

<b>Principio attivo</b>	<b>Pagine</b>	<b>N° abstract</b>
Bromocriptina	pag. 2-16	14
Cabergolina	pag. 16-20	4
Calcio	pag. 21-83	62
Condroitinsolfato	pag. 84-109	25
Melatonina	pag. 110-201	91
Octreotide	pag. 202-296	94
Retinoidi	pag. 297-529	232
Somatostatina	pag. 530-640	109
Somatostatina e octreotide	pag. 641-681	40
Vitamina C	pag. 682-792	110
Vitamina D3	pag. 793-1005	212
Vitamina E	pag. 1006-1164	158

## BROMOCRIPTINA

1: Tam NN, Szeto CY, Freudenberg JM, Fullenkamp AN, Medvedovic M, Ho SM.

### **Research resource: estrogen-driven prolactin-mediated gene-expression networks in hormone-induced prostatic intraepithelial neoplasia.**

Mol Endocrinol. 2010Nov;24(11):2207-17. Epub 2010 Sep 22. PubMed PMID: 20861223; PubMed CentralPMCID: PMC2958750.

Cotreatment with testosterone (T) and 17 $\beta$ -estradiol (E2) is an established regimen for inducing of prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) and prostate cancer in rodent models. We previously used the pure antiestrogen ICI 182,780 (ICI) and bromocriptine, a dopamine receptor agonist, to inhibit PIN induction and systemic hyperprolactinemia in Noble rats and found that the carcinogenic action of T+E2 is mediated directly by the effects of E2 on the prostate and/or indirectly via E2-induced hyperprolactinemia. In this study, we delineate the specific action(s) of E2 and prolactin (PRL) in early prostate carcinogenesis by an integrated approach combining global transcription profiling, gene ontology, and gene-network mapping. We identified 2504 differentially expressed genes in the T+E2-treated lateral prostate. The changes in expression of a subset of 1990 genes (~80%) were blocked upon cotreatment with ICI and bromocriptine, respectively, whereas those of 262 genes (~10%) were blocked only by treatment with ICI, suggesting that E2-induced pituitary PRL is the primary mediator of the prostatic transcriptional response to the altered hormone milieu. Bioinformatics analyses identified hormone-responsive gene networks involved in immune responses, stromal tissue remodeling, and the ERK pathway. In particular, our data suggest that IL-1 $\beta$  may mediate, at least in part, hormone-induced changes in gene expression during PIN formation. Together, these data highlight the importance of pituitary PRL in estrogen-induced prostate tumorigenesis. The identification of both E2- and pituitary PRL-responsive genes provides a comprehensive resource for future investigations of the complex mechanisms by which changes in the endocrine milieu contribute to prostate carcinogenesis in vivo.

### **Ricerca di risorse: reti dell'espressione dei geni mediate dalla prolattina e guidata dagli estrogeni nelle neoplasie intraepiteliali prostatiche indotte dagli ormoni.**

Il cotrattamento con testosterone (T) ed 17 $\beta$ -estradiol (E2) nei modelli murini viene usato per indurre la neoplasia prostatica intraepiteliale (PIN) e il cancro prostatico. Abbiamo usato precedentemente l'antiestrogeno puro ICI 182,780 (ICI) e la bromocriptina, un agonista del recettore della dopamina, per inibire l'induzione di PIN e della iperprolattinemia sistemica in ratti Noble e abbiamo osservato che l'azione carcinogenica di T+E2 è mediata direttamente tramite gli effetti di E2 sulla prostata e/o indirettamente tramite l'iperprolattinemia indotta da E2. In questo studio, abbiamo delineato l'azione specifica di E2 e della prolattina (PRL) nella carcinogenesi prostatica precoce tramite un approccio integrato con il profilo di trascrizione globale, l'ontologia dei geni, e la mappa genica. Abbiamo identificato 2504 geni espressi diversamente nella prostata trattata con T+E2. I cambiamenti nell'espressione di un sottoinsieme di 1990 geni (~80%) sono bloccati dal cotrattamento con ICI e bromocriptina, rispettivamente, mentre 262 geni (~10%) sono bloccati solo dal trattamento con ICI, suggerendo che PRL pituitaria indotta da E2 è il mediatore primario della risposta trascrizionale prostatica all'ambiente ormonale alterato. Analisi bioinformatiche hanno identificato la rete genica di risposta all'ormone coinvolta nella risposta immunitaria, nel rimodellamento del tessuto stromale, e nella via di segnale ERK. In particolare, i nostri dati suggeriscono che IL-1 $\beta$  può mediare, almeno in parte, cambiamenti indotti dall'ormone

nell'espressione genica durante la formazione di PIN. Insieme, questi dati evidenziano l'importanza di PRL pituitaria nella tumorigenesi prostatica indotta dagli estrogeni. L'identificazione dei geni di E2 e PRL pituitaria fornisce una risorsa per le ricerche future sul complesso meccanismo che può contribuire al cambiamento nell'ambito endocrino della la carcinogenesi prostatica in vivo.

14: de Leeuw van Weenen JE, Parlevliet ET, Maechler P, Havekes LM, Romijn JA, Ouwens DM, Pijl H, Guigas B.

**The dopamine receptor D2 agonist bromocriptine inhibits glucose-stimulated insulin secretion by direct activation of the alpha2-adrenergic receptors in beta cells.**

Biochem Pharmacol. 2010 Jun15;79(12):1827-36. Epub 2010 Feb 4. PubMed PMID: 20138024.

Treatment with the dopamine receptor D2 (DRD2) agonist bromocriptine improves metabolic features in obese patients with type 2 diabetes by a still unknown mechanism. In the present study, we investigated the acute effect of bromocriptine and its underlying mechanism(s) on insulin secretion both in vivo and in vitro. For this purpose, C57Bl6/J mice were subjected to an intraperitoneal glucose tolerance test (ipGTT) and a hyperglycemic (HG) clamp 60min after a single injection of bromocriptine or placebo. The effects of bromocriptine on glucose-stimulated insulin secretion (GSIS), cell membrane potential and intracellular cAMP levels were also determined in INS-1E beta cells. We report here that bromocriptine increased glucose levels during ipGTT in vivo, an effect associated with a dose-dependent decrease in GSIS. During the HG clamp, bromocriptine reduced both first-phase and second-phase insulin response. This inhibitory effect was also observed in INS-1E beta cells, in which therapeutic concentrations of bromocriptine (0.5-50nM) decreased GSIS. Mechanistically, neither cellular energy state nor cell membrane depolarization was affected by bromocriptine whereas intracellular cAMP levels were significantly reduced, suggesting involvement of G-protein-coupled receptors. Surprisingly, the DRD2 antagonist domperidone did not counteract the effect of bromocriptine on GSIS, whereas yohimbine, an antagonist of the alpha2-adrenergic receptors, completely abolished bromocriptine-induced inhibition of GSIS. In conclusion, acute administration of bromocriptine inhibits GSIS by a DRD2-independent mechanism involving direct activation of the pancreatic alpha2-adrenergic receptors. We suggest that treatment with bromocriptine promotes beta cells rest, thereby preventing long-lasting hypersecretion of insulin and subsequent beta cell failure.

**La bromocriptina, agonista del recettore della dopamina D2, nelle cellule beta inibisce la secrezione dell'insulina stimolata dal glucosio tramite l'attivazione diretta dei recettori adrenergici alpha-2.**

Il trattamento con l'agonista del recettore della dopamina D2(DRD2) la bromocriptina è in grado di migliorare le caratteristiche metaboliche in pazienti obesi con diabete di tipo 2 tramite un meccanismo ancora sconosciuto. Nel presente studio, abbiamo indagato l'effetto acuto della bromocriptina e il meccanismo attraverso il quale agisce sulla secrezione di insulina in vivo e in vitro. Per questo scopo, topi C57Bl6/J hanno eseguito un test di tolleranza al glucosio intraperitoneale (ipGTT) e un clamp iperglicemico 60 minuti dopo l'iniezione di bromocriptina o placebo. Gli effetti della bromocriptina sulla secrezione insulinica stimolata dal glucosio (GSIS), sul potenziale di membrana cellulare e sui livelli intracellulari di cAMP sono stati determinati anche nelle cellule INS-1E beta. Abbiamo osservato che la bromocriptina aumenta i livelli di glucosio durante ipGTT in vivo, un effetto associato alla diminuzione dose-dipendente sulla GSIS. Durante il clamp HG, la bromocriptina riduce la prima fase e la seconda fase della risposta insulinica. Questo effetto inibitorio si osserva anche nelle cellule INS-1E beta, nelle quali concentrazione terapeutiche di bromocriptina (0.5-50nM) diminuiscono la GSIS. Né lo stato energetico cellulare né la depolarizzazione di membrana sono influenzati dalla bromocriptina mentre i livelli intracellulari di

cAMP vengono diminuiti, questo suggerisce il coinvolgimento di recettori accoppiati a proteine G. Sorprendentemente, l'antagonista domperidone DRD2 non neutralizza l'effetto della bromocriptina sulla GSIS, mentre yohimbine, un antagonista dei recettori adrenergici-alpha-2, abolisce completamente l'inibizione della GSIS indotta dalla bromocriptina. In conclusione, somministrazioni di bromocriptina inibiscono la GSIS tramite un meccanismo indipendente da DRD2 che coinvolge l'attivazione diretta dei recettori adrenergici alpha-2. Sugeriamo che il trattamento con bromocriptina possa promuovere l'arresto delle cellule beta, prevenendo l'ipersecrezione di insulina a lunga durata, e il decadimento conseguente delle cellule beta.

16: Salehi F, Kovacs K, Scheithauer BW, Cantelmi D, Horvath E, Lloyd RV, Cusimano M.

**Immunohistochemical expression of pituitary tumor transforming gene (PTTG) in pituitary adenomas: a correlative study of tumor subtypes.**

Int J Surg Pathol.2010 Feb;18(1):5-13. PubMed PMID: 20106827.

**OBJECTIVE:** We investigated the correlation between immunohistochemical expression of the pituitary tumor transforming gene (PTTG) and pituitary adenoma subtype.

**METHODS:** Pituitary adenomas (n = 89) were stained for PTTG using the streptavidin-biotin-peroxidase complex method and a monoclonal PTTG antibody.

**RESULTS:** PTTG staining was found to be cytoplasmic with a pronounced paranuclear expression pattern. Reactivity was highest in growth hormone (GH) adenomas as compared with other tumors, including prolactin (GH) follicle-stimulating hormone/luteinizing hormone/alpha subunit, as well as adrenocorticotrophic hormone-secreting adenomas. PRL adenomas exhibited the lowest expression levels. Among GH adenomas, untreated tumors demonstrated significantly higher PTTG levels than octreotide-treated examples. Although dopamine agonist-treated PRL adenomas tended to show lower expression levels, statistical significance was not reached.

**CONCLUSIONS:** Our finding that PTTG was differentially expressed in pituitary adenoma subtypes suggests a cell-specific function for PTTG. Moreover, treatment of GH adenomas with somatostatin analogues lowered PTTG expression. Further investigation into mechanisms mediating cell-specific expression of PTTG is warranted.

**Espressione immunoistochimica del gene (PTTG) che causa tumore pituitario negli adenoma pituitari: uno studio di correlazione tra i sottotipi tumorali.**

**OBIETTIVI:** Abbiamo indagato la correlazione tra l'espressione immunoistochimica del gene che causa tumore pituitario (PTTG) e il tipo di adenoma pituitario.

**METODI:** Adenomi pituitari (n = 89) sono stati colorati per la ricerca di PTTG usando il metodo ossidasi-streptavidina-biotina e un anticorpo monoclonale anti-PTTG.

**RISULTATI:** E' stato osservato che la colorazione PTTG è citoplasmatica con un pattern di espressione paranucleare. La reattività è alta negli adenomi con ormone della crescita (GH) se confrontata agli altri tumori, includendo la subunità alfa/ormone luteinizzante/ormone stimolante il follicolo della prolattina, come succede negli adenomi secernenti l'ormone adrenocorticotrofico. Gli adenomi PRL hanno livelli di espressione bassi. Tra gli adenomi GH, i tumori non trattati hanno mostrato alti livelli di PTTG rispetto agli esempi trattati con octreotide. Sebbene gli adenomi PRL trattati con l'agonista della dopamina sembrano mostrare livelli di espressione bassi, non ci sono evidenze statistiche di ciò.

**CONCLUSIONI:** La nostra scoperta che PTTG è espresso diversamente nei sottotipi di adenomi pituitari suggerisce che PTTG abbia una funzione cellulo-specifica. Inoltre, il trattamento degli adenomi GH con gli analoghi della somatostatina diminuiscono l'espressione di PTTG. Sono necessari ulteriori studi per capire i meccanismi cellulo-specifici che mediano l'espressione di PTTG.

17: Wu ZB, Zheng WM, Su ZP, Chen Y, Wu JS, Wang CD, Lin C, Zeng YJ, Zhuge QC.

**Expression of D2RmRNA isoforms and ERmRNA isoforms in prolactinomas: correlation with the response to bromocriptine and with tumor biological behavior.**

JNeurooncol. 2010 Aug;99(1):25-32. Epub 2010 Jan 9. PubMed PMID: 20063113.

Invasive prolactinomas are more likely to be resistant to drug therapy but the mechanism of this is still unknown. The objective of this study was to analyze the different expression of ERmRNA and D2RmRNA isoforms in prolactinomas responsive and resistant to dopamine agonist (DA), and to discuss the correlation of such gene expression with tumor biological behavior. A prospective study of 20 consecutive patients who harbored prolactinomas was designed. Patients were classified as responsive (14 cases) or resistant (six cases) according to their clinical and biochemical response to bromocriptine. Tumor tissue samples were examined by means of QRT-PCR analysis. Median D2SmRNA expression in responsive patients was about 2.5-fold that in resistant ones (13.5 +/- 10.4 and 5.4 +/- 2.4, respectively, P = 0.09). No significant difference was found between D2LmRNA expression levels (P = 0.77). However, there was a significant difference between D2S/D2LmRNA ratios for responsive and resistant tumors (P = 0.012). A significant difference was not found between these two groups in levels of ERalphamRNA and ERbetamRNA expression (P = 0.20 and 0.06, respectively). D2SmRNA expression was significantly different for invasive and noninvasive tumors (6.2 +/- 3.6 vs. 17.0 +/- 11.2, respectively, P = 0.02). The D2S/D2L ratio is related to the responsiveness of prolactinomas to DA medication, in which D2SmRNA plays an important role. Lower expression of D2SmRNA in invasive tumor patients suggests that invasive prolactinomas may be more likely to be resistant to DA medication.

**Espressione delle isoforme di D2RmRNA e di ERmRNA nei prolattinomi: correlazione tra la risposta alla bromocriptina e il comportamento biologico del tumore.**

I prolattinomi invasivi sono resistenti ai farmaci ma il meccanismo è ancora sconosciuto. L'obiettivo di questo studio è di analizzare la diversa espressione di ERmRNA e delle isoforme di D2RmRNA nei prolattinomi responsivi e resistenti all'agonista della dopamina (DA), e di discutere la correlazione tra l'espressione genica e il comportamento biologico del tumore. È stato effettuato uno studio prospettico su 20 pazienti con prolattinoma. I pazienti, in base alle risposte cliniche e biochimiche alla bromocriptina, sono stati classificati come responsivi (14 casi) o resistenti (6 casi). I campioni con tessuto tumorale sono stati esaminati tramite la tecnica della QRT-PCR. L'espressione media di D2SmRNA nei pazienti responsivi era di circa 2.5 volte rispetto a quelli resistenti (13.5 +/- 10.4 and 5.4 +/- 2.4, rispettivamente, P = 0.09). Nessuna differenza significativa è stata osservata tra i livelli di espressione di D2LmRNA (P = 0.77). Tuttavia, non è stata osservata nessuna differenza significativa tra i due gruppi nei livelli di espressione di ERalphamRNA e ERbetamRNA (P = 0.20 and 0.06, rispettivamente). L'espressione di D2SmRNA è diversa nei tumori invasivi e non invasivi (6.2 +/- 3.6 vs. 17.0 +/- 11.2, rispettivamente, P = 0.02). La percentuale di D2S/D2L è collegata alla reattività dei prolattinomi al trattamento con DA, nei quali D2SmRNA ha un ruolo importante. Bassi livelli di espressione di D2SmRNA nei pazienti con tumore invasivo suggeriscono che i prolattinomi invasivi possano essere più facilmente resistenti al trattamento con DA.

20: Lania AG, Ferrero S, Pivonello R, Mantovani G, Peverelli E, Di Sarno A, Beck-Peccoz P, Spada A, Colao A.

**Evolution of an aggressive prolactinoma into a growth hormone secreting pituitary tumor coincident with GNAS gene mutation.**

Clin Endocrinol Metab. 2010 Jan;95(1):13-7. Epub 2009 Nov 4. PubMed PMID:19890024.

CONTEXT: Mixed PRL- and GH-secreting pituitary adenomas are relatively common because somatotrophs and lactotrophs share the common somato-mammotroph progenitor lineage.

Conversely, the occurrence of a prolactinoma evolving into clinically and biochemically active acromegaly is a rare phenomenon.

OBJECTIVE AND RESULTS: We report a patient with a prolactinoma who after 15 yr of disease control by bromocriptine became resistant to dopaminergic drugs and due to the rapid tumor growth was submitted to four neurosurgeries and two stereotactic radiotherapies in the subsequent 5 yr. Unexpectedly, in the last 1.5 yr, after the fourth neurosurgery and second gamma-knife, she complained of signs and symptoms of acromegaly that was biochemically confirmed. Histological examination of the surgical specimens revealed high Ki67 and p53 and low D2 receptor expression. Although samples from the initial surgery were positive for prolactin and negative for GH, about 10% of GH-positive cells were detected in tissue from the last surgery, consistent with the observed clinical shift to acromegaly. Molecular screening failed to find mutations in RAS, TP53, and BRAF hot spots, whereas Arg201His mutation in GNAS gene (gsp oncogene), absent in the previous surgical materials, was detected in the tumor from the last surgery, which was found to be monoclonal. CONCLUSIONS: These observations suggest that 1) treatment of prolactinomas resistant to dopaminergic drugs is still a challenge, and 2) the appearance of gsp oncogene in a prolactinoma evolving into acromegaly might be the underlying mechanism of this rare transition, further confirming that this mutational change is associated with somatotroph growth and transformation.

**Evoluzione di un prolattinoma aggressivo in un tumore ipofisario GH secernente coincidente con mutazione del gene GNAS.**

CONTESTO: Gli adenomi PRL e GH-secernenti misti sono relativamente comuni perché le cellule somatotrope e lattotrope hanno una linea progenitrice comune somato-mammotrofica. Al contrario, la presenza di un prolattinoma che evolve clinicamente e biochimicamente in acromegalia attiva è un fenomeno raro.

OBIETTIVI E RISULTATI: Segnaliamo un paziente con un prolattinoma che dopo 15 anni di lotta contro la malattia e controllato con bromocriptina è diventato resistente ai farmaci dopaminergici e grazie alla rapida crescita del tumore è stato sottoposto a quattro interventi di neurochirurgia e due radioterapie stereotassiche nei successivi 5 anni. Inaspettatamente, nel corso dell'ultimo anno e mezzo, dopo la quarta neurochirurgia e la seconda radioterapia, si è lamentata di segni e sintomi di acromegalia, che è stata confermata biochimicamente. L'esame istologico del pezzo operatorio ha rivelato un'alta espressione Ki67 e p53 e bassa dei recettori D2. Anche se i campioni dal primo intervento sono stati positivi per la prolattina e negativo per il GH, circa il 10% delle cellule GH-positivi sono stati rilevati nel tessuto da ultimo l'intervento, in coerenza con il passaggio clinici osservati per acromegalia. Lo screening molecolare non è riuscito a trovare mutazioni di RAS, TP53, BRAF e punti caldi, mentre in Arg201His è stata evidenziata una mutazione nel gene GNAS (oncogene gsp), assente nel precedente materiale chirurgico, è stato rilevato nel tumore della precedente chirurgia, che è risultato essere monoclonali.

CONCLUSIONI: Queste osservazioni suggeriscono che 1) il trattamento di prolattinomi resistenti ai farmaci dopaminergici è ancora una sfida, e 2) la comparsa di oncogene gsp in un prolattinoma che evolve in acromegalia potrebbe essere il meccanismo raro alla base di questa transizione, ad

ulteriore conferma che questo cambiamento mutazionale è associato con somatotropi crescita e trasformazione.

24: Stanosz S.

**An attempt at conservative treatment in selected cases of type I endometrial carcinoma (stage I a/G1) in young women.**

Eur J Gynaecol Oncol.2009;30(4):365-9. PubMed PMID: 19761123.

**PURPOSE:** The aim of the study was to evaluate an attempt of conservative treatment in selected cases of endometrial carcinoma Stage I A/type I in young women.

**MATERIALS AND METHODS:** The study comprised five young nulliparous women aged 24-38 (30.8 +/- 4.2) with well-defined type I endometrial carcinoma Stage I A/G1. Diagnostic dilatation and curettage (D&C) in these women was performed. Biochemical hormonal studies comprised the assessment of estrone, estradiol, progesterone, prolactin in basal conditions, prolactin after a metoclopramide test and total testosterone. In the treatment phase estriol was given intravaginally. Additionally progesterone was applied for 12 days in the second phase of therapeutic cycles. Moreover the women were given ergocryptine and metformin.

**RESULTS:** After six months of therapy and during two years of follow-up histopathological examinations of material obtained from D&C the endometrial pattern was normal and free of cancer cells.

**CONCLUSIONS:** 1) In selected cases the conservative treatment of young women diagnosed with type I endometrial carcinoma Stage I A/G1 could be indicated. 2) Conservative pharmacological treatment of young women with well-defined endometrial carcinoma Stage I A/G1 type I should be monitored with followup histopathological examinations of material obtained from D&C of the endometrium and assessment of concentrations of sex hormones in the serum. 3) This kind of therapy requires frequent and thorough gynecological and clinical follow-up.

**Tentativo di trattamento conservativo in casi selezionati di carcinoma endometriale di tipo I (stadio I a/G1) nelle donne giovani**

**SCOPO:** Lo scopo dello studio è stato di valutare un trattamento conservativo in casi selezionati di carcinoma endometriale di tipo I stadio A / I tipo in giovani donne.

**MATERIALI E METODI:** Lo studio è composto da cinque giovani donne nullipare di età compresa tra 24-38 (30,8 + / - 4.2) con un ben definito carcinoma endometriale di tipo I stadio IA/G1. In queste donne è stata effettuata dilatazione e raschiamento diagnostico (D & C). Gli studi biochimici ormonali comprendevano la valutazione di estrone, estradiolo, progesterone, prolattina in condizioni basali, la prolattina dopo un test metoclopramide e testosterone totale. Nella fase di trattamento l'estriolo è stato dato per via intravaginale. Inoltre il progesterone è stato applicato per 12 giorni nella seconda fase dei cicli terapeutici. Inoltre, le donne hanno avuto ergocriptine e metformina.

**RISULTATI:** Dopo sei mesi di terapia e nel corso di due anni di esami di follow-up istopatologico del materiale ottenuto da D & C il pattern endometriale era normale e privo di cellule tumorali.

**CONCLUSIONI:** 1) In casi selezionati il trattamento conservativo delle giovani donne con diagnosi di carcinoma endometriale di tipo I livello IA/G1 potrebbe essere indicato. 2) trattamento farmacologico conservativo di giovani donne con ben definite stadi di carcinoma dell'endometrio A/G1 di tipo I devono essere monitorati con follow, esami istopatologici di materiale ottenuto da D & C dell'endometrio e di valutazione delle concentrazioni di ormoni sessuali nel siero. 3) Questo tipo di terapia richiede frequenti e approfonditi follow-up ginecologici e clinici.

29: Palmeri CM, Petiti JP, Sosa Ldel V, Gutiérrez S, De Paul AL, Mukdsi JH, Torres AI.

**Bromocriptine induces paraptosis as the main type of cell death responsible for experimental pituitary tumor shrinkage.**

Toxicol Appl Pharmacol.2009 Oct 1;240(1):55-65. Epub 2009 Jul 10. PubMed PMID: 19595700.

Bromocriptine (Bc) produces pituitary tumoral mass regression which induces the cellular death that was classically described as apoptosis. However, recent works have related that other mechanisms of cell death could also be involved in the maintenance of physiological and pathological pituitary homeostasis. The aim of this study was to evaluate and characterize the different types of cell death in the involution induced by Bc in experimental rat pituitary tumors. The current study demonstrated that Bc induced an effective regression of estrogen induced pituitary tumors by a mechanism identified as paraptosis. This alternative cell death was ultrastructurally recognized by extensive cytoplasmic vacuolization and an increased cell electron density, represented around 25% of the total pituitary cells counted. Furthermore, the results obtained from biochemical assays did not correspond to the criteria of apoptosis or necrosis. We also investigated the participation of p38, ERK1/2 and PKC delta in the paraptotic pathway. An important observation was the significant increase in phosphorylated forms of these MAPKs, the holoenzyme and catalytic fragments of PKC delta in nuclear fractions after Bc administration compared to control and estrogen treated rats. Furthermore, the immunolocalization at ultrastructural level of these kinases showed a similar distribution pattern, with a prevalent localization at nuclear level in lactotrophs from Bc treated rats. In summary, we determined that paraptosis is the predominant cell death type involved in the regression of pituitary tumors in response to Bc treatment, and may cause the activation of PKC delta, ERK1/2 and p38.

**Bromocriptina induce paraptosi come il principale tipo di morte cellulare responsabile della diminuzione di tumori pituitari.**

La bromocriptina produce una regressione della massa del tumore pituitario che provoca la morte cellulare, chiamata apoptosi. Tuttavia, studi recenti hanno rivelato che nel mantenimento dell'omeostasi fisiologica e patologica pituitaria potrebbero essere coinvolti altri meccanismi di morte cellulare. Lo scopo di questo studio è di valutare e caratterizzare i diversi tipi di morte cellulare indotta da Bc nei tumori pituitari dei ratti. Questo studio mostra che Bc, nei tumori pituitari, induce una regressione degli estrogeni indotti tramite un meccanismo identificato come paraptosi. Questa morte cellulare alternativa è caratterizzata da una vacuolizzazione citoplasmatica e un aumento della densità elettronica intracellulare, che rappresenta il 25% della totalità di cellule pituitarie. Inoltre, i risultati ottenuti dai test biochimici non corrispondono ai criteri di apoptosi o necrosi. Abbiamo anche indagato la partecipazione di p38, ERK1/2 e PKC delta nella via paraptotica. Un'importante osservazione è stato l'aumento significativo dopo la somministrazione di Bc delle forme fosforilate di questi MAPKs, dei frammenti oloenzimi e catalitici di PKC delta nelle frazioni nucleari se confrontati ai controlli e ai ratti trattati con estrogeni. Inoltre, la immunolocalizzazione a livello ultrastrutturale di queste chinasi mostra un pattern di distribuzione simile, con una localizzazione prevalente a livello nucleare nei lattotrofi nei ratti trattati con Bc. Abbiamo determinato che la paraptosi è il tipo di morte cellulare più coinvolto nella regressione dei tumori pituitari in risposta al trattamento con Bc, e può causare l'attivazione di PKC delta, ERK1/2 e p38.

33: Yavasoglu I, Kucuk M, Coskun A, Guney E, Kadikoylu G, Bolaman Z.

### **Polycystic ovary syndrome and prolactinoma association.**

Intern Med. 2009;48(8):611-3. Epub2009 Apr 15. PubMed PMID: 19367058.

Hyperprolactinemia is the most common pituitary hormone hypersecretion syndrome in both men and women. Polycystic ovary syndrome (PCOS) is one of the most common endocrinopathies affecting 5%-10% of reproductive age women. Here, we present a patient with irregular menses, obesity, hirsutism and infertility, and hyperprolactinemia who was diagnosed as PCOS and prolactinoma and admitted to our clinic. Prolactinoma and PCOS association is a rare condition. This 33-year-old woman was admitted to the internal medicine outpatient clinic for irregular menses, obesity, hirsutism and infertility, and hyperprolactinemia. Her laboratory results were as follows: prolactin was 74 ng/mL (normal range:1.8-20.3 ng/mL). Pelvic ultrasonography was correlated with polycystic ovary syndrome. Pituitary MRI showed 6x8 mm microadenoma at left half. Bromocriptine was started with 1.25 mg/day and increased to 5 mg/day. After six months of bromocriptine treatment her prolactin level was normal and no adenoma was detected in pituitary MRI. PCOS and prolactinoma association should be taken into account in PCOS cases with mild hyperprolactinoma.

### **Associazione tra la sindrome dell'ovaio policistico e il prolattinoma**

L'iperprolattinemia è la sindrome caratterizzata da ipersecrezione dell'ormone pituitario più comune sia negli uomini che nelle donne. La sindrome dell'ovaio policistico (PCOS) è una delle più comuni endocrinopatie che interessa il 5-10% delle donne in età fertile. Abbiamo presentato una paziente afferente alla nostra clinica che presentava mestruazioni irregolari, obesità, irsutismo e infertilità, e iperprolattinemia a cui è stata diagnosticata PCOS e prolattinoma. Prolattinoma associato a PCOS è raro. Questa donna di 33 anni è stata ricoverata nel reparto di medicina interna per mestruazioni irregolari, obesità, irsutismo, infertilità e iperprolattinemia. I risultati laboratoristici sono i seguenti: prolattina 74 ng/mL (normal range:1.8-20.3 ng/mL). L'indagine pelvica ad ultrasuoni è correlata alla sindrome dell'ovaio policistico. MRI pituitaria ha mostrato un microadenoma di 6x8 mm. La somministrazione di bromocriptina è partita con 1.25 mg/giorno ed è stata aumentata a 5 mg/giorno. Dopo 6 mesi di trattamento con bromocriptina i livelli di prolattina erano normali e nella MRI pituitaria, non è stato rilevato nessun adenoma. Nei casi di PCOS con leggera iperprolattinemia dovrebbe essere preso in considerazione la possibile presenza dell'associazione PCOS e prolattinoma.

36: Yoshida M, Watanabe G, Suzuki T, Inoue K, Takahashi M, Maekawa A, Taya K, Nishikawa A.

**Long-term treatment with bromocriptine inhibits endometrial adenocarcinoma development in rats.**

J Reprod Dev. 2009 Apr;55(2):105-9. Epub 2008Dec 24. PubMed PMID: 19106489.

The effects of long-term blockade of prolactin (PRL) action by bromocriptine (BRC) treatment on uterine carcinogenesis and on related ovarian physiology were investigated using a rat uterine cancer model. Ten-week-old cycling female Donryu rats, a high yield strain for uterine corpus tumors (endometrial adenocarcinomas), were treated with N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (ENNG), as a tumor initiator, and injected with 1 mg/kg body weight BRC subcutaneously 4 times per week until 14.5 months of age to block the proestrus PRL surge. The study was terminated at 15 months of age, and the results showed that long-term BRC treatment significantly inhibited endometrial adenocarcinoma development in terms of both incidence (34.6% to 13.0% with significant difference at 5%) and multiplicity (0.35 to 0.18 with significant difference at 5%), which indicates the number of adenocarcinomas per animals. While BRC did not affect estrous cyclicity in the treated animals, a significant decline was evident in the serum 17 beta-estradiol (E2) to progesterone (P) ratio (E: P ratio), and the serum E2 level showed a decreased tendency at 15 months of age. While the precise pathway to the inhibitory effect could not be determined; the pathway by which ovarian hormonal imbalance decreases the serum E: P ratio most likely plays a crucial role.

**Un trattamento a lungo termine con bromocriptina inibisce lo sviluppo di adenocarcinoma endometriale nei ratti**

Abbiamo osservato gli effetti della bromocriptina (BRC) sul blocco a lungo termine della prolattina (PRL) nella carcinogenesi uterina e nella fisiologia dell'ovaio usando un modello di cancro uterino nel ratto. Ratti femmine Donryu di 10 settimane, un ceppo che produce facilmente tumori del corpo uterino (adenocarcinoma endometriali) sono stati trattati con N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (ENNG), come iniziatore tumorale, e BRC 1mg/ per Kg di peso corporeo tramite un'iniezione sottocutanea 4 volte a settimana fino a 14.5 mesi per bloccare l'aumento di PRL. Lo studio è terminato a 15 mesi d'età, e i risultati hanno mostrato che un trattamento a lungo termine con BRC inibisce significativamente lo sviluppo di adenocarcinomi endometriali in termini di incidenza (34.6% to 13.0% with significant difference at 5%) e molteplicità (0.35 to 0.18 with significant difference at 5%), che indica il numero di adenocarcinomi per animale. Mentre BRC non influenza la ciclicità estrale negli animali trattati, è stata evidenziata nel siero una diminuzione significativa della percentuale di 17 beta-estradiolo (E2) e progesterone e il livello sierico di E2 ha mostrato una tendenza alla diminuzione a 15 mesi di età. Mentre non è ancora stato identificato il meccanismo preciso degli effetti inibitori, il meccanismo attraverso il quale lo squilibrio degli ormoni ovarici diminuisce la percentuale sierica di E: P può avere un ruolo fondamentale.

38: Sughrue ME, Chang EF, Tyrell JB, Kunwar S, Wilson CB, Blevins LS Jr.

**Pre-operative dopamine agonist therapy improves post-operative tumor control following prolactinoma resection.**

Pituitary. 2009;12(3):158-64. PubMed PMID:18651225.

**OBJECTIVE:** Normalization of serum prolactin concentrations in patients with prolactinomas is an accepted endpoint of therapy. Clinical signs and symptoms of hyperprolactinemia are usually resolved when prolactin levels are lowered to within the normal range. While most patients are treated with dopamine agonist drugs, some patients require surgical resection of their tumors. We sought to determine whether preoperative treatment with dopamine agonists alters the outcome of surgical intervention.

**METHODS AND RESULTS:** We present an analysis of 253 patients with prolactinomas treated surgically during the period of time when dopamine agonist therapy was first introduced and prior to its widespread use as first-line therapy. We compared both short- and long-term outcomes of patients treated with dopamine agonists prior to surgery with those undergoing surgery as their initial treatment modality. Our data showed that that patients treated with dopamine agonists prior to surgery experienced greater reductions in prolactin levels, had lower prolactin levels, were more likely to have normal prolactin levels at long term follow-up, and were less likely to require additional therapy to control their prolactin levels.

**CONCLUSION:** Our study provides strong evidence suggesting that, regardless of initial prolactin level, preoperative dopamine agonist therapy is not detrimental. In fact, pretreatment with dopamine agonist drugs, possibly by inducing tumor regression, seemed to improve the surgeon's ability to resect a greater percentage of the tumor and led to better control of the prolactin level.

**La terapia pre-operatoria con agonisti della dopamina seguita alla resezione del prolattinoma migliora la funzione di controllo post-operatorio del tumore**

**OBIETTIVO:** La normalizzazione della concentrazione di prolattina nel siero nei pazienti con prolattinoma è un obiettivo terapeutico accettabile. I segni clinici e i sintomi dell'iperprolattinemia si risolvono quando i livelli di prolattina sono vicini al range normale. Mentre molti pazienti sono trattati con farmaci agonisti della dopamina, alcuni pazienti necessitano dell'intervento chirurgico in questi tumori. Abbiamo cercato di capire se il trattamento pre-operatorio con gli agonisti della dopamina altera l'esito dell'intervento chirurgico.

**METODI E RISULTATI:** Abbiamo presentato un'analisi di 253 pazienti con prolattinomi trattati chirurgicamente durante il periodo di tempo in cui la terapia con agonisti della dopamina era stata introdotta da poco e prima del suo uso diffuso come terapia di prima linea. Abbiamo confrontato gli esiti a breve e a lungo termine del trattamento con agonisti della dopamina precedente alla chirurgia con quelli che hanno fatto uso della chirurgia come trattamento iniziale. I nostri dati mostrano che i pazienti che hanno eseguito un trattamento con agonisti della dopamina precedente alla chirurgia evidenziano una grossa riduzione nei livelli di prolattina, hanno bassi livelli di prolattina, presentano al follow up a lungo termine livelli normali di prolattina più facilmente, e non richiedono solitamente terapie addizionali per controllare i livelli di prolattina.

**CONCLUSIONI:** Il nostro studio fornisce forti evidenze che suggeriscono che, riguardo ai livelli iniziali di prolattina, la terapia pre-operatoria con agonisti della dopamina non è dannosa. Infatti, un pretrattamento con farmaci agonisti della dopamina, inducendo la regressione del tumore, sembra migliorare le potenzialità della chirurgia nel ridurre una grossa porzione del tumore e porta a un miglioramento del controllo dei livelli di prolattina.

39: Saveanu A, Jaquet P.

### **Somatostatin-dopamine ligands in the treatment of pituitary adenomas.**

Rev Endocr Metab Disord. 2009 Jun;10(2):83-90. Epub 2008 Jul 24. Review. PubMed PMID: 18651224.

Somatostatin receptors (sst1-5) and dopamine receptor 2 (D2DR) are well expressed and co-localized in several human pituitary adenomas, suggesting possible functional interactions in the control of hormonal hypersecretion and tumor cell growth. The present review describes the expression and functionality of these receptors in the different classes of human pituitary adenomas. The sst2 agonists, octreotide and lanreotide, control GH hypersecretion and tumor growth in about 65% of somatotropinomas. The D2DR agonists, bromocriptine and cabergoline, control about 90% of prolactinomas. Such drugs are much less effective in the control of the others pituitary adenomas also expressing ssts and D2DR receptors. The second part summarizes the current knowledge on new chimeric compounds with sst2, sst5, and D2DR affinity. Such ligands bearing distinct ssts and DRD2 pharmacophores may synergistically produce an increased control of secretion and/or of proliferation in the different types of pituitary adenomas. The mechanisms of action of such chimeric molecules through increased binding affinities, prolonged bioavailability, ligand-induced modulation of receptors heterodimerization, are discussed.

### **Ligandi somatostatina-dopamina nel trattamento degli adenoma pituitari**

I recettori della somatostatina (sst1-5) e il recettore della dopamina 2 (D2DR) vengono espressi e sono colocalizzati in molti adenomi pituitari umani, suggerendo possibili interazioni funzionali nel controllo dell'ipersecrezione ormonale e della crescita tumorale della cellula. La presente review descrive l'espressione e la funzionalità di questi recettori nelle diverse classi di adenomi pituitari umani. Gli agonisti di sst2, octreotide e lanreotide, controllano l'ipersecrezione del GH e la crescita tumorale nel circa 65% dei somatotropinomi. Gli agonisti di D2DR, la bromocriptina e la cabergolina, controllano circa il 90% dei prolattinomi. Questi farmaci sono molto meno efficaci nel controllo di altri adenomi pituitari che esprimono ugualmente ssts e D2DR. La seconda parte riassume le conoscenze su nuovi composti chimerici con affinità per sst2, sst5, e D2DR. Alcuni ligandi, avendo diversi fori per ssts e DRD2, possono produrre un aumento nel controllo della secrezione e/o proliferazione nei diversi tipi di adenoma pituitario. Vengono discussi il meccanismo di azione di queste molecole chimeriche che, attraverso un aumento delle affinità di legame, prolunga la biodisponibilità, e la modulazione dei recettori di eterodimerizzazione indotta dal ligando.

Mol Endocrinol. 2010 Nov;24(11):2207-17. Epub 2010 Sep 22.

**Research resource: estrogen-driven prolactin-mediated gene-expression networks in hormone-induced prostatic intraepithelial neoplasia.**

Tam NN, Szeto CY, Freudenberg JM, Fullenkamp AN, Medvedovic M, Ho SM.

Department of Environmental Health, University of Cincinnati Medical Center, Kettering Laboratory, Suite 128, 3223 Eden Avenue, Cincinnati, Ohio 45267-0056, USA.

Cotreatment with testosterone (T) and 17 $\beta$ -estradiol (E2) is an established regimen for inducing of prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) and prostate cancer in rodent models. We previously used the pure antiestrogen ICI 182,780 (ICI) and bromocriptine, a dopamine receptor agonist, to inhibit PIN induction and systemic hyperprolactinemia in Noble rats and found that the carcinogenic action of T+E2 is mediated directly by the effects of E2 on the prostate and/or indirectly via E2-induced hyperprolactinemia. In this study, we delineate the specific action(s) of E2 and prolactin (PRL) in early prostate carcinogenesis by an integrated approach combining global transcription profiling, gene ontology, and gene-network mapping. We identified 2504 differentially expressed genes in the T+E2-treated lateral prostate. The changes in expression of a subset of 1990 genes (~80%) were blocked upon cotreatment with ICI and bromocriptine, respectively, whereas those of 262 genes (~10%) were blocked only by treatment with ICI, suggesting that E2-induced pituitary PRL is the primary mediator of the prostatic transcriptional response to the altered hormone milieu. Bioinformatics analyses identified hormone-responsive gene networks involved in immune responses, stromal tissue remodeling, and the ERK pathway. In particular, our data suggest that IL-1 $\beta$  may mediate, at least in part, hormone-induced changes in gene expression during PIN formation. Together, these data highlight the importance of pituitary PRL in estrogen-induced prostate tumorigenesis. The identification of both E2- and pituitary PRL-responsive genes provides a comprehensive resource for future investigations of the complex mechanisms by which changes in the endocrine milieu contribute to prostate carcinogenesis in vivo.

PMID: 20861223 [PubMed - indexed for MEDLINE]PMCID: PMC2958750 [Available on 2011/11/1]

**La ricerca di risorse: vie di espressione genica della prolattina mediata estrogeno guidata nella neoplasia intraepiteliale prostatica ormone indotta**

Cotrattamento con il testosterone (T) e 17 $\beta$ -estradiolo (E2) è un regime stabilito per l'induzione della neoplasia prostatica intraepiteliale (PIN) e il cancro alla prostata in modelli di roditori. In precedenza avevamo usato il antiestrogeno puro ICI 182.780 (ICI) e la bromocriptina, un agonista del recettore della dopamina, di inibire PIN induzione e iperprolattinemia sistemica nei ratti Noble e ha scoperto che l'azione cancerogena di T + E2 è mediata direttamente dagli effetti della E2 sulla prostata e / o indirettamente tramite E2-iperprolattinemia indotta. In questo studio, abbiamo delineare le azioni specifiche (s) di E2 e prolattina (PRL) nella carcinogenesi della prostata presto da un approccio integrato che combina profilazione globale trascrizione, l'ontologia del gene, e la mappatura del gene-network. Abbiamo identificato 2.504 geni differenzialmente espressi nella prostata T + E2-trattati laterale. I cambiamenti nella espressione di un sottoinsieme del 1990 geni (~80%) sono stati bloccati su cotrattamento con ICI e bromocriptina, rispettivamente, mentre quelli di 262 geni (~10%) sono stati bloccati solo dal trattamento con l'ICI, suggerendo che E2-indotta pituitaria PRL è il principale mediatore della risposta trascrizionale prostatica al milieu ormonale alterato. Analisi bioinformatica identificato reti geniche ormone-sensibile coinvolte nella risposta

immunitaria, il rimodellamento del tessuto stromale, e la via ERK. In particolare, i nostri dati suggeriscono che l'IL-1 $\beta$  può mediare, almeno in parte, l'ormone cambiamenti indotti nell'espressione genica durante la formazione del PIN. Insieme, questi dati sottolineano l'importanza di PRL ipofisaria in estrogeni tumorigenesi prostatica indotta. L'identificazione di entrambi i geni E2-pituitario e PRL-reattiva fornisce una risorsa completa per future indagini dei complessi meccanismi con cui le variazioni di milieu endocrino contribuire alla carcinogenesi della prostata in vivo.

## CABERGOLINA

4) Segers H, van der Heyden JC, van den Akker EL, de Krijger RR, Zwaan CM, van den Heuvel-Eibrink MM.

### **Cushing syndrome as a presenting symptom of renal tumors in children.**

Pediatr Blood Cancer. 2010 Sep;55(3):589-90.

#### **Abstract**

Cushing syndrome as the presenting symptom of a malignant renal tumor in children is rare. We report the first case of paraneoplastic Cushing syndrome due to a Wilms tumor, in which clinical and biological signs of hypercortisolism regressed during preoperative chemotherapy. Additionally, we reviewed the literature on paraneoplastic Cushing syndrome secondary to pediatric renal tumors.

La sindrome di Cushing come sintomo di tumore renale nei bambini

Sindrome di Cushing come sintomo di presentazione di un tumore maligno renale nei bambini è rara. Segnaliamo il primo caso di sindrome di Cushing paraneoplastica a causa di un tumore di Wilms, in cui i segni clinici e biologici di ipercortisolismo sono regrediti durante la chemioterapia preoperatoria. Inoltre, abbiamo esaminato la letteratura sulla sindrome di Cushing paraneoplastica secondaria a tumori renali pediatrici.

5: Bronstein MD.

### **Optimizing acromegaly treatment.**

Front Horm Res. 2010;38:174-83.Epub 2010 Jul 5. Review. PubMed PMID: 20616509.

Acromegaly is a rare chronic and disabling disease with many comorbidities leading to a mortality rate three times higher than in the normal population, mainly due to cardiovascular diseases. Based on epidemiological evidence, the mortality rate is normalized to normal population values when treatment brings serum GH levels to <2.5 microg/l and IGF-1 levels to normal age/gender values. Many efficacious therapeutic approaches are currently available to acromegaly control, namely pituitary surgery, radiotherapy and medical therapy, which encompasses dopamine agonists (DA), somatostatin analogs (SA; currently considered the gold standard treatment) and the GH-receptor antagonist pegvisomant (PEG-V). The efficacy and indications of each therapy depend on the tumor size and invasiveness, patient's condition and the local availability of each treatment modality. Treatment with SA analogs controls about two thirds of acromegalics, with recent data highly suggesting that this result can be enhanced by the combination of SA with PEG-V, or with the DA cabergoline. Moreover, surgical tumor debulking, even noncurative, might overcome the resistance of GH-secreting adenomas to SA. Therefore, these strategies may optimize acromegaly control, and potentially reduce treatment costs.

### **Ottimizzare il trattamento dell'acromegalia**

L'acromegalia è una malattia cronica rara e invalidante con comorbidità che portano a un tasso di mortalità tre volte superiore rispetto alla popolazione normale, soprattutto a causa di malattie cardiovascolari. Sulla base di evidenze epidemiologiche, il tasso di mortalità è normalizzato ai valori popolazione normale quando il trattamento comporta dei livelli sierici di GH a <2,5 microg / l, e di IGF-1 livelli di età normale / valori di genere. Molti approcci terapeutici efficaci sono attualmente disponibili per il controllo acromegalia, cioè la chirurgia dell'ipofisi, radioterapia e terapia medica, che comprende agonisti della dopamina (DA), analoghi della somatostatina (SA; attualmente è considerato il trattamento gold standard) e l'antagonista del recettore del GH pegvisomant (PEG-V). L'efficacia e le indicazioni di ogni terapia dipende dalle dimensioni del tumore e l'invasività, la condizione del paziente e la disponibilità locale di ogni modalità di trattamento. Il trattamento con analoghi SA controlla circa i due terzi dei acromegalici, con i dati recenti suggeriscono fortemente che questo risultato può essere migliorato dalla combinazione di SA con PEG-V, o con la cabergolina DA. Inoltre, debulking chirurgico del tumore, anche noncurative, potrebbe superare la resistenza di adenomi GH-secernenti a SA. Pertanto, queste strategie possono ottimizzare il controllo acromegalico, e ridurre potenzialmente i costi di trattamento.

15: Kars M, Dekkers OM, Pereira AM, Romijn JA.

### **Update in prolactinomas.**

Neth JMed. 2010 Mar;68(3):104-12. Review. PubMed PMID: 20308704.

Prolactinomas are a frequent cause of gonadal dysfunction and infertility, especially in women. Dopamine agonists are first-line therapy and their efficacy in the treatment of prolactinomas is well established. Current challenges related to the management of prolactinomas remain in the recurrence of the disease after withdrawal of dopamine agonists, the potential of increased risk of cardiac valvulopathy, which is observed in patients treated with high-dose cabergoline for Parkinson's disease, the effects of pregnancy, and impaired quality of life associated with pituitary adenomas in general, and prolactinomas in particular. Although most prolactinomas are biochemically well controlled by pharmaceutical treatment, long-term follow-up is required.

### **Aggiornamento sui prolattinomi**

I prolattinomi sono una causa frequente di disfunzione delle gonadi e infertilità, soprattutto nelle donne. Gli agonisti della dopamina sono la terapia di prima scelta e la loro efficacia nel trattamento delle prolattinomi è ben stabilita. Le sfide relative alla gestione dei prolattinomi rimangono nella ricorrenza della malattia dopo il ritiro degli agonisti della dopamina, il potenziale di aumento del rischio di valvulopatia cardiaca, che si osserva nei pazienti trattati con cabergolina ad alte dosi per il morbo di Parkinson, gli effetti della gravidanza, e la qualità della vita compromessa associati con gli adenomi pituitari in generale, e prolattinomi in particolare. Sebbene la maggior parte dei prolattinomi sono biochimicamente ben controllati con trattamento farmacologico, è richiesto un follow-up a lungo termine.

16: Bergamaschi S, Ronchi CL, Giavoli C, Ferrante E, Verrua E, Ferrari DI, Lania A, Rusconi R, Spada A, Beck-Peccoz P.

### **Eight-year follow-up of a child with a GH/prolactin-secreting adenoma: efficacy of pegvisomant therapy.**

Horm Res Paediatr. 2010;73(1):74-9. Epub 2010 Jan 15. PubMed PMID: 20190543.

A 3.4-year-old girl was admitted to the Pediatric Department because of tall stature (116.0 cm, +5.1 SDS) and increased height velocity (16.3 cm/year, +6.1 SDS). Basal hormonal evaluation revealed elevated insulin-like growth factor I (IGF-I) levels (938 ng/ml, nv 40-190), prolactin (PRL) (98.0 ng/ml, nv 1.7-24.0) and mean growth hormone (GH) nocturnal concentration (147 ng/ml). Basal adrenal, gonadal and thyroid functions were normal. Hand-wrist bone age was 3.6 years. Magnetic resonance imaging revealed a macroadenoma with moderate suprasellar invasion. The adenoma was surgically removed and histological characterization confirmed the diagnosis of GH/PRL-secreting adenoma. The patient was admitted to our Endocrine Unit when 7.9 years old, because of the persistence of elevated GH, IGF-I and PRL levels, although there was a slight height velocity reduction and absence of tumor recurrence. Treatment with cabergoline was initiated, but only PRL levels normalized. Afterwards, octreotide long-acting release (LAR) was added without reaching the normalization of GH and IGF-I levels. Thus, treatment with octreotide LAR was discontinued and pegvisomant was added to cabergoline, leading to the normalization of IGF-I levels and height velocity without side effects. Other anterior pituitary functions were always normal. To conclude, treatment of pituitary gigantism with pegvisomant was effective and well tolerated in a young giant unresponsive to combined cabergoline and octreotide treatment.

### **Otto anni di follow-up di un bambino con una / adenoma GH secernente prolattina: efficacia della terapia pegvisomant.**

Una bambina di 3,4 anni, è stata ricoverata al Dipartimento di Pediatria a causa di alta statura (116,0 centimetri, 5,1 SDS) e velocità di crescita maggiore (16,3 cm / anno, +6,1 SDS). La valutazione ormonale basale ha rivelato elevato fattore di crescita insulino-simile I livelli di (IGF-I) erano (938 ng / ml, vn 40-190), la prolattina (PRL) (98,0 ng / ml, vn 1,7-24,0) e la media della crescita (GH) concentrazione notturna (147 ng / ml). Le funzioni basali surrenali, delle gonadi e tiroide erano normali. L'osso della mano-polso era di una bambina di età di 3,6 anni. La risonanza magnetica ha rivelato un macroadenoma con moderata invasione suprasellar. L'adenoma è stato rimosso chirurgicamente e la caratterizzazione istologica ha confermato la diagnosi di GH / adenoma PRL-secernente. La paziente è stata ricoverata presso la nostra Unità di endocrinologia all'età di 7.9 anni, a causa della persistenza di livelli elevati di GH, IGF-I e PRL, anche se c'è stata una lieve riduzione della velocità di crescita e l'assenza di recidiva del tumore. Il trattamento con cabergolina è stato avviato, ma solo i livelli di PRL normalizzati. In seguito, octreotide a lunga azione di rilascio (LAR) è stato aggiunto senza raggiungere la normalizzazione di GH e di IGF-I. Pertanto, il trattamento con octreotide LAR è stato sospeso e pegvisomant è stato aggiunto alla cabergolina, che ha portato alla normalizzazione dei livelli di IGF-I e la velocità di crescita senza effetti collaterali. Le altre funzioni dell'ipofisi anteriore sono sempre stati normali. Per concludere, il trattamento di gigantismo ipofisario con pegvisomant è stato efficace e ben tollerato in una giovane paziente che non risponde alla cabergolina combinata e il trattamento con octreotide.

## CALCIO

1: Grothey A, Nikcevich DA, Sloan JA, Kugler JW, Silberstein PT, Dentchev T, Wender DB, Novotny PJ, Chitaley U, Alberts SR, Loprinzi CL.

### **Intravenous calcium and magnesium for oxaliplatin-induced sensory neurotoxicity in adjuvant colon cancer: NCCTG N04C7.**

J Clin Oncol. 2011 Feb 1;29(4):421-7. Epub 2010 Dec 28. PubMed PMID: 21189381.

**PURPOSE:** Cumulative sensory neurotoxicity (sNT) is the dose-limiting toxicity of oxaliplatin, which commonly leads to early discontinuation of oxaliplatin-based therapy in the palliative and adjuvant settings. In a nonrandomized, retrospective study, intravenous (IV) calcium/magnesium (Ca/Mg) was associated with reduced oxaliplatin-induced sNT.

**METHODS:** Patients with colon cancer undergoing adjuvant therapy with infusional fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (FOLFOX) were randomly assigned to Ca/Mg (1g calcium gluconate plus 1g magnesium sulfate pre- and post-oxaliplatin) or placebo, in a double-blinded manner. The primary end point was the percentage of patients with grade 2 or greater sNT at any time during or after oxaliplatin-based therapy by National Cancer Institute Common Terminology Criteria for Adverse Events (NCI CTCAE; version 3) criteria. An oxaliplatin-specific sNT scale and patient questionnaires were also used to assess sNT. After 104 of 300 planned patients were enrolled, the study was closed. This was due to preliminary reports from another trial that suggested that Ca/Mg decreased treatment efficacy; these data were subsequently found to be incorrect.

**RESULTS:** Overall, 102 patients were available for analysis. Ca/Mg decreased the incidence of chronic, cumulative, grade 2 or greater sNT, as measured by NCI CTCAE ( $P = .038$ ) and also by the oxaliplatin-specific sNT scale ( $P = .018$ ). In addition, acute muscle spasms associated with oxaliplatin were significantly reduced ( $P = .01$ ). No effect on acute, cold-induced sNT was found. No substantial differences in adverse effects were noted between Ca/Mg and placebo.

**CONCLUSION:** Despite early termination and decreased statistical power, this study supports IV Ca/Mg as an effective neuroprotectant against oxaliplatin-induced cumulative sNT in adjuvant colon cancer.

### **Calcio e magnesio intravenoso nella neurotossicità sensoriale indotta dall'oxaliplatino nel cancro al colon adiuvante: NCCTG N04C7.**

**SCOPO:** Pacchetto cumulativo di neurotossicità sensoriali (SNT) è la tossicità dose-limitante di oxaliplatino, che di solito causa l'interruzione precoce della terapia a base di oxaliplatino nelle impostazioni palliative e terapia adiuvante. In uno non randomizzato, lo studio retrospettivo, per via endovenosa (IV) di calcio / magnesio (Ca / Mg), è stato associato ad una ridotta oxaliplatino SNT-indotta.

**METODI:** I pazienti con cancro del colon sottoposti a terapia adiuvante con fluorouracile infusione, LV, e oxaliplatino (FOLFOX) sono stati assegnati in modo casuale a Ca / Mg (1 g di gluconato di calcio più di magnesio solfato 1 g di pre-e post-oxaliplatino) o placebo, in doppio cieco modo. L'end point primario era rappresentato dalla percentuale di pazienti con SNT grado 2 o superiore in qualsiasi momento durante o dopo la terapia a base di oxaliplatino dal National Cancer Institute Common Terminology Criteria per eventi avversi (NCI CTCAE; versione 3) criteri. Una scala SNT oxaliplatino e questionari specifici dei pazienti sono stati anche utilizzati per valutare SNT. Dopo 104 di 300 pazienti previsti sono stati arruolati, lo studio è stato chiuso. Ciò era dovuto alla rapporti preliminari di un altro processo che ha suggerito che Ca / Mg è diminuito l'efficacia del trattamento, questi dati sono stati successivamente trovati a non essere corretto.

**RISULTATI:** Complessivamente, 102 pazienti erano disponibili per l'analisi. Ca / Mg diminuisce l'incidenza di malattie croniche, cumulativi, SNT grado 2 o superiore, misurata dal NCI CTCAE ( $P = 0,038$ ) e anche dalla scala SNT oxaliplatino-specific ( $P = 0,018$ ). Inoltre, spasmi muscolari acuti

connessi con oxaliplatino sono ridotte significativamente ( $P = .01$ ) Nessun effetto sulla tossicità acuta, SNT freddo-indotta è stata trovata. Sostanziali differenze di effetti avversi sono stati osservati tra Ca / Mg e placebo.  
**CONCLUSIONE:** Malgrado recesso anticipato e ridotto la potenza statistica, questo studio supporta IV Ca / Mg come neuroprotettore efficace contro oxaliplatino SNT-indotta cumulativo adiuvante nel cancro del colon.

2: Kimmick G, Broadwater G, Vitolins M.

### **Hot flashes in breast cancer survivors and an association with calcium supplement use.**

Int J Womens Health. 2010 Aug24;2:291-4. PubMed PMID: 21151674; PubMed Central PMCID: PMC2990896.

**AIMS:** In breast cancer survivors, we aimed to describe the frequency of hot flashes and night sweats, frequency and type of treatment, and the association of hot flashes and use of calcium supplements.

**METHODS:** Charts of breast cancer survivors were reviewed for information about hot flashes, treatment for hot flashes, and calcium supplementation. Associations between variables were explored using the Chi-square test and Fisher's Exact test.

**RESULTS:** Eighty-six charts were reviewed. Mean age of the women was 58 years and 79% were postmenopausal. Forty-two (49%) of women had hot flashes and 18 (21%) had night sweats. Thirty-one (36%) were treated for hot flashes. Treatment included selective serotonin reuptake inhibitors/serotonin-norepinephrine reuptake inhibitors ( $n = 19$ ), clonidine ( $n = 7$ ), Bellergal-S(®) ( $n = 8$ ), sleep-aid ( $n = 7$ ), and other ( $n = 5$ ). Calcium supplementation was recorded in 31%. Of women with hot flashes, 44% took calcium supplements; of women without hot flashes, 18% took calcium supplements (Chi-square  $P = 0.02$ ).

**CONCLUSION:** Hot flashes were recorded in 49% of this group of primarily postmenopausal breast cancer survivors. Women with hot flashes were more likely to be taking calcium supplements. Further exploration of the association between hot flashes and calcium supplementation is warranted.

### **Novità sulla sopravvivenza del cancro al seno e sull'associazione ad un uso supplementare di calcio**

**OBIETTIVI:** In sopravvissute al cancro al seno, si è cercato di descrivere la frequenza delle vampate di calore e sudorazioni notturne, frequenza e tipo di trattamento, e l'associazione delle vampate di calore e l'uso di integratori di calcio.

**METODI:** Classifiche di donne sopravvissute al cancro al seno sono state riviste per informazioni sulle vampate di calore, il trattamento di vampate di calore, e la supplementazione di calcio. Le associazioni tra le variabili sono state esplorate usando il test chi-quadro e test esatto di Fisher.

**RISULTATI:** Ottantasei grafici sono stati rivisti. L'età media delle donne era di 58 anni e il 79% era in post-menopausa. Quarantadue (49%) delle donne ha vampate di calore e 18 (21%) hanno avuto sudorazioni notturne. Trentuno (36%) sono stati trattati per le vampate di calore. Trattamento ha compreso gli inibitori selettivi della ricaptazione della serotonina / inibitori della ricaptazione della serotonina-norepinefrina ( $n = 19$ ), la clonidina ( $n = 7$ ), Bellergal-S (®) ( $n = 8$ ), sonno-aiuto ( $n = 7$ ), e altri ( $n = 5$ ). Supplementazione di calcio è stato registrato nel 31%. Delle donne con vampate di calore, il 44% ha preso integratori di calcio, di donne senza vampate di calore, il 18% ha preso i supplementi di calcio (chi-quadro  $p = 0,02$ ).

**CONCLUSIONE:** vampate di calore sono stati registrati nel 49% di questo gruppo di superstiti della mammella soprattutto dopo la menopausa il cancro. Le donne con vampate di calore sono più probabilità di assumere integratori di calcio. Esplorare ulteriormente l'associazione tra vampate di calore e la supplementazione di calcio è giustificata.

3: Tollefson MK, Gettman MT, Blute ML, Bergstralh EJ, Rangel LJ, Karnes RJ.

### **Serum Calcium Is Not Predictive of Aggressive Prostate Cancer After Radical**

Prostatectomy. *Urology*. 2010 Nov 29. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 21122899.

**OBJECTIVES:** To investigate the effect of preoperative total serum calcium on disease progression after radical prostatectomy (RP). Elevated total serum calcium has been linked to death from prostate cancer in the National Health and Nutrition Examination Surveys I and II. However, these findings have not been studied in a large cohort of patients with prostate cancer.

**METHODS:** We identified 10 532 consecutive patients who had undergone RP from 1990 to 2004 for prostate cancer. Total serum calcium levels were available for 7648 (72.6%) of these patients within 90 days before RP. Postoperative survival was estimated using the Kaplan-Meier method and compared using the log-rank test. Cox proportional hazard regression models were used to analyze the ability of serum calcium to predict biochemical recurrence, systemic progression, and cancer-specific survival.

**RESULTS:** The median patient age at surgery was 64 years. The median total serum calcium level was 9.4 mg/dL (range 6.8-11.2). On univariate analysis, the total serum calcium level was not significantly associated with any clinical or pathologic variables, including tumor stage, preoperative prostate-specific antigen, Gleason score, tumor volume, surgical margins, or lymph node status. Furthermore, the serum calcium level was not significantly associated with biochemical failure, systemic progression, or prostate cancer death on univariate or multivariate analysis.

**CONCLUSIONS:** The total serum calcium level was not predictive of cancer outcomes in patients who had undergone RP. Additional investigations of the preoperative disease predictors after RP for patients with nonmetastatic disease might be better directed toward other markers.

### **Il calcio sierico non è un fattore predittivo del cancro alla prostata aggressivo dopo prostatectomia radicale**

**OBIETTIVI:** Per studiare l'effetto di pre-operatoria calcio sierico totale sulla progressione della malattia dopo prostatectomia radicale (RP). Elevati livelli sierici di calcio totale è stato collegato alla morte per cancro alla prostata nel National Health and Nutrition indagini sugli esami I e II. Tuttavia, questi risultati non sono stati studiati in un'ampia coorte di pazienti con cancro alla prostata.

**METODI:** Abbiamo individuato 10 532 pazienti consecutivi che avevano subito RP 1990-2004 per il cancro alla prostata. Totale livelli sierici di calcio erano disponibili per 7.648 (72,6%) di questi pazienti entro 90 giorni prima della RP. Sopravvivenza postoperatoria è stato stimato utilizzando il metodo di Kaplan-Meier e confrontate con il log-rank test. Modelli di regressione proporzionale di Cox di rischio sono stati utilizzati per analizzare la capacità del calcio sierico per predire recidiva biochimica, la progressione sistemica, e la sopravvivenza cancro-specifica.

**RISULTATI:** L'età media dei pazienti al momento dell'intervento era di 64 anni. La mediana totale calcemia è stato del 9,4 mg / dL (range 6,8-11,2). All'analisi univariata, il totale dei livelli sierici di calcio non era significativamente associato ad alcuna delle variabili cliniche o patologiche, fra cui lo stadio del tumore, preoperatoria antigene prostatico specifico, il punteggio di Gleason, il volume del tumore, margini chirurgici, o nodo di stato linfa. Inoltre, il livello di calcio sierico non è risultata significativamente associata ad insufficienza biochimica, la progressione sistemica, la morte o il cancro della prostata in analisi univariata o multivariata.

**CONCLUSIONI:** Il totale calcemia non era predittivo degli esiti del cancro in pazienti che avevano subito RP. Ulteriori indagini dei predittori malattia pre-operatoria dopo RP per i pazienti con malattia non metastatici potrebbe essere migliore diretti verso altri marcatori.

4: Memon AA, Munk M, Nexo E, Sorensen BS.

**Calcium-induced apoptosis is delayed by HER1 receptor signalling through the Akt and PLC $\gamma$  pathways in bladder cancer cells.**

Scand J Clin Lab Invest. 2011 Feb;71(1):45-51. Epub 2010 Nov 18. PubMedPMID: 21087080.

The level of extracellular calcium has been demonstrated to regulate important physiological processes like cell growth and apoptosis. We demonstrate that in the bladder cancer cell line RT4, an increased extracellular calcium level induces apoptosis and that the HER1 receptor functions as a cell survival factor and delays apoptosis. After 12 h of calcium treatment (10 mM) apoptosis was detected in the RT4 cells. Increased activation of the HER1 receptor was detected as soon as 30 min after calcium addition, and the activation decreased again after 12 h of incubation, coinciding with the time when apoptosis was detectable. Inhibition of HER1 with Gefitinib (5  $\mu$ M) or Tyrphostin (AG1478) (20  $\mu$ M) augmented the calcium-induced apoptosis, and with HER1 inhibition apoptosis was detectable after 6 h. Analysis of downstream signalling molecules showed an increased activation of Akt, PLC $\gamma$  and MAPK in response to calcium treatment. The activation of Akt and PLC $\gamma$  was abolished by inhibition of HER1 with Gefitinib (5  $\mu$ M), whereas this had no effect on the activity of MAPK. In addition, incubation with inhibitors of Akt and PLC $\gamma$  significantly augmented calcium-induced apoptosis, whereas this was not seen with MAPK inhibition. Finally a significant increase in PKC $\delta$  activity was observed with calcium treatment alone and was augmented further with HER1 inhibition. In conclusion we show that calcium-induced apoptosis in bladder cancer cells is delayed by HER1 receptor activation involving the Akt and PLC $\gamma$  signalling pathways.

**L'apoptosi indotta dal calcio è ritardata dal segnale del recettore HER1 tramite la via Akt e PLC $\gamma$  nelle cellule cancerose della vescica**

Il livello di calcio extracellulare è stata dimostrata per regolare importanti processi fisiologici come la crescita cellulare e apoptosi. Dimostriamo che nel RT4 cellula di cancro della vescica linea, un aumento del livello del calcio extracellulare induce l'apoptosi e che le funzioni del recettore HER1 come fattore di sopravvivenza cellulare e apoptosi ritardi. Dopo 12 ore di trattamento di calcio (10 mM) è stata rilevata l'apoptosi nelle cellule RT4. Una maggiore attivazione del recettore HER1 è stato rilevato non appena 30 minuti dopo l'aggiunta di calcio, e l'attivazione è diminuito ancora dopo 12 h di incubazione, in coincidenza con il momento in cui l'apoptosi è stata individuata. Inibizione di HER1 con Gefitinib (5 micron) o Tyrphostin (AG1478) (20 micron) aumentata del calcio-indotto apoptosi, e con HER1 inibizione apoptosi è stato rilevato dopo 6 ore Analisi delle molecole di segnalazione a valle hanno mostrato un aumento di attivazione di Akt, PLC $\gamma$  e MAPK in risposta al trattamento di calcio. L'attivazione di Akt e PLC $\gamma$  è stata abolita dalla inibizione di HER1 con Gefitinib (5 micron), che tale non ha avuto effetto sull'attività della MAPK. Inoltre, l'incubazione con gli inibitori di Akt e PLC $\gamma$  significativamente aumentata di calcio-indotto apoptosi, mentre ciò non è stato visto con l'inibizione di MAPK. Infine, un notevole aumento dell'attività di PKC $\delta$  è stato osservato con il trattamento con calcio da solo ed è stata ulteriormente aumentata con HER1 inibizione. In conclusione possiamo dimostrare che il calcio-indotto apoptosi nelle cellule di cancro alla vescica è ritardato di HER1 attivazione dei recettori che coinvolgono la Akt e PLC $\gamma$  vie di segnalazione.

5: Pan Z, Gollahon L.

**Taxol directly induces endoplasmic reticulum-associated calcium changes that promote apoptosis in breast cancer cells.**

Breast J. 2011Jan;17(1):56-70. doi: 10.1111/j.1524-4741.2010.00988.x. Epub 2010 Nov 15. PubMed PMID: 21073601.

Calcium, a key regulator of cell survival, is also important in regulating apoptosis. Although the chemotherapeutic agent Taxol employs apoptosis to induce cell death, the exact mechanism of how it induces apoptosis and the role of calcium in this process remains unclear. The main intracellular calcium storehouse, the endoplasmic reticulum, was identified as a new important gateway in apoptosis, possibly providing a target for Taxol. The goal of this study was to investigate whether calcium changes associated with the endoplasmic reticulum, were directly or indirectly generated by Taxol at clinically relevant doses, and related to Taxol-induced apoptosis in breast cancer cells. Time-lapsed imaging techniques followed by an endoplasmic reticulum-targeted construct, cameleon D1ER, were used to monitor cytosol--endoplasmic reticulum calcium dynamics in MDA-MB-468 (Bcl-2 negative) and MCF 7 (Bcl-2 positive) breast carcinoma cells. Apoptosis levels were measured with Annexin V and Propidium Iodide (PI) using flow cytometry. In both cell lines, Taxol at 2.5 $\mu$ M (~10<sup>-6</sup> M) was observed to induce significant internal calcium changes, first a rapid endoplasmic reticulum calcium release and a transient cytosolic calcium increase upon Taxol addition. After several hours of Taxol treatment, the endoplasmic reticulum calcium store was gradually depleted, and a sustained cytosolic calcium elevation was observed before significant induction of apoptosis. Inhibition of these calcium changes decreased Taxol-induced apoptosis levels. In contrast, 0.2 $\mu$ M Taxol (~10<sup>-7</sup>M) induced only a slight cellular calcium change, not enough to regulate apoptosis. Our findings demonstrate that endoplasmic reticulum calcium stores provide a direct target for Taxol action and are important for induction of apoptosis, independent of Bcl-2 status. Furthermore, our results show for the first time, that the role of calcium in Taxol-induced endoplasmic reticulum-mediated apoptosis is dependent on Taxol dosage.

**Il taxolo induce direttamente cambiamenti del calcio associati al reticolo endoplasmico che promuovono l'apoptosi nelle cellule mammarie cancerose**

Il calcio, un regolatore chiave della sopravvivenza cellulare, è importante anche nella regolazione dell'apoptosi. Anche se l'agente chemioterapico Taxol impiega l'apoptosi di indurre la morte cellulare, il meccanismo esatto di come esso induce l'apoptosi e il ruolo del calcio in questo processo rimane poco chiaro. Il magazzino principale calcio intracellulare, il reticolo endoplasmatico, è stato identificato come un nuovo gateway importante in apoptosi, possibilmente fornendo un obiettivo per il Taxol. L'obiettivo di questo studio era di valutare se le modifiche di calcio associato al reticolo endoplasmatico, sono state direttamente o indirettamente generati da Taxol a dosi clinicamente rilevanti, e relativo alla Taxol apoptosi indotta nelle cellule di cancro al seno. tecniche di imaging a tempo scaduto seguito da un reticolo endoplasmatico D1ER mirati cameleon costruire, sono stati utilizzati per monitorare citosol - reticolo endoplasmatico dinamiche di calcio in MDA-MB-468 (Bcl-2 negativo) e MCF 7 (Bcl-2 positivo) della mammella carcinoma delle cellule. i livelli di apoptosi sono stati misurati con annessina V e ioduro di propidio (PI) citometria a flusso. In entrambe le linee cellulari, a Taxol 2.5 $\mu$ M (~ 10<sup>-6</sup> M) è stata osservata per indurre significativi cambiamenti interni di calcio, in primo luogo un rapido rilascio del calcio del reticolo endoplasmatico ed un aumento transitorio del calcio citosolico 'aggiunta Taxol. Dopo diverse ore di trattamento Taxol, il reticolo endoplasmatico negozio di calcio è stato progressivamente impoverito, e una costante elevazione del calcio citosolico è stata osservata prima significativa induzione di apoptosi. L'inibizione di questi cambiamenti di calcio ridotte Taxol indotto i livelli di apoptosi. Al contrario, 0.2 $\mu$ M Taxol (~ 10<sup>-7</sup> M) ha indotto solo un leggero

cambiamento del calcio cellulare, non abbastanza per regolare l'apoptosi. I nostri risultati dimostrano che il reticolo endoplasmatico negozi calcio fornire un bersaglio diretto per l'azione Taxol e sono importanti per l'induzione di apoptosi, indipendente di Bcl-2 di stato. Inoltre, i nostri risultati dimostrano per la prima volta, che il ruolo del calcio nel Taxol indotto apoptosi mediata dal reticolo endoplasmatico dipende dal dosaggio Taxol.

7: Knijn N, Tol J, Koopman M, Werter MJ, Imholz AL, Valster FA, Mol L, Vincent AD, Teerenstra S, Punt CJ.

**The effect of prophylactic calcium and magnesium infusions on the incidence of neurotoxicity and clinical outcome of oxaliplatin-based systemic treatment in advanced colorectal cancer patients.**

Eur J Cancer. 2011 Feb;47(3):369-74. Epub 2010 Nov 8. PubMed PMID: 21067912.

**BACKGROUND:** Peripheral sensory neurotoxicity is a frequent and potentially debilitating side effect of oxaliplatin treatment. Calcium and magnesium (Ca/Mg) infusions are frequently used to prevent this toxicity. However, concerns about a negative impact of Ca/Mg infusions on outcome have been raised. We retrospectively assessed the effect of Ca/Mg infusions on the incidence of neurotoxicity and on clinical outcome in advanced colorectal cancer (ACC) patients treated in the phase III CAIRO2 study.

**MATERIALS AND METHODS:** Seven hundred and fifty five previously untreated ACC patients were randomised between treatment with capecitabine, oxaliplatin and bevacizumab or the same combination with the addition of cetuximab. Patients were retrospectively divided into two groups: patients in the Ca/Mg(+) group received Ca/Mg at least during their first treatment cycle, and patients in the Ca/Mg(-) group did not.

**RESULTS:** Seven hundred and thirty two patients were evaluable for this analysis. The Ca/Mg(+) group consisted of 551 patients, the Ca/Mg(-) group consisted of 181 patients. The incidence of all grade neurotoxicity in the Ca/Mg(+) group and the Ca/Mg(-) group was 85% and 92%, respectively ( $p = 0.02$ ), and the incidence of grade  $\geq 2$  neurotoxicity was 40% and 45%, respectively ( $p = 0.22$ ). The median PFS in the Ca/Mg(+) versus Ca/Mg(-) group was 10.1 versus 10.7 months ( $p = 0.92$ ), the median OS was 19.8 versus 20.7 months ( $p = 0.10$ ), and the response rate was 43.1% versus 50% ( $p = 0.11$ ), respectively.

**CONCLUSIONS:** In this largest retrospective analysis to date we observed that Ca/Mg infusions significantly reduced all grade oxaliplatin-related neurotoxicity. Ca/Mg infusions did not affect the clinical efficacy of treatment.

**L'effetto di infusioni di magnesio e di calcio profilattico sull'incidenza della neurotossicità e degli esiti clinici del trattamento sistemico con oxaliplatino nei pazienti con cancro colonrettale in stadio avanzato**

**BACKGROUND:** neurotossicità periferica sensoriale è un effetto collaterale frequente e potenzialmente debilitante di trattamento oxaliplatino. Calcio e magnesio (Ca / Mg) infusioni sono spesso utilizzati per prevenire questa tossicità. Tuttavia, le preoccupazioni circa il possibile impatto negativo delle infusioni di Ca / Mg sul risultato sono state sollevate. Abbiamo retrospettivamente valutato l'effetto delle infusioni di Ca / Mg l'incidenza di neurotossicità e l'outcome clinico nel carcinoma del colon-retto (ACC) pazienti trattati nello studio di fase III CAIRO2.

**MATERIALI E METODI:** Settecentocinquanta cinque pazienti non trattati in precedenza ACC sono stati randomizzati tra il trattamento con capecitabina, oxaliplatino e bevacizumab o la stessa combinazione con l'aggiunta di cetuximab. I pazienti sono stati retrospettivamente divisi in due gruppi: i pazienti del Ca / Mg (+) gruppo ha ricevuto Ca / Mg, almeno durante il primo ciclo di trattamento, ed i pazienti nel Ca / Mg (-) gruppo non ha fatto.

**RISULTATI:** Sette e trenta due pazienti erano valutabili per questa analisi. Ca / Mg (+) gruppo era

composto da 551 pazienti, il Ca / Mg (-) gruppo era composto da 181 pazienti. L'incidenza di tutti neurotossicità di grado nella Ca / Mg (+) e il gruppo Ca / Mg (-) gruppo era 85% e 92%, rispettivamente ( $p = 0,02$ ), e l'incidenza di neurotossicità di grado  $\geq 2$  è stata del 40% e 45%, rispettivamente ( $p = 0,22$ ). La PFS mediana del Ca / Mg (+) rispetto a Ca / Mg (-) gruppo era il 10,1 versus 10,7 mesi ( $p = 0,92$ ), la mediana OS stata del 19,8 versus 20,7 mesi ( $p = 0,10$ ), e il tasso di risposta è stato 43,1 % versus 50% ( $p = 0.11$ ), rispettivamente. CONCLUSIONI: In questa analisi il più grande retrospettiva finora abbiamo osservato che le infusioni di Ca / Mg significativamente ridotto tutti neurotossicità di grado oxaliplatino-related. Infusioni di Ca / Mg non ha influenzato l'efficacia clinica del trattamento.

8: Parkash J, Asotra K.

### **Calcium wave signaling in cancer cells.**

Life Sci. 2010Nov 20;87(19-22):587-95. Epub 2010 Sep 25. Review. PubMed PMID: 20875431; PubMed Central PMCID: PMC2974775.

Ca(2+) functions as an important signaling messenger right from beginning of life to the final moments of the end of life. Ca(2+) is needed at several steps of the cell cycle such as early G(1), at the G(1)/S, and G(2)/M transitions. The Ca(2+) signals in the form of time-dependent changes in intracellular Ca(2+) concentrations, [Ca(2+)](i), are presented as brief spikes organized into regenerative Ca(2+) waves. Ca(2+)-mediated signaling pathways have also been shown to play important roles in carcinogenesis such as transformation of normal cells to cancerous cells, tumor formation and growth, invasion, angiogenesis and metastasis. Since the global Ca(2+) oscillations arise from Ca(2+) waves initiated locally, it results in stochastic oscillations because although each cell has many IP(3)Rs and Ca(2+) ions, the law of large numbers does not apply to the initiating event which is restricted to very few IP(3)Rs due to steep Ca(2+) concentration gradients. The specific Ca(2+) signaling information is likely to be encoded in a calcium code as the amplitude, duration, frequency, waveform or timing of Ca(2+) oscillations and decoded again at a later stage. Since Ca(2+) channels or pumps involved in regulating Ca(2+) signaling pathways show altered expression in cancer, one can target these Ca(2+) channels and pumps as therapeutic options to decrease proliferation of cancer cells and to promote their apoptosis. These studies can provide novel insights into alterations in Ca(2+) wave patterns in carcinogenesis and lead to the development of newer technologies based on Ca(2+) waves for the diagnosis and therapy of cancer.

### **Segnale del calcio nelle cellule cancerose**

Ca (2 +) funziona come un diritto importante messaggero segnalazione dall'inizio della vita fino ai momenti finali della fine della vita. Ca (2 +) è necessaria a diverse fasi del ciclo cellulare, come presto G (1), al G (1) / S, e G (2) / M transizioni. Il Ca (2 +) segnali in forma di variazioni tempodipendenti di Ca intracellulare (2 +) di concentrazioni, [Ca (2 +)] (i), sono presentati come i picchi brevi organizzati in rigenerativa Ca (2 +) onde. Ca (2 +) vie di segnalazione mediata hanno anche dimostrato di giocare un ruolo importante nella carcinogenesi come la trasformazione di cellule normali in cellule cancerose, la formazione e la crescita del tumore, invasione, angiogenesi e metastasi. Dato che la Ca globale (2 +) oscillazioni derivano da Ca (2 +) onde avviati a livello locale, il risultato e 'oscillazioni stocastico, perché anche se ogni cellula ha molti IP (3) Rs e Ca (2 +) ioni, la legge dei grandi numeri non non si applicano per l'evento di apertura che è limitata a pochissimi IP (3) Rs a causa della ripida Ca (2 +) gradienti di concentrazione. Le specifiche di Ca (2 +) informazioni di segnalazione è probabile che sia codificata in un codice di calcio quali, ampiezza, durata, frequenza, forma d'onda o frequenza di Ca (2 +) oscillazioni e decodificato in una fase successiva. Dal Ca (2 +) canali o pompe coinvolti nella regolazione del Ca (2 +) espressione vie di segnalazione mostra alterata nel cancro, si può catturare queste Ca (2 +) canali e pompe come opzioni terapeutiche per diminuire la proliferazione delle cellule tumorali e per promuovere la loro apoptosi. Questi studi possono fornire spunti romanzo in alterazioni a Ca (2 +) modelli di onda nella

carcinogenesi e portare allo sviluppo di nuove tecnologie basate su Ca (2+) onde per la diagnosi e la terapia del cancro.

9: Muscella A, Calabriso N, Vetrugno C, Fanizzi FP, De Pascali SA, Storelli C, Marsigliante S.

**The platinum (II) complex [Pt(O,O'-acac)( $\gamma$ -acac)(DMS)] alters the intracellular calcium homeostasis in MCF-7 breast cancer cells.**

BiochemPharmacol. 2011 Jan 1;81(1):91-103. Epub 2010 Sep 18. PubMed PMID: 20854797.

It was previously demonstrated that [Pt(O,O'-acac)( $\gamma$ -acac)(DMS)] exerted toxic effects at high doses, whilst sub-cytotoxic concentrations induced anoikis and decreased cell migration. Aim of this study was to investigate the hypothesis that [Pt(O,O'-acac)( $\gamma$ -acac)(DMS)] alters the [Ca(2+)](i) and that this is linked to its ability to trigger rapid apoptosis in MCF-7 cells. Thus, cells were treated with [Pt(O,O'-acac)( $\gamma$ -acac)(DMS)] and its effects on some of the systems regulating Ca(2+) homeostasis were studied, also in cells dealing with the complex changes occurring during the Ca(2+) signalling evoked by extracellular stimuli. [Pt(O,O'-acac)( $\gamma$ -acac)(DMS)] caused the decrease of PMCA activity (but not SERCA or SPCA) and Ca(2+) membrane permeability. These two opposite effects on [Ca(2+)](i) resulted in its overall increase from  $102 \pm 12$  nM to  $250 \pm 24$  nM after 15min incubation. The effects of [Pt(O,O'-acac)( $\gamma$ -acac)(DMS)] were also evident when cells were stimulated with ATP: the changes in Ca(2+) levels caused by purinergic stimulation resulted altered due to decreased PMCA activity and to the closure of Ca(2+) channels opened by purinergic receptor. Conversely, [Pt(O,O'-acac)( $\gamma$ -acac)(DMS)] did not affect the store-operated Ca(2+) channels opened by thapsigargin or by ATP. [Pt(O,O'-acac)( $\gamma$ -acac)(DMS)] provoked the activation of PKC- $\alpha$  and the production of ROS that were responsible for the Ca(2+) permeability and PMCA activity decrease, respectively. The overall effect of [Pt(O,O'-acac)( $\gamma$ -acac)(DMS)] is to increase the [Ca(2+)](i), an effect that is likely to be linked to its ability to trigger rapid apoptosis in MCF-7 cells. These data reinforce the notion that [Pt(O,O'-acac)( $\gamma$ -acac)(DMS)] would be a promising drug in cancer treatment.

**Il complesso di platino (II) [Pt(O,O'-acac)( $\gamma$ -acac)(DMS)] altera l'omeostasi del calcio intracellulare nelle cellule mammarie cancerose MCF-7**

E' stato precedentemente dimostrato che [Pt (O, O'-acac) ( $\gamma$ -acac) (DMS)] esercita effetti tossici a dosi elevate, mentre le concentrazioni sub-citotossiche indotta anoikis e diminuito la migrazione delle cellule. Scopo di questo studio era di esaminare l'ipotesi che [Pt (O, O'-acac) ( $\gamma$ -acac) (DMS)] altera la [Ca (2+)] (i) e che ciò sia dovuto alla sua capacità di innescare l'apoptosi rapida in cellule MCF-7. Così, le cellule sono state trattate con [Pt (O, O'-acac) ( $\gamma$ -acac) (DMS)] e dei suoi effetti su alcuni dei sistemi di regolazione Ca (2+) omeostasi sono stati studiati, anche in cellule che fare con il complesso cambiamenti che si verificano durante il Ca (2+) di segnalazione evocato da stimoli extracellulari. [Pt (O, O'-acac) ( $\gamma$ -acac) (DMS)] ha causato la diminuzione di attività PMCA (ma non SERCA o SPCA) e Ca (2+) permeabilità di membrana. Questi due effetti opposti su [Ca (2+)] (i) ha determinato la sua crescita complessiva da  $102 \pm 12$  nm a  $250 \pm 24$  nM dopo 15min di incubazione. Gli effetti di [Pt (O, O'-acac) ( $\gamma$ -acac) (DMS)] erano evidenti anche quando le cellule sono state stimolate con ATP: le modifiche in Ca (2+) livelli causati dalla stimolazione purinergici risultato alterato a causa della ridotta PMCA attività e alla chiusura di Ca (2+) canali aperti da recettori purinergici. Al contrario, [Pt (O, O'-acac) ( $\gamma$ -acac) (DMS)] non ha influenzato le vendite operati Ca (2+) canali aperti da thapsigargin o da ATP. [Pt (O, O'-acac) ( $\gamma$ -acac) (DMS)] ha provocato l'attivazione della PKC- $\alpha$  e la produzione di ROS che erano responsabili per il Ca (2+) alla permeabilità e diminuire l'attività PMCA, rispettivamente. L'effetto complessivo di [Pt (O, O'-acac) ( $\gamma$ -acac) (DMS)] è l'aumento della [Ca (2+)] (i), un effetto che è probabile che sia legato alla sua capacità di innescare l'apoptosi rapida in cellule MCF-7. Questi dati rafforzano l'idea che il [Pt (O, O'-acac) ( $\gamma$ -acac) (DMS)] potrebbe essere un farmaco promettente nel trattamento del cancro.

10: Grice DM, Vetter I, Faddy HM, Kenny PA, Roberts-Thomson SJ, Monteith GR.

**Golgi calcium pump secretory pathway calcium ATPase 1 (SPCA1) is a key regulator of insulin-like growth factor receptor (IGF1R) processing in the basal-like breast cancer cell line MDA-MB-231.**

J Biol Chem. 2010 Nov 26;285(48):37458-66. Epub 2010 Sep 13. PubMed PMID: 20837466; PubMed Central PMCID: PMC2988351.

Calcium signaling is a key regulator of pathways important in tumor progression, such as proliferation and apoptosis. Most studies assessing altered calcium homeostasis in cancer cells have focused on alterations mediated through changes in cytoplasmic free calcium levels. Here, we show that basal-like breast cancers are characterized by an alteration in the secretory pathway calcium ATPase 1 (SPCA1), a calcium pump localized to the Golgi. Inhibition of SPCA1 in MDA-MB-231 cells produced pronounced changes in cell proliferation and morphology in three-dimensional culture, without alterations in sensitivity to endoplasmic reticulum stress induction or changes in global calcium signaling. Instead, the effects of SPCA1 inhibition in MDA-MB-231 cells reside in altered regulation of calcium-dependent enzymes located in the secretory pathway, such as proprotein convertases. Inhibition of SPCA1 produced a pronounced alteration in the processing of insulin-like growth factor receptor (IGF1R), with significantly reduced levels of functional IGF1R $\beta$  and accumulation of the inactive trans-Golgi network pro-IGF1R form. These studies identify for the first time a calcium transporter associated with the basal-like breast cancer subtype. The pronounced effects of SPCA1 inhibition on the processing of IGF1R in MDA-MB-231 cells independent of alterations in global calcium signaling also demonstrate that some calcium transporters can regulate the processing of proteins important in tumor progression without major alterations in cytosolic calcium signaling. Inhibitors of SPCA1 may offer an alternative strategy to direct inhibitors of IGF1R and attenuate the processing of other proprotein convertase substrates important in basal breast cancers.

**Nella linea cellulare del cancro al seno basal-like MDA-MB-231 la via di segnale secretoria della pompa del calcio ATPasi 1 (SPCA1) nel Golgi è un regolatore chiave del processo di formazione del recettore del fattore di crescita insulin-like**

Calcio segnalazione è un regolatore chiave di percorsi importanti nella progressione del tumore, come la proliferazione e l'apoptosi. La maggior parte studi di valutazione alterata omeostasi del calcio nelle cellule tumorali si sono concentrati sulle alterazioni mediate attraverso cambiamenti nei livelli di calcio libero citoplasmatico. Qui si dimostra che i tumori al seno basale-come sono caratterizzati da una alterazione della via secretoria calcio ATPasi 1 (SPCA1), una pompa di calcio localizzato al Golgi. L'inibizione di SPCA1 in MDA-MB-231 cellule prodotte cambiamenti pronunciati nella proliferazione cellulare e la morfologia della cultura tridimensionale, senza alterazioni della sensibilità a stress del reticolo endoplasmatico induzione o cambiamenti di calcio a livello mondiale di segnalazione. Al contrario, gli effetti di inibizione SPCA1 in MDA-MB-231 cellule risiedono in alterata regolazione di enzimi calcio-dipendente si trova nella via secretoria, come convertasi proprotein. L'inibizione di SPCA1 prodotto una alterazione marcata nella lavorazione del recettore insulin-like growth factor (IGF1R), con livelli significativamente ridotto di IGF1R $\beta$  funzionale e l'accumulo di formare la rete inattiva trans-Golgi pro-IGF1R. Questi studi identificano per la prima volta un trasportatore di calcio associato al sottotipo seno basale-come il cancro. Gli effetti della pronuncia SPCA1 inibizione sul trattamento dei IGF1R in MDA-MB-231 cellule indipendenti di alterazioni del calcio mondiale segnalazione anche dimostrare che alcuni trasportatori di calcio in grado di regolare il trattamento di proteine importanti nella progressione del tumore, senza alterazioni rilevanti del calcio citosolico segnalazione. Inibitori del SPCA1 può offrire una strategia alternativa per gli inibitori diretti della IGF1R e attenuare il trattamento dei convertasi proprotein altri substrati importante del tumore della mammella basale.

11: Usoro NI, Omabbe MC, Usoro CA, Nsonwu A.

**Calcium, inorganic phosphates, alkaline and acid phosphatase activities in breast cancer patients in Calabar, Nigeria.**

Afr Health Sci. 2010 Mar;10(1):9-13. PubMed PMID: 20811518; PubMedCentral PMCID: PMC2895791.

**BACKGROUND:** Breast cancer is the commonest malignancy of women in Nigeria. Change in serum levels of some biochemical parameters could assist diagnosis and follow-up of breast cancer.

**OBJECTIVE:** To determine serum levels of calcium, inorganic phosphates, alkaline phosphatase (ALP) and acid phosphatase (ACP) activities in patients with breast cancer, and change in the serum levels over time.

**METHODS:** Total serum calcium and inorganic phosphates, and serum ALP and ACP activities were determined in 25 women with breast cancer and 25 age-matched controls using colorimetric and enzymatic methods, over 6 months with bimonthly analysis.

**RESULTS:** The serum calcium level, ALP and ACP activities were significantly higher ( $p < 0.05$ ) in the study group than in the control group. No significant difference was seen in the inorganic phosphate levels of both groups. There were significant increases in serum calcium levels, ALP and ACP activities in the study group with time ( $p < 0.05$ ), whereas no significant increase was observed in the control group.

**CONCLUSION:** Breast cancer patients have higher calcium levels and higher ALP and ACP activities. The increase in the levels of these parameters with time shows that they could be of importance in monitoring treatment and disease progress in a resource-poor setting.

**Attività di calcio, fosfati inorganici, fosfatasi alcaline e acide nei pazienti con cancro al seno in Calabar, Nigeria.**

**BACKGROUND:** il cancro della mammella è la neoplasia maligna più frequente delle donne in Nigeria. Variazione dei livelli sierici di alcuni parametri biochimici potrebbero aiutare la diagnosi e il follow-up del tumore al seno.

**OBIETTIVO:** Per determinare i livelli sierici di calcio, fosfati inorganici, fosfatasi alcalina (ALP) e la fosfatasi acida (ACP) attività nei pazienti con cancro al seno, e il cambiamento dei livelli sierici nel tempo.

**METODI:** attività di fosfati di calcio sierico totale e inorganico, e nel siero ALP e dei paesi ACP sono stati determinati in 25 donne con cancro al seno e 25 controlli di pari età con metodi colorimetrici ed enzimatici, più di 6 mesi con analisi bimestrale.

**RISULTATI:** Il livello di calcio sierico, attività di ALP e ACP erano significativamente più alti ( $p < 0,05$ ) nel gruppo di studio rispetto al gruppo di controllo. Nessuna differenza significativa è stata osservata nei livelli di fosfato inorganico di entrambi i gruppi. Ci sono stati aumenti significativi nei livelli sierici di calcio, attività di ALP e ACP nel gruppo di studio con il tempo ( $p < 0,05$ ), mentre nessun aumento significativo è stato osservato nel gruppo di controllo.

**CONCLUSIONE:** pazienti affetti da cancro al seno hanno livelli di calcio più alti attività ALP e ACP. L'aumento dei livelli di questi parametri con spettacoli di tempo che potrebbe essere di importanza per il monitoraggio del trattamento e il progresso della malattia in un ambiente povero di risorse.

12: Shiota M, Tsunoda T, Song Y, Yokomizo A, Tada Y, Oda Y, Naito S.

**Enhanced S100 calcium-binding protein P expression sensitizes human bladder cancer cells to cisplatin.**

BJU Int. 2010 Aug 19. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 20726978.

**OBJECTIVE** \* To investigate the role of S100 calcium-binding protein P (S100P) in the gain of cis-diamminedichloroplatinum (II) (cisplatin) resistance in bladder cancer, having previously found, with cDNA microarrays using two pairs of parental (T24, KK47) and their cisplatin-resistant bladder cancer cell lines (T24/DDP10, KK47/DDP20), that S100P mRNA expression was significantly reduced in cisplatin-resistant cells. **MATERIALS AND METHODS** \* S100P mRNA and protein expression levels were investigated by northern and western blot analyses, respectively. \* Intracellular S100P localization was examined by immunocytochemistry and immunohistochemistry. \* S100P over-expression, obtained by transfection with S100P expression plasmid, was used to investigate whether or not S100P affected cellular resistance to cisplatin. **RESULTS** \* S100P mRNA showed increased expression by cisplatin stimulation in parental cell lines. \* On the other hand, S100P mRNA and protein expression levels were markedly reduced in cisplatin-resistant cells. \* The over-expression of S100P in resistant cells resulted in an increased sensitivity to cisplatin. **CONCLUSION** \* In bladder cancer cells, S100P was expressed and localized mainly in the nucleus. \* S100P expression was also involved in cisplatin sensitivity. \* S100P might thus represent a molecular marker predicting cisplatin sensitivity and a molecular therapeutic target for cisplatin-based chemotherapy.

**L'aumento dell'espressione della proteina P legata al calcio S100 sensibilizza le cellule cancerose della vescica al cisplatino**

\* **OBIETTIVO** Per studiare il ruolo di S100 proteina legante il calcio P (S100P) nel guadagno di cis-diamminedichloroplatinum (II) (cisplatino) resistenza nel carcinoma della vescica, dopo aver trovato, con microarray di cDNA utilizzando due coppie di genitori (T24, KK47 ) E la loro cisplatino-resistente linee di cellule di cancro della vescica (T24/DDP10, KK47/DDP20), che S100P espressione di mRNA era significativamente ridotta nelle cellule cisplatino-resistente. **MATERIALI E METODI** \* S100P mRNA e livelli di espressione della proteina sono state indagate da blot settentrionale e occidentale, rispettivamente. \* localizzazione intracellulare S100P è stata esaminata mediante immunocitochimica e immunoistochimica. \* S100P sovra-espressione, ottenuta mediante trasfezione con plasmide espressione S100P, è stato utilizzato per indagare se interessati S100P resistenza cellulare al cisplatino. **RISULTATI** \* S100P mRNA ha mostrato un aumento dell'espressione di stimolazione cisplatino in linee cellulari dei genitori. \* D'altra parte, S100P mRNA e livelli di espressione della proteina sono marcatamente ridotti nelle cellule cisplatino-resistente. \* L'iper-espressione di S100P in cellule resistenti portato ad un aumento della sensibilità al cisplatino. \* **Conclusion** In cellule di cancro alla vescica, S100P è stato espresso e localizzati principalmente nel nucleo. \* espressione S100P è stato anche coinvolto nella sensibilità cisplatino. \* S100P potrebbe quindi rappresentare un marcatore molecolare predire la sensibilità cisplatino e un target molecolare terapeutici per la chemioterapia a base di cisplatino.

13: Carroll C, Cooper K, Papaioannou D, Hind D, Pilgrim H, Tappenden P.

### **Supplemental calcium in the chemoprevention of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis.**

Clin Ther. 2010 May;32(5):789-803. Review. PubMed PMID:20685491.

**OBJECTIVE:** The aim of the review was to assess the evidence for the effectiveness of calcium in reducing the recurrence of adenomas and the occurrence of colorectal cancer among populations at high, intermediate, and low risk of the disease.

**METHODS:** A systematic review of randomized controlled trials (RCTs) was performed to compare calcium alone, and with other agents, versus placebo. Nine databases (Cochrane Library, MEDLINE, PreMEDLINE, CINAHL, EMBASE, Web of Science, Biological Abstracts, the National Research Register, and Current Controlled Trials) were searched for published and unpublished trials. Searches were not restricted by either language or date of publication. All searches were completed in January 2010. Database thesaurus and free text terms for calcium and adenomas or colorectal cancer were used to search for trial reports; additional terms were used to search for other agents of interest, such as NSAIDs and folic acid. Search terms consisted of a combination of terms for colorectal cancer (eg, colon or colorectal and neoplasm or cancer or adenoma) and terms for calcium and RCTs. The initial searches were conducted in June 2008, with update searches in January 2010 to identify more recent studies. The reference lists of relevant studies were also searched for additional papers not identified by the search of electronic databases. Studies had to satisfy the following criteria to be included: RCTs about calcium, with or without other chemopreventive agents, in adults with familial adenomatous polyposis (FAP), hereditary nonpolyposis colorectal cancer, or a history of colorectal adenomas, or with no increased baseline risk of colorectal cancer. Meta-analysis was performed. For discrete and numerical outcomes, relative risks (RRs) and risk differences were reported with 95% CIs. The random-effects model was used to account for clinical and methodologic variations between trials.

**RESULTS:** The original and update searches of electronic databases produced 3835 citations, of which 6 studies (8 papers) met the inclusion criteria. Supplemental calcium had no effect on the number of adenomas in 1 small trial of patients with FAP. Meta-analysis of 3 trials in individuals with a history of adenomas showed a statistically significant reduction in the RR for adenoma recurrence (RR = 0.80 [95% CI, 0.69-0.94], P = 0.006) for those receiving calcium 1200 to 2000 mg/d, but no effect was seen in advanced adenoma (RR = 0.77 [95% CI, 0.50-1.17], P = NS). Meta-analysis of 2 trials in populations with no increased baseline risk for colorectal cancer suggested that calcium, with or without vitamin D, had no effect on the RR for colorectal cancer (RR = 0.62 [95% CI, 0.11-3.40], P = NS).

**CONCLUSION:** Published reports indicated that supplemental calcium was effective for the prevention of adenoma recurrence in populations with a history of adenomas, but no similar effect was apparent in populations at higher or lower risk.

### **Uso supplementare di calcio nella chemioprevenzione del cancro colonrettale: una review sistematica e meta-analisi**

**OBIETTIVO:** Lo scopo della revisione è stato quello di valutare gli elementi di prova per l'efficacia del calcio nel ridurre la recidiva di adenomi e l'insorgenza del cancro del colon-retto tra le popolazioni ad alto rischio, intermedio e basso della malattia.

**METODI:** Una revisione sistematica di studi randomizzati e controllati (RCT) è stata eseguita per confrontare il calcio da solo e con altri agenti, rispetto al placebo. Nove banche dati (Cochrane Library, MEDLINE, PreMEDLINE, CINAHL, EMBASE, Web of Science, Biological Abstracts, il National Research Register, e Current Controlled Trials) sono stati perquisiti per gli studi editi e inediti. Le ricerche non sono state limitate da una lingua o la data di pubblicazione. Tutte le ricerche sono stati completati nel gennaio 2010. thesaurus di database e le condizioni di testo libero per il calcio e di adenomi o tumore del colon-retto sono stati utilizzati per la ricerca di rapporti di prova;

termini aggiuntivi sono stati utilizzati per la ricerca di altri agenti di interesse, come i FANS e acido folico. I termini di ricerca consisteva in una combinazione di termini per il tumore del colon-retto (per esempio, al colon o del colon-retto e tumore o cancro o adenoma) e termini per il calcio e RCT. Le ricerche iniziali sono state condotte nel giugno 2008, con ricerche aggiornamento a gennaio 2010 per identificare gli studi più recenti. Le liste di riferimento di studi rilevanti sono stati cercati documenti aggiuntivi non identificati dalla ricerca di banche dati elettroniche. Gli studi hanno dovuto soddisfare i seguenti criteri per essere inclusi: RCT su calcio, con o senza altri agenti chemiopreventivi, in adulti con poliposi adenomatosa familiare (FAP), il cancro coloretale ereditario senza poliposi, oppure una storia di adenomi coloretali, o senza aumentato rischio di base di cancro coloretale. La meta-analisi è stata effettuata. Per i risultati discreti e numerici, i rischi relativi (RR) e le differenze di rischio sono stati riportati con IC al 95%. Il modello ad effetti casuali è stato utilizzato per tener conto delle variazioni cliniche e metodologico tra le prove. RISULTATI: Le ricerche originali e aggiornamento delle banche dati elettroniche prodotte 3.835 citazioni, di cui 6 studi (8 articoli) ha incontrato i criteri di inclusione. La supplementazione di calcio non ha avuto effetti sul numero di adenomi in uno piccolo studio di pazienti con FAP. La meta-analisi di 3 studi in individui con una storia di adenomi hanno mostrato una riduzione statisticamente significativa del RR di recidiva di adenoma (RR = 0,80 [95% CI, 0,69-0,94], p = 0,006) per coloro che ricevono il calcio 1200-2000 mg / d, ma nessun effetto è stato osservato in adenoma avanzato (RR = 0,77 [95% CI, 0,50-1,17], p = NS). La meta-analisi di 2 studi in popolazioni con alcun rischio di base aumentato per cancro del colon-retto ha suggerito che il calcio, con o senza la vitamina D, non ha avuto effetto sulla RR per il cancro del colon-retto (RR = 0,62 [95% CI, 0,11-3,40], P = NS). CONCLUSIONE: rapporti pubblicati indicano che supplementi di calcio è stato efficace per la prevenzione delle recidive adenoma in popolazioni con una storia di adenomi, ma nessun effetto simile è stato evidente nelle popolazioni a rischio alto o più basso.

14: Hjartåker A, Thoresen M, Engeset D, Lund E.

**Dairy consumption and calcium intake and risk of breast cancer in a prospective cohort: the Norwegian Women and Cancer study.**

Cancer Causes Control. 2010 Nov;21(11):1875-85. Epub 2010 Jul 25. PubMed PMID: 20658314; PubMed Central PMCID: PMC2959158.

**OBJECTIVE:** To study the association between consumption of dairy products and calcium intake and risk of breast cancer risk according to menopausal status.

**METHODS:** In a population-based prospective cohort study of 64,904 Norwegian women followed from 1996/1999 through 2006, we examined total dairy consumption and consumption of various dairy products in relation to pre- and postmenopausal breast cancer risk. We also examined breast cancer in relation to calcium intake and to milk consumption during childhood and performed additional analyses corrected for measurement errors in the dietary data. In total, 218 premenopausal and 1,189 postmenopausal incident breast cancer cases were diagnosed during follow-up.

**RESULTS:** Total dairy, adult, and childhood milk consumption was not associated with either pre- or postmenopausal breast cancer risk. Premenopausal women with the highest consumption of white cheese had half the risk of breast cancer compared to those with the lowest consumption (hazard rate ratio in the 4th quartile vs. the 1st quartile 0.50, 95% confidence interval 0.29-0.87). Total calcium intake tended to be inversely related to premenopausal (hazard rate ratio in the 4th quartile vs. the 1st quartile 0.65, 95% confidence interval 0.39-1.08) and postmenopausal breast cancer (hazard rate ratio in the 4th quartile vs. the 1st quartile 0.85, 95% confidence interval 0.70-1.04). Correcting for measurement errors did not alter the results substantially, nor did exclusion of early cancer cases.

**CONCLUSION:** Dairy consumption is not strongly related to breast cancer risk in this prospective study. A non-significant negative association between calcium intake and breast cancer risk was seen, particularly among premenopausal women.

**Assunzioni di prodotti lattiero-caseari e di calcio e rischio di cancro al seno in una coorte prospettiva: le donne norvegesi e lo studio sul cancro**

Obiettivo: studiare l'associazione tra consumo di prodotti lattiero-caseari e assunzione di calcio e rischio di rischio di cancro al seno in base allo stato menopausale.

**METODI:** In uno studio basato sulla popolazione coorte di 64.904 donne norvegesi seguita dal 1996/1999 al 2006, abbiamo esaminato il consumo totale di prodotti lattiero-caseari e il consumo dei prodotti lattiero-caseari diversi in relazione a pre-menopausa e rischio di cancro al seno. Abbiamo anche esaminato il cancro al seno in relazione all'assunzione di calcio e di consumo di latte durante l'infanzia ed eseguito analisi supplementari corretti per errori di misura nei dati dietetici. In totale, 218 in premenopausa e menopausa 1.189 casi di cancro al seno incidente sono stati diagnosticati durante il follow-up.

**RISULTATI:** latte totale, adulto, e il consumo di latte infanzia non è stata associata oa rischio seno pre-o post-menopausa cancro. Donne in premenopausa con il più alto consumo di formaggio bianco avevano metà del rischio di cancro al seno rispetto a quelli con il più basso consumo (tasso hazard ratio nel quarto quartile rispetto al primo quartile 0,50, intervallo di confidenza 95% 0,29-0,87). Assunzione di calcio totale tendevano ad essere inversamente proporzionale alla pre-menopausa (hazard rate ratio nel quarto quartile rispetto al primo quartile 0,65, intervallo di confidenza 95% 0,39-1,08) e di carcinoma mammario in post-menopausa (tasso hazard ratio nel quarto quartile rispetto al primo quartile 0,85, intervallo di confidenza 95% 0,70-1,04). Correzione di errori di misura non hanno modificato sostanzialmente i risultati, né l'esclusione dei casi di cancro precoce.

**CONCLUSIONE:** il consumo di latte non è fortemente correlato al rischio di cancro al seno in questo studio prospettico. Un'associazione non-negativa significativa tra assunzione di calcio e rischio di cancro al seno è stato visto, soprattutto tra le donne in premenopausa.

15: Toriola AT, Surcel HM, Calypse A, Grankvist K, Luostarinen T, Lukanova A, Pukkala E, Lehtinen M.

**Independent and joint effects of serum 25-hydroxyvitamin D and calcium on ovarian cancer risk: a prospective nested case-control study.**

Eur J Cancer. 2010 Oct;46(15):2799-805. Epub 2010 Jun 18. PubMed PMID: 20601305.

**INTRODUCTION:** Ovarian cancer has very few known modifiable risk factors but dietary studies suggest a role for vitamin D and calcium in the prevention of ovarian cancer. Thus, we investigated the association between pre-diagnostic serum calcium and 25-hydroxyvitamin D (25-OHD) on the risk of later development of ovarian cancer.

**METHODS:** We conducted a population-based nested case-control study within the Finnish Maternity Cohort (FMC). The cohort subset comprised 172 ovarian cancer cases with 172 matched controls (age  $\pm$  1 year, parity and season of blood donation  $\pm$  2 weeks).

**RESULTS:** We observed a significant inverse association between calcium and ovarian cancer risk. Relative risk (estimated as odds ratio, OR) comparing the highest quartile to the lowest quartile was significantly decreased; 0.41 [95% confidence interval (CI) 0.19-0.85, P-trend 0.004]. Even though a comparable association between 25-OHD and ovarian cancer did not reach statistical significance (OR 0.57, 95% CI 0.26-1.24, P-trend 0.07), having sufficient ( $>$  75 nmol/L) serum 25-OHD levels compared to insufficient serum 25-OHD was associated with a significantly decreased risk of ovarian cancer (OR 0.32; 95% CI 0.12-0.91, p-value 0.03). No synergistic protective interaction between high levels of calcium and 25-OHD against ovarian cancer was observed, the joint effect being just multiplicative.

**CONCLUSION:** Calcium and vitamin D act independently to reduce the risk of ovarian cancer. The decreased risk of ovarian cancer associated with pre-diagnostic serum calcium and vitamin D needs to be evaluated further for possible new insights into ovarian cancer prevention.

**Effetti indipendenti e comuni di 25-idrossivitamina D e calcio sul rischio di cancro ovarico: uno studio caso-controllo prospettico**

**INTRODUZIONE:** Il cancro dell'ovaio è fattori noti di rischio modificabili ben pochi, ma gli studi dieta suggeriscono un ruolo per la vitamina D e calcio nella prevenzione del cancro ovarico. Quindi, abbiamo studiato l'associazione tra calcio sierico pre-diagnostica e di 25-idrossivitamina D (25-OHD) sul rischio di successivo sviluppo di cancro ovarico.

**METODI:** Abbiamo condotto uno studio di popolazione caso-controllo nidificato all'interno del finlandese maternità coorte (FMC). Il sottoinsieme di coorte comprendeva 172 casi di tumore ovarico con 172 controlli appaiati (età  $\pm$  1 anno, parità e la stagione della donazione del sangue  $\pm$  2 settimane).

**RISULTATI:** Abbiamo osservato una significativa associazione inversa tra rischio di cancro al calcio e alle ovaie. Il rischio relativo (stimato come odds ratio, OR) confrontando il quartile più alto al più basso quartile era significativamente diminuito, 0,41 [95% intervallo di confidenza (CI) 0,19-,85, P-trend 0,004]. Anche se una associazione analoga tra il cancro 25-OHD e ovarico non ha raggiunto la significatività statistica (OR 0,57, 95% CI 0,26-1,24, p-trend 0,07), avendo sufficiente ( $>$  75 nmol / L) livelli sierici di 25-OHD rispetto al insufficienti livelli sierici di 25-OHD è stato associato ad un rischio significativamente ridotto di cancro ovarico (OR 0,32, IC 95% 0,12-0,91, p-value 0,03). Nessuna interazione sinergica di protezione tra alti livelli di calcio e 25-OHD contro il cancro ovarico è stato osservato, l'effetto congiunto di essere solo moltiplicativa.

**CONCLUSIONE:** Il calcio e la vitamina D agisce in modo indipendente per ridurre il rischio di cancro ovarico. La diminuzione del rischio di cancro ovarico associato al calcio sierico pre-diagnostica e vitamina D deve essere valutata ulteriormente per possibili nuove prospettive di prevenzione del cancro ovarico.

16: Jacobs ET, Martínez ME, Campbell PT, Conti DV, Duggan D, Figueiredo JC, Haile RW, LeRoy EC, Poynter JN, Thompson PA, Baron JA.

**Genetic variation in the retinoid X receptor and calcium-sensing receptor and risk of colorectal cancer in the Colon Cancer Family Registry.**

Carcinogenesis. 2010 Aug;31(8):1412-6. Epub2010 Jun 17. PubMed PMID: 20558521; PubMed Central PMCID: PMC2915636.

Genetic variants in the calcium/vitamin D metabolic pathway may be related to risk for colorectal cancer. While several investigations of vitamin D receptor (VDR) polymorphisms and colorectal cancer have been conducted, no studies to date have evaluated the association of genetic variation in the heterodimer partner for VDR, the retinoid X receptor (RXR). Another important gene in this pathway is the calcium-sensing receptor (CASR). Employing a discordant-sibship case-control design, we examined the association between single nucleotide polymorphisms (SNPs) in RXRA and CASR and risk for colorectal cancer overall and by colorectal subsite and microsatellite instability (MSI) status using data from the Colon Cancer Family Registry. No gene-level relationships between RXRA or CASR and colorectal cancer overall were observed. However, for RXRA SNP rs7861779, a high-interest SNP selected for study a priori, there was a statistically significantly increased risk for proximal colorectal cancer among those with at least one A allele [odds ratio (OR) = 1.42; 95% confidence interval (CI) = 1.03-1.97]. Another selected RXRA SNP, rs12004589, was significantly associated with risk of MSI-high cancers (OR = 2.27; 95% CI = 1.13-4.56). Additionally, CASR SNP rs1801726 was significantly associated with a reduced risk for rectal cancer (OR = 0.53; 95% CI = 0.29-0.96). These results provide support that RXRA SNPs rs7861779 and rs12004589 and CASR SNP rs1801726 may be important markers for colorectal neoplasia. Further work is needed to elucidate their role in the carcinogenic pathway.

**Variatione genetica nel recettore dei retinoidi X e nel recettore sensibile al calcio e rischio di cancro colonrettale nel Registro Familiare del Cancro al Colon**

Varianti genetiche nel calcio / vitamina D via metabolica può essere collegato al rischio di tumore del colon-retto. Mentre diverse inchieste del recettore della vitamina D (VDR) e polimorfismi del colon-retto sono stati condotti, nessuno studio fino ad oggi hanno valutato l'associazione di variazioni genetiche nel partner eterodimero per VDR, il recettore retinoide X (RXR). Un altro gene importante in questo percorso è il recettore sensibile al calcio (CASR). Impiegando una discordante-sibship design caso-controllo, abbiamo esaminato l'associazione tra polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) in RXRA e CASR e rischio per il tumore coloretale globale e per sito secondario del colon-retto e di instabilità dei microsatelliti (MSI) utilizzando dati di stato per il Cancro Colon famiglia anagrafica . No rapporti gene-livello tra RXRA o CASR e globale del cancro del colon-retto sono stati osservati. Tuttavia, per RXRA SNP rs7861779, un SNP ad alto interesse selezionati per lo studio a priori, c'è stato un rischio statisticamente significativo per prossimale del colon-retto tra quelle con almeno un allele A ratio [odds (OR) = 1,42; intervallo di confidenza del 95% (CI) = 1,03-1,97]. Un altro selezionato RXRA SNP, rs12004589, era significativamente associato al rischio di tumori MSI-alta (OR = 2.27, IC 95% = 1,13-4,56). Inoltre, CASR SNP rs1801726 era significativamente associato ad un ridotto rischio di tumore del retto (OR = 0.53, IC 95% = ,29-,96). Questi risultati forniscono il supporto che RXRA SNPs rs7861779 e rs12004589 e CASR SNP rs1801726 possono essere indicatori importanti per neoplasia coloretale. Sono necessari ulteriori lavori per chiarire il loro ruolo nel percorso cancerogeni.

**A short primer on the calcium sensing receptor: an important cog in the colon cancer wheel?**

Dig Dis Sci. 2011 Feb;56(2):279-84. Epub2010 Jun 16. Review. PubMed PMID: 20556514.

The gastrointestinal (GI) tract handles a complex task of nutrient absorption and excretion of excess fluid, electrolytes, and toxic substances. GI epithelium is under constant proliferation and renewal. Differentiation of colonocytes occurs as they migrate from the basal layer to the apex of the crypt. Cells of the basal layer are highly proliferative but less differentiated, whereas apical cells are highly differentiated but non-proliferative. Alterations of this intricate process lead to abnormal proliferation and differentiation of colorectal mucosa leading to development of polyps and neoplasia. The effects of calcium (Ca) on colorectal mucosal growth have been extensively studied after the discovery of the calcium sensing receptor (CaSR). Fluctuation in extracellular Ca can induce hyperproliferation or quiescence. Disruption in the function of CaSR and/or changes in the level of CaSR expression can cause loss of growth suppressing effects of extracellular Ca. This review addresses the role of Ca and CaSR in the physiology and pathophysiology of colonocyte proliferation.

**Un primer corto sul recettore sensibile al calcio: una componente importante nel cancro al colon?**

Il tratto gastrointestinale (GI) gestisce un complesso lavoro di assorbimento dei nutrienti e l'eliminazione dei liquidi in eccesso, elettroliti e sostanze tossiche. Epitelio GI è in fase di proliferazione e un rinnovamento costanti. Differenziazione dei colonociti si verifica quando migrano dallo strato basale all'apice della cripta. Le cellule dello strato basale sono altamente proliferative, ma meno differenziato, mentre le cellule apicali sono altamente differenziate, ma non proliferativa. Alterazioni di questo cavo complesso processo di proliferazione e differenziazione abnorme della mucosa del colon-retto che porta allo sviluppo di polipi e neoplasie. Gli effetti del calcio (Ca), sulla crescita della mucosa del colon-retto sono stati ampiamente studiati dopo la scoperta del recettore sensibile al calcio (CaSR). Fluttuazione di Ca extracellulare può indurre iperproliferazione o quiescenza. Perturbazioni nella funzione di CaSR e / o cambiamenti nel livello di espressione del CaSR può causare la perdita di effetti di crescita soppressione di Ca extracellulare. Questa recensione affronta il ruolo di Ca e CaSR nella fisiologia e fisiopatologia della proliferazione colonocyte.

20: Block GJ, DiMattia GD, Prockop DJ.

**Stanniocalcin-1 regulates extracellular ATP-induced calcium waves in human epithelial cancer cells by stimulating ATP release from bystander cells.**

PLoS One. 2010 Apr 20;5(4):e10237. PubMed PMID:20422040; PubMed Central PMCID: PMC2857883.

**BACKGROUND:** The epithelial cell response to stress involves the transmission of signals between contiguous cells that can be visualized as a calcium wave. In some cell types, this wave is dependent on the release of extracellular trinucleotides from injured cells. In particular, extracellular ATP has been reported to be critical for the epithelial cell response to stress and has recently been shown to be upregulated in tumors in vivo.

**METHODOLOGY/PRINCIPAL FINDINGS:** Here, we identify stanniocalcin-1 (STC1), a secreted pleiotrophic protein, as a critical mediator of calcium wave propagation in monolayers of pulmonary (A549) and prostate (PC3) epithelial cells. Addition of STC1 enhanced and blocking STC1 decreased the distance traveled by an extracellular ATP-dependent calcium wave. The same effects were observed when calcium was stimulated by the addition of exogenous ATP. We uncover a positive feedback loop in which STC1 promotes the release of ATP from cells in vitro and in vivo.

**CONCLUSIONS/SIGNIFICANCE:** The results indicated that STC1 plays an important role in the early response to mechanical injury by epithelial cells by modulating signaling of extracellular ATP. This is the first report to describe STC1 as a modulator of purinergic receptor signaling.

**Stanniocalcina-1 regola il calcio indotto dall'ATP extracellulare nelle cellule cancerose epiteliali umane tramite la stimolazione del rilascio di ATP dalle cellule adiacenti**

**BACKGROUND:** La risposta delle cellule epiteliali di stress comporta la trasmissione di segnali tra cellule contigue, che può essere visualizzato come un'onda di calcio. In alcuni tipi di cellule, questa onda dipende dal rilascio di trinucleotidi extracellulare dalle cellule danneggiate. In particolare, ATP extracellulare è stato segnalato per essere critica per la risposta delle cellule epiteliali di stress ed è stato recentemente dimostrato di essere up-regolato nei tumori in vivo.

**METODOLOGIA / Principali risultati:** Qui, identifichiamo stanniocalcin-1 (STC1), una proteina secreta pleiotrofica, come mediatore critico di propagazione delle onde di calcio in monostrati di polmonare (A549) e della prostata (PC3) cellule epiteliali. L'aggiunta di STC1 rafforzata e bloccando STC1 diminuito la distanza percorsa da un'onda extracellulare di calcio ATP-dipendente. Gli stessi effetti sono stati osservati quando il calcio è stata stimolata con l'aggiunta di ATP esogeno. Abbiamo scoperto un ciclo di feedback positivo in cui STC1 promuove il rilascio di ATP da parte delle cellule in vitro e in vivo.

**CONCLUSIONI / SIGNIFICATO:** I risultati hanno indicato che STC1 svolge un ruolo importante nella risposta precoce di lesioni meccaniche da parte delle cellule epiteliali modulando segnalazione di ATP extracellulare. Questo è il primo rapporto per descrivere STC1 come modulatore dei recettori purinergici o segnalazione.

21: Motiani RK, Abdullaev IF, Trebak M.

**A novel native store-operated calcium channel encoded by Orai3: selective requirement of Orai3 versus Orai1 in estrogen receptor-positive versus estrogen receptor-negative breast cancer cells.**

J Biol Chem. 2010 Jun 18;285(25):19173-83. Epub 2010 Apr 15. PubMed PMID: 20395295; PubMed Central PMCID: PMC2885196.

Store-operated calcium (Ca<sup>2+</sup>) entry (SOCE) mediated by STIM/Orai proteins is a ubiquitous pathway that controls many important cell functions including proliferation and migration. STIM proteins are Ca<sup>2+</sup> sensors in the endoplasmic reticulum and Orai proteins are channels expressed at the plasma membrane. The fall in endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> causes translocation of STIM1 to subplasmalemmal puncta where they activate Orai1 channels that mediate the highly Ca<sup>2+</sup>-selective Ca<sup>2+</sup> release-activated Ca<sup>2+</sup> current (I(CRAC)). Whereas Orai1 has been clearly shown to encode SOCE channels in many cell types, the role of Orai2 and Orai3 in native SOCE pathways remains elusive. Here we analyzed SOCE in ten breast cell lines picked in an unbiased way. We used a combination of Ca<sup>2+</sup> imaging, pharmacology, patch clamp electrophysiology, and molecular knockdown to show that native SOCE and I(CRAC) in estrogen receptor-positive (ER(+)) breast cancer cell lines are mediated by STIM1/2 and Orai3 while estrogen receptor-negative (ER(-)) breast cancer cells use the canonical STIM1/Orai1 pathway. The ER(+) breast cancer cells represent the first example where the native SOCE pathway and I(CRAC) are mediated by Orai3. Future studies implicating Orai3 in ER(+) breast cancer progression might establish Orai3 as a selective target in therapy of ER(+) breast tumors.

**Un canale del calcio nuovo codificato da Orai3: requisito selettivo di Orai3 verso Orai1 nelle cellule mammarie cancerose positive al recettore degli estrogeni rispetto a quelle negative al recettore degli estrogeni**

Calcio Store-operati (Ca<sup>2+</sup>), voce (Soce) mediata da STIM / proteine Orai è un percorso onnipresente che controlla molte funzioni importanti, compresa la proliferazione delle cellule e la migrazione. Le proteine sono STIM Ca<sup>2+</sup> sensori nel reticolo endoplasmatico e le proteine Orai sono canali espressi a livello della membrana plasmatica. Il calo reticolo endoplasmatico Ca<sup>2+</sup> provoca la traslocazione di STIM1 a puncta subplasmalemmal dove attivano i canali che mediano il Orai1 altamente Ca<sup>2+</sup>-selettivi Ca<sup>2+</sup> Ca rilascio attivati (2+) corrente (I(CRAC)). Orai1 considerando che è stato chiaramente dimostrato di codificare i canali Soce in molti tipi di cellule, il ruolo di Orai2 e Orai3 in nativo percorsi Soce resta sfuggente. Qui abbiamo analizzato Soce in seno dieci linee di cellule raccolte in modo imparziale. Abbiamo utilizzato una combinazione di Ca<sup>2+</sup> di imaging, la farmacologia, elettrofisiologia patch clamp, atterramento e molecolari per dimostrare che Soce natale ed io (CRAC) in positivo per il recettore dell'estrogeno (ER(+)) linee di cellule di cancro al seno sono mediati da STIM1 / 2 e Orai3 mentre gli estrogeni negativi per il recettore (ER(-)) le cellule di cancro al seno usa il percorso canonico STIM1/Orai1. La ER(+) le cellule di cancro al seno rappresenta il primo esempio in cui il percorso Soce natale ed io (CRAC) sono mediate da Orai3. Gli studi futuri che implicano Orai3 in ER(+) la progressione del cancro al seno potrebbe stabilire Orai3 come obiettivo selettivo nella terapia di ER(+) i tumori al seno.

22: Kurniali PC, Luo LG, Weitberg AB.

### **Role of calcium/ magnesium infusion in oxaliplatin-based chemotherapy for colorectal cancer patients.**

Oncology(Williston Park). 2010 Mar;24(3):289-92. PubMed PMID: 20394142.

The combination of oxaliplatin plus fluorouracil/leucovorin is known as the FOLFOX regimen, and it has become a standard regimen for colorectal cancer (CRC), both as adjuvant therapy and as treatment for metastatic disease. Unfortunately, platinum-based chemotherapies also produce neurotoxicity as a side effect. Neurotoxicity is the most common dose-limiting toxicity of oxaliplatin, and it is one of the major causes for patients to stop receiving chemotherapy. It can manifest as either of two distinct syndromes: a transient, acute syndrome that can appear during or shortly after the infusion (approximately 1%-2% of patients), and a dose-limiting, cumulative sensory neuropathy. Calcium/magnesium (Ca/Mg) infusions have been used to decrease the incidence of oxaliplatin-induced neuropathy. The actual utility of Ca/Mg infusions in this setting has been an interesting and controversial topic. They may reduce the severity of neurotoxicity, but some investigators have questioned whether they also will alter the efficacy of these chemotherapy regimens. In this paper, we review the clinical data concerning the usefulness of Ca/Mg infusions in reducing the incidence of oxaliplatin-induced neuropathy as well as their effect on responsiveness to chemotherapy.

### **Ruolo del calcio/magnesio nella chemioterapia basata sull'oxaliplatino nei pazienti con cancro colonrettale**

La combinazione di oxaliplatino più fluorouracile / leucovorin è conosciuto come il regime FOLFOX, ed è diventato una terapia standard per il tumore del colon-retto (CRC), sia come terapia adiuvante e come trattamento per la malattia metastatica. Purtroppo, chemioterapie a base di platino anche produrre neurotossicità come un effetto collaterale. Neurotossicità è risultata la più comune tossicità dose-limitante di oxaliplatino, ed è una delle cause principali per i pazienti per non ricevere più chemioterapia. Essa può manifestarsi come una delle due sindromi distinte: una transitoria, la sindrome acuta che può apparire durante o subito dopo l'infusione (circa l'1% -2% dei pazienti), e una dose-limitante, neuropatia sensoriale cumulativo. Calcio / magnesio (Ca / Mg) infusioni sono state utilizzate per diminuire l'incidenza di neuropatia indotta a base di oxaliplatino. L'utilità effettiva di infusioni di Ca / Mg in questa impostazione è stata un argomento interessante e controverso. Essi possono ridurre la gravità della neurotossicità, ma alcuni ricercatori si sono chiesti se anche loro si altera l'efficacia di questi regimi di chemioterapia. In questo articolo, passiamo in rassegna i dati clinici riguardanti l'utilità di infusioni di Ca / Mg nel ridurre l'incidenza di neuropatia indotta a base di oxaliplatino, nonché il loro effetto sulla capacità di risposta alla chemioterapia.

23: Anderson LN, Cotterchio M, Vieth R, Knight JA.

**Vitamin D and calcium intakes and breast cancer risk in pre- and postmenopausal women.**

Am J Clin Nutr. 2010 Jun;91(6):1699-707. Epub 2010 Apr 14. PubMed PMID: 20392891.

**BACKGROUND:** Some evidence suggests that vitamin D may reduce breast cancer risk. Despite the biological interaction between vitamin D and calcium, few studies have evaluated their joint effects on breast cancer risk.

**OBJECTIVE:** The objective was to evaluate the associations and potential interaction between vitamin D and calcium (from food and supplements) and breast cancer risk in a population-based case-control study.

**DESIGN:** Breast cancer cases aged 25-74 y (diagnosed 2002-2003) were identified through the Ontario Cancer Registry. Controls were identified by using random digit dialing; 3101 cases and 3471 controls completed epidemiologic and food-frequency questionnaires. Adjusted odds ratios (ORs) and 95% CIs were estimated by using multivariate logistic regression.

**RESULTS:** Vitamin D and calcium intakes from food only and total combined intakes (food and supplements) were not associated with breast cancer risk, although the mean intake of vitamin D was low. Vitamin D supplement intake >10 microg/d (400 IU/d) compared with no intake was associated with a reduced risk of breast cancer (adjusted OR: 0.76; 95% CI: 0.59, 0.98). No categories of calcium supplement intake were significantly associated with reduced breast cancer risk, but a significant inverse trend was observed ( $P = 0.04$ ). There were no significant interactions involving vitamin D, calcium, or menopausal status.

**CONCLUSIONS:** No associations were found between overall vitamin D or calcium intake and breast cancer risk. Vitamin D from supplements was independently associated with reduced breast cancer risk. Further research is needed to investigate the effects of higher doses of vitamin D and calcium supplements.

**Assunzioni di vitamina D e calcio e rischio di cancro al seno nelle donne pre- e post-menopausa**

**BACKGROUND:** Alcune evidenze suggeriscono che la vitamina D può ridurre il rischio di cancro al seno. Nonostante l'interazione biologica tra vitamina D e calcio, pochi studi hanno valutato gli effetti congiunti sul rischio di cancro al seno.

**OBIETTIVO:** L'obiettivo era quello di valutare le associazioni e potenziale interazione tra vitamina D e calcio (da alimenti e supplementi) e rischio di cancro della mammella in uno studio di popolazione caso-controllo.

**DESIGN:** casi di cancro al seno di età compresa tra 25-74 y (diagnosticati 2002-2003) sono stati identificati attraverso l'Ontario Cancer Registry. I controlli sono stati identificati mediante la selezione casuale di cifre; 3.101 casi e 3.471 controlli completato questionari epidemiologici e food-frequency. Adjusted odds ratio (OR) e IC al 95% è stato stimato utilizzando la regressione logistica multivariata.

Assunzioni di vitamina D e calcio da solo cibo e totale assunzione combinata (alimenti e integratori) non sono stati associati al rischio di cancro al seno, anche se l'assunzione media di vitamina D è stata bassa: **RISULTATI.** Assunzione di vitamina supplemento  $D > 10$  microg / die (400 UI / die) rispetto a nessuna assunzione è stata associata ad un ridotto rischio di carcinoma mammario (OR aggiustato: 0,76; 95% CI: 0,59, 0,98). Nessuna categoria di assunzione di calcio supplemento erano significativamente associati ad un minor rischio cancro al seno, ma una significativa tendenza inversa è stata osservata ( $P = 0,04$ ). Non ci sono state significative interazioni che coinvolgono la vitamina D, calcio, o lo stato della menopausa.

**CONCLUSIONI:** Nessuna associazione è stata trovata tra vitamina D globale o l'assunzione di calcio e rischio di cancro al seno. La vitamina D da integratori era indipendentemente associata a ridotto rischio di cancro al seno. Sono necessarie ulteriori ricerche per studiare gli effetti di dosi più elevate di vitamina D e supplementi di calcio.

25: Schwartz L, Abolhassani M, Guais A, Sanders E, Steyaert JM, Campion F, Israël M.

**A combination of alpha lipoic acid and calcium hydroxycitrate is efficient against mouse cancer models: preliminary results.**

Oncol Rep. 2010 May; 23(5):1407-16. PubMed PMID: 20372858.

The impact of metabolic dysregulation on tumor development has long been established. We have targeted two enzymes that are altered during carcinogenesis: pyruvate dehydrogenase (PDH), which is down-regulated, and ATP citrate lyase, which is overexpressed in cancer cells. Alpha lipoic acid is a cofactor of PDH, while hydroxycitrate is a known inhibitor of ATP citrate lyase. Our hypothesis is that a combination of these drugs may have antitumoral potential. The efficacy of these molecules was screened in vitro by treatment of different human cancer and murine cell lines. Lipoic acid reduced the cell number by 10-50% depending on concentrations (0.1-10 microM) and cell types. Calcium hydroxycitrate reduced the cell number by 5-60% at different concentrations (10-500 microM). When hydroxycitrate and lipoic acid were used together, there was a major cytotoxic effect: complete cell death was seen following 8 microM lipoic acid and 300 microM hydroxycitrate treatment for 72 h. The combination of alpha lipoic acid and hydroxycitrate was administered to healthy mice, at doses currently utilized for other indications than cancer; no demonstrable toxicity was observed. The combination was used to treat mouse syngenic cancer models: MBT-2 bladder transitional cell carcinoma, B16-F10 melanoma and LL/2 Lewis lung carcinoma. The efficacy of this combination appears similar to conventional chemotherapy (cisplatin or 5-fluorouracil) as it resulted in significant tumor growth retardation and enhanced survival. This preliminary study suggests that this combination of drugs is efficient against cancer cell proliferation both in vitro and in vivo. A clinical trial is warranted.

**Una combinazione dell'acido alfa lipoico e dell'idrossicitrato di calcio è efficace verso modelli di topi affetti da tumore: risultati preliminari**

L'incidenza di alterazioni metaboliche sullo sviluppo del tumore è da tempo stabilito. Ci hanno preso di mira due enzimi che sono stati alterati durante la carcinogenesi: piruvato deidrogenasi (PDH), che è down-regolato, e ATP citrato liasi, che è sovraespresso nelle cellule tumorali. L'acido alfa lipoico è un cofattore di PDH, mentre hydroxycitrate è un noto inibitore di ATP citrato liasi. La nostra ipotesi è che una combinazione di questi farmaci possono avere un potenziale antitumorale. L'efficacia di queste molecole è stato proiettato in vitro per trattamento di diversi tumori umani e linee cellulari murine. L'acido lipoico ridotto il numero delle cellule da 10-50% a seconda delle concentrazioni (0.1-10 microM) e tipi di cellule. Calcio hydroxycitrate ridotto il numero di cellule da 5-60% a diverse concentrazioni (10-500 microM). Quando l'acido lipoico hydroxycitrate e sono stati utilizzati insieme, c'è stato un importante effetto citotossico: morte cellulare completo è stato visto seguenti 8 acido lipoico e 300 microM trattamento hydroxycitrate microM per 72 h. La combinazione di acido alfa lipoico e hydroxycitrate è stata somministrata a topi sani, a dosi attualmente utilizzati per indicazioni diverse da cancro, non è stata osservata tossicità dimostrabile. La combinazione è stata usata per trattare il cancro singenici modelli di mouse: MBT-2 carcinoma a cellule di transizione della vescica, melanoma B16-F10 e LL / 2 carcinoma polmonare Lewis. L'efficacia di questa combinazione sembra simile alla chemioterapia convenzionale (cisplatino o 5-fluorouracile), così come risultava in ritardo significativo la crescita tumorale e la sopravvivenza maggiore. Questo studio preliminare suggerisce che questa combinazione di farmaci è efficace contro la proliferazione delle cellule tumorali sia in vitro che in vivo. Un trial clinico è giustificato.

29: Anghileri LJ.

**Magnesium, calcium and cancer.**

Magnes Res. 2009Dec;22(4):247-55. Review. PubMed PMID: 20228002.

Magnesium ion (Mg(2+)) and calcium ion (Ca(2+)) control a diverse and important range of cellular processes, such as gene transcription, cell proliferation, neoplastic transformation, immune response and therapeutic treatment. Their characteristic biologic antagonism makes it important to treat the most important aspects of that competitive behavior together. This synopsis aims to be a useful means of promoting further research on the relationship between both cations and human health affected by environmental conditions.

**Magnesio, calcio e cancro**

Ione magnesio (Mg (2 +)) e di ioni calcio (Ca (2 +)) controllare una gamma varia e importante di processi cellulari, come la trascrizione genica, la proliferazione cellulare, trasformazione neoplastica, la risposta immunitaria e trattamento terapeutico. Il loro antagonismo biologico caratteristica lo rende importante per trattare gli aspetti più importanti di tale comportamento concorrenziale insieme. Questa sintesi si propone di essere un mezzo utile per promuovere ulteriori ricerche sulla relazione tra i due cationi e la salute umana influenzato dalle condizioni ambientali.

31: Sun B, Zhang X, Yonz C, Cummings BS.

**Inhibition of calcium-independent phospholipase A2 activates p38 MAPK signaling pathways during cytotaxis in prostate cancer cells.**

Biochem Pharmacol. 2010 Jun 15;79(12):1727-35. Epub 2010Feb 18. PubMed PMID: 20171194.

The p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathways activated during cytotaxis induced by Ca(2+)-independent phospholipase A2 (iPLA2) inhibition in prostate cancer cells were investigated. iPLA2 inhibition using siRNA, or the selective inhibitor bromoenol lactone (BEL) and its enantiomers, decreased growth in LNCaP (p53 positive) and PC-3 (p53 negative) human prostate cancer cells. Decreased cell growth correlated to time- and concentration-dependent activation of the mitogen-activated protein kinase p38 in both cell lines. Inhibition of cytosolic iPLA(2)beta using S-BEL, induced significantly higher levels of P-p53, p53, p21 and P-p38 expression than inhibition of microsomal iPLA2 gamma using R-BEL. Inhibition of p38 using SB202190 or SB203580 inhibited BEL-induced increases in P-p53 (ser15), p53 and p21, and altered the number of cells in G1 in LNCaP cells, and S-phase in PC-3 cells. BEL treatment also induced reactive species in PC-3 and LNCaP cells, which was partially reversed by pretreatment with N-acetyl-cysteine (NAC). NAC subsequently inhibited BEL-induced activation of p38 and p53 in LNCaP cells. In addition, treatment of cells with NAC partially reversed the effect of BEL on cell growth and preserved cell morphology. Collectively, these data demonstrate the novel findings that iPLA2 inhibition activates p38 by inducing reactive species, and further suggest that this signaling kinase is involved in p53 activation, cell cycle arrest and cytotaxis.

**L'inibizione della fosfolipasi A2 indipendente dal calcio attiva la via di segnale p38 MAPK durante la citostasi nelle cellule cancerose prostatiche**

Il mitogeno p38-attivato proteina-chinasi (MAPK) vie di segnalazione attivate durante cytotaxis indotta da Ca (2 +) fosfolipasi A2-indipendente (iPLA2) inibizione in cellule di cancro alla prostata sono stati studiati. iPLA2 inibizione con siRNA, o il lattone bromoenol selettivo inibitore (BEL) ed è enantiomeri, riduzione della crescita in LNCaP (p53 positivo) e PC-3 (p53 negativo) cellule umane di cancro alla prostata. Diminuzione della crescita cellulare correlato al tempo e l'attivazione dipendente dalla concentrazione della proteina mitogeno-attivata della chinasi p38 in entrambe le linee cellulari. L'inibizione della IPLA citosolica (2) beta con S-BEL, indotta livelli significativamente più elevati di P-p53, p53, p21 e p38 P-espressione di inibizione della microsomiale iPLA2 gamma con R-BEL. L'inibizione della p38 utilizzando SB202190 o SB203580 inibito BEL-indotta da aumenti di P-p53 (ser15), p53 e p21, e alterato il numero di cellule in G1 nelle cellule LNCaP, e S-fase PC-3 celle. Trattamento BEL anche indotto specie reattive in PC-3 e cellule LNCaP, che è stato parzialmente annullato dal pretrattamento con N-acetil-cisteina (NAC). NAC successivamente inibita BEL-indotta l'attivazione di p38 e p53 nelle cellule LNCaP. Inoltre, il trattamento delle cellule con NAC parzialmente annullato l'effetto della BEL sulla crescita cellulare e la morfologia delle cellule conservate. Nel complesso, questi dati dimostrano i risultati romanzo che iPLA2 inibizione attiva p38 inducendo specie reattive, e inoltre suggeriscono che questa segnalazione chinasi è coinvolta nella attivazione di p53, arresto del ciclo cellulare e cytotaxis.

32: Maggiori L, Rullier E, Meyer C, Portier G, Faucheron JL, Panis Y.

**Randomized controlled trial of pelvic calcium alginate following rectal cancer surgery.**

Br JSurg. 2010 Apr;97(4):479-84. PubMed PMID: 20155788.

**BACKGROUND:** The aim of this randomized controlled trial was to assess the possible benefit of using a new haemostatic agent (Hémoionic) in the pelvic cavity in sphincter-saving surgery for rectal cancer.

**METHODS:** Eighty-five patients undergoing elective sphincter-saving rectal resection for cancer were randomized into Hémoionic (41 patients) and control (44) groups. In both groups, a pelvic suction drain was left in place for as long as the daily output exceeded 20 ml. The primary endpoint was volume of fluid collected by the suction drain; secondary endpoints were duration of drainage, and postoperative mortality and morbidity rates.

**RESULTS:** The mean total drainage volume was significantly lower in the Hémoionic group (453 ml versus 758 ml in control group;  $P = 0.031$ ). There was no significant difference between groups in duration of drainage and morbidity. The mortality rate was four of 41 in the Hémoioni group and one of 44 in the control group ( $P = 0.192$ ).

**CONCLUSION:** Hémoionic may reduce the drainage volume after sphincter-saving surgery for rectal cancer, but offers no clinical advantage.

**Trial randomizzato controllato dell'alginato di calcio pelvico seguita da chirurgia di un tumore rettale**

**BACKGROUND:** L'obiettivo di questo studio controllato randomizzato è stato quello di valutare il possibile beneficio di utilizzare un nuovo agente emostatico (Hémoionic) nella cavità pelvica in chirurgia di salvataggio degli sfinteri per cancro del retto.

**METODI:** Ottantacinque pazienti sottoposti a resezione elettiva dello sfintere salva-rettale per cancro sono stati randomizzati in Hémoionic (41 pazienti) e controllo (44) i gruppi. In entrambi i gruppi, un drenaggio di aspirazione pelvico è stato lasciato in sede per tutto il tempo la produzione giornaliera superiore a 20 ml. L'endpoint primario era il volume di fluido raccolti dalla fuga di aspirazione; endpoint secondari erano la durata di drenaggio e di mortalità e morbilità postoperatoria.

**RISULTATI:** Il volume medio di drenaggio totale era significativamente inferiore nel gruppo Hémoionic (453 ml versus 758 ml nel gruppo di controllo,  $P = 0,031$ ). Non vi era alcuna differenza significativa tra i gruppi della durata di drenaggio e morbilità. Il tasso di mortalità era di quattro di 41 nel gruppo Hémoioni e uno di 44 nel gruppo controllo ( $P = 0,192$ ).

**CONCLUSIONE:** Hémoionic può ridurre il volume di scarico dopo l'intervento dello sfintere di risparmio per il cancro del retto, ma non offre alcun vantaggio clinico.

33: Kawase T, Matsuo K, Suzuki T, Hirose K, Hosono S, Watanabe M, Inagaki M, Iwata H, Tanaka H, Tajima K.

**Association between vitamin D and calcium intake and breast cancer risk according to menopausal status and receptor status in Japan.**

Cancer Sci. 2010 May;101(5):1234-40. Epub 2010 Jan 12. PubMed PMID: 20151981.

Although several studies have investigated the possible association between elevated vitamin D and calcium intake and low breast cancer risk, findings have been inconsistent. We conducted a case-control study to clarify the association between vitamin D and calcium intake and breast cancer risk among pre- and post-menopausal women in Japan. We also investigated whether these effects were modified by tumor receptor status, specifically estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), or human epidermal growth factor receptor-2 (HER2) status. We examined 1803 breast cancer patients and 3606 age- and menopausal status-matched noncancer controls. Among cases, 713 were assessed for ER, PR, and HER2 status. Odds ratios (ORs) with 95% confidence intervals (CIs) were estimated using conditional or unconditional logistic models adjusted for potential confounders. A significant inverse association was observed between vitamin D and calcium intake and breast cancer risk among all subjects, with top quartile ORs of 0.76 (95% CI, 0.63-0.90; trend P = 0.001) and 0.83 (95% CI, 0.69-0.99; trend P = 0.038), respectively. In analyses stratified by menopausal status, a significant association between risk and vitamin D was observed only among premenopausal women (trend P < 0.001), whereas that between risk and calcium intake was seen only among postmenopausal women (trend P = 0.022). Heterogeneity by menopausal status for these associations was statistically significant. This association was modified by tumor receptor status. These findings suggest that the protective effects of vitamin D and calcium intake against breast cancer risk may differ by menopausal status and receptor status.

**Associazione tra assunzione di vitamina D e calcio e rischio di cancro al seno in base allo stato menopausale e lo stato del recettore in Giappone**

Anche se diversi studi hanno indagato la possibile associazione tra vitamina D e di elevata assunzione di calcio e basso rischio di cancro al seno, i risultati sono stati contraddittori. Abbiamo condotto uno studio caso-controllo per chiarire l'associazione tra vitamina D e apporto di calcio e rischio di cancro al seno tra le donne pre-e post-menopausa in Giappone. Abbiamo anche studiato se questi effetti sono stati modificati in base allo stato dei recettori del tumore, in particolare recettore per gli estrogeni (ER), recettore del progesterone (PR), o epidermico umano del recettore del fattore di crescita-2 (HER2) di stato. Sono stati esaminati 1.803 pazienti con cancro mammario e 3606 controlli per età e stato di menopausa noncancer-matched. Tra i casi, 713 sono stati valutati per ER, PR, e lo stato di HER2. Odds ratio (OR) con intervalli di confidenza al 95% (IC) sono stati stimati tramite modelli logistici condizionato o incondizionato adeguati per i potenziali confondenti. Una significativa associazione inversa è stata osservata tra vitamina D e apporto di calcio e rischio di cancro al seno tra tutti i soggetti, con top quartile OR di 0,76 (95% CI, 0,63-0,90; trend P = 0,001) e 0,83 (95% CI, 0,69-0,99 ; trend P = 0,038), rispettivamente. Nelle analisi stratificate per stato menopausale, una significativa associazione tra rischio e di vitamina D è stata osservata solo tra le donne in premenopausa (trend P <0,001), mentre quello tra rischio e assunzione di calcio è stata osservata solo nelle donne in postmenopausa (p trend = 0,022). Eterogeneità in base allo stato menopausale per queste associazioni è risultata statisticamente significativa. Questa associazione è stato modificato in base allo stato dei recettori del tumore. Questi risultati suggeriscono che gli effetti protettivi della vitamina D e apporto di calcio contro il rischio di cancro al seno potrebbe essere diverso dallo stato menopausale e lo stato del recettore.

34: Suzuki T, Nishioka T, Ishizuka S, Hara H.

**A novel mechanism underlying phytate-mediated biological action-phytate hydrolysates induce intracellular calcium signaling by a Gαq protein-coupled receptor and phospholipase C-dependent mechanism in colorectal cancer cells.**

Mol Nutr Food Res. 2010 Jul;54(7):947-55.PubMed PMID: 20146267.

Phytate (inositol hexa-phosphate, IP6) possesses multiple biological functions including anticancer activity. IP6 is converted to inositol di-, tri-, and tetra-phosphates (IP2, IP3, and IP4) by phytase in large intestinal microbes; however, their contribution to the IP6-mediated functions has not been investigated. We have developed the preparations of IP2-4 and IP3-rich phytate hydrolysate (IP3-RPH) by IP6 digestion using microbial phytase, and examined the induction of intracellular Ca(2+) signaling in response to the preparations in colorectal cancer cells. IP2-4, but not inositol (IP0) and IP6, induced increases in intracellular Ca(2+) concentration ([Ca(2+)](i)) in Caco-2 cells with the following rank order: IP3>IP2=IP4. Inositol tri-phosphate (IP3)-RPH induced increases in [Ca(2+)](i) in both undifferentiated Caco-2 and HT-29 cells, but not in differentiated Caco-2. The IP3-RPH-induced [Ca(2+)](i) increase was resistant to extracellular Ca(2+) depletion, however, it was impaired by inhibitors of phospholipase C, inositol 1, 4, 5 tri-phosphate receptor, ryanodine receptor, and Galphaq protein. These results show that the putative G protein-coupled receptor on the plasma membrane senses the IP6 hydrolysates and activates phospholipase Cβ, resulting in Ca(2+) mobilization through Ca(2+) channels coupled with the inositol 1, 4, 5 tri-phosphate and ryanodine receptors on the sarco-endoplasmic reticulum Ca(2+) store in colorectal cancer cells.

**Nelle cellule cancerose colon rettali un nuovo meccanismo che sottolinea l'azione biologica di idrolisati fitati mediate dai fitati induce il segnale del calcio intracellulare tramite un recettore accoppiato alla proteina Gαq e il meccanismo dipendente dalla fosfolipasi C**

Fitato (inositolo esa-fosfato, IP6) possiede molteplici funzioni biologiche, compresa l'attività antitumorale. IP6 viene convertito in inositolo di-, tri- e tetra-fosfati (IP2, IP3, e IP4) di fitasi in grandi microbi intestinali, tuttavia, il loro contributo alle funzioni ip6-mediate non è stata studiata. Abbiamo sviluppato le preparazioni di IP2-4 e IP3 ricchi di fitati idrolizzato (IP3-RPH) da IP6 digestione utilizzando fitasi microbiche, e ha esaminato l'induzione di Ca intracellulare (2+) di segnalazione, in risposta ai preparativi in cellule di cancro coloretale. IP2-4, ma non inositolo (IP0) e IP6, ha indotto un aumento intracellulare di Ca (2+) concentrazione ([Ca (2+)] (i)) in cellule Caco-2 con il seguente ordine di classifica: IP3> IP2 = IP4. Inositolo tri-fosfato (IP3)-RPH aumenti indotti in [Ca (2+)] (i) in entrambi i indifferenziato Caco-2 e HT-29 cellule, ma non differenziate in Caco-2. L'IP3-RPH indotta [Ca (2+)] (i) incremento è resistente a extracellulare Ca (2+) di esaurimento, tuttavia, si è ridotta dagli inibitori della fosfolipasi C, inositolo 1, 4, 5 recettore tri-fosfato, recettore della rianodina, e proteine Galphaq. Questi risultati dimostrano che la presunta proteina G-recettore accoppiato sui sensi membrana del plasma del IP6 idrolizzati ed attiva la fosfolipasi Cβ, con conseguente Ca (2+) attraverso la mobilitazione di Ca (2+) canali accoppiato con il inositolo 1, 4, 5 tri-fosfato e ryanodine recettori sul reticolo endoplasmatico sarco-Ca (2+) conservare in cellule di cancro del colon-retto.

35: Xia W, Bacus S, Husain I, Liu L, Zhao S, Liu Z, Moseley MA 3rd, Thompson JW, Chen FL, Koch KM, Spector NL.

**Resistance to ErbB2 tyrosine kinase inhibitors in breast cancer is mediated by calcium-dependent activation of RelA.**

Mol Cancer Ther. 2010 Feb;9(2):292-9. Epub 2010 Feb 2. PubMed PMID: 20124457.

The widespread clinical use of therapies targeting the ErbB2 receptor tyrosine kinase oncogene represents a significant advance in breast cancer treatment. However, the development of therapeutic resistance represents a dilemma limiting their clinical efficacy, particularly small-molecule tyrosine kinase inhibitors that block ErbB2 autophosphorylation and activation. Here, we show that lapatinib (GW572016), a highly selective, small-molecule inhibitor of the ErbB2 and epidermal growth factor receptor tyrosine kinases, which was recently approved for the treatment of advanced-stage ErbB2(+) breast cancer, unexpectedly triggered a cytoprotective stress response in ErbB2(+) breast cancer cell lines, which was mediated by the calcium-dependent activation of RelA, the prosurvival subunit of NF-kappaB. Abrogation of lapatinib-induced RelA activation using either small interfering RNA constructs or an intracellular calcium chelator enhanced the apoptotic effects of lapatinib in parental ErbB2(+) breast cancer cells and overcame therapeutic resistance to lapatinib in ErbB2(+) breast cancer lines that had been rendered resistant to lapatinib through chronic exposure to the drug, mimicking the clinical setting. In addition, analysis of changes in phospho-RelA expression in sequential clinical biopsies from ErbB2(+) breast cancers treated with lapatinib monotherapy revealed marginally statistically significant differences between responders and nonresponders, which was consistent with our preclinical findings. Elucidating the regulation of RelA by lapatinib in ErbB2(+) breast cancers, and showing its role in the development of therapeutic resistance to lapatinib, identifies another therapeutic target to overcome or prevent the onset of resistance to lapatinib in some women with ErbB2(+) breast cancers.

**La resistenza agli inibitori tirosin chinasi di ErbB2 nel cancro al seno è mediata dall'attivazione di RelA dipendente dal calcio**

Il diffuso utilizzo clinico delle terapie intese a promuovere l'oncogene ErbB2 tirosin-chinasi del recettore rappresenta un significativo passo avanti nel trattamento del carcinoma mammario. Tuttavia, lo sviluppo della resistenza terapeutica rappresenta un dilemma che limita la loro efficacia clinica, in particolare piccole molecole inibitori della tirosin-chinasi che autofosforilazione blocco ErbB2 e l'attivazione. Qui, indichiamo che lapatinib (GW572016), altamente selettivo inibitore della piccolo-molecola del ErbB2 e epidermico chinasi del recettore del fattore di crescita della tirosina, che è stato recentemente approvato per il trattamento di ErbB2 in stadio avanzato (+) il cancro al seno, inaspettatamente innescato una risposta allo stress citoprotettivo in ErbB2 (+) linee di cancro al seno cellule, che è stata mediata dalla attivazione di calcio-dipendente di relazioni, la subunità prosurvival di NF-kB. Abrogazione di lapatinib-attivazione indotta RelA utilizzando piccoli RNA interferenti o costruisce un chelante del calcio intracellulare rafforzato gli effetti apoptotici di lapatinib in ErbB2 parentale (+) le cellule di cancro al seno e ha superato la resistenza terapeutico a lapatinib in ErbB2 (+) linee di cancro al seno che era stato reso resistente a lapatinib attraverso l'esposizione cronica al farmaco, imitando il setting clinico. Inoltre, l'analisi delle variazioni di espressione fosfo-RelA sequenziale biopsie in clinica da ErbB2 (+) tumori della mammella trattati con lapatinib in monoterapia hanno evidenziato differenze statisticamente significative marginalmente tra i responder ed i non responder, che è stato coerente con i nostri risultati preclinici. Chiarire il regolamento di relazioni da parte lapatinib in ErbB2 (+) tumori al seno, e mostrando il suo ruolo nello sviluppo della resistenza terapeutico a lapatinib, individua un altro bersaglio terapeutico per superare o prevenire l'insorgenza di resistenza a lapatinib in alcune donne con ErbB2 (+) tumori del seno.

36: Almquist M, Bondeson AG, Bondeson L, Malm J, Manjer J.

**Serum levels of vitamin D, PTH and calcium and breast cancer risk-a prospective nested case-control study.**

Int J Cancer. 2010 Nov 1;127(9):2159-68. PubMed PMID:20112341.

Previous studies indicate that calcium and its regulating hormones, i.e., parathyroid hormone (PTH) and vitamin D, might affect breast cancer risk. Evidence also suggests that this relationship could be influenced by menopausal status and BMI. We examined breast cancer risk related to prediagnostic serum levels of vitamin D (25OHD(2) and 25OHD(3)), PTH and calcium using a nested case-control design within the Malmö Diet and Cancer Study. There were 764 incident breast cancer cases, and 764 controls were selected by incidence density matching, using age as the underlying time scale, matching on calendar time at inclusion, menopausal status and age at inclusion. Using logistic regression analysis, odds ratios (OR) with 95% confidence intervals were calculated for breast cancer risk in different quartiles of the analyzed factors. All analyses were adjusted for risk factors for breast cancer, and for levels of albumin, creatinine and phosphate. Analyses were repeated stratified for BMI and menopausal status, and for low vs. high levels of 25OHD(3), PTH and calcium. There was a weak, nonsignificant inverse association between breast cancer risk and 25OHD(3), and the OR for the 2nd, 3rd and 4th quartiles, as compared to the first, were 0.84 (0.60-1.15), 0.84 (0.60-1.17) and 0.93 (0.66-1.33). Serum calcium was positively associated with breast cancer in premenopausal women (OR for the 4th quartile = 3.10:1.33-7.22 and p for quartile trend = 0.04), and in women with BMI > 25 (OR for the 4th quartile = 1.94:1.12-3.37 and p for trend < 0.01). There was no association between baseline serum PTH and breast cancer risk.

**Livelli sierici di vitamina D, PTH e calcio e rischio di cancro al seno in uno studio prospettico caso-controllo**

Precedenti studi indicano che il calcio e la sua ormoni che regolano, cioè l'ormone paratiroideo (PTH) e vitamina D, potrebbe influire il rischio di cancro al seno. L'evidenza suggerisce anche che questo rapporto possa essere influenzato dallo stato menopausale e BMI. Abbiamo esaminato il rischio di cancro al seno collegato al prediagnostici livelli sierici di vitamina D (25OHD (2) e 25OHD (3)), PTH e calcio usando un disegno caso-controllo nidificato all'interno della dieta di Malmö e Cancer Study. Ci sono stati 764 casi di cancro al seno incidente, e 764 controlli sono stati selezionati da corrispondenti incidenza di densità, usando l'età come la scala di tempo di base, corrispondenti sul tempo di calendario al momento dell'inclusione, lo stato menopausale e l'età al momento dell'inclusione. Usando l'analisi di regressione logistica, gli odds ratio (OR) con intervalli di confidenza al 95% sono stati calcolati per il rischio di cancro al seno in quartili diversi fattori analizzati. Tutte le analisi sono stati aggiustati per fattori di rischio per il cancro al seno, e per i livelli di albumina, creatinina e fosfato. Le analisi sono state ripetute stratificate per indice di massa corporea e stato di menopausa, e per i bassi livelli elevati di 25OHD vs (3), PTH e calcio. Ci fu un debole, non significativa associazione inversa tra rischio di cancro al seno e 25OHD (3), e l'OR per il 2 °, 3 ° e quarto quartile, rispetto al primo, era rispettivamente di 0,84 (0,60-1,15), 0,84 (0,60-1,17) e 0,93 (0,66-1,33). Sierici di calcio è stato associato positivamente con il cancro al seno nelle donne in premenopausa (o per il quarto quartile = 3.10:1.33-7.22 e p per trend quartile = 0,04), e nelle donne con BMI > 25 (o per il quarto quartile = 1.94:1.12 - 3,37 e p per trend <0,01). Non c'è stata associazione tra PTH sierica al basale e il rischio di cancro al seno.

37: Lee KL, Dai Q, Hansen EL, Saner CN, Price TM.

**Modulation of ATP-induced calcium signaling by progesterone in T47D-Y breast cancer cells.**

Mol Cell Endocrinol. 2010 May 5;319(1-2):109-15. Epub 2010 Jan 14. PubMed PMID: 20079401; PubMed Central PMCID: PMC2837125.

Extracellular ATP activates purinergic (P(2)) receptors with an increase in intracellular calcium and phosphorylation of MAPK. In this study we have investigated the effect of progesterone/progestin on ATP-induced calcium mobilization and phosphorylation of the kinase ERK in the T47D-Y breast cancer cell line that exhibits no detectable nuclear progesterone receptor expression. Brief pretreatment with progesterone/progestin results in a dose dependent inhibition of ATP-induced intracellular calcium mobilization, and inhibition of ERK phosphorylation. Response to a cell impermeable ligand and inhibition of the response by an inactivating antibody suggests a mechanism of action at the plasma membrane. These results in T47D-Y cells strongly suggest that progesterone can act in a rapid non-nuclear manner to inhibit extracellular ATP effects on intracellular calcium mobilization and ERK activation. This research provides an example of progesterone action in a breast cancer cell line lacking expression of the classical nuclear progesterone receptors.

**Modulazione del segnale del calcio indotto dall'ATP da parte del progesterone nelle cellule mammarie cancerose T47D-Y**

ATP extracellulare attiva purinergici (P (2)) i recettori con un aumento del calcio intracellulare e la fosforilazione di MAPK. In questo studio abbiamo studiato l'effetto del progesterone / progestinici sulla mobilitazione del calcio ATP-indotta e la fosforilazione delle chinasi ERK nella linea T47D-Y cellule del cancro della mammella che non presenta alcuna rilevabile espressione nucleare recettore del progesterone. Breve pretrattamento con progesterone risultati / progestinico determina una inibizione dose-dipendente di ATP indotta mobilitazione del calcio intracellulare, e l'inibizione della fosforilazione di ERK. Risposta ad un ligando cellulare impermeabile e l'inibizione della risposta da parte di un anticorpo inattivando suggerisce un meccanismo di azione a livello della membrana plasmatica. Questi risultati nelle cellule T47D-Y suggeriscono fortemente che il progesterone può agire in modo rapido non-nucleari di inibire gli effetti ATP extracellulare sulla mobilitazione del calcio intracellulare e l'attivazione ERK. Questa ricerca fornisce un esempio di azione del progesterone in una linea cellulare del cancro della mammella senza espressione dei recettori nucleari classica progesterone.

38: Lin J, Denmeade S, Carducci MA.

### **HIF-1alpha and calcium signaling as targets for treatment of prostate cancer by cardiac glycosides.**

Curr Cancer Drug Targets. 2009 Nov;9(7):881-7. Review. PubMed PMID: 20025575.

Prostate cancer possesses its unique feature of low proliferation rate and slow growth. Ca(2+)-induced apoptosis is not dependent on cell cycle progression and targeting this pathway could circumvent the problems encountered using current cytotoxic chemotherapies for prostate cancer. Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) is another novel cancer drug target and inhibitors of hypoxia-response pathway are being developed. Digoxin and other cardiac glycosides, known inhibitors of the alpha-subunit of sarcolemmal Na(+)-K(+)-ATPase, were recently found to block tumor growth via the inhibition of HIF-1alpha synthesis. Thus, cardiac glycosides disrupt two important cellular pathways and, therefore, may be useful as an anticancer therapy. This review will focus on HIF-1alpha and calcium signaling as novel cancer drug targets in prostate cancer. The possible application of digoxin and other cardiac glycosides in cancer therapeutics especially in prostate cancer is discussed.

### **HIF-1alfa e segnale del calcio come target per il trattamento del cancro prostatico tramite i glicosidi cardiaci**

Il cancro della prostata ha una sua caratteristica unica del basso tasso di proliferazione e la crescita lenta. Ca (2 +)-apoptosi indotta non dipende dalla progressione del ciclo cellulare e il targeting questo percorso potrebbero aggirare i problemi riscontrati utilizzando gli attuali chemioterapie citotossiche per il cancro alla prostata. 1alfa fattore ipossia-inducibile (HIF-1alfa) è un altro nuovo bersaglio del cancro della droga ed inibitori della via di ipossia-risposta sono in fase di sviluppo. Digossina ed altri glicosidi cardiaci, noti inibitori della subunità alfa di Na sarcolemma (+) K (+)-ATPasi, sono stati recentemente trovati a bloccare la crescita del tumore attraverso l'inibizione della sintesi di HIF-1alfa. Così, glicosidi cardiaci disturbare due percorsi importanti cellulare e, quindi, può essere utile come terapia antitumorale. Questa recensione si concentrerà su HIF-1alfa e calcio segnalazione di nuovi bersagli farmaco antitumorale nel tumore alla prostata. L'eventuale applicazione di digossina e altri glicosidi cardiaci nelle terapie del cancro in particolare nel cancro alla prostata è discussa.

39: Sprague BL, Skinner HG, Trentham-Dietz A, Lee KE, Klein BE, Klein R.

**Serum calcium and breast cancer risk in a prospective cohort study.**

Ann Epidemiol. 2010Jan;20(1):82-5. PubMed PMID: 20006279; PubMed Central PMCID: PMC2796253.

Calcium has anti-proliferative and pro-differentiation effects on mammary cells in vitro and can inhibit the development of mammary tumors in mice. While there is some epidemiologic evidence for an inverse relation between dietary calcium intake and breast cancer risk, only one previous study has examined serum calcium levels in relation to breast cancer risk. We investigated this relation in a prospective cohort study of 2,762 women, aged 43-86, who were enrolled in the Beaver Dam Eye Study in 1988 and followed for up to 19 years. We found no evidence for an association between breast cancer risk and either total (hazard ratio, HR = 0.98; 95% CI: 0.60-1.60; 4(th) vs. 1(st) quartile) or ionized (HR = 0.85; 95% CI: 0.53, 1.38; 4(th) vs. 1(st) quartile) serum calcium levels. Additionally, we found no evidence for an association among subgroups defined by menopausal status and body mass index.

**Calcio sierico e rischio di cancro al seno in uno studio di coorte prospettico**

Il calcio è anti-proliferativa e gli effetti pro-differenziazione in cellule mammarie in vitro e possono inibire lo sviluppo di tumori mammari nei topi. Mentre vi è qualche evidenza epidemiologica per una relazione inversa tra assunzione di calcio nella dieta e rischio di cancro al seno, solo un precedente studio ha esaminato i livelli sierici di calcio in relazione al rischio di cancro al seno. Abbiamo studiato questa relazione in uno studio prospettico di coorte di 2.762 donne, di età compresa tra 43-86, che erano iscritti al Beaver Dam Eye Study nel 1988 e seguiti fino a 19 anni. Abbiamo trovato alcuna prova di una associazione tra rischio di cancro al seno e sia in totale (hazard ratio, HR = 0,98, IC 95%: 0,60-1,60; 4 (°) vs 1 (st) quartile) o ionizzato (HR = 0,85; 95 % CI: 0,53, 1,38, 4 (TH) vs 1 (st) quartile), i livelli sierici di calcio. Inoltre, abbiamo trovato alcuna evidenza di un'associazione tra i sottogruppi definiti in base allo stato menopausale e indice di massa corporea.

40: Chiu LY, Ko JL, Lee YJ, Yang TY, Tee YT, Sheu GT.

**L-type calcium channel blockers reverse docetaxel and vincristine-induced multidrug resistance independent of ABCB1 expression in human lung cancer cell lines.**

Toxicol Lett.2010 Feb 15;192(3):408-18. Epub 2009 Nov 26. PubMed PMID: 19944135.

Multidrug resistance (MDR) of cancer cells to cytotoxic drugs significantly impedes chemotherapeutic treatment. The purpose of this study is to characterize docetaxel (DOC) or vincristine (VCR) selected A549 and H1299 non-small cell lung cancer (NSCLC) sublines that exhibit MDR phenotypes and followed by re-sensitization study. Although all drug resistant sublines showed cross-resistance to DOC, VCR, and doxorubicin (DXR), the expression of ATP-binding cassette (ABC) transporter B1 (ABCB1) gene was found to be strongly induced in DOC but not in VCR resistant A549 sublines by quantitative reverse transcription real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). In DOC and VCR resistant H1299 sublines, moderate expression of ABCB1 was detected. The levels of ABCB1 protein and efflux activities were further examined by immunoblotting and rhodamin-123 staining assay. The results showed that both ABC and non-ABC mediated MDR are existed. Furthermore, verapamil (VER), an inhibitor of ABCB1 and an L-type calcium channel blocker, is capable of reversing the resistance in all drug-resistant sublines independent of ABCB1 expression. Importantly, VER only sensitizes resistant sublines but has no effect on parental cancer cells. Other L-type calcium channel blockers, such as diltiazem (DIL) and nifedipine (NIF), also sensitize MDR sublines without interfering with ABCB1 activity but with lower efficacy than VER. Our data showed that in addition to ABCB1, calcium channel activity may play a crucial role in DOC- and VCR-acquired MDR. Therefore, inhibition of calcium influx may provide a new target to modulate MDR in chemotherapy.

**I canali del calcio di tipo L bloccano la multiresistenza indotta dal docetaxel e dalla vincristina che è indipendente dall'espressione di ABCB1 nelle linee cellulari cancerose polmonari umane**

Multiresistenza ai farmaci (MDR) delle cellule tumorali ai farmaci citotossici ostacoli in modo significativo il trattamento chemioterapico. Lo scopo di questo studio è quello di caratterizzare docetaxel (DOC) o vincristina (VCR) A549 selezionato e H1299 non a piccole cellule del polmone (NSCLC) sublines che presentano fenotipi MDR e seguita da uno studio re-sensibilizzazione. Anche se tutti sublines resistenti ai farmaci hanno mostrato resistenza crociata a DOC, VCR e doxorubicina (DXR), l'espressione di ATP-binding cassette (ABC) trasportatore B1 (ABCB1) gene è risultato essere fortemente indotta in DOC, ma non in VCR A549 resistente sublines dalla reazione della polimerasi d'inversione quantitativa della trascrizione in tempo reale catena (QRT-PCR). In DOC e sublines H1299 VCR resistente, espressione moderata di ABCB1 è stata rilevata. I livelli di proteina ABCB1 e le attività di efflusso sono stati ulteriormente esaminati da immunoblotting e rhodamin-123 test di colorazione. I risultati hanno mostrato che sia la ABC e ABC MDR non-mediata sono esistiti. Inoltre, verapamil (VER), un inibitore del ABCB1 e un L-type calcio-antagonista, è in grado di invertire la resistenza in tutte le sublines farmaco-resistenti indipendente ABCB1 espressione. Importante, VER sensibilizza solo sublines resistente ma non ha alcun effetto sulle cellule di cancro dei genitori. Altri L-tipo calcio-antagonisti, come diltiazem (DIL) e nifedipina (NIF), anche sensibilizzare sublines MDR senza interferire con ABCB1 attività, ma con minore efficacia rispetto VER. I nostri dati mostrano che oltre a ABCB1, canale attività di calcio può svolgere un ruolo cruciale nella DOC-e VCR-MDR acquisite. Pertanto, l'inibizione della afflusso di calcio può fornire un nuovo obiettivo di modulare MDR in chemioterapia.

41: Barton CA, Gloss BS, Qu W, Statham AL, Hacker NF, Sutherland RL, Clark SJ, O'Brien PM.

**Collagen and calcium-binding EGF domains 1 is frequently inactivated in ovarian cancer by aberrant promoter hypermethylation and modulates cell migration and survival.**

Br J Cancer. 2010 Jan 5;102(1):87-96. Epub 2009 Nov 24. PubMed PMID: 19935792; PubMed Central PMCID: PMC2813742.

**BACKGROUND:** Collagen and calcium-binding EGF domains 1 (CCBE1) is an uncharacterised gene that has down-regulated expression in breast cancer. As CCBE1 maps to 18q21.32, a region frequently exhibiting loss of heterozygosity in ovarian cancer, the aim of this study was to determine the expression and function of CCBE1 in ovarian cancer.

**METHODS:** Expression and methylation patterns of CCBE1 were determined in ovarian cancer cell lines and primary tumours. CCBE1 contains collagen repeats and an aspartic acid/asparagine hydroxylation/EGF-like domain, suggesting a function in extracellular matrix remodelling and migration, which was determined using small-interfering RNA (siRNA)-mediated knockdown and over-expression of CCBE1 in cell lines.

**RESULTS:** CCBE1 is expressed in normal ovary, but is reduced in ovarian cancer cell lines and primary carcinomas. Pharmacological demethylation/deacetylation in ovarian cancer cell lines re-induced CCBE1 expression, indicating that epigenetic mechanisms contribute to its silencing in cancer. CCBE1 promoter hypermethylation was detected in 6/11 (55%) ovarian cancer cell lines and 38/81 (41%) ovarian carcinomas. siRNA-mediated knockdown of CCBE1 in ovarian cancer cell lines enhanced their migration; conversely, re-expression of CCBE1 reduced migration and survival. Hence, loss of CCBE1 expression may promote ovarian carcinogenesis by enhancing migration and cell survival.

**CONCLUSIONS:** These data suggest that CCBE1 is a new candidate tumour suppressor in ovarian cancer.

**Il collagene e i domini di EGF legati al calcio sono frequentemente inattivati nel cancro ovarico tramite l'ipermetilazione del promotore aberrante e modulano la migrazione cellulare e la sopravvivenza**

**BACKGROUND:** collagene e calcio-vincolante domini EGF 1 (CCBE1) è un gene che è espressione non caratterizzato down-regolato nel cancro della mammella. Come CCBE1 mape per 18q21.32, una regione spesso presentano la perdita di eterozigosi nel carcinoma ovarico, l'obiettivo di questo studio era di determinare l'espressione e la funzione della CCBE1 nel carcinoma ovarico.

**METODI:** pattern di espressione e di metilazione di CCBE1 sono stati determinati in linee di cellule di cancro ovarico e tumori primari. CCBE1 ripete contiene collagene e di un acido aspartico / asparagina idrossilazione / dominio EGF-simile, il che suggerisce una funzione di rimodellamento della matrice extracellulare e la migrazione, che è stato determinato utilizzando piccole interferenti atterramento RNA (siRNA)-mediata e iper-espressione di CCBE1 in linee cellulari .

**RISULTATI:** CCBE1 è espresso in ovaio normale, ma è ridotta in linee di cellule di cancro ovarico e nei carcinomi primari. Demetilazione Farmacologiche / deacetilazione nelle linee di cellule di cancro ovarico re-indotta CCBE1 espressione, che indica che meccanismi epigenetici contribuire al suo silenzio in cancro. CCBE1 ipermetilazione del promotore è stato rilevato in 6 / 11 (55%) le linee cellulari del cancro ovarico e 38/81 (41%) carcinomi ovarici. knockdown siRNA-mediato di CCBE1 nelle linee di cellule di cancro ovarico migliorato le loro migrazioni, per converso, ri-espressione di CCBE1 ridotta migrazione e la sopravvivenza. Quindi, la perdita di espressione CCBE1 può promuovere la carcinogenesi ovarica dalla migrazione valorizzazione e la sopravvivenza cellulare.

**CONCLUSIONI:** Questi dati suggeriscono che CCBE1 è un nuovo oncosoppressore candidato nel carcinoma ovarico.

42: Simon JA. ACP Journal Club: Review:

**Evidence for the effectiveness of vitamin D and calcium for reducing CV outcomes, cancer, and death is limited.**

Ann Intern Med. 2009 Nov 17;151(10):JC5-5. PubMed PMID: 19920263.

43: Welch AA, Fransen H, Jenab M, Boutron-Ruault MC, Tumino R, Agnoli C, Ericson U, Johansson I, Ferrari P, Engeset D, Lund E, Lentjes M, Key T, Touvier M, Niravong M, Larrañaga N, Rodríguez L, Ocké MC, Peeters PH, Tjønneland A, Bjerregaard L, Vasilopoulou E, Dilis V, Linseisen J, Nöthlings U, Riboli E, Slimani N, Bingham S.

**Variation in intakes of calcium, phosphorus, magnesium, iron and potassium in 10 countries in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition study.**

Eur J Clin Nutr. 2009 Nov;63 Suppl 4:S101-21. PubMed PMID: 19888269.

**BACKGROUND/OBJECTIVES:** Adequate mineral intake is important for the maintenance of bone health, cellular function and general metabolism, and possibly in the aetiology of cancer and other chronic diseases. This study aimed at investigating variation in intakes of selected minerals across 10 European countries participating in the EPIC (European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition) study.

**METHODS:** Nutrient intakes for 36 034 subjects, aged between 35 and 74 years, in 27 centres were obtained using standardized 24-h dietary recall software (EPIC-SOFT). Mean intakes of calcium, phosphorus, magnesium, iron and potassium were calculated by centre and weighted by season and day of the week and were also stratified by age group. The contribution of food groups to total nutrient intake was calculated.

**RESULTS:** There was clear geographical variability in intakes, with differences ranging from 35% for magnesium to 90% for iron in men and 36% for potassium to 75% for calcium in women, and a twofold difference in sources of haem iron (meat and fish). There was a geographical gradient in iron intake, with higher intakes in Southern than in Northern Europe and also around a twofold north-south gradient in the contribution of fruits and vegetables to potassium intake. Compared with reference intakes, the majority of age groups and centres had intakes above the recommended levels. Dairy foods and products contributed the most to calcium and phosphorus intake in almost all centres. Cereals and cereal products contributed the most to magnesium and iron intakes, except in Greece and Germany.

**CONCLUSIONS:** Intakes of minerals vary substantially throughout Europe, with some geographical variability in their food sources.

**Variazioni nell'assunzione di calcio, fosforo, magnesio, ferro e potassio in 10 paesi nello studio Europeo Prospettico sul cancro e Nutrizione**

**BACKGROUND / OBIETTIVI:** apporto di minerali sufficiente è importante per il mantenimento della salute delle ossa, la funzione cellulare e il metabolismo generale e, eventualmente, nell'eziologia del cancro e di altre malattie croniche. Questo studio finalizzato a studiare variazione di apporto di minerali selezionati in 10 paesi europei partecipanti al EPIC (European Investigation sul cancro e la Nutrizione) di studio.

**METODI:** assunzione di nutrienti per 36 034 soggetti, di età compresa tra i 35 ei 74 anni, in 27 centri sono stati ottenuti utilizzando il software standardizzato di 24 h ricordare dietetici (EPIC-SOFT). L'assunzione media di calcio, fosforo, magnesio, ferro e potassio sono stati calcolati dal centro e ponderati in stagione e giorno della settimana e sono stati anche stratificati per fascia di età. Il contributo dei gruppi di alimenti per l'assunzione di nutrienti totale è stato calcolato.

**RISULTATI:** Ci era chiara variabilità geografica nella assunzione, con differenze che vanno dal 35% di magnesio al 90% per il ferro negli uomini e del 36% per il potassio al 75% per il calcio nelle donne, e una differenza in duplice fonte di ferro eme (carne e di pesce). C'è stato un gradiente geografico in assunzione di ferro, con più elevate assunzioni nel sud che nel nord Europa e anche attorno a un duplice gradiente nord-sud nel contributo di frutta e verdura per l'apporto di potassio. Rispetto ai consumi di riferimento, la maggior parte dei gruppi di età e centri erano prese di sopra dei livelli raccomandati. Latticini e prodotti maggiormente contribuirono alla assunzione di calcio e fosforo in quasi tutti i centri. Cereali e prodotti derivati maggiormente contribuirono alla assunzione di magnesio e ferro, tranne in Grecia e Germania.

**CONCLUSIONI:** L'assunzione di minerali varia notevolmente in tutta Europa, con una certa variabilità geografica nelle loro fonti di cibo.

44: Deng L, Su T, Leng A, Zhang X, Xu M, Yan L, Gu H, Zhang G.

**Upregulation of soluble resistance-related calcium-binding protein (sorcina) in gastric cancer.**

Med Oncol. 2010 Dec;27(4):1102-8. Epub 2009 Nov 3. PubMed PMID: 19885748.

The aim of this paper was to identify novel proteins involved in the development of gastric cancer (GC). Isobaric tags for relative and absolute quantification (iTRAQ) analysis was adopted to separate the differentially expressed proteins between normal gastric epithelial cell line GES-1 and GC cell line SGC7901. Western blotting was utilized to validate the increased expression of sorcina in SGC7901; immunohistochemistry was performed to investigate its relationship with clinicopathological features of GC. Twelve differential proteins were identified. Seven proteins were found to be significantly upregulated ( $\geq$ two-fold), while five proteins were markedly downregulated ( $\leq$ 0.5-fold), in SGC7901 cells. Sorcina was detected by this proteomic approach with a 5.4-fold upregulation in SGC7901. Western blotting and immunohistochemistry confirmed the overexpression of sorcina in GC. Immunohistochemistry showed us that sorcina was overexpressed in 55 samples of GC tissue (55/85, 64.71%) and was related closely to the depth of invasion, TNM stage, and lymph node metastasis of GC ( $P < 0.05$ ). The development of GC is regulated by multiple genes. Sorcina will be a novel molecular biomarker for the diagnosis, treatment, and prognosis of GC.

**Regolazione positiva della proteina (sorcina) legata al calcio collegato alla resistenza solubile nel cancro gastrico**

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di identificare nuove proteine coinvolte nello sviluppo del cancro gastrico (GC). Tags isobarica per la quantificazione relativa e assoluta (iTRAQ) analisi è stato adottato per separare le proteine differenzialmente espresse tra normale epiteliali gastriche GES linea cellulare-1 e la linea di cellule GC SGC7901. Western blotting è stato utilizzato per convalidare l'aumentata espressione di sorcina in SGC7901; immunohistochimica è stata effettuata per indagare il suo rapporto con le caratteristiche clinico-patologici di GC. Dodici le proteine differenziali sono stati identificati. Sette le proteine sono risultate significativamente upregulated ( $\geq$  due volte), mentre cinque proteine sono state marcatamente inibiti ( $\leq$  0,5 volte), in SGC7901 cellule. Sorcina è stato rilevato da questo approccio proteomico con un upregulation 5,4 volte in SGC7901. Western blotting e immunohistochimica ha confermato la sovraespressione di sorcina in GC. Immunohistochemistry ci ha mostrato che sorcina è stato sovra-espresso in 55 campioni di tessuto GC (55/85, 64,71%) ed è stato collegato strettamente alla profondità di invasione, stadio TNM, e metastasi linfonodali di GC ( $P < 0,05$ ). Lo sviluppo di GC è regolata da più geni. Sorcina sarà un nuovo biomarker molecolari per la diagnosi, il trattamento e la prognosi di GC.

46: Chen P, Hu P, Xie D, Qin Y, Wang F, Wang H.

### **Meta-analysis of vitamin D, calcium and the prevention of breast cancer.**

Breast Cancer Res Treat. 2010Jun;121(2):469-77. Epub 2009 Oct 23. PubMed PMID: 19851861.

Vitamin D and calcium intake have been suggested to have protective effects against breast cancer; however, the data have been inconclusive. The present meta-analysis examined the overall effects of vitamin D intake, circulating 25(OH)D and 1alpha,25(OH)(2)D levels, and calcium intake on breast cancer risk. Data from 11 studies on vitamin D intake, 7 studies on circulating 25(OH)D levels, 3 studies of circulating 1alpha,25(OH)(2)D levels, and 15 studies on calcium intake and breast cancer risk were included in this analysis. From the meta-analysis, there was a significant inverse relationship between vitamin D intake and breast cancer risk, with an overall relative risk (RR) of high versus low vitamin D intake for breast cancer of 0.91 (95% CI = 0.85-0.97). The highest quantile of circulating 25(OH)D was found to be associated with a 45% (OR = 0.55, 95% CI = 0.38-0.80) decrease in breast cancer when compared with the lowest quantile. No significant association for the circulating 1alpha,25(OH)(2)D level and breast cancer was found (OR = 0.99, 95% CI = 0.68-1.44). For calcium, a 19% (RR = 0.81, 95% CI = 0.72-0.90) decrease in breast cancer risk was found for those with highest quantile of calcium intake compared to the lowest quantile. These results provide strong evidence that vitamin D and calcium have a chemopreventive effect against breast cancer.

### **Meta-analisi della vitamina D, calcio e prevenzione del cancro al seno**

La vitamina D e apporto di calcio sono state suggerite per avere effetti protettivi contro il cancro al seno, ma i dati sono stati inconcludenti. Il presente meta-analisi ha esaminato gli effetti complessivi di vitamina D, circolanti di 25 (OH) D e 1alfa, 25 (OH) (2) livelli di D, e assunzione di calcio sul rischio di cancro al seno. Dati da 11 studi sulla vitamina D, 7 studi sulla circolazione di 25 (OH) livelli di D, 3 studi di 1alpha circolanti, 25 (OH) (2) livelli di D, e 15 studi sulla assunzione di calcio e rischio di cancro al seno sono stati inclusi in questo analisi. Dalla meta-analisi, c'è stata una significativa relazione inversa tra assunzione di vitamina D e rischio di cancro al seno, con un rischio complessivo relativo (RR) di alta assunzione di vitamina D rispetto a bassa per il cancro al seno di 0.91 (IC 95% = 0,85-0,97) . La più alta quantile di circolazione di 25 (OH) D è stato trovato per essere associato con un 45% (OR = 0.55, IC 95% = 0,38-0,80) diminuzione nel cancro della mammella rispetto al più basso quantile. Nessuna associazione significativa per la circolazione 1alfa, 25 (OH) (2) livello D e cancro al seno è stato trovato (OR = 0.99, 95% CI = 0,68-1,44). Per il calcio, un 19% (RR = 0,81, IC 95% = ,72-,90) diminuzione del rischio di cancro al seno è stato trovato per quelli con più alto quantile di assunzione di calcio rispetto al più basso quantile. Questi risultati forniscono una forte evidenza che la vitamina D e calcio hanno un effetto chemiopreventivo contro il cancro al seno.

47: Vestergaard P, Sanden AK.

**[Management of serum calcium with cinacalcet in parathyroid cancer].**

Ugeskr Laeger. 2009 Oct 5;171(41):3004-6. Danish. PubMedPMID: 19814929.

Treatment with cinacalcet and intravenous bisphosphonate has improved the previously often fatal prognosis of parathyroid cancer. We report two cases, of which one did not react to treatment and died within a short time-frame. In the other case, cinacalcet controlled serum calcium during a prolonged time period despite metastases. However, increasing doses of cinacalcet combined with more frequent intravenous bisphosphonate were necessary.

**[Gestione del calcio sierico con cinacalcet nel cancro paratiroideo].**

Il trattamento con bifosfonati per via endovenosa cinacalcet e ha migliorato la prognosi in precedenza spesso mortale di cancro paratiroideo. Segnaliamo due casi, di cui uno non ha reagito alle cure e morì in un breve arco di tempo. Nell'altro caso, cinacalcet calcio controllata siero durante un periodo di tempo prolungato, nonostante le metastasi. Tuttavia, dosi crescenti di cinacalcet combinato con bifosfonati per via endovenosa più frequenti erano necessari.

48: Iwanami M, Odaka M, Nakamura T, Hirata K.

**[Paraneoplastic cerebellar degeneration and Lambert-Eaton myasthenic syndrome associated with anti P/Q-type voltage-gated calcium channel antibody in a patient with primary double lung cancer].**

Brain Nerve. 2009 Sep;61(9):1083-7. Japanese. PubMed PMID: 19803409.

We report the case of a 50-year-old man with paraneoplastic cerebellar degeneration (PCD) and Lambert-Eaton myasthenic syndrome (LEMS) associated with primary double lung cancer. He developed acute progressive double vision, slurred speech, and gait disturbance. Neurological examination revealed diplopia, mild ptosis, bilateral horizontal gaze-evoked nystagmus, and cerebellar limb and truncal ataxia. The diffusion image of brain magnetic resonance imaging (MRI) revealed no abnormal findings in the cerebellum. On the basis of the diagnosis of acute cerebellitis, he was given methylprednisolone pulse therapy followed by oral prednisolone, which gradually improved his neurological signs and symptoms. The analysis of the possible etiology suggested that the PCD was induced by lung cancer, which led to ataxia. A chest computed tomography scan revealed mass lesions of irregular shape and unclear margins in the upper lobe of the right lung and a small nodule tumor in the upper lobe of the left lung. We performed transbronchial needle aspiration and detected the bronchioloalveolar carcinoma of the right lung. An electromyogram showed waxing phenomenon in the ulnar nerve at high-frequency (50Hz) stimulation. The serum levels of anti-P/Q-type voltage-gated calcium channel (VGCC) antibody were elevated in the patient. These findings confirmed that the pathogenesis of the condition of this patient to be associated with LEMS. His cerebellar symptoms were considered to be caused by the PCD, and the diplopia, ptosis, and hyporeflexia were attributed to LEMS. We performed upper left lobectomy with mediastinal lymphnode dissection via video-assisted thoracoscopic surgery. A histological study detected small cell carcinoma. A diagnosis of double primary lung cancer was made. Physicians need to be aware that patients may develop PCD and LEMS associated with anti-VGCC antibody caused by small cell lung cancer, and a mass survey should be conducted and careful examinations performed.

**[La degenerazione cerebellare paraneoplastica e la sindrome miastenica di Lambert-Eaton sono associate a un anticorpo del canale del calcio voltaggio-dipendente di tipo anti P/Q in un paziente con cancro al polmone primario].**

Segnaliamo il caso di un uomo di 50 anni con degenerazione cerebellare paraneoplastica (PCD) e sindrome di Lambert-Eaton (LEMS) associata a tumore primitivo del polmone doppio. Ha sviluppato acuta visione progressista doppia, difficoltà di parola, e disturbi del movimento. Esame neurologico ha rivelato diplopia, ptosi lieve, bilaterale sguardo orizzontale-evocato nistagmo e atassia cerebellare e arti tronco. La diffusione di immagini della risonanza magnetica del cervello (MRI) non hanno rivelato risultati anormali nel cervelletto. Sulla base della diagnosi di cerebellitis acuta, ha ricevuto la terapia di metilprednisolone, seguiti da polso prednisolone orale, che progressivamente migliorato i suoi segni e sintomi neurologici. L'analisi della possibile eziologia suggerito che il PCD è stata indotta da tumore del polmone, che ha portato alla atassia. Una tomografia computerizzata del torace ha rivelato le lesioni di massa di forma irregolare e margini di poco chiaro nel lobo superiore del polmone destro e un tumore piccolo nodulo nel lobo superiore del polmone sinistro. Abbiamo eseguito aspirazione transbronchiale ago e rilevato il carcinoma bronchiolo-alveolare del polmone destro. Un elettromiogramma mostrato ceretta fenomeno del nervo ulnare al alta frequenza (50 Hz) stimolazione. I livelli sierici di anti-P/Q-type canali calcio voltaggio-dipendenti (VGCC) anticorpi erano elevati nel paziente. Questi risultati hanno confermato che la patogenesi della malattia di questo paziente per essere associate a LEMS. I suoi sintomi cerebellari sono stati considerati causati dal PCD, e, ptosi diplopia, e iporeflexia sono stati attribuiti ad LEMS. Abbiamo eseguito in alto a sinistra lobectomia con dissezione dei linfonodi del

mediastino attraverso video-assistita chirurgia toracoscopica. Uno studio istologico rilevato il carcinoma a piccole cellule. Una diagnosi di tumore al polmone doppio primario è stata fatta. I medici devono essere consapevoli che i pazienti possono sviluppare PCD e LEMS associati con l'anticorpo anti-VGCC causata da carcinoma polmonare a piccole cellule, e di un sondaggio di massa dovrebbe essere condotta e degli esami eseguiti attento.

49: Aung CS, Ye W, Plowman G, Peters AA, Monteith GR, Roberts-Thomson SJ.

#### **Plasma membrane calcium ATPase 4 and the remodeling of calcium homeostasis in human colon cancer cells.**

Carcinogenesis. 2009 Nov;30(11):1962-9. Epub 2009 Sep 15. PubMed PMID: 19755660.

A remodeling of calcium homeostasis has been identified as a characterizing feature of some cancers. Possible consequences of this include alterations in many pivotal physiological responses including apoptosis, proliferation and gene transcription. An alteration in calcium homeostasis can occur via changes in the expression of proteins that transport calcium and examples of cancers where this is seen includes the prostate and breast. A specific isoform of the calcium efflux pump, plasma membrane Ca(2+)-ATPase (PMCA) 4, is significantly upregulated during differentiation of the HT-29 colon cancer cell line suggesting that it may also be altered in colon cancer. We now report that differentiated HT-29 colon cancer cells have pronounced plasma membrane PMCA4 localization, consistent with augmented calcium efflux. Assessment of PMCA4 transcription in human colon cancer samples suggests that PMCA4 is significantly ( $P < 0.000001$ ) downregulated early in the progression of some colon cancers as these cells become less differentiated. Inhibition of PMCA4 using small interfering RNA did not induce cell death or augment sensitivity to the mitochondrial uncoupler carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP) or tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. Reversing the colon cancer remodeling of PMCA4 by overexpression reduced cellular proliferation ( $P < 0.01$ ) and downregulated transcription of the calcium sensitive early response gene FOS. Our studies suggest that the remodeling of the calcium signal in colon cancer is associated with compromised calcium efflux at a level that promotes proliferative pathways while avoiding increased sensitivity to apoptotic stimuli.

#### **L 'ATPasi 4 del calcio della membrana plasmatica e il rimodellamento dell'omeostasi del calcio nelle cellule cancerose del colon umane**

Un rimodellamento della omeostasi del calcio è stata identificata come un elemento caratterizzante di alcuni tumori. Possibili conseguenze di ciò sono le alterazioni in chiave molte risposte fisiologiche tra cui l'apoptosi, la proliferazione e la trascrizione genica. Una alterazione dell'omeostasi del calcio può avvenire per i cambiamenti nell'espressione delle proteine di trasporto che il calcio e gli esempi dei tumori in cui si vede ciò include la prostata e del seno. Una isoforma specifica della pompa di efflusso di calcio, membrana plasmatica di Ca (2 +)-ATPasi (PMCA) 4, è significativamente up-regolato durante il differenziamento della linea di cellule HT-29 suggerendo che il cancro al colon può anche essere modificata nel cancro del colon. Ora segnaliamo che differenziate HT-29 cellule di cancro del colon hanno pronunciato membrana plasmatica PMCA4 localizzazione, in coerenza con l'efflusso di calcio aumentata. Valutazione della PMCA4 trascrizione nei campioni tumorali di colon umano suggerisce che PMCA4 è significativamente ( $P < 0,000$  mila uno) presto inibiti nella progressione di alcuni tumori del colon, come queste cellule diventano meno differenziato. L'inibizione della PMCA4 utilizzando piccoli RNA interferenti non induce la morte cellulare o aumentare la sensibilità al carbonile disaccoppiatore mitocondriale cianuro 3-chlorophenylhydrazone (CCCP) o fattore di necrosi tumorale-correlati che inducono apoptosi ligando. L'inversione del rimodellamento del cancro al colon PMCA4 da sovraespressione ridotta proliferazione cellulare ( $P < 0,01$ ) e la trascrizione downregulated del sensibile FOS risposta precoce gene calcio. I nostri studi suggeriscono che il rimodellamento del segnale di calcio nel

cancro del colon è associato ad efflusso di calcio compromesso ad un livello che promuove percorsi proliferativa, evitando nel contempo una maggiore sensibilità a stimoli apoptotici.

50: Jenab M, McKay J, Bueno-de-Mesquita HB, van Duijnhoven FJ, Ferrari P, Slimani N, Jansen EH, Pischon T, Rinaldi S, Tjønneland A, Olsen A, Overvad K, Boutron-Ruault MC, Clavel-Chapelon F, Engel P, Kaaks R, Linseisen J, Boeing H, Fisher E, Trichopoulou A, Dilis V, Oustoglou E, Berrino F, Vineis P, Mattiello A, Masala G, Tumino R, Vrieling A, van Gils CH, Peeters PH, Brustad M, Lund E, Chirlaque MD, Barricarte A, Suárez LR, Molina E, Dorronsoro M, Sala N, Hallmans G, Palmqvist R, Roddam A, Key TJ, Khaw KT, Bingham S, Boffetta P, Autier P, Byrnes G, Norat T, Riboli E.

### **Vitamin D receptor and calcium sensing receptor polymorphisms and the risk of colorectal cancer in European populations.**

Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2009 Sep;18(9):2485-91. Epub 2009 Aug 25. PubMed PMID: 19706842.

Increased levels of vitamin D and calcium may play a protective role in colorectal cancer (CRC) risk. It has been suggested that these effects may be mediated by genetic variants of the vitamin D receptor (VDR) and the calcium sensing receptor (CASR). However, current epidemiologic evidence from European populations for a role of these genes in CRC risk is scarce. In addition, it is not clear whether these genes may modulate CRC risk independently or by interaction with blood vitamin D concentration and level of dietary calcium intake. A case-control study was conducted nested within the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. CRC cases (1,248) were identified and matched to 1,248 control subjects. Genotyping for the VDR (BsmI: rs1544410; FokI: rs2228570) and CASR (rs1801725) genes was done by Taqman, and serum vitamin D (25OHD) concentrations were measured. Conditional logistic regression was used to estimate the incidence rate ratio (RR). Compared with the wild-type bb, the BB genotype of the VDR BsmI polymorphism was associated with a reduced risk of CRC [RR, 0.76; 95% confidence interval (CI), 0.59-0.98]. The association was observed for colon cancer (RR, 0.69; 95% CI, 0.45-0.95) but not rectal cancer (RR, 0.97; 95% CI, 0.62-1.49). The FokI and CASR genotypes were not associated with CRC risk in this study. No interactions were noted for any of the polymorphisms with serum 25OHD concentration or level of dietary calcium. These results confirm a role for the BsmI polymorphism of the VDR gene in CRC risk, independent of serum 25OHD concentration and dietary calcium intake.

### **I polimorfismi recettoriali sensibili al recettore della vitamina D e al calcio e rischio di cancro colonrettale nella popolazione europea**

Aumento dei livelli di vitamina D e calcio può svolgere un ruolo protettivo nei tumori del colon-retto (CRC) del rischio. È stato suggerito che questi effetti possono essere mediati da varianti genetiche del recettore della vitamina D (VDR) e il recettore sensibile al calcio (CASR). Tuttavia, l'evidenza epidemiologica attuale dalle popolazioni europee per un ruolo di questi geni a rischio di CRC è scarsa. Inoltre, non è chiaro se questi geni possono modulare rischio CRC indipendente o dall'interazione con concentrazione di vitamina D nel sangue e il livello di assunzione di calcio nella dieta. Uno studio caso-controllo nested è stato condotto all'interno della Studio prospettico europeo sul cancro e nutrizione. Casi di CRC (1.248) sono stati identificati e abbinati a 1.248 soggetti di controllo. Genotipizzazione per il VDR (BsmI: rs1544410; FokI: rs2228570) e CASR (rs1801725) geni è stato fatto da Taqman, e vitamina D (25OHD) le concentrazioni sono state misurate. Regressione logistica condizionale è stato utilizzato per stimare il rapporto tra tasso di incidenza (RR). Rispetto al bb wild-type, il genotipo BB del polimorfismo VDR BsmI era associato ad un ridotto rischio di CRC [RR, 0,76; intervallo di confidenza al 95% (CI), 0,59-0,98]. L'associazione è stata osservata per tumore del colon (RR 0,69, IC 95%, 0,45-0,95) ma non il cancro del retto (RR, 0,97; 95% CI, 0,62-1,49). I genotipi FokI e CASR non erano associati a

rischio di CRC in questo studio. Nessuna interazione sono stati notati per uno dei polimorfismi con siero 25OHD concentrazione o il livello di calcio nella dieta. Questi risultati confermano un ruolo per il polimorfismo BsmI del gene VDR a rischio CRC, indipendente dalla concentrazione di siero di 25OHD e l'assunzione di calcio nella dieta.

51: Wang P, Xu S, Zhao K, Xiao B, Guo J.

**Increase in cytosolic calcium maintains plasma membrane integrity through the formation of microtubule ring structure in apoptotic cervical cancer cells induced by trichosanthin.**

Cell Biol Int. 2009Nov;33(11):1149-54. Epub 2009 Aug 23. PubMed PMID: 19706333.

This study investigates the role of dysregulated cytosolic free calcium ( $[Ca^{2+}]_c$ ) homeostasis on microtubule (MT) ring structure in apoptotic cervical cancer (HeLa) cells induced by trichosanthin (TCS), a type I ribosome inactivating protein (RIP). The TCS-induced decrease in cell viability was significantly enhanced in combination with the specific calcium chelator, EGTA-AM. Sequestration of  $[Ca^{2+}]_c$  markedly disrupted the special MT ring structure. Furthermore, TCS tended to increase LDH release, whereas no significant differences were observed until 48 h of the treatment. In contrast, combined addition of EGTA-AM or colchicine (an inhibitor of tubulin polymerization) significantly reinforced LDH release. The data suggest that TCS-elevated  $[Ca^{2+}]_c$  maintains plasma membrane integrity via the formation of the MT ring structure in apoptotic HeLa cells.

**L'aumento nel calcio citosolico mantiene l'integrità della membrane plasmatica tramite la formazione di strutture microtubulari ad anello nelle cellule cancerose cervicali apoptiche indotto dalla trichosantina**

Questo studio indaga il ruolo della deregolazione del calcio citosolico libero ( $[Ca^{2+}]_c$ ) sulla omeostasi dei microtubuli (MT), struttura ad anello in apoptosi cancro della cervice uterina (HeLa) le cellule indotte da trichosanthin (TCS), un tipo mi ribosoma inattivante della proteina (RIP). Il TCS diminuzione indotta la vitalità delle cellule è stata significativamente migliorata in combinazione con il chelante del calcio, specifici, EGTA-AM. Sequestro di  $[Ca^{2+}]_c$  marcatamente perturbato la speciale struttura ad anello MT. Inoltre, TCS tendeva ad aumentare rilascio di LDH, mentre nessuna differenza significativa è stata osservata fino a 48 h di trattamento. Al contrario, l'aggiunta combinata di EGTA-AM o colchicina (un inibitore della polimerizzazione della tubulina) significativamente rafforzato rilascio di LDH. I dati suggeriscono che TCS-elevata  $[Ca^{2+}]_c$  mantiene l'integrità della membrana plasmatica attraverso la formazione della struttura ad anello in MT apoptosi delle cellule HeLa.

53: Cross HS, Peterlik M.

### **Vitamin D, calcium, and cancer.**

Anticancer Res. 2009Sep;29(9):3685. PubMed PMID: 19667165.

54: Simmons C, Amir E, Dranitsaris G, Clemons M, Wong B, Veith R, Cole DE.

### **Altered calcium metabolism in patients on long-term bisphosphonate therapy for metastatic breast cancer.**

Anticancer Res. 2009 Jul;29(7):2707-11. PubMed PMID:19596950.

**BACKGROUND:** Bisphosphonates (BPs) are considered the standard of care in metastatic breast cancer (MBC) patients with bone metastases. Because the survival for these patients may be prolonged compared with those patients with visceral metastases, they may be prescribed BPs for several years. The effects of this long-term BP use on calcium metabolism in MBC patients have not previously been described.

**OBJECTIVES:** The main objective of this study was to evaluate the effect of long-term BP use on calcium homeostasis in MBC patients. The secondary objective was to assess Vitamin D levels in these patients.

**MATERIALS AND METHODS:** An exploratory analysis of serum calcium, parathyroid (PTH), and 25 hydroxycholecalciferol (25-(OH)D) levels and their inter-relationships was undertaken in 46 MBC patients who had been on prolonged BP therapy. These results were compared to a historical control group of 420 patients without bone or mineral disease who were matched for gender, age, baseline renal function and season of serological testing.

**RESULTS:** Patients were similar in the two groups with no significant difference in mean age, baseline creatinine or season of testing. Serum calcium was no different between the two groups. However, PTH was significantly higher in MBC patients, compared to controls (5.7 vs. 4.8 pmol/L,  $p=0.043$ ). Linear regression analysis showed that PTH was significantly higher in the MBC group at lower serum calcium levels and fell sharply with increasing serum calcium levels ( $p=0.0001$ ). Among the patients with MBC, 62% had suboptimal levels of vitamin D and 18% were found to have insufficient or deficient levels (25-(OH)D < 40 nM) despite taking dietary supplementation.

**CONCLUSION:** In MBC patients with prolonged BP use, there appears to be a state of hyperparathyroidism similar to that seen with BP use in benign bone disease. Supplementation with 400 IU per day of Vitamin D per day was not sufficient to correct this metabolic abnormality.

### **Metabolismo del calcio alterato nei pazienti con terapia a lungo di termine di bisfosfonati per il cancro al seno metastatico**

**BACKGROUND:** I bisfosfonati (BP) sono considerati lo standard di cura nel cancro al seno metastatico (MBC) pazienti con metastasi ossee. Poiché la sopravvivenza di questi pazienti possono essere prolungata rispetto a quei pazienti con metastasi viscerali, possono essere prescritti bps per diversi anni. Gli effetti di tale impiego a lungo termine di BP sul metabolismo del calcio in pazienti MBC non sono state precedentemente descritte.

**OBIETTIVI:** L'obiettivo principale di questo studio era di valutare l'effetto di lungo termine l'uso BP sull'omeostasi del calcio in pazienti MBC. L'obiettivo secondario era valutare i livelli di vitamina D in questi pazienti.

**MATERIALI E METODI:** Un'analisi esplorativa del calcio sierico, paratiroideo (PTH), e 25 hydroxycholecalciferol (25 - (OH) D) i livelli e le loro interrelazioni è stato intrapreso in 46 pazienti MBC che erano stati in terapia prolungata BP. Questi risultati sono stati confrontati con un gruppo di controllo storico di 420 pazienti senza malattia ossea o minerali che sono stati appaiati per sesso, età, funzione renale basale e la stagione dei test serological.

**RISULTATI:** I pazienti sono stati simili nei due gruppi senza differenze significative in età media della creatinina al basale o la stagione di test. Sierici di calcio non era diverso tra i due gruppi.

Tuttavia, PTH era significativamente più alta nei pazienti MBC, rispetto ai controlli (5,7 vs 4,8 pmol / L,  $p = 0,043$ ). Analisi di regressione lineare ha mostrato che PTH era significativamente più alta nel gruppo MBC a bassi livelli sierici di calcio e registrato un netto calo con aumento dei livelli sierici di calcio ( $p = 0,0001$ ). Tra i pazienti con MBC, il 62% aveva livelli subottimali di vitamina D e il 18% sono stati trovati ad avere livelli insufficienti o carenti (25 - (OH) D <40 nm), nonostante la presa integrazione alimentare.

CONCLUSIONE: In pazienti con MBC prolungato uso BP, sembra che vi sia uno stato di iperparatiroidismo simile a quella osservata con l'utilizzo di BP in malattia ossea benigna. La supplementazione con 400 UI al giorno di vitamina D al giorno non è stato sufficiente a correggere questa anomalia metabolica.

56: Schwartz GG.

**Is serum calcium a biomarker of fatal prostate cancer?**

FutureOncol. 2009 Jun;5(5):577-80. PubMed PMID: 19519196.

57: Nicotera TM, Schuster DP, Bourhim M, Chadha K, Klaich G, Corral DA.

**Regulation of PSA secretion and survival signaling by calcium-independent phospholipase A(2)beta in prostate cancer cells.**

Prostate. 2009 Sep;69(12):1270-80. PubMed PMID: 19475654.

**BACKGROUND:** Serum prostate specific antigen (PSA) levels in prostate cancer patients serve as a useful biomarker for diagnosing and monitoring prostate cancer. Recently, secreted PSA has been characterized as an autocrine survival factor through activation of Akt and induction of AR. In the normal prostate, PSA is secreted in the lumen of prostatic ducts to lyse proteins in the seminal coagulum.

**METHODS:** However, the mechanism for constitutive PSA secretion from benign prostate and its transport across the prostate-blood barrier into serum are unknown. Regulation of peptide secretion by iPLA(2)-beta has been reported in non-prostatic tissue and in prostate tissue iPLA(2)-beta is reported to be under androgen regulation. We investigated whether iPLA(2) plays a role for in PSA secretion by comparing iPLA(2) activity and expression in normal prostate epithelial RWPE-1 cells and in LNCaP prostate cancer cells. Expression of the two active iPLA(2)-beta mRNA splice variants, LH-iPLA(2) and SH-iPLA(2), were increased and the inhibitory ankyrin-iPLA(2) isoform was markedly reduced in LNCaP cells as compared to normal prostate epithelial RWPE-1 cells.

**RESULTS:** These changes are consistent with a higher enzymatic activity in LNCaP cells. The iPLA(2)-beta-specific inhibitor BEL inhibited PSA secretion and induced apoptosis in LNCaP cells. iPLA(2) knockdown using siRNA inhibited PSA secretion, downregulated AR and induced apoptosis. Exogenous PSA suppressed BEL-induced apoptosis and neutralizing anti-PSA antibody blocked the survival effect of PSA.

**CONCLUSIONS:** These data indicate that iPLA(2)-beta participates in regulating PSA secretion and supports the concept that secreted PSA provides an autocrine survival function in LNCaP cells.

**Regolazione della secrezione del PSA e sopravvivenza segnalate dalla fosfolipasi A(2) indipendente dal calcio nelle cellule cancerose prostatiche**

**BACKGROUND:** il siero antigene prostatico specifico (PSA) in pazienti con cancro alla prostata servire come un biomarker utile per la diagnosi e il monitoraggio del cancro alla prostata. Recentemente, secreta PSA si è caratterizzato come un fattore di sopravvivenza autocrino attraverso l'attivazione di Akt e induzione di AR. Nella prostata normale, PSA è secreta nel lume di dotti prostatici per lisare proteine del coagulo seminale.

**METODI:** Tuttavia, il meccanismo di secrezione costitutiva da PSA benigna della prostata e il suo trasporto attraverso la barriera sangue-prostata in siero sono sconosciuti. Regolazione della secrezione del peptide da IPLA (2)-beta è stato riportato in tessuto non-prostatica e della prostata in tessuto IPLA (2)-beta è segnalato per essere ai sensi del regolamento androgeni. Abbiamo studiato se IPLA (2) svolge un ruolo di PSA in secrezione confrontando IPLA (2) attività e di espressione nel normale epiteliali della prostata RWPE-1 e cellule in cellule di carcinoma prostatico LNCaP. Espressione dei due attivi IPLA (2)-beta varianti di splicing dell'mRNA, LH-IPLA (2) e SH-IPLA (2), sono stati aumentati e l'inibitoria ankyrin-IPLA (2) isoforma è stata marcatamente ridotta nelle cellule LNCaP rispetto al epiteliali della prostata normale RWPE-1 celle. **RISULTATI:** Queste modifiche sono coerenti con una maggiore attività enzimatica nelle cellule LNCaP. L'IPLA (2)-beta-inibitore specifico BEL inibito la secrezione di PSA e l'apoptosi indotta nelle cellule LNCaP. IPLA (2) atterramento utilizzando siRNA inibito la secrezione di PSA, AR inibiti e apoptosi indotta. Esogeni PSA soppresso BEL-apoptosi indotta e anticorpi neutralizzanti

anti-PSA ha bloccato l'effetto sopravvivenza del PSA.  
CONCLUSIONI: Questi dati indicano che l'IPLA (2)-beta partecipa nella regolazione della secrezione di PSA e sostiene il concetto che secreto PSA fornisce una funzione autocrina sopravvivenza in cellule LNCaP.

59: Florea AM, Büsselberg D.

**Anti-cancer drugs interfere with intracellular calcium signaling.**

Neurotoxicology. 2009 Sep;30(5):803-10. Epub 2009 May 22. Review. PubMed PMID: 19465052.  
(Neuro-)toxicity of metal and metal compounds is frequently highlighted. While specific metals or metal compounds are essential for cellular function, other metals are toxic and/or carcinogens. Metals can trigger accidental cell death in the form of necrosis, or activate programmed cell death in the form of apoptosis. The aim of anti-cancer therapy is induction of apoptosis in tumor cells. Therefore, there is an interesting twist in the toxicity of metals and metal compounds (e.g., arsenic trioxide, cisplatin); since they have a higher specificity to induce apoptosis in cancer cells (possibly due to the high turnover in these cells) they are used to cure some forms of cancer. A body of evidence suggests that second messengers, such as modulations in the intracellular calcium concentration, could be involved in metals induced toxicity as well as in the beneficial effects shown by anti-cancer drugs. Here we review the influence on calcium homeostasis induced by some metallic compounds: cisplatin, arsenic trioxide and trimethyltin chloride.

**I farmaci anticancro interferiscono con il segnale del calcio intracellulare**

(Neuro-) tossicità dei composti metallici e metallo è spesso evidenziato. Mentre metalli specifici o composti di metalli sono essenziali per il funzionamento cellulare, altri metalli sono tossici e / o cancerogeni. I metalli possono provocare la morte accidentale di cellule in forma di necrosi, o attivare la morte cellulare programmata in forma di apoptosi. L'obiettivo della terapia anti-cancro è l'induzione di apoptosi nelle cellule tumorali. Pertanto, vi è una svolta interessante nella tossicità dei metalli e composti metallici (ad esempio, triossido di arsenico, cisplatino), in quanto hanno una specificità più alta di indurre l'apoptosi nelle cellule tumorali (forse a causa del turnover in queste cellule) sono utilizzati per curare alcune forme di cancro. Un corpo di evidenza suggerisce che secondi messaggeri, come modulazioni della concentrazione intracellulare di calcio, potrebbero essere coinvolti in metalli tossicità indotta come pure negli effetti benefici dimostrato da farmaci anti-cancro. Qui passiamo in rassegna l'influenza sull'omeostasi del calcio indotta da alcuni composti metallici: cisplatino, triossido di arsenico e cloruro trimethyltin.

60: He XW, Liu T, Xiao Y, Feng YL, Cheng DJ, Tingting G, Zhang L, Zhang Y, Chen YX, Tingting G, Zhang L.

**Vascular endothelial growth factor-C siRNA delivered via calcium carbonate nanoparticle effectively inhibits lymphangiogenesis and growth of colorectal cancer in vivo.**

Cancer Biother Radiopharm. 2009 Apr;24(2):249-59. PubMed PMID: 19409048.

A nonviral gene carrier, calcium carbonate (CaCO<sub>3</sub>)-nanoparticle, was evaluated for the efficient in vitro and in vivo delivery of siRNA-targeting vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C). The chemically synthesized CaCO<sub>3</sub>-nanoparticle has a 58-nm diameter and a + 28.6-mV positive surface charge. It is capable of forming a CaCO<sub>3</sub>-nanoparticle-DNA complex and transferring DNA into targeted cells with high transfection efficiency, while effectively protecting the encapsulated DNA from degradation. Further, the CaCO<sub>3</sub>-nanoparticle-DNA complex has no obvious cytotoxicity for LoVo cells, while a liposome-DNA complex exhibited measurable cytotoxicity. LoVo cells transfected with a VEGF-C-targeted small interfering RNA (siRNA) via the CaCO<sub>3</sub>-nanoparticle exhibits significantly reduced VEGF-C expression, as measured by real-time polymerase chain reaction (PCR) and enzyme-linked immunosorbent assay, whereas no decrease in VEGF-C expression is observed in cells treated by control transfection. Transfection of LoVo cells with VEGF-C siRNA via the CaCO<sub>3</sub>-nanoparticle also dramatically suppresses tumor lymphangiogenesis, tumor growth, and regional lymph-node metastasis in subcutaneous xenografts. Significant downregulation of VEGF-C messenger RNA expression in a subcutaneous xenograft derived from VEGF-C siRNA-treated LoVo cells was confirmed by real-time PCR, as compared to controls. We conclude that the CaCO<sub>3</sub>-nanoparticle is a novel, nonviral system for the effective delivery of siRNA for cancer gene therapy.

**Il fattore di crescita vascolare endoteliale -C siRNA distribuito tramite le nanoparticelle di carbonato di calcio inibisce la linfangiogenesi e la crescita del cancro colon rettale in vivo**

Un vettore gene non virali, carbonato di calcio (CaCO<sub>3</sub>)-nanoparticelle, è stata valutata per l'efficace in vitro e in vivo di consegna di siRNA-targeting Vascular Endothelial Growth Factor-C (VEGF-C). La sintesi chimica CaCO<sub>3</sub>-nanoparticella ha un diametro di 58 nm e un + 28,6 mV carica positiva di superficie. E 'in grado di formare un complesso CaCO<sub>3</sub>-nanoparticelle-DNA e il trasferimento di DNA in cellule bersaglio con l'efficienza di trasfezione alta, mentre proteggere efficacemente il DNA incapsulato dal degrado. Inoltre, il CaCO<sub>3</sub>-complesso nanoparticelle-DNA non ha citotossicità evidente per le cellule LoVo, mentre un complesso liposoma-DNA esposto citotossicità misurabili. LoVo cellule transfettate con un VEGF-C-targeting piccoli RNA interferenti (siRNA) tramite il CaCO<sub>3</sub> mostre-nanoparticella ha ridotto significativamente l'espressione di VEGF-C, misurata come reazione a catena della polimerasi in tempo reale (PCR) e analisi enzima-collegata dell'immunosorbente, mentre nessuna riduzione di espressione di VEGF-C è stato osservato nelle cellule trattate con trasfezione di controllo. Transfezione delle cellule LoVo con VEGF-C siRNA tramite il CaCO<sub>3</sub>-nanoparticelle anche sopprime drasticamente linfangiogenesi tumore, la crescita tumorale e metastasi regionale dei linfonodi in xenotrapianti sottocutanea. Sottoregolazione significativa espressione del messaggero di VEGF-C RNA in caso di trapianto sottocutaneo derivato da VEGF-C trattati con siRNA cellule LoVo è stata confermata dalla PCR in tempo reale, rispetto ai controlli. Concludiamo che la (3) Caco-nanoparticella è un romanzo, non virali del sistema per l'effettiva consegna di siRNA per la terapia genica del cancro.

61: Olsen A, Egeberg R, Tjønneland A.

**Re: Calcium plus vitamin D supplementation and the risk of breast cancer.**

J Natl Cancer Inst. 2009 May 6;101(9):690; author reply 690-1. Epub 2009 Apr 28. PubMed PMID: 19401545.

62: Halthur C, Johansson AL, Almquist M, Malm J, Grönberg H, Manjer J, DickmanPW.

**Serum calcium and the risk of prostate cancer.**

Cancer Causes Control. 2009Sep;20(7):1205-14. Epub 2009 Apr 18. PubMed PMID: 19377857.

**BACKGROUND:** Recent studies have suggested an association between high dietary intake of calcium and the risk of prostate cancer. Calcium-rich diet has been suggested to affect the serum levels of Vitamin D, and thereby promote cancer. We conducted the largest study of the association between prediagnostic serum levels of calcium and the risk of prostate cancer. **OUTLINE:** We examined the incidence of prostate cancer in relation to prediagnostic serum calcium levels in a prospective cohort study of 22,391 healthy Swedish men, of which 1,539 incident cases of prostate cancer were diagnosed during the 30 years of follow-up until December 2006.

**MATERIAL AND METHODS:** Serum levels of calcium were measured at baseline, and categorized into quartiles. Cox regression was used to estimate the adjusted hazard ratios (HR) with 95% confidence intervals (CI).

**RESULTS:** We found no evidence of an association between prediagnostic serum levels of calcium and risk of prostate cancer (HR for trend = 0.99 [95% CI;0.94-1.03]). However, a moderate significant negative association was seen in men with a BMI above 25 and aged below 45 years at baseline (Highest vs. lowest quartile, HR = 0.63 [95% CI;0.40-0.99]).

**CONCLUSION:** These data do not support the hypothesis that high serum calcium levels is a risk factor for prostate cancer. On the contrary, the data suggest that high serum levels of calcium in young overweight men may be a marker for a decreased risk of developing prostate cancer.

**Calcio sierico e rischio di cancro alla prostata**

**BACKGROUND:** Studi recenti hanno suggerito un'associazione tra elevato apporto dietetico di calcio e il rischio di cancro alla prostata. Dieta ricca di calcio è stato suggerito di influenzare i livelli sierici di vitamina D, ea promuovere quindi il cancro. Abbiamo condotto il più grande studio di associazione tra livelli sierici prediagnostici di calcio e il rischio di cancro alla prostata.

**DESCRIZIONE:** Abbiamo esaminato l'incidenza di carcinoma della prostata in relazione ai livelli sierici di calcio prediagnostici in uno studio prospettico di coorte di 22.391 uomini sani svedese, di cui sono stati diagnosticati 1.539 casi incidenti di carcinoma della prostata nei 30 anni di follow-up fino al dicembre 2006.

**MATERIALI E METODI:** I livelli sierici di calcio sono stati misurati al basale, e classificati in quartili. Regressione di Cox è stato utilizzato per stimare l'hazard ratio (HR) con intervalli di confidenza al 95% (CI).

**RISULTATI:** Abbiamo trovato nessuna evidenza di un'associazione tra livelli sierici prediagnostici di calcio e rischio di cancro alla prostata (HR per trend = 0,99 [95% CI, 0,94-1,03]). Tuttavia, un moderato un'associazione negativa significativa è stata osservata negli uomini con un BMI superiore a 25 e di età sotto i 45 anni al basale (più alto quartile più basso rispetto, HR = 0,63 [95% CI, 0,40-0,99]).

**CONCLUSIONE:** Questi dati non supportano l'ipotesi che alti livelli sierici di calcio è un fattore di rischio per il cancro alla prostata. Al contrario, i dati suggeriscono che alti livelli sierici di calcio in giovani uomini in sovrappeso può essere un indicatore di una diminuzione del rischio di sviluppare il cancro alla prostata.

63: Biankin AV, Kench JG, Colvin EK, Segara D, Scarlett CJ, Nguyen NQ, Chang DK, Morey AL, Lee CS, Pinese M, Kuo SC, Susanto JM, Cosman PH, Lindeman GJ, Visvader JE, Nguyen TV, Merrett ND, Warusavitarne J, Musgrove EA, Henshall SM, Sutherland RL; NSW Pancreatic Cancer Network.

**Expression of S100A2 calcium-binding protein predicts response to pancreatectomy for pancreatic cancer.**

Gastroenterology. 2009Aug;137(2):558-68, 568.e1-11. Epub 2009 Apr 16. PubMed PMID: 19376121.

**BACKGROUND & AIMS:** Current methods of preoperative staging and predicting outcome following pancreatectomy for pancreatic cancer (PC) are inadequate. We evaluated the utility of multiple biomarkers from distinct biologic pathways as potential predictive markers of response to pancreatectomy and patient survival.

**METHODS:** We assessed the relationship of candidate biomarkers known, or suspected, to be aberrantly expressed in PC, with disease-specific survival and response to therapy in a cohort of 601 patients.

**RESULTS:** Of the 17 candidate biomarkers examined, only elevated expression of S100A2 was an independent predictor of survival in both the training (n = 162) and validation sets (n = 439; hazard ratio [HR], 2.19; 95% confidence interval [CI]: 1.48-3.25; P < .0001) when assessed in a multivariate model with clinical variables. Patients with high S100A2 expressing tumors had no survival benefit with pancreatectomy compared with those with locally advanced disease, whereas those without high S100A2 expression had a survival advantage of 10.6 months (19.4 vs 8.8 months, respectively) and a HR of 3.23 (95% CI: 2.39-4.33; P < .0001). Of significance, patients with S100A2-negative tumors had a significant survival benefit from pancreatectomy even in the presence of involved surgical margins (median, 15.7 months; P = .0007) or lymph node metastases (median, 17.4 months; P = .0002).

**CONCLUSIONS:** S100A2 expression is a good predictor of response to pancreatectomy for PC and suggests that high S100A2 expression may be a marker of a metastatic phenotype. Prospective measurement of S100A2 expression in diagnostic biopsy samples has potential clinical utility as a predictive marker of response to pancreatectomy and other therapies that target locoregional disease.

**Nel cancro pancreatico l'espressione della proteina legata al calcio S100A2 predice la risposta alla pancreatectomia**

**CONTESTO ED OBIETTIVI:** Gli attuali metodi di stadiazione preoperatoria e pancreatectomia risultato predire seguente per il carcinoma pancreatico (PC) sono inadeguati. Abbiamo valutato l'utilità di biomarker multipli da percorsi biologici distinte come potenziali marker predittivo di risposta al pancreatectomia e la sopravvivenza dei pazienti.

**METODI:** Abbiamo valutato la relazione tra biomarker candidato conosciuto, o sospetta, di essere espresso in modo aberrante PC, con la sopravvivenza malattia-specifica e la risposta alla terapia in una coorte di 601 pazienti.

**RISULTATI:** Dei 17 biomarkers candidati esaminati, solo espressione elevata di S100A2 era un predittore indipendente di sopravvivenza sia nella formazione (n = 162) e set di validazione (n = 439; hazard ratio [HR], 2.19; 95 [intervallo di confidenza% CI]: 1,48-3,25, p <.0001) quando valutato in un modello multivariato con variabili cliniche. I pazienti con tumori che esprimono alti S100A2 non aveva alcun beneficio di sopravvivenza con pancreasectomia rispetto a quelli con malattia localmente avanzata, mentre quelli senza alta espressione S100A2 aveva un vantaggio di sopravvivenza di 10,6 mesi (19,4 vs 8,8 mesi, rispettivamente) e un HR di 3.23 (IC 95% : 2,39-4,33, p <.0001). Di significatività, i pazienti con tumori S100A2-negativi hanno un vantaggio

significativo di sopravvivenza pancreatectomia anche in presenza di margini chirurgici coinvolti (mediana, 15,7 mesi,  $p = 0,0007$ ) metastasi o linfa (mediana, 17,4 mesi;  $P = 0,0002$ ).

CONCLUSIONI: espressione S100A2 è un buon predittore di risposta alla pancreatectomia per PC e suggerisce che l'espressione S100A2 elevate possono essere un indicatore di un fenotipo metastatico. Misurazione delle prospettive di espressione S100A2 nei campioni di biopsia diagnostica ha un potenziale utilità clinica come marker predittivo di risposta alle terapie pancreatectomia e altre che colpiscono la malattia locoregionale.

65: Riganti C, Doublier S, Viarisio D, Miraglia E, Pescarmona G, Ghigo D, Bosia A.

**Artemisinin induces doxorubicin resistance in human colon cancer cells via calcium-dependent activation of HIF-1alpha and P-glycoprotein overexpression.**

Br J Pharmacol. 2009 Apr;156(7):1054-66. Epub 2009 Mar 9. PubMed PMID: 19298255; PubMed Central PMCID: PMC2697684.

**BACKGROUND AND PURPOSE:** Artemisinin is an antimalarial drug exerting pleiotropic effects, such as the inhibition of the transcription factor nuclear factor-kappa B and of the sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca(++)-ATPase (SERCA) of *P. falciparum*. As the sesquiterpene lactone thapsigargin, a known inhibitor of mammalian SERCA, enhances the expression of P-glycoprotein (Pgp) by increasing the intracellular Ca(++) ([Ca(++)]<sub>i</sub>) level, we investigated whether artemisinin and its structural homologue parthenolide could inhibit SERCA in human colon carcinoma HT29 cells and induce a resistance to doxorubicin.

**EXPERIMENTAL APPROACH:** HT29 cells were incubated with artemisinin or parthenolide and assessed for SERCA activity, [Ca(++)]<sub>i</sub> levels, Pgp expression, doxorubicin accumulation and toxicity, and translocation of the hypoxia-inducible factor, HIF-1alpha.

**KEY RESULTS:** Artemisinin and parthenolide, like the specific SERCA inhibitors thapsigargin and cyclopiazonic acid, reduced the activity of SERCA. They also increased intracellular calcium concentration ([Ca(++)]<sub>i</sub>) and Pgp expression and decreased doxorubicin accumulation and cytotoxicity. The intracellular Ca(++) chelator, 1,2-bis(2-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid, and the inhibitor of calmodulin-dependent kinase II (CaMKII) KN93 prevented these effects. CaMKII is known to promote the phosphorylation and the activation of HIF-1alpha, which may induce Pgp. In HT29 cells, artemisinin and parthenolide induced the phosphorylation of HIF-1alpha, which was inhibited by KN93.

**CONCLUSIONS AND IMPLICATIONS:** Our results suggest that artemisinin and parthenolide may act as SERCA inhibitors and, like other SERCA inhibitors, induce resistance to doxorubicin in human colon cancer cells, via the CaMKII-dependent activation of HIF-1alpha and the induction of Pgp.

**L'artemisinina induce la resistenza alla doxorubicina nelle cellule cancerose umane del colon tramite l'attivazione di HIF-alfa dipendente dal calcio e la sovraespressione della glicoproteina P**

**PRIORITÀ BASSA E SCOPO:** L'artemisinina è un farmaco antimalarico esercitare effetti pleiotropici, come ad esempio l'inibizione del fattore di trascrizione nucleare B fattore-kappa e del sarcoplasmatico / reticolo endoplasmatico Ca (++)- ATPasi (SERCA) di *P. falciparum*. Come il thapsigargin lattone sesquiterpene, un noto inibitore di mammiferi SERCA, aumenta l'espressione di P-glicoproteina (Pgp), aumentando il Ca intracellulare (++) ([Ca (++)]<sub>i</sub> il livello), abbiamo valutato se artemisinina e il suo omologo partenolide strutturale potrebbe inibire SERCA in cellule umane di carcinoma del colon HT29 e indurre una resistenza alla doxorubicina.

**APPROCCIO SPERIMENTALE:** cellule HT29 sono state incubate con artemisinina o partenolide e valutati per l'attività SERCA, [Ca (++)]<sub>i</sub> i livelli, espressione di Pgp, accumulo doxorubicina, la tossicità e la traslocazione del fattore ipossia-inducibile, HIF-1alfa.

**RISULTATI PRINCIPALI:** artemisinina e partenolide, come la specifica thapsigargin SERCA inibitori e acido ciclopiazonico, ha ridotto l'attività della SERCA. Hanno anche un aumento della concentrazione intracellulare di calcio ([Ca (++)]<sub>i</sub>) e di espressione della Pgp e diminuito accumulo doxorubicina e citotossicità. Il Ca intracellulare (++) chelante, 1,2-bis (2-aminophenoxy) etano-N, N, N'-acido tetracetico N ',, e l'inibitore della calmodulina-dipendente della chinasi II (CaMKII) KN93 impedito a questi effetti . CaMKII è conosciuta per promuovere la fosforilazione e l'attivazione di HIF-1alfa, che può indurre Pgp. In cellule HT29, artemisinina e partenolide indotto la fosforilazione di HIF-1alfa, che è stato inibito dal KN93. Conclusioni e implicazioni: I nostri risultati suggeriscono che artemisinina e partenolide possono

agire come inibitori SERCA e, come altri inibitori della SERCA, inducono resistenza alla doxorubicina in cellule umane di cancro del colon, attraverso l'attivazione CaMKII-dipendente di HIF-1 alfa e l'induzione della Pgp.

68: Mazzeo MA, Linares JA, Campos ML, Busamia BE, Dubersarsky C, Lavarda M, Jarchum G, Finkelberg AB.

### **Oral signs of intravenous chemotherapy with 5-Fluorouracil and Leucovorin calcium in colon cancer treatment.**

Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2009 Mar 1;14(3):E108-13. PubMed PMID: 19242388.

Several studies have shown how cytostatics may cause hypofunction of salivary glands but failed to elucidate any potentially related side effects. Keeping in mind the sialochemical assistance and the role of saliva on the homeostasis of the stomatognathic system, the aim of this study was to establish potential gland disorders in patients submitted to 5-Fluorouracil (5-Fu) and Leucovorin calcium (LV) as well as their correlation with certain oral health disorders that diminish the quality of life.

**MATERIALS AND METHODS:** the focus of this research was observational and longitudinal. Twenty-five patients diagnosed with colon cancer at an initial, intermediate and late phase submitted to specifically devised therapy were assessed. Clinical history, oral health indexes and basal or stimulated saliva samples were recorded.

**RESULTS:** Basal and stimulated flow dropped in the intermediate stage. Stimulated saliva pH decreased during treatment. On basal saliva, urea, sodium and potassium rose during the intermediate phase. Loe and Silness rates as well as simplified bleeding increased during therapy but reverted by the end of the treatment. Depth index of the vestibular gingival sulcus rose during the intermediate phase but did not return.

**CONCLUSION:** This treatment caused functional salivary gland disorders as evidenced by basal and stimulated hyposialia, and acidification of stimulated saliva pH during the intermediate phase. Increase in basal urea may be due to proteic catabolism arising from plasma or glands. Variation in Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> of basal saliva concentrates might be assumed as a possible duct disorder. Recovery of bleeding and Loe and Silness rates may point to a transient inflammatory effect associated to a decrease in salivary flow. Increase in the depth rates of the periodontal vestibular sulcus could be correlated with a higher risk of periodontal disease.

### **Segni orali della chemioterapia intravenosa con 5-Fluorouracile e Leucovorina calcio nel trattamento del cancro al colon**

Diversi studi hanno dimostrato come citostatici possono causare ipofunzione delle ghiandole salivari, ma non è riuscito a chiarire gli eventuali effetti collaterali potenzialmente correlati. Tenendo presente l'assistenza sialochemical e il ruolo della saliva sulla omeostasi del sistema stomatognatico, lo scopo di questo studio era di determinare disturbi della ghiandola potenziale in pazienti sottoposti a 5 - fluorouracile (5-Fu) e calcio Leucovorin (LV), nonché la loro correlazione con alcuni problemi di salute orale che diminuiscono la qualità della vita.

**MATERIALI E METODI:** il focus di questa ricerca è stato osservazionale e longitudinale. Venticinque pazienti con diagnosi di cancro al colon in fase iniziale, intermedio e tardivo presentato alla terapia specificamente messo a punto sono stati valutati. La storia clinica, gli indici di salute orale e basale o campioni di saliva stimolata sono stati registrati.

**RISULTATI:** basale e stimolata flusso caduta nella fase intermedia. PH saliva stimolata diminuita durante il trattamento. Su saliva basale, urea, sodio e potassio rosa durante la fase intermedia. Tassi Loe e Silness così come semplificato aumentato sanguinamento durante la terapia, ma tornò alla fine del trattamento. Indice di profondità del solco gengivale vestibolare rosa durante la fase intermedia, ma non ritorno.

**CONCLUSIONE:** Questo trattamento ha causato i disordini funzionali delle ghiandole salivari,

come evidenziato dal basale e stimolata hyposialia, e l'acidificazione del pH della saliva stimolata durante la fase intermedia. Aumento dell'urea basale può essere dovuto al catabolismo proteico derivanti dal plasma o ghiandole. Variazione Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> di saliva basale concentrati potrebbe essere assunto come un disturbo condotto possibile. I tassi di recupero di sanguinamento e di Løe e Silness potrebbe puntare a un effetto transitorio infiammatorio associato ad una diminuzione del flusso salivare. Aumento dei tassi di profondità del solco parodontale vestibolare potrebbe essere correlato con un alto rischio di malattia parodontale.

69: Park Y, Leitzmann MF, Subar AF, Hollenbeck A, Schatzkin A.

### **Dairy food, calcium, and risk of cancer in the NIH-AARP Diet and Health Study.**

Arch InternMed. 2009 Feb 23;169(4):391-401. PubMed PMID: 19237724; PubMed Central PMCID:PMC2796799.

**BACKGROUND:** Dairy food and calcium intakes have been hypothesized to play roles that differ among individual cancer sites, but the evidence has been limited and inconsistent. Moreover, their effect on cancer in total is unclear.

**METHODS:** Dairy food and calcium intakes in relation to total cancer as well as cancer at individual sites were examined in the National Institutes of Health (NIH)-AARP (formerly known as the American Association of Retired Persons) Diet and Health Study. Intakes of dairy food and calcium from foods and supplements were assessed with a food frequency questionnaire. Incident cancer cases were identified through linkage with state cancer registries. A Cox proportional hazard model was used to estimate relative risks and 2-sided 95% confidence intervals (CIs).

**RESULTS:** During an average of 7 years of follow-up, we identified 36 965 and 16 605 cancer cases in men and women, respectively. Calcium intake was not related to total cancer in men but was nonlinearly associated with total cancer in women: the risk decreased up to approximately 1300 mg/d, above which no further risk reduction was observed. In both men and women, dairy food and calcium intakes were inversely associated with cancers of the digestive system (multivariate relative risk for the highest quintile of total calcium vs the lowest, 0.84; 95% CI, 0.77-0.92 in men, and 0.77; 95% CI, 0.69-0.91 in women). Decreased risk was particularly pronounced with colorectal cancer. Supplemental calcium intake was also inversely associated with colorectal cancer risk.

**CONCLUSION:** Our study suggests that calcium intake is associated with a lower risk of total cancer and cancers of the digestive system, especially colorectal cancer.

### **Cibi caseari, calcio e rischio di cancro nello studio sulla salute e sulla dieta NIH-AARP**

**BACKGROUND:** consumo di alimenti lattiero-caseari e di calcio sono stati ipotizzati a svolgere ruoli che differiscono tra singole sedi tumorali, ma le prove sono state limitate e inconsistenti. Inoltre, il loro effetto sul cancro in totale non è chiaro.

**METODI:** consumo di alimenti prodotti lattiero-caseari e di calcio in relazione al totale del cancro e il cancro nei singoli siti sono stati esaminati nel National Institutes of Health (NIH)-AARP (precedentemente noto come l'Associazione Americana dei Pensionati) Dieta e Health Study. L'assunzione di prodotti lattiero-caseari e di calcio dagli alimenti e integratori sono stati valutati con un questionario di frequenza alimentare. Casi di tumore incidenti sono stati individuati attraverso il collegamento con i registri tumori di Stato. Un modello proporzionale di Cox è stato utilizzato per stimare i rischi relativi e 2-lati gli intervalli di confidenza al 95% (IC).

**RISULTATI:** Durante una media di 7 anni di follow-up, abbiamo identificato 36 965 e 16 605 casi di cancro negli uomini e nelle donne, rispettivamente. L'apporto di calcio non è stato collegato al totale del cancro negli uomini, ma è stato associato al cancro non lineare totale nelle donne: il rischio è diminuito fino a circa 1300 mg / die, oltre la quale nessuna riduzione ulteriore rischio è stata osservata. In entrambi gli uomini e le donne, latticini e le prese di calcio erano inversamente associati a tumori maligni dell'apparato digerente (rischio relativo multivariato per il quintile più alto del calcio totale vs il più basso, 0,84, 95% CI, 0,77-0,92 negli uomini e 0,77; 95% CI, 0,69-

0,91 nelle donne). Diminuzione del rischio è stata particolarmente pronunciata con cancro coloretale. Assunzione di calcio supplementare anche era inversamente associata a rischio di cancro coloretale.

**CONCLUSIONE:** Il nostro studio suggerisce che l'assunzione di calcio è associata a un minor rischio di cancro totali e tumori dell'apparato digerente, in particolare il cancro del colon-retto.

73: Zhang H, Liu D, Sun S, Liu J, Wu S, Mao Y, Li M, Feng S, Xiao Y, He D, Xiao X.

**[Selective Expression of Calcium-Binding Protein S100A7 in Lung Cancer].**

Zhongguo Fei Ai Za Zhi. 2009 Jan 20;12(1):54-8. Chinese. PubMed PMID: 20712958.

**BACKGROUND:** S100A7 is a member of S100 family and its overexpression has been previously associated with carcinogenesis of certain cancers. The aim of this study is to explore the expression of calcium-binding protein S100A7 in lung cancer.

**METHODS:** In the present study, RT-PCR, Western-blot and immunohistochemistry were used to analyze the different expression of S100A7 in lung cancer tissues and paired noncancerous lung tissues.

**RESULTS:** The specific expression of S100A7 was found in squamous cell carcinomas and large cell lung carcinomas, whereas it was not detected in adenocarcinomas, small cell carcinomas, other cell types of lung cancer and normal lung tissues as well as paired noncancerous lung tissues.

**CONCLUSIONS:** S100A7 was selectively expressed in squamous cell carcinomas and large cell lung carcinomas and may serve as a potential marker for lung cancer diagnosis.

**[Espressione selettiva della proteina S100A7 nel cancro al polmone].**

**BACKGROUND:** S100A7 è un membro della famiglia S100 e la sua sovraespressione è stata precedentemente associata a carcinogenesi di alcuni tumori. Lo scopo di questo studio è quello di esplorare l'espressione della proteina legante il calcio S100A7 nel cancro del polmone.

**METODI:** Nel presente studio, RT-PCR, Western-blot ed immunoistochimica sono stati utilizzati per analizzare l'espressione di differenti S100A7 nei tessuti cancro del polmone e associato tessuti polmonari noncancerous.

**RISULTATI:** La manifestazione specifica del S100A7 è stato trovato nel carcinoma a cellule squamose e carcinomi polmonari grandi cellule, mentre non è stata rilevata in adenocarcinomi, carcinomi a piccole cellule, altri tipi di cellule di cancro ai polmoni e tessuti polmonari normali sia abbinato tessuti polmonari noncancerous.

**CONCLUSIONI:** S100A7 era selettivamente espresso nel carcinoma a cellule squamose e grandi carcinomi del polmone delle cellule e può servire come un potenziale marker per la diagnosi del cancro polmonare.

74: Huncharek M, Muscat J, Kupelnick B.

**Colorectal cancer risk and dietary intake of calcium, vitamin D, and dairy products: a meta-analysis of 26,335 cases from 60 observational studies.**

Nutr Cancer. 2009;61(1):47-69. PubMed PMID: 19116875.

In vivo and in vitro studies suggest that dairy products, calcium, and dietary vitamin D inhibits the development of colorectal cancer (CRC). A meta-analysis was performed to evaluate this relationship in observational studies. Data from 60 epidemiological studies enrolling 26,335 CRC cases were pooled using a general variance-based meta-analytic method. Summary relative risk (RR) estimates and 95% confidence intervals (CIs) were calculated for the highest vs. the lowest intake categories. Sensitivity analyses tested the robustness of these summary effect measures and the statistical heterogeneity. The summary RR for high milk and dairy product intake, respectively, on colon cancer risk was 0.78 (95% CI = 0.67-0.92) and 0.84 (95% CI = 0.75-0.95). Milk intake was unrelated to rectal cancer risk. High calcium intake had a greater protective effect against tumors of the distal colon and rectal cancer vs. proximal colon. The risk reduction associated with calcium was similar for dietary and supplemental sources. Vitamin D was associated with a nonsignificant 6% reduction in CRC risk. Higher consumption of milk/dairy products reduces the risk of colon cancer, and high calcium intake reduces the risk of CRC. Low vitamin D intake in the study populations may limit the ability to detect a protective effect if one exists.

**Rischio di cancro colonrettale e assunzione di calcio, vitamina D e prodotti caseari: una meta analisi di 26,335 casi da 60 studi osservazionali**

In vivo e in studi in vitro suggeriscono che i latticini, calcio e vitamina D inibisce lo sviluppo del cancro del colon-retto (CRC). Una meta-analisi è stata effettuata per valutare questo rapporto in studi osservazionali. Dati da 60 studi epidemiologici iscrivendosi 26.335 casi di CRC, sono stati raccolti utilizzando un metodo generale varianza basata meta-analitica. Riassunto rischio relativo (RR) di stime e intervalli di confidenza al 95% (IC) sono stati calcolati per i più alti rispetto alle categorie più basse di aspirazione. Le analisi di sensibilità testato la solidità di queste misure di effetto sintesi e l'eterogeneità statistica. Il RR di sintesi per il latte e di prodotti di alta assunzione di latte, rispettivamente, sul rischio di cancro del colon è stato 0,78 (IC 95% = 0,67-0,92) e 0,84 (95% CI = 0,75-0,95). Consumo di latte non era correlata al rischio di cancro rettale. Assunzione di calcio ad alto ha avuto un effetto maggiore protezione contro i tumori del colon distale e del cancro rettale vs colon prossimale. La riduzione del rischio associato con il calcio era simile per fonti alimentari e supplementari. La vitamina D è stata associata ad una riduzione non significativa del 6% del rischio di CRC. Maggiore consumo di prodotti lattiero / caseari riduce il rischio di cancro al colon, e alto apporto di calcio riduce il rischio di CRC. Basso apporto di vitamina D nella popolazione di studio può limitare la capacità di rilevare un effetto protettivo, se ne esiste uno.

75: Stajner I.

**Comment on interaction of hormone replacement therapy with calcium and vitamin D supplementation on colorectal cancer risk.**

Int J Cancer. 2009 Apr 1;124(7):1736; author reply 1737-8. PubMed PMID: 19107933.

76: Larsson SC, Bergkvist L, Wolk A.

**Long-term dietary calcium intake and breast cancer risk in a prospective cohort of women.**

Am J Clin Nutr. 2009 Jan;89(1):277-82. Epub 2008 Dec 3. PubMed PMID: 19056569.

**BACKGROUND:** Calcium may potentially influence the risk of breast cancer because of its role in regulating cell proliferation, differentiation, and apoptosis. However, prospective studies of calcium intake in relation to breast cancer incidence are sparse.

**OBJECTIVE:** The objective of this study was to prospectively examine and show the association, if any, of dietary calcium intake with risk of breast cancer by estrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PR) status of the tumor.

**DESIGN:** The Swedish Mammography Cohort is a population-based prospective cohort of 61,433 women who were cancer-free at enrollment in 1987-1990. Dietary calcium intake was assessed with a food-frequency questionnaire at baseline and again in 1997. Cox proportional hazards models were used to estimate rate ratios (RRs) and 95% CIs, adjusted for breast cancer risk factors.

**RESULTS:** During an average of 17.4 y of follow-up, 2,952 incident cases of invasive breast cancer were ascertained. Dietary calcium intake was not associated with risk of overall breast cancer; the multivariate RR for the highest compared with the lowest quintile of calcium intake was 0.97 (95% CI: 0.87, 1.09; P for trend: 0.49). There was a statistically significant inverse trend for ER-negative/PR-negative (ER-/PR-) breast cancer (P for trend: 0.02); the multivariate RR for the comparison of extreme quintiles of calcium intake was 0.66 (95% CI: 0.44, 0.99). Calcium intake was not associated with ER-positive/PR-positive (ER+/PR+) or ER+/PR- tumors.

**CONCLUSIONS:** Our findings do not support an association between dietary calcium intake and overall breast cancer risk. The inverse relation between calcium intake and ER-/PR- breast cancer requires confirmation in other studies.

**Assunzione a lungo termine di calcio e rischio di cancro al seno in una coorte di donne prospettica**

**BACKGROUND:** Il calcio potrebbe potenzialmente influenzare il rischio di cancro al seno a causa del suo ruolo nella regolazione della proliferazione cellulare, differenziamento e apoptosi. Tuttavia, studi prospettici di assunzione di calcio in relazione alla incidenza del cancro al seno sono scarsi.

**OBIETTIVO:** L'obiettivo di questo studio era di esaminare in modo prospettico e mostrare l'associazione, se del caso, di assunzione di calcio nella dieta con il rischio di cancro al seno con recettori per gli estrogeni (ER) e del recettore del progesterone (PR) lo stato del tumore.

**DESIGN:** La svedese Mammografia coorte è una coorte basata sulla popolazione prospettico su 61.433 donne che erano privi di tumore al momento dell'arruolamento nel 1987-1990. Assunzione di calcio alimentare è stata valutata con un questionario alimentare frequenza al basale e di nuovo nel 1997. Modelli di rischio proporzionale di Cox sono stati utilizzati per stimare i rapporti tra rate (RR) e IC al 95%, aggiustato per fattori di rischio di cancro al seno.

**RISULTATI:** Durante una media di 17,4 y del follow-up, 2.952 casi incidenti di carcinoma mammario invasivo sono state accertate. Assunzione di calcio nella dieta non era associato al rischio di cancro al seno globale; il RR multivariato per il più alto in confronto con il più basso quintile di assunzione di calcio è stato 0,97 (95% CI: 0,87, 1,09, P per trend: 0,49). C'è stata una tendenza statisticamente significativa inversa per ER-negativo/PR-negativo (ER-/PR-), il tumore al seno (p per trend: 0,02), il RR multivariato per il confronto dei quintili estremi di assunzione di

calcio è stato 0,66 (IC 95% : 0,44, 0,99). L'apporto di calcio non è stato associato con ER-positive/PR-positive (ER + / PR +) o ER + / PR-tumori.  
CONCLUSIONI: I nostri risultati non supportano un'associazione tra assunzione di calcio nella dieta e nel complesso il rischio di cancro al seno. La relazione inversa tra assunzione di calcio e tumore al seno ER-/PR- richiede la conferma in altri studi.

**Calcium sensing receptor down-regulates malignant cell behavior and promotes chemosensitivity in human breast cancer cells.**

CellCalcium. 2009 Mar;45(3):216-25. Epub 2008 Nov 28. PubMed PMID: 19038444

The function of Ca(2+) and the calcium sensing receptor (CaSR) in breast epithelium and its relationship to mammary carcinogenesis is poorly understood. In this study, we determined the function of this ligand receptor system in regulating the biologic properties of the estrogen receptor-positive MCF-7 and the estrogen receptor-negative MDA-MB-435 human breast cancer cells. Physiologic concentration of extracellular Ca(2+) (by comparison to cells cultured in control low Ca(2+) medium) down-modulated cellular proliferation, cellular invasion and growth in soft agarose in both of these cell lines. Physiologic concentration of extracellular Ca(2+) also down-modulated the expression of the anti-apoptotic protein survivin, survivin gene transcriptional activity, survivin mRNA expression and promoted a cytotoxic response to paclitaxel. These responses to extracellular Ca(2+) were found to require CaSR expression because knocking down CaSR expression in these cells abrogated the cellular responses to extracellular Ca(2+). Each cell line was found to contain small subpopulations that did not express CaSR but expressed a higher level of survivin. These subpopulations were relatively resistant to paclitaxel by comparison to cells that expressed CaSR with a lower level of survivin expression. It is concluded that extracellular Ca(2+) and CaSR may constitute a robust ligand-receptor system in regulating the biologic phenotype of breast epithelial cells and loss of CaSR expression may promote malignancy and resistance to cytotoxic drugs.

**Il recettore sensibile al calcio regola negativamente il comportamento delle cellule maligne e promuove la chemiosensibilità nelle cellule mammarie cancerose umane.**

La funzione di Ca (2 +) e il recettore sensibile al calcio (CaSR) dell'epitelio della mammella e del suo rapporto carcinogenesi mammaria è poco conosciuta. In questo studio, abbiamo determinato la funzione di questo sistema recettoriale ligando nel regolare le proprietà biologiche del recettore-positivo MCF-7 e il recettore per gli estrogeni negativi MDA-MB-435 cellule umane di cancro al seno. Fisiologica concentrazione extracellulare di Ca (2 +) (rispetto alle cellule in coltura in un controllo di basso Ca (2 +) di media), la proliferazione cellulare down-modulati, l'invasione e la crescita cellulare in agarosio morbido in entrambe queste linee cellulari. Fisiologica concentrazione extracellulare di Ca (2 +) anche le modulata l'espressione della survivina proteina anti-apoptotica, gene survivin attività trascrizionale, espressione di survivina mRNA e promosso una risposta citotossica di paclitaxel. Queste risposte a extracellulare Ca (2 +) sono stati trovati a richiedere espressione CaSR perché abbattere CaSR espressione in queste cellule abrogato la risposta cellulare al extracellulare Ca (2 +). Ogni linea cellulare è stata rilevata la presenza di sottopopolazioni di piccole dimensioni che non hanno espresso CaSR ma ha espresso un livello superiore di survivina. Queste sottopopolazioni sono relativamente resistenti al paclitaxel rispetto alle cellule che esprimevano CaSR con un basso livello di espressione di survivina. Si è concluso che Ca extracellulare (2 +) e CaSR può costituire un solido sistema ligando-recettore nella regolazione del fenotipo biologico delle cellule epiteliali mammarie e la perdita di espressione CaSR possono promuovere malignità e la resistenza ai farmaci citotossici.

**Calcium/calmodulin-dependent kinase II regulates notch-1 signaling in prostate cancer cells.**

J Cell Biochem. 2009 Jan;106(1):25-32. PubMed PMID: 19021144.

Notch signaling is associated with prostate osteoblastic bone metastases and calcium/calmodulin-dependent kinase II (CaMKII) is associated with osteoblastogenesis of human mesenchymal stem cells. Here we show that prostate cancer cell lines C4-2B and PC3, both derived from bone metastases and express Notch-1, have all four isoforms of CaMKII (alpha, beta, gamma, delta). In contrast, prostate cancer cell lines LNCaP and DU145, which are not derived from bone metastases and lack the Notch-1 receptor, both lack the alpha isoform of CaMKII. In addition, DU145 cells also lack the beta-isoform. In C4-2B cells, inhibition of CaMKII by KN93 or gamma-secretase by L-685,458 inhibited the formation of the cleaved form of Notch-1 thus inhibiting Notch signaling. KN93 inhibited down stream Notch-1 signaling including Hes-1 gene expression, Hes-1 promoter activity, and c-Myc expression. In addition, both KN93 and L-685,458 inhibited proliferation and Matrigel invasion by C4-2B cells. The activity of gamma-secretase was unaffected by KN93 but markedly inhibited by L-685,458. Inhibition of the expression of alpha, beta, or gamma-isoform by siRNA did not affect Hes-1 gene expression, however when expression of one isoform was inhibited by siRNA, there were compensatory changes in the expression of the other isoforms. Over-expression of CaMKII-alpha increased Hes-1 expression, consistent with Notch-1 signaling being at least partially dependent upon CaMKII. This unique crosstalk between CaMKII and Notch-1 pathways provides new insight into Notch signaling and potentially provides new targets for pharmacotherapeutics.

**La chinasi II dipendente dalla calmodulina /calcio regola il segnale notch-1 nelle cellule cancerose della prostata**

Del segnale di Notch è associata alla prostata con metastasi ossee osteoblastiche e di calcio / calmodulina-dipendente della chinasi II (CaMKII) è associato ad osteoblastogenesis di cellule staminali mesenchimali. Qui ci mostrano che le linee di cellule di cancro alla prostata C4-2B e PC3, entrambi derivati da metastasi ossee e di esprimere Notch-1, hanno tutte e quattro le isoforme di CaMKII (alfa, beta, gamma, delta). Al contrario, il cancro alla prostata linee cellulari LNCaP e DU145, che non sono derivate da metastasi ossee e la mancanza del recettore Notch-1, sia l'isoforma alfa mancanza di CaMKII. Inoltre, le cellule DU145 manca anche la beta-isoforma. Nelle cellule C4-2B, l'inibizione di CaMKII da KN93 o gamma-secretasi da L-685, 458 inibita la formazione della forma spaccati di Notch-1, con conseguente inibizione del segnale di Notch. KN93 inibito a valle Notch-1 segnalamento, comprese Hes-1 l'espressione genica, Hes-1 attività del promotore, e c-Myc espressione. Inoltre, sia KN93 e L-685, 458 hanno inibito la proliferazione e l'invasione da parte delle cellule Matrigel C4-2B. L'attività della gamma-secretasi è stata influenzata dalla KN93 ma marcatamente inibita da L-685, 458. L'inibizione dell'espressione di alfa, beta o gamma-isoforma da siRNA non ha influenzato Hes-1 espressione del gene, tuttavia, quando l'espressione di una isoforma è stata inibita da siRNA, ci sono stati cambiamenti di compensazione nell'espressione delle isoforme di altri. Over-espressione di CaMKII-alfa aumentato Hes-1 espressione, coerente con Notch-1 segnalazione essere almeno in parte dipende CaMKII. Questo crosstalk unica tra CaMKII e Notch-1 consente di conoscere nuove vie di segnalazione in Notch e, potenzialmente, prevede nuovi obiettivi per pharmacotherapeutics.

### **Calcium, calcium-sensing receptor and colon cancer.**

CancerLett. 2009 Mar 8;275(1):9-16. Epub 2008 Aug 23. Review. PubMed PMID: 18725175.

There is much evidence that dietary Ca(2+) loading reduces colon cell proliferation and carcinogenesis in humans and rodents, but during carcinogenesis it becomes ineffective or even tumor-promoting. We are beginning to see how Ca(2+) balances the continuous massive cell production in colon crypts by driving the terminal differentiation and eventually the apoptosis of the cells mainly on the mucosal surface, and how this Ca(2+) control is lost during colon carcinogenesis. The rapid proliferation of the transit-amplifying (TA) progeny of the colon stem cells is driven by the so-called "Wnt" signaling mechanism, which involves the stimulation of proliferogenic genes such as those for c-Myc and cyclin D1 and the silencing of the gene for the cell cycle-stopping p21(Cip1/WAF1) protein by nuclear beta-catenin\*Tcf-4 complexes. TA cells avoid mitotic damage and premature apoptosis by expressing the protein survivin. It appears that TA cell cycling stops and terminal differentiation starts when the cells reach a higher level in the crypt where there is enough luminal Ca(2+) to stimulate the expression and activation of CaSRs (Ca(2+)-sensing receptors), the signals from which stimulate the expression of E-cadherin. Along with this, the APC (adenomatous polyposis coli) protein appears and some of it enters the nucleus. There it makes the TA cells susceptible to the eventual apoptotic balancing by stopping survivin expression and the beta-catenin\*Tcf-4 complex from driving further cell cycling by releasing beta-catenin from the nucleus, and delivering it to cytoplasmic APC\*axin\*GSK-3beta complexes for ultimate proteasomal destruction. Cytoplasmic beta-catenin is then prevented from returning to the nucleus by either being intercepted and destroyed by APC\*axin\*GSK-3beta complexes or locked by the emerging E-cadherin into membrane adherens junctions which tie the cell into the sheet of proliferatively shut-down cells with APC-dependent cytoskeletons moving to the mouth of the crypt and onto the flat mucosal surface. A common first step in sporadic colon carcinogenesis is the loss of functional APC which disorients upwardly directed migration and causes the retention of nuclear beta-catenin and proliferogenic beta-catenin\*Tcf-4 complexes as well as genomic instability. Eventually the balance between cell proliferation and terminal differentiation and death is radically tipped in favour of proliferation by the appearance of apoptosis-resistant, survivin-expressing clones of Ca(2+)-insensitive cells which are locked into the proliferative, mutation-prone mode because of CaSR-disabling gene mutations which prevent the stimulation of E-cadherin expression and terminal differentiation.

### **Calcio, recettore sensibile al calcio e cancro al colon**

Ci sono molte prove che dieta Ca (2 +) di carico riduce la proliferazione delle cellule del colon e cancerogenesi negli esseri umani e roditori, ma durante la cancerogenesi diventa inefficace o addirittura tumori di promozione. Stiamo cominciando a vedere come Ca (2 +) bilancia la produzione continua di cellule massiccia nelle cripte del colon guidando la differenziazione terminale e, infine, l'apoptosi delle cellule principalmente sulla superficie delle mucose, e come questo Ca (2 +) della perdita del controllo durante la carcinogenesi del colon. La rapida proliferazione del transito di amplificazione (TA) progenie di cellule staminali del colon è guidata dal cosiddetto "Wnt" meccanismo di segnalazione, che comporta la stimolazione dei geni proliferogenic come quelli per c-Myc e tacere ciclina D1 e la del gene per l'arresto del ciclo cellulare-p21 (Cip1/WAF1) proteina nucleare di beta-catenina \* TCF-4 complessi. cellule TA evitare danni mitotico e l'apoptosi prematura esprimendo la proteina survivina. Sembra che la cellula smette di ciclismo TA e differenziazione terminale inizia quando le cellule raggiungere un livello superiore nella cripta dove c'è abbastanza luminal Ca (2 +) per stimolare l'espressione e l'attivazione di CaSRs (Ca (2 recettori +)-sensing), i segnali che stimolano l'espressione di E-caderina. Insieme a questo, l'APC (poliposi adenomatosa) proteine appare e alcuni di essi entra nel nucleo. Ci rende le cellule TA suscettibile di bilanciamento eventuale apoptosi mediante l'arresto e

l'espressione survivin \* beta-catenina TCF-4 complesso della patente di guida in bicicletta ulteriormente con il rilascio delle cellule beta-catenina dal nucleo, e la consegna a citoplasmatici APC \* \* Axin GSK -3beta complessi per la massima distruzione proteasoma. beta-catenina citoplasmatica viene quindi impedito di tornare al nucleo da una di essere intercettato e distrutto da APC \* Strutture \* Axin GSK-3beta o bloccati dal emergenti E-caderina in membrana giunzioni aderenti che legano la cella nel foglio di proliferatively shut- le cellule con il citoscheletro APC-dipendenti si spostano alla foce della cripta e sulla superficie della mucosa piatta. Un passo comune, prima nella carcinogenesi del colon sporadica è la perdita di funzionalità di APC, che disorienta la migrazione verso l'alto diretto e provoca il mantenimento del nucleare beta-catenina e proliferogenic \* beta-catenina TCF-4 complessi, nonché l'instabilità genomica. Alla fine l'equilibrio tra proliferazione cellulare e la differenziazione terminale e la morte è radicalmente capovolto a favore della proliferazione dalla comparsa di cloni, survivina che esprimono l'apoptosi-resistente di Ca (2 +) cellule / minuscole che sono bloccati in modalità proliferativa, la mutazione-prone CaSR a causa di mutazioni del gene-invalidanti che impediscono la stimolazione dell'espressione E-caderina e differenziazione terminale.

82: Tucci M, Mosca A, Lamanna G, Poriglia F, Terzolo M, Vana F, Cracco C, Russo L, Gorzegno G, Tampellini M, Torta M, Reimondo G, Poggio M, Scarpa RM, Angeli A, Dogliotti L, Berruti A.

### **Prognostic significance of disordered calcium metabolism in hormone-refractory prostate cancer patients with metastatic bone disease.**

Prostate Cancer Prostatic Dis. 2009;12(1):94-9. Epub 2008 Mar 11. PubMed PMID:18332901.

Bone metabolic disruption that occurs in bone metastatic prostate cancer could lead to disturbances of calcium metabolism. The prognostic role of either hypocalcemia or hypercalcemia was assessed in a consecutive series of hormone-refractory bone metastatic prostate cancer patients. Serum calcium was measured in 192 patients. The presence of hypocalcemia and hypercalcemia was related with baseline biochemical and clinical characteristics and the role of these two calcium disturbances in predicting prognosis and adverse skeletal-related events (SREs) was assessed. As compared to normocalcemic patients, hypocalcemic patients (n=51) had higher tumor load in bone (P=0.005), higher plasma chromogranin A (CgA, P=0.01), serum alkaline phosphatase (P=0.01), urinary N-telopeptide (NTX, P=0.002) and lower hemoglobin values (P=0.01), while hypercalcemic patients (n=16) had higher plasma CgA (P=0.001) and serum lactate dehydrogenase values (P=0.001), higher bone pain (P=0.003) and a lower frequency of pure osteoblastic lesions (P=0.001). Hypercalcemia was significantly associated with poor prognosis: hazard ratio (HR), 1.9 (95% confidence Interval (CI) 1.2-3.3) and higher risk to develop SREs HR, 2.5 (95% CI 1.2-5.2, P=0.01), while hypocalcemia was not associated with poor prognosis. The prognostic role of hypercalcemia was maintained in multivariate analysis after adjusting for validated prognostic parameters: HR, 2.72 (95% CI 1.1-6.8, P=0.03). These data suggest that serum calcium levels should be taken into account in the clinical decision-making process of bone metastatic prostate cancer patients. Patients with asymptomatic hypercalcemia could benefit of a strict follow-up and an immediate bisphosphonate treatment. Further prospective clinical trials are needed to confirm this finding.

### **Significato prognostico dei disordini nel metabolismo del calcio nei pazienti con cancro alla prostata refrattario all'ormone con patologia ossea metastatica**

Perturbazione del metabolismo osseo che si verifica nel carcinoma della prostata metastatico osseo potrebbe portare a disturbi del metabolismo del calcio. Il ruolo prognostico di una ipocalcemia o ipercalcemia è stata valutata in una serie consecutiva di ormone-refrattario pazienti della prostata metastatico cancro osseo. Sierici di calcio è stato misurato in 192 pazienti. La presenza di ipocalcemia e ipercalcemia fu collegato con biochimiche di base e le caratteristiche cliniche e il ruolo di questi due disturbi del calcio nel predire la prognosi e avversi eventi scheletrici correlati (SRE) è stata valutata. Rispetto ai pazienti normocalcemic, i pazienti ipocalcemia (n = 51) era superiore in carico tumorale ossea (p = 0,005), superiore al plasma cromogranina A (CgA, P = 0,01), fosfatasi alcalina sierica (p = 0,01), N-telopeptide urinario (NTX, P = 0,002) i valori di emoglobina e inferiore (P = 0,01), mentre i pazienti ipercalcemia (n = 16) avevano più alti CgA plasmatica (P = 0,001) e valori sierici di lattato deidrogenasi (P = 0,001), dolore osseo più elevata (P = 0,003) ed una frequenza inferiore di puro lesioni osteoblastiche (P = 0,001). L'ipercalcemia è risultata significativamente associata a prognosi infausta: hazard ratio (HR), 1.9 (95% confidence interval (CI) 1,2-3,3) e più alto rischio di sviluppare SRE HR, 2.5 (IC 95% 1,2-5,2, p = 0,01), mentre ipocalcemia non era associata a prognosi infausta. Il ruolo prognostico di ipercalcemia è stato mantenuto in un'analisi multivariata, dopo aggiustamento per convalidato parametri prognostici: HR 2,72 (IC 95% 1,1-6,8, p = 0,03). Questi dati suggeriscono che i livelli sierici di calcio dovrebbero essere presi in considerazione nel processo decisionale clinico dei pazienti della prostata metastatico cancro osseo. I pazienti con ipercalcemia asintomatica possono beneficiare di un rigoroso follow-up e un immediato trattamento con bifosfonati. Ulteriori studi clinici prospettici sono necessari per confermare questa constatazione.

## CONDROITINSOLFATO

1: Campoli M, Ferrone S, Wang X.

### **Functional and clinical relevance of chondroitin sulfate proteoglycan 4.**

Adv Cancer Res. 2010;109:73-121. PubMed PMID: 21070915.

The lack of effective conventional therapies for the treatment of advanced stage melanoma has stimulated interest in the development of novel strategies for the management of patients with malignant melanoma. Among them, immunotherapy has attracted much attention because of the potential role played by immunological events in the clinical course of melanoma. For many years, T cell-based immunotherapy has been emphasized in part because of the disappointing results of the monoclonal antibody (mAb)-based clinical trials conducted in the early 1980s and in part because of the postulated major role played by T cells in tumor growth control. More recently, mAb-based therapies have gained in popularity given their clinical and commercial success for a variety of malignant diseases. As a result, there has been increased interest in identifying and characterizing antibody-defined melanoma antigens. Among them, the chondroitin sulfate proteoglycan 4 (CSPG4), also known as high molecular weight-melanoma associated antigen (HMW-MAA) or melanoma chondroitin sulfate proteoglycan (MCSP), has attracted much attention in recent years because of the growing experimental evidence that it fulfills two requirements for immunotherapy to be therapeutically effective: (1) targeting of cancer stem cells (CSC) and (2) development of combinatorial therapies to counteract the escape mechanisms driven by the genetic instability of tumor cells. With this in mind, in this chapter, we have reviewed recent information related to the distribution of CSPG4 on various types of tumors, including CSC, its expression on pericytes in the tumor microenvironment, its recognition by T cells, its role in cell biology as well as the potential mechanisms underlying the ability of CSPG4-specific immunity to control malignant cell growth.

### **Rilevanza clinica e funzionale di condroitin solfato proteoglicano 4.**

La mancanza di efficaci terapie convenzionali per il trattamento del melanoma in fase avanzata ha stimolato l'interesse nello sviluppo di strategie innovative per la gestione dei pazienti con melanoma maligno. Tra questi, l'immunoterapia ha attirato molta attenzione a causa del potenziale ruolo svolto dagli eventi immunologici nel decorso clinico del melanoma. Per molti anni, l'immunoterapia a base di cellule T è stata sottolineata in parte a causa dei deludenti risultati degli anticorpi monoclonali (mAb) le sperimentazioni cliniche basate condotto nei primi anni 1980 e in parte a causa del ruolo importante svolto postulata da parte delle cellule T tumorali controllo della crescita. Più recentemente, le terapie a base di mAb hanno guadagnato in popolarità dato il loro successo clinico e commerciale per una varietà di malattie maligne. Di conseguenza, vi è stato aumento di interesse per identificare e caratterizzare gli antigeni melanoma anticorpo-definiti. Tra questi, i proteoglicani condroitin solfato 4 (CSPG4), noto anche come antigene alto peso molecolare-melanoma associato (HMW-MAA) o condroitin solfato proteoglicani melanoma (MCSP), ha attirato molta attenzione in questi ultimi anni a causa della crescente evidenza sperimentale che soddisfa due requisiti per l'immunoterapia per essere terapeuticamente efficace: (1) il targeting di cellule staminali tumorali (CSC) e (2) sviluppo di terapie combinatorie per contrastare i meccanismi di fuga guidato da l'instabilità genetica delle cellule tumorali. Con questo in mente, in questo capitolo, abbiamo esaminato le recenti informazioni relative alla distribuzione di CSPG4 su vari tipi di tumori, tra cui CSC, la sua espressione in periciti nel microambiente tumorale, il suo riconoscimento da parte delle cellule T, il suo ruolo nella biologia cellulare come nonché i possibili meccanismi alla base della capacità di immunità CSPG4 specifici per controllare la crescita delle cellule maligne.

3: Kalathas D, Triantaphyllidou IE, Mastronikolis NS, Goumas PD, Papadas TA, Tsiropoulos G, Vynios DH.

**The chondroitin/dermatan sulfate synthesizing and modifying enzymes in laryngeal cancer: expressional and epigenetic studies.**

Head Neck Oncol. 2010 Oct 7;2:27. PubMed PMID: 20929582; PubMed Central PMCID: PMC2958872.

**BACKGROUND:** Significant biochemical changes are observed in glycosaminoglycans in squamous cell laryngeal carcinoma. The most characteristics are in chondroitin/dermatan sulfate fine structure and proportion, which might be due to differential expression of the enzymes involved in their biosynthesis. The aim of the present work was the investigation in expressional and epigenetic level of the enzymes involved in chondroitin/dermatan sulfate biosynthesis in laryngeal cancer.

**METHODS:** Tissues subjected to total RNA and DNA isolation, and protein extraction. The techniques used in this study were RT-PCR analysis, western blotting and methylation specific PCR.

**RESULTS:** We identified that many enzymes were expressed in the cancerous specimens intensively. Dermatan sulfate epimerase was expressed exclusively in the cancerous parts and in minor amounts in healthy tissues; in the macroscopically normal samples it was not detected. Furthermore, chondroitin synthase I and chondroitin polymerizing factor were strongly expressed in the cancerous parts compared to the corresponding normal tissues. Sulfotransferases, like chondroitin 6 sulfotransferase 3, were highly expressed mainly in healthy specimens.

**CONCLUSIONS:** The study of the various chondroitin/dermatan synthesizing enzymes revealed that they were differentially expressed in cancer, in human laryngeal cartilage, leading to specific chondroitin/dermatan structures which contributed to proteoglycan formation with specific features. The expression of the examined enzymes correlated with the glycosaminoglycan profile observed in previous studies.

**Gli enzimi che modificano e sintetizzano il condroitin/dermatan solfato nel cancro alla laringe: studi epigenetici e di espressione**

**BACKGROUND:** cambiamenti biochimici significativi si osservano in glicosaminoglicani nel carcinoma a cellule squamose della laringe. Le più caratteristiche sono di condroitina / dermatansolfato struttura solfato fine e proporzione, che potrebbe essere a causa di espressione differenziale degli enzimi coinvolti nella loro biosintesi. Lo scopo del presente lavoro è stata l'inchiesta di livello espressivo ed epigenetica degli enzimi coinvolti nella condroitina / biosintesi dermatan solfato nel cancro della laringe.

**METODI:** I tessuti sottoposti a RNA totale e l'isolamento del DNA, e l'estrazione di proteine. Le tecniche utilizzate in questo studio sono stati l'analisi RT-PCR, western blotting e PCR metilazione specifici.

**RISULTATI:** Abbiamo identificato che molti enzimi sono stati espressi nei campioni tumorali intensamente. epimerasi Dermatan solfato è stata espressa esclusivamente nelle parti cancerose e in piccole quantità nei tessuti sani; nei campioni macroscopicamente normale non è stata rilevata. Inoltre, la condroitina e la condroitina I sintasi fattore di polimerizzazione erano fortemente espressi nelle parti cancerose rispetto ai corrispondenti tessuti normali. Sulfotransferasi, come la condroitina 6 sulfotransferase 3, sono stati altamente espressa soprattutto negli esemplari sani.

**CONCLUSIONI:** Lo studio della condroitina vari / dermatan enzimi di sintesi è emerso che essi sono differenzialmente espressi nel cancro, nella umana cartilagine della laringe, portando a condroitina specifici / strutture dermatan che ha contribuito alla formazione dei proteoglicani con caratteristiche specifiche. L'espressione degli enzimi esaminati correlata con il profilo di

glicosaminoglicani osservato in studi precedenti.

4: Wang X, Osada T, Wang Y, Yu L, Sakakura K, Katayama A, McCarthy JB, Brufsky A, Chivukula M, Khoury T, Hsu DS, Barry WT, Lyerly HK, Clay TM, Ferrone S.

#### **CSPG4 protein as a new target for the antibody-based immunotherapy of triple-negative breast cancer.**

J Natl Cancer Inst. 2010 Oct 6;102(19):1496-512. Epub 2010 Sep 17. PubMed PMID: 20852124; PubMed Central PMCID: PMC2950168.

**BACKGROUND:** The cell surface proteoglycan, chondroitin sulfate proteoglycan 4 (CSPG4), is a potential target for monoclonal antibody (mAb)-based immunotherapy for many types of cancer. The lack of effective therapy for triple-negative breast cancer (TNBC) prompted us to examine whether CSPG4 is expressed in TNBC and can be targeted with CSPG4-specific mAb.

**METHODS:** CSPG4 protein expression was assessed in 44 primary TNBC lesions, in TNBC cell lines HS578T, MDA-MB-231, MDA-MB-435, and SUM149, and in tumor cells in pleural effusions from 12 metastatic breast cancer patients. The effect of CSPG4-specific mAb 225.28 on growth, adhesion, and migration of TNBC cells was tested in vitro. The ability of mAb 225.28 to induce regression of tumor metastases (n = 7 mice) and to inhibit spontaneous metastasis and tumor recurrence (n = 12 mice per group) was tested in breast cancer models in mice. The mechanisms responsible for the antitumor effect of mAb 225.28 were also investigated in the cell lines and in the mouse models. All statistical tests were two-sided.

**RESULTS:** CSPG4 protein was preferentially expressed in 32 of the 44 (72.7%) primary TNBC lesions tested, in TNBC cell lines, and in tumor cells in pleural effusions from 12 metastatic breast cancer patients. CSPG4-specific mAb 225.28 statistically significantly inhibited growth, adhesion, and migration of TNBC cells in vitro. mAb 225.28 induced 73.1% regression of tumor metastasis in a TNBC cell-derived experimental lung metastasis model (mAb 225.28 vs control, mean area of metastatic nodules = 44590.8 vs 165950.8  $\mu\text{m}^2$ ; difference of mean = 121360.0  $\mu\text{m}^2$ , 95% confidence interval = 91010.7 to 151709.4  $\mu\text{m}^2$ ;  $P < .001$ ). Additionally, mAb 225.28 statistically significantly reduced spontaneous lung metastases and tumor recurrences in an orthotopic xenograft mouse model. The mechanisms responsible for antitumor effect included increased apoptosis and reduced mitotic activity in tumor cells, decreased blood vessel density in the tumor microenvironment, and reduced activation of signaling pathways involved in cell survival, proliferation and metastasis.

**CONCLUSIONS:** This study identified CSPG4 as a new target for TNBC. The antitumor activity of CSPG4-specific mAb was mediated by multiple mechanisms, including the inhibition of signaling pathways crucial for TNBC cell survival, proliferation, and metastasis.

#### **La proteina CSPG4 come nuovo target per la immunoterapia anticorpale del cancro mammario triplo-negativo.**

**BACKGROUND:** La proteoglicani della superficie cellulare, proteoglicani condroitin solfato 4 (CSPG4), è un potenziale bersaglio per gli anticorpi monoclonali (mAb) immunoterapia a base per molti tipi di cancro. La mancanza di una terapia efficace per il carcinoma mammario triplo-negativi (TNBC) ci hanno spinto ad esaminare se CSPG4 è espressa in TNBC e può essere mirata con mAb CSPG4-specific.

**METODI:** CSPG4 l'espressione della proteina è stata valutata in 44 lesioni primarie TNBC, in linee cellulari TNBC Hs578T, MDA-MB-231, MDA-MB-435, e SUM149, e in cellule tumorali in versamenti pleurici da 12 pazienti con carcinoma mammario metastatico. L'effetto di mAb CSPG4 specifici 225,28 sulla crescita, l'adesione e la migrazione delle cellule TNBC è stato testato in vitro. La capacità di mAb 225,28 per indurre la regressione delle metastasi del tumore (n = 7 topi) e di inibire le metastasi spontanea e recidiva (n = 12 topi per gruppo) è stato sperimentato in modelli di

tumore al seno nei topi. I meccanismi responsabili dell'effetto antitumorale di mAb 225,28 sono stati indagati anche in linee cellulari e in modelli murini. Tutti i test statistici sono stati due lati.

**RISULTATI:** proteina CSPG4 era preferenzialmente espresso in 32 dei 44 (72,7%) le lesioni primarie TNBC testato, in linee cellulari TNBC, e in cellule tumorali in versamenti pleurici da 12 pazienti con carcinoma mammario metastatico. MAb CSPG4 specifici 225,28 in maniera statisticamente significativa inibito la crescita, l'adesione e la migrazione delle cellule TNBC in vitro. mAb 225,28 regressione indotta 73,1% di metastasi del tumore in una cella di derivazione del modello sperimentale di metastasi polmonari TNBC (mAb controllo vs 225,28, area media dei noduli metastatici = 44.590,8 165.950,8 vs micron (2); differenza della media = 121.360,0 micron (2), 95 % intervallo di confidenza = 91.010,7-151.709,4 micron (2),  $P < .001$ ). Inoltre, mAb 225,28 metastasi polmonare statisticamente significativa riduzione spontanea e recidive del tumore in un modello ortotopico mouse xenotrapianto. I meccanismi responsabili per effetto antitumorale includevano aumento di apoptosi e la ridotta attività mitotica nelle cellule tumorali, riduzione della densità vaso sanguigno nel microambiente tumorale, e la ridotta attivazione di vie di segnalazione coinvolte nella sopravvivenza cellulare, la proliferazione e le metastasi.

**CONCLUSIONI:** Questo studio ha identificato CSPG4 come un nuovo bersaglio per TNBC. L'attività antitumorale di mAb CSPG4-specifica è stata mediata da meccanismi multipli, incluso l'inibizione del pathway di segnale fondamentale per la sopravvivenza delle cellule TNBC, la proliferazione e le metastasi.

5: Theocharis AD, Skandalis SS, Tzanakakis GN, Karamanos NK.

**Proteoglycans in health and disease: novel roles for proteoglycans in malignancy and their pharmacological targeting.**

FEBS J. 2010 Oct;277(19):3904-23. doi:10.1111/j.1742-4658.2010.07800.x. Epub 2010 Aug 31. Review. PubMed PMID:20840587.

The expression of proteoglycans (PGs), essential macromolecules of the tumor microenvironment, is markedly altered during malignant transformation and tumor progression. Synthesis of stromal PGs is affected by factors secreted by cancer cells and the unique tumor-modified extracellular matrix may either facilitate or counteract the growth of solid tumors. The emerging theme is that this dual activity has intrinsic tissue specificity. Matrix-accumulated PGs, such as versican, perlecan and small leucine-rich PGs, affect cancer cell signaling, growth and survival, cell adhesion, migration and angiogenesis. Furthermore, expression of cell-surface-associated PGs, such as syndecans and glypicans, is also modulated in both tumor and stromal cells. Cell-surface-associated PGs bind various factors that are involved in cell signaling, thereby affecting cell proliferation, adhesion and motility. An important mechanism of action is offered by a proteolytic processing of cell-surface PGs known as ectodomain shedding of syndecans; this facilitates cancer and endothelial cell motility, protects matrix proteases and provides a chemotactic gradient of mitogens. However, syndecans on stromal cells may be important for stromal cell/cancer cell interplay and may promote stromal cell proliferation, migration and angiogenesis. Finally, abnormal PG expression in cancer and stromal cells may serve as a biomarker for tumor progression and patient survival. Enhanced understanding of the regulation of PG metabolism and the involvement of PGs in cancer may offer a novel approach to cancer therapy by targeting the tumor microenvironment. In this minireview, the implication of PGs in cancer development and progression, as well as their pharmacological targeting in malignancy, are presented and discussed.

**Proteoglicani in individui sani e malati: nuovi ruoli per proteoglicani nei tumori e obiettivi farmacologici**

L'espressione di proteoglicani (PG), macromolecole essenziali del microambiente tumorale, è notevolmente alterato durante la trasformazione neoplastica e nella progressione tumorale. Sintesi di PG stromale è influenzata da fattori secreti dalle cellule cancerose e il tumore unico modificati matrice extracellulare può sia favorire o contrastare la crescita dei tumori solidi. Il tema che emerge è che questa attività è duplice specificità intrinseca dei tessuti. Matrix-PG accumulato, come versican, perlecan PG e piccoli ricchi di leucina, incidono cellula tumorale di segnalazione, di crescita e la sopravvivenza, adesione cellulare, la migrazione e l'angiogenesi. Inoltre, l'espressione di PG della cellula-superficie-associati, come syndecans e glypicans, è anche modulata in entrambi i tumori e cellule stromali. Cell-superficie associati fattori si legano i vari PG che sono coinvolte nella segnalazione cellulare, compromettendone la proliferazione cellulare, l'adesione e la motilità. Un importante meccanismo di azione è offerto da un processo proteolitico di PG della superficie cellulare conosciuto come ectodomain spargimento di syndecans, e agevola il cancro e la motilità delle cellule endoteliali, protegge proteasi della matrice e fornisce un gradiente chemiotattico di mitogeni. Tuttavia, syndecans sulle cellule stromali possono essere importanti per cellule stromali / interazione cellula del cancro e può favorire la proliferazione delle cellule stromali, la migrazione e l'angiogenesi. Infine, espressione PG anormale nel cancro e le cellule stromali possono servire come biomarcatori per la progressione del tumore e la sopravvivenza del paziente. Una migliore comprensione della regolazione del metabolismo del PG e il coinvolgimento di PG in cancro può offrire un nuovo approccio alla terapia del cancro di mira il microambiente tumorale. In questa minireview, l'implicazione di PG nello sviluppo del cancro e nella progressione, così come la loro farmacologica mira a malignità, sono presentati e discussi.

7: Klüppel M.

**The roles of chondroitin-4-sulfotransferase-1 in development and disease.**

Prog Mol Biol Transl Sci. 2010;93:113-32. Review. PubMed PMID: 20807643.

The glycosaminoglycan chondroitin sulfate (CS) consists of long linear chains of repeating disaccharide units, which are covalently attached to core proteins to form CS-proteoglycans. These molecules have been shown to fulfill important biological functions in development, disease, and signaling. Biosynthesis of CS takes place in the Golgi apparatus. Concomitant to chondroitin chain elongation, sulfation of specific carbon residues by chondroitin sulfotransferase enzymes takes place. The sulfation balance and pattern of CS on specific carbon residues are tightly regulated during development, injury, and disease, with the temporal and spatial expression of chondroitin sulfotransferase genes believed to be a crucial determinant of this fine balance of chondroitin sulfation. Chondroitin-4-sulfotransferase-1 (C4ST-1)/carbohydrate sulfotransferase 11 (CHST11) is one of the enzymes involved in the sulfation of chondroitin by catalyzing the transfer of sulfate groups from a sulfate donor to the carbon-4 position of the N-acetylgalactosamine sugar of the repeating disaccharide units. Here, I summarize the significant recent advances in our understanding of the roles of C4ST-1 in vertebrate development, disease, and signaling pathways, and the transcriptional regulation of the C4ST-1 gene. Proper 4-sulfation of chondroitin by C4ST-1 plays a crucial role in the skeletal development and signaling events, and new evidence is suggestive of a potential role for C4ST-1 in human disease, including cancer.

**Il ruolo di condroitin-4-sulfotransferasi-1 nello sviluppo di patologie**

Il solfato di condroitina glicosaminoglicani (CS) è costituito da lunghe catene lineari di unità disaccaride ripetere, che sono covalentemente alle proteine di base per formare CS-proteoglicani. Queste molecole hanno dimostrato di assolvere importanti funzioni biologiche per lo sviluppo, la malattia, e la segnalazione. Biosintesi di CS si svolge nel Golgi. Concomitante di condroitina allungamento della catena, la solfatazione dei residui di carbonio da parte di enzimi specifici sulfotransferase condroitina avviene. Il saldo solfatazione e la struttura del CS sui residui di carbonio specifici sono strettamente regolati durante lo sviluppo, lesioni e malattie, con l'espressione temporale e spaziale dei geni sulfotransferase condroitina creduto di essere una determinante cruciale di questo delicato equilibrio di solfatazione condroitina. Condroitina-4-sulfotransferase-1 (C4ST-1) / carboidrati sulfotransferase 11 (CHST11) è uno degli enzimi coinvolti nella solfatazione di condroitina catalizzando il trasferimento di gruppi solfato da un donatore di solfato alla posizione di carbonio-4 del N -acetilgalattosammina zucchero delle unità disaccaride ripetuto. Ecco, io riassumere i significativi progressi recenti nella nostra comprensione dei ruoli delle C4ST-1 nello sviluppo dei vertebrati, le malattie e vie di segnalazione, e la regolazione trascrizionale del gene-1 C4ST. Corretto 4-solfatazione di condroitina da C4ST-1 svolge un ruolo cruciale nello sviluppo dello scheletro e gli eventi di segnalazione, e nuovi elementi di prova è indicativo di un potenziale ruolo per C4ST-1 in malattie umane, incluso il cancro.

16: Bagari R, Bansal D, Gulbake A, Jain A, Soni V, Jain SK.

**Chondroitin sulphate functionalized liposomes for solid tumor targeting.**

J Drug Target. 2010 Jun 14.[Epub ahead of print] PubMed PMID: 20545459.

The present investigation was aimed to develop and explore the use of chondroitin sulfate-coupled liposomes (CS-LP) for solid tumor targeting. The liposomes were prepared by cast film method and coupled with chondroitin sulfate. The coupling was confirmed by infrared spectroscopy. They were further characterized for various parameters such as vesicle shape and surface morphology, size and size distribution, zeta potential, entrapment efficiency, and in vitro release pattern. The vesicle size of the uncoupled liposome (256nm) was found to be less than that of CS-LP (310nm). In vitro drug release exhibited a release of 44.2% from uncoupled liposomal formulation, compared to 38.3% as observed in coupled formulation at the end of 24hr. The uptake of the CS-LP and uncoupled liposomes by MDA-MB-231 breast cancer cell lines was visualized using fluorescence microscopy that revealed the dependence of liposomes recognition and higher uptake on the coupling of chondroitin sulfate. Coupling of the liposomes significantly enhanced the tumor uptake of drug, which is reflected in the recovery of a higher percentage of the dose from tumor following administration of CS-LP in comparison to uncoupled liposomes or free drug, suggesting that they can be used as vectors for solid tumor targeting.

**Liposomi funzionalizzati dal condroitin solfato come target nei tumori solidi**

Il presente studio è stato mirato a sviluppare ed esplorare l'uso di condroitina solfato-liposomi accoppiata (CS-LP), per tumori solidi targeting. I liposomi sono stati preparati con il metodo cast del film e accoppiati con solfato di condroitina. L'accoppiamento è stato confermato con la spettroscopia a infrarossi. Essi sono stati ulteriormente caratterizzati per diversi parametri come la forma delle vescicole e la morfologia di superficie, dimensione e distribuzione delle dimensioni, il potenziale zeta, efficienza intrappolamento, e nel modello in vitro di rilascio. La dimensione della vescicola sganciato liposomi (256 nm) è risultato inferiore a quello del CS-LP (310 nm). In vitro il rilascio di farmaci hanno mostrato una versione di 44,2% da sganciato formulazione liposomiale, rispetto al 38,3% come rilevato nella formulazione accoppiato alla fine di 24 ore. La captazione del CS-LP e sganciato da liposomi MDA-MB-231 linee di cancro al seno cellule è stata visualizzata usando la microscopia a fluorescenza che ha rivelato la dipendenza del riconoscimento liposomi e più alto assorbimento sull'accoppiamento di solfato di condroitina. Accoppiamento dei liposomi significativamente migliorato la diffusione del tumore di droga, che si riflette nel recupero di una percentuale più elevata della dose da tumore in seguito alla somministrazione di CS-LP in confronto al liposomi sganciato o droga libera, suggerendo che essi possono essere utilizzati come vettori per tumore solido targeting.

17: Park W, Park SJ, Na K.

**Potential of self-organizing nanogel with acetylated chondroitin sulfate as an anti-cancer drug carrier.**

Colloids Surf BBiointerfaces. 2010 Sep 1;79(2):501-8. Epub 2010 Jun 11. PubMed PMID: 20541919.

In order to obtain feasibility data regarding the possibility of using chondroitin sulfate (CS) in an anti-cancer drug delivery system, CS was chemically modified by a one-step process with acetic anhydride. Although 3 samples with different degrees of acetylation were synthesized, only the sample with the highest degree of acetylation (AC-CS3) was tested as a nanogel because the others (AC-CS1 and 2) dissolved in distilled water (DW) in the test range (1-10 mg/ml). The AC-CS3 nanogel was characterized by fluorescence probe and dynamic light scattering (DLS) techniques. Its critical aggregation concentration (CAC) was  $<2.0 \times 10^{-2}$  mg/ml at 25 degrees C. The partition equilibrium constant,  $K(v)$ , of the nanogel ( $7.88 \times 10^5$ ) was similar to that of polymeric micelles, which means that the acetyl group may act as a hydrophobic core controlling pharmacokinetic behavior. The higher surface charge value in the nanogel, above -40 due to carboxyl and sulfate groups in CS, explains its good stability. The anticancer drug doxorubicin (DOX) loading efficiency of the AC-CS3 nanogel was also superior, at above 90%. Changes in the size of the polydispersion index (PDI) of nanogels loaded with DOX over a 3-week period were negligible. The nanogels interacted with HeLa cells and were internalized together with the entrapped drug within the cytoplasm, probably via an endocytic mechanism exploited by sugar receptors. Based on these results, the AC-CS3 nanogel is expected to prove useful as an anti-cancer drug carrier for chemotherapy.

**Possibilità del nanogel con condroitinsolfato acetilato come un farmaco anti-cancro.**

Al fine di ottenere i dati di fattibilità riguardante la possibilità di utilizzare condroitin solfato (CS) in un sistema di consegna anti-cancro droga, CS è stato modificato chimicamente da un processo in un'unica fase con l'anidride acetica. Sebbene 3 campioni con diversi gradi di acetilazione sono stati sintetizzati, solo il campione con il più alto grado di acetilazione (AC-CS3) è stato testato come Nanogel perché gli altri (AC-CS1 e 2) disciolto in acqua distillata (DW) nel test intervallo (1-10 mg / ml). Il Nanogel AC-CS3 è stato caratterizzato da sonda a fluorescenza e dinamico scattering di luce (DLS) tecniche. La sua concentrazione critica di aggregazione (CAC) è stata  $<2,0 \times 10^{-2}$  mg / ml a 25 ° C. L'equilibrio di ripartizione costante  $K(v)$ , del Nanogel ( $7,88 \times 10^5$ ) era simile a quella di micelle polimeriche, il che significa che il gruppo acetile può agire come un nucleo idrofobo controllo del comportamento farmacocinetico. Più alto è il valore di carica di superficie nella Nanogel, soprattutto - a causa di carbossile e il solfato di gruppi in CS 40, spiega la sua buona stabilità. Il farmaco antitumorale doxorubicina (DOX) efficienza di carico del Nanogel AC-CS3 era anche superiore, pari o superiore al 90%. Cambiamenti nella dimensione dell'indice polydispersion (PDI) di nanogels caricato con DOX in un periodo di 3 settimane sono state trascurabili. Il nanogels interagito con le cellule HeLa e sono stati interiorizzati insieme con il farmaco intrappolato all'interno del citoplasma, probabilmente attraverso un meccanismo di endocitosi sfruttata dai recettori zucchero. Sulla base di questi risultati, la Nanogel AC-CS3 è prevista per dimostrarsi utile come vettore di farmaco anti-cancro per la chemioterapia.

21: Wang X, Wang Y, Yu L, Sakakura K, Visus C, Schwab JH, Ferrone CR, Favoino E, Koya Y, Campoli MR, McCarthy JB, DeLeo AB, Ferrone S.

**CSPG4 in cancer: multiple roles.**

Curr Mol Med. 2010 Jun;10(4):419-29. Review. PubMed PMID: 20455858.

Chondroitin sulfate proteoglycan 4 (CSPG4), also known as High Molecular Weight-Melanoma Associated Antigen, is a cell surface proteoglycan which has been recently shown to be expressed not only by melanoma cells, but also by various types of human carcinoma and sarcoma. Furthermore, at least in squamous cell carcinoma of head and neck and in basal breast carcinoma, CSPG4 is expressed by cancer stem cells. CSPG4 plays an important role in tumor cell growth and survival. These CSPG4-associated functional properties of tumor cells are inhibited by CSPG4-specific monoclonal antibodies (mAb) in vitro. Moreover, CSPG4-specific mAb can also inhibit tumor growth and metastasis in vivo. The anti-tumor effects of CSPG4-specific mAb are likely to reflect the blocking of important migratory, mitogenic and survival signaling pathways in tumor cells. These results indicate that CSPG4 is a promising new target to implement mAb-based immunotherapy of various types of cancer.

**CSPG4 nel cancro: ruoli molteplici.**

Proteoglicani condroitin solfato 4 (CSPG4), noto anche come High Molecular Weight-associated Antigen Melanoma, è uno dei proteoglicani della superficie cellulare che è stato recentemente dimostrato di essere espressa non solo da cellule di melanoma, ma anche da vari tipi di carcinoma e sarcoma umano. Inoltre, almeno nel carcinoma a cellule squamose della testa e del collo e nel carcinoma mammario basale, CSPG4 è espressa da cellule staminali tumorali. CSPG4 svolge un ruolo importante nella crescita delle cellule tumorali e sopravvivenza. Queste proprietà CSPG4-funzionale associata delle cellule tumorali sono inibiti dagli anticorpi monoclonali specifici per CSPG4 (mAb) in vitro. Inoltre, mAb CSPG4-specifica può anche inibire la crescita tumorale e metastasi in vivo. Gli effetti anti-tumorali di mAb CSPG4 specifici probabile che riflettano il blocco di importanti vie migratorie, mitogeni e la sopravvivenza di segnalazione nelle cellule tumorali. Questi risultati indicano che CSPG4 è un bersaglio promettente per implementare mAb immunoterapia a base di vari tipi di cancro.

28: Fernandez SV, Snider KE, Wu YZ, Russo IH, Plass C, Russo J.

**DNA methylation changes in a human cell model of breast cancer progression.**

Mutat Res. 2010 Jun 1;688(1-2):28-35. Epub 2010 Mar 1. PubMed PMID: 20193695; PubMed Central PMCID:PMC2872054.

Epigenetic inactivation of genes by DNA hypermethylation plays an important role in carcinogenesis. An in vitro model of human breast epithelial cell transformation was used to study epigenetic changes induced by estradiol during the neoplastic process. Different stages of tumor initiation and progression are represented in this model being MCF-10F the normal stage; trMCF cells, the transformed stage; bsMCF cells, the invasive stage and, caMCF cells, the tumor stage. Global methylation studies by restriction landmark genomic scanning (RLGS) showed an increased DNA methylation during the in the invasive and tumor stages. Expression studies showed that NRG1 (neuregulin 1), CSS3 (chondroitin sulfate synthase 3) and SNIP (SNAP-25-interacting protein) were downregulated in the invasive and tumor cells. The transformed cells showed low expression of STXBP6 (amysin) compared to the parental cells MCF-10F. The treatment of these cells with the demethylating agent 5-aza-dC alone or in combination with the histone deacetylase inhibitor trichostatin increased the expression of NRG1, STXBP6, CSS3 and SNIP confirming that DNA methylation plays an important role in the regulation of the expression of these genes. The NRG1 exon 1 has a region located between -136 and +79 (considering +1, the translational initiation site) rich in CpG sites that was analyzed by methylation specific PCR (MSP). NRG1 exon 1 showed progressive changes in the methylation pattern associated with the progression of the neoplastic process in this model; NRG1 exon 1 was unmethylated in MCF-10F and trMCF cells, becoming hypermethylated in the invasive (bsMCF) and tumor (caMCF) stages. Studies of human breast tissue samples showed that NRG1 exon 1 was partially methylated in 14 out of 17 (82.4%) invasive carcinomas although it was unmethylated in normal tissues (8 out of 10 normal breast tissue samples). Furthermore, NRG1 exon 1 was partially methylated in 9 out of 14 (64.3%) morphologically normal tissue samples adjacent to invasive carcinomas.

**La metilazione del DNA cambia in un modello umano con progressione di cancro al seno**

Inattivazione epigenetica di geni da ipermetilazione del DNA gioca un ruolo importante nella carcinogenesi. Un modello in vitro di cellule umane di trasformazione epiteliale della mammella è stato utilizzato per studiare i cambiamenti epigenetici indotti da estradiolo durante il processo neoplastico. Le varie fasi di iniziazione e la progressione tumorale sono rappresentate in questo modello di essere MCF-10F fase normale, le cellule trMCF, la fase di trasformazione; cellule bsMCF, la fase invasiva e, caMCF cellule, lo stadio del tumore. Studi di metilazione globale da punto di riferimento restrizione scansione genomica (RLGS) hanno mostrato un aumentato la metilazione del DNA durante l'nelle fasi invasive e tumore. Studi di espressione hanno mostrato che NRG1 (neuregulina 1), CSS3 (condroitina solfato sintasi 3) e SNIP (proteina SNAP-25-interazione) sono stati inibiti nelle cellule invasive e tumorali. Le cellule trasformate hanno mostrato una bassa espressione di STXBP6 (amysin) rispetto alle cellule parentali MCF-10F. Il trattamento di queste cellule con l'agente demetilante 5-aza-dC da solo o in combinazione con la tricostatina inibitore della istone deacetilasi aumentato l'espressione di NRG1, STXBP6, CSS3 e SNIP confermando che la metilazione del DNA gioca un ruolo importante nella regolazione dell'espressione dei questi geni. L'NRG1 esone 1 è una regione situata tra -136 e 79 (considerando 1, il sito di inizio traslazionale) ricca di CpG siti che è stato analizzato da metilazione specifica PCR (MSP). NRG1 esone 1 ha mostrato progressivi cambiamenti nel modello di metilazione associati con la progressione del processo neoplastico in questo modello; NRG1 esone 1 è stato non metilato in MCF-10F e trMCF cellule, diventando hypermethylated nel invasive (bsMCF) e tumori (caMCF) Ciclo. Studi di campioni di tessuto mammario umano ha dimostrato che NRG1 esone 1 è stato parzialmente

metilato in 14 su 17 (82,4%) carcinomi invasivi anche se è stato non metilato nei tessuti normali (8 su 10 campioni di tessuto mammario normale). Inoltre, NRG1 esone 1 è stato parzialmente metilato in 9 su 14 (64,3%) campioni di tessuto morfologicamente normale adiacente al carcinoma invasivo.

31: Brezillon S, Zeltz C, Schneider L, Terryn C, Vuillermoz B, Ramont L, Perrau C, Pluot M, Diebold MD, Radwanska A, Malicka-Blaszkiewicz M, Maquart FX, Wegrowski Y.

### **Lumican inhibits B16F1 melanoma cell lung metastasis.**

J PhysiolPharmacol. 2009 Oct;60 Suppl 4:15-22. PubMed PMID: 20083847.

**BACKGROUND:** Lumican is a small leucine-rich proteoglycan (SLRP) of the extracellular matrix (ECM) involved in the control of melanoma growth and invasion. The aim of the present study was to analyse the role of lumican in the regulation of the development of lung metastasis.

**METHODS:** B16F1 melanoma cells stably transfected with lumican expressing plasmid (Lum-B16F1) were injected to syngenic mice. The lung metastasis was compared to mice injected with mock-transfected B16F1 cells (Mock-B16F1). The expression of lumican, cyclin D1, apoptotic markers, vascular endothelium growth factor (VEGF) and Von Willebrand Factor (vWF) within lung metastasis nodules was investigated by immunohistochemistry. In parallel, cells cultured in presence of lumican were assayed for apoptosis and motility.

**RESULTS:** We observed that the number and the size of lung metastasis nodules were significantly decreased in mice injected with Lum-B16F1 cells in comparison to Mock-B16F1 cells. This was associated with an increase of tumour cell apoptosis within metastasis nodules but the cell proliferation rate remained constant in the two mice groups. In contrast, the VEGF immunostaining and the number of blood vessels within the lung metastasis nodules were decreased in the lumican-expressing tumours. In vitro, a significant decrease of apoptotic markers in wild type B16F1 cells incubated with increasing amounts of lumican core protein was observed. In addition, pseudotubes formation on Matrigel(R) and the migratory capacity of endothelial cells was inhibited by lumican. Altogether, our results indicate that lumican decreases lung metastasis development not only by inducing tumour cell apoptosis but also by inhibiting angiogenesis.

### **Lumican inibisce metastasi polmonari di cellule di melanoma B16F1.**

**BACKGROUND:** Lumican è un piccolo proteoglicani ricchi di leucina (SLRP) della matrice extracellulare (ECM) coinvolte nel controllo della crescita del melanoma e di invasione. Lo scopo del presente studio è stato quello di analizzare il ruolo delle lumican nella regolazione dello sviluppo di metastasi polmonari.

**METODI:** cellule di melanoma B16F1 trasfettate stabilmente con lumican esprimere plasmide (Lum-B16F1) è stato iniettato ai topi singenici. La metastasi del polmone è stato confrontato con i topi iniettati con le cellule B16F1 mock-trasfettate (Mock-B16F1). L'espressione di lumican, ciclina D1, marcatori di apoptosi, fattore di crescita vascolare endoteliale (VEGF) e di fattore von Willebrand (vWF) all'interno di noduli metastasi polmonare è stata valutata mediante immunostochimica. In parallelo, cellule in coltura in presenza di lumican sono stati analizzati per l'apoptosi e la motilità.

**RISULTATI:** Abbiamo osservato che il numero e le dimensioni dei noduli metastasi polmonari sono risultati significativamente diminuiti nei topi iniettati con le cellule Lum-B16F1 rispetto alle cellule mock-B16F1. Questo è stato associato ad un aumento di apoptosi delle cellule tumorali all'interno di noduli metastasi ma il tasso di proliferazione cellulare è rimasto costante nei due gruppi di topi. Al contrario, il VEGF immunostaining e il numero di vasi sanguigni all'interno dei noduli metastasi del polmone sono diminuiti nei tumori lumican che esprime. In vitro, una riduzione significativa dei marcatori apoptotici in cellule di tipo selvatico B16F1 incubate con quantità crescenti di proteina core lumican è stata osservata. Inoltre, pseudotubes formazione sulla Matrigel (R) e la capacità migratoria delle cellule endoteliali è stata inibita da lumican. Complessivamente, i nostri risultati indicano che lumican diminuisce metastasi al polmone di sviluppo non solo inducendo l'apoptosi delle cellule tumorali, ma anche inibendo l'angiogenesi.

38: Li X, Feng P, Ou J, Luo Z, Dai P, Wei D, Zhang C.

**Dermatopontin is expressed in human liver and is downregulated in hepatocellular carcinoma.**

Biochemistry(Mosc). 2009 Sep;74(9):979-85. PubMed PMID: 19916908.

Dermatopontin (DPT) was recently found as a downstream target of vitamin D receptor, which is a key molecule in the 1,25-dihydroxy-vitamin D(3) anti-hepatoma proliferation pathway. MCTx-1 from *Millepora*, a homolog of DPT, is identified as a cytotoxin towards leukemia cells. The aim of this study was to analyze DPT expression in hepatocellular carcinoma (HCC) based on the analysis for DPT gene in normal tissues in order to estimate its function in the progression of HCC. DPT mRNA expression was analyzed in normal tissues and HCC cell lines by RT-PCR, and in HCC tissue by RT-PCR and real-time PCR. Its protein was examined in HCC tissues by Western blot and immunohistochemistry assays. Meanwhile, transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) that is closely associated with HCC and DPT was observed by immunohistochemistry in HCC tissues. The results showed that DPT mRNA was strongly expressed in human fetal and adult liver, kidney, and spleen, weakly in ovary and heart, and absent in other tissues and HCC cell lines examined. Its mRNA was significantly downregulated in HCC tissues, while its protein was weakly expressed in tumor compared with non-tumor. DPT is located mainly in the cytoplasm of several cell types in the liver; it has been identified also in the extracellular matrix of the skin. TGF-beta1 was observed in extensive tumor tissue of HCC. This fact suggests that DPT can play various roles in different tissues and might be a molecule related to carcinogenesis and the progression of HCC via possible interaction with TGF-beta1 and other potential mechanisms.

**Dermatopontina viene espressa nel fegato e, nel carcinoma epatocellulare, è sottoregolata**

Dermatopontin (DPT) è stato recentemente scoperto come bersaglio a valle del recettore della vitamina D, che è una molecola chiave del 1,25-diidrossi-vitamina D (3) anti-proliferazione epatoma percorso. MCTx-1 dal *Millepora*, un omologo di DPT, è identificata come una citotossina verso le cellule leucemiche. Lo scopo di questo studio era quello di analizzare l'espressione DPT nel carcinoma epatocellulare (HCC) sulla base dell'analisi di DPT gene nei tessuti normali, al fine di valutare la sua funzione nella progressione del carcinoma epatocellulare. DPT espressione di mRNA è stato analizzato nei tessuti normali e le linee di cellule HCC mediante RT-PCR, e nel tessuto HCC mediante RT-PCR e PCR real-time. Le sue proteine è stata esaminata nei tessuti HCC da Western Blot e saggi di immunoistochimica. Nel frattempo, fattore di crescita trasformante-beta1 (TGF-beta1) che è strettamente associata con HCC e DPT è stata osservata mediante immunoistochimica nei tessuti HCC. I risultati hanno mostrato che la DPT mRNA è stata fortemente espressa nel fegato fetale umano e adulti, rene, milza e, debolmente in ovaio e cuore, e assente in altri tessuti e linee cellulari di carcinoma epatocellulare in esame. Il suo mRNA era significativamente inibiti nei tessuti HCC, mentre la sua proteina è stata espressa debolmente nel tumore rispetto ai non-tumorale. DPT si trova principalmente nel citoplasma di diversi tipi di cellule nel fegato, ma è stato identificato anche nella matrice extracellulare della pelle. TGF-beta1 è stata osservata nel tessuto tumorale estensivo di HCC. Questo fatto suggerisce che la DPT può svolgere vari ruoli in diversi tessuti e potrebbe essere una molecola legati alla cancerogenesi e la progressione del carcinoma epatocellulare mediante l'interazione possibile con TGF-beta1 e altri meccanismi di potenziale.

42: Yang J, Price MA, Li GY, Bar-Eli M, Salgia R, Jagedeeswaran R, Carlson JH, Ferrone S, Turley EA, McCarthy JB.

**Melanoma proteoglycan modifies gene expression to stimulate tumor cell motility, growth, and epithelial-to-mesenchymal transition.**

Cancer Res. 2009 Oct 1;69(19):7538-47. Epub 2009 Sep 8. PubMed PMID: 19738072; PubMed Central PMCID: PMC2762355.

Melanoma chondroitin sulfate proteoglycan (MCSP) is a plasma membrane-associated proteoglycan that facilitates the growth, motility, and invasion of tumor cells. MCSP expression in melanoma cells enhances integrin function and constitutive activation of Erk1,2. The current studies were performed to determine the mechanism by which MCSP expression promotes tumor growth and motility. The results show that MCSP expression in radial growth phase, vertical growth phase, or metastatic cell lines causes sustained activation of Erk1,2, enhanced growth, and motility which all require the cytoplasmic domain of the MCSP core protein. MCSP expression in a radial growth phase cell line also promotes an epithelial-to-mesenchymal transition based on changes in cell morphology and the expression of several epithelial-to-mesenchymal transition markers. Finally, MCSP enhances the expression of c-Met and hepatocyte growth factor, and inhibiting c-Met expression or activation limits the increased growth and motility of multiple melanoma cell lines. The studies collectively show the importance of MCSP in promoting progression by an epigenetic mechanism and they indicate that MCSP could be targeted to delay or inhibit tumor progression in patients.

**I proteoglicani del melanoma modificano l'espressione genica per stimolare la motilità cellulare, la crescita, e la transizione da epiteliale a mesenchimale**

Proteoglicani condroitin solfato Melanoma (MCSP) è un proteoglicano plasmatica associata alla membrana che facilita l', la motilità crescita, e l'invasione delle cellule tumorali. MCSP espressione in cellule di melanoma aumenta la funzione delle integrine e l'attivazione costitutiva di ERK1, 2. Gli studi attuali sono stati condotti per determinare il meccanismo mediante il quale espressione MCSP promuove la crescita del tumore e la motilità. I risultati mostrano che l'espressione MCSP in fase di crescita radiale, fase di crescita verticale, o linee di cellule metastatiche cause sostenuto l'attivazione di ERK1, 2, una maggiore crescita, e la motilità che tutti richiedono il dominio citoplasmatico della proteina core MCSP. MCSP espressione in una linea cellulare radiale fase di crescita promuove anche una transizione epiteliale-to-mesenchimali in base ai cambiamenti della morfologia cellulare e l'espressione di alcuni marcatori transizione epitelio-to-mesenchimali. Infine, MCSP aumenta l'espressione del c-Met e del fattore di crescita degli epatociti, e limiti di inibire l'espressione di c-Met attivazione o la crescita e la motilità di più linee cellulari di melanoma. Gli studi mostrano insieme l'importanza di promuovere MCSP in progressione da un meccanismo epigenetico e indicano che MCSP potrebbero essere mirati a ritardare o inibire la progressione del tumore nei pazienti.

45: Zeltz C, Brézillon S, Perreau C, Ramont L, Maquart FX, Wegrowski Y.

**Lumcorin: a leucine-rich repeat 9-derived peptide from human lumican inhibiting melanoma cell migration.**

FEBS Lett. 2009 Sep 17;583(18):3027-32. Epub 2009 Aug 15. PubMed PMID: 19686741.

We previously showed that lumican decreases melanoma progression. The aim of the present study was to determine the active sequence of the lumican core protein responsible for the inhibition of melanoma cell migration. Using different recombinant and synthetic peptides derived from lumican, we localized an active site in the leucine-rich repeat 9 domain of the lumican core protein. We propose the name lumcorin (fragment of lumican core protein) for the active peptide derived from this site. Lumcorin was able to inhibit melanoma cell migration in vitro.

**Lumcorin: un peptide ricco in leucina che deriva dal lumican inibisce la migrazione cellulare nel melanoma**

Abbiamo precedentemente dimostrato che lumican diminuisce la progressione del melanoma. Lo scopo del presente studio era di determinare la sequenza attiva della proteina core lumican responsabile per l'inibizione della migrazione delle cellule di melanoma. Utilizzando diversi peptidi ricombinanti e sintetici derivati dal lumican, abbiamo localizzato un sito attivo nella ricchi di leucina ripetere 9 dominio della proteina core lumican. Proponiamo la lumcorin nome (frammento di proteina del core lumican) per il peptide attivo derivato da questo sito. Lumcorin è stato in grado di inibire la migrazione delle cellule di melanoma in vitro.

48: Sim H, Hu B, Viapiano MS.

**Reduced expression of the hyaluronan and proteoglycan link proteins in malignant gliomas.**

J Biol Chem. 2009 Sep25;284(39):26547-56. Epub 2009 Jul 24. PubMed PMID: 19633295; PubMed CentralPMCID: PMC2785343.

Malignant gliomas have a distinctive ability to infiltrate the brain parenchyma and disrupt the neural extracellular matrix that inhibits motility of axons and normal neural cells. Chondroitin sulfate proteoglycans (CSPGs) are among the major inhibitory components in the neural matrix, but surprisingly, some are up-regulated in gliomas and act as pro-invasive signals. In the normal brain, CSPGs are thought to associate with hyaluronic acid and glycoproteins such as the tenascins and link proteins to form the matrix scaffold. Here, we examined for the first time the expression of link proteins in human brain and malignant gliomas. Our results indicate that HAPLN4 and HAPLN2 are the predominant members of this family in the adult human brain but are strongly reduced in the tumor parenchyma. To test if their absence was related to a pro-invasive gain of function of CSPGs, we expressed HAPLN4 in glioma cells in combination with the CSPG brevican. Surprisingly, HAPLN4 increased glioma cell adhesion and migration and even potentiated the motogenic effect of brevican. Further characterization revealed that HAPLN4 expressed in glioma cells was largely soluble and did not reproduce the strong, hyaluronan-independent association of the native protein to brain subcellular membranes. Taken together, our results suggest that the tumor parenchyma is rich in CSPGs that are not associated to HAPLNs and could instead interact with other extracellular matrix proteins produced by glioma cells. This dissociation may contribute to changes in the matrix scaffold caused by invasive glioma cells.

**Espressione ridotta delle proteine legate ai ialuronani e proteoglicani nei gliomi maligni**

Gliomi maligni hanno una capacità distintiva di infiltrarsi nel parenchima cerebrale e può interferire sulla neurale matrice extracellulare che inibisce la motilità degli assoni e normali cellule neurali. Proteoglicani condroitin solfato (CSPGs) sono tra i principali componenti inibitori nella matrice neurale, ma sorprendentemente, alcuni sono up-regolati in gliomi e agiscono come segnali pro-invasive. Nel cervello normale, CSPGs si pensa ad associare con acido ialuronico e glicoproteine come la tenascins link e le proteine per formare l'impalcatura della matrice. Qui, abbiamo esaminato per la prima volta l'espressione delle proteine link nel cervello umano e gliomi maligni. I nostri risultati indicano che HAPLN4 e HAPLN2 sono i membri di questa famiglia predominante nel cervello umano adulto, ma sono fortemente ridotti nel parenchima del tumore. Per verificare se la loro assenza era legato a un guadagno pro-invasiva della funzione di CSPGs, abbiamo espresso HAPLN4 in cellule di glioma in combinazione con il brevican CSPG. Sorprendentemente, HAPLN4 maggiore adesione delle cellule di glioma e la migrazione e anche potenziato l'effetto di motogenic brevican. Un'ulteriore caratterizzazione è emerso che HAPLN4 espresso in cellule di glioma era in gran parte solubile e non riprodurre il forte, l'associazione acido ialuronico-indipendente della proteina nativa a membrane del cervello subcellulare. Presi insieme, i nostri risultati suggeriscono che il parenchima tumore è ricco di CSPGs che non sono associati a HAPLNs e potrebbe, invece di interagire con altre proteine della matrice extracellulare prodotta dalle cellule del glioma. Questa dissociazione può contribuire ai cambiamenti del patibolo matrice causata da cellule di glioma invasive.

61: Pathak A, Kumar P, Chuttani K, Jain S, Mishra AK, Vyas SP, Gupta KC.

**Gene expression, biodistribution, and pharmacoscintigraphic evaluation of chondroitin sulfate-PEI nanoconstructs mediated tumor gene therapy.**

ACS Nano. 2009 Jun23;3(6):1493-505. PubMed PMID: 19449835.

Tumor-specific gene delivery constitutes a primary challenge in nonviral mediated gene therapy. In this investigation, branched polyethylenimine (bPEI, 25 kDa) was modified by forming nanoconstructs with a natural polysaccharide, chondroitin sulfate (CS), to impart site-specific property. A library of CS-PEI (CP) nanoconstructs was fabricated by altering the content of CS and evaluated in terms of size, surface charge, morphology, pDNA loading efficiency, pDNA release assay, pDNA protection study, cytotoxicity, and transfection efficiency. In vitro transfection efficiency of CP nanoconstructs was examined in HEK293, HEK293T, HepG2, and HeLa cell lines, while their cytotoxicity was investigated in HepG2 and HeLa cells. DNase I protection assay showed that the plasmid was protected from degradation over a period of time. The CP nanoconstructs possess significantly lower toxicity and enhanced transfection efficiency compared to PEI (25 kDa) and commercial transfection reagents (i.e., superfect, fugene, and GenePORTER 2). Further, the CP nanoconstructs were also found to transfect cells in serum-containing medium. In vivo studies were carried out with pDNA loaded CP-3 nanoconstruct after intravenous (iv) injection in Ehrlich ascites tumor (EAT)-bearing mice. The outcome revealed higher concentration of CP-3 nanoconstruct in tumor mass. These findings demonstrate that CP nanoconstructs could be exploited as carriers for nanomedicine for efficient management of solid tumor.

**Espressione genica, biodistribuzione, e valutazione farmacoscintigrafica dei nanostrutti del condroitinsolfato mediati dalla terapia genica tumorale**

Consegna del gene tumore-specifici costituisce una sfida primaria in terapia genica non virale mediata. In questa indagine, polyethylenimine ramificata (bPEI, 25 kDa) è stato modificato formando nanoconstructs con un polisaccaride naturale, condroitinsolfato (CS), per impartire proprietà site-specific. Una libreria di CS-PEI (CP) nanoconstructs è stato realizzato modificando il contenuto di CS e valutati in termini di dimensioni, carica superficiale, morfologia, l'efficienza di carico pDNA, saggio di rilascio pDNA, studio tutela pDNA, la citotossicità e l'efficienza di trasfezione. In termini di efficienza di trasfezione in vitro di CP nanoconstructs è stato esaminato in HEK293, HEK293T, HepG2, e linee cellulari HeLa, mentre la loro citotossicità è stata studiata in cellule HepG2 e HeLa. DNasi I test hanno mostrato che tutela il plasmide è stato protetto dal degrado in un periodo di tempo. Il CP nanoconstructs abbiano una tossicità significativamente più bassi e l'efficienza di trasfezione maggiore rispetto al PEI (25 kDa) e reagenti di trasfezione commerciali (cioè, superfect, Fugene e GenePORTER 2). Inoltre, il CP nanoconstructs sono stati trovati anche a transfect cellule in siero contenente il mezzo. Gli studi in vivo sono stati effettuati con pDNA caricato CP-3 nanoconstruct dopo somministrazione endovenosa (ev) nel tumore ascite Ehrlich (EAT)-cuscinetto topi. Il risultato ha rivelato una maggiore concentrazione di CP-3 nanoconstruct in massa tumorale. Questi risultati dimostrano che la CP nanoconstructs potrebbero essere sfruttati come vettori di nanomedicina per la gestione efficiente dei tumori solidi.

65: Brézillon S, Radwanska A, Zeltz C, Malkowski A, Ploton D, Bobichon H, Perreau C, Malicka-Blaszkiwicz M, Maquart FX, Wegrowski Y.

**Lumican core protein inhibits melanoma cell migration via alterations of focal adhesion complexes.**

Cancer Lett.2009 Sep 28;283(1):92-100. Epub 2009 Apr 24. PubMed PMID: 19394140.

Lumican is a small leucine-rich proteoglycan (SLRP) of the extracellular matrix (ECM) with anti-tumor activity. We recently demonstrated that lumican inhibits the migration of melanoma cells and identified beta1 integrin as mediator of this effect [M.F. D'Onofrio, S. Brézillon, T. Baranek, C. Perreau, P.J. Roughley, F.X. Maquart, Y. Wegrowski, Identification of beta1 integrin as mediator of melanoma cell adhesion to lumican, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 365 (2008) 266-272]. The aim of the present work was to study beta1 integrin, focal adhesion complexes, actin distribution and expression in the presence of lumican substratum in comparison to type I collagen or fibronectin substrata in A375 human melanoma cells. The protein distribution was investigated by immunocytochemistry and confocal microscopy. In parallel, their expression was evaluated by Western immunoblotting and Real-time Reverse Transcription-PCR analyses. The interaction of melanoma cells with the lumican substratum resulted in heterogeneous distribution of beta1 integrin on cell membrane after 24h of seeding. Concomitantly, a reorganization of actin stress fibers and a significant decrease in vinculin immunostaining at focal adhesion complexes were observed. No alteration of the expression was detected at protein and mRNA levels. However, a cytosolic accumulation of vinculin focal adhesion protein was observed on lumican substratum by confocal microscopy. Moreover, vinculin expression was significantly increased in cytosolic fractions in comparison to cells seeded on type I collagen or fibronectin substrata. Our results suggest that lumican induces an alteration of the link between actin filaments and beta1 integrin, characterized by a cytosolic accumulation of vinculin focal adhesion protein, which could lead to a destabilization of focal adhesion complexes. In addition, focal adhesion kinase phosphorylated at tyrosine-397 (pFAK) was significantly decreased. Therefore, the cytoskeleton remodeling and the decreased pFAK phosphorylation induced by lumican in melanoma cells might explain, at least in part, the anti-invasive effect of this SLRP.

**Lumican core protein inibisce la migrazione cellulare nel melanoma tramite l'alterazione dei complessi di adesione focali.**

Lumican è un piccolo proteoglicani ricchi di leucina (SLRP) della matrice extracellulare (ECM) con attività anti-tumorale. Abbiamo recentemente dimostrato che lumican inibisce la migrazione delle cellule di melanoma e ha individuato l'integrina beta1 come mediatore di questo effetto [MF D'Onofrio, S. Brézillon, Baranek T., C. Perreau, Roughley PJ, FX Maquart, Y. Wegrowski, Identificazione di integrina beta1 come mediatore di adesione delle cellule di melanoma lumican, *Biochem. Biophys. Ris. Commun.* 365 (2008) 266-272]. Lo scopo del presente lavoro è stato quello di studiare l'integrina beta1, complessi di adesione focale, la distribuzione di actina e di espressione in presenza di substrato lumican rispetto al collagene di tipo I substrati o fibronectina in cellule di melanoma A375 umane. La distribuzione della proteina è stata valutata mediante immunocitochimica e microscopia confocale. In parallelo, la loro espressione è stata valutata mediante Western immunoblotting e in tempo reale analisi della trascrizione inversa-PCR. L'interazione delle cellule del melanoma con il substrato lumican portato distribuzione eterogenea della beta1 integrina sulla membrana cellulare dopo 24 ore di semina. Al contempo, una riorganizzazione delle fibre di stress di actina e una significativa riduzione del vinculin immunostaining a complessi di adesione focale sono stati osservati. Nessuna alterazione della espressione è stata rilevata a livello della proteina e mRNA. Tuttavia, un accumulo di proteine di

adesione citosolico vinculin focale è stata osservata su un substrato di lumican mediante microscopia confocale. Inoltre, l'espressione vinculin era significativamente aumentata in frazioni citosoliche in confronto cellule seminate su substrati di collagene di tipo I o fibronectina. I nostri risultati suggeriscono che lumican induce un'alterazione del legame tra filamenti di actina e beta1 integrina, caratterizzata da un accumulo di citosolico vinculin proteina di adesione focale, che potrebbe portare ad una destabilizzazione di complessi di adesione focale. Inoltre, l'adesione focale chinasi fosforilate in tirosina-397 (pFAK) era significativamente diminuito. Pertanto, il rimodellamento del citoscheletro e la fosforilazione pFAK diminuito indotta da lumican in cellule di melanoma potrebbe spiegare, almeno in parte, l'effetto anti-invasive di questo SLRP.

74: Bret C, Hose D, Reme T, Sprynski AC, Mahtouk K, Schved JF, Quittet P, Rossi JF, Goldschmidt H, Klein B.

**Expression of genes encoding for proteins involved in heparan sulphate and chondroitin sulphate chain synthesis and modification in normal and malignant plasma cells.**

Br J Haematol. 2009 May;145(3):350-68. Epub 2009 Mar 2. PubMed PMID: 19298595; PubMed Central PMCID: PMC2730414.

Syndecan-1 is a proteoglycan that concentrates heparin-binding factors on the surface of multiple myeloma cells, and probably plays a major role in multiple myeloma biology. As heparan sulphate and chondroitin sulphate are the bioactive components of syndecan-1, we analysed the signature of genes encoding 100 proteins involved in synthesis of these chains, i.e. from precursor uptake to post-translational modifications, using Affymetrix microarrays. The expression of enzymes required for heparan sulphate and chondroitin sulphate biosynthesis was shown to increase in parallel with syndecan-1 expression, throughout the differentiation of memory B cells into plasmablasts and normal bone marrow plasma cells. Sixteen genes were significantly different between normal and malignant plasma cells, nine of these genes -EXT2, CHSY3, CSGALNACT1, HS3ST2, HS2ST1, CHST11, CSGALNACT2, HPSE, SULF2 - encode proteins involved in glycosaminoglycan chain synthesis or modifications. Kaplan-Meier analysis was performed in two independent series of patients: B4GALT7, CSGALNACT1, HS2ST1 were associated with a good prognosis whereas EXT1 was linked to a bad prognosis. This study provides an overall picture of the major genes encoding for proteins involved in heparan sulphate and chondroitin sulphate synthesis and modifications that can be implicated in normal and malignant plasma cells.

**Espressione dei geni che codificano per le proteine coinvolte nella sintesi di eparan solfato e delle catene del condroitin solfato e modificazioni nelle plasmacellule normali e maligne.**

Syndecan-1 è un proteoglicano che concentra i fattori eparina vincolante sulla superficie delle cellule del mieloma multiplo, e probabilmente gioca un ruolo importante nella biologia mieloma multiplo. Come solfato e condroitina solfato eparan sono le componenti bioattivi del Syndecan-1, abbiamo analizzato la firma di geni che codificano 100 proteine coinvolte nella sintesi di queste catene, vale a dire l'assorbimento da precursore a modificazioni post-traduzionali, utilizzando microarray Affymetrix. L'espressione di enzimi necessari per eparan solfato e condroitina solfato biosintesi ha mostrato di aumentare in parallelo con Syndecan-1 espressione, per tutta la differenziazione delle cellule B di memoria in plasmablasts e normali plasmacellule del midollo osseo. Sedici geni erano significativamente differenti tra le plasmacellule normali e neoplastiche, nove di questi, CHSY3, CSGALNACT1, HS3ST2, HS2ST1, CHST11, CSGALNACT2, HPSE, geni EXT2 SULF2 - codificano proteine coinvolte nella catena di sintesi dei glicosaminoglicani o modifiche. L'analisi di Kaplan-Meier è stata effettuata in due serie indipendenti di pazienti: B4GALT7, CSGALNACT1, HS2ST1 sono stati associati con una buona prognosi mentre EXT1 era legato a una cattiva prognosi. Questo studio fornisce un quadro generale dei principali geni che codifica per proteine coinvolte nella eparan solfato e condroitina solfato di sintesi e le modifiche che possono essere implicati in plasmacellule normali e maligni.

75: Basappa, Murugan S, Sugahara KN, Lee CM, ten Dam GB, van Kuppevelt TH, Miyasaka M, Yamada S, Sugahara K.

**Involvement of chondroitin sulfate E in the liver tumor focal formation of murine osteosarcoma cells.**

Glycobiology. 2009Jul;19(7):735-42. Epub 2009 Mar 17. PubMed PMID: 19293233.

Cell surface heparan sulfate plays a critical role in regulating the metastatic behavior of tumor cells, whereas the role of chondroitin sulfate/dermatan sulfate (CS/DS) has been little understood in this context. Here, we characterized CS/DS chains from the murine osteosarcoma cell line LM8G7, which forms tumor nodules in liver. Structural analysis of the CS/DS chains showed a higher proportion of GlcUA beta 1-3GalNAc(4,6-O-disulfate) (E-units) in LM8G7 (12%) than in its parental cell line LM8 (6%), which rarely forms tumors in the liver. Immunostaining with GD3G7, an antibody specific to E-units, confirmed the higher expression of the epitope in LM8G7 than LM8 cells. The tumor focal formation of LM8G7 cells in the liver in mice was effectively inhibited by the preadministration of CS-E (rich in E-unit) or the preincubation of the antibody GD3G7 with the tumor cells. CS-E or GD3G7 inhibited the adhesion of LM8G7 cells to a laminin-coated plate in vitro. In addition, the invasive ability of LM8G7 cells in vitro was also reduced by the addition of CS-E or the antibody. Further, CS-E or the antibody inhibited the proliferation of LM8G7 cells dose dependently. The binding of LM8G7 cells to VEGF in vitro was also significantly reduced by CS-E and GD3G7. Thus, the present study reveals the significance of highly sulfated CS/DS structures in the liver colonization of osteosarcoma cells and also provides a framework for the development of GAG-based anticancer molecules.

**Coinvolgimento del condroitin solfato E nella formazione focale del tumore al fegato nelle cellule di osteosarcoma murine**

Solfato di superficie cellulare eparan svolge un ruolo critico nella regolazione del comportamento metastatico delle cellule tumorali, mentre il ruolo di solfato di condroitina / dermatan solfato (CS / DS) è stata poco compresa in questo contesto. Qui, abbiamo caratterizzato CS / catene DS dalla linea di cellule murine LM8G7 osteosarcoma, che forma noduli tumorali nel fegato. Analisi strutturale del CS / catene DS ha mostrato una più alta proporzione di GlcUA beta 1-3GalNAc (4,6-O-disulfate) (E-unità) in LM8G7 (12%) che nei suoi LM8 parentale linea cellulare (6%), che si forma raramente tumori del fegato. Immunostaining con GD3G7, un anticorpo specifico per E-unità, ha confermato l'espressione più alta della epitopo in LM8G7 di LM8 cellule. La formazione di tumori LM8G7 focale di cellule nel fegato nei topi è stato effettivamente inibito dalla preadministration di CS-E (ricco di E-unitari) o la preincubazione dell'anticorpo GD3G7 con le cellule tumorali. CS-E o GD3G7 inibito l'adesione delle cellule LM8G7 ad una piastra laminina rivestite in vitro. Inoltre, la capacità invasiva di LM8G7 cellule in vitro è stato ridotto con l'aggiunta di CS-E o l'anticorpo. Inoltre, CS-E o l'anticorpo ha inibito la proliferazione delle cellule LM8G7 dose dipendente. Il legame di VEGF LM8G7 cellule in vitro è stata significativamente ridotta del CS-E e GD3G7. Pertanto, il presente studio rivela il significato di solfato altamente CS / strutture DS nella colonizzazione delle cellule del fegato osteosarcoma e fornisce inoltre un quadro per lo sviluppo di molecole antitumorali GAG-based.

77: Teplyuk NM, Haupt LM, Ling L, Dombrowski C, Mun FK, Nathan SS, Lian JB, Stein JL, Stein GS, Cool SM, van Wijnen AJ.

**The osteogenic transcription factor Runx2 regulates components of the fibroblast growth factor/proteoglycan signaling axis in osteoblasts.**

J Cell Biochem. 2009 May 1;107(1):144-54. PubMed PMID: 19259985; PubMed Central PMCID: PMC2918404.

Heparan sulfate proteoglycans cooperate with basic fibroblast growth factor (bFGF/FGF2) signaling to control osteoblast growth and differentiation, as well as metabolic functions of osteoblasts. FGF2 signaling modulates the expression and activity of Runt-related transcription factor 2 (Runx2/Cbfa1), a key regulator of osteoblast proliferation and maturation. Here, we have characterized novel Runx2 target genes in osteoprogenitors under conditions that promote growth arrest while not yet permitting sustained phenotypic maturation. Runx2 enhances expression of genes related to proteoglycan-mediated signaling, including FGF receptors (e.g., FGFR2 and FGFR3) and proteoglycans (e.g., syndecans [Sdc1, Sdc2, Sdc3], glypicans [Gpc1], versican [Vcan]). Runx2 increases expression of the glycosyltransferase Exostosin-1 (Ext1) and heparanase, as well as alters the relative expression of N-linked sulfotransferases (Ndst1 = Ndst2 > Ndst3) and enzymes mediating O-linked sulfation of heparan sulfate (Hs2st > Hs6st) or chondroitin sulfate (Cs4st > Cs6st). Runx2 cooperates with FGF2 to induce expression of Sdc4 and the sulfatase Galns, but Runx2 and FGF2 suppress Gpc6, thus suggesting intricate Runx2 and FGF2 dependent changes in proteoglycan utilization. One functional consequence of Runx2 mediated modulations in proteoglycan-related gene expression is a change in the responsiveness of bone markers to FGF2 stimulation. Runx2 and FGF2 synergistically enhance osteopontin expression (>100 fold), while FGF2 blocks Runx2 induction of alkaline phosphatase. Our data suggest that Runx2 and the FGF/proteoglycan axis may form an extracellular matrix (ECM)-related regulatory feed-back loop that controls osteoblast proliferation and execution of the osteogenic program.

**Il fattore di trascrizione osteogenico Runx2 negli osteoblasti regola i componenti dei fattori di crescita dei fibroblasti/della via di segnale dei proteoglicani**

proteoglicani eparansolfato collaborare con fattore di crescita dei fibroblasti (bFGF/FGF2) di segnalazione per controllare la crescita e la differenziazione degli osteoblasti, così come le funzioni metaboliche di osteoblasti. FGF2 segnalazione modula l'espressione e l'attività del fattore di trascrizione Runt connessi 2 (Runx2/Cbfa1), un regolatore chiave della proliferazione degli osteoblasti e di maturazione. Qui, abbiamo caratterizzato romanzo geni bersaglio Runx2 in osteoprogenitors in condizioni che favoriscano l'arresto della crescita, pur non consentendo ancora sostenuta maturazione fenotipica. Runx2 aumenta l'espressione di geni correlati a proteoglicani-mediata segnalazione, inclusi i recettori FGF (ad esempio, FGFR2 e FGFR3) e proteoglicani (ad esempio, syndecans [sdc1, Sdc2, Sdc3], glypicans [Gpc1], versican [Vcan]). Runx2 espressione aumenta del glicosiltransferasi Exostosin-1 (EXT1) e eparanasi, così altera l'espressione relativa di sulfotransferasi N-linked (Ndst1 = Ndst3 Ndst2>) e gli enzimi di mediazione solfatazione O-linked di eparansolfato (Hs2st> Hs6st) o condroitina solfato (Cs4st> Cs6st). Collabora con Runx2 FGF2 di indurre l'espressione di Sdc4 e la Galns solfatasi, ma Runx2 FGF2 e reprimere Gpc6, suggerendo così Runx2 intricato e FGF2 modifiche dipendenti nell'utilizzo proteoglicani. Una delle conseguenze funzionali di Runx2 modulazioni mediata dell'espressione genica proteoglicani alle voci di un cambiamento nella capacità di risposta dei marcatori ossei alla stimolazione FGF2. Runx2 e FGF2 sinergicamente migliorare l'espressione osteopontina (> 100 volte), mentre l'induzione blocchi FGF2 Runx2 della fosfatasi alcalina. I nostri dati suggeriscono che Runx2 e l'FGF / asse proteoglicani possono formare una matrice extracellulare (ECM) relativi loop di

regolamentazione feed-back che controlla la proliferazione degli osteoblasti e l'esecuzione del programma osteogenico.

82: Ricciardelli C, Sakko AJ, Stahl J, Tilley WD, Marshall VR, Horsfall DJ.

**Prostatic chondroitin sulfate is increased in patients with metastatic disease but does not predict survival outcome.**

Prostate. 2009 May 15;69(7):761-9. PubMed PMID: 19189303.

**BACKGROUND:** Previous studies from our laboratory demonstrated a strong association between an elevated level of chondroitin sulfate (CS) in peritumoral stroma and PSA-relapse in patients with early stage disease. In this study we determined whether CS levels could predict overall survival in men diagnosed with advanced prostate cancer subsequently treated by orchiectomy alone.

**METHODS:** CS was localized in archived prostatic tissues by immunohistochemistry, and the level of CS expression as measured by video image analysis was compared in cohorts of 157 and 60 men with early stage or advanced disease, respectively.

**RESULTS:** The CS levels in the peritumoral stroma of patients without relapse after treatment for early stage disease was significantly reduced compared to levels in prostate tissue from patients who either relapsed ( $P = 0.003$ ) or were diagnosed with advanced prostate cancer ( $P < 0.00001$ ). There was no difference between the median CS level in the peritumoral prostatic stroma of early stage patients that relapsed after treatment and patients diagnosed with advanced prostate cancer. Increased CS levels ( $P < 0.0001$ ) and high Gleason score ( $P < 0.0001$ ) were associated with an increased rate of PSA-relapse in the cohort of patients with early stage disease. However, neither CS level nor Gleason score alone or in combination could predict survival outcome in patients with advanced prostate cancer following androgen deprivation therapy.

**CONCLUSIONS:** Although peritumoral CS levels and Gleason score are strong predictors of relapse-free survival in early stage prostate cancer patients, neither peritumoral CS levels nor Gleason score can predict survival outcome in patients with advanced disease.

**Il condroitin solfato prostatico è aumentato nei pazienti con metastasi ma non è in grado di predire la sopravvivenza**

**BACKGROUND:** Gli studi precedenti dal nostro laboratorio hanno dimostrato una forte associazione tra un elevato livello di condroitin solfato (CS) in stroma peritumorale e PSA-ricidiva nei pazienti con malattia in stadio precoce. In questo studio abbiamo determinato che i livelli di CS potrebbe predire la sopravvivenza generale negli uomini con diagnosi di carcinoma della prostata avanzato successivamente trattati con orchiectomia solo.

**METODI:** CS è stato localizzato in archiviato tessuti prostatici di immunoistochimica, e il livello di espressione CS misurato con l'analisi delle immagini video sono state confrontate in coorti di 157 e 60 uomini con malattia in fase iniziale o avanzata, rispettivamente.

**RISULTATI:** I livelli di CS nello stroma peritumorale di pazienti senza recidive dopo trattamento per la malattia in stadio precoce è stata significativamente ridotta rispetto ai livelli nel tessuto prostatico di pazienti che o recidiva ( $P = 0,003$ ) o sono stati diagnosticati con tumore avanzato della prostata ( $p < 0,00001$ ). Non c'era differenza tra il livello mediano CS nello stroma peritumorale prostatico di pazienti in stadio precoce che recidivato dopo trattamento e pazienti con diagnosi di carcinoma della prostata avanzato. Aumento dei livelli di CS ( $P < 0,0001$ ) e punteggio di Gleason elevato ( $P < 0.0001$ ) erano associati ad un aumentato tasso di PSA-ricaduta nella coorte di pazienti con malattia in stadio precoce. Tuttavia, né il livello né CS Gleason score da solo o in combinazione possono preannunciare l'outcome di sopravvivenza nei pazienti con carcinoma della prostata avanzato dopo la terapia androgeno deprivazione.

**CONCLUSIONI:** Anche se peritumorale livelli di CS e punteggio di Gleason sono forti predittori di sopravvivenza libera da recidiva in pazienti con cancro alla prostata allo stadio iniziale, né i livelli

di peritumorale CS né Gleason score in grado di prevedere esito di sopravvivenza nei pazienti con malattia avanzata.

83: Erfurt C, Müller E, Emmerling S, Klotz C, Hertl M, Schuler G, Schultz ES.

**Melanoma-associated chondroitin sulphate proteoglycan as a new target antigen for CD4+ T cells in melanoma patients.**

Int J Cancer. 2009 May 15;124(10):2341-6.PubMed PMID: 19173283.

Melanoma-associated chondroitin sulfate proteoglycan (MCSP) (also known as high molecular weight-melanoma-associated antigen) represents an interesting target antigen for cancer immunotherapy which is expressed on human melanomas and other tumors such as breast carcinomas, gliomas, neuroblastomas and acute leukemias. MCSP seems to play an important functional role in melanoma as it is involved in tumor cell migration, invasion and angiogenesis. In this study, we isolated CD4(+) T helper cells from the blood of a healthy donor, recognizing a peptide from the MCSP core protein presented by HLA-DBR1\*1101 molecules. T cell reactivity against the identified peptide could be detected in the blood of healthy donors and melanoma patients. MCSP specific T cells from the blood of a patient could be readily expanded by repeated peptide stimulation and recognized MCSP and HLA-DR expressing tumor cells. Our findings suggest that vaccination against MCSP helper T cell epitopes might be a promising approach to fight melanoma.

**I proteoglicani condroitin solfato associate al melanoma come nuovo target antigenico per le cellule CD4+ T nei pazienti con melanoma**

Melanoma-proteoglicani condroitin solfato associato (MCSP) (noto anche come antigene alto peso molecolare-melanoma associate) rappresenta un antigene target interessante per l'immunoterapia del cancro, che si esprime in melanomi umani e altri tumori come il carcinoma del seno, gliomi, neuroblastomi e leucemie acute . MCSP sembra giocare un importante ruolo funzionale nel melanoma in quanto è coinvolto nella migrazione delle cellule tumorali, invasione e l'angiogenesi. In questo studio, abbiamo isolato cellule CD4 (+) le cellule T helper dal sangue di un donatore sano, riconoscendo un peptide della proteina core MCSP presentati da HLA-DBR1 \* 1101 molecole. Reattività delle cellule T contro il peptide identificato potrebbe essere rilevato nel sangue di donatori sani e pazienti affetti da melanoma. MCSP cellule T specifiche dal sangue di un paziente potrebbe essere facilmente ampliato con la stimolazione ripetuta e peptide riconosciuto MCSP e HLA-DR cellule tumorali che esprimono. I nostri risultati suggeriscono che la vaccinazione contro MCSP epitopi delle cellule T helper potrebbe essere un approccio promettente per combattere il melanoma.

87: Kumarasuriyar A, Murali S, Nurcombe V, Cool SM.

**Glycosaminoglycan composition changes with MG-63 osteosarcoma osteogenesis in vitro and induces human mesenchymal stem cell aggregation.**

J Cell Physiol. 2009 Mar;218(3):501-11. PubMedPMID: 18988189.

Osteogenic differentiation is coordinated by the exposure of cells to temporal changes in a combination of growth factors and elements within the extracellular matrix (ECM). Many of the key proteins that drive these changes share the property of being dependent on ECM glycosaminoglycans (GAGs) for their activity. Here, we examined whether GAGs isolated from proliferating, differentiating and mineralizing MG-63 osteosarcoma cells differed in their physical properties, and thus in their capacities to coordinate the osteogenic cascade both in human MG-63 osteosarcoma cells and primary human mesenchymal stem cells (hMSCs). Our results show that the size distribution of GAGs, the expression of GAG-carrying proteoglycan cores and the expression of enzymes involved in their modification systematically change as MG-63 cells mature in culture. When dosed back onto cells exogenously in soluble form, GAGs regulated MG-63 survival and growth in a dose-dependent manner, but not differentiation in either cell type. In contrast, hMSCs aggregated into distinct colonies when grown on GAG-coated substrates, while MG-63 cells did not. Heparin-coated substrates improved hMSC viability without inducing aggregation. These results suggest a complex role for GAGs in coordinating the emergence of the osteoblast phenotype, and provide further evidence for the use of heparans in bone tissue repair applications.

**La composizione dei glicosamminoglicani cambia durante l'osteogenesi nei osteosarcomi MG-63 in vitro e induce l'aggregazione delle cellule staminali mesenchimali umane**

Il differenziamento osteogenico è coordinato dalla esposizione delle cellule ai cambiamenti temporali in una combinazione di fattori di crescita e di elementi all'interno della matrice extracellulare (ECM). Molte delle proteine chiave che guidano queste parti cambia la proprietà di essere dipendente da ECM glicosamminoglicani (GAG) per la loro attività. Qui, abbiamo esaminato se GAG isolato la proliferazione, la differenziazione e rimineralizzante cellule MG-63 osteosarcoma diverse tra loro per caratteristiche fisiche, e quindi nella loro capacità di coordinare la cascata osteogenico tanto sul piano umano MG-63 cellule di osteosarcoma e primaria cellule staminali mesenchimali (hMSCs ). I nostri risultati mostrano che la distribuzione delle dimensioni dei GAG, l'espressione di core proteoglicani GAG-contabile e l'espressione degli enzimi coinvolti nella loro modifica sistematicamente cambiamento come MG-63 cellule mature in coltura. Quando somministrato torna quindi in cellule esogena in forma solubile, GAG regolamentato MG-63 la sopravvivenza e la crescita in modo dose-dipendente, ma non la differenziazione in entrambi i tipi di cellule. Al contrario, hMSCs aggregati in colonie distinte, se coltivate su substrati GAG-rivestito, mentre cellule MG-63 non ha fatto. substrati rivestita di eparina migliorata redditività hMSC senza indurre aggregazione. Questi risultati suggeriscono un ruolo complesso per GAG nel coordinare la comparsa del fenotipo osteoblasti e fornire ulteriori prove per l'utilizzo di heparans nelle applicazioni di riparazione del tessuto osseo.

90: Benassi MS, Pazzaglia L, Chiechi A, Alberghini M, Conti A, Cattaruzza S, Wassermann B, Picci P, Perris R.

### **NG2 expression predicts the metastasis formation in soft-tissue sarcoma patients.**

J Orthop Res. 2009 Jan;27(1):135-40. PubMedPMID: 18634019.

Enhanced expression levels of NG2 proteoglycan in presurgical original lesions of soft-tissue sarcoma (STS) patients defines with 55% probability the immediate (i.e., within 12 months postsurgery) risk in these individuals to develop postsurgical secondary lesions, independently of any other clinical trait. It, therefore, provides a molecular factor that alone prospects a particularly unfavorable clinical outcome in such patients. Evaluation of the timing of metastasis formation in patients with high and low levels of NG2 in their primitive lesions further stratified the patients in subsets with diverse lag phases in the occurrence of metastatic disease. In our cohort of high-grade STS cases, transcription of NG2 also showed a 81-fold amplification in metastatic lesions, when compared to primitive ones, and this gene overexpression was accompanied by an abundant but nonuniform in situ expression of its product. In a similar manner as seen in primitive lesions, patients with higher levels of metastatic NG2 encountered a significantly more dismal clinical course. Multivariate analysis asserted that in these individuals upregulation of NG2 represented an absolute independent prognostic parameter. Therefore, minimally invasive assessment of the transcription levels of the NG2 gene represents a parameter capable of predicting the arising of metastatic disease within a definite postsurgery time interval, and affords in adjunct in the definition of life expectancy in STS patients.

### **L'espressione di NG2 predice la formazione di metastasi nei pazienti con sarcoma dei tessuti molli**

I livelli di espressione di proteoglicani NG2 in prechirurgico lesioni originale di sarcoma dei tessuti molli (STS) definisce i pazienti con il 55% di probabilità l'immediato (cioè entro 12 mesi postsurgery) il rischio in questi soggetti a sviluppare post-chirurgica delle lesioni secondarie, indipendentemente da qualsiasi altra caratteristica clinica . Si prevede pertanto un fattore molecolare che le prospettive di solo un risultato particolarmente sfavorevole clinica in tali pazienti. La valutazione dei tempi di formazione di metastasi in pazienti con livelli alti e bassi di NG2 nel loro lesioni primitive ulteriormente stratificato i pazienti in sottoinsiemi con fasi diverse ritardo nella comparsa della malattia metastatica. Nella nostra coorte di alta qualità casi STS, la trascrizione di NG2 ha anche mostrato un amplificazione di 81 volte nelle lesioni metastatiche, rispetto a quelle primitive, e questo l'iperpressione del gene è stato accompagnato da un abbondante ma non uniforme in situ l'espressione del suo prodotto. In maniera analoga come si è visto nelle lesioni primitive, i pazienti con livelli più elevati di NG2 metastatico riscontrato un corso molto più lugubre clinica. L'analisi multivariata ha affermato che in questi sovraregolazione individui di NG2 rappresentato una assoluta parametro prognostico indipendente. Pertanto, la valutazione minimamente invasiva dei livelli di trascrizione del gene NG2 rappresenta un parametro in grado di prevedere l'insorgere della malattia metastatica in un intervallo di tempo definito postsurgery, e offre in aggiunta alla definizione di aspettativa di vita nei pazienti STS.

## MELATONINA

1: Mao L, Yuan L, Slakey LM, Jones FE, Burow ME, Hill SM.

### **Inhibition of breast cancer cell invasion by melatonin is mediated through regulation of the p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway.**

Breast Cancer Res. 2010 Dec 17; 12(6):R107. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 21167057

**INTRODUCTION:** The pineal gland hormone, melatonin, has been shown by numerous studies to inhibit the proliferation of estrogen receptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ )-positive breast cancer cell lines. Here, we investigated the role of melatonin in the regulation of breast cancer cell invasion.

**METHODS:** Three invasive MCF-7 breast cancer cell clones - MCF-7/6, MCF-7/Her2.1, and MCF-7/CXCR4 cells - were employed in these studies. All three cell lines exhibited elevated phosphorylation of the ERK1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) as determined by Western blot analysis. The effect of melatonin on the invasive potential of these human breast cancer cells was examined by matrigel invasion chamber assays. The expression and proteinase activity of two matrix metalloproteinases (MMPs), MMP-2 and MMP-9, were analyzed by Western blot analysis and gelatin zymography, respectively.

**RESULTS:** Melatonin (10<sup>-9</sup> M) significantly suppressed the invasive potential of MCF-7/6 and MCF-7/Her2.1 cells as measured by matrigel invasion chamber assays, and significantly repressed the proteinase activity of MMP-2 and MMP-9. In MCF-7/CXCR4 cells, melatonin significantly inhibited stromal-derived factor-1 (SDF-1/CXCL12) induced cell invasion and activity of MMP-9. Elevated expression of the MT1 melatonin receptor further enhanced, while luzindole, an MT1/MT2 antagonist, abrogated melatonin's anti-invasive effect, suggesting that melatonin's effect on invasion is mediated, principally, through the MT1 receptor. Furthermore, melatonin repressed the phosphorylation of p38 MAPK in MCF-7/Her2.1 cells and blocked stromal-derived factor-1 (SDF-1) induced p38 phosphorylation in MCF-7/CXCR4 cells. SB230580, a p38 inhibitor, was able to mimic, while transfection of the cells with a constitutively-active MKK6b construct blocked melatonin's effect on cell invasion, suggesting that the anti-invasive action of melatonin is mediated through the p38 pathway.

**CONCLUSIONS:** Melatonin exerts an inhibitory effect on breast cancer cell invasion through down-regulation of the p38 pathway, and inhibition of MMP-2 and MMP-9 expression and activity.

### **L'inibizione dell'invasione cellulare del carcinoma alla mammella da parte della melatonina è mediata dalla regolazione della proteina chinasi via di segnale mitogeno-attivata P38.**

Introduzione: La melatonina, ormone secreto della ghiandola pineale, secondo i risultati di numerosi studi, inibisce la proliferazione del recettore dell'estrogeno  $\alpha$ (ER $\alpha$ ) positivo nelle linee cellulari del carcinoma al seno. Noi abbiamo studiato il ruolo della melatonina nella regolazione dell'invasione cellulare del carcinoma al seno.

METODI: In questi studi sono stati utilizzati tre cloni cellulari del carcinoma al seno invasivo MCF-7: le cellule MCF-7/6, MCF-7/Her2. 1 e MCF-7/CXCR4. Tutte le tre linee cellulari hanno inibito l'elevata fosforilazione della proteina chinasi (MARK) mitogeno attivata ERK1/2 e p38 come constatato dalla tecnica di immunorivelazione (Western blot). L'effetto della melatonina sul potenziale invasivo di queste cellule tumorali della mammella è stato esaminato nel corso degli esperimenti sul protocollo di analisi "Matrigel Invasion Chamber".

L'espressione e l'attività della proteinase di due matrici metalloproteinase (MMPs), MMP-2 e MMP-9, sono state analizzate rispettivamente con la tecnica di immunorivelazione (Western blot) e zimografia di gelatina.

**RISULTATI:** la melatonina ( $10^{-9}$  M) ha soppresso in modo significativo il potenziale invasivo delle cellule MCF-7/6 e MCF-7/Her2.1 come dimostrato dal protocollo di analisi “Matrigel Invasion Chamber” ed ha inoltre represso l’attività proteinasica del MMP-2 e MMP-9. Nelle cellule MCF-7/CXCR4, la melatonina ha significativamente inibito il fattore-1 di derivazione stromale (SDF-1/CXCL12) indotto, l’invasione cellulare e l’attività del MMP9. L’elevata espressione del recettore della melatonina MT1 ha ulteriormente aumentato l’effetto anti-invasivo della stessa, laddove il Luzindolo, un antagonista della MT1/MTI ha annullato l’effetto anti-invasivo della melatonina, suggerendo perciò che l’effetto della melatonina sul processo di invasione tumorale sia mediato principalmente dal recettore MT1. Inoltre, la melatonina reprime la fosforilazione di p38 MARK nelle cellule MCF-7/Her2.1 e blocca la fosforilazione del fattore-1 di derivazione stromale (SDF-1) indotto p38 nelle cellule MCF-7/CXCR4. SB230580, un inibitore di p38, è riuscito ad imitare l’effetto della melatonina, laddove la trasfezione delle cellule con un costrutto MKK6b essenzialmente attivo ha invece bloccato gli effetti della melatonina nell’invasione cellulare suggerendo che l’azione anti-invasiva della melatonina sia mediata dalla via di p38.

**CONCLUSIONI:** la melatonina esercita un effetto inibitorio sull’invasione cellulare del carcinoma al seno attraverso la down-regulation della via di segnale di p38, e l’inibizione dell’espressione e dell’attività di MMP-2 e MMP-9

2: Deriabina ON, Plotnikova NA, Anisimov VN.

**[Melatonin and metformin inhibit skin carcinogenesis induced by benz(a)pyrene in mice].**

[Article in Russian]

Vopr Onkol.2010;56(5):583-7. Russian. PubMed PMID: 21137239.

One hundred and twenty SHR male mice were randomly divided into 4 groups. Their clean-shaven backs were painted with 0.2 ml of 0.05% acetone solution of benz(a)pyrene (BP) twice a week. Group 1 was in control and received no additional treatment. From beginning to end (6 months), the remaining mice received melatonin 2 mg/l with drinking water at nighttime (group 2), metformin 200 mg/l with drinking water during 24 hrs (group 3), melatonin and metformin as in groups 2 and 3 (group 4). There was a separate group of intact animals. Skin tumor frequency decreased: among melatonin/metformin-treated mice (groups 1-4) - 83.3%, 66.7%, 60% and 50%; squamous cell carcinoma - 56.73%, 36.7%, 20% and 20%. Treatment with melatonin and metformin and their combinations was followed by significantly lower tumor multiplicity and smaller size, longer latency period and survival of tumor-bearers. After BP, levels of malonic dialdehyde (MDA) and catalase rose in blood serum while concentrations of the latter in skin tumors were higher than in cutaneous homogenates in intact animals. Melatonin and metformin significantly lowered MDA content of blood serum as compared with group 1. Blood serum catalase fell after their joint administration whereas it was 2.6 times as high in cutaneous homogenates after metformin. However, it decreased after melatonin.

**La melatonina e la metformina inibiscono il carcinoma della pelle indotto dal benzopirene, nelle sperimentazioni su topi.**

Centoventi topi maschi SHR (Spontaneously Hypertensive Rat = ratto spontaneamente iperteso) sono stati divisi a caso in 4 gruppi. I loro didietro previa pulitura e rasatura sono stati colorati con 0.2 ml di soluzione acetonica di benzoapirene (BP) al 0,05% due volte a settimana. Il gruppo 1 era monitorato e non ha ricevuto altri trattamenti. Dall'inizio alla fine dell'esperimento (per sei mesi), ai rimanenti topi sono stati dati la notte 2 mg/l di melatonina sciolti in acqua potabile (gruppo 2), nel corso di 24 ore 200 mg/l di metformina sciolti in acqua potabile (gruppo 3), melatonina e merformina come nei gruppi 2 e 3 (gruppo 4). C'era un gruppo separato di animali intatti. La frequenza del tumore alla pelle è diminuita tra i topi trattati con melatonina/metformina (gruppi 1-4) - 83,3%, 66,7%, 60% 83 e 50%; carcinoma cellulare squamoso - 56,735, 36,7%,20% e 20%. Il trattamento con la melatonina e la metformina e le loro combinazioni sono stati seguiti da un significativo abbassamento della varietà/molteplicità tumorale, dalla presenza di tumori di dimensioni inferiori, da un maggiore periodo di latenza e da una maggiore sopravvivenza dei portatori di tumori. Dopo (BP), i livelli di dialdeide malonica e di catalasi nel siero del sangue mentre le concentrazioni di tumori della pelle negli ultimi erano superiori rispetto agli omogenati di pelle in animali intatti. La melatonina e la metformina hanno diminuito significativamente il contenuto di MDA nel siero del sangue come confrontato con il gruppo 1. La catalasi del siero del sangue è precipitata dopo la loro somministrazione congiunta, viceversa è risultata 2,6 volte più alta negli omogenati di pelle, dopo la somministrazione di metformina. Tuttavia, è diminuita dopo la somministrazione di melatonina.

3: Gonzalez A, Del Castillo-Vaquero A, Miro-Moran A, Tapia JA, Salido GM.

**Melatonin reduces pancreatic tumor cell viability by altering mitochondrial physiology.**

J Pineal Res. 2010 Nov 30. doi: 10.1111/j.1600-079X.2010.00834.x.

Melatonin reduces proliferation in many different cancer cell lines. Thus, melatonin is considered a promising antitumor agent, promoting apoptosis in tumor cells while preserving viability of normal cells. Herein, we examined the effects of melatonin on the pancreatic AR42J tumor cell line. We have analyzed cytosolic-free  $Ca^{2+}$  concentration ( $[Ca^{2+}]_c$ ), mitochondrial-free  $Ca^{2+}$  concentration ( $[Ca^{2+}]_m$ ), mitochondrial membrane potential ( $\Psi_m$ ), mitochondrial flavin adenine dinucleotide (FAD) oxidative state, cellular viability and caspase-3 activity. Our results show that melatonin induced transient changes in  $[Ca^{2+}]_c$  and  $[Ca^{2+}]_m$ . Melatonin also induced depolarization of  $\Psi_m$  and led to a reduction in the level of oxidized FAD. In addition, melatonin reduced AR42J cell viability. Finally, we found a  $Ca^{2+}$ -dependent caspase-3 activation in response to melatonin. Collectively, these data support the likelihood that melatonin reduces viability of tumor AR42J cells via its action on mitochondrial activity and caspase-3 activation.

**La melatonina riduce la viabilità cellulare del tumore pancreatico per mezzo di un'alterazione della fisiologia dei mitocondri.**

La melatonina riduce la proliferazione in molte diverse linee cellulari del cancro. Di conseguenza la melatonina è considerata un agente antitumorale promettente, che promuove l'apoptosi nelle cellule tumorali preservando però la viabilità delle cellule normali. Nel presente articolo abbiamo esaminato gli effetti della melatonina nella linea cellulare AR42J del tumore pancreatico. Abbiamo analizzato la concentrazione  $Ca^{2+}$  senza citosol, ( $[Ca^{2+}]_c$ ), la concentrazione senza mitocondri  $Ca^{2+}$  ( $[Ca^{2+}]_m$ ), il potenziale di membrana mitocondriale ( $\Psi_m$ ), lo stato ossidativo della flavina adenina dinucleotide mitocondriale (FAD), l'attività della viabilità cellulare e della caspasi-3. I nostri risultati hanno dimostrato che la melatonina ha provocato degli effimeri/transitori cambiamenti nel  $[Ca^{2+}]_c$  e  $[Ca^{2+}]_m$ . La melatonina ha inoltre indotto la depolarizzazione del  $\Psi_m$  e ha portato ad una riduzione del livello dell'ossidasi del FDA. Inoltre la melatonina, ha ridotto la viabilità delle cellule AR42J. Infine, abbiamo riscontrato un'attivazione del  $Ca^{2+}$ caspasi-3 dipendente in risposta all'assunzione di melatonina. Nella loro totalità questi dati supportano la verosimiglianza che la melatonina riduca la viabilità delle cellule tumorali AR42J per mezzo della sua azione sull'attività mitocondriale e attraverso l'attivazione della capcasi-3.

5: Proietti S, Cucina A, D'Anselmi F, Dinicola S, Pasqualato A, Lisi E, Bizzarri M.

**Melatonin and vitamin D(3) synergistically down-regulate Akt and MDM2 leading to TGFβ-1-dependent growth inhibition of breast cancer cells.**

J Pineal Res. 2010 Nov 22. doi: 10.1111/j.1600-079X.2010.00824.x. [Epub ahead of print] PubMed PMID:21091766.

Melatonin and vitamin D3 inhibit breast cancer cell growth and induce apoptosis, but they have never been combined as a breast cancer treatment. Therefore, we investigated whether their association could lead to an enhanced anticancer activity. In MCF-7 breast cancer cells, melatonin together with vitamin D3, induced a synergistic proliferative inhibition, with an almost hr. Cell growth blockade is associated to an complete cell growth arrest at 144 activation of the TGFβ-1 pathway, leading to increased TGFβ-1, Smad4 and phosphorylated-Smad3 levels. Concomitantly, melatonin and D3, alone or in combination, caused a significant reduction in Akt phosphorylation and MDM2 values, with a consequent increase of p53/MDM2 ratio. These effects were completely suppressed by adding a monoclonal anti-TGFβ-1 antibody to the culture medium. Taken together, these results indicate that cytostatic effects triggered by melatonin and D3 are likely related to a complex TGFβ-1-dependent mechanism, involving down-regulation of both MDM2 and Akt-phosphorylation.

**L'associazione di melatonina e vitamina D3 porta ad una significativa inibizione di Akt e del MDM2 con una conseguente inibizione del fattore di crescita TGFβ-1 nelle cellule cancerogene del seno.**

La melatonina e la vitamina D3 inibiscono la crescita nelle cellule del carcinoma al seno ed inducono all'apoptosi, ma non sono mai state associate per l'utilizzo terapeutico nei casi di carcinoma al seno. Perciò abbiamo studiato se la loro associazione potrebbe portare ad un aumento dell'attività antitumorale. Nelle cellule MCF-7 del cancro al seno, la melatonina insieme alla vitamina D3, hanno portato a una inibizione proliferativa sinergetica con un'alta percentuale (hr. = high rate) di blocco della crescita della cellula associata ad un completo arresto della crescita della cellula alla 144 attivazione della via TGFβ-1, che porta ad un aumento del TGFβ-1, Smad4 e dei livelli di Smad3 fosforilato.

In modo concomitante, la melatonina e la vitamina D3, singolarmente o insieme, hanno dato luogo ad una significativa riduzione della fosforilazione di AKt e dei valori di MDM2, con un conseguente incremento del rapporto P53/MDM2. Tali effetti sono stati completamente eliminati mediante l'aggiunta al terreno di coltura dell'anticorpo monoclonale anti- TGFβ-1. Analizzati insieme questi risultati indicano che gli effetti citostatici provocati dalla melatonina e dalla vitamina D3 sono probabilmente legati ad un meccanismo complesso TGFβ-1 dipendente, che coinvolge la sotto regolazione (down regulation) sia della proteina MDM2 che della fosforilazione di AKt.

8: Mediavilla MD, Sanchez-Barcelo EJ, Tan DX, Manchester L, Reiter RJ.

### **Meccanismi di base degli effetti anti-tumorali della melatonina.**

Curr Med Chem.2010;17(36):4462-81. PubMed PMID: 21062257

It is commonly accepted that melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine), the most relevant pineal secretory product, has oncostatic properties in a wide variety of tumors and, especially, in those identified as being hormonedependent. The objective of the present article is to offer a global and integrative view of the mechanisms involved in the oncostatic actions of this indoleamine. Due to the wide spectrum of melatonin's actions, the mechanisms that may be involved in its ability to counteract tumor growth are varied. These include: a) antioxidant effects; b) regulation of the estrogen receptor expression and transactivation; c) modulation of the enzymes involved in the local synthesis of estrogens; d) modulation of cell cycle and induction of apoptosis; e) inhibition of telomerase activity; f) inhibition of metastasis; g) prevention of circadian disruption; h) antiangiogenesis; i) epigenetic effects; j) stimulation of cell differentiation; and k) activation of the immune system. The data supporting each of these oncostatic actions of melatonin are summarized in this review. Moreover, the list of actions described may not be exhaustive in terms of how melatonin modulates tumor growth.

### **Meccanismi di base degli effetti anti-tumorali della melatonina.**

E' comunemente accettato che la melatonina (N-acetil-5- Metossitriptamina) il più importante prodotto di secrezione della ghiandola pineale, possiede delle proprietà oncostatiche in una vasta gamma di tumori, e in particolare, nei tumori identificati come ormone dipendenti. Lo scopo del presente articolo è quello di offrire una panoramica globale ed integrativa dei meccanismi nelle azioni oncostatiche di questa indoleamina. Visto l'ampio spettro delle azioni della melatonina, i meccanismi che possono essere coinvolti nella sua capacità di contrastare la crescita tumorale sono vari. Essi includono: a) effetti antiossidanti; b) regolazione dell'espressione e della transattivazione dell'estrogeno; c) modulazione degli enzimi coinvolti nella sintesi locale degli estrogeni; d) modulazione del ciclo cellulare e induzione all'apoptosi; e) inibizione dell'attività della telomerasi; f) inibizione delle metastasi; g) prevenzione della distruzione circadiana h) antiangiogenesi; i) effetti epigenici; j) stimolazione della differenziazione cellulare; e k) attivazione del sistema immunitario. I dati che supportano ciascuna di queste azioni oncostatiche della melatonina sono riassunti in questa recensione. Inoltre, la lista delle azioni descritte può non essere esaustiva in termini di come la melatonina moduli la crescita tumorale.

9: Lin ZY, Chuang WL..

**Pharmacologic concentrations of melatonin have diverse influence on differential expressions of angiogenic chemokine genes in different hepatocellular carcinoma cell lines.**

Biomed Pharmacother. 2010 Dec;64(10):659-62.

This study was to investigate whether melatonin (MLT) at pharmacologic concentrations (1 and 100  $\mu$ M) had potential to influence the expressions of angiogenic (CCL2, CXCL6, IL8) and angiostatic (CXCL10) chemokine genes in two hepatocellular carcinoma (HCC) cell lines with different characteristics (cell line A, HCC24/KMUH, without susceptible to amphotericin B (AmB)-induced oxidative stress; cell line B, HCC38/KMUH, susceptible to AmB-induced oxidative stress). Differential expression of gene was investigated by quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction. Two genes related to oxidative stress (SOD2, VNN3) were also studied. One and 100  $\mu$ M MLT up-regulated CCL2, IL8 and CXCL10 genes in cell line A but down-regulated CCL2, CXCL6, IL8 and SOD2 genes in cell line B. CXCL10 gene was up-regulated by 1 and 100  $\mu$ M MLT in both cell lines. SOD2 gene was down-regulated by 1 and 100  $\mu$ M MLT only in cell line B. The magnitudes of gene expression fold changes of CCL2 and IL8 genes in cell line A and CCL2, CXCL6, IL8 and SOD2 genes in cell line B were similar between 1 and 100  $\mu$ M MLT. The magnitudes of gene expression fold change of up-regulated CXCL10 gene in both cell lines were smaller in 100  $\mu$ M MLT than in 1  $\mu$ M MLT. In conclusion, the responses of angiogenic chemokine genes to MLT were mainly determined by the characteristics of cancer cells. The concentration of MLT may be the main determinant for the response of angiostatic CXCL10 gene to MLT. Clinical application of MLT in patients with HCC should consider these effects.

**Le concentrazioni farmacologiche di melatonina influenzano in modo diverso le varie espressioni dei geni della chemochina angiogenica nei vari tipi di linee di cellule del carcinoma epatocellulare.**

Lo studio aveva lo scopo di investigare se la melatonina (MLT) in quantità farmacologiche (1 e 100  $\mu$ M) abbia una capacità potenziale di influenzare le espressioni dei geni della chemochina angiostatici(CXCL10) e angiogenici(CCL2, CXCL6, IL8) in due linee di cellule (HCC) del carcinoma epatocellulare con differenti caratteristiche (linea della cellula A, HCC24/KMUH, senza essere suscettibile allo stress ossidativo indotto dall'amfotericina B (AmB); linea della cellula B, HCC38/KMUH, suscettibile allo stress ossidativo indotto da AmB. L'espressione genica differenziale è stata studiata da una reazione quantitativa inversa a catena della transcriptasi-polimerasi. Sono stati inoltre studiati due geni legati allo stress ossidativo (SOD2,VNN3). Uno e 100  $\mu$ M MLT sopra-regolati CCL2, IL8 e i geni CXCL10 nella linea della cellula A ma sotto-regolati CCL2, CXCL6, IL8 e i geni SOD2 nella linea della cellula B. Il gene CXCL10 è stato sopra-regolato da 1 a 100  $\mu$ M MLT in entrambe le linee delle cellule. Il gene SOD2 è stato sotto-regolato da 1 e 100  $\mu$ M MLT solamente nella linea della cellula B. L'ampiezza del numero di volte dell'espressione di CCL2 e i geni IL8 nella linea cellulare A e CCL2, CXCL6, IL8 e i geni SOD2 nella linea della cellula B erano simili tra l' 1 e il 100  $\mu$ M MLT. L'ampiezza del numero di volte dell'espressione del gene sopra regolato CXCL10 sia nelle linee della cellula era inferiore in 100  $\mu$ M MLT rispetto a 1  $\mu$ M MLT. In conclusione, le risposte dei geni delle chemochine angiogeniche alla MLT possono essere determinate principalmente dalla risposta del gene angiostatico CXCL10 alla

MLT. L'applicazione clinica della melatonina in pazienti con HCC dovrebbe tener conto di tali effetti.

10: Vigoré L, Messina G, Brivio F, Fumagalli L, Rovelli F, DI Fede G, Lissoni P.

**Psychoneuroendocrine modulation of regulatory T lymphocyte system: in vivo and in vitro effects of the pineal immunomodulating hormone melatonin.**

In Vivo. 2010Sep-Oct;24(5):787-9. PubMed PMID: 20952751.

**BACKGROUND:** At present, it is known that cancer-related immunosuppression would mainly depend on an immunosuppressive action mediated by a subtype of CD4+ lymphocytes, the so-called regulatory T lymphocytes (T-reg), which are identified as CD4+CD25+ cells. Moreover, it has been shown that anticancer immunity is under psychoneuroendocrine regulation, mainly mediated by the pineal hormone melatonin (MLT). This study was performed to investigate the in vivo and in vitro effects of MLT on T-reg generation.

**MATERIALS AND METHODS:** We evaluated the in vivo effects of MLT (20 mg/daily orally in the evening) in 20 patients with untreatable metastatic solid tumor and the in vitro effects of MLT incubation (at 10 and 100 pg/ml) of pure lymphocyte cultures on T-reg cell count.

**RESULTS:** MLT induced a statistically significant decline in mean T-reg cell numbers in patients who achieved disease control, whereas no effect was seen in those who had progressed. In contrast, no in vitro effect of MLT incubation was apparent.

**CONCLUSION:** This preliminary study would suggest that MLT may exert in vivo an inhibitory action on T-reg cell generation in cancer patients which is associated with a control of the neoplastic progression, whereas no direct effect was seen in vitro on lymphocyte differentiation. This finding would suggest that MLT may counteract T-reg cell generation in vivo by inhibiting macrophage activity which is involved in stimulating T-reg cell production.

**La modulazione psiconeuroendocrina del linfocita T regolatore del sistema:effetti in vivo e in vitro della melatonina,ormone immunomodulatore pineale.**

**ANTEFATTO:** al momento è noto che l'immunosoppressione legata al cancro dovrebbe principalmente dipendere da un'azione immunosoppressiva mediata da un sottotipo di CD4+ linfociti, quello che viene chiamato regolatore T dei linfociti (T –regolatori), che sono identificati come CD4+CD25+ cellule. Inoltre, è stato dimostrato che l'immunità antitumorale dipende dalla regolazione psiconeuroendocrina, principalmente mediata dall'ormone pineale della melatonina (MLT). Tale studio è stato realizzato per studiare gli effetti della melatonina in vivo e in vitro sulla generazione T – regolatorie.

**MATERIALI E METODI:** abbiamo valutato gli effetti in vivo della MLT(20 mg/al giorno per via orale la sera) su 20 pazienti con tumore solido metastatico non curabile e gli effetti in vitro della incubazione della MLT (a 10 e 100 pg/ml) di colture linfatiche pure sul conto delle cellule T – regolatorie.

**RISULTATI:** la melatonina ha portato ad un declino statisticamente significativo nella media del numero delle cellule T regolatorie di pazienti che hanno raggiunto un controllo della malattia, laddove non è stato notato alcun effetto in coloro che erano progrediti. Di contro, non è stato rilevato alcun effetto evidente in vitro della incubazione della melatonina.

**CONCLUSIONE:** questo studio preliminare vorrebbe suggerire che la melatonina può esercitare in vivo un'azione inibitoria sulla generazione delle cellule T- regolatorie in pazienti con cancro che è stato associato ad una progressione neoplastica, laddove non sono stati riscontrati effetti in vitro nella differenziazione dei linfociti. Questa scoperta suggerirebbe che la melatonina può annullare la generazione delle cellule T – regolatorie in vivo mediante un'inibizione dell'attività macrofagica che è coinvolta nella stimolazione della produzione delle cellule T – regolatorie.

18: Leja-Szpak A, Jaworek J, Pierzchalski P, Reiter RJ.

### **Melatonin induces pro-apoptotic signaling pathway in human pancreatic carcinoma cells (PANC-1).**

J. Pineal Res. 2010 Oct;49(3):248-55

Pancreatic cancer is a highly lethal disease with a poor prognosis for long-term survival rate at all stages of invasiveness. It responds poorly to radio- and chemotherapy because the tumor cells are resistant to apoptosis. Melatonin has been reported to inhibit pancreatic cancer growth in experimental studies in animals but the effect of melatonin on cultured human pancreatic carcinoma cells has not been tested. Moreover, we have recently shown that melatonin stimulates production of two major anti-apoptotic heat shock proteins, HSP27 and HSP 90, in pancreatic carcinoma cells. This study investigated the changes in intrinsic pathway of apoptosis at the mitochondrial level and cascade of caspases in human pancreatic carcinoma cells (PANC-1) cells subjected to melatonin and/or luzindole. Melatonin ( $10^{-8}$  -  $10^{-12}$  m), the nonselective melatonin receptor antagonist, luzindole ( $10^{-8}$  -  $10^{-12}$  m) or a combination of both agents were added to PANC-1 cell cultures. Cells were harvested, and the cytoplasmic proteins were isolated after 24 and 48 hr of incubation and analyzed employing co-immunoprecipitation and western blot. Administration of melatonin to the PANC-1 cells resulted in the stimulation of Bcl-2/Bax and caspase-9 proteins levels. The strongest signal of these pro-apoptotic factors was observed at the low concentration ( $10^{-12}$  m) of melatonin. Pretreatment with luzindole alone and prior to the addition of melatonin reversed the stimulatory effect of this indoloamine on Bcl-2/Bax and caspase-9 proteins expression in PANC-1 cells. This is the first study to demonstrate a pro-apoptotic effect of low (physiological) concentration of melatonin on the pancreatic carcinoma cells. In conclusion, melatonin induced pro-apoptotic pathways in human pancreatic carcinoma, probably by interaction with the Mel-1 A/B receptors.

### **La melatonina induce ad una via di segnale pro-apoptotica nelle cellule del carcinoma pancreatico umano.**

Il cancro pancreatico rappresenta una malattia altamente letale con una scarsa possibilità di prognosi di tasso di sopravvivenza a lungo termine a tutti gli stadi di invasività. Risponde in scarso modo alla radioterapia e alla chemioterapia poiché le cellule tumorali sono resistenti all'apoptosi. Gli studi sperimentali su animali hanno dimostrato che la melatonina inibisce la crescita del cancro pancreatico, ma non è stato ancora studiato l'effetto della melatonina sulle cellule colturali del carcinoma pancreatico umano. Inoltre, abbiamo di recente dimostrato che la melatonina stimola la produzione di due importanti proteine da shock termico anti-apoptotiche, l'HSP27 e l'HSP90, nelle cellule del carcinoma pancreatico. Questo studio ha preso in esame i cambiamenti nella via intrinseca dell'apoptosi a livello mitocondriale e la successione di operazioni delle caspasi nelle cellule del carcinoma pancreatico umano (PANC-1), cellule soggette alla melatonina e/o al luzindolo. La melatonina ( $10^{-8}$ - $10^{-12}$  m), il luzindolo ( $10^{-8}$ - $10^{-12}$  m), recettore della melatonina antagonista non selettivo, o una combinazione di entrambi gli agenti è stata aggiunta alle colture

delle cellule del PANC-1. Le cellule sono state raccolte e le proteine citoplasmiche sono state isolate dopo 24 e 48 ore di incubazione ed analizzate impiegando co-immunoprecipitazione e immunorivelazione (western blot). L'amministrazione della melatonina alle cellule PANC-1 è risultata nella stimolazione del Bcl-2/Bax e ai livelli della caspasi-9 delle proteine. Il segnale più forte di questi fattori pro-apoptocici è stato osservato nella bassa concentrazione ( $10^{-12}$  M) di melatonina. Il pre-trattamento con il luzindolo e con una precedente aggiunta di melatonina hanno invertito l'effetto della stimolazione di tale indoleamina su Bcl-2/Bax e sull'espressione delle proteine tagliate da caspasi-9 nelle cellule PANC-1. Questo è il primo studio che dimostra un effetto pro-apoptotico di bassa (fisiologica) concentrazione di melatonina nelle cellule pancreatiche del carcinoma. In conclusione, la melatonina ha indotto le vie pro-apoptotiche nel carcinoma pancreatico umano, probabilmente per mezzo di una interazione con i recettori Mel-1 A/B.

20: Um HJ, Kwon TK.

### **Protective effect of melatonin on oxaliplatin-induced apoptosis through sustained Mcl-1 expression and anti-oxidant action in renal carcinoma Caki cells.**

J Pineal Res. 2010 Oct;49(3):283-90.

Melatonin is an indolamine initially found to be produced in the pineal gland but now known to be synthesized in a variety of other tissues as well. The mechanisms whereby melatonin regulates the apoptotic program remain only partially understood. Anti-/pro-apoptotic effects of exogenous melatonin on various stimuli-mediated apoptosis were investigated in this report. We investigated the combined effect of melatonin and death receptor-mediated ligands (TNF- $\alpha$ , TRAIL, and anti-Fas antibody) or endoplasmic reticulum (ER) stress-inducing agents (thapsigargin, brefeldin A, and tunicamycin) on apoptosis of cancer cells. Death receptor- or ER stress-induced apoptosis was not significantly influenced by melatonin treatment. However, pretreatment with melatonin significantly inhibited DNA damage-induced apoptosis and glutathione (GSH) depletion, suggesting the reactive oxygen species mediate oxaliplatin/etoposide-induced apoptosis. Interestingly, we also found the involvement of myeloid cell leukemia-1 (Mcl-1) downregulation in oxaliplatin-induced apoptosis; thus, pretreatment with melatonin inhibited Mcl-1 downregulation, and ectopic expression of Mcl-1 attenuated oxaliplatin-induced apoptosis. Taken together, the results demonstrate that melatonin attenuates oxaliplatin-induced apoptosis in cancer cells by inhibition of GSH depletion and Mcl-1 downregulation.

### **Effetto protettivo della melatonina nell'apoptosi indotta dalla oxaliplatina per mezzo dell'espressione prolungata di Mcl1 e dell'azione antiossidante nelle cellule del carcinoma renale di Caki.**

La melatonina è una indolamina che inizialmente si è scoperto essere prodotta nella ghiandola pineale, ma adesso si sa che è anche sintetizzata in una varietà di altri tessuti. I meccanismi con i quali la melatonina regola il programma apoptotico è solo parzialmente chiaro. In questo studio sono stati studiati gli effetti anti-/pro-apoptotici della melatonina esogena sulle varie apoptosi stimolate. Abbiamo analizzato l'effetto congiunto della melatonina e dei ligandi mediati dal recettore della morte (TNF- $\alpha$ , TRAIL, e anti-Fas anticorpo) o del reticolo endoplasmatico (ER), agenti induttori di stress (thapsigargina, brefeldin A e tunicamicina) sull'apoptosi delle cellule cancerogene. Il recettore della morte – o l'apoptosi indotta dallo stress ER non è stato influenzato significativamente dal trattamento con la melatonina. Tuttavia, il pre-trattamento con la melatonina ha inibito significativamente l'apoptosi indotta dal danneggiamento del DNA e l'esaurimento del glutathione (GSH), suggerendo che l'apoptosi indotta dall' oxaliplatin/etoposide sia mediata dai tipi ossigeno reattivi. Interessante è anche la scoperta della sottoregolazione della cellula mieloide della leucemia (Mcl-1), nell'apoptosi indotta dall'oxaliplatin; per cui un trattamento con la melatonina

inibisce la sottoregolazione del Mcl-1, e l'espressione ectopica di Mcl-1 attenua l'apoptosi indotta dall'oxaliplatin. Se presi insieme, i risultati dimostrano che la melatonina attenua l'apoptosi indotta dall'oxaliplatin nelle cellule del cancro per mezzo di un'inibizione dell'impoverimento del GHS e della sotto regolazione del Mcl1.

22: Mao L, Cheng Q, Guardiola-Lemaître B, Schuster-Klein C, Dong C, Lai L, Hill SM.

### **In vitro and in vivo antitumor activity of melatonin receptor agonists.**

J Pineal Res. 2010 Oct;49(3):210-21.

Melatonin has been shown to inhibit the proliferation of estrogen receptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ )-positive human breast cancer cells in vitro and suppress the growth of carcinogen-induced mammary tumors in rats. Melatonin's antiproliferative effect is mediated, at least in part, through the MT1 melatonin receptor and mechanisms involving modulation of the estrogen-signaling pathway. To develop melatonin analogs with greater therapeutic effects, we have examined the in vitro and in vivo antimitotic activity of two MT1/MT2 melatonin receptor agonists, S23219-1 and S23478-1. In our studies, both agonists are quite effective at suppressing the growth of MCF-7 human breast cancer cells. At a concentration of  $10^{-6}$  m, S23219-1 and S23478-1 inhibited the growth of MCF-7 cells by 60% and 73%, respectively. However, S23478-1 is more effective than melatonin and S23219-1 at repressing the expression and transactivation of the ER $\alpha$ , and modulating the expression of pancreatic spasmolytic polypeptide (pS2), an estrogen-regulated gene. The melatonin agonist S23478-1 exhibited enhanced antitumor potency in the subsequent studies in our animal model. At a dosage of 25 mg/kg/day, S23478-1 is more efficacious than melatonin at inducing regression of the established N-nitroso-N-methyl-urea-induced rat mammary tumors. This dose of S23478-1 (25 mg/kg/day) generated a significant ( $P < 0.05$ ) overall regression response of 52%. Furthermore, at this dosage, S23478-1 is more effective than melatonin at suppressing the estrogen-signaling pathway and promoting tumor cell apoptosis, significantly increasing the expression of the proapoptotic protein Bax, while decreasing the expression of ER $\alpha$  and the anti-apoptotic protein Bcl-2.

### **Attività antitumorale dei recettori antagonisti della melatonina in vitro e in vivo.**

E' stato dimostrato che la melatonina inibisce la proliferazione in vitro del recettore dell'estrogeno  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) positivo nelle cellule del seno umano e sopprime la crescita dei tumori mammari carcinogeno indotti, nei ratti. L'effetto antiproliferativo della melatonina è mediato, perlomeno in parte, dal recettore della melatonina e dai meccanismi che coinvolgono la modulazione della via di segnalazione dell'estrogeno. Per sviluppare degli analoghi della melatonina che presentano maggiori effetti terapeutici, abbiamo esaminato l'attività antimitotica in vitro e in vivo di due MT1/MT2 recettori agonisti della melatonina, S23219-1 e S23478-1. Nei nostri studi, entrambi gli agonisti sono risultati piuttosto efficaci nel sopprimere la crescita del MCF-7 nelle cellule del cancro al seno. Ad una concentrazione di  $10^{-6}$  m, S23219-1 e S23478-1 e S23478-1 ha inibito la crescita delle cellule MCF-7 rispettivamente del 60% e del 73%. Tuttavia S23478-1 è più efficace rispetto alla melatonina e S23219-1 nella repressione e transattivazione del ER $\alpha$ , e nella repressione del polipeptide spasmolitico pancreatico (pS2), e del gene estrogeno-regolato. L'agonista della melatonina S234478-1 ha dimostrato di aver aumentato la potenza antitumorale negli studi successivi su nostri modelli animali. Ad un dosaggio di 25 mg/kg/al giorno, S23478-1 risulta più efficace rispetto alla melatonina nell'indurre una regressione del nominato N-nitroso-N-metil-urea-indotto nei tumori mammari del ratto. Tale dosi di S23478-1 (25mg/kg/al giorno) hanno generato una significativa ( $P < 0,05$ ) risposta complessiva di regressione del 52%. Inoltre, a questo dosaggio, S23478-1 è più efficiente rispetto alla melatonina nel sopprimere la via di segnalazione

dell'estrogeno promuovendo l'apoptosi della cellula tumorale e facendo aumentare significativamente l'espressione della proteina Bax pro-apoptotica, mentre diminuisce l'espressione del Era e della proteina anti-apoptotica Bcl-2.

23: Dubocovich ML, Delagrange P, Krause DN, Sugden D, Cardinali DP, Olcese J.

**International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXV. Nomenclature, classification, and pharmacology of G protein-coupled melatonin receptors.**

Pharmacol Rev. 2010 Sep;62(3):343-80.

The hormone melatonin (5-methoxy-N-acetyltryptamine) is synthesized primarily in the pineal gland and retina, and in several peripheral tissues and organs. In the circulation, the concentration of melatonin follows a circadian rhythm, with high levels at night providing timing cues to target tissues endowed with melatonin receptors. Melatonin receptors receive and translate melatonin's message to influence daily and seasonal rhythms of physiology and behavior. The melatonin message is translated through activation of two G protein-coupled receptors, MT(1) and MT(2), that are potential therapeutic targets in disorders ranging from insomnia and circadian sleep disorders to depression, cardiovascular diseases, and cancer. This review summarizes the steps taken since melatonin's discovery by Aaron Lerner in 1958 to functionally characterize, clone, and localize receptors in mammalian tissues. The pharmacological and molecular properties of the receptors are described as well as current efforts to discover and develop ligands for treatment of a number of illnesses, including sleep disorders, depression, and cancer.

**Unione internazionale della farmacologia di base e clinica. LXXXV. Nomenclatura, classificazione e farmacologia della proteina G accoppiata ai recettori della melatonina.**

L'ormone melatonina (5-metoxi-N-acetiltryptamina) è principalmente sintetizzato nella ghiandola pineale e nella retina ed in diversi tessuti ed organi periferici. Nella circolazione, la concentrazione di melatonina segue il ritmo circadiano, con alti livelli la notte fornendo dei segnali orari per bersagliare i tessuti assegnati con i recettori della melatonina. I recettori della melatonina ricevono e traducono il messaggio della melatonina per influenzare i ritmi giornalieri e stagionali della fisiologia e del comportamento. Il messaggio della melatonina è tradotto per mezzo di un'attivazione di due protettori della proteina G – uniti, MT (1) e MT (2), che potenzialmente rappresentano degli obiettivi terapeutici nelle malattie che vanno da l'insonnia e dei disturbi del sonno circadiani, alla depressione, alle malattie cardiovascolari e al cancro. Questa rivista riassume i passi fatti da quando la melatonina è stata scoperta da Aaron Lerner nel 1958 fino a caratterizzare in modo funzionale, clonare e localizzare i recettori nei tessuti mammari. Nell'articolo sono descritte le proprietà farmacologiche e molecolari dei recettori così come gli sforzi attuali finalizzati alla scoperta e allo sviluppo dei ligandi per la cura di diverse patologie, incluse i disturbi del sonno dei pazienti, la depressione ed il cancro.

24: Nahleh Z, Pruemer J, Lafollette J, Sweany S.

### **M elatonin, a promising role in taxane-related neuropathy.**

Clin Med Insights Oncol. 2010 Apr 28;4:35-41.

**PURPOSE:** Melatonin has neuroprotective effects in animal studies and has been suggested to decrease adverse reactions of chemotherapy including neuropathy. This pilot trial aimed at assessing whether melatonin, given during taxane chemotherapy for breast cancer, will decrease the incidence and/or severity of neuropathy.

**METHODS:** Twenty two consecutive patients beginning chemotherapy for breast cancer with paclitaxel, or docetaxel were enrolled. Patients received melatonin 21 mg daily at bedtime. Incidence and severity of neuropathy were assessed using neurological examinations, toxicity assessment per NCI-CTC 3.0 scale and FACT-Taxane quality of life questionnaire.

**RESULTS:** Neuropathy was seen in 45% (n = 10) of patients, 23% (n = 6) grade 1 and 22% (n = 5) Grade 2 neuropathy. No grade 3 neuropathies were reported. The majority (55%) of all patients reported no neuropathy. Compliance with melatonin (>60% of dose) was seen in most patients (86%) No patient reported daytime sedation. The median FACT-Taxane quality of life end of study score was 137, with only a 0.5 median decline from baseline.

**CONCLUSION:** Patients receiving melatonin during taxane chemotherapy had a reduced incidence of neuropathy. Melatonin may be useful in the prevention or reduction of taxane-induced neuropathy and in maintaining quality of life. Larger trials are warranted to further explore the role of melatonin in neuropathy treatment and prevention.

### **Melatonina, un ruolo promettente nella neuropatia con taxani**

**SCOPO:** la melatonina ha degli effetti neuroprotettivi negli studi sugli animali ed è stata suggerita per diminuire alcune reazioni avverse della chemioterapia includendo la neuropatia. Questo studio pilota ha lo scopo di accertare se la melatonina, data nel corso della terapia con taxani per la cura del cancro al seno, diminuirà l'incidenza e/o la gravità della neuropatia.

**METODI:** Sono stati inseriti nello studio ventidue pazienti in successione che hanno incominciato la chemioterapia per la cura con il paclitaxel, o il docetaxel. Ai pazienti sono stati dati 21 mg di melatonina prima di coricarsi. Sono state valutate l'incidenza e la gravità della neuropatia per mezzo di esami neurologici, per valutare invece la scala NCI-CTC 3.0 e il questionario sulla qualità della vita del FAC-taxano, si è valutata la tossicità.

**RISULTATI:** è stata vista una neuropatia nel 45% dei pazienti (n=10), 23% (n=6) grado 1 e nel 22% (n=5) neuropatia di grado 2. Non sono state riportate neuropatie di grado 3. La maggioranza (55%) dei pazienti non hanno riportato neuropatia. La compliance (efficacia) della melatonina (>60% della dose) è stata osservata nella maggioranza dei pazienti (86%). Nessun paziente ha riportato stati di sonnolenza durante il giorno. Il risultato finale dello studio relativo alla mediana FACT-Taxane della qualità della vita è stato di 137 con solo il 0,5 di calo di mediana rispetto alla base di rivelamento.

CONCLUSIONE: I pazienti ai quali è stata somministrata la melatonina durante la chemioterapia con taxani hanno mostrato una ridotta incidenza della neuropatia. La melatonina può essere utile nella prevenzione o nella riduzione della neuropatia indotta dai taxani oltre che a mantenere la qualità della vita. Sono stati autorizzati ulteriori studi clinici per esplorare il ruolo della melatonina nel trattamento delle neuropatie e nella loro prevenzione.

28: Dong C, Yuan L, Dai J, Lai L, Mao L, Xiang S, Rowan B, Hill SM.

**Declining melatonin levels and MT1 receptor expression in aging rats is associated with enhanced mammary tumor growth and decreased sensitivity to melatonin.**

Dec;75(12):944-51

Serum melatonin (MLT) levels have been reported to diminish significantly by the 5th and 6th decades of life as the incidence of breast cancer increases. Given MLT's anti-cancer activity, we hypothesize that age-related decline in pineal MLT production leads to enhanced breast cancer development and growth as women age. In this study, we sought to determine whether the growth of tissue-isolated mammary tumors in young, adult, and old female Buffalo rats relates to the age-related changes in MLT and its MT1 receptor. Significant decreases in the peak nighttime serum MLT levels were observed in old as compared to adult and young rats. Significantly diminished nighttime and early morning levels of MT1-melatonin receptors were observed in uteri from old rats compared to adult and young rats. Growth rates in transplanted, tissue-isolated, carcinogen-induced mammary tumors are significantly increased in old rats as compared to adult or young rats. The growth-suppressive actions of exogenous MLT are diminished in old rats compared to adult and young rats. This decrease in tumor response correlates with reduced expression of the MT1 receptor in old as compared to young and adult rats. Thus, enhanced mammary tumor growth is associated with old age and diminished levels of MLT and MT1 receptor during old age, resulting in reduced sensitivity to exogenous MLT. Finally, our studies demonstrate that the tissue-isolated tumor model is viable model system in which to study the role of aging on breast cancer growth.

**La melatonina inibisce la diafonia (anche detta cross-talk) tra il recettore alpha orfano relativo all'acido retinico (RORalpha) e ERalpha nelle cellule MCF-7 umane del cancro al seno.**

I concetti di reporter di luciferase e di approcci di co-trasfezione dimostrano che l'espressione elevata di RORalpha1 aumenta l'attivazione trascrizionale del full-length (piena lunghezza) ERalfa indotta dal 17-beta-estradiolo (E (2)), ma non tronca i costrutti ERalfa (ABCD o CDEF), nelle cellule MCF-7 del cancro al seno e nelle cellule renali embrionali HEK293. Queste concentrazioni fisiologiche di MLT inibiscono l'attività individuale e l'attività trascrizionale di ERalfa per mezzo di RORalpha1 ed E (2). I test di spostamento della mobilità del gel e della co-immunoprecipitazione (IP) / pull-down (spingere giù), dimostrano che RORalpha1 e ERalfa non interagiscono direttamente a livello del DNA-vincolante o come eterodimeri, tuttavia, l'RORalpha1 aumenta l'espressione di PS2 e della ciclina D1 indotte da E (2) mentre la MLT inibisce l'espressione di PS2 e della ciclina D1 indotte da RORalpha1 / E (2) nelle cellule MCF-7.

29: Hill SM, Cheng C, Yuan L, Mao L, Jockers R, Dauchy B, Frasch T, Blask DE.

## **Declining melatonin levels and MT1 receptor expression in aging rats is associated with enhanced mammary tumor growth and decreased sensitivity to melatonin.**

Breast Cancer Res Treat. 2010 Jun 12.

Serum melatonin (MLT) levels have been reported to diminish significantly by the 5th and 6th decades of life as the incidence of breast cancer increases. Given MLT's anti-cancer activity, we hypothesize that age-related decline in pineal MLT production leads to enhanced breast cancer development and growth as women age. In this study, we sought to determine whether the growth of tissue-isolated mammary tumors in young, adult, and old female Buffalo rats relates to the age-related changes in MLT and its MT1 receptor. Significant decreases in the peak nighttime serum MLT levels were observed in old as compared to adult and young rats. Significantly diminished nighttime and early morning levels of MT1-melatonin receptors were observed in uteri from old rats compared to adult and young rats. Growth rates in transplanted, tissue-isolated, carcinogen-induced mammary tumors are significantly increased in old rats as compared to adult or young rats. The growth-suppressive actions of exogenous MLT are diminished in old rats compared to adult and young rats. This decrease in tumor response correlates with reduced expression of the MT1 receptor in old as compared to young and adult rats. Thus, enhanced mammary tumor growth is associated with old age and diminished levels of MLT and MT1 receptor during old age, resulting in reduced sensitivity to exogenous MLT. Finally, our studies demonstrate that the tissue-isolated tumor model is viable model system in which to study the role of aging on breast cancer growth.

## **Livelli bassi di melatonina ed espressione del recettore MT1 in topi anziani sono associati a un aumento nella crescita dei tumori mammari e a una diminuzione della sensibilità alla melatonina**

Si è notato che i livelli di melatonina sierica (MTL) diminuiscono significativamente a partire dalla quinta e sesta decade della vita, contemporaneamente ad un aumento dell'incidenza del carcinoma al seno. Dimostrata l'attività anti-cancro della melatonina, ipotizziamo che la diminuzione della produzione di melatonina da parte della ghiandola pineale legata all'età, favorisca lo sviluppo e la crescita del carcinoma al seno quando la donna invecchia. In questo studio, abbiamo cercato di determinare se la crescita di un tessuto isolato di un carcinoma mammario in ratti buffalo di sesso femminile giovani, adulti, e vecchi si riferisca ai cambiamenti della melatonina e del suo recettore legati all'età. Si è riscontrata una diminuzione significativa dei livelli sierici della melatonina che arriva al suo picco massimo la notte nei ratti vecchi, a confronto con i ratti adulti e giovani. Si è inoltre riscontrata negli uteri dei ratti vecchi messi a confronto con gli uteri dei ratti adulti o giovani, una significativa diminuzione dei livelli dei recettori della melatonina la notte e la mattina presto. I tassi di crescita nei tumori della mammella carcinoma indotti nei tessuti isolati trapiantati sono significativamente aumentati nei ratti vecchi se confrontati con i dati dei ratti adulti o giovani. Le azioni della melatonina esogena sul blocco della crescita risultano diminuite nei ratti vecchi se confrontate con i ratti adulti o giovani. Tale diminuzione nella risposta del tumore è correlata alla ridotta espressione del recettore MT1 nei ratti vecchi rispetto ai ratti giovani ed ai ratti adulti. Conseguentemente, l'aumento del fattore di crescita nel tumore alla mammella è associato all'anzianità e ai ridotti livelli di MLT e del recettore MT1 nella tarda età, con conseguente riduzione dell'efficacia della melatonina esogena. Infine, i nostri studi dimostrano che il modello del tessuto isolato del tumore è un sistema di modello attuabile che permette di studiare il ruolo dell'invecchiamento nella crescita del tumore al seno.

32: Jung-Hynes B, Huang W, Reiter RJ, Ahmad N.

## **Melatonin resynchronizes dysregulated circadian rhythm circuitry in human prostate cancer cells.**

J Pineal Res. 2010 Aug;49(1):60-8.

Prostate cancer (PCa) is a major age-related malignancy as increasing age correlates with increased risk for developing this neoplasm. Similarly, alterations in circadian rhythms have also been associated with the aging population and cancer risk. The pineal hormone melatonin is known to regulate circadian rhythms, which is under the control of a core set of genes: Period 1, 2, 3 (Per 1-3); Cryptochrome 1, 2 (Cry 1, 2); Clock, and Bmal 1, 2. Melatonin levels have been shown to decrease in patients with cancer and exogenous melatonin exhibits antiproliferative effects against certain cancers. In this study, we challenged the hypothesis that melatonin imparts antiproliferative effects in prostate cancer via resynchronization of deregulated core clock circuitry. We found that Clock and Per2 protein levels were downregulated whereas Bmal1 protein levels were upregulated in PCa cells, compared to normal prostate cells. Additionally, employing automated quantitative analysis of a microarray containing human tissues, we found that compared to benign tissues, Clock and Per2 levels were downregulated, whereas Bmal1 levels were upregulated in PCa and other proliferative prostatic conditions. Overexpression of Per2 was found to result in a significant loss of PCa cell growth and viability. Interestingly, melatonin treatment resulted in an increase in Per2 and Clock and a reduction in Bmal1 in PCa cells. Further, melatonin treatment resulted in a resynchronization of oscillatory circadian rhythm genes (Dbp and Per2). Our data support our hypothesis and suggest that melatonin should be thoroughly investigated as an agent for the management of PCa and other age-related malignancies.

## **La melatonina risincronizza il ritmo circadiano sregolato nelle cellule tumorali della prostata umana.**

Il cancro alla prostata (PCa) rappresenta il tumore maligno che maggiormente è legato all'età del paziente. Infatti, con l'aumentare dell'età aumenta il rischio di sviluppare questo neoplasma. Analogamente, anche le alterazioni ai ritmi circadiani sono state associate all'invecchiamento della popolazione ed al rischio di cancro.

L'ormone pineale della melatonina è noto come regolatore dei ritmi circadiani. L'ormone pineale è sotto il controllo di un "core set" (gruppo base) di geni: periodo 1,2,3, (Per 1-3); criptocromo 1,2, (Cry 1,2); il "Clock" (orologio circadiano) e l'espressione Bmal 1,2. Si è dimostrato che i livelli di melatonina diminuiscono nei pazienti con cancro e che la melatonina esogena blocca gli effetti antiproliferativi in certi tipi di cancro. In questo studio abbiamo ipotizzato che la melatonina provochi degli effetti antiproliferativi nel cancro alla prostata mediante una risincronizzazione dell'orologio del circuito circadiano. Abbiamo scoperto che l'orologio circadiano ed i livelli di proteina Per2 erano sopra-regolati nelle cellule PCa, se confrontati alle cellule normali della prostata. Inoltre, per mezzo di analisi quantitative automatizzate di un "microarray" (un piccolo rettangolo di vetro (simile ad un vetrino da microscopio con una griglia di decine di migliaia di punti microscopici) contenente dei tessuti umani, abbiamo scoperto che se confrontati con i tessuti benigni, il Clock ed i livelli Per2 erano sotto-regolati, laddove i livelli di Bmal erano sopra-regolati quando si presentava la condizione del PCa ed altre condizioni proliferative della prostata. Si è scoperto che la sovraespressione di Per2 porta ad una perdita significativa della cellula della crescita del PCa e della sua vitalità. E' interessante notare che il trattamento con la melatonina ha portato ad una crescita di Per2 e del Clock ed ad una riduzione di Bmal1 nelle cellule del Pca. Inoltre, il trattamento della melatonina ha portato ad una risincronizzazione dei geni del ritmo circadiano oscillatorio (Dbp e Per2). I nostri dati supportano la nostra ipotesi e suggeriscono che la melatonina dovrebbe essere studiata a fondo nella sua funzione di agente per la gestione del Pca e di altri tumori maligni.

34: Reiter RJ, Tan DX, Fuentes-Broto L.

**Melatonin: a multitasking molecule.**

Prog Brain Res. 2010;181:127-51.

Melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine) has revealed itself as an ubiquitously distributed and functionally diverse molecule. The mechanisms that control its synthesis within the pineal gland have been well characterized and the retinal and biological clock processes that modulate the circadian production of melatonin in the pineal gland are rapidly being unravelled. A feature that characterizes melatonin is the variety of mechanisms it employs to modulate the physiology and molecular biology of cells. While many of these actions are mediated by well-characterized, G-protein coupled melatonin receptors in cellular membranes, other actions of the indole seem to involve its interaction with orphan nuclear receptors and with molecules, for example calmodulin, in the cytosol. Additionally, by virtue of its ability to detoxify free radicals and related oxygen derivatives, melatonin influences the molecular physiology of cells via receptor-independent means. These uncommonly complex processes often make it difficult to determine specifically how melatonin functions to exert its obvious actions. What is apparent, however, is that the actions of melatonin contribute to improved cellular and organismal physiology. In view of this and its virtual absence of toxicity, melatonin may well find applications in both human and veterinary medicine.

**La melatonina: una molecola dalle molteplici funzioni**

La melatonina (N-acetil-5-metossitriptamina) si è rivelata essere una molecola distribuita in modo onnipresente e funzionale. I meccanismi che controllano la sua sintesi all'interno della ghiandola pineale sono stati ben caratterizzati e si stanno scoprendo rapidamente i processi dell'orologio che regola la visione retinica e quelli che regolano l'orologio biologico che modulano la produzione circadiana di melatonina nella ghiandola pineale. Una caratteristica che è tipica della melatonina è rappresentata dalla varietà dei meccanismi che utilizza per modulare la fisiologia e la biologia molecolare delle cellule. Mentre molte di queste azioni sono mediate dai recettori della melatonina della proteina G accoppiata nelle membrane cellulari, altre azioni del composto indolo sembrano coinvolgere la sua interazione con i recettori nucleari orfani e con le molecole, per esempio la calmodulina, nel citosol (liquido intracellulare). Inoltre, in virtù della sua capacità di disintossicare i radicali liberi ed i relativi derivati dell'ossigeno, la melatonina influenza la fisiologia molecolare delle cellule per mezzo di mezzi recettore-indipendenti. Tali processi insolitamente complessi rendono spesso difficile determinare in modo specifico quali siano i meccanismi di funzionamento della melatonina pur essendo chiare, per non dire ovvie le sue azioni. Ciò che è chiaro, tuttavia, è che le azioni della melatonina contribuiscono al miglioramento della fisiologia cellulare e dell'organismo. Tenuto conto di ciò e della sua virtuale assenza di tossicità, la melatonina può trovare delle applicazioni sia nel campo della medicina umana che in quello della medicina animale.

35: Cabrera J, Negrín G, Estévez F, Loro J, Reiter RJ, Quintana J.

### **Melatonin decreases cell proliferation and induces melanogenesis in human melanoma SK-MEL-1 cells.**

J. Pineal Res. 2010 Aug;49(1):45-54.

Melatonin is an indoleamine synthesized in the pineal gland, and after its release into the blood, it has an extensive repertoire of biological activities, including antitumoral properties. In this study, we found that melatonin reduced the growth of the human melanoma cells SK-MEL-1. The antiproliferative effect was associated with an alteration in the progression of the phases of the cell cycle and also with an increase in tyrosinase activity, the key regulatory enzyme of melanogenesis. Antagonists for melatonin membrane receptors (luzindole and 4-P-PDOT) and the general G-coupled receptor inhibitor, pertussis toxin, did not prevent the melatonin-induced cell growth arrest; this suggests a mechanism independent of G-coupled membrane receptors. In contrast, p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) signaling pathway seems to play a significant role in cell growth inhibition by melatonin. The indoleamine-induced phosphorylation of p38 MAPK and the effect on cell proliferation were abrogated by the specific inhibitor SB203580. Furthermore, comparative studies with known antioxidants such as N-acetyl-l-cysteine and trolox indicate that the growth of SK-MEL-1 cells is highly sensitive to antioxidants.

### **La melatonina diminuisce la proliferazione delle cellule ed induce alla melangiogenesi nelle cellule del melanoma umano SK-MEL-1.**

La melatonina è una indoleamina sintetizzata nella ghiandola pineale, dopo che viene rilasciata nel sangue la melatonina dà luogo ad una grande varietà di attività biologiche, incluse le proprietà antitumorali. In questo studio, abbiamo scoperto che la melatonina riduce la crescita delle cellule del melanoma umano SK-MEL-1. L'effetto antiproliferativo è stato associato ad una alterazione ed ad una progressione delle fasi del ciclo cellulare ed anche ad un aumento dell'attività della tirosinasi, l'enzima chiave che regola la melanogenesi. Né gli antagonisti per i recettori della membrana della melatonina (luzindolo e 4-P-PDOT) né la tossina pertussica, l'inibitore del recettore generale accoppiato alla proteina G, hanno impedito l'arresto delle cellule della crescita da parte della melatonina indotta; ciò suggerisce la presenza di un meccanismo indipendente dai recettori della membrana accoppiati alla proteina G. Di contro, la via di segnale della proteina mitogeno attivata kinase p38 (p38 MARK) sembra avere un ruolo significativo nel processo di inibizione cellulare innescato dalla melatonina. Sono stati abrogati da un specifico inibitore SB203580 sia la fosforilazione della p38 MARK dovuta all'induzione della indoleamina sia l'effetto sulla proliferazione cellulare. Inoltre, degli studi comparativi con degli antiossidanti conosciuti come N-acetil-l-cisteina e trolox, indicano che la crescita delle cellule SK-MEL-1 è fortemente sensibile agli antiossidanti.

## **Melatonin suppresses tumor angiogenesis by inhibiting HIF-1alpha stabilization under hypoxia.**

J Pineal Res. 2010 Mar;48(2):178-84

Angiogenesis is an important mediator of tumor progression. As tumors expand, diffusion distances from the existing vascular supply increases, resulting in hypoxia in the cancer cells. Sustained expansion of a tumor mass requires new blood vessel formation to provide rapidly proliferating tumor cells with an adequate supply of oxygen and nutrients. The key regulator of hypoxia-induced angiogenesis is the transcription factor known as hypoxia-inducible factor (HIF)-1. HIF-1alpha is stabilized by hypoxia-induced reactive oxygen species (ROS) and enhances the expression of several types of hypoxic genes, including that of the angiogenic activator known as vascular endothelial cell growth factor (VEGF). In this study, we found that melatonin, a small lipophilic molecule secreted primarily by the pineal gland, destabilizes hypoxia-induced HIF-1alpha protein levels in the HCT116 human colon cancer cell line. This destabilization of HIF-1alpha resulted from the antioxidant activity of melatonin against ROS induced by hypoxia. Moreover, under hypoxia, melatonin suppressed HIF-1 transcriptional activity, leading to a decrease in VEGF expression. Melatonin also blocked in vitro tube formation and invasion and migration of human umbilical vein endothelial cells induced by hypoxia-stimulated conditioned media of HCT116 cells. These findings suggest that melatonin could play a pivotal role in tumor suppression via inhibition of HIF-1-mediated angiogenesis.

37: Park SY, Jang WJ, Yi EY, Jang JY, Jung Y, Jeong JW, Kim YJ.

## **La melatonina sopprime l'angiogenesi del tumore per mezzo dell'inibizione della stabilizzazione del HIF-1 alfa in ipossia.**

L'angiogenesi è un importante mediatore della progressione tumorale. Man mano che i tumori si espandono, aumenta la diffusione della distanza dagli aumenti dell'esistente alimentazione cellulare, con la conseguenza di creare una situazione d'ipossia nelle cellule del cancro. Un'espansione costante di una massa tumorale richiede la formazione di nuovi vasi sanguigni per poter fornire rapidamente ossigeno alla proliferazione delle cellule tumorali e per fornire sostanze nutritive. Il regolatore chiave dell'angiogenesi indotta dall'ipossia è il fattore di trascrizione conosciuto come il fattore inducibile dall'ipossia (HIF)-1. HIF-1 alpha è stabilizzato dalle specie d'ossigeno reattivo indotto dall'ipossia (ROS) e accresce l'espressione di diversi tipi di geni ipossici, inclusi quelli dell'attivatore angiogenico conosciuto come fattore di crescita dell'endotelio vascolare della cellula (VEGF). In questo studio abbiamo scoperto che la melatonina, una piccola molecola secreta principalmente dalla ghiandola pineale, destabilizza i livelli di proteina HIF-1 indotti dall'ipossia nella linea cellulare HCT116 del cancro al colon dell'uomo. Tale destabilizzazione di HIF-1 alfa rappresenta il risultato di un'attività antiossidante della melatonina contro il ROS indotto dall'ipossia. Inoltre, sotto ipossia, la melatonina sopprime l'attività trascrizionale, che porta ad una diminuzione dell'espressione. La melatonina inoltre blocca la formazione, la migrazione e l'invasione delle cellule endoteliali della vena ombelicale umana indotte per mezzo della stimolazione all'ipossia delle cellule HCT116. Tali scoperte suggeriscono che la melatonina può avere un ruolo pilota nella soppressione del tumore per mezzo di un'inibizione dell'angiogenesi HIF-1 mediata.

38: Tripathi DN, Jena GB.

## **Effect of melatonin on the expression of Nrf2 and NF-kappaB during cyclophosphamide-induced urinary bladder injury in rat.**

J Pineal Res. 2010 May;48(4):324-31

Urotoxicity is one of the major problems associated with cyclophosphamide (CP) chemotherapy in cancer patients. Melatonin is a potent antioxidant and reduces CP-induced urotoxicity. However, the molecular mechanisms of protection offered by melatonin are not yet clear. The present study investigated the role of nuclear erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) and nuclear factor-kappa B (NF-kappaB) on melatonin-mediated protection against CP-induced urotoxicity. CP was administered intraperitoneally at the dose of 150 mg/kg to induce urotoxicity in male Sprague-Dawley rats. Melatonin treatment (10 mg/kg) was initiated 3 days before and continued for 1 day after the CP administration. Melatonin treatment reduced the CP-induced oxidative stress and DNA damage in the urinary bladder as observed by abrogation in thiobarbituric acid-reactive substances and glutathione levels as well as comet and modified comet assay parameters. Melatonin treatment reduced the bladder damage and apoptosis as observed by histological analysis and TUNEL assay. Melatonin increased the expression of transcription factor Nrf2 as well as associated phase-II enzymes NADPH: quinone oxidoreductase-1 and heme oxygenase-1. Further melatonin treatment reduced the expression of transcription factor NF-kappaB. The results of the present study provide evidence that melatonin treatment favorably alters Nrf2 and NF-kappaB expression and, this appears to be at least in part responsible for observed protection against CP-induced urotoxicity.

## **Effetto della melatonina sull'espressione di Nrf2 e NF-KappaB durante la ferita nella vescica urinaria dei ratti indotta dal ciclofosfamide**

L'urotossicità rappresenta uno dei maggiori problemi associati alla chemioterapia con ciclofosfamide (CP) nei pazienti con cancro. La melatonina è un potente antiossidante e riduce l'urotossicità del CP indotto. Tuttavia, non sono ancora chiari i meccanismi molecolari di protezione della melatonina. Il presente studio ha preso in considerazione il ruolo del fattore 2 legato all'eritroide nucleare 2 (Nrf2) e al fattore nucleare kappa B (NF-kappaB) sulla protezione mediata dalla melatonina sull'urotossicità indotta da CP. Il CP è stato amministrato in modo intraperitoneale in dosi di 150mg/kg per indurre l'urotossicità in ratti maschi Sprague-Dawley. Il trattamento con la melatonina (10 mg/kg) è stato iniziato nei tre giorni precedenti ed è continuato il giorno successivo la somministrazione di CP. Il trattamento con la melatonina riduce lo stress ossidativo indotto da CP e diminuisce il danneggiamento del DNA presente nella ferita urinaria così come osservato per mezzo dell'annullamento delle sostanze tiobarbituriche acido-reattive e dei livelli di glutatione e anche dal "comet test" (Il **test della cometa** noto anche come **elettroforesi su singola cellula** è un test di mutagenesi per l'identificazioni di danni al DNA in una cellula (solitamente di mammifero). Il test è conosciuto anche con le dizioni inglesi *comet assay*, *Single Cell Gel Electrophoresis* e il suo acronimo *SCGE*) ed ha anche modificato i parametri dello "studio cometa". Il trattamento con melatonina riduce il danno della vescica e l'apoptosi come osservato dalle analisi istologiche e dallo studio TUNEL. La melatonina ha aumentato l'espressione della trascrizione del fattore Nrf2 così come la fase associata alla fase II degli enzimi NASPH: la chinone ossidoreductasi-1 e l'eme ossigenasi-1. Inoltre, il trattamento con melatonina ha ridotto l'espressione della trascrizione del fattore NF-kappaB. I risultati del presente studio hanno dato prova che il trattamento con la melatonina altera in modo favorevole l'espressione di Nrf2 e NF-kappaB e sembra che ciò sia quanto meno responsabile dell'osservata protezione nei confronti dell'urotossicità indotta da CP.

40: Sánchez-Barceló EJ, Mediavilla MD, Tan DX, Reiter RJ.

### **Clinical uses of melatonin: evaluation of human trials.**

Curr Med Chem. 2010;17(19):2070-95.

During the last 20 years, numerous clinical trials have examined the therapeutic usefulness of melatonin in different fields of medicine. The objective of this article is to review, in depth, the science regarding clinical trials performed to date. The efficacy of melatonin has been assessed as a treatment of ocular diseases, blood diseases, gastrointestinal tract diseases, cardiovascular diseases, diabetes, rheumatoid arthritis, fibromyalgia, chronic fatigue syndrome, infectious diseases, neurological diseases, sleep disturbances, aging and depression. Melatonin has been also used as a complementary treatment in anaesthesia, hemodialysis, in vitro fertilization and neonatal care. The conclusion of the current review is that the use of melatonin as an adjuvant therapy seems to be well funded for macular degeneration, glaucoma, protection of the gastric mucosa, irritable bowel syndrome, arterial hypertension, diabetes, side effects of chemotherapy and radiation in cancer patients or hemodialysis in patients with renal insufficiency and, especially, for sleep disorders of circadian etiology (jet lag, delayed sleep phase syndrome, sleep deterioration associated with aging, etc.) as well as in those related with neurological degenerative diseases (Alzheimer, etc.) or Smith-Magenis syndrome. The utility of melatonin in anesthetic procedures has been also confirmed. More clinical studies are required to clarify whether, as the preliminary data suggest, melatonin is useful for treatment of fibromyalgia, chronic fatigue syndrome, infectious diseases, neoplasias or neonatal care. Preliminary data regarding the utility of melatonin in the treatment of ulcerative colitis, Crohn's disease, rheumatoid arthritis are either ambiguous or negative. Although in a few cases melatonin seems to aggravate some conditions, the vast majority of studies document the very low toxicity of melatonin over a wide range of doses.

### **Usi clinici della melatonina: valutazione dei trial umani.**

Nel corso degli ultimi 20 anni l'utilità della melatonina è stata studiata in molti trial clinici in diversi campi della medicina. Lo scopo di questo articolo è quello di recensire in profondità la scienza concernente i trial clinici effettuati fino ad oggi. L'efficacia della melatonina è stata accertata come trattamento nel caso di disturbi oculari, disturbi del sangue, malattie dell'apparato gastro-intestinale, disturbi cardio-vascolari, diabete, artrite reumatoide, fibromialgie, sindrome da affaticamento cronico, malattie infettive, disturbi neurologici, problemi d'insonnia, disturbi legati all'età e depressione. La melatonina è stata altresì utilizzata come trattamento complementare durante l'anestesia, l'emodialisi, la fertilizzazione in vitro e nella terapia neonatale. La conclusione del presente articolo è che l'uso della melatonina come terapia adiuvante sembra essere funzionante??? (well funded?=ben sovvenzionata) per quanto riguarda la degenerazione maculare, il glaucoma, la protezione della mucosa gastrica, la sindrome da intestino irritabile, ipertensione arteriosa, diabete, effetti collaterali della chemioterapia e della radioterapia nei pazienti con cancro o effetti collaterali dell'emodialisi in pazienti con insufficienza renale e specialmente nei disturbi del sonno d'etiologia circadiana (jet lag (essere scombuscolato per il cambiamento del fuso orario), sindrome da sonno posticipato, perdita del sonno dovuta all'invecchiamento, ecc.) così come per quanto riguarda le malattie neurologiche degenerative (alzheimer, ecc) o la sindrome di Smith.Magenis. E' stata altresì confermata l'utilità della melatonina nelle procedure d'anestesia. Sono necessari maggiori studi clinici per chiarire se, come sembrano suggerire i dati preliminari, la melatonina sia utile per il trattamento della fibromialgia, della sindrome da stanchezza cronica, delle malattie infettive, delle neoplasie e della terapia neonatale. I dati preliminari relativi all'utilità della melatonina nella cura delle coliti ulcerose, del morbo di Crohn e delle artriti reumatoide sono o ambigui o negativi. Inoltre la melatonina in rarissimi casi sembra aggravare alcune condizioni di salute, ma la maggioranza degli studi ha dimostrato la bassissima tossicità della melatonina attestata su una vasta gamma di dosi.

44: Hevia D, Mayo JC, Quiros I, Gomez-Cordoves C, Sainz RM.

### **Monitoring intracellular melatonin levels in human prostate normal and cancer cells by HPLC.**

Anal Bioanal Chem. 2010 Jun;397(3):1235-44.

Melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine) is a potent endogenous antioxidant and free radical scavenger that has attracted much attention as a consequence of its multiple biological functions. In addition to other physiological properties, it has clear antiproliferative activity in several types of cancer cell. The concentration of melatonin necessary to inhibit cell growth is much higher than its blood physiological concentrations in some tumor types. For years its indolic nature has impeded proper monitoring, by molecular or immunological techniques, of its uptake by cancer cells. In this work we developed a simple, rapid, and validated analytical method for detection and quantification of MEL inside normal and cancer cells. For this purpose we performed high-performance liquid chromatographic analysis after liquid-liquid extraction of the indole from biological samples. The method was validated, and the correlation coefficient for amounts from 0.125 to 1.25 microg was higher than 0.999, with a range of recovery near 100%. Precision was evaluated as repeatability, and for intermediate precision, the relative standard deviation was less than 5%. The method was used to study the stability of the indole in solution and to determine intracellular melatonin concentrations in normal (PNT1A) and several cancer (LNCaP, DU-145, PC-3) prostate cell lines. Intracellular LOQ/LOD were 7.23/2.83, 23.17/9.07, 4.03/1.83, and 6.51/2.53 nmol L(-1), or 1.82/4.66, 0.56/1.45, 3.26/8.34, and 2.02/5.17 attogram in each cell in PNT1A, LNCaP, DU145, and PC-3 cells, respectively. Because there was no information about intracellular levels of melatonin inside normal or tumor prostate cells after treatment with the indole, nor a relationship between its antiproliferative activity and its intracellular concentration, this is the first time that, by using an analytical method combined with measurement of cellular volume by flow cytometry, the intracellular concentration of MEL has been estimated. Also, data obtained here explain why the antiproliferative properties of MEL vary in different cell types. This is, moreover, the first time that by increasing the intracellular concentration of melatonin, its antitumor properties have been promoted in prostate cancer cells. This process can be monitored by the method developed here.

### **Monitoraggio dei livelli intracellulari di melatonina nella prostata umana normale e nelle cellule cancerogene di HPLC.**

La melatonina (N-acetil-5-metossitriptamina) è un potenziale antiossidante endogeno ed un eliminatore dei radicali liberi che ha attratto su di se una grande attenzione da parte degli studiosi per la sue funzioni biologiche multiple. In aggiunta ad altre proprietà fisiologiche, la melatonina ha un'evidente attività antiproliferativa in diversi tipi di cellule del cancro. In alcuni tipi di tumore la concentrazione di melatonina necessaria ad inibire la crescita cellulare è molto maggiore rispetto alla sua concentrazione fisiologica nel sangue. Per anni, la sua natura indolica, ha impedito un monitoraggio svolto in modo appropriato per mezzo di tecniche molecolari o immunomolecolari, della captazione della melatonina da parte delle cellule cancerogene. In questo lavoro abbiamo sviluppato un metodo semplice, rapido ed analiticamente convalidato per la detenzione e la qualificazione della MEL all'interno delle cellule normali del cancro. A tale proposito abbiamo effettuato delle analisi cromatografiche liquide ad alto rendimento dopo l'estrazione dell'indolo di liquido da liquido dai campioni biologici. Il metodo è stato validato, ed il coefficiente di correlazione per ammontare tra 0,15 e 1,25 microg era molto più alto di 0,999, con una gamma di guarigioni vicino al 100%. La precisione è stata valutata come ripetibilità, e per la precisione intermedia, la deviazione standard relativa era meno del 5%. Il metodo è stato usato per studiare la stabilità della soluzione dell'indolo, e per determinare le concentrazioni intracellulari di melatonina

nelle linee cellulari normali del cancro alla prostata (PNT1A) e in diverse linee cellulari cancerogene della prostata (LNCaP, DU-145, PC-3). Gli LOQ/LOD intracellulari erano 7.23/2.83, 23.17/9.07, 4.03/1.83, e 6.51/2.53 nmol L<sup>-1</sup>, o 1.82/4.66, 0.56/1.45, 3.26/8.34, e 2.02/5.17 attogrammi in ogni cellula PNT1A, LNCaP, DU145, e rispettivamente nelle cellule PC-3. Visto che dopo il trattamento con indolo non si sono ottenute informazioni relativamente ai livelli cellulari di melatonina all'interno delle cellule della prostata normale e di quelle tumorali e non si è neppure rintracciata una relazione tra l'attività antiproliferativa della melatonina e la sua concentrazione intracellulare, questa è la prima volta che, per mezzo di un metodo analitico abbinato ad una misurazione del volume cellulare della citometria di flusso, è stata valutata la concentrazione intracellulare della MEL. Inoltre, i dati ottenuti qui spiegano le proprietà antiproliferative della MEL in diversi tipi di cellule. Ciò accade, soprattutto la prima volta che mediante l'aumento della concentrazione della melatonina, le sue proprietà antitumorali sono state promosse nelle cellule del cancro alla prostata. Tale processo può essere monitorato dal metodo qui sviluppato.

## **Melatonin and doxorubicin synergistically induce cell apoptosis in human hepatoma cell lines.**

World J Gastroenterol. 2010 Mar 28;16(12):1473-81.

**AIM:** To investigate whether melatonin has synergistic effects with doxorubicin in the growth-inhibition and apoptosis-induction of human hepatoma cell lines HepG2 and Bel-7402.

**METHODS:** The synergism of melatonin and doxorubicin inhibited the cell growth and induced cell apoptosis in human hepatoma cell lines HepG2 and Bel-7402. Cell viability was analyzed by the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) assay. Cell apoptosis was evaluated using TUNEL method and flow cytometry. Apoptosis-related protein Bax, Bcl-2 and caspase-3 expressions were measured by immunohistochemical staining.

**RESULTS:** Treatment with melatonin (10(-8)-10(-5) mol/L) alone had a dose-related inhibitory effect on cell proliferation but no cytotoxic effect on hepatoma cell lines HepG2 and Bel-7402. Interestingly, when combined with doxorubicin, melatonin significantly increased the effects of cell growth inhibition and cell apoptosis. Furthermore, TUNEL staining and flow cytometry revealed that cooperative apoptosis induction was associated with decreased expression of Bcl-2 as well as increased expression of Bax and Caspase3.

**CONCLUSION:** The synergism of melatonin and doxorubicin inhibits hepatoma cell growth and induces cell apoptosis.

## **La combinazione di melatonina e doxorubicina induce all'apoptosi delle cellule nelle linee cellulari dell'epatoma umano.**

**SCOPO:** studiare se la melatonina ha degli effetti sinergici con la doxorubicina nell'inibizione della crescita e nell'induzione all'apoptosi nelle linee cellulari HepG2 e Bel-7402 dell'epatoma umano.

**METODI:** il sinergismo della melatonina e della doxorubicina hanno dimostrato di inibire la crescita cellulare e di indurre all'apoptosi delle cellule nelle linee cellulari HepG2 e Bel-7402 dell'epatoma umano. La viabilità cellulare è stata analizzata dallo studio 3-(4,5-dimetiltiazolo-2-yl)-2,5-difeniltetrazolo bromuro (MTT). L'apoptosi delle cellule invece è stata analizzata con il metodo TUNEL ed il metodo della citometria di flusso. La proteina Bax, Bcl-2 legata all'apoptosi e le espressioni della capcase-3, sono state misurate per mezzo della colorazione immunoistochimica.

**RISULTATI:** il trattamento con melatonina (10(-8)-10 (-5) mol/L) da solo ha avuto un effetto inibitorio sulla proliferazione cellulare a seconda della dose usata, ma non ha avuto alcun effetto citotossico sulle linee cellulari dell'epatoma HepG2 e Bel-7402. Interessante notare che, se in combinazione con la dosorubicina, la melatonina aumenta significativamente gli effetti dell'inibizione della crescita cellulare e l'apoptosi della cellula. Inoltre, gli studi TUNEL, della colorazione e citometria di flusso, hanno rilevato che l'induzione combinata all'apoptosi era associata con la diminuzione dell'espressione di Bcl-2 e con un aumento dell'espressione di Bax e della Caspasi 3.

**CONCLUSIONE:** il sinergismo della melatonina e della doxorubicina inibisce la crescita della cellula dell'epatoma ed induce all'apoptosi.

## Measuring serum melatonin in epidemiologic studies.

Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2010 Apr;19(4):932-7.

**BACKGROUND:** Epidemiologic data on serum melatonin, a marker of circadian rhythms, and cancer are sparse due largely to the lack of reliable assays with high sensitivity to detect relatively low melatonin levels in serum collected during daylight, as commonly available in most epidemiologic studies.

**METHODS:** To help expand epidemiologic research on melatonin, we assessed the reproducibility and refined a currently available melatonin RIA, and evaluated its application to epidemiologic investigations by characterizing melatonin levels in serum, urine, and/or plasma in 135 men from several ethnic groups.

**RESULTS:** Reproducibility was high for the standard 1.0-mL serum [mean coefficient of variation (CV), 6.9%; intraclass correlation coefficient (ICC), 97.4%; n = 2 serum pools in triplicate] and urine-based (mean CV, 3.5%; ICC, 99.9%) assays. Reproducibility for the 0.5-mL refined-serum assay was equally good (mean CV, 6.6%; ICC, 99.0%). There was a positive correlation between morning serum melatonin and 6-sulfatoxymelatonin in 24-hour urine ( $r = 0.46$ ;  $P = 0.008$ ; n = 49 subjects). Melatonin levels in serum-plasma pairs had a high correlation ( $r = 0.97$ ;  $P < 1 \times 10^{-4}$ ; n = 20 pairs). Morning serum melatonin levels were five times higher than those from the afternoon (before 9 a.m. mean, 11.0 pg/mL, versus after 11 a.m. mean, 2.0 pg/mL). Chinese men had lower melatonin levels (mean, 3.4 pg/mL), whereas Caucasian, African-American, and Ghanaian men had similar levels (mean, 6.7-8.6 pg/mL).

**CONCLUSIONS:** These results suggest that melatonin can be detected reliably in serum samples collected in epidemiologic studies in various racial groups.

**IMPACT:** With improved assays, it may be possible to investigate the role of melatonin and the emerging circadian rhythm hypothesis in cancer etiology in epidemiologic studies.

## Misurazione della melatonina sierica negli studi di epidemiologia.

**ANTEFATTO:** i dati epidemiologici sulla melatonina sierica, un marker (marcatore) dei ritmi circadiani, e sul suo rapporto con il cancro sono scarsi principalmente a causa della mancanza di studi attendibili che siano riusciti ad indagare i livelli relativamente bassi di melatonina nel siero che è stato raccolto nel corso della giornata, come di solito risultano nella maggior parte degli studi epidemiologici.

**METODI:** per aiutare a sviluppare la ricerca epidemiologica sulla melatonina, abbiamo valutato la riproducibilità, abbiamo purificato la melatonina RIA attualmente disponibile e abbiamo valutato la sua applicazione negli studi epidemiologici per mezzo di una caratterizzazione dei livelli di melatonina nel siero, urina, e/o plasma in 135 uomini appartenenti a diversi gruppi etnici.

**RISULTATI:** la riproducibilità era elevata per gli standard 1.0-mL siero (significa coefficiente di variazione (CV), 6.9; il coefficiente di correlazione tra le classi (ICC), 97.4%; n=2 poli del siero in triplice copia) e gli studi basati sull'urina (significa CV, 3.5; ICC, 99.9%).

La riproducibilità secondo lo studio 0.5-mL siero-ripulito, era altrettanto buona (significa CV, 6.6; ICC, 99.0%). C'era una correlazione positiva tra la melatonina sierica della mattina e l'urina 6-solfatossimelatonina delle 24 ore (soggetti  $r=0.46$ ;  $P=0,008$ ;  $n=49$ ). I livelli di melatonina nelle coppie sieriche del plasma aveva una alta correlazione ( $r = 0.97$ ;  $P < 1 \times 10^{-4}$ ; n = 20 coppie). La mattina i livelli di melatonina sierica erano cinque volte più alti rispetto a quelli del pomeriggio (prima delle 9 del mattino media, 11.0 pg/mL, contro dopo le 11,00 del mattino media 2,0 pg/mL). Gli uomini cinesi presentavano livelli di melatonina più bassa (media, 3.4 pg/ml), mentre i caucasici, gli afro-americani, e gli uomini del Ghana mostravano livelli simili (media 6.7-8.6 pg/mL)

**CONCLUSIONE:** tali risultati suggeriscono che la melatonina può essere ricercata in modo attendibile nei campioni di siero raccolti durante gli studi di epidemiologia in vari gruppi razziali.

54: González A, Martínez-Campa C, Mediavilla MD, Alonso-González C, Alvarez-García V, Sánchez-Barceló EJ, Cos S.

**Inhibitory effects of melatonin on sulfatase and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity and expression in glioma cells.**

Oncol Rep. 2010 Apr; 23(4):1173-8.

Melatonin interacts with estradiol at the estrogen receptor level in different kinds of neoplasias and also regulates the expression and the activity of some enzymes involved in the biosynthesis of estrogens in peripheral tissues. Glioma cells express estrogen receptors and have the ability to synthesize estrogens locally. Since melatonin inhibits the growth of C6 cells, and this indoleamine has been demonstrated to be capable of decreasing aromatase expression and activity in these cells, the aim of the present study was to analyze whether the regulation of the sulfatase, the enzyme that catalyzes the rate-limiting step in the conversion of estrogen sulfates to estrogens, and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase, the enzyme which converts the relatively inactive estrone to the most potent 17beta-estradiol, could be involved in the inhibition of glioma cell growth by melatonin. We found that melatonin decreases the growth of C6 glioma cells and reduces the sulfatase and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity. Finally, we demonstrated that melatonin downregulates sulfatase and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase mRNA steady state levels in these glioma cells. By analogy to the implications of these enzymes in other forms of estrogen-sensitive tumors, it is conceivable that their modulation by melatonin may play a role in the growth of glioblastomas.

**Effetti inibitori della melatonina sull'attività della solfatide e del 17 beta-idrossisteroide deidrogenasi, e sulle espressioni nelle cellule del tumore glioma.**

La melatonina interagisce con l'estradiolo a livello dell'estrogeno recettore in diversi tipi di neoplasia ed inoltre regola l'espressione e l'attività di alcuni enzimi coinvolti nella biosintesi degli estrogeni nei tessuti periferici. Le cellule del glioma esprimono i recettori degli estrogeni e hanno la capacità di sintetizzare gli estrogeni localmente. Poiché la melatonina inibisce la crescita delle cellule C6, ed è stato dimostrato che questa indoleamina è in grado di diminuire l'espressione dell'enzima aromatasi e l'attività in queste cellule, lo scopo del presente studio è stato quello di analizzare se la regolazione della solfatase, l'enzima che catalizza il limite del passo in percentuale nella conversione dei solfati in estrogeni, e il 17beta-idrossisteroide deidrogenase, l'enzima che converte l'estrogeno relativamente inattivo nel più potente 17beta-estradiolo, potrebbero essere coinvolti nell'inibizione della crescita della cellula del glioma per mezzo della melatonina. Abbiamo scoperto che la melatonina diminuisce la crescita delle cellule del glioma e riduce la solfatasi e l'attività di deidrogenasi del 17beta idrossisteroide. Infine, abbiamo dimostrato che la melatonina sottoregola la solfatase e lo stato dei livelli costanti del mrRNA 17beta-idrossisteroide deidrogenasi in queste cellule del glioma. Per analogia con le implicazioni di questi enzimi in altre forme di tumori sensibili all'estrogeno, è immaginabile che la loro modulazione da parte della melatonina possa avere un ruolo sulla crescita dei glioblastomi.

55: Schernhammer ES, Berrino F, Krogh V, Secreto G, Micheli A, Venturelli E, Grioni S, Sempos CT, Cavalleri A, Schünemann HJ, Strano S, Muti P.

## **Urinary 6-Sulphatoxymelatonin levels and risk of breast cancer in premenopausal women: the ORDET cohort.**

Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2010 Mar; 19(3):729-37.

**BACKGROUND:** Lower urinary melatonin levels are associated with a higher risk of breast cancer in postmenopausal women. Literature for premenopausal women is scant and inconsistent.

**METHODS:** In a prospective case-control study, we measured the concentration of 6-sulphatoxymelatonin (aMT6s) in the 12-hour overnight urine of 180 premenopausal women with incident breast cancer and 683 matched controls.

**RESULTS:** In logistic regression models, the multivariate odds ratio (OR) of invasive breast cancer for women in the highest quartile of total overnight aMT6s output compared with the lowest was 1.43 [95% confidence interval (CI), 0.83-2.45; P(trend) = 0.03]. Among current nonsmokers, no association was existent (OR, 1.00; 95% CI, 0.52-1.94; P(trend) = 0.29). We observed an OR of 0.68 between overnight urinary aMT6s level and breast cancer risk in women with invasive breast cancer diagnosed >2 years after urine collection and a significant inverse association in women with a breast cancer diagnosis >8 years after urine collection (OR, 0.17; 95% CI, 0.04-0.71; P(trend) = 0.01). There were no important variations in ORs by tumor stage or hormone receptor status of breast tumors.

**CONCLUSION:** Overall, we observed a positive association between aMT6s and risk of breast cancer. However, there was some evidence to suggest that this might be driven by the influence of subclinical disease on melatonin levels, with a possible inverse association among women diagnosed further from recruitment. Thus, the influence of lag time on the association between melatonin and breast cancer risk needs to be evaluated in further studies.

## **Livelli urinari di 6-sulfatossimelatonina e rischio di cancro al seno in donne in premenopausa: lo studio di gruppo ORDET .**

**ANTEFATTO:** bassi livelli di melatonina urinaria sono associati ad un alto rischio di carcinoma al seno in donne in post menopausa. La letteratura relativa alle donne in premenopausa è scarsa e inconsistente.

**METODI:** in uno studio case-control, abbiamo misurato la concentrazione della 6-sulfatossimelatonina (aMT6s) nell'urina raccolta nelle 12 ore durante la notte in 180 donne in premenopausa con carcinoma al seno e abbiamo effettuato 683 controlli incrociati.

**RISULTATI:** nei modelli di regressione logistica, il rapporto multivariato di "odds ratio" (OR = L'Odds Ratio si basa su di una tabella che è alla base di tutto, una tabella a doppia entrata relativa a due variabili dicotomiche: Fattore di Rischio ed Insorgenza Malattia ) di un carcinoma invasivo per le donne nel più alto quartile di un'intera notte aMT6s l se comparato con il risultato più basso è stato di 1.43 (95% intervallo di confidenza o intervallo di fiducia (CI), 0.83 – 2.45; P (andamento) = 0.03). Tra i non fumatori correnti, non c'era nessuna associazione esistente (OR, 1.00; 95% CI, 0.52-1.94; P(trend) = 0.29). Abbiamo osservato un OR di 0.68 tra il livello urinario aMT6s della notte e il rischio di carcinoma al seno in donne alle quali è stato diagnosticato un carcinoma invasivo al seno > a 2 anni dopo la raccolta delle urine ed una significativa associazione inversa nelle donne con diagnosi di carcinoma al seno > 8 anni dopo la raccolta delle urine (OR, 0.17; 95% CI, 0.04-0.71; P(trend)=0.01). Non c'erano delle variazioni importanti degli OR dagli stadi tumorali o dagli stati del recettore ormonale dei carcinomi al seno.

**CONCLUSIONE:** complessivamente, abbiamo osservato un'associazione positiva tra aMT6s e il rischio del carcinoma al seno. Tuttavia, c'erano delle prove che suggerivano la possibilità che essa possa essere guidata dall'influenza del disturbo subclinico sui livelli della melatonina, con una possibile associazione inversa tra le donne alle quali era stata fatta una diagnosi di tumore e che non facevano parte di coloro che erano state scelte per lo studio. Conseguentemente, l'influenza del

ritardo nella associazione tra la melatonina e il rischio del carcinoma al seno deve essere presa in considerazioni negli studi futuri.

63: Rodella LF, Filippini F, Bonomini F, Bresciani R, Reiter RJ, Rezzani R.

### **Beneficial effects of melatonin on nicotine-induced vasculopathy.**

J Pineal Res. 2010 Mar;48(2):126-32.

Tobacco smoking is responsible for death of many people each year and increases the risk of developing numerous disorders, particularly cardiovascular disease and cancer. Among the components of cigarette smoke, nicotine is known to exert proatherosclerotic, prothrombotic and proangiogenic effects on vascular endothelial cells. The current study was designed to investigate the mechanisms by which nicotine induces endothelial dysfunction and further to examine whether melatonin protects against nicotine-induced vasculopathy. Four groups of male rats (controls, melatonin-treated, nicotine treated [100 microg/mL in drinking water], and nicotine plus melatonin [5 mg/kg/day] treated) were used in this study. After 28 days all the animals were killed by decapitation and the aorta was removed. We evaluated the hydroxyproline content, and the different expression of proteins involved in several types of stress (ERK1/2), in fibrosis (TGF-beta1, NF-kappaB) and in recruitment of circulating leukocytes onto the vessel wall, including intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and vascular cellular adhesion molecule-1 (VCAM-1). These metabolic pathways are important in the development of nicotine-induced atherosclerosis and hypertension. Our results show that nicotine induces marked structural and functional alterations in the aorta. Nicotine receptor binding results in activation and phosphorylation of ERK 1/2. This enzyme, in turn, activates both TGF-beta1 and NF-kappaB; they stimulate respectively the synthesis of type I collagen, responsible of fibrosis, and moreover ICAM-1, VCAM-1 and reactive oxygen species. Based on these findings, melatonin is able to minimize the negative effects of nicotine by blocking the activation of ERK and the other signalling pathways in which this enzyme is involved.

### **Effetti benefici della melatonina nella vasculopatia indotta da nicotina.**

Il fumo del tabacco è responsabile della morte di molte persone ogni anno, ed aumenta il rischio di sviluppare diverse malattie, in particolare disturbi cardiovascolari e cancro. Tra i componenti del fumo della sigaretta, è noto che la nicotina ha degli effetti proaterosclerotici, protrombotici e proangiogenici sulle cellule vascolari endoteliali. Il presente studio è stato realizzato per investigare i meccanismi secondo i quali la nicotina produce una disfunzione endoteliale e successivamente per esaminare se la melatonina abbia un'azione protettiva nei confronti nella vasculopatia indotta da nicotina. In questo studio sono stati utilizzati quattro gruppi di ratti maschi (gruppo di controllo, gruppo trattato con la melatonina, gruppo trattato con la nicotina (100 microg/mL in acqua potabile), e gruppo trattato con la melatonina più la nicotina (5 mg/kg/day)). Dopo 28 giorni tutti gli animali sono stati uccisi per decapitazione ed è stata loro asportata l'aorta. Abbiamo analizzato il contenuto dell'amminoacido idrossiprolina e le diverse espressioni delle proteine coinvolte nei diversi tipi di stress (ERK1/2), nelle fibrosi (TGF-beta1-kappaB) e nella crescita graduale dei leucociti circolanti nella parete del vaso, incluso l'adesione intercellulare della molecola 1 (ICAM-1) e l'adesione cellulare vascolare della molecola 1 (VCAM-1). Queste vie metaboliche sono importanti nello sviluppo dell'aterosclerosi e ipertensione. I nostri risultati mostrano che la nicotina è causa di marcate alterazioni funzionali e strutturali nell'aorta. Il legame del recettore della nicotina risulta nell'attivazione e della fosforilazione di ERK 1 / 2. Questo enzima, attiva a turno sia il TGF-beta1 e NF-kappaB; essi stimolano rispettivamente la sintesi del collagene tipo I, responsabile della fibrosi, e soprattutto ICAM-1, VCAM-1 e le specie reattive all'ossigeno. Sulla base di queste scoperte, la melatonina è in grado di minimizzare gli effetti negativi della nicotina

mediante il blocco dell'attivazione di ERK e delle altre vie di segnale nelle quali è coinvolto questo enzima.

64: Hill SM, Frasch T, Xiang S, Yuan L, Duplessis T, Mao L.

### **Molecular mechanisms of melatonin anticancer effects.**

Integr Cancer Ther. 2009 Dec;8(4):337-46.

The authors have shown that, via activation of its MT1 receptor, melatonin modulates the transcriptional activity of various nuclear receptors and the proliferation of both ER alpha+ and ER alpha- human breast cancer cells. Employing dominant-negative (DN) and dominant-positive (DP) G proteins, it was demonstrated that G alpha i2 proteins mediate the suppression of estrogen-induced ER alpha transcriptional activity by melatonin, whereas the G alpha q proteins mediate the enhancement of retinoid-induced RAR alpha transcriptional activity by melatonin. In primary human breast tumors, the authors' studies demonstrate an inverse correlation between ER alpha and MT1 receptor expression, and confocal microscopic studies demonstrate that the MT1 receptor is localized to the caveoli and that its expression can be repressed by estrogen and melatonin. Melatonin, via activation of its MT1 receptor, suppresses the development and growth of breast cancer by regulation of growth factors, regulation of gene expression, regulation of clock genes, inhibition of tumor cell invasion and metastasis, and even regulation of mammary gland development. The authors have previously reported that the clock gene, Period 2 (Per2), is not expressed in human breast cancer cells but that its reexpression in breast cancer cells results in increased expression of p53 and induction of apoptosis. The authors demonstrate that melatonin, via repression of ROR alpha transcriptional activity, blocks the expression of the clock gene BMAL1. Melatonin's blockade of BMAL1 expression is associated with the decreased expression of SIRT1, a member of the Silencing Information Regulator family and a histone and protein deacetylase that inhibits the expression of DNA repair enzymes (p53, BRCA1 & 2, and Ku70) and the expression of apoptosis-associated genes. Finally, the authors developed an MMTV-MT1-flag mammary knock-in transgenic mouse that displays reduced ductal branching, ductal epithelium proliferation, and reduced terminal end bud formation during puberty and pregnancy. Lactating female MT1 transgenic mice show a dramatic reduction in the expression of beta-casein and whey acidic milk proteins. Further analyses showed significantly reduced ER alpha expression in mammary glands of MT1 transgenic mice. These results demonstrate that the MT1 receptor is a major transducer of melatonin's actions in the breast, suppressing mammary gland development and mediating the anticancer actions of melatonin through multiple pathways.

### **Meccanismi molecolari alla base degli effetti anti cancro della melatonina.**

Gli autori hanno dimostrato che, mediante l'attivazione del suo recettore MT1 la melatonina modula l'attività trascrizionale dei diversi recettori nucleari e la proliferazione delle cellule umane cancerogene del seno ERalfa + ed ER alfa -. Con l'utilizzo di proteine (DN) dominanti negative e (DP) dominanti positive, è stato dimostrato che le proteine G alfa i2 mediano, grazie alla melatonina, la soppressione dell'attività trascrizionale di ER alfa estrogeno indotta; laddove le proteine G alfa q mediano, grazie alla melatonina l'aumento dell'attività trascrizionale di RAR alfa indotta dai retinoidi. Nei carcinomi umani primari al seno, gli studi degli autori dimostrano una correlazione inversa tra l'espressione del recettore MT1 e l'espressione del recettore ER alfa, e gli studi al microscopio dimostrano che il recettore MT1 è localizzato nei caveole (latino per piccole grotte, singolare: caveola) e che la sua espressione può essere repressa dall'estrogeno e dalla melatonina. La melatonina, per mezzo dell'attivazione del suo recettore MT1, sopprime lo sviluppo e la crescita del carcinoma al seno per mezzo della regolazione dei fattori della crescita, della

regolazione dell'espressione del gene, della regolazione dell'orologio genetico, dell'inibizione dell'invasione della cellula tumorale e delle metastasi, e perfino per mezzo della regolazione dello sviluppo della ghiandola mammaria. Gli autori hanno in precedenza relazionato che il gene che regola il ritmo sonno veglia, Period 2 (Per2), non è espresso nelle cellule del carcinoma umano, ma che la sua nuova espressione nelle cellule del carcinoma risulta nell'aumentata espressione di p53 e dall'induzione all'apoptosi. Gli autori dimostrano che la melatonina, per mezzo di una repressione dell'attività trascrizionale di ROR alfa, blocca l'espressione del gene che regola il ritmo sonno veglia BMAL1. Il blocco dell'espressione BMAL1 è associato alla diminuzione di SIRT1, un membro del regolatore silenzioso dell'informazione familiare e una deacetilase dell'istone e della proteina che inibisce l'espressione degli enzimi riparatori del DNA (p53, BRCA1 & 2, e Ku70) e l'espressione dei geni associati all'apoptosi. Infine, gli autori hanno sviluppato un topo transgenico che dimostra la ridotta diramazione duttale, la proliferazione duttale dell'epitelio e la ridotta formazione della struttura a forma di bulbo (TEB) durante la pubertà e la gravidanza. I topi femminili MT1 che allattano mostrano una notevole riduzione dell'espressione della beta-caseina e del siero acido delle proteine del latte. Ulteriori analisi hanno mostrato una significativa riduzione dell'espressione ER alfa nelle ghiandole mammarie dei topi transgenici MT1. Tali risultati dimostrano che il recettore MT1 rappresenta il maggior trasduttore delle azioni della melatonina nel seno, che sopprime lo sviluppo della ghiandola mammaria e media le azioni antitumorali della melatonina mediante vie multiple.

## **Antioxidant enzymatically modified isoquercitrin or melatonin supplementation reduces oxidative stress-mediated hepatocellular tumor promotion of oxfendazole in rats.**

Arch Toxicol. 2010 Feb;84(2):143-53.

To clarify whether enzymatically modified isoquercitrin (EMIQ) or melatonin (MLT) supplementation reduces oxidative stress-mediated hepatocellular tumor-promoting effect of oxfendazole (OX), a benzimidazole anthelmintic, male rats were administered a single intraperitoneal injection of N-diethylnitrosamine (DEN) and were fed a diet containing OX (500 ppm) for 10 weeks with or without EMIQ (2,000 ppm) or MLT (100 ppm) in the drinking water after DEN initiation. One week after the commencement of the administration of OX, rats were subjected to two-thirds of partial hepatectomy. The number of GST-P-positive foci promoted by OX was significantly inhibited by the combined antioxidant EMIQ or MLT administration, and the area of GST-P-positive foci was inhibited by the administration of MLT. Real-time RT-PCR analysis revealed decreases in mRNA expression levels of cytochrome P450, family 2, subfamily b, polypeptide 2 (Cyp2b2) and malic enzyme 1 (Me1) in the DEN-OX-EMIQ and DEN-OX-MLT groups and decreases in mRNA expression levels of Cyp1a1 and aldo-keto reductase family 7, member A3 (Akr7a3) in the DEN-OX-MLT group compared to those in the DEN-OX group. In vitro ROS production assay, inhibited production of NADPH-dependent ROS was observed by the treatment with EMIQ or MLT. These results suggest that coadministration of EMIQ or MLT suppresses the hepatocellular tumor-promoting activity of OX in rats through the decrease in ROS production by the activation of CYPs.

## **L'isoquercitrina antiossidante enzimaticamente modificato o l'integrazione di melatonina, riduce la produzione di oxfendazolo nei topi con tumore epatocellulare mediato da stress ossidativo.**

Per chiarire se l'integrazione di isoquercitrina enzimaticamente modificata (EMIQ) o melatonina (MLT) riduca il tumore epatocellulare mediato da stress ossidativo per mezzo della promozione dell'effetto dell'oxfendazolo (OX), un benzimidazolo antielmintico, è stata fatta una singola iniezione intraperitoneale di N-dietilnitrosamine (DNE) a dei ratti e gli stessi sono stati nutriti in base ad una dieta che conteneva OX (500ppm) per 10 settimane con o senza EMIQ (2,000 ppm) o MLT (100 ppm) messo nell'acqua da bere dopo l'iniezione di DEN. La settimana successiva alla data d'inizio della somministrazione di OX, i due terzi dei ratti sono stati sottoposti ad epatectomia parziale. Il numero dei centri di GTS-P positivi promossi da OX è stato significativamente inibito per mezzo della somministrazione combinata dell'antiossidante EMIQ e di MLT, e l'area dei centri positivi GST-P- è stata inibita mediante la somministrazione di melatonina. Le analisi fatte in tempo reale hanno rivelato una diminuzione dell'espressione mRNA dei livelli di citocromo P450, famiglia 2, sottofamiglia b, polipeptide 2 (Cyp2b2) e dell'enzima malico 1 (Me1) nei gruppi DEN-OX-EMIQ e DEN-OX-MLT ed una diminuzione dell'espressione dei livelli di Cyp1a1 e della famiglia 7 di aldo-cheto, membro A3 (Akr7a3) nel gruppo DEN-OX-MLT confrontato con quelle del gruppo DEN-OX. Nello studio in vitro della produzione di ROS, la produzione di NADPH-dipendente ROS era inibita come da osservazioni conseguenti al trattamento con EMIQ o MLT. Tali risultati suggeriscono che la somministrazione concomitante di EMIQ o MLT sopprime la promozione dell'attività di OX del tumore epatocellulare nei ratti mediante una diminuzione della produzione di ROS per mezzo dell'attivazione di CYPs.

70: Casado-Zapico S, Rodriguez-Blanco J, García-Santos G, Martín V, Sánchez-Sánchez AM, Antolín I, Rodriguez C.

## **Synergistic antitumor effect of melatonin with several chemotherapeutic drugs on human Ewing sarcoma cancer cells: potentiation of the extrinsic apoptotic pathway.**

J Pineal Res. 2010 Jan;48(1):72-80.

Ewing sarcoma, the second most frequent bone cancer type, affects mainly adolescents, who have a survival of 50% 5 yr after diagnosis. Current treatments include a combination of surgery, radiotherapy and chemotherapy, which present potential serious side effects. Melatonin, a natural molecule without relevant side effects, has been previously shown to induce cytotoxicity in SK-N-MC cells, a Ewing sarcoma cell line. Here, we found that there is a synergy in the antitumor effect when melatonin (50  $\mu\text{M}$ ) is combined with vincristine at the concentration of 5-10 nm or with ifosfamide at the range of 100  $\mu\text{M}$ . This synergism is due to the potentiation of cell death, particularly to the potentiation of apoptosis, i.e., mainly the extrinsic apoptotic pathway. There is a significant increase in the activation of caspase-3, -8, -9 and Bid when melatonin is combined with vincristine or ifosfamide compared to the individual treatments. Finally, there is also a potentiation of the early free radical production, likely dependent on the extrinsic apoptosis pathway activation, when the drugs are combined with melatonin. Other proteins which are related to this pathway including mitogen-activated protein kinase or protein kinase B/Akt are not involved in apoptosis induced by these agents separately or when combined. The results shown here together with the facts that: (i) no relevant side effects have been reported for melatonin and (ii) melatonin has a cytoprotective effect on noncancer cells, opens the door for a new approach in the treatment of the Ewing sarcoma family of tumors.

## **L'effetto antitumorale sinergico della melatonina e di diversi farmaci chemioterapici nel sarcoma umano di Ewing : potenziamento del percorso apoptotico estrinseco.**

Il sarcoma di Ewing, il secondo tipo per diffusione di cancro delle ossa, colpisce principalmente gli adolescenti che presentano un tasso di sopravvivenza pari al 50% a cinque anni dalla diagnosi. I presenti trattamenti includono una combinazione di chirurgia, radioterapia e chemioterapia, che presentano seri effetti collaterali. La melatonina, una molecola naturale senza importanti effetti collaterali, ha già dimostrato indurre a citotossicità nelle cellule SK-N-MC, una linea cellulare del sarcoma di Ewing. Abbiamo inoltre riscontrato che c'è una sinergia tra l'effetto antitumorale quando la melatonina (50  $\mu\text{M}$ ) è associata alla vincristina in una concentrazione da 5-10 nm o con ifosfamide in una gamma che va da 100  $\mu\text{M}$  a 1 mM. Tale sinergismo è dovuto al potenziamento della cellula morta, ed in particolare al potenziamento dell'apoptosi, ossia, principalmente la via estrinseca apoptotica. Vi è un significativo aumento nell'attivazione della caspase-3, -8, -9 e Bid, quando la melatonina è associata alla vincristina o all'ifosfamide se confrontata al trattamento individuale. Infine, si è anche riscontrato un potenziamento della produzione precoce dei radicali liberi, probabilmente dipendente dall'attivazione della via estrinseca apoptotica, quando i farmaci sono uniti alla melatonina. Altre proteine che sono legate a questa via, inclusa la proteina kinasi mitogeno attivata o la proteina kinasi B/Akt, non sono coinvolte nell'apoptosi indotta da questi agenti separatamente o insieme. I risultati qui esposti insieme ai fatti portano alla conclusione che: 1) non è stato riscontrato alcun effetto collaterale della melatonina 2) la melatonina ha un effetto citoprotettivo sulle cellule non cancerogene e apre la porta per un nuovo approccio nel trattamento della famiglia dei tumori del sarcoma di Ewing.

71: Jung-Hynes B, Reiter RJ, Ahmad N.

## **Sirtuins, melatonin and circadian rhythms: building a bridge between aging and cancer.**

J Pineal Res. 2010 Jan;48(1):9-19.

Histone deacetylases (HDAC) have been under intense scientific investigation for a number of years. However, only recently the unique class III HDAC, sirtuins, have gained increasing investigational momentum. Originally linked to longevity in yeast, sirtuins and more specifically, SIRT1 have been implicated in numerous biological processes having both protective and/or detrimental effects. SIRT1 appears to play a critical role in the process of carcinogenesis, especially in age-related neoplasms. Similarly, alterations in circadian rhythms as well as production of the pineal hormone melatonin have been linked to aging and cancer risk. Melatonin has been found act as a differentiating agent in some cancer cells and to lower their invasive and metastatic status. In addition, melatonin synthesis and release occurs in a circadian rhythm fashion and it has been linked to the core circadian machinery genes (Clock, Bmal1, Periods, and Cryptochromes). Melatonin has also been associated with chronotherapy, the timely administration of chemotherapy agents to optimize trends in biological cycles. Interestingly, a recent set of studies have linked SIRT1 to the circadian rhythm machinery through direct deacetylation activity as well as through the nicotinamide adenine dinucleotide (NAD(+)) salvage pathway. In this review, we provide evidence for a possible connection between sirtuins, melatonin, and the circadian rhythm circuitry and their implications in aging, chronomodulation, and cancer.

## **Sirtuine, melatonina e ritmi circadiani: costruire un ponte tra l'invecchiamento e il cancro.**

Gli enzimi istone deacetilasi (HDAC) sono stati approfonditamente studiati scientificamente per diversi anni. Tuttavia, solamente recentemente la classe unica III HDAC, i geni della sirtina, hanno raggiunto un impulso di studio sempre crescente. I geni della sirtina, erano in origine legati alla longevità nel lievito, e più nello specifico, i SIRT1 sono stati implicati in numerosi processi biologici che hanno sia effetti protettivi e/o dannosi/nocivi. SIRT1 sembra avere un ruolo critico nel processo della carcinogenesi, specialmente nei neoplasmi legati all'età. In modo simile, le alterazioni nei ritmi circadiani, così come la produzione della melatonina – ormone pineale, sono stati legati all'età ed ai rischi di cancro. Si è scoperto che la melatonina agisce come agente discriminante in alcune cellule tumorali e che abbassa il loro status invasivo e metastatico. Inoltre, il fatto che la sintesi della melatonina ed il suo rilascio avvengono seguendo il ritmo circadiano è stato collegato alla base dei meccanismi circadiani (orologio, Bmal1, intervalli e criptocromi). La melatonina è stata anche associata alla cronoterapia, la gestione del tempo degli agenti chemioterapici per ottimizzare le tendenze nei cicli biologici. Un recente set di studi è risultato interessante per aver legato SIRT1 al meccanismo del ritmo circadiano mediante un'attività diretta di deacetilazione così come attraverso la via del materiale di recupero del nicotinamide adenina dinucleotide (NAD(+)). In questa recensione, abbiamo dimostrato una possibile connessione tra le sirtuine, la melatonina ed il circuito del ritmo circadiano e le loro implicazioni nell'invecchiamento, nella cronomodulazione e nel cancro.

## **Inhibition of procarcinogen-bioactivating human CYP1A1, CYP1A2 and CYP1B1 enzymes by melatonin.**

J Pineal Res. 2010 Jan;48(1):55-64.

Administration of melatonin to rodents decreases the incidence of tumorigenesis initiated by benzo[a]pyrene or 7,12-dimethylbenz[a]anthracene, which requires bioactivation by cytochrome P450 enzymes, such as CYP1A1, CYP1A2 and CYP1B1, to produce carcinogenic metabolites. The present study tested the hypothesis that melatonin is a modulator of human CYP1 catalytic activity and gene expression. As a comparison, we also investigated the effect of melatonin on the catalytic activity of CYP2A6, which is also a procarcinogen-bioactivating enzyme. Melatonin (3-300 microm) decreased 7-ethoxyresorufin O-dealkylation catalyzed by human hepatic microsomes and recombinant CYP1A1, CYP1A2 and CYP1B1, whereas it did not affect coumarin 7-hydroxylation catalyzed by hepatic microsomes or recombinant CYP2A6. Melatonin inhibited CYP1 enzymes by mixed inhibition, with apparent  $K(i)$  values (mean  $\pm$  S.E.M.) of 59  $\pm$  1 (CYP1A1), 12  $\pm$  1 (CYP1A2), 14  $\pm$  2 (CYP1B1) and 46  $\pm$  8 microm (hepatic microsomes). Additional experiments indicated that melatonin decreased benzo[a]pyrene hydroxylation catalyzed by hepatic microsomes and CYP1A2 but not by CYP1A1 or CYP1B1. Treatment of MCF-10A human mammary epithelial cells with melatonin (up to 300 microm) did not affect basal or benzo[a]pyrene-inducible CYP1A1 or CYP1B1 gene expression. Consistent with this finding, melatonin did not influence reporter activity in aryl hydrocarbon receptor-dependent pGudluc6.1-transfected MCF-10A cells treated with or without benzo[a]pyrene, as assessed in an in vitro cell-based luciferase reporter gene assay. Overall, melatonin is an in vitro inhibitor of human CYP1 catalytic activity, and it may be useful to develop potent analogues of melatonin as potential cancer chemopreventive agents that block CYP1-mediated chemical carcinogenesis.

## **Inibizione degli enzimi umani procarcinogeno bioattivanti CYP1A1 CYP1A2 e CYP1B1 per mezzo della melatonina.**

La somministrazione di melatonina ai roditori diminuisce l'incidenza della tumorigenesi indotta da benzo(a)pirene o 7,12-dimethylbenzantracene, che richiede la bioattivazione per mezzo degli enzimi P450, come ad esempio CYP1A1, CYP1A2 e CYP1B1, per produrre metabolici carcinogeni. Il presente studio ha esaminato l'ipotesi che la melatonina sia un modulatore dell'attività catalitica del CYP1 e dell'espressione del gene. Per fare un confronto, abbiamo inoltre studiato gli effetti della melatonina sull'attività catalitica del CYP2A6, che è anche un enzima procarcinogeno bioattivante. La melatonina (3-300 microm) ha diminuito la 7-etossiressofurino O-dealkitazione catalizzata da microsomi umani epatici e da un ricombinante CYP1A1, CYP1A2 e il CYP1B1, laddove non ha inciso la curarina 7-idrossilazione catalizzata dai microsomi epatico il ricombinante CYP2A6. L'enzima CYP1 inibito dalla melatonina per mezzo di una inibizione mista con valori apparenti  $K(i)$  (significa  $\pm$  S.E.M.) di 59  $\pm$  1 (CYP1A1), 12  $\pm$  1 (CYP1A2), 14  $\pm$  2 (CYP1B1) e 46  $\pm$  8 microm (microsomi epatici). Ulteriori esperimenti hanno dimostrato che la melatonina diminuisce l'idrossilazione del benzopirene catalizzato per mezzo dei microsomi epatici e di CYP1A2, ma non del CYP1A1 o del CYP1B1. Il trattamento delle cellule mammarie umane epiteliali MCF-10A con melatonina (fino a 300 microm) non ha avuto effetti sul CYP1B1 basale o benzopirene-inducibile o sull'espressione del gene CYP1A1. Coerentemente con tale scoperta, la melatonina non ha influenzato l'attività di reporter (forse trasmettitore) nel recettore-dipendente idrocarbore pGudluc6.1 trasferito nelle cellule arili trattate con o senza benzopirene, come accertato nello studio del gene reporter nella luciferase in vitro MCF-10A trasferite. La melatonina è soprattutto un inibitore umano in vitro dell'attività catalitica di CYP1 e potrebbe essere utile sviluppare dei potenti analoghi della melatonina da usare come potenziali agenti chemiopreventivi del cancro che bloccano la carcinogenesi chimica mediata da CYP1.

81: Girgert R, Hanf V, Emons G, Gründker C.

**Signal transduction of the melatonin receptor MT1 is disrupted in breast cancer cells by electromagnetic fields.**

Bioelectromagnetics. 2010 Apr;31(3):237-45.

The growth of estrogen-receptor positive breast cancer cells is inhibited by the pineal gland hormone, melatonin. Concern has been raised that power-line frequency and microwave electromagnetic fields (EMFs) could reduce the efficiency of melatonin on breast cancer cells. In this study we investigated the impact of EMFs on the signal transduction of the high-affinity receptor MT1 in parental MCF-7 cells and MCF-7 cells transfected with the MT1 gene. The binding of the cAMP-responsive element binding (CREB) protein to a promoter sequence of BRCA-1 after stimulation with melatonin was analyzed by a gel-shift assay and the expression of four estrogen-responsive genes was measured in sham-exposed breast cancer cells and cells exposed to a sinusoidal 50 Hz EMF of 1.2 microT for 48 h. In sham-exposed cells, binding of CREB to the promoter of BRCA-1 was increased by estradiol and subsequently diminished by treatment with melatonin. In cells exposed to 1.2 microT, 50 Hz EMF, binding of CREB was almost completely omitted. Expression of BRCA-1, p53, p21(WAF), and c-myc was increased by estradiol stimulation and subsequently decreased by melatonin treatment in both cell lines, except for p53 expression in the transfected cell line, thereby proving the antiestrogenic effect of melatonin at molecular level. In contrast, in breast cancer cells transfected with MT1 exposed to 1.2 microT of the 50 Hz EMF, the expression of p53 and c-myc increased significantly after melatonin treatment but for p21(WAF) the increase was not significant. These results convincingly prove the negative effect of EMF on the antiestrogenic effect of melatonin in breast cancer cells.

**Il segnale di trasduzione del recettore della melatonina MT1 è disgregato nelle cellule tumorali del cancro al seno dai campi elettromagnetici.**

La crescita delle cellule tumorali del seno positive per il recettore degli estrogeni è bloccata dall'ormone della ghiandola pineale chiamata melatonina. Ha riscosso un certo interesse il fatto che il potere della frequenza di linea ed i campi elettromagnetici del microonde (EMFs) possano ridurre l'efficacia della melatonina sulle cellule tumorali del seno. In questo studio abbiamo analizzato l'impatto del EMFs sul segnale di trasduzione del recettore MT1 che presenta una grand'affinità nelle cellule parentali MCF.7 e MCF-7 transfettate con il gene MT1. Il legame della proteina CREB (**cAMP responsive elements binding protein**) ad un attivatore di sequenza di BRCA-1 dopo la stimolazione con melatonina è stato analizzato per mezzo di uno studio gel-shift ed è stata anche misurata l'espressione di quattro geni estrogeno reattivi nelle cellule cancerogene del seno con falsa esposizione e nelle cellule esposte ad un sinusoidale 50 Hz EMF di 1.2 micro T per 48 ore. Nelle cellule di falsa esposizione il legame di CREB con l'attivatore di BRCA-1 è stato aumentato dall'estradiolo e successivamente diminuito dal trattamento con la melatonina. Nelle cellule esposte a 1.2 microT, 50 Hz EMF, che si legano a CREB è stato quasi completamente omesso. L'espressione di BRCA-1, p21 (WAF), e c-myc è stata aumentata per mezzo della stimolazione dell'estradiolo e successivamente diminuita grazie al trattamento con melatonina in entrambe le linee cellulari, ad eccezione dell'espressione di p53 nelle linee cellulari transfettate, provocando in tal modo l'effetto antiestrogenico della melatonina a livello molecolare. Di contro, nelle cellule del seno transfettate con MT1 esposte a 1.2 micro T di 50 Hz EMF, l'espressione di p53 e di c-myc è aumentata significativamente dopo il trattamento con melatonina, ma per p21 (WAF) l'aumento non è stato significativo. Questi risultati hanno dimostrato in modo convincente l'effetto negativo d'EMF sugli effetti antiestrogenici della melatonina sulle cellule cancerogene del seno.

84: Danielczyk K, Dziegiel P.

## **The expression of MT1 melatonin receptor and Ki-67 antigen in melanoma malignum.**

Anticancer Res. 2009 Oct;29(10):3887-95.

**BACKGROUND:** Melatonin, the principal hormone produced by the pineal gland, manifests strong potency of inhibiting growth of dermal melanoma cells both under in vitro and in vivo conditions. Although the mechanism of the phenomenon has not been fully clarified yet, melatonin receptors seem to play a key role in the inhibition. In humans, two main types of high affinity membrane melatonin receptors have been identified, including MT1 (Mel1a) and MT2 (Mel1b) receptors, and their expression increases efficacy of the oncostatic melatonin activity. The principal aim of this study involved determination of location and intensity of expression of MT1 melatonin receptors and of Ki-67 proliferation-associated antigen in dermal melanoma using an immunohistochemical technique and an examination of their reciprocal correlation and their relationship with clinical advancement of the tumour, i.e. with its depth of infiltration.

**PATIENTS AND METHODS:** Immunohistochemical studies were conducted on the material of 48 cases of dermal melanoma, including 38 primary tumours and 10 metastatic lymph nodes, fixed in formalin and embedded in paraffin.

**RESULTS:** In all the examined cases, positive immunohistochemical reactions were obtained with antibodies to MT1 and Ki-67. Expression of MT1 receptor was more pronounced in primary tumours than in lymph nodes ( $p < 0.05$ ). Depth of tumour infiltration demonstrated a moderate positive correlation with the intensity of MT1 expression ( $r = 0.45$ ;  $p < 0.05$ ) and a strongly positive correlation with the expression of Ki-67 antigen ( $r = 0.79$ ;  $p < 0.05$ ). Moreover, both in primary tumours and in metastatic lymph nodes, a weak correlation was detected between the expression of MT1 receptor and expression of Ki-67 antigen.

**CONCLUSION:** Confirmation of positive correlation between the expression of MT1 receptor and depth of melanoma infiltration may point to future use of MT1 as a prognostic index for such tumours.

## **L'espressione del recettore della melatonina MT1 e dell'antigene Ki-67 nel melanoma maligno.**

Antefatto: La melatonina, il principale ormone prodotto dalla ghiandola pineale, manifesta una gran capacità di inibire la crescita delle cellule del melanoma della pelle sia in vitro che in vivo. Sebbene il meccanismo del fenomeno non sia stato ancora pienamente spiegato, i recettori della melatonina sembrano giocare un ruolo chiave nel processo d'inibizione. Negli umani, sono stati identificati due principali tipi di membrana di alta affinità dei recettori della melatonina, incluso i recettori MT1 (Mel 1a) e MT2 (Mel1b) e la loro espressione aumenta l'efficacia dell'attività oncostatica della melatonina. Lo scopo principale di questo studio ha coinvolto la determinazione della localizzazione e l'intensità dell'espressione dei recettori della melatonina MT1 e dell'antigene associato alla proliferazione Ki-67 nel melanoma della pelle usando una tecnica immunoistochimica e mediante l'esame delle loro reciproche correlazioni e della loro relazione con la progressione clinica del tumore, cioè con la sua profondità di infiltrazione.

**PAZIENTI E METODO:** gli studi immunoistochimici sono stati condotti su un materiale di 48 casi di melanoma della pelle, inclusi 38 tumori primari e 10 linfonodi metastatici, fissati nella formalina ed inseriti nella paraffina.

**RISULTATI:** in tutti i casi presi in esame, sono state ottenute delle reazioni immunoistochimiche positive con gli anticorpi MT1 e Ki-67. L'espressione del recettore MT1 è risultata maggiormente pronunciata nei tumori primari piuttosto che nei linfonodi ( $p < 0,05$ ). La profondità dell'infiltrazione

tumorale ha dimostrato una moderata correlazione positiva con l'intensità dell'espressione MT1 ( $r=0,45$ ;  $p<0,05$ ) ed una forte correlazione positiva con l'espressione dell'antigene Ki-67 ( $r=0,79$ ;  $p<0,05$ ). Inoltre, sia nei tumori primari che in quelli che presentano linfo nodi metastatici, è stata individuata una leggera correlazione tra l'espressione del recettore MT1 e l'espressione dell'antigene Ki-67.

**CONCLUSIONE:** una conferma della correlazione positiva tra l'espressione del recettore MT1 e la profondità dell'infiltrazione del melanoma può essere alla base di un uso futuro della MT1 come indice di prognosi per questo tipo di tumori.

85: Danielczyk K, Dziegiel P.

**MT1 melatonin receptors and their role in the oncostatic action of melatonin**

[Article in Polish]

Postepy Hig Med Dosw Online). 2009 Sep. 15;63:425-34.

Melatonin, the main hormone produced by the pineal gland, strongly inhibits the growth of cancer cells in vitro and in vivo. Some publications indicate that the addition of melatonin to culture medium slows the proliferation of some cancer cell lines. It is also suggested that melatonin used as an adjuvant benefits the effectiveness and tolerance of chemotherapy. The mechanisms of this are not fully understood, but melatonin receptors might be one of the most important elements. Two distinct types of membrane-bound melatonin receptors have been identified in humans: MT1 (Mella) and MT2 (Mellb) receptors. These subtypes are 60% homologous at the amino-acid level. MT1 receptors are G-protein-coupled receptors. Through the  $\alpha$  subunit of G protein, melatonin receptors stimulate an adenylate cyclase and decrease the level of cAMP. This has a significant influence on cell proliferation and has been confirmed in many tests on different cell lines, such as S-19, B-16 murine melanoma cells, and breast cancer cells. It seems that expression of the MT1 melatonin receptors benefits the efficacy of melatonin treatment. Melatonin and its receptors may provide a promising way to establish new alternative therapeutic approaches in human cancer prevention

85: Danielczyk K, Dziegiel P.

### **I recettori della melatonina MT1 ed il loro ruolo nell'azione oncostatica della melatonina**

La melatonina, il più importante ormone della crescita prodotto dalla ghiandola pineale, inibisce notevolmente la crescita delle cellule cancerogene sia in vitro che in vivo. Alcune pubblicazioni hanno messo in luce che l'aggiunta di melatonina ad un ambiente di coltura, rallenta la proliferazione di alcune linee cellulari cancerogene. Inoltre, suggerisce che la melatonina usata come adiuvante abbia dei benefici sull'efficacia e sulla tollerabilità della chemioterapia. Non sono ancora del tutto chiari i meccanismi che stanno alla base di ciò, ma i recettori della melatonina potrebbero essere considerati uno dei più importanti elementi alla base dei sopra citati meccanismi. Sono stati identificati negli uomini, due tipi distinti di recettori della melatonina legati alla membrana: MT1 (Mella) e MT2 (Mellb). Questi due sottotipi sono al 60% omologhi a livello degli amminoacidi. I recettori MT1 sono dei recettori di proteina G accoppiati. Per mezzo della sottounità di proteina G, i recettori della melatonina stimolano un enzima ciclase adenilato e diminuiscono il livello di cAMP. Ciò presenta una significativa influenza nella proliferazione cellulare ed è stata confermata da molti test relativi a diverse linee cellulari, come ad esempio sulle cellule del melanoma del murino S-19, B-16, e nelle cellule del carcinoma al seno. Sembra che l'espressione dei recettori della melatonina MT1 favorisca l'efficacia del trattamento con la melatonina. La melatonina ed i suoi recettori possono rappresentare un percorso promettente per degli approcci terapeutici alternativi nella prevenzione del cancro.

86: Davanipour Z, Poulsen HE, Weimann A, Sobel E.

### **Endogenous melatonin and oxidatively damaged guanine in DNA.**

BMC Endocr Disord. 2009 Oct 18;9:22.

**BACKGROUND:** A significant body of literature indicates that melatonin, a hormone primarily produced nocturnally by the pineal gland, is an important scavenger of hydroxyl radicals and other reactive oxygen species. Melatonin may also lower the rate of DNA base damage resulting from hydroxyl radical attack and increase the rate of repair of that damage. This paper reports the results of a study relating the level of overnight melatonin production to the overnight excretion of the two primary urinary metabolites of the repair of oxidatively damaged guanine in DNA.

**METHODS:** Mother-father-daughter(s) families (n = 55) were recruited and provided complete overnight urine samples. Total overnight creatinine-adjusted 6-sulphatoxymelatonin (aMT6s/Cr) has been shown to be highly correlated with total overnight melatonin production. Urinary 8-oxo-7,8-dihydro-guanine (8-oxoGua) results from the repair of DNA or RNA guanine via the nucleobase excision repair pathway, while urinary 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodG) may possibly result from the repair of DNA guanine via the nucleotide excision repair pathway. Total overnight urinary levels of 8-oxodG and 8-oxoGua are therefore a measure of total overnight guanine DNA damage. 8-oxodG and 8-oxoGua were measured using a high-performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry assay. The mother, father, and oldest sampled daughter were used for these analyses. Comparisons between the mothers, fathers, and daughters were calculated for aMT6s/Cr, 8-oxodG, and 8-oxoGua. Regression analyses of 8-oxodG and 8-oxoGua on aMT6s/Cr were conducted for mothers, fathers, and daughters separately, adjusting for age and BMI (or weight).

**RESULTS:** Among the mothers, age range 42-80, lower melatonin production (as measured by aMT6s/CR) was associated with significantly higher levels of 8-oxodG ( $p < 0.05$ ), but not with 8-oxoGua. Among the fathers, age range 46-80, lower melatonin production was associated with marginally higher levels of 8-oxoGua ( $p < 0.07$ ), but not with 8-oxodG. Among the daughters, no relationship was found between melatonin levels and either 8-oxodG or 8-oxoGua levels. When the mother and father data were further analyzed using only subjects older than the oldest daughter, the associations became somewhat stronger.

**CONCLUSION:** Low levels of endogenous melatonin production among older individuals may lead to higher levels of oxidatively damaged guanine in DNA, thereby possibly increasing the risk of developing cancer. The possible different effects of melatonin in the rates of utilization of pathways for repair of oxidatively damaged guanine in DNA identified between older women and older men are intriguing.

### **Melatonina endogena e guanina danneggiata per ossidazione nel DNA.**

**ANTEFATTO:** un corpo significante della letteratura indica che la melatonina, un ormone primariamente prodotto la notte dalla ghiandola pineale, è un importante eliminatore di radicali idrossili e di altre specie di ossigeno. La melatonina può anche abbassare il tasso delle lesioni di base del DNA risultante dall'attacco del radicale idrossile, nonché aumentare il tasso di riparazione della lesione stessa. Questo articolo riporta i risultati di uno studio relativo al livello di produzione della melatonina durante la notte per mezzo della secrezione dei due principali metaboliti urinari primari della riparazione della guanina del DNA danneggiata dall'ossidazione.

**METODI:** sono state inserite nello studio 55 famiglie composte da madre padre figlia (e), che hanno fornito nel corso della notte dei campioni di urina. Nel corso di tutta la notte la 6-sulfatossimelatonina corretta con la creatinina (aMT6s/Cr) ha dimostrato di essere altamente correlata con la produzione totale di melatonina durante tutta la notte. La guanina urinaria 8-osso-7,8-didro-guanina (8-ossoGua) risulta dalla riparazione della guanina del DNA o del RNA per mezzo di una riparazione per escissione della base del nucleo, mentre 8-oxodG urinario può essere la conseguenza della riparazione della guanina del DNA per mezzo di una escissione nucleotide di riparazione. I livelli urinari totali della notte di 8-oxodG and 8-oxoGua rappresentano perciò una misurazione del danno della guanina totale nel corso della notte. 8-oxodG e 8-oxoGua sono state

misurate per mezzo di uno studio spettroscopico di una massa tandem (in fila) ad alto rendimento di ionizzazione, cromatografia liquida ed elettrospray. Per queste analisi sono stati utilizzati la madre, il padre e la figlia più grande campionata. I confronti tra le madri, i padri, e le figlie sono stati calcolati per aMT6s/Cr, 8-oxodG, and 8-oxoGua. Per quanto riguarda le madri, i padri e le figlie, erano già stati sottoposti separatamente in passato ad analisi in base all'età e al BMI (indice di massa corporea o peso).

RISULTATI: tra le madri, d'età compresa fra i 42 e gli 80, una bassa produzione di melatonina (come misurato da aMT6s/CR) era associata a dei livelli significativamente maggiori di 8-oxoGua ( $p < 0.07$ ), ma non con 8-oxodG. Tra i padri di età compresa tra il 46 e gli 80 anni, una minore produzione di melatonina è stata associata a dei livelli marginalmente più alti di 8-oxoGua ( $p < 0.07$ ), ma non di 8-oxodG. Tra le figlie, non si sono riscontrati dei legami tra i livelli di melatonina ed i livelli sia di 8-oxodG che di quelli di 8-oxoGua. Quando i dati delle madri e dei padri sono stati ulteriormente analizzati usando solamente dei soggetti con età superiore a quella della più grande delle figlie, le associazioni sono diventate in qualche modo più forti.

CONCLUSIONE: bassi livelli di melatonina endogena prodotta tra gli individui più grandi di età può portare a dei livelli più alti di guanina danneggiata per ossidazione nel DNA, in tal modo aumentano le possibilità di sviluppare il cancro. Interessante è l'identificazione dei possibili effetti diversi della melatonina nei tassi di utilizzazione delle vie per riparare il danno ossidativo della guaina nel DNA identificato nelle donne e negli uomini più grandi d'età.

88: Hu S, Shen G, Yin S, Xu W, Hu B.

**Melatonin and tryptophan circadian profiles in patients with advanced non-small cell lung cancer.**

Adv Ther. 2009 Sep;26(9):886-92.

**INTRODUCTION:** Accumulating studies indicate that melatonin is a natural oncostatic agent capable of mediating the influence of the psychoneuroendocrine system on cancer growth. Although there is increasing evidence to show that the pineal gland may play a role in human non-small cell lung cancer (NSCLC), there is uncertainty about circadian profiles of melatonin, its precursor tryptophan, and its major metabolite, 6-sulfatoxymelatonin (6-OH-MLT) in NSCLC patients before and after treatment with standard chemotherapy (cisplatin plus vinorelbine). The aim of this study was to investigate the concentration changes of melatonin, tryptophan, and 6-OH-MLT in NSCLC patients treated with standard chemotherapy.

**METHODS:** We examined the circadian melatonin, tryptophan, and 6-OH-MLT rhythms in 30 patients suffering from advanced-stage NSCLC and compared them with those of 63 healthy volunteers free from neoplastic disease. Blood samples were collected at 12 noon and 12 midnight. Urine samples were collected at 7 AM: and 4 PM: . The levels of melatonin in serum and of 6-OH-MLT in urine were measured by high-performance liquid chromatography. The concentration of amino acids including tryptophan in serum was measured by amino acid analyzer.

**RESULTS:** Melatonin, tryptophan, and 6-OH-MLT concentrations were significantly lower in cancer patients, in comparison with healthy subjects. A significant inverse correlation between melatonin and tryptophan was observed. Additionally, after three cycles of standard chemotherapy, there was a tendency of melatonin, tryptophan, and 6-OH-MLT concentrations to progressively decrease in NSCLC patients.

**CONCLUSION:** The results of the present study indicate that the presence of NSCLC influences the metabolism of melatonin, and chemotherapy in NSCLC patients may progressively decrease the production of melatonin.

### **Profili circadiani della melatonina e del triptofano, in pazienti con carcinomi tumorali polmonari non a piccole cellule di stadio avanzato.**

**INTRODUZIONE:** una serie di studi indica che la melatonina è un agente oncostatico naturale in grado di mediare l'influenza del sistema psicoendoendocrino nella crescita del cancro. Nonostante ci sia una prova evidente del fatto che la ghiandola pineale possa avere un ruolo nel carcinoma tumorale umano non a piccole cellule ai polmoni (NSCLC), c'è un'incertezza circa il profilo circadiano della melatonina, del suo predecessore (precursore) triptofano, e del suo maggiore metabolita 6-sulfatoxymelatonina (6-OH-MLT) nei pazienti con NSCLC prima e dopo il trattamento con la chemioterapia standard (cisplatinina più vinorelbina). Lo scopo di questo studio è stato quello di analizzare i cambiamenti di concentrazione di melatonina, triptofano e 6-OH-MLT nei pazienti NSCLC trattati con chemioterapia standard.

**METODI:** abbiamo esaminato i ritmi circadiani della melatonina, del triptofano, e di 6-OH-MLT su 30 pazienti con stadio avanzato di NSCLC messi a confronto con i ritmi circadiani di 63 volontari sani che non presentano alcuna forma neoplastica. A mezzogiorno ed a mezzanotte sono stati raccolti dei campioni di sangue. I campioni di urina sono stati raccolti alle 7 del mattino e alle 4 del pomeriggio. I livelli della melatonina sierica e di 6-OH-MLT nelle urine sono stati misurati per mezzo di una cromatografia liquida ad alta prestazione. La concentrazione degli amminoacidi incluso il triptofano nel siero è stata misurata da un analizzatore di amminoacidi.

**RISULTATI:** la melatonina, il triptofano e la concentrazione di 6-OH-MLT erano significativamente più basse nei pazienti con cancro, confrontati con quelli dei soggetti sani. E' stata osservata una correlazione inversa significativa tra la melatonina e il triptofano.

Inoltre, nei pazienti NSCLC, dopo tre cicli di chemioterapia standard, è stata rilevata una tendenza della melatonina, del triptofano e della concentrazione di 6-OH-MLT ad una progressiva diminuzione.

**CONCLUSIONI:** i risultati dei presenti studi indicano che la presenza di NSCLC influenza il metabolismo della melatonina e che la chemioterapia nei pazienti NSCLC può progressivamente diminuire la produzione della melatonina.

90: Martínez-Campa C, González A, Mediavilla MD, Alonso-González C, Alvarez-García V, Sánchez-Barceló EJ, Cos S.

**Melatonin inhibits aromatase promoter expression by regulating cyclooxygenases expression and activity in breast cancer cells.**

Br J Cancer. 2009 Nov 3;101(9):1613-9.

**BACKGROUND:** Melatonin reduces the development of breast cancer interfering with oestrogen-signalling pathways, and also inhibits aromatase activity and expression. Our objective was to study the promoters through which melatonin modifies aromatase expression, evaluate the ability of melatonin to regulate cyclooxygenases and assess whether the effects of melatonin are related to its effects on intracellular cAMP, in MCF-7 cells.

**METHODS:** Total aromatase mRNA, aromatase mRNA promoter regions and cyclooxygenases mRNA expression were determined by real-time RT-PCR. PGE(2) and cAMP were measured by kits.

**RESULTS:** Melatonin downregulated the gene expression of the two major specific aromatase promoter regions, pII and pI.3, and also that of the aromatase promoter region pI.4. Melatonin 1 nM was able to counteract the stimulatory effect of tetradecanoyl phorbol acetate on PGE(2) production and inhibit COX-2 and COX-1 mRNA expression. Melatonin 1 nM elicited a parallel time-dependent decrease in both cyclic AMP formation and aromatase mRNA expression.

**CONCLUSIONS:** This study shows that melatonin inhibits aromatase activity and expression by regulating the gene expression of specific aromatase promoter regions. A possible mechanism for these effects would be the regulation by melatonin of intracellular cAMP levels, mediated by an inhibition of cyclooxygenase activity and expression.

### **La melatonina inibisce l'espressione del promotore dell'aromatasi tramite la regolazione dell'espressione della cicloossigenasi e della sua attività nelle cellule del cancro al seno.**

**ANTEFATTO:** la melatonina riduce lo sviluppo del carcinoma al seno mediante un'interferenza con le vie di segnale dell'estrogeno ed inoltre inibisce l'attività dell'aromatasi e la sua espressione. Il nostro obiettivo era studiare i promotori attraverso i quali la melatonina modifica l'espressione dell'aromatasi, valutare la capacità della melatonina di regolare la cicloossigenasi e di accertare se gli effetti della melatonina sono legati al suo effetto su cAMP intracellulare e sulle cellule MCF-7.

**METODI:** l'aromatasi totale mRNA, le regioni del promotore dell'aromatasi mRNA e la cicloossigenasi dell'espressione della mRNA che sono determinate da RT-PCR in tempo reale. PGE (2) e da cAMP, sono state misurate per mezzo di kit (equipaggiamenti).

**RISULTATI:** la melatonina sottoregola l'espressione del gene delle due regioni specifiche più importanti dell'aromatasi, pII e pI.3, e anche quella della regione del promotore dell'aromatasi pI.4. La melatonina 1 nM è in grado di contrastare l'effetto stimolatore del tetradecanoil forbolo acetato sulla produzione di PGE(2) ed è altresì in grado di inibire COX-2 e sull'espressione di COX-1 mRNA. La Melatonina 1 nM suscita una diminuzione parallela legata al tempo sia nella formazione ciclica del AMP sia nella espressione mRNA dell'aromatasi.

**CONCLUSIONI:** questo studio mostra che la melatonina inibisce l'attività dell'aromatasi e la sua espressione per mezzo dell'espressione delle regioni specifiche del promotore dell'aromatasi. Un possibile meccanismo responsabile di questi effetti potrebbe essere la regolazione per mezzo della melatonina dei livelli intracellulari cAMP, mediati da un'attività di inibizione della cicloossigenasi e della sua espressione.

93: Radogna F, Nuccitelli S, Mengoni F, Ghibelli L.

### **Neuroprotection by melatonin on astrocytoma cell death.**

Ann N Y Acad Sci. 2009 Aug;1171:509-13.

Glial cells play an active role in the homeostatic regulation of the central nervous system (CNS). Astrocytes, the most abundant glial cell types in the brain, provide mechanical and metabolic support for neurons. The regulation of astrocyte apoptosis, therefore, is important for physiological and pathological processes in the CNS. Melatonin is a neurohormone that regulates target cells via binding to specific high-affinity plasma membrane receptors, MT1/MT2. In addition to regulating circadian rhythms, melatonin has recently attracted much interest for its potential regulation of cell apoptosis. We recently showed that melatonin antagonizes apoptosis on U937 cells via intersecting signal transduction events involving binding to MT1/MT2 and activation of lipoxygenase. Here we describe the neuroprotective potential of melatonin, showing that melatonin significantly reduces damage-induced apoptosis in astrocytoma cells. The mechanism of protection is different from that shown in U937 cells, because it does not involve MT1/MT2 or lipoxygenase; likewise, Ca(2+) influx is not involved. Intriguingly, inhibition of phospholipase C (PLC) with neomycin reverses melatonin protection, suggesting that a PLC-dependent signal transduction, different from that triggered by MT1/MT2, is involved in the antiapoptotic pathway of melatonin.

### **Neuroprotezione della melatonina sulla morte della cellula nell'astrocitoma.**

Le cellule gliali rivestono un ruolo importante nella regolazione omeostatica del sistema nervoso centrale (CNS). Gli astrociti, i tipi più abbondanti di cellule gliali nel cervello, forniscono un supporto meccanico e metabolico ai neuroni. La regolazione dell'apoptosi nell'astrocitoma perciò, è importante per quanto concerne i processi fisiologici e patologici nel CNS. La melatonina è un neuroormone che regola le cellule bersaglio per mezzo di un legame tra i recettori della membrana del plasma molto affini tra di loro MT1/MT2. Oltre a regolare i ritmi circadiani, la melatonina ha recentemente attratto l'interesse su di se per la sua potenzialità di regolazione dell'apoptosi della cellula. Abbiamo di recente dimostrato che la melatonina contrasta l'apoptosi sulla via che interseca gli eventi di trasduzione del segnale coinvolgendo il legame con MT1/MT2 e l'attivazione della lipossigenasi. Qui descriviamo il potenziale neuroprotettivo della melatonina, mostrando che la melatonina riduce significativamente il danno indotto dall'apoptosi nelle cellule dell'astrocitoma. Il meccanismo di protezione è diverso da quello mostrato nelle cellule U937 perché non coinvolge MT1/MT2 o la lipossigenasi, allo stesso modo, il flusso Ca (2+) non è coinvolto. E' interessante il fatto che l'inibizione della fosfolipasi C (PLC) con neomicina cambia/inverte/rovescia la protezione della melatonina, suggerendo che un segnale di trasduzione PLC- dipendente, diverso da quello provocato da MT1/MT2, sia coinvolto nella via antiapoptotica della melatonina.

94: Cristofanon S, Uguccioni F, Cerella C, Radogna F, Dicato M, Ghibelli L, Diederich M.

**Intracellular prooxidant activity of melatonin induces a survival pathway involving NF-kappaB activation.**

We have shown that melatonin exerts a prooxidant activity in U937 cells, a tumor human promonocytic cell line. (1) Here we show that melatonin induces a strong canonical activation of NF-kappaB, inducing IkappaBalpha degradation and the consequential nuclear translocation of p50/p65 subunits. The timing of NF-kappaB activation overlaps with the timing of reactive oxygen species (ROS) production due to melatonin. Overexpression of dominant-negative IkappaB, which prevents a possible NF-kappaB activation, transformed melatonin in a proapoptotic molecule. These data indicate for the first time that melatonin can trigger NF-kappaB activation and might suggest a possible role for ROS induced by melatonin. Results indicate a possible involvement in the survival pathway of melatonin-generated ROS as secondary messengers.

**L'attività pro-ossidante intracellulare della melatonina porta ad una via di sopravvivenza coinvolgente l'attivazione di NF-kappaB.**

Abbiamo dimostrato che la melatonina esercita un'attività pro-ossidante nelle cellule U937, una linea cellulare tumorale umana promonocitica. (1) Qui mostriamo che la melatonina induce una forte e regolare attivazione di NF-kappaB, inducendo ad una degradazione di IkappaBalfa e alla conseguente translocazione nucleare delle sotto unità p50/p65. Il tempo di attivazione di NF-kappaB si sovrappone con il tempo di della produzione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) dovute alla melatonina. Una sovraespressione di IkappaB dominante negativo, che previene una possibile attivazione di NF-kappaB, ha trasformato la melatonina in una molecola proapoptotica. Questi dati indicano per la prima volta che la melatonina può provocare l'attivazione di NF-kappaB e potrebbe suggerire un possibile ruolo del ROS indotto da parte della melatonina. I risultati indicano un possibile coinvolgimento nel percorso di sopravvivenza del ROS generato dalla melatonina come messaggeri secondari.

Melatonin is considered a promising antitumor agent, promoting apoptosis in tumor cells and contrasting it in normal cells. The basis for this selectivity is presumed to be the ability of melatonin to stimulate reactive oxygen species (ROS) production in tumor cells. Here we investigate the effect of melatonin on three types of human lymphocytes: normal blood lymphocytes, BL41 Burkitt lymphoma, and the cognate Epstein-Barr virus (EBV)-converted E2r. We found that melatonin promotes ROS production in all these cells. Melatonin protects BL41 from apoptosis in the same manner as normal lymphocytes, whereas E2r are unaffected. These results show that ROS production is not limited to tumor lymphocytes nor it is involved in apoptosis promotion; that melatonin does not promote apoptosis in tumor lymphocytes, but EBV inhibits melatonin anti-apoptotic effects; and that the anti-apoptotic effect of melatonin does not depend on the well-known chemical antioxidant properties of melatonin.

### **La melatonina come un modulatore dell'apoptosi nelle cellule del linfoma-B**

La melatonina è considerata un promettente agente antitumorale che promuove l'apoptosi nelle cellule tumorali e che la contrasta nelle cellule normali. La base del processo di selezione sopra descritto è data presumibilmente dalla capacità della melatonina di stimolare la produzione di specie d'ossigeno reattive (ROS) nelle cellule tumorali. In questo studio prendiamo in considerazione l'effetto della melatonina su tre tipi di linfociti umani: linfociti del sangue normali, linfoma Burkitt BL41 e l'affine virus Epstein-Barr (EBV) convertito E2r. Abbiamo scoperto che la melatonina attiva la produzione di ROS in tutte le cellule. La melatonina protegge BL41 dall'apoptosi nello stesso modo in cui protegge i linfociti normali, laddove E2r rimangono inalterati. Tali risultati mostrano che la produzione di ROS non è limitata ai linfociti tumorali e non è coinvolta nella promozione dell'apoptosi, e che la melatonina non produce l'apoptosi nei linfociti tumorali. Si è inoltre dimostrato che l'EBV inibisce gli effetti anti-apoptotici della melatonina, e che gli effetti anti-apoptotici della melatonina non dipendono dalle note proprietà chimiche antiossidanti della stessa.

96: Rosen R, Hu DN, Perez V, Tai K, Yu GP, Chen M, Tone P, McCormick SA, Walsh J.

**Urinary 6-sulfatoxymelatonin level in age-related macular degeneration patients.**

**PURPOSE:** Melatonin is a potent antioxidant and free radical scavenger. It has been reported that serum melatonin level is relevant to certain aging diseases. The purpose of this study was to investigate melatonin levels in age-related macular degeneration (AMD) patients by measurement of 6-sulfatoxymelatonin levels (aMT6s), the major metabolite of melatonin in urine, and compare it with a group of age- and gender-matched controls.

**METHODS:** The first urine of the morning was collected from 43 AMD patients and 12 controls who did not have AMD. The level of aMT6s in specimens was measured by a commercial 6-sulfatoxymelatonin ELISA kit. The assay was performed by researchers, who were masked to the clinical information. To adjust for variation in the diluteness of urine, urinary creatinine level was measured and aMT6s levels were expressed as aMT6s/creatinine.

**RESULTS:** The level of urinary aMT6s/creatinine (mean $\pm$ SD) in AMD (6.24 $\pm$ 3.45 ng aMT6s/mg creatinine) was significantly lower than that of the controls (10.40 $\pm$ 4.51,  $p=0.0128$ ). After adjustment for various factors (age, smoking, cancer, and coronary heart disease) that may influence the aMT6s level, the odds-ratio of urinary aMT6s comparing AMD patients to controls was 0.65 (95% confidence interval=0.48-0.88,  $p=0.0036$ ), indicating that urinary aMT6s level in AMD patients was lower than in controls even after multivariate adjustment.

**CONCLUSIONS:** Urinary aMT6s level in AMD patients was 40% lower than in age- and gender-matched controls. This difference between AMD patients and controls is present after adjustment for the factors of age, smoking, and histories of cancer and coronary heart disease. The significance of this result and the role of melatonin in the occurrence of AMD require further investigation.

### **Livello urinario 6- di sulfatossimelatonina nelle degenerazioni maculari legate all'età dei pazienti**

**SCOPO:** la melatonina è un potente antiossidante ed un eliminatore di radicali liberi. E' stato appurato che il livello della melatonina sierica è importante in certi disturbi legati all'età. Lo scopo di questo studio è stato quello di analizzare i livelli di melatonina nei pazienti con degenerazioni maculari legate all'età (AMD) per mezzo di una misurazione dei livelli di 6-sulfatossimelatonina (aMT6s), il metabolite più importante della melatonina nell'urina, ed è stato messo a confronto con un gruppo di controllo composto da soggetti di diverso sesso ed età.

**METODI:** la prima urina del mattino è stata raccolta da 43 pazienti AMD e 12 del gruppo di controllo che non avevano AMD. Il livello di MT6s nei campioni ottenuti è stato misurato mediante l'utilizzo del kit commerciale 6-sulfatossimelatonina ELISA. Lo studio è stato svolto da ricercatori i quali non erano al corrente delle informazioni cliniche. Al fine di adattare la variazione della diluibilità dell'urina sono stati misurati il livello di creatinina urinaria ed i livelli di aMT6s e sono stati espressi come aMT6s/creatinina.

**RISULTATI:** i livelli urinari di creatinina aMT6s (media  $\pm$  SD) nei pazienti AMD (6.24  $\pm$  3.45 ng a MT6 s/mg creatinina) erano significativamente più bassi rispetto a quelli del gruppo di controllo (10.40  $\pm$  4.51,  $p=0.0128$ ). Dopo l'aggiustamento di diversi fattori (età, fumo, cancro, e disturbi coronari del cuore) che potrebbero influenzare il livello di aMT6s, l'"ODDS-RATIO" (OR = L'Odds Ratio si basa su di una tabella che è alla base di tutto, una tabella a doppia entrata relativa a due variabili dicotomiche: Fattore di Rischio ed Insorgenza Malattia) del aMT6s urinario nel confronto tra i pazienti AMD e quelli del gruppo di controllo era di 0,65 (95% intervallo di affidamento = 0.48-0.88,  $p=0.0036$ ), indicante che il livello di aMT6s nei pazienti AMD era minore rispetto a quello del gruppo di controllo perfino dopo una svariata serie di aggiustamenti.

**CONCLUSIONI:** il livello urinario aMT6s nei pazienti AMD era del 40% più basso nei gruppi di controllo appaiati per età e genere. Tale differenza tra i pazienti AMD e quelli dei soggetti del gruppo di controllo è presente dopo l'aggiustamento per i fattori d'età, fumo, storie di cancro e

disturbi alle coronarie del cuore. Il significato di tale risultato ed il ruolo della melatonina in pazienti AMD necessitano di ulteriori approfondimenti.

97: Gómez-Moreno G, Guardia J, Ferrera MJ, Cutando A, Reiter RJ.

### **Melatonin in diseases of the oral cavity.**

Oral Dis. 2010 Apr;16(3):242-7.

**BACKGROUND:** Melatonin is the principal secretory product of the pineal gland. It has immunomodulatory and antioxidant activities, stimulates the proliferation of collagen and osseous tissue and acts as a protector against cellular degeneration associated with aging and toxin exposure. Arising out of its antioxidant actions, melatonin protects against inflammatory processes and cellular damage caused by the toxic derivatives of oxygen. As a result of these actions, melatonin may be useful as a co-adjuvant in the treatment of certain conditions of the oral cavity.

**METHODS:** An extensive review of the scientific literature was carried out using PubMed, Science Direct, ISI Web of Knowledge and the Cochrane base.

**RESULTS:** Melatonin, which is released into the saliva, may have important implications for oral diseases. Melatonin may have beneficial effects in certain oral pathologies including periodontal diseases, herpes viral infections and Candida, local inflammatory processes, xerostomia, oral ulcers and oral cancer.

**CONCLUSIONS:** Melatonin may play a role in protecting the oral cavity from tissue damage caused by oxidative stress. The experimental evidence suggests that melatonin may have utility in the treatment of several common diseases of the oral cavity. However, more specific studies are necessary to extend the therapeutic possibilities to other oral diseases.

### **Melatonina nelle malattie del cavo orale.**

**ANTEFATTO:** la melatonina è il principale prodotto secreto dalla ghiandola pineale. Presenta delle attività immunomodulatorie e antiossidanti, stimola la proliferazione del collagene e del tessuto osseo ed agisce come protettore contro la degenerazione cellulare associata all'invecchiamento e alla esposizione a tossine. Grazie alla sua azione antiossidante, la melatonina protegge dai processi infiammatori e dal danno cellulare causato dai derivati tossici dell'ossigeno. Come risultato di tali azioni, la melatonina può essere utile come coadiuvante nel trattamento di certe condizioni della cavità orale.

**METODI:** è stata fatta una completa revisione della letteratura scientifica usando come base: PubMed, Science Direct; ISI Web di Knowledge e Cochrane.

**RISULTATI:** la melatonina, che viene rilasciata nella saliva, può avere delle implicazioni importanti per quanto riguarda le malattie della cavità orale. La melatonina può avere degli effetti benefici su certe patologie orali incluso le malattie periodontali, le infezioni virali da herpes da Candida, da roccesse locali infiammatorie, la xerostomia, le ulcere orali ed il cancro orale.

**CONCLUSIONI:** La melatonina potrebbe avere un ruolo nella protezione del cavo orale da danno del tessuto causato da stress ossidativo. Le prove sperimentali suggeriscono che la melatonina possa avere un'utilità nel trattamento di numerose malattie comuni della cavità orale Tuttavia, sono necessari ulteriori studi più specifici per ampliare le possibilità terapeutiche ad altre malattie orali.

100: Lipton J, Megerian JT, Kothare SV, Cho YJ, Shanahan T, Chart H, Ferber R, Adler-Golden L, Cohen LE, Czeisler CA, Pomeroy SL.

## **Melatonin deficiency and disrupted circadian rhythms in pediatric survivors of craniopharyngioma.**

Neurology. 2009 Jul 28;73(4):323-5.

Abnormal circadian behavior and melatonin levels in craniopharyngioma survivors

(A) Ambulatory baseline recordings. Dark bars represent movement detected by wrist actigraphy; absence of dark bars indicates presumed sleeping bouts. Horizontal lines represent consecutive 24-hour periods. Clock hour is indicated on the x-axis. Arrows indicate examples of inappropriate presumed daytime sleep (red) or nocturnal arousal (blue). (B) Plasma melatonin profiles measured in craniopharyngioma subjects (colored circles) and controls (open circles). Clock hour is indicated on the x-axis. CT = circadian time in hours from onset of inpatient monitoring.

## **Mancanza di melatonina e ritmi circadiani spezzati nei sopravvissuti pediatrici di craniofaringioma.**

A) Registrazione della linea di base di laboratorio. Le strisce nere rappresentano il movimento riscontrato da actigrafia del polso, l'assenza di linee nere indica dei presunti attacchi durante il sonno. Le linee orizzontali rappresentano un periodo consecutivo di 24 ore. L'orologio orario è indicato nell'asse x. Le frecce indicano esempi di presunto sonno inappropriato diurno (rosso) o "arousal" notturno (arousal: termine inglese difficilmente traducibile (letteralmente "risveglio") con cui viene designato il livello di attivazione della corteccia cerebrale necessario a mantenere questa in uno stato di vigilanza e quindi di adeguata ricezione degli stimoli provenienti dal mondo esterno) (blu). (B) profili del plasma della melatonina misurato nei soggetti con craniofaringioma (circoli colorati) e in quelli del gruppo di controllo (circoli aperti). L'ora dell'orologio è indicata nell'asse x. CT= il tempo circadiano nelle ore d'all'inizio del monitoraggio dei degenti.

101: Martín V, García-Santos G, Rodríguez-Blanco J, Casado-Zapico S, Sanchez-Sanchez A, Antolín I, Medina M, Rodríguez C.

### **Melatonin sensitizes human malignant glioma cells against TRAIL-induced cell death.**

Cancer Lett. 2010 Jan28;287(2):216-23.

Despite the common expression of death receptors, many types of cancer including gliomas are resistant to the death receptor ligand (TRAIL). Melatonin antitumoral actions have been extensively described, including oncostatic properties on several tumor types and improvement of chemotherapeutic regimens. Here, we found that melatonin effectively increase cell sensitivity to TRAIL-induced cell apoptosis in A172 and U87 human glioma cells. The effect seems to be related to a modulation of PKC activity which in turns decreases Akt activation leading to an increase in death receptor 5 (DR5) levels and a decrease in the antiapoptotic proteins survivin and bcl-2 levels.

### **La melatonina sensibilizza le cellule umane del glioma maligno nei confronti della cellula della morte indotta dal TRAIL**

Nonostante l'espressione comune dei recettori della morte, diversi tipi di cancro incluso il glioma sono resistenti al ligando del recettore della morte (TRAIL). Sono state ampiamente studiate le azioni antitumorali della melatonina, comprese le proprietà oncostatiche su diversi tipi di tumore ed il miglioramento dovuto al suo utilizzo nei regimi chemioterapici. In questo studio, abbiamo scoperto che la melatonina effettivamente aumenta la sensibilità delle cellule all'apoptosi indotta da TRAIL nelle cellule umane del glioma U87 e A172. Tale effetto sembra essere collegato ad una modificazione dell'attività di PKC che di conseguenza diminuisce l'attivazione di Akt portando ad un aumento nei livelli 5 dei recettori della morte (DR5) e ad una diminuzione della sopravvivenza delle proteine anti apoptotiche che sopravvivono nei livelli bel 2.

**Transcripts of calcium/calmodulin-dependent kinases are changed after forskolin- or IBMX-induced insulin secretion due to melatonin treatment of rat insulinoma beta-cells (INS-1).**

Horm Metab Res. 2009 Nov;41(11):805-13.

The objective of the present study was to examine the effects of melatonin on transcripts of isoforms of calcium/calmodulin-dependent protein kinases in rat insulinoma beta-cells INS-1. Investigations show that calcium/calmodulin-dependent kinase IV and calcium/calmodulin-dependent kinase 2d are expressed in human and rat pancreatic islets and INS-1 cells. By application of either forskolin or 3-isobutyl-1-methylxanthine for 6 hours, calcium spiking was evoked and the release of insulin was increased. The expression of the calcium/calmodulin-dependent kinase IV and calcium/calmodulin-dependent kinase 2d transcripts was significantly increased due to forskolin or 3-isobutyl-1-methylxanthine. Acute melatonin treatment (6 h) in the presence of either forskolin or 3-isobutyl-1-methylxanthine caused a significant decrease in insulin release and induced significant downregulation of calcium/calmodulin-dependent kinase IV and calcium/calmodulin-dependent kinase 2d transcripts in INS-1 batch cultures. The attenuating effect of melatonin on transcripts could be almost completely reversed by preincubation with the melatonin receptor antagonist luzindole. Thus, the insulin-inhibiting effect of melatonin in INS-1 cells is associated with significant changes in transcripts of calcium-signaling components suggesting that melatonin influences gene expression of components, which are known to be involved in insulin secretion or insulin gene expression.

**Le trascrizioni delle chinasi di calcio/calmodulina dipendenti vengono modificate dopo la secrezione d'insulina indotta dalla foscorina o dal IBMX dovuto alla cura con la melatonina delle cellule-beta dei topi.(INS-1).**

Lo scopo del presente studio è stato quello di esaminare gli effetti della melatonina nelle trascrizioni delle isoforme della proteina calcio/calmodulina dipendente chinasi nelle cellule dell'insulinoma del ratto INS-1. Gli studi mostrano che la chinasi IV calcio/calmodulina dipendente e la chinasi 2d calcio/calmodulina dipendente, sono espresse nelle cellule degli isolotti pancreatici INS-1 dell'uomo e del ratto. L'applicazione o di forskolino o di 3-isobutil-1-metilxantina per 6 ore, con iniezione di calcio è stato evocato e il rilascio di insulina è aumentato. L'espressione della chinasi IV calcio/calmodulina dipendente e le trascrizioni della chinase 2d calcio/calmodulina dipendente è aumentata in modo significativo dovuto al forskolino o 3-isobutil-1-metilxantina. Un trattamento intensivo alla melatonina (per 6 ore) in presenza o di forskolino o di 3-isobutil-1-metilxantina, ha causato una significativa diminuzione dell'insulina ed ha provocato una significativa sottoregolazione della chinasi IV calcio/calmodulina dipendente e delle trascrizioni della chinasi 2d calcio-calmodulina dipendente nelle colture di gruppo INS-1. L'effetto attenuante della melatonina nelle trascrizioni potrebbe essere quasi completamente invertito per mezzo di una preincubazione con il recettore antagonista della melatonina: il luzindolo. Così, l'effetto della melatonina come inibitore dell'insulina nelle cellule 1-INS è associato con i cambiamenti significativi nelle trascrizioni dei componenti che segnalano il calcio suggerendo che la melatonina influenzi l'espressione genica dei componenti, che notoriamente sono coinvolti nella secrezione dell'insulina o nell'espressione del gene dell'insulina.

## **Melatonin exerts differential actions on X-ray radiation-induced apoptosis in normal mice splenocytes and Jurkat leukemia cells.**

J Pineal Res. 2009 Sep;47(2):147-55.

The ability of melatonin as a potent antioxidant was used as a rationale for testing its antiapoptotic ability in normal cells. Recently, melatonin was shown to possess proapoptotic action by increasing reactive oxygen species in certain cancer cells. The modification of radiation-induced apoptosis by melatonin and the expression of apoptosis-associated upstream regulators were studied in normal mice splenocytes and Jurkat T leukemia cells. C57BL/6 mice were exposed to a single whole body X-ray radiation dose of 2 Gy with or without 250 mg/kg melatonin pretreatment. The Jurkat cells were divided into four groups of control, 1 mm melatonin alone, 4 Gy irradiation-only and melatonin pretreatment before irradiation. The highest level of apoptosis in the normal splenic white pulp was detected by TUNEL assay at 8 hr after irradiation. At this time, the apoptotic index of irradiation-only and melatonin pretreatment groups were 35.6% and 20.7%, respectively. This reduced apoptosis by melatonin was associated with the increase of Bcl-2 expression and a reduction of Bax/Bcl-2 ratio through a relative decrease of p53 mRNA and protein. In the Jurkat cells treated with a combination of melatonin and radiation, both Annexin V-FITC(+)/PI(-) and Annexin V-FITC(+) cells were increased at 48 hr after irradiation when compared with irradiation-only or melatonin alone. The expressions of p53 between groups were well correlated with the results of Annexin V binding. The irradiation or melatonin did not influence the JNK1 expression in Jurkat cells. The present results suggest that melatonin enhances radiation-induced apoptosis in Jurkat leukemia cells, while reducing radiation-induced apoptosis in normal mice splenocytes. These differential effects on radiation-induced apoptosis by melatonin might involve the regulation of p53 expression.

## **La melatonina svolge diverse azioni sull'apoptosi indotta dalle radiazioni dei raggi X nei topi normali e nelle cellule della leucemia Jurkat.**

La proprietà della melatonina di essere un potente antiossidante era usata come fondamento per provare la sua capacità apoptotica nelle cellule normali. Recentemente, la melatonina ha dimostrato di avere un'azione apoptotica mediante l'aumento delle specie d'ossigeno attivo in alcune cellule cancerogene. Sono state studiate nelle cellule splenociti normali dei ratti e nelle cellule Jurkat T della leucemia la modificazione dell'apoptosi indotta dalla irradiazione da parte della melatonina e l'espressione dei regolatori a monte associati all'apoptosi. I ratti C57BL/6 sono stati esposti ad una dose singola d'irradiazioni su tutto il corpo

2 Gy con o senza pretrattamento con 250 mg/kg di melatonina. Le cellule Jurkat sono state divise in 4 gruppi di controllo, 1mm di melatonina da solo, 4 Gy di sola irradiazione ed il gruppo dove era stato fatto un pretrattamento con la melatonina prima dell'irradiazione. Il più alto livello di apoptosi nelle polpa bianca splenica è stato riscontrato con lo studio TUNEL ad 8 ore dall'irradiazione. In questo momento, l'indice apoptotico dei gruppi della irradiazione singola e del pretrattamento con melatonina erano rispettivamente 35.6% e 20.7%. Tale riduzione dell'apoptosi per mezzo della melatonina è stata associata all'aumento dell'espressione Bcl-2 e alla riduzione di Bax/Bcl-2 attraverso una relativa riduzione del p53 mRNA e della proteina. Nelle cellule Jurkat trattate con una combinazione di melatonina ed irradiazione, sia l'Annexin V-FITC(+=/PI(-) che le cellule Annexin V-FITC(+) erano aumentate 48 ore dopo l'irradiazione se confrontate con le sole irradiazioni o con la sola melatonina. Le espressioni di p53 tra i gruppi erano ben collegate con i risultati del legame di Annexin. L'irradiazione o la melatonina non hanno influenzato l'espressione di JNK1 nelle cellule Jurkat. I presenti risultati suggeriscono che la melatonina aumenti l'apoptosi indotta da irradiazione nelle cellule colpite da leucemia Jurkat, mentre riduce l'apoptosi indotta

dall'irradiazione negli splenociti normali dei ratti. Tali effetti diversi della melatonina sull'apoptosi indotta da irradiazione potrebbero coinvolgere la regolazione dell'espressione di p53.

106: Rögelsperger O, Ekmekcioglu C, Jäger W, Klimpfinger M, Königsberg R, Krenbek D, Sellner F, Thalhammer T.

### **Coexpression of the melatonin receptor 1 and nestin in human breast cancer specimens.**

J Pineal Res. 2009 May;46(4):422-32.

Activation of the G-protein-coupled receptor (GPCR) for melatonin (MT1) suppresses breast cancer cell growth in experimental models. To elucidate whether MT1 might play a role in cancer cells positive for the stem cell marker nestin, we assessed paired carcinomatous (Ca) and adjacent noncancerous (NCa) samples from 42 patients with primary breast cancer for MT1 and nestin by double immunofluorescence staining and quantitative image analysis with Tissue-Quest software. MT1 was located in luminal and myoepithelial cells in milk ducts and in tumor cells in 40/42 and 39/42 of NCa and Ca specimens, respectively, independent of hormone receptor and HER-2 status. Nestin was located together with MT1 in myoepithelial cells in 38 NCa specimens (total n = 42) and in 18 Ca specimens with intact milk ducts. Quantitative evaluation of selected 16 NCa and Ca samples revealed that MT1 levels were higher in invasive Ca sections than in NCa specimens in eight and lower in six cases. Specimens from higher tumor stages (TII/III) with a higher risk of relapse were associated with MT1/nestin co-staining in more than 10% of tumor cells, whereas a lack of co-staining correlated with lower tumor stages. Abundant expression of MT1 and, particularly, coexpression of MT1 with nestin in invading tumor cells in more advanced tumors suggest an important role for this GPCR in the pathogenesis of breast cancer.

### **Coespressione del recettore 1 della melatonina e della nestina nei campioni del cancro umano al seno.**

L'attivazione del recettore accoppiato alla proteina G (GPGR) per mezzo della melatonina (MT1) sopprime la crescita delle cellule del cancro in modelli sperimentali. Per chiarire se la MT1 potrebbe avere un ruolo importante nelle cellule positive del cancro per il marcatore della cellula staminale nestina, abbiamo valutato in coppia campioni carcinomatosi (Ca) e quelli adiacenti non cancerogeni (NCa) di 42 pazienti con carcinoma al seno primario trattati con la melatonina e la nestina utilizzando una doppia colorazione immunofluorescente e un'analisi quantitativa dell'immagine con il software (programma) Tissue-Quest. La melatonina era localizzata nelle cellule luminali e mioepiteliali nei dotti galattofori della mammella e nelle cellule tumorali, in rispettivamente 40/42 e 39/42 dei NCa e Ca individui, indipendentemente dal recettore ormonale e dallo status HER-2. La nestina era localizzata insieme alla MT1 nelle cellule mioepiteliali in 38 individui NCa (totale n=42) e in 18 Ca individui con dotti galattofori della mammella intatti. Una valutazione quantitativa dei campioni selezionati di 16 individui NCa e Ca ha rivelato che il livelli di MT1 erano maggiori nelle sezioni con Ca invasivo rispetto ai livelli di melatonina riscontrati in otto casi tra gli individui con NCa e più bassa invece rispetto agli individui con NCa in sei casi. I campioni di tumori agli stadi più avanzati (TII/III) con un più alto rischio di recidiva erano associati alla co colorazione di MT1/nestina in più del 10% delle cellule tumorali, laddove una mancanza di co colorazione è correlata agli stadi più bassi del tumore. Un'abbondante espressione di MT1 e, in particolare, la coespressione di MT1 con la nestina nelle cellule tumorali invasive nei tumori più avanzati, suggerisce che questo GPCR svolga un ruolo nella patogenesi del carcinoma al seno.

107: Park JW, Hwang MS, Suh SI, Baek WK.

## **Melatonin down-regulates HIF-1 alpha expression through inhibition of protein translation in prostate cancer cells.**

J. Pineal Res. 2009 May;46(4):415-21.

Melatonin, the main secretory product of the pineal gland, has been shown to exert an oncostatic activity in cancer cells. Recently, several studies have shown that melatonin has antiangiogenic properties. However, the mechanism by which melatonin exerts antiangiogenic effects is not understood. Hypoxia inducible factor (HIF)-1 is a transcription factor which mediates adaptive response to changes in tissue oxygenation. HIF-1 is a heterodimer formed by the association of a constitutively expressed HIF-1 beta subunit and a HIF-1 alpha subunit, the expression of which is highly regulated. In this study, pharmacologic concentrations of melatonin was found to inhibit expression of HIF-1 alpha protein under both normoxic and hypoxic conditions in DU145, PC-3, and LNCaP prostate cancer cells without affecting HIF-1 alpha mRNA levels. Consistent with the reduction in HIF-1 alpha protein levels, melatonin inhibited HIF-1 transcriptional activity and the release of vascular endothelial growth factor. We found that the suppression of HIF-1 alpha expression by melatonin correlated with dephosphorylation of p70S6K and its direct target RPS6, a pathway known to regulate HIF-1 alpha expression at the translational level. Metabolic labeling assays indicated that melatonin inhibits de novo synthesis of HIF-1 alpha protein. Taken together, these results suggest that the pharmacologic concentration of melatonin inhibits HIF-1 alpha expression through the suppression of protein translation in prostate cancer cells.

## **La melatonina abbassa l'espressione dell'HIF-1 alfa tramite l'inibizione della transazione della proteina nelle cellule tumorali della prostata.**

E' stato dimostrato che la melatonina, il maggiore prodotto di secrezione della ghiandola pineale, esercita un'attività oncostatica nelle cellule del cancro. Recentemente, diversi studi hanno dimostrato che la melatonina possiede delle proprietà antiangiogeniche. Tuttavia, non è ancora stato capito quale sia il meccanismo mediante il quale la melatonina esercita gli effetti antiangiogenici. Il fattore inducibile dall'ipossia (HIF)-1 è un fattore di trascrizione che media la risposta d'adattamento ai cambiamenti nell'ossigenazione dei tessuti. HIF-1 è un eterodimero formato mediante l'associazione di una subunità HIF-1 basilarmente espressa ed una subunità HIF-1 alfa, l'espressione della quale è pienamente regolata. In questo studio, si è riscontrato che concentrazioni farmacologiche di melatonina inibiscono l'espressione della proteina HIF-1 in condizioni normossiche e ipossiche nelle cellule del cancro alla prostata DU145, PC-3 e LNCaP senza influire i livelli di mRNA HIF-1 alfa. Coerente con la riduzione dei livelli della proteina alfa HIF-1, è risultata l'attività trascrizionale di HIF-1 inibita dalla melatonina e l'allentamento del fattore della crescita edoteliale vascolare. Abbiamo riscontrato che la soppressione dell'espressione HIF-1 alfa da parte della melatonina è in correlazione con la defosforilazione di p70S6K e del suo diretto obiettivo RPS6, una via nota per regolare l'espressione HIF-1 alfa a livello translationale. Saggi di marcatura metabolica hanno indicato che la melatonina inibisce "de novo" (a partire dall'inizio) la sintesi della proteina HIF-1. Presi nella loro totalità, questi risultati suggeriscono che la concentrazione farmacologica della melatonina inibisce l'espressione HIF-1 alfa mediante la soppressione della transazione nelle cellule cancerogene della prostata.

110: Joo SS, Yoo YM.

## **Melatonin induces apoptotic death in LNCaP cells via p38 and JNK pathways: therapeutic implications for prostate cancer.**

J Pineal Res. 2009 Aug;47(1):8-14.

Apoptosis, a form of cell death, is a fundamental process for the development and maintenance of multicellular organisms that promotes the removal of damaged, senescent or unwanted cells. Induction of cancer cell apoptosis is an important strategy of anticancer therapy. In this study, we examined if melatonin, the main secretory product of the pineal gland, inhibited the growth of prostate cancer cells (LNCaP) and promoted apoptosis via mitogen-activated protein kinases (MAPKs), which are closely associated with apoptosis and survival. Melatonin treatment significantly inhibited the growth of LNCaP cells in a dose- and time-dependent manner. It clearly induced both an early stage of apoptosis (propidium iodide(-), FITC Annexin-V(+)) and a late apoptosis/secondary necrosis (propidium iodide(+)) and FITC Annexin-V(+)), which indicated induction of serial stages of apoptosis in cells. Moreover, melatonin markedly activated c-JUN N-terminal kinase (JNK) and p38 kinase, whereas extracellular signal-regulated kinase (ERK) was not responsive to melatonin. Treatment with MAPK inhibitors, PD98059 (ERK inhibitor), SP600125 (JNK inhibitor) and SB202190 (p38 inhibitor), confirmed that melatonin-induced apoptosis was JNK- and p38-dependent, but ERK-independent. In the presence of PD98059, caspase-3 activity increased, while levels of Bax/cytochrome c (Cyt c) and Bcl-2 decreased. These effects were opposite to those observed with SP600125 and SB202190 treatments. Together, these results strongly suggest that JNK and p38 activation directly participate in apoptosis induced by melatonin. Thus, melatonin may be of promise for anti-prostate cancer strategies.

## **La melatonina induce alla morte apoptotica nelle cellule LNCaP per mezzo del percorso p 38 e di JNK: implicazioni terapeutiche per la cura del cancro alla prostata.**

L'apoptosi, una forma della cellula della morte, è un processo fondamentale per lo sviluppo ed il mantenimento degli organismi multicellulari che promuove la rimozione del danno nelle cellule senescenti o non volute. L'induzione ad apoptosi della cellula del cancro rappresenta un'importante strategia di terapia anticancro. In questo studio, abbiamo preso in esame la melatonina, il maggior prodotto della secrezione della ghiandola pineale. La melatonina inibisce la crescita delle cellule del cancro alla prostata (LNCaP) e promuove l'apoptosi per mezzo della proteina chinasi mitogeno-attivata (MAPKs), che sono fortemente associate all'apoptosi e alla sopravvivenza. Il trattamento con melatonina inibisce in modo significativo la crescita delle cellule LNCaP in un modo che dipende dal tempo e dalla dose. Ha chiaramente indotto sia ad uno stato iniziale d'apoptosi (propidium iodide (-), FITC Annexina-V(+)) e ad una tarda apoptosi/necrosi secondaria (propidium iodide (+) e FITC Annexin-V (+)), che indicava l'induzione ad una serie di stadi di apoptosi nelle cellule. Inoltre, la melatonina ha marcatamente attivato la chinasi-c JUN N terminale (JNK) e la chinasi p38, laddove la chinasi extracellulare regolata dal segnale (ERK) non è risultata reattiva alla melatonina. Il trattamento con gli inibitori MAPK, PD98059 (ERK inibitore), SP600125 (inibitori JNK) e SB202190 (inibitore p38), ha confermato che l'apoptosi indotta dalla melatonina era dipendente da JNK e P38, ma indipendente da ERK. In presenza di PD98059, l'attività di capcase-3 aumentava, mentre i livelli do Bax/citocromo c (Cyt c) e Bcl-2 diminuiva. Tali effetti erano opposti a quelli osservati con i trattamenti SP600125 e SB202190. Insieme, questi risultati suggeriscono fortemente che l'attivazione di JNK e di p38 partecipa direttamente all'apoptosi indotta dalla melatonina. Conseguentemente, la melatonina può rappresentare una strategia anti cancro promettente.

111: Girgert R, Hanf V, Emons G, Gründker C.

## **Membrane-bound melatonin receptor MT1 down-regulates estrogen responsive genes in breast cancer cells.**

J Pineal Res. 2009 Aug;47(1):23-31.

Melatonin possesses anti-estrogenic effects on estrogen receptor expressing (ER+) breast cancer cells in culture by reducing cell cycle progression and cell proliferation. There is increasing agreement that on a cellular level the effects of melatonin are primarily induced by the membrane-bound receptor MT1. The participation of a second, nuclear receptor of the group of ligand-dependent transcription factors, called RZRalpha, is under debate. In this study we used a number of breast cancer cell lines differing in their expression of the estrogen receptor and the two known melatonin receptors. In MCF-7 breast cancer cells transfected with a vector carrying the MT1 gene (MCF-7Mella) binding of CREB-protein to the cAMP-responsive element of the breast cancer suppressing gene BRCA-1 was more strongly reduced by treatment with melatonin than in the parental cells. Expression of estrogen responsive genes was determined in serum-starved cells, cells stimulated for 16 hr with estradiol and cells subsequently treated with melatonin. Expression of BRCA-1, p53, p21(WAF) and c-myc were up-regulated by estradiol. Treatment of the stimulated cells with melatonin counteracted the increase induced by estradiol almost completely. The more MT1 a cell line expressed, the stronger was the reduction of the expression of the estradiol-induced genes. There was no correlation between the expression of the nuclear receptor RZRalpha and the effects of melatonin on these genes.

## **Il recettore della melatonina MT1 legato alla membrana, sotto regola i geni estrogeni di risposta delle cellule tumorali nel cancro al seno.**

La melatonina possiede degli effetti anti estrogenici sul recettore dell'estrogeno che si esprime (ER+) nelle cellule tumorali nel carcinoma al seno mediante riduzione della progressione del ciclo cellulare e della proliferazione cellulare. C'è un consenso crescente riguardo al fatto che a livello cellulare gli effetti della melatonina siano principalmente indotti dal recettore MT1 legato alla membrana. La partecipazione di un secondo recettore nucleare del gruppo di fattori di trascrizione ligando-dipendenti chiamato RZRalfa, è al momento oggetto di dibattito. In questo studio abbiamo utilizzato un certo numero di linee cellulari del carcinoma al seno, diverse per espressione dell'estrogeno recettore ed i due recettori della melatonina noti.

Nelle cellule del carcinoma al seno trasfettate con un vettore portante il gene MT1 (MCF-7Mella) legato alla proteina CREB all'elemento cAMP-reattivo del carcinoma al seno che sopprime il gene BRCA-1 era maggiormente ridotto dal trattamento con la melatonina rispetto alle cellule parentali. L'espressione dei geni reattivi all'estrogeno è stata determinata nelle cellule affamate di siero, nelle cellule che erano state stimulate per 16 ore con estradiolo e nelle cellule trattate successivamente con melatonina. L'espressione di BRCA-1, p53, p21 (WAF) e c-myc erano sopra regolate dall'estradiolo. Il trattamento delle cellule stimulate con melatonina annullava quasi completamente la crescita indotta dall'estradiolo. Maggiore era la MT1 espressa in una linea cellulare, maggiore era la riduzione dell'espressione dei geni indotti dall'estradiolo. Non c'era alcuna correlazione tra l'espressione del recettore nucleare RZRalfa e gli effetti della melatonina su questi geni.

## **Actual and potential agents and biomarkers in the treatment of cancer.**

Anticancer Agents Med Chem. 2009 Jun;9(5):500-16.

It is well known that cancer is defined as a group of diseases that differ both regarding the tissues they affect as well as their origin. For this reason, much effort is being made in the development of new drugs with the aim of increasing survival and patients' quality of life. There is already a wide spectrum of anti-cancer agents that follow different mechanisms of action, such as the inhibitors of topoisomerases I and II and anti-mitotic chemicals, among others. Usually, these drugs are able to increase the patient's survival, although their toxicity worsens the patient's quality of life. Therefore, we should seriously consider alternative mechanisms, as well as the co-administration of these drugs with non-toxic compounds, such as melatonin or retinoic acid. This would increase the toxic effects of these drugs at low doses. Obviously, a better understanding of modified physiological systems during the development of these diseases would improve the diagnostic tools. This would be translated, in turn, into a higher survival index. The alteration of the proteolytic enzymes involved in the renin-angiotensin system and in the regulation of the gonadotrophins and TRH synthesis in breast cancer are examples of the above. These two proteins are regulated by the same enzyme, pyrrolidone carboxipeptidase, and both are directly involved in the initiation and development of breast cancer. Therefore, the aim of the present review is to revise the different options available at present to improve patients' survival and to show alternative mechanisms that may be beneficial to patients' well being.

### **Agenti potenziali ed effettivi e biomarker nella cura del cancro.**

E' noto che il cancro è definito come un gruppo di malattie che si differenzia sia per quanto riguarda i tessuti che colpiscono sia per quanto riguarda la loro origine. Per tale ragione, si stanno compiendo notevoli sforzi per la realizzazione di un nuovo gruppo di farmaci che hanno lo scopo di aumentare la sopravvivenza e la qualità della vita dei pazienti. E' già presente un ampio spettro di agenti che seguono diversi meccanismi d'azione, come ad esempio gli inibitori delle topoisomerasi I e II e delle sostanze chimiche anti-mitotiche. Generalmente tali farmaci sono in grado di aumentare la sopravvivenza del paziente, sebbene la loro tossicità ne peggiori la qualità della vita. Perciò, dovremmo prendere seriamente in considerazione dei meccanismi alternativi, quali la co-somministrazione di farmaci contenenti componenti atossici, come ad esempio melatonina oppure l'acido retinoico. Ciò aumenterebbe l'effetto tossico di questi farmaci se presi a piccole dosi. Ovviamente, al fine di migliorare gli strumenti diagnostici è necessario capire in modo più approfondito l'azione dei sistemi fisiologici modificati durante lo sviluppo di queste malattie. Ciò sarebbe trasferito, a sua volta, in un più altro indice di sopravvivenza. L'alterazione degli enzimi proteolitici che vede coinvolti il sistema renale-angiotensino, la regolazione delle gonadotropine e la sintesi di TRH nel carcinoma al seno, rappresenta degli esempi di ciò che è stato sopra riportato. Queste due proteine sono regolate dallo stesso enzima, pirrolidone carbossipeptidasi ed entrambi sono direttamente coinvolti nell'inizio e nello sviluppo del carcinoma al seno. Perciò, lo scopo del presente articolo è quello di rivedere le diverse opzioni attualmente disponibili al fine di migliorare la sopravvivenza dei pazienti e per far vedere i meccanismi alternativi che possono risultare benefici per il benessere dei pazienti.

113: Ozdemir F, Deniz O, Kaynar K, Arslan M, Kavgaci H, Yildiz B, Aydin F.

## **The effects of melatonin on human hepatoma (Hep G2) cell line.**

Bratisl Lek Listy. 2009;110(5):276-9.

**BACKGROUND:** Melatonin has been suggested to have antiproliferative effects on cancer cells. These effects can be attributed to immunomodulation, growth factor inhibition, induction of apoptosis and prooxidant properties. Melatonin is considered as a safe drug with minimal adverse effects.

**OBJECTIVES:** We planned to investigate the effects of melatonin in hepatoma (Hep G2) cell line. In this study, different concentrations of melatonin were studied to assess its effects on human hepatoma (Hep G2) cell line in vitro.

**METHODS:** In this study, different doses ( $5 \times 10^{-5}$  M,  $5 \times 10^{-4}$  M,  $10^{-3}$  M) of melatonin were administered into hepatocellular carcinoma cell line in vitro. After an incubation period of 72 hours, the studied and control groups were evaluated for cell cycle, morphology, proliferating index and apoptosis percentage.

**RESULTS:** A significant decrease in percentage of phase G0/G1 cells was found in high-dose melatonin group ( $10^{-3}$  M) compared to control group. Melatonin increased the cell counts in S phase of cell cycle at high doses as well. However, phase G2/M cell percentage did not change with the administration of melatonin. Cell proliferation was increased in all melatonin groups, but the only statistically significant difference was found between the high-dose and control groups. There was a significant increase in proliferative index between the control group and high-dose melatonin group.

**CONCLUSION:** High dose of melatonin increases the cell count in S phase and shows an antiproliferative effect on hepatoma cells. This indicates that melatonin can be considered a promising drug when used along with other antineoplastic agents for the treatment of hepatoma. However, it has no effect on apoptosis and colony counts (Tab. 1, Fig. 2, Ref. 19). Full Text (Free, PDF) [www.bmj.sk](http://www.bmj.sk).

## **Gli effetti della melatonina sulla linea cellulare dell'epatoma umano (hep G2)**

**ANTEFATTO:** si ritiene che la melatonina possieda degli effetti antiproliferativi sulle cellule del cancro. Tali effetti possono essere attribuiti all'immunomodulazione, all'inibizione del fattore della crescita, alla sua capacità d'induzione ad apoptosi e alle sue proprietà proossidanti. La melatonina è considerata un farmaco sicuro che presenta pochissimi effetti collaterali.

**OBIETTIVI:** abbiamo pianificato di prendere in esame gli effetti della melatonina sulla linea cellulare dell'epatoma (Hep G2). In questo studio, sono state prese in esame diverse concentrazioni di melatonina al fine di valutare i suoi effetti in vitro, sulla linea cellulare dell'epatoma umano (Hep G2).

**METODI:** in questo studio, sono state somministrate dosi differenti di melatonina ( $5 \times 10^{-5}$  M,  $5 \times 10^{-4}$  M,  $10^{-3}$  M) nella linea cellulare del carcinoma epatocellulare. Dopo un periodo d'incubazione di 72 ore, i gruppi di controllo e di studio sono stati valutati prendendo in considerazione il ciclo della cellula, la morfologia, l'indice di proliferazione e la percentuale d'apoptosi.

**RISULTATI:** se fatto un confronto con il gruppo di controllo, si è riscontrato che il gruppo con alte dosi di melatonina ( $10^{-3}$ M) presentava una diminuzione significativa delle cellule di fase G0/G1. La melatonina aumentava il numero delle cellule nella fase S del ciclo cellulare anche in presenza di dosi alte. Tuttavia la cellula della fase G2/M, non è cambiata in seguito a variazioni delle dosi di somministrazione della melatonina. La proliferazione cellulare è aumentata nei gruppi

con la melatonina, ma l'unica differenza importante da un punto di vista statistico è stata trovata tra i gruppi di controllo e quelli a dosi alte di melatonina.

**CONCLUSIONE:** alti dosi di melatonina aumentano il numero di cellule in fase S e mostrano un effetto antiproliferativo nelle cellule dell'epatoma. Ciò indica che la melatonina può essere considerata un farmaco promettente quando usata insieme ad altri agenti neoplastici nel trattamento dell'epatoma. Tuttavia, non ha alcun effetto sul conteggio dell'apoptosi e delle colonie.

## **Upregulation of manganese superoxide dismutase (SOD2) is a common pathway for neuroendocrine differentiation in prostate cancer cells.**

Int J Cancer. 2009 Oct 1;125(7):1497-504.

Despite improvements in diagnosis of advanced prostate cancer (PCa), treatment is not efficient and 5-year survival is still low. Initially, the less abundant of cell types, neuroendocrine cells (NE), are involved in regulatory process but their physiological role is not fully understood. Among others, an increase in NE cells along with tumor progression has been commonly reported but their role in tumorigenesis or the molecular mechanisms of transdifferentiation is still a matter of debate. We have used human PCa cells (LNCaP) induced to differentiate to NE cells with several stimuli: androgen withdrawal, cyclic AMP or treatment with the antioxidant pineal hormone melatonin. PCa patients' specimens were also analyzed by western blotting and by immunocytochemistry. NE-like LNCaP cells express high levels of mitochondrial superoxide dismutase (MnSOD/SOD2) in addition to NE markers. MnSOD upregulation is mediated by NFkappaB transcription factor, mainly through p65 translocation into the nuclei. More importantly, overexpression of MnSOD induces the rise of NE-markers in LNCaP cells, showing that MnSOD upregulation might be instrumental for NE differentiation in PCa cells. Furthermore, MnSOD is highly expressed in advanced tumors of patients' when compared with control, nonpathological samples or with low-grade tumors, along with the presence of synaptophysin, a common NE marker. Also, fluorescence immunohistochemical analysis revealed that MnSOD colocalizes with NE markers in most of NE cells observed in PCa specimens. The present findings indicate that MnSOD is essential for NE transdifferentiation and mediates in part the differentiation process, which appears also to be critical *in vivo*.

## **La sopraregolazione del superossido manganese dismutasi (SOD2) è una via comune per la differenziazione neuroendocrina nelle cellule del cancro alla prostata.**

**ABSTRACT:** Nonostante i miglioramenti nella diagnosi del carcinoma della prostata avanzato (PCA), il trattamento non è efficace e il tasso di sopravvivenza a 5 anni è ancora basso. Inizialmente, tipi di cellule meno abbondanti, ossia le cellule neuroendocrine (NE), sono coinvolte nel processo di regolamentazione, ma il loro ruolo fisiologico non è del tutto chiaro. Tra gli altri, è stato comunemente riportato un aumento di cellule NE insieme alla progressione tumorale, ma il loro ruolo nella genesi dei tumori o nei meccanismi molecolari di transdifferenziamento è ancora materia di dibattito. Abbiamo utilizzato le cellule umane PCA (LNCaP) indotte per la differenziazione in cellule NE con stimoli diversi: il ritiro degli androgeni, AMP ciclico o il trattamento con la melatonina, ormone pineale antiossidante. I campioni dei pazienti PCA sono stati analizzati anche mediante il metodo "western blotting" e mediante l'immunocitochimica. Le cellule NE di LNCaP esprimono alti livelli di dismutasi mitocondriale superossido (MnSOD/SOD2) oltre ai marcatori NE. La sopra regolazione di MnSOD è mediata dal fattore di trascrizione NFkappaB, principalmente attraverso la traslocazione di p65 nei nuclei. Ancora più importante, è la constatazione che la sovraespressione di MnSOD induce all'aumento dei marcatori NE nelle cellule di LNCaP, dimostrando che la sovraespressione di MnSOD potrebbe essere strumentale per la differenziazione di NE nelle cellule dei PCA. Inoltre, MnSOD è altamente espresso nei tumori avanzati di pazienti se messo a confronto con i campioni non patologici del gruppo di controllo o con i tumori di basso grado, insieme alla presenza della sinaptofisina, un marcatore comune NE. Inoltre, l'analisi immunocitochimica di fluorescenza ha rivelato che MnSOD colocalizza con i marcatori NE nella maggior parte delle cellule NE osservate in campioni di PCA. I presenti risultati indicano che MnSOD è essenziale per la transdifferenziazione di NE e media in parte il processo di differenziazione, che sembra anche essere critico *in vivo*.

116: Dauchy RT, Blask DE, Dauchy EM, Davidson LK, Tirrell PC, Greene MW, Tirrell RP, Hill CR, Sauer LA.

**Antineoplastic effects of melatonin on a rare malignancy of mesenchymal origin: melatonin receptor-mediated inhibition of signal transduction, linoleic acid metabolism and growth in tissue-isolated human leiomyosarcoma xenografts.**

J Pineal Res. 2009 Aug;47(1):32-42.

Melatonin provides a circadian signal that regulates linoleic acid (LA)-dependent tumor growth. In rodent and human cancer xenografts of epithelial origin in vivo, melatonin suppresses the growth-stimulatory effects of linoleic acid (LA) by blocking its uptake and metabolism to the mitogenic agent, 13-hydroxyoctadecadienoic acid (13-HODE). This study tested the hypothesis that both acute and long-term inhibitory effects of melatonin are exerted on LA transport and metabolism, and growth activity in tissue-isolated human leiomyosarcoma (LMS), a rare, mesenchymally-derived smooth muscle tissue sarcoma, via melatonin receptor-mediated inhibition of signal transduction activity. Melatonin added to the drinking water of female nude rats bearing tissue-isolated LMS xenografts and fed a 5% corn oil (CO) diet caused the rapid regression of these tumors (0.17 +/- 0.02 g/day) versus control xenografts that continued to grow at 0.22 +/- 0.03 g/day over a 10-day period. LMS perfused in situ for 150 min with arterial donor blood augmented with physiological nocturnal levels of melatonin showed a dose-dependent suppression of tumor cAMP production, LA uptake, 13-HODE release, extracellular signal-regulated kinase (ERK 1/2), mitogen activated protein kinase (MEK), Akt activation, and [(3)H]thymidine incorporation into DNA and DNA content. The inhibitory effects of melatonin were reversible and preventable with either melatonin receptor antagonist S20928, pertussis toxin, forskolin, or 8-Br-cAMP. These results demonstrate that, as observed in epithelially-derived cancers, a nocturnal physiological melatonin concentration acutely suppress the proliferative activity of mesenchymal human LMS xenografts while long-term treatment of established tumors with a pharmacological dose of melatonin induced tumor regression via a melatonin receptor-mediated signal transduction mechanism involving the inhibition of tumor LA uptake and metabolism

**Effetti antineoplastici della melatonina su una rara forma maligna d'origine mesenchimale: inibizione del segnale di trasduzione del recettore della melatonina-mediato, metabolismo dell'acido linoleico e crescita dei xenotrapianti del liposarcoma umano del tessuto isolato.**

La melatonina fornisce un segnale circadiano che regola la crescita del tumore dipendente dall'acido linoleico (LA). Nei trapianti eteroplastici del cancro dei roditori e degli umani d'origine epiteliale in vivo, la melatonina sopprime gli effetti degli stimolatori della crescita dell'acido linoleico (LA), bloccando il suo assorbimento ed il suo metabolismo all'agente mitogeno, ossia l'acido 13-acido idrossi octadecadienoico (13-HODE). Questo studio ha valutato l'ipotesi che entrambi gli effetti acuti ed inibitori a lungo termine della melatonina, siano esercitati su LA di trasporto sul metabolismo e sulla crescita dell'attività nel tessuto umano-isolato del leiomiomasarcoma (LMS), un sarcoma dei tessuti molli del muscolo di derivazione mesenchimale, per mezzo dell'inibizione della melatonina mediata dai recettori dell'attività di trasduzione del segnale. La melatonina aggiunta all'acqua potabile del tessuto cuscinetto isolato dei xenotrapianti LMS di ratto femmina nudo ed alimentato con olio di mais al 5% (CO), ha causato una rapida regressione di questi tumori (0,17 +/- 0,02 g/giorno) se messi a confronto con gli eterotrapianti di controllo che hanno continuato a crescere a 0,22 +/- 0,03 g/giorno per un periodo di 10 giorni. L'irrorazione di LMS in "situ" per 150 minuti con del sangue arterioso di un donatore in aggiunta ai livelli fisiologici notturni della melatonina, ha mostrato una soppressione in funzione della dose, della produzione di cAMP del tumore, ha mostrato altresì l'assorbimento di LA, il rilascio di 13-HODE, la chinasi regolata dal segnale extracellulare (ERK 1 / 2) di mitogeno proteina attivata chinasi (MEK), l'attivazione di Akt

ed [(3) H] l'incorporazione di timidina nel DNA ed il contenuto del DNA. Gli effetti inibitori della melatonina erano reversibili e prevenibili sia con il recettore antagonista della melatonina S20928 sia con la tossina della pertosse e la forskolina, o il 8-Br-cAMP. Questi risultati dimostrano che, come osservato nei tumori di derivazione epiteliale, una concentrazione fisiologica notturna di melatonina aumenta notevolmente l'attività proliferativa di xenotrapianti mesenchimali umani LMS, mentre il trattamento a lungo termine dei tumori stabilito con una dose farmacologica di melatonina induce ad una regressione del tumore tramite un meccanismo di trasduzione del segnale mediato del recettore della melatonina che coinvolge l'inibizione della captazione del tumore LA e del metabolismo.

## **Melatonin prevents the development of hyperplastic urothelium induced by repeated doses of cyclophosphamide.**

Virchows Arch. 2009 Jun;454(6):657-66.

Repeated cyclophosphamide (CP) chemotherapy increases the risk of developing bladder cancer, which could be due to the extremely rapid proliferation of urothelial cells observed in hyperplastic urothelium induced by CP treatment. We investigated the effect of melatonin on the development of urothelial hyperplasia induced by repeated CP treatment. Male ICR mice were injected with CP (150 mg/kg) or melatonin (10 mg/kg) with CP once a week for 3, 4 and 5 weeks. Transmission and scanning electron microscopy, immunohistochemistry and Western blot analysis were used to study the ultrastructure, apoptosis, proliferation and differentiation of urothelial cells. Repeated doses of CP caused the development of hyperplastic urothelium with up to ten cell layers and increased proliferation and apoptotic indices regarding Ki-67 and active caspase-3 immunohistochemistry, respectively. Scanning electron microscopy observations, cytokeratin and asymmetrical unit membrane immunohistochemistry and Western blot analysis showed a lower differentiation state of superficial urothelial cells. Melatonin co-treatment prevented the development of hyperplastic urothelium, statistically significantly decreased proliferation and apoptotic indices after four and five doses of CP and caused higher differentiation state of superficial urothelial cells.

## **La melatonina previene lo sviluppo dell'urotelio iperplastico indotto da ripetute dosi di ciclofosfamide**

Ripetute chemioterapie di ciclofosfamide (CP) aumentano il rischio di sviluppare il cancro alla vescica che potrebbe essere dovuto ad una proliferazione estremamente rapida delle cellule uroteliali osservata nella iperplastica dell'urotelio indotta da trattamento con CP. Abbiamo studiato l'effetto della melatonina sullo sviluppo dell'iperplasia uroteliale indotta dal trattamento ripetuto di CP. A dei ratti maschi ICR sono stati iniettati del CP (150 mg / kg) o della melatonina (10 mg / kg) con CP una volta alla settimana per 3, 4 e 5 settimane. Per studiare l'ultrastruttura, l'apoptosi, la proliferazione e la differenziazione delle cellule uroteliali sono stati utilizzati: la trasmissione e la scansione elettronica microscopica, l'immunoistochimica ed il test "Western blot". Dosi ripetute di CP hanno causato rispettivamente lo sviluppo dell'urotelio iperplastico costituito fino a dieci strati di cellule ed un aumento della proliferazione e gli indici apoptotici relativi a Ki-67 e alla caspasi-3 immunoistochimica attiva. Osservazioni per mezzo di uno strumento di microscopia elettronica a scansione, l'immunoistochimica della membrana unità asimmetrica e l'analisi "Western blot" hanno mostrato uno stato di differenziazione inferiore delle cellule uroteliali superficiali. Il co-trattamento con la melatonina ha impedito lo sviluppo dell'urotelio iperplastico è inoltre diminuita significativamente la proliferazione e gli indici apoptotici dopo quattro e cinque dosi di CP e ha dato luogo ad uno stato di maggiore differenziazione delle cellule uroteliali superficiali.

## **Light-at-night, circadian disruption and breast cancer: assessment of existing evidence.**

Int J Epidemiol. 2009 Aug;38(4):963-70.

**BACKGROUND:** Breast cancer incidence is increasing globally for largely unknown reasons. The possibility that a portion of the breast cancer burden might be explained by the introduction and increasing use of electricity to light the night was suggested >20 years ago.

**METHODS:** The theory is based on nocturnal light-induced disruption of circadian rhythms, notably reduction of melatonin synthesis. It has formed the basis for a series of predictions including that non-day shift work would increase risk, blind women would be at lower risk, long sleep duration would lower risk and community nighttime light level would co-distribute with breast cancer incidence on the population level.

**RESULTS:** Accumulation of epidemiological evidence has accelerated in recent years, reflected in an International Agency for Research on Cancer (IARC) classification of shift work as a probable human carcinogen (2A). There is also a strong rodent model in support of the light-at-night (LAN) idea.

**CONCLUSION:** If a consensus eventually emerges that LAN does increase risk, then the mechanisms for the effect are important to elucidate for intervention and mitigation. The basic understanding of phototransduction for the circadian system, and of the molecular genetics of circadian rhythm generation are both advancing rapidly, and will provide for the development of lighting technologies at home and at work that minimize circadian disruption, while maintaining visual efficiency and aesthetics. In the interim, there are strategies now available to reduce the potential for circadian disruption, which include extending the daily dark period, appreciate nocturnal awakening in the dark, using dim red light for nighttime necessities, and unless recommended by a physician, not taking melatonin tablets.

## **Luce di notte, disturbi dei ritmi circadiani e carcinoma al seno. Valutazione delle prove esistenti.**

**ANTEFATTO:** l'incidenza del cancro al seno è in aumento a livello globale per una serie di ragioni, gran parte delle quali ancora sconosciute. La possibilità che una parte dell'aggravio del cancro al seno potrebbe essere spiegata per mezzo dell'introduzione e dell'uso crescente dell'energia elettrica per illuminare la notte è stato suggerita > 20 anni fa.

**METODI:** La teoria si basa sul concetto di disturbo dei ritmi circadiani indotto dalla luce notturna, in particolare viene analizzata la riduzione della sintesi della melatonina. Tale teoria ha costituito la base per una serie di previsioni tra le quali quella del lavoro a turni non-diurni che aumenterebbe il rischio di cancro. Donne cieche sarebbero meno esposte al rischio di cancro al seno e conseguentemente il sonno di lunga durata ne ridurrebbe il rischio ed infine il livello di luce notturna nella comunità sarebbe fortemente legato all'incidenza del carcinoma al seno..

**RISULTATI:** L'accumulo delle prove epidemiologiche si è sveltito negli ultimi anni, e lo si vede dai dati ottenuti dalla classifica del lavoro a turni dell'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (IARC) dalla quale è risultato che il lavoro a turni può essere un probabile carcinogeno umano (2A). Vi è anche un modello forte di roditore a sostegno del concetto di luce di notte (LAN).

**CONCLUSIONE:** se alla fine emerge un consenso riguardo al fatto che LAN non aumenta il rischio, allora è importante chiarire i meccanismi causa - effetto al fine di poter intervenire e mitigare il danno. La comprensione di base della fototrasduzione per il sistema circadiano, e della genetica molecolare della generazione del ritmo circadiano stanno entrambe avanzando rapidamente, e saranno d'impulso per uno sviluppo delle tecnologie dell'illuminazione a casa ed al

lavoro atto a minimizzare i disagi dei ritmi circadiani, pur mantenendo l'efficienza visiva ed estetica. Nel frattempo, oggi giorno ci sono delle strategie disponibili per ridurre il potenziale di disturbo del ritmo circadiano, che comprendono l'estensione del periodo di buio giornaliero, l'apprezzamento del risveglio notturno al buio usando una luce fioca rossa per le necessità notturne, e la raccomandazione che senza il consiglio del medico non si deve assumere la melatonina in compresse.

## **Melatonin modulates microfilament phenotypes in epithelial cells: implications for adhesion and inhibition of cancer cell migration.**

Histol Histopathol. 2009 Jun;24(6):789-99.

Cell migration and adhesion are cytoskeleton-dependent functions that play a key role in epithelial physiology. Specialized epithelial cells in water transport have specific microfilament rearrangements that make these cells adopt a polyhedral shape, forming a sealed monolayer which functions as permeability barrier. Also, specific polarized microfilament phenotypes are formed at the front and the rear of migratory epithelial cells. In pathological processes such as cancer, increased migration occurs in invasive cells driven by the formation of polarized and differential microfilament phenotypes. Melatonin, the main product secreted by the pineal gland during dark phase of the photoperiod, acts as a cytoskeletal modulator in normal and cancer cells. In this paper we will summarize evidence supporting that melatonin acts as a microfilament modulator in epithelial MDCK cells, and we will describe its effects on cytoskeleton organization involved in the mechanism by which melatonin synchronizes water transport. In addition, we will review recent data that indicate that melatonin is able to switch microfilament phenotypes in MCF-7 human mammary cancer cells, from invasive migratory cells to dormant microfilament phenotypes that occur in non-migratory cells. Moreover, we will discuss the implications of the cytoskeleton as therapeutic target for cancer cells.

## **La melatonina modula i microfilamenti nei fenotipi delle cellule epiteliali: implicazioni per l'adesione e l'inibizione della proliferazione delle cellule tumorali.**

La migrazione cellulare e l'adesione sono funzioni del citoscheletro-dipendenti che svolgono un ruolo chiave nella fisiologia epiteliale. Le cellule epiteliali specializzate nel trasporto di acqua presentano riarrangiamenti microfilamenti specifici che portano queste cellule ad assumere una forma poliedrica, formando un monostrato sigillato che funziona come barriera di permeabilità. Inoltre, nella parte anteriore e posteriore delle cellule epiteliali si formano specifici fenotipi microfilamenti migratori polarizzati. In processi patologici come il cancro, l'aumento della migrazione avviene nelle cellule invasive guidato dalla formazione di microfilamenti di fenotipi polarizzati e differenziali. La melatonina, il principale prodotto secreto dalla ghiandola pineale durante la fase buia del fotoperiodo, agisce come un modulatore del citoscheletro nelle cellule normali e tumorali. In questo lavoro si riassumono i documenti giustificativi del fatto che la melatonina agisce come un modulatore dei microfilamenti nelle cellule epiteliali MDCK, e si descrivono i suoi effetti sull'organizzazione del citoscheletro. Tali effetti sono coinvolti nel meccanismo con cui la melatonina sincronizza il trasporto dell'acqua. Inoltre, rivedremo i dati recenti che indicano che la melatonina è in grado di passare i fenotipi dei microfilamenti nelle cellule umane MCF-7 del carcinoma mammario, dalle cellule invasive migratorie ai fenotipi dei microfilamenti dormienti che si trovano nelle cellule non-migratorie. Inoltre, si discuterà delle implicazioni del citoscheletro come target terapeutico per le cellule tumorali.

133: Grant SG, Melan MA, Latimer JJ, Witt-Enderby PA.

## **Melatonin and breast cancer: cellular mechanisms, clinical studies and future perspectives.**

Expert Rev Mol Med. 2009 Feb 5;11:e5.

Recent studies have suggested that the pineal hormone melatonin may protect against breast cancer, and the mechanisms underlying its actions are becoming clearer. Melatonin works through receptors and distinct second messenger pathways to reduce cellular proliferation and to induce cellular differentiation. In addition, independently of receptors melatonin can modulate oestrogen-dependent pathways and reduce free-radical formation, thus preventing mutation and cellular toxicity. The fact that melatonin works through a myriad of signalling cascades that are protective to cells makes this hormone a good candidate for use in the clinic for the prevention and/or treatment of cancer. This review summarises cellular mechanisms governing the action of melatonin and then considers the potential use of melatonin in breast cancer prevention and treatment, with an emphasis on improving clinical outcomes.

## **Melatonina e il carcinoma al seno, meccanismi cellulari, studi clinici e prospettive future.**

Studi recenti hanno suggerito che la melatonina, un ormone secreto dalla ghiandola pineale, possa proteggere contro il cancro al seno. I meccanismi alla base delle azioni della melatonina stanno diventando sempre più chiari. La melatonina funziona attraverso dei recettori e delle distinte vie di secondo messaggero per ridurre la proliferazione cellulare e per indurre al differenziamento cellulare. Inoltre, indipendentemente dai recettori, la melatonina è in grado di modulare i percorsi estrogeno-dipendenti e di ridurre la formazione di radicali liberi, prevenendo così la mutazione e la tossicità cellulare. Il fatto che la melatonina funzioni attraverso una miriade di cascate di segnalazione che sono protettive per le cellule, rende questo ormone un buon candidato per la prevenzione e/o la cura del cancro. Questo articolo riassume i meccanismi cellulari che regolano l'azione della melatonina e quindi prende in considerazione l'uso potenziale della melatonina nella prevenzione del tumore al seno e nella sua cura, con particolare attenzione al miglioramento dei risultati clinici.

## **Evidence for a biphasic apoptotic pathway induced by melatonin in MCF-7 breast cancer cells.**

J Pineal Res. 2009 Mar;46(2):172-80.

Previous investigations demonstrated that melatonin exerts an oncostatic action on estrogen-responsive breast cancer, both in vitro and in vivo. Nevertheless, the pro-apoptotic effect of melatonin is still a matter of debate. An experimental study was undertaken to focus on melatonin-related apoptosis and to identify the apoptotic pathways involved. Whole cell-count, flow-cytometry analysis and proteins involved in apoptotic pathways [p53, p73, murine double minute 2 (MDM2), caspases-9,-7,-6, cleaved-poly ADP ribose polymerase (PARP), Bcl-2, Bax and apoptotic inducing factor (AIF)] were investigated in human MCF-7 breast cancer cells treated with physiological (1 nM) concentration of melatonin. Melatonin exerts a significant growth-inhibitory effect on MCF-7 cells, becoming evident after 72 hr and thereafter increasing linearly up to 144 hr. In this model, the growth-inhibition is transforming growth factor beta 1 (TGFbeta1)-dependent and it might be reversed by adding an anti-TGFbeta1 antibody. Melatonin induces a significant rise in apoptotic rate, at both 24 and 96 hr. The anti-TGFbeta1 antibody almost completely suppresses melatonin-related late apoptosis; however, early apoptosis is unaffected. Early programmed cell death is associated with a significant increase in the p53/MDM2 ratio and in AIF release, without modifications in caspase activity or cleaved-PARP levels. Activated caspases-9 and -7 and cleaved-PARP increased significantly at 96 hr, concomitantly with a down-regulation of the Bcl-2/Bax ratio. These data suggest that two distinct apoptotic processes are triggered by melatonin in MCF-7 cells: an early, TGFbeta1 and caspase-independent response, and a late apoptotic TGFbeta1-dependent process in which activated-caspase-7 is likely to be the terminal effector

## **Prova di un percorso bifasico apoptotico indotto dalla melatonina nelle cellule MCF-F del carcinoma al seno.**

Studi passati hanno dimostrato che la melatonina esercita un'azione oncostatica sul carcinoma al seno estrogeno-sensibile, sia in vitro che in vivo. Tuttavia, l'effetto pro-apoptotico della melatonina rimane ancora materia di dibattito. E' stato intrapreso uno studio sperimentale per focalizzare l'attenzione sull'apoptosi legata alla melatonina e per l'individuazione dei percorsi apoptotici in essa coinvolti. Sono state studiate cellule umane cancerogene del seno MCF-7 trattate con una concentrazione fisiologica (1 nM) di melatonina. Lo studio ha analizzato: la totalità delle cellule, l'analisi della citometria a flusso e le proteine coinvolte nei percorsi apoptotici [p53, p73, murino doppio 2 minuti (MDM2), caspasi-9, -7, -6, sfaldati poli-ADP ribosio polimerasi (PARP), Bcl- 2, Bax e il fattore che induce all'apoptosi (AIF)]. La melatonina esercita un effetto di significativa inibizione della crescita sulle cellule MCF-7, diventando evidente dopo 72 ore e, successivamente, aumentando linearmente fino a 144 ore. In questo modello l'inibizione della crescita sta trasformando il fattore di crescita beta 1 (TGFbeta1)-dipendente e potrebbe essere invertito mediante l'aggiunta di un anticorpo anti-TGFbeta1. La melatonina induce un aumento significativo del tasso di apoptosi, sia a 24 che a 96 ore. L'anticorpo anti-TGFbeta1 sopprime quasi completamente la tarda apoptosi legata alla melatonina, tuttavia, l'apoptosi precoce rimane inalterata. La morte cellulare precocemente programmata è associata ad un aumento significativo del rapporto p53/MDM2 enel rilascio fondi AIF (fattore che induce all'apoptosi), senza modifiche dell'attività delle caspasi o dei livelli spaccati di PARP. Le caspasi attivate 9 e 7 e i PARP spaccati risultavano significamene aumentate a 96 ore, in concomitanza con una sotto-regolazione del rapporto Bcl-2/Bax. Tali dati suggeriscono che la melatonina attiva due distinti processi apoptotici nelle cellule MCF-7 probabilmente avendo come effetti conclusivi: una risposta precoce di TGFbeta1, delle caspasi-indipendenti ed un tardivo processo apoptotico di TGFbeta1-dipendente che ha attivato la caspasi-7 è PMID: 19175854 [PubMed - indicizzato per MEDLINE]

135: Leston J, Mottolese C, Champier J, Jouvet A, Brun J, Sindou M, Chazot G, Claustrat B, Fèvre-Montange M.

### **Contribution of the daily melatonin profile to diagnosis of tumors of the pineal region.**

J Neurooncol. 2009 Jul;93(3):387-94.

Tumors of the pineal region (TPR) include different entities: germ cell tumors (GCT), pineal parenchymal tumors (PPT), meningiomas, and glial tumors. Except for GCT, there are no peripheral markers and histopathological diagnosis needs biopsy or surgery. We studied daily melatonin variations in twenty-nine patients with TPR and five with tectal plate glioma (TPG), used as controls, before and/or after surgery. Before surgery, a melatonin nycthemeral rhythm was observed in patients with TPG and TPR (one cyst, three PPT, one papillary tumor of the pineal region, two meningiomas, six gliomas). Melatonin rhythm was dramatically reduced for undifferentiated or invasive tumors. After surgery, the absence of melatonin variation in some cases could be the consequence of pineal damage by surgery. The contribution of determination of melatonin profiles to the diagnosis of TPR remains limited but of interest. The evidence for melatonin deficiency could justify melatonin administration to prevent the postpinealectomy syndrome.

### **Contributo del profilo di melatonina giornaliero nella diagnosi dei tumori nella regione pineale.**

I tumori della regione pineale (TPR) comprendono diversi tipi di tumori: tumori delle cellule germinali (GCT), tumori parenchimali pineali (PPT), meningiomi e tumori gliali. Fatta eccezione per i GCT, non ci sono marcatori periferici e la diagnosi istopatologica necessita di una biopsia o di un intervento chirurgico. Abbiamo studiato le variazioni giornaliere della melatonina in 29 pazienti con TPR e cinque con glioma "Tectal Plate" (TPG) (glioma del tetto del mesencefalo), utilizzati come controlli, prima e/o dopo la chirurgia. Prima dell'intervento, è stato osservato il ritmo nictemerale della melatonina nei pazienti con TPG e TPR (una ciste, tre PPT, un tumore papillare della regione pineale, due meningiomi, sei glomi). Il ritmo della melatonina è stato drasticamente ridotto per i tumori indifferenziati o invasivi. Dopo l'intervento, l'assenza di variazioni della melatonina, in alcuni casi potrebbe essere la conseguenza di un danno pineale da intervento chirurgico. Il contributo della determinazione dei profili di melatonina per la diagnosi del TPR rimane limitato, ma in ogni caso di un certo interesse. La prova dimostrante la carenza di melatonina potrebbe giustificare la somministrazione di melatonina per prevenire la sindrome da postpinealectomia.

136: Kloog I, Haim A, Stevens RG, Portnov BA.

## **Global co-distribution of light at night (LAN) and cancers of prostate, colon, and lung in men.**

Chronobiol Int. 2009 Jan;26(1):108-25.

The incidence rates of cancers in men differ by countries of the world. We compared the incidence rates of three of the most common cancers (prostate, lung, and colon) in men residing in 164 different countries with the population-weighted light at night (LAN) exposure and with several developmental and environmental indicators, including per capita income, percent urban population, and electricity consumption. The estimate of per capita LAN exposure was a novel aspect of this study. Both ordinary least squares (OLS) and spatial error (SE) regression models were used in the analysis. We found a significant positive association between population exposure to LAN and incidence rates of prostate cancer, but no such association with lung cancer or colon cancer. The prostate cancer result is consistent with a biological theory and a limited number of previous studies of circadian disruption and risk. The LAN-prostate cancer connection is postulated to be due to suppression of melatonin and/or disruption of clock gene function. An analysis holding other variables at average values across the 164 countries yielded a risk of prostate cancer in the highest LAN-exposed countries 110% higher than in the lowest LAN exposed countries. This observed association is a necessary condition for a potentially large effect of LAN on risk of prostate cancer. However, it is not sufficient due to potential confounding by factors that increase the risk of prostate cancer and are also associated with LAN among the studied countries.

## **Co-distribuzione globale della luce di notte (LAN) e dei tumori alla prostata, colon, e ai polmoni negli uomini.**

I tassi d'incidenza del cancro negli uomini sono diversi nei diversi paesi del mondo. Abbiamo confrontato i tassi d'incidenza di tre dei tumori più comuni (prostata, polmoni e colon) in uomini residenti in 164 paesi diversi con diversa esposizione solare e (LAN) e con numerosi indicatori di sviluppo ed ambientali, compreso il reddito pro-capite, la percentuale della popolazione urbana ed il consumo di energia elettrica. La stima dell'esposizione LAN pro capite ha rappresentato un aspetto innovativo di questo studio. Per l'analisi sono stati utilizzati sia i modelli dei quadrati ordinari minimi (OLS) sia quelli dell'errore spaziale (SE) così come i modelli di regressione spaziale. Abbiamo riscontrato un'importante associazione positiva tra l'esposizione a LAN della popolazione ed i tassi d'incidenza del cancro alla prostata, ma tale associazione non è stata riscontrata nè nel cancro ai polmoni nè in quello al colon. Il risultato ottenuto sul cancro alla prostata è compatibile con la teoria biologica e con un ristretto numero di studi precedenti relativi al danno conseguente ad un'alterazione dei ritmi circadiani e dei rischi ai quali incorre una persona che presenta un ritmo circadiano alterato. Si suppone che il rapporto prostata-LAN sia dovuto alla soppressione della melatonina e/o all'interruzione della funzione del gene che regola l'orologio circadiano. Un'analisi svolta nei 164 paesi oggetto dello studio, ha mantenuto le altre variabili a dei valori medi e ha dimostrato che il rischio di cancro alla prostata era del 110% superiore nei paesi nei quali l'esposizione a LAN era maggiore rispetto a quella riscontrata nei paesi esposti a LAN più basso. L'associazione osservata rappresenta una condizione necessaria per un effetto potenzialmente elevato del LAN sul rischio di ammalarsi di cancro alla prostata. Tutto ciò però non è sufficiente, in quanto nei paesi studiati vi è una potenziale confusione tra i vari fattori che aumentano il rischio di cancro alla prostata e che sono anch'essi associati al LAN.

137: Schernhammer ES, Hankinson SE.

## Urinary melatonin levels and postmenopausal breast cancer risk in the Nurses' Health Study cohort.

Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2009 Jan;18(1):74-9

**BACKGROUND:** Melatonin seems to play a role in breast cancer etiology, but data addressing the association between melatonin levels and breast cancer risk in postmenopausal women is sparse.

**METHODS:** We conducted a nested case-control study in the Nurses' Health Study cohort. First spot morning urine was collected from 18,643 cancer-free women from March 2000 through December 2002. The concentration of the major metabolite of melatonin, 6-sulfatoxymelatonin (aMT6s), was available for 357 postmenopausal women who developed incident breast cancer through May 31, 2006, along with 533 matched control subjects. We used multivariable conditional logistic regression models to investigate associations. All statistical tests were two sided.

**RESULTS:** An increased concentration of urinary aMT6s was statistically significantly associated with a lower risk of breast cancer (odds ratio for the highest versus lowest quartile of morning urinary aMT6s, 0.62; 95% confidence interval, 0.41-0.95; P(trend) = 0.004). There was no apparent modification of risk by hormone receptor status of breast tumors, age, body mass index, or smoking status.

**CONCLUSION:** Results from this prospective study add substantially to the growing literature that supports an inverse association between melatonin levels and breast cancer risk.

## Livelli di melatonina nelle urine ed il rischio del cancro al seno in soggetti in postmenopausa nello studio relativo allo stato di salute delle infermiere

### ABSTRACT

**ANTEFATTO:** La melatonina sembra avere un ruolo nell'eziologia del cancro al seno, ma i dati che si riferiscono all'associazione tra i livelli di melatonina ed il rischio di cancro al seno nelle donne in postmenopausa sono scarsi.

**METODI:** Abbiamo condotto uno studio "case-control" all'interno dello studio "cohort" (studio di gruppo) relativo allo stato di salute di un gruppo di infermiere. Il primo campione d'urina del mattino è stato raccolto da 18.643 donne non malate di tumore da marzo 2000 fino al dicembre 2002. La concentrazione del principale metabolita della melatonina, la 6-sulfatosimelatonina (aMT6s), era disponibile per 357 donne in post-menopausa che avevano avuto un episodio di cancro al seno fino al 31 maggio 2006, confrontati con 533 soggetti di controllo. Abbiamo utilizzato modelli multivariabili di regressione logistica condizionale per studiare le possibili associazioni. Tutti i test statistici erano bilaterali.

**RISULTATI:** un aumento della concentrazione urinaria di aMT6s, è stata significativamente associata ad un minor rischio di cancro al seno (differente tasso per il più alto quartile versus il più basso di aMT6s concentrazione urinaria del mattino 0,62, intervallo di confidenza 95% 0,41-0,95, p ("trend"- andamento) = 0.004). Non è risultata alcuna modifica apparente di rischio in base allo stato dei recettori ormonali dei tumori della mammella, rispetto all'età, all'indice di massa corporea, o all'abitudine al fumo.

**CONCLUSIONE:** I risultati di questo studio prospettico hanno contribuito in modo sostanziale all'aumento della letteratura che sostiene un'associazione inversa tra i livelli di melatonina ed il rischio di carcinoma al seno.

## **Melatonin, sleep disturbance and cancer risk.**

Sleep Med Rev. 2009 Aug;13(4):257-64.

The pineal hormone melatonin is involved in the circadian regulation and facilitation of sleep, the inhibition of cancer development and growth, and the enhancement of immune function. Individuals, such as night shift workers, who are exposed to light at night on a regular basis experience biological rhythm (i.e., circadian) disruption including circadian phase shifts, nocturnal melatonin suppression, and sleep disturbances. Additionally, these individuals are not only immune suppressed, but they are also at an increased risk of developing a number of different types of cancer. There is a reciprocal interaction and regulation between sleep and the immune system quite independent of melatonin. Sleep disturbances can lead to immune suppression and a shift to the predominance in cancer-stimulatory cytokines. Some studies suggest that a shortened duration of nocturnal sleep is associated with a higher risk of breast cancer development. The relative individual contributions of sleep disturbance, circadian disruption due to light at night exposure, and related impairments of melatonin production and immune function to the initiation and promotion of cancer in high-risk individuals such as night shift workers are unknown. The mutual reinforcement of interacting circadian rhythms of melatonin production, the sleep/wake cycle and immune function may indicate a new role for undisturbed, high quality sleep, and perhaps even more importantly, uninterrupted darkness, as a previously unappreciated endogenous mechanism of cancer prevention.

### **La melatonina, i disturbi del sonno ed il rischio di cancro**

L'ormone pineale melatonina è coinvolto nella regolazione del ritmo circadiano e nella facilitazione del sonno. Inoltre è coinvolto nell'inibizione dello sviluppo del cancro e nella sua crescita, potenziando altresì la funzione immunitaria. Tale funzione è particolarmente riscontrabile in alcuni individui, come ad esempio i lavoratori del turno di notte, che sono esposti alla luce durante la notte, sulla base di un'esperienza biologica di un ritmo regolare (cioè circadiano) alterato, comprese eventuali interruzioni e spostamenti di fase circadiana, nonché soppressione della produzione della melatonina notturna con conseguenti disturbi del sonno. Inoltre, questi individui non sono solo immunitario soppressi, ma sono anche soggetti ad un rischio maggiore di sviluppare una serie di diversi tipi di cancro. Vi è una reciproca interazione e regolazione fra il sonno ed il sistema immunitario abbastanza indipendente dalla melatonina. I disturbi del sonno possono portare alla soppressione immunitaria ed al passaggio al predominio delle citochine cancro-stimolatori. Alcuni studi suggeriscono che una riduzione della durata del sonno notturno sia associata ad un maggiore rischio di sviluppo del cancro al seno. Sono ancora sconosciuti i contributi individuali relativi ai disturbi del sonno, la distruzione dei ritmi circadiani dovuti all'esposizione alla luce notturna e alle svalutazioni connesse alla produzione di melatonina e alla funzione immunitaria per l'avvio e la promozione di tumori in soggetti ad alto rischio come i lavoratori del turno di notte. Il rafforzamento reciproco dell'interagire dei ritmi circadiani di produzione di melatonina, il ciclo sonno / veglia e la funzione immunitaria possono indicare un nuovo ruolo per un sonno di alta qualità indisturbato e forse ancora più importante, il buio senza interruzioni, come un meccanismo endogeno precedentemente incompreso della prevenzione del cancro

139: Esposito E, Genovese T, Caminiti R, Bramanti P, Meli R, Cuzzocrea S.

## **Melatonin reduces stress-activated/mitogen-activated protein kinases in spinal cord injury.**

Res J Pineale. 2009 Jan; 46 (1) :79-86.

Permanent functional deficits following spinal cord injury (SCI) arise from both mechanical injury and from secondary tissue reactions involving inflammation. The mitogen-activated protein kinases (MAPKs) play a critical role in cell signaling and gene expression. MAPK family includes three major members: extracellular signal regulated kinase (ERK), p38, and c-Jun N-terminal kinase (JNK), representing three different signaling cascades. Moreover, various studies have clearly shown that high-mobility group box 1 (HMGB1) protein is implicated as a putative danger signal involved in the pathogenesis of a variety of inflammatory conditions including autoimmunity, cancer, trauma and hemorrhagic shock, and ischemia-reperfusion injury. Recently, we have reported that the pineal secretory product melatonin exerts important anti-inflammatory effects in an experimental model of SCI induced by the application of vascular clips (force of 24 g) to the dura after a four-level T5-T8 laminectomy. However, no reports are available on the effect of melatonin on MAPK signaling pathways and HMGB1 expression in SCI. The aim of the present study was to evaluate whether the melatonin protective effect observed in SCI is related to the regulation of MAPK signaling pathways and HMGB1 in mice. In this study we demonstrate the efficacy of treatment with the melatonin in SCI in mice in reducing (a) motor recovery, (b) activation of MAPKs p38, JNK and ERK1/2, (c) tumor necrosis factor-alpha expression, and (d) expression of HMGB1. We propose that melatonin's ability to reduce SCI in mice is also related to a reduction in MAPK signaling pathways and HMGB1 expression.

## **La melatonina riduce le chinasi, una proteina attivata dallo stress e dal mitogeno, nelle lesioni del midollo spinale**

I Deficit funzionali permanenti conseguenti ad una lesione del midollo spinale (SCI) derivano sia da lesioni meccaniche sia dalle reazioni che coinvolgono l'infiammazione dei tessuti secondari. Le proteine chinasi mitogeno-attivate (MAPKs) svolgono un ruolo importante nella segnalazione cellulare e nell'espressione genica. La famiglia MAPK include tre componenti principali: il segnale extracellulare regolamentato chinasi (ERK), la p38 e la c-Jun N-terminale chinasi (JNK), che rappresentano tre diverse cascate di segnalazione. Inoltre, diversi studi hanno chiaramente dimostrato che la proteina del gruppo ad alta mobilità box 1 (HMGB1) è coinvolta nel meccanismo in quanto rappresenta un segnale di pericolo presunto coinvolto nella patogenesi di una varietà di condizioni infiammatorie, comprese le malattie autoimmuni, i tumori, i traumi e lo shock emorragico, ed infine il danno da ischemia-riperfusion. Recentemente, abbiamo riscontrato che il prodotto di secrezione della ghiandola pineale la melatonina, esercita importanti effetti anti-infiammatori in un modello sperimentale di SCI indotta mediante l'applicazione di clips vascolari (forza di 24 g) alla dura madre (o pachimeringe), dopo una laminectomia di quattro livelli T5-T8. Tuttavia, non sono disponibili dei dati sugli effetti della melatonina sull'espressione delle vie di segnalazione MAPK e HMGB nel SCI. Lo scopo del presente studio era di valutare se l'effetto protettivo della melatonina osservato nel SCI sia connesso alla regolamentazione delle vie di segnalazione MAPK e HMGB1 nei ratti. In questo studio si dimostra l'efficacia del trattamento con la melatonina nel SCI dei topi nella riduzione (a) motore di recupero, (b) nell'attivazione di MAPKs p38, JNK e ERK1 / 2, (c) nell'espressione del fattore di necrosi tumorale-alfa, e (d) nell'espressione di HMGB1. Riteniamo che la capacità della melatonina di ridurre SCI nei topi sia anche correlata ad una riduzione della via di segnale MAPK e dell'espressione di HMGB1

## **Circulating melatonin and the risk of breast and endometrial cancer in women.**

Lett. 2009 Aug 18;281(1):1-7.

Several decades of observational data have accumulated to implicate a potential role for melatonin in cancer prevention. Experimental studies suggest that the antineoplastic action of melatonin arises through many different mechanisms, including melatonin's antioxidant, antimutagenic, and antiangiogenic activity, as well as its ability to modulate the immune system and alter fat metabolism. Melatonin interacts with membrane and nuclear receptors, and may be linked to the regulation of tumor growth. Of particular relevance to breast cancer risk, melatonin may also block the estrogen receptor ER $\alpha$  and impact the enzyme aromatase, which produces estradiol. A growing number of epidemiologic studies have evaluated the relationship between night shift work as well as how varying duration of sleep affects peak melatonin secretion at night. While the studies demonstrate lower nightly melatonin levels in night workers, the evidence for an association between sleep duration and melatonin production is less clear. Similarly, both case-control and prospective cohort studies have consistently linked night shift work with breast cancer risk and, more recently, endometrial cancer - another tumor highly sensitive to estrogens. While, to date, the evidence for an association between sleep duration and breast cancer risk is less convincing, overall, there is increasing support for a potentially important link between melatonin and breast cancer risk and perhaps the risk of other tumors. As evidence increases, modifiable factors that have been shown to affect melatonin production, such as night shift work, are likely to gain increasing recognition as potential public health hazards. Additional studies are needed to delineate further the potential of melatonin in cancer prevention.

## **Melatonina circolante e rischio di cancro al seno e di cancro dell'endometrio nelle donne.**

La somma dei dati osservazionali, frutto di decenni di studi, ha dimostrato il potenziale ruolo della melatonina nella prevenzione del cancro. Gli studi sperimentali suggeriscono che l'azione antineoplastica della melatonina si svolge attraverso molti meccanismi diversi, tra i quali l'attività antiossidante e antimicotica della melatonina sommata alla sua attività antiangiogenica, così come la capacità della melatonina di modulare il sistema immunitario e di alterare il metabolismo dei grassi. La melatonina interagisce con i recettori di membrana e quelli nucleari, e può essere legata alla regolazione della crescita tumorale. Di particolare importanza la considerazione che, in relazione al rischio di cancro al seno, la melatonina può anche bloccare il recettore dell'estrogeno ER $\alpha$  e l'impatto dell'enzima aromatasi che produce estradiolo. Un crescente numero di studi epidemiologici ha valutato la relazione tra il turno di lavoro di notte e la durata variabile del sonno che influisce sul picco massima di secrezione della melatonina durante la notte. Mentre gli studi dimostrano chiaramente la presenza di livelli più bassi di secrezione di melatonina di notte dalla ghiandola pineale dei lavoratori notturni, l'evidenza di un'associazione tra durata del sonno e la produzione di melatonina è meno chiara. Allo stesso modo, sia il "case control" che gli studi prospettici "Cohort" hanno messo in relazione in modo molto stretto i turni di lavoro notturno con il rischio cancro al seno e, più recentemente, il cancro endometriale - un altro tumore altamente sensibile agli estrogeni. Mentre, ad oggi, l'evidenza di un'associazione tra durata del sonno e il rischio di cancro al seno è meno convincente, in generale, vi è un consenso crescente nel vedere un importante legame potenziale tra la melatonina ed il rischio di cancro al seno e forse il rischio di altri tumori. Con l'aumentare delle prove, i fattori modificabili che hanno dimostrato di influenzare la produzione di melatonina, come il lavoro notturno a turni, sono suscettibili di ottenere sempre più rilevanza come potenziali pericoli per la salute pubblica. Sono necessari ulteriori studi per delineare ulteriormente il potenziale della melatonina nella prevenzione del cancro.

142: Tanaka T, Yasui Y, Tanaka M, Tanaka T, Oyama T, Rahman KM.

### **Melatonin suppresses AOM/DSS-induced large bowel oncogenesis in rats.**

Chem Biol Interact. 2009 Jan 27;177(2):128-36.

The inhibitory effects of exogenous melatonin (MEL) on colon oncogenesis were investigated using an azoxymethane (AOM)/dextran sodium sulfate (DSS) rat model. Male F344 rats initiated with a single intraperitoneal injection of AOM (20mg/kg bw) were promoted by 1% (w/v) DSS in drinking water for 7 days. They were then given 0.4, 2 or 10ppm MEL in drinking water for 17 weeks. At week 20, the development of colonic adenocarcinoma was significantly inhibited by the administration with MEL dose-dependently. MEL exposure modulated the mitotic and apoptotic indices in the colonic adenocarcinomas that developed and lowered the immunohistochemical expression of nuclear factor kappa B, tumor necrosis factor alpha, interleukin-1beta and STAT3 in the epithelial malignancies. These results may indicate the beneficial effects of MEL on colitis-related colon carcinogenesis and a potential application for inhibiting colorectal cancer development in the inflamed colon.

### **La melatonina sopprime l'oncogenesi indotta da AOM/DSS dell'intestino grosso nei ratti.**

Gli effetti inibitori della melatonina esogena (MEL) nell'oncogenesi del colon sono stati studiati usando un modello di ratto azossimetano (AOM) / destrano solfato di sodio (DSS). I ratti maschi F344 che hanno iniziato con una singola iniezione intraperitoneale di OMA (20mg/kg di peso corporeo) sono stati promossi da 1% (w/v) DSS in acqua da bere per 7 giorni. E' stato quindi data loro 0,4, 2 o 10 ppm di MEL in acqua da bere per 17 settimane. Alla ventesima settimana è stato riscontrato che lo sviluppo di un adenocarcinoma del colon è stato significativamente inibito dalla somministrazione di MEL dose -dipendente. L'esposizione alla MEL ha modulato gli indici mitotici e apoptotici negli adenocarcinomi del colon e ha sviluppato ed abbassato l'espressione immunoistochimica del fattore nucleare kappa B, il fattore di necrosi tumorale alfa, l'interleuchina-1beta e lo STAT3 nei tumori epiteliali. Questi risultati supportano la tesi che la melatonina abbia degli effetti benefici sulla carcinogenesi del colon come conseguenza di una colite e di un potenziale suo utilizzo per l'inibizione dello sviluppo del cancro del colon-retto nel colon infiammato.

### **Alteration of the MT1 melatonin receptor gene and its expression in primary human breast tumors and breast cancer cell lines.**

Breast Cancer Res Treat. 2009 Nov; 118(2):293-305.

The MT1 melatonin receptor is bound and activated by the pineal hormone melatonin. This G protein-coupled melatonin receptor is expressed in human breast tumor cell lines, and when activated, mediates the growth-suppressive and steroid hormone/nuclear receptor modulatory actions of melatonin on breast tumor cells. In the current studies, we have examined the expression of the MT1 receptor in breast cancer cell lines and primary human breast tumors and correlated MT1 receptor expression with the deletion, rearrangement and amplification of the MT1 gene and established markers of breast cancer such as tumor size, stage, estrogen receptor alpha (ERalpha) and progesterone receptor (PR) expression. These studies suggest amplification of the MT1 gene in some breast tumors and an inverse correlation with ERalpha, PR and MT1 protein expression. Furthermore, these approaches employing immunohistochemical and immunofluorescent/confocal microscopic studies demonstrate that the MT1 receptor is localized to the caveoli and that MT1 expression in MCF-7 breast cancer cells can be repressed by estradiol and melatonin.

### **Alterazione del gene che codifica il recettore della melatonina MT1 e la sua espressione nei tumori primari umani e nelle linee cellulari del carcinoma alla mammella.**

Il recettore della melatonina MT1 è legato ed attivato dalla melatonina, ormone secreto dalla ghiandola pineale. Questo recettore di melatonina accoppiato con la proteina G è espresso nelle linee cellulari tumorali umane del carcinoma al seno e, quando attivato, media l'ormone della crescita-soppressiva e le azioni del recettore steroide ormono/nucleare modulatorio della melatonina sulle cellule tumorali del seno. Negli studi in corso, abbiamo esaminato l'espressione dei recettori MT1 nelle linee cellulari del cancro al seno, nei tumori primari umani del seno e nella relativa espressione dei recettori di MT1 mediante la cancellazione e l'amplificazione del gene MT1 e dei marcatori stabiliti del cancro al seno come le dimensioni del tumore, lo stadio, il recettore alfa degli estrogeni (ERalfa) e l'espressione del recettore del progesterone (PR). Tesi di studio suggeriscono l'amplificazione del gene MT1 in alcuni tumori della mammella e una correlazione inversa con ERalfa, PR e l'espressione della proteina MT1. Inoltre, questi approcci per mezzo di studi confocali microscopici immunostochimici e immunofluorescenti dimostrano che il recettore MT1 è localizzato nei caveoli e che espressione di MT1 nelle cellule cancerogene del seno MCF-7, possono essere represses dall'estradiolo e dalla melatonina.

## **Cranial irradiation-induced inhibition of neurogenesis in hippocampal dentate gyrus of adult mice: attenuation by melatonin pretreatment.**

J Pineal Res. 2009 Jan;46(1):71-8.

Radiation is an important therapeutic tool in the treatment of cancer. The tremendous development in radiotherapeutic techniques and dosimetry has made it possible to augment the patient survival. Therefore, attention has focused on long-range treatment side effects especially in relation to the neurocognitive changes. As cognitive health of an organism is considered to be maintained by the capacity of hippocampal neurogenesis, this study designed to evaluate the delayed effect of cranial irradiation on hippocampal neurogenesis, possible implication of oxidative stress and prophylactic action of melatonin in mice. One month after cranial irradiation (6 Gy, X-ray), changes in the population of immature and proliferating neurons in dentate gyrus were localized through the expression of the microtubule binding protein doublecortin (Dcx) and proliferation marker Ki-67. We found a substantial reduction in the Dcx and Ki-67 positive cells after irradiation. Melatonin pretreatment significantly ameliorated the radiation-induced decline in the Dcx and Ki-67 positive cells. In addition, profound increase in the 4-hydroxynonenal (4-HNE) and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine positive cells were reported in subventricular zone, granular cell layer and hilus after day 30 postirradiation. Immunoreactivity of these oxidative stress markers were significantly inhibited by melatonin pretreatment. To confirm the magnitude of free-radical scavenging potential of melatonin, we measured the in-vitro OH radical scavenging power of melatonin by electron spin resonance. Interestingly, the melatonin was capable of scavenging the OH radicals at very low concentration (IC(50) = 214.46 nm). The findings indicate the possible benefit of melatonin treatment to combat the delayed side effects of cranial radiotherapy.

## **L'inibizione della neurogenesi nel giro dentato dell'ippocampo indotta dall'irradiazione cranica di topi adulti: : attenuazione dei sintomi dovuta al pretrattamento con melatonina.**

Le radiazioni rappresentano un importante strumento terapeutico nel trattamento del cancro. L'enorme sviluppo delle tecniche di radioterapia e di dosimetria ha permesso di aumentare la sopravvivenza dei pazienti. Pertanto, l'attenzione si è concentrata sugli effetti collaterali del trattamento a lungo raggio specialmente in relazione ai cambiamenti neurocognitivi. Poiché la salute cognitiva di un organismo si considera essere mantenuta dalla capacità di neurogenesi ippocampale, questo studio è stato svolto per valutare l'effetto postumo dell'irradiazione cranica sulla neurogenesi ippocampale, la possibilità di coinvolgimento dello stress ossidativo e l'azione preventiva della melatonina sui topi. Un mese dopo irradiazione cranica (6 Gy, X-ray), sono stati localizzati dei cambiamenti nella popolazione di neuroni immaturi e proliferativi nel giro dentato attraverso l'espressione della proteina doublecortin legata al microtubulo (DCX) e alla proliferazione del marcatore Ki-67. Abbiamo riscontrato una sostanziale riduzione nelle cellule positive DCX e Ki-67 dopo l'irradiazione. Il pretrattamento con melatonina ha notevolmente migliorato il calo da radiazione indotta nel DCX e nelle cellule 7 positive Ki-6. Inoltre, è stato riscontrato un profondo aumento delle cellule idrossinonenale 4-(4-HNE) e delle cellule positive 8-idrossi-2'-deossiguanosina nella zona subventricolare, nello strato di cellule granulari e nell'ilo dopo il trentesimo giorno dalle radiazioni. L'immunoreattività di questi marker di stress ossidativo è stata significativamente inibita dal pretrattamento con melatonina. Per confermare l'entità del potenziale della melatonina di eliminare i radicali liberi, abbiamo misurato l'eliminatore del radicale OH in vitro, e il potere di eliminazione dei radicali della melatonina mediante risonanza dello spin elettronico. È interessante notare che la melatonina era in grado di eliminare i radicali OH a concentrazioni molto basse (IC (50) = 214,46 nm). I risultati indicano il possibile beneficio del

trattamento con la melatonina per combattere gli effetti collaterali postumi della radioterapia craniale.

150: Korkmaz A, Sanchez-Barcelo EJ, Tan DX, Reiter RJ.

### **Role of melatonin in the epigenetic regulation of breast cancer.**

Res Treat. 2009 May;115(1):13-27.

The oncostatic properties of melatonin as they directly or indirectly involve epigenetic mechanisms of cancer are reviewed with a special focus on breast cancer. Five lines of evidence suggest that melatonin works via epigenetic processes: (1) melatonin influences transcriptional activity of nuclear receptors (ERalpha, GR and RAR) involved in the regulation of breast cancer cell growth; (2) melatonin down-regulates the expression of genes responsible for the local synthesis or activation of estrogens including aromatase, an effect which may be mediated by methylation of the CYP19 gene or deacetylation of CYP19 histones; (3) melatonin inhibits telomerase activity and expression induced by either natural estrogens or xenoestrogens; (4) melatonin modulates the cell cycle through the inhibition of cyclin D1 expression; (5) melatonin influences circadian rhythm disturbances dependent on alterations of the light/dark cycle (i.e., light at night) with the subsequent deregulation of PER2 which acts as a tumor suppressor gene.

### **Ruolo della melatonina nella regolazione epigenetica del cancro al seno.**

Vengono studiate le proprietà oncostatiche della melatonina in quanto direttamente o indirettamente coinvolgono i meccanismi epigenetici del cancro, prestando particolare attenzione al cancro al seno. Cinque linee di prova suggeriscono che la melatonina funziona attraverso processi epigenetici: (1) la melatonina influenza l'attività trascrizionale dei recettori nucleari (ERalfa, GR e RAR) coinvolti nella regolazione della crescita delle cellule del cancro al seno, (2) la melatonina sotto-regola l'espressione dei geni responsabili della sintesi locale o l'attivazione degli estrogeni compresa l'aromatasi, un effetto che può essere mediato dalla metilazione del gene CYP19 o dalla deacetilazione degli istoni CYP19, (3) la melatonina inibisce l'attività della telomerasi e l'espressione indotta o da estrogeni naturali oppure da xenoestrogeni (4); la melatonina modula il ciclo cellulare attraverso l'inibizione dell'espressione della ciclina D1, (5) la melatonina influenza disturbi del ritmo circadiano dipendente dalle alterazioni del ciclo luce/buio (cioè, la luce di notte) con la conseguente deregolamentazione del PER2 che agisce come un gene soppressore del tumore

**ROCK-regulated cytoskeletal dynamics participate in the inhibitory effect of melatonin on cancer cell migration.**

J Pineal Res. 2009 Jan;46(1):15-21.

Cell movement is generated by a driving force provided by dynamic cytoskeletal organization. Two main cytoskeletal-dependent features, essential for migration, are the highly cell polarized structure and focal adhesion complexes. Cell migration and substrate anchorage are finely regulated by external signaling exerted by growth factors and hormones. In particular, the serine threonine kinase activated by the small GTPase Rho, the Rho-associated protein kinase (ROCK), participate in both processes through regulation of actin rearrangements in lamellipodia, filopodia, ruffles, and stress fibers. Melatonin, the main product secreted by the pineal gland has oncostatic properties. In MCF-7 cells, 1 nM melatonin reduces migration and invasiveness through increased expression of two cell surface adhesion proteins, E-cadherin and beta(1)-integrin. In this work, we studied the microfilament and microtubule rearrangements elicited by melatonin in migrating leader MCF-7 cells by a wound-healing assay. Additionally, cell anchorage was estimated by quantification of focal adhesions in MCF-7 cells cultured with melatonin. ROCK participation in the indole effects on anchorage and migration was explored by inhibition of the kinase activity with the specific inhibitor of ROCK, the Y-27632 compound. The results indicate that ROCK participates in the melatonin inhibitory effects on cell migration by changing cytoskeletal organization of leader MCF-7 cells. Also, they indicated that indole increased the number of focal contacts through ROCK. These results support the notion that melatonin inhibits cancer cell invasion and metastasis formation via ROCK-regulated microfilament and microtubule organization that converge in a migration/anchorage switch.

**Le dinamiche del citoscheletro ROCK regolato partecipano all'effetto inibitorio della melatonina nella migrazione della cellula tumorale.**

Il movimento delle cellule è generato da una forza motrice fornita da un'organizzazione dinamica del citoscheletro. Le due caratteristiche principali del citoscheletro-dipendente, essenziali per la migrazione, sono: la struttura cellulare altamente polarizzata ed i complessi di adesione focale. La migrazione delle cellule ed il substrato d'ancoraggio sono finemente regolati dalla segnalazione esterna esercitata dai fattori di crescita e dagli ormoni. In particolare, la chinasi serina treonina attivata dalla piccola GTPasi Rho, la chinasi associata alla proteina Rho (ROCK), partecipano ad entrambi i processi attraverso la regolamentazione degli riarrangiamenti d'actina nella lamellipodia, filopodia, nervosismi, e "stress fibers" (strutture di ordine superiore in cellule costituito da filamenti di actina). La melatonina, il principale prodotto secreto dalla ghiandola pineale possiede proprietà oncostatiche. Nelle cellule MCF-7, 1 nM di melatonina riduce la migrazione e l'invasività attraverso un'aumentata espressione di due proteine d'adesione della superficie delle cellule, E-caderina e di beta (1)-integrina. In questo studio abbiamo analizzato i riarrangiamenti dei microfilamenti ed i microtubuli creati dalla melatonina nella migrazione delle cellule leader MCF-7 mediante una ricerca sulla cicatrizzazione. Inoltre, l'ancoraggio delle cellule è stato stimato dalla quantificazione delle adesioni focali nelle cellule MCF-7 in coltura con la melatonina. La partecipazione ROCK agli effetti dell'indolo (o **2,3-benzopirrolo**) sull'ancoraggio e sulla migrazione è stata studiata mediante l'inibizione dell'attività della chinasi con l'inibitore specifico del ROCK, il composto Y-27.632. I risultati indicano che ROCK partecipa agli effetti inibitori della melatonina sulla migrazione delle cellule, modificando l'organizzazione del citoscheletro delle cellule leader MCF-7. Inoltre, è stato riscontrato che l'indolo ha aumentato il numero di contatti focali attraverso il ROCK. Questi risultati supportano l'idea che la melatonina inibisca l'invasione delle cellule tumorali e la

formazione di metastasi per mezzo di microfilamenti ROCK-regolati e dell'organizzazione dei microtubuli che convergono in uno scambio di migrazione/ancoraggio.

153: Sharma S, Haldar C.

### **Comparative effect of melatonin and vitamin E on phenylhydrazine-induced toxicity in the spleen of *Funambulus pennanti*.**

Toxicol. 2009 Feb;24(1):1-9.

Phenylhydrazine (PHZ) oxidation resulting in free iron release followed by free radical generation has increased frequency of cancer. This study aims towards the dose-dependent response of PHZ and the role of melatonin in comparison with vitamin E following PHZ-induced toxicity within the lymphoid tissue (spleen) of Indian tropical seasonal breeder, *Funambulus pennanti*, during reproductively active phase. An increase in the damages in terms of lipid peroxidation (LPO), apoptosis percentage, and splenomegaly was observed following different doses of PHZ treatment, i.e., 0.025, 0.5, and 1 mg/100 g body weight (b.wt.), where dose of 1 mg/100 g b.wt. showed more significant damages. Both melatonin (0.5 mg/100 g b.wt.) and vitamin E (1 mg/100 g b.wt.) administration ameliorated oxidative damages of 1 mg/100 g b.wt. PHZ-treated group. Melatonin altered PHZ-induced responses significantly to a greater degree than vitamin E as evidenced by LPO status, SOD activity, and ABTS radical cation scavenging activity of antioxidants. Thus, melatonin might be able to restrict carcinogenic property of PHZ-induced oxidative stress by protecting macromolecules of the cell from harmful effects of PHZ and instead preserving cell viability.

### **Effetto comparativo della melatonina e della vitamina E sulla tossicità indotta dalla fenilidrazina nella milza dei pennati *Funambulus*.**

L'ossidazione della fenilidrazina (PHZ) con conseguente rilascio di ferro libero seguita dalla creazione di radicali liberi ha aumentato la frequenza del cancro. Questo studio ha come obiettivo la risposta dose-dipendente al PHZ ed il ruolo della melatonina a confronto con la vitamina E a seguito di una tossicità indotta da PHZ all'interno del tessuto linfoide (milza) di un allevatore stagionale di pennanti *Funambulus* dell'India tropicale, durante la fase sessualmente attiva. È stato osservato un aumento dei danni in termini di perossidazione lipidica (LPO), di percentuale d'apoptosi e di splenomegalia, dopo la somministrazione di dosi diverse di trattamento PHZ, vale a dire, 0.025, 0,5, e 1 mg/100 g di peso corporeo (b.wt.), laddove una dose di 1 mg/100 g b.wt. ha dato luogo ai danni più significativi. La somministrazione sia di melatonina (0,5 mg/100 g b.wt.) che di vitamina E (1 b.wt. mg/100 g) ha migliorato i danni ossidativi di 1 mg/100 g b.wt. del gruppo trattato con PHZ-. La melatonina ha alterato le risposte da PHZ-indotto in modo significativo ad un grado maggiore rispetto a quello della vitamina E come dimostrano lo stato di LPO, l'attività SOD ed il catione ABTS che elimina l'attività degli antiossidanti. Così, la melatonina potrebbe essere in grado di limitare la proprietà cancerogena dello stress ossidativo indotto da PHZ mediante una protezione delle macromolecole della cellula dagli effetti nocivi di PHZ e la conservazione della vitalità cellulare.

Rögelsperger O, Wlcek K, Ekmekcioglu C, Humpeler S, Svoboda M, Königsberg R, Klimpfinger M, Jäger W, Thalhammer T.

### **Melatonin receptors, melatonin metabolizing enzymes and cyclin D1 in human breast cancer.**

J Recept Signal Transduct Res. 2011 Mar 8. [Epub ahead of print]

#### **Abstract**

**Background.** Melatonin suppresses breast cancer cell proliferation by inhibiting the upregulation of estrogen-induced cyclin D1 via its G-protein-coupled receptor MT1. Additionally, melatonin stimulates the expression of the estrogen sulfotransferase, SULT1E1. However, metabolism of melatonin via 6-hydroxylation by CYP1A1/1A2 and subsequent sulfonation by SULT1A1/1A3 decreases its intracellular concentration. This could have a negative impact on its oncostatic action in breast cancer. **Patients and methods.** In this pilot study, we performed immunohistochemical (IHC) analysis of MT1 and cyclin D1 in breast cancer specimens from 33 patients. Also, we investigated the expression of CYP1A1/1A2, SULT1A1/1A3/1E1, and cyclin D1 in cancer (CANC) and adjacent non-cancer (NCANC) specimens from 10 representative breast cancer patients using quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction. **Results.** CYP1A1-mRNA-expression was found only in three CANC and in one NCANC. CYP1A2 mRNA was below the detection limit in all patients. SULT1A1 was observed only in two of the 10 CANC and one of the 10 NCANC specimens. But, all 10 CANC and NCANC samples showed high SULT1A3 levels. Cyclin D1 mRNA levels were found in all 10 CANC and NCANC specimens. Furthermore, IHC-staining of cyclin D1 was observed in 27 of 33 CANC and correlated positively with estrogen receptor positivity ( $p=0.015$ ). **Conclusion.** The low or even absent expression of CYP1A1 or CYP1A2 in breast cancer specimens suggested that melatonin might be involved in cell cycle arrest.

#### **I recettori della melatonina, gli enzimi che metabolizzano la melatonina e la ciclina D1 nel cancro al seno umano**

**Background.** La melatonina sopprime il cancro al seno proliferazione delle cellule inibendo l'up-regulation di estrogeno-ciclina D1 indotta attraverso il suo recettore del G-protein-coupled MT1. Inoltre, la melatonina stimola l'espressione del sulfotransferase estrogeni, SULT1E1. Tuttavia, il metabolismo di melatonina attraverso 6-idrossilazione di solfonazione CYP1A1/1A2 e successive SULT1A1/1A3 diminuisce la sua concentrazione intracellulare. Ciò potrebbe avere un impatto negativo sulla sua azione oncostatica nel cancro della mammella. **Pazienti e metodi.** In questo studio pilota, abbiamo effettuato immunostochimica (IHC) analisi dei MT1 e ciclina D1 in campioni di cancro al seno da 33 pazienti. Inoltre, abbiamo studiato l'espressione di CYP1A1/1A2, SULT1A1/1A3/1E1 e ciclina D1 nel carcinoma (CANC) e adiacenti non-cancro (NCANC) campioni provenienti da 10 pazienti del seno rappresentante cancro usando quantitativi in tempo reale inversione di reazione della polimerasi a catena della trascrizione. **Risultati.** CYP1A1-mRNA-espressione è stata trovata solo in tre CANC e in un NCANC. CYP1A2 mRNA era al di sotto del limite di rilevazione in tutti i pazienti. SULT1A1 è stata osservata solo in due dei 10 CANC e uno dei 10 esemplari NCANC. Ma, tutti i 10 CANC e campioni NCANC hanno mostrato alti livelli di SULT1A3. Ciclina D1 livelli di mRNA sono stati trovati in tutti e 10 i CANC e campioni NCANC. Inoltre, IHC-colorazione della ciclina D1 è stata osservata in 27 di 33 CANC e correlato positivamente con positività del recettore dell'estrogeno ( $p = 0,015$ ). **Conclusione.** L'espressione bassi o addirittura assenti del CYP1A1 o del CYP1A2 nei campioni di cancro al seno ha suggerito che la melatonina possa essere coinvolto in arresto del ciclo cellulare.

Cutando A, Aneiros-Fernández J, Aneiros-Cachaza J, Arias-Santiago S.

### **Melatonin and cancer: current knowledge and its application to oral cavity tumours.**

J Oral Pathol Med. 2011 Feb 2. doi: 10.1111/j.1600-0714.2010.01002.x. [Epub ahead of print]

Departamento de Estomatología, Facultad de Odontología, Universidad de Granada, Granada, Spain  
Departamento de Anatomía Patológica, Hospital Clínico Universitario de Granada, Granada, Spain  
Departamento de Dermatología. Hospital Clínico Universitario de Granada, Granada, Spain.

#### **Abstract**

Melatonin (MLT) is a molecule secreted J Oral Pathol Med (2011) Background: by the pineal gland in cyclical periods. In mammals, MLT is involved in physiological processes, such as sleep/wake regulation in the circadian cycle. It has antioxidant and anti-inflammatory properties, functions as an immunomodulator, and stimulates bone metabolism. MLT is also involved in tumour processes in breast, prostate, liver, and bone cancers, among others, and in oral cavity tumours like epidermoid carcinoma. We are gradually increasing our knowledge of the underlying mechanism of MLT action in the aforementioned tumour processes, in which MT1, MT2, MT3, and RZR receptors appear to play a highly important role. These receptors belong to a large family of G-protein-coupled transmembrane receptors, some of which have been linked to melatonin's anticancer action, to tumour growth, and to prognosis. The objective of this article is to provide a clear review of research into the range of MLT functions, focusing specifically on MT receptors. We aim to contribute An interesting, new approaches to research into oral cavity tumours. Methods: extensive review of the research literature was conducted using PubMed, Science This study Direct, ISI Web of Knowledge, and the Cochrane base. Results: highlights the growing importance of MLT in the prognosis and treatment of certain tumours, including epidermoid carcinoma in the oral cavity. Moreover, it opens up a highly original, encouraging line of research in the field of MLT contributes to protecting the oral cavity from tissue tumours. Conclusions: damage caused by receptor action. Experimental evidence suggests that it may be useful in the treatment and prognosis of tumour processes in the oral cavity.

#### **Melatonina e cancro: conoscenze e applicazioni nei tumori del cavo orale**

La melatonina (MLT) è una molecola secreta J Oral Med Pathol (2011) Introduzione: dalla ghiandola pineale in periodi ciclici. Nei mammiferi, MLT è coinvolto in processi fisiologici, come il sonno / veglia regolazione del ciclo circadiano. Ha proprietà antiossidanti e antinfiammatorie, funziona come un immunomodulatore, e stimola il metabolismo osseo. MLT è anche coinvolta nei processi di tumore della mammella, della prostata, al fegato e cancro alle ossa, tra gli altri, e nei tumori del cavo orale come il carcinoma epidermoide. Stiamo gradualmente aumentando la nostra conoscenza del meccanismo alla base della azione MLT nei processi di tumore di cui sopra, in cui MT1, MT2, MT3, e recettori RZR sembrano svolgere un ruolo molto importante. Questi recettori appartengono ad una grande famiglia di G-protein-coupled recettori transmembrana, alcuni dei quali sono stati collegati ad azione antitumorale della melatonina, per la crescita tumorale, e di prognosi. L'obiettivo di questo articolo è di fornire una rassegna delle ricerche chiaro nella gamma di funzioni di MLT, concentrandosi in particolare sui recettori MT. Il nostro obiettivo è di contribuire Un interessante, nuovi approcci alla ricerca di tumori della cavità orale. Metodi: un'ampia revisione della letteratura di ricerca è stata condotta utilizzando PubMed, Scienza Questo studio diretto, ISI Web of Knowledge, e la base Cochrane. Risultati: mette in luce la crescente importanza della MLT nella prognosi e nel trattamento di alcuni tumori, tra cui il carcinoma epidermoide nella cavità orale. Inoltre, si apre una molto originale, la linea di favorire la ricerca nel campo della MLT contribuisce a proteggere il cavo orale da tumori dei tessuti. Conclusioni: I danni

causati dall'azione del recettore. Prove sperimentali suggeriscono che può essere utile nel trattamento e nella prognosi dei processi di tumore nella cavità orale.

Kannen V, Marini T, Zanette DL, Frajacomio FT, Silva GE, Silva WA Jr, Garcia SB.

### **The melatonin action on stromal stem cells within pericryptal area in colon cancer model under constant light.**

Biochem Biophys Res Commun. 2011 Feb 25;405(4):593-8. Epub 2011 Jan 23.

Department of Pathology, Medical School of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto - São Paulo 14049-900, Brazil.

#### **Abstract**

Constant light (LL) is associated with high incidence of colon cancer. MLT supplementation was related to the significant control of preneoplastic patterns. We sought to analyze preneoplastic patterns in colon tissue from animals exposed to LL environment (14days; 300lx), MLT-supplementation (10mg/kg/day) and DMH-treatment (1,2 dimethylhydrazine; 125mg/kg). Rodents were sacrificed and MLT serum levels were measured by radioimmunoassay. Our results indicated that LL induced ACF development ( $p < 0.001$ ) with a great potential to increase the number of CD133(+) and CD68(+) cells ( $p < 0.05$  and  $p < 0.001$ ). LL also increased the proliferative process (PCNA-Li;  $p < 0.001$ ) as well as decreased caspase-3 protein ( $p < 0.001$ ), related to higher COX-2 protein expression ( $p < 0.001$ ) within pericryptal colonic stroma (PCCS). However, MLT-supplementation controlled the development of dysplastic ACF ( $p < 0.001$ ) diminishing preneoplastic patterns into PCCS as CD133 and CD68 ( $p < 0.05$  and  $p < 0.001$ ). These events were relative to decreased PCNA-Li index and higher expression of caspase-3 protein. Thus, MLT showed a great potential to control the preneoplastic patterns induced by LL.

#### **L'azione della melatonina sulle cellule staminali stromali entro l'area pericriptale nel modello di cancro al colon sotto luce costante**

Luce costante (LL) è associata ad alta incidenza di cancro del colon. Supplementazione MLT era collegato al controllo significativo dei modelli preneoplastiche. Abbiamo cercato di analizzare i modelli preneoplastiche nel tessuto del colon provenienti da animali esposti ad ambiente LL (14 giorni; 300lx), MLT-supplementazione (10mg/kg/day) e DMH-trattamento (1,2 dimetilidrazina; 125mg/kg). I roditori sono stati sacrificati ed i livelli sierici di MLT sono stati misurati con metodo radioimmunologico. I nostri risultati hanno indicato che LL ha indotto lo sviluppo ACF ( $p < 0,001$ ) con un grande potenziale per aumentare il numero di CD133 (+) e CD68 (+) le cellule ( $p < 0.05$  e  $p < 0,001$ ). LL è aumentato anche il processo di proliferazione (PCNA-Li,  $p < 0.001$ ), così come è diminuito proteina caspasi-3 ( $p < 0,001$ ), dovuta all'aumento del COX-2 l'espressione della proteina ( $p < 0,001$ ) entro pericryptal stroma del colon (PCCS). Tuttavia, MLT-supplementazione controllato lo sviluppo di displastici ACF ( $p < 0,001$ ) diminuendo i modelli preneoplastiche in PCCS come CD133 e CD68 ( $p < 0,05$  e  $p < 0,001$ ). Questi eventi sono stati l'indice è diminuito rispetto al PCNA-Li e più espressione di caspasi-3 di proteine. Così, MLT ha mostrato un grande potenziale per controllare i modelli preneoplastiche indotte da LL.

Um HJ, Park JW, Kwon TK.

**Melatonin sensitizes Caki renal cancer cells to kahweol-induced apoptosis through CHOP-mediated up-regulation of PUMA.**

J Pineal Res. 2011 Jan 18. doi: 10.1111/j.1600-079X.2010.00851.

Department of Immunology, School of Medicine, Keimyung University, Dalseo-Gu, Daegu, Korea.

**Abstract**

Melatonin has recently gained attention as a regulator of biologic processes in addition to its effects on circadian rhythms. The mechanisms whereby melatonin regulates the apoptotic program remain poorly understood. In this study, we investigated the combined effect of melatonin and kahweol on apoptosis of cancer cells, but not in most normal human cell types, thus presenting an attractive novel strategy for cancer treatment. In our experiments, treatment with a combination of melatonin and kahweol induced apoptosis, stimulated DEVDase activity, and DNA fragmentation. Co-treatment with melatonin and kahweol induced up-regulation of p53-upregulated modulator of apoptosis (PUMA) while down-regulation of PUMA expression using small interfering RNAs attenuated melatonin plus kahweol-induced apoptosis. In addition, co-treatment with kahweol and melatonin induced PUMA up-regulation through endoplasmic reticulum stress-mediated C/EBP homologous protein induction and the p53-independent pathway. Our results collectively demonstrate that up-regulation of PUMA contributes to the sensitizing effect of melatonin plus kahweol on apoptosis in cancer cells.

**La melatonina sintetizza le cellule cancerose renali Caki che portano ad apoptosi indotta da kahweol tramite la regolazione positiva di PUMA mediata da CHOP**

La Melatonina ha recentemente attirato l'attenzione come un regolatore di processi biologici, oltre ai suoi effetti sui ritmi circadiani. I meccanismi con cui la melatonina regola il programma apoptotico sono ancora limitate. In questo studio, abbiamo studiato l'effetto combinato della melatonina e kahweol su apoptosi delle cellule tumorali, ma non nella maggior parte dei tipi di cellule umane normali, quindi presenta una strategia interessante romanzo per il trattamento del cancro. Nei nostri esperimenti, il trattamento con una combinazione di melatonina e kahweol apoptosi indotta, stimolato l'attività DEVDase, e la frammentazione del DNA. Co-trattamento con la melatonina e kahweol indotto up-regolazione di p53-modulatore upregulated di apoptosi (PUMA), mentre down-regolazione dell'espressione di PUMA con piccoli RNA interferenti attenuato melatonina più kahweol apoptosi indotta. Inoltre, il co-trattamento con kahweol e melatonina indotta PUMA up-regulation attraverso reticolo endoplasmatico C stress-mediata / EBP omologa induzione della proteina e della via di p53-indipendente. I nostri risultati dimostrano che collettivamente up-regolazione di PUMA contribuisce all'effetto sensibilizzante della melatonina più kahweol sulla apoptosi nelle cellule tumorali.

Mazzoccoli G, Fontana A, Copetti M, Pellegrini F, Piepoli A, Muscarella LA, Paziienza V, Giuliani F, Tarquini R.

### **Stage dependent destructuration of neuro-endocrine-immune system components in lung cancer patients.**

Biomed Pharmacother. 2011 Feb;65(1):69-76. Epub 2010 Dec 29.

Department of Internal Medicine and Chronobiology Unit, Scientific Institute and Regional General Hospital Casa Sollievo della Sofferenza, S. Giovanni Rotondo (FG), Italy. g.mazzoccoli@tin.it

#### **Abstract**

**BACKGROUND:** Close relationships among the nervous, endocrine and immune system components maintain body homeostasis. Alteration of time-related profile of variation of system components and loss of integrated function may favour the developing of cancer and may be aggravated in the presence of neoplastic disease. The aim of our study was to evaluate the profiles of time-related variation of neuro-endocrine-immune system components in lung cancer patients.

**METHODS:** Peripheral blood samples were collected at intervals of 4hours for 24hours from 11 healthy subjects (age range 35-53years, mean age $\pm$ s.e. 43.6 $\pm$ 1.7) and nine patients suffering from nonsmall cell lung cancer (age range 43-63years, mean age $\pm$ s.e. 51.0 $\pm$ 2.4). In each blood sample, lymphocyte subpopulations (CD3, CD4, CD8, HLA-DR, CD16, CD20, CD25,  $\gamma\delta$ TcR) were analyzed and melatonin, cortisol, TRH, TSH, free thyroxine, GH, IGF1 and interleukin IL2 on serum were measured.

**RESULTS:** In our I-II stage lung cancer patients CD8+ lymphocytes (P=0.01), and in particular the T suppressor subset (P<0.0001), CD20+ cells (P=0.05),  $\gamma\delta$ TCR expressing cells (P<0.01) and IGF1 (P=0.004) were diminished, whereas CD16+ cells (P<0.0001), CD25+ cells (P=0.03), free thyroxine (P=0.001) and GH (P<0.0001) were increased in respect of healthy subjects. In our III-IV stage lung cancer patients CD8+ lymphocytes (P=0.003) and in particular the T suppressor subset (P<0.0001), CD20+ cells (P=0.05),  $\gamma\delta$ TCR expressing cells (P=0.01), melatonin (P=0.03), TSH (P=0.006) and IGF1 (P<0.0001) were diminished, whereas CD4+ cells (P=0.002), CD16+ cells (P<0.0001), CD25+ cells (P=0.002), cortisol (P=0.003), TRH (P=0.004), free thyroxine (P=0.001), GH (P<0.0001) and IL2 (P=0.0002) were increased in respect of healthy subjects. A statistically significant difference was evidenced between the two groups of cancer patients for the values of CD16+ cells (P<0.0001), free thyroxine (P=0.001) and IGF1 (P<0.0001) higher in I-II stage lung cancer patients and for the values of CD4+ cells (P<0.0001),  $\gamma\delta$ TCR expressing cells (P=0.002), TRH (P=0.002) and IL2 (P=0.01) higher in III-IV stage lung cancer patients. Lung cancer patients showed alteration of the pattern of circadian variation of CD3+, CD8+, CD8+ dim, CD16+, CD20+ and  $\gamma\delta$ TCR expressing cells and of cortisol, TSH and GH serum levels. Pair-wise comparisons showed severe and stage dependent alterations in lung cancer patients.

**CONCLUSIONS:** The profiles of time-related variation of neuro-endocrine-immune system components are altered in a stage dependent manner in lung cancer patients and this alteration may impair the customary integrated system function.

#### **Destrutturazione del sistema immune neuroendocrino dipendente dallo stadio nei pazienti con cancro al polmone**

**BACKGROUND:** Le strette relazioni tra i componenti del sistema nervoso, endocrino e immunitario mantenere l'omeostasi del corpo. Alterazione del profilo temporale di variazione dei componenti del sistema e la perdita di funzione integrata può favorire lo sviluppo del cancro e può essere aggravata in presenza di malattia neoplastica. Lo scopo del nostro studio era di valutare i profili di variazione relative al tempo dei componenti del sistema neuro-endocrino-immunitario

nei pazienti con tumore del polmone. METODI: i campioni di sangue periferico sono stati raccolti ad intervalli di 4 ore per 24 ore da 11 soggetti sani (età 35-53 anni, età media  $43,6 \pm \pm$  SE 1.7) e nove pazienti affetti da carcinoma polmonare a cellule non-small (fascia di età 43-63 anni, età media  $\pm$  SE 51,0  $\pm$  2,4). In ogni campione di sangue, sottopopolazioni linfocitarie (CD3, CD4, CD8, HLA-DR, CD16, CD20, CD25,  $\gamma\delta$ TcR) sono stati analizzati e melatonina, il cortisolo, TRH, TSH, tiroxina libera, IL2, GH, IGF1 e l'interleuchina su campioni di siero sono stati misurati. RISULTATI: Nel nostro stadio I-II, cancro del polmone CD8 pazienti + linfociti ( $P = 0,01$ ), e in particolare la T sottoinsieme soppressore ( $P < 0,0001$ ), CD20 + cellule ( $P = 0,05$ ),  $\gamma\delta$ TCR cellule che esprimono ( $P < 0,01$ ) e IGF1 ( $P = 0,004$ ) sono stati diminuiti, mentre le cellule CD16 + ( $P < 0,0001$ ), le cellule CD25 + ( $p = 0,03$ ), di tiroxina libera ( $P = 0,001$ ) e GH ( $P < 0,0001$ ) sono risultate aumentate nei confronti di soggetti sani. Nel nostro stadio III-IV cancro del polmone CD8 pazienti + linfociti ( $P = 0,003$ ) e in particolare il sottoinsieme T suppressor ( $P < 0,0001$ ), CD20 + cellule ( $P = 0,05$ ),  $\gamma\delta$ TCR cellule che esprimono ( $P = 0,01$ ), la melatonina ( $p = 0,03$ ), TSH ( $P = 0,006$ ) e IGF1 ( $p < 0,0001$ ) sono diminuiti, mentre le cellule CD4 + ( $p = 0,002$ ), CD16 + cellule ( $P < 0,0001$ ), CD25 + cellule ( $P = 0,002$ ), il cortisolo ( $P = 0,003$ ), TRH ( $P = 0,004$ ), di tiroxina libera ( $P = 0,001$ ), GH ( $P < 0,0001$ ) e IL2 ( $P = 0,0002$ ) sono aumentati nei confronti di soggetti sani. Una differenza statisticamente significativa è stata evidenziata tra i due gruppi di pazienti di cancro per i valori di CD16 + cellule ( $P < 0,0001$ ), di tiroxina libera ( $P = 0,001$ ) e IGF1 ( $p < 0,0001$ ) più elevato in I-II stadio pazienti con cancro del polmone e per i valori delle cellule CD4 + ( $p < 0,0001$ ),  $\gamma\delta$ TCR cellule che esprimono ( $P = 0,002$ ), TRH ( $P = 0,002$ ) e IL2 ( $P = 0,01$ ) più elevati nei pazienti polmone III-IV stadio del cancro. pazienti affetti da tumore del polmone ha mostrato alterazioni del pattern di variazione circadiana del CD3 +, CD8 +, CD8 + dim, CD16 +, CD20 + e cellule che esprimono  $\gamma\delta$ TCR e di cortisolo, TSH ed i livelli sierici di GH. confronti Pair-wise ha mostrato gravi alterazioni e la fase di carico nei pazienti con tumore del polmone. CONCLUSIONI: La profiles di variazione relative al tempo dei componenti del sistema neuro-endocrino-immunitario sono alterate in maniera fase dipendente nei pazienti con cancro del polmone e questa alterazione può compromettere la funzione di consueto sistema integrato.

Ruiz-Rabelo J, Vázquez R, Arjona A, Perea D, Montilla P, Túnez I, Muntané J, Padillo J.

### **Improvement of capecitabine antitumoral activity by melatonin in pancreatic cancer.**

Pancreas. 2011 Apr;40(3):410-4.

From the \*Department of Surgery, IMIBIC, Reina Sofia University Hospital, Córdoba, Spain; †Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Córdoba, Córdoba, Spain; ‡Liver Research Unit, IMIBIC, Reina Sofia University Hospital, Córdoba, Spain; §Department of Surgery, Virgen del Rocío University Hospital-IBiS, Sevilla, Spain; and ||Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd o Ciberehd), Barcelona, Spain.

#### **Abstract**

**OBJECTIVE:** : The purpose of our study was to evaluate the effects of the addition of melatonin and capecitabine on experimental pancreatic cancer.

**METHODS:** : Fifty Syrian hamsters were randomized in 5 groups: group 1: no tumor induction (control group); group 2: tumor induction with BOP [N-nitrosobis(2-oxopropyl) amine]; group 3: tumor induction with BOP and melatonin administration; group 4: tumor induction with BOP and capecitabine administration; and group 5: tumor induction with BOP and administration of combined capecitabine and melatonin therapy. The evaluation of pathological tumor evolution and oxidative stress markers in pancreatic tissue was carried out.

**RESULTS:** : All animals under BOP exposure presented poorly or moderately differentiated pancreatic adenocarcinoma associated with increased lipoperoxide levels and decreased antioxidant activity in pancreatic tissue. Pancreatic cancer was shown in only 66% of the capecitabine-treated group and 33% of melatonin-treated group ( $P < 0.05$ ), most of them moderately differentiated adenocarcinoma. When capecitabine and melatonin were combined, a well-differentiated pancreatic adenocarcinoma was observed in 10% of animals. The beneficial effect was associated with a decrease in lipoperoxide levels and increased antioxidant activity in pancreatic tissue.

**CONCLUSIONS:** : The combined administration of capecitabine and melatonin provided an improvement in antioxidant status as well as a synergistic antitumoral effect in experimental pancreatic cancer.

#### **Miglioramento dell'attività antitumorale della capecitabina da parte della melatonina nel cancro pancreatico**

**OBIETTIVO:** Lo scopo del nostro studio era di valutare gli effetti della melatonina e aggiunta di capecitabina sulla sperimentale cancro al pancreas.

**METODI:** Fifty criceti siriani sono stati randomizzati in 5 gruppi: Gruppo 1: nessuna induzione del tumore (gruppo di controllo) Gruppo 2: induzione del tumore con BOP [N-nitrosobis (2-oxopropyl) ammina], gruppo 3: induzione del tumore e con BOP melatonina amministrazione; gruppo 4: induzione del tumore con BOP capecitabina e l'amministrazione, e il gruppo 5: induzione del tumore con la somministrazione di BOP e capecitabina combinati e terapia con melatonina. La valutazione di evoluzione patologica del tumore e di marker di stress ossidativo nel tessuto pancreatico è stato effettuato.

**RISULTATI:** Tutti gli animali in esposizione BOP presentato scarsamente o moderatamente differenziato adenocarcinoma pancreatico associati a livelli lipoperoxide aumentare e diminuire l'attività antiossidante in tessuto pancreatico. Il tumore al pancreas è stato mostrato in solo il 66% del gruppo trattato con capecitabina e 33% del gruppo trattato con melatonina ( $P < 0,05$ ), l'adenocarcinoma maggior parte di loro moderatamente differenziato. Quando capecitabina e melatonina sono stati combinati, un adenocarcinoma ben differenziato del pancreas è stata osservata nel 10% degli animali. L'effetto benefico è stato associato con una diminuzione dei livelli

lipoperoxide e aumento dell'attività antiossidante in tessuto pancreatico. CONCLUSIONI: La somministrazione di capecitabina e melatonina previsto un miglioramento dello stato antiossidante ed un effetto sinergico antitumorale sperimentale nel cancro del pancreas.

Gonzalez A, Del Castillo-Vaquero A, Miro-Moran A, Tapia JA, Salido GM.

**Melatonin reduces pancreatic tumor cell viability by altering mitochondrial physiology.**

J Pineal Res. 2011 Apr;50(3):250-60. doi: 10.1111/j.1600-079X.2010.00834.x. Epub 2010 Nov 30.

Department of Physiology, Cell Physiology Research Group, University of Extremadura, Caceres, Spain.

**Abstract**

Melatonin reduces proliferation in many different cancer cell lines. Thus, melatonin is considered a promising antitumor agent, promoting apoptosis in tumor cells while preserving viability of normal cells. Herein, we examined the effects of melatonin on the pancreatic AR42J tumor cell line. We have analyzed cytosolic-free  $Ca^{2+}$  concentration ( $[Ca^{2+}]_c$ ), mitochondrial-free  $Ca^{2+}$  concentration ( $[Ca^{2+}]_m$ ), mitochondrial membrane potential ( $\Psi_m$ ), mitochondrial flavin adenine dinucleotide (FAD) oxidative state, cellular viability and caspase-3 activity. Our results show that melatonin induced transient changes in  $[Ca^{2+}]_c$  and  $[Ca^{2+}]_m$ . Melatonin also induced depolarization of  $\Psi_m$  and led to a reduction in the level of oxidized FAD. In addition, melatonin reduced AR42J cell viability. Finally, we found a  $Ca^{2+}$ -dependent caspase-3 activation in response to melatonin. Collectively, these data support the likelihood that melatonin reduces viability of tumor AR42J cells via its action on mitochondrial activity and caspase-3 activation.

**La melatonina reduce la viabilità cellulare nei tumori pancreatici alternando la fisiologia mitocondriale**

LA melatonina riduce la proliferazione in linee tumorali molti differenti cellule. Così, la melatonina è considerato un promettente agente antitumorale, promuovendo l'apoptosi nelle cellule tumorali, preservando la vitalità delle cellule normali. Qui, abbiamo esaminato gli effetti della melatonina sulla linea di cellule pancreatiche tumorali AR42J. Abbiamo analizzato citosolica-free  $Ca^{2+}$  concentrazione ( $[Ca^{2+}]_c$ ), mitocondriale-free  $Ca^{2+}$  concentrazione ( $[Ca^{2+}]_m$ ), potenziale di membrana mitocondriale ( $\Psi_m$ ), mitocondriale flavina adenina dinucleotide (FAD) dello stato ossidativo, la vitalità cellulare e caspasi-3 attività. I nostri risultati dimostrano che la melatonina ha indotto cambiamenti transitori in  $[Ca^{2+}]_c$  e  $[Ca^{2+}]_m$ . La melatonina ha anche indotto depolarizzazione di  $\Psi_m$  e ha portato ad una riduzione del livello di FAD ossidato. Inoltre, la melatonina riduce la vitalità cellulare AR42J. Infine, abbiamo trovato una  $Ca^{2+}$ -dipendente caspasi-3 di attivazione in risposta alla melatonina. Nell'insieme, questi dati supportano la probabilità che la melatonina riduce la vitalità delle cellule tumorali AR42J attraverso la sua azione sul dell'attività mitocondriale e caspasi-3 di attivazione.

Proietti S, Cucina A, D'Anselmi F, Dinicola S, Pasqualato A, Lisi E, Bizzarri M

**Melatonin and vitamin D3 synergistically down-regulate Akt and MDM2 leading to TGFβ-1-dependent growth inhibition of breast cancer cells.**

J Pineal Res. 2011 Mar;50(2):150-8. doi: 10.1111/j.1600-079X.2010.00824.x. Epub 2010 Nov 22.

Department of Experimental Medicine, University La Sapienza, Roma, Italy.

**Abstract**

Melatonin and vitamin D3 inhibit breast cancer cell growth and induce apoptosis, but they have never been combined as a breast cancer treatment. Therefore, we investigated whether their association could lead to an enhanced anticancer activity. In MCF-7 breast cancer cells, melatonin together with vitamin D3, induced a synergistic proliferative inhibition, with an almost hr. Cell growth blockade is associated to an complete cell growth arrest at 144 activation of the TGFβ-1 pathway, leading to increased TGFβ-1, Smad4 and phosphorylated-Smad3 levels. Concomitantly, melatonin and D3, alone or in combination, caused a significant reduction in Akt phosphorylation and MDM2 values, with a consequent increase of p53/MDM2 ratio. These effects were completely suppressed by adding a monoclonal anti-TGFβ-1 antibody to the culture medium. Taken together, these results indicate that cytostatic effects triggered by melatonin and D3 are likely related to a complex TGFβ-1-dependent mechanism, involving down-regulation of both MDM2 and Akt-phosphorylation.

**La melatonina e la vitamina D3 regolano negativamente in maniera sinergica Akt e MDM2 portando alla inibizione della crescita delle cellule mammarie cancerose dipendente da TGFβ-1**

Melatonina e vitamina D3 inibisce la crescita del cancro al seno e di indurre l'apoptosi delle cellule, ma non sono mai stati combinati in un trattamento del cancro al seno. Pertanto, abbiamo valutato se la loro associazione potrebbe portare ad una maggiore attività antitumorale. Nelle cellule del seno MCF-7 il cancro, la melatonina insieme alla vitamina D3, ha indotto una inibizione sinergica proliferativa, con quasi un ora. Blocco della crescita delle cellule è associato ad un arresto completo della crescita cellulare a 144 attivazione della via TGFβ-1, portando ad un aumento TGFβ-1, Smad4 e dei livelli di fosforilazione-Smad3. Contemporaneamente, la melatonina e D3, da soli o in combinazione, ha causato una significativa riduzione della fosforilazione di Akt e di valori MDM2, con un conseguente aumento di p53/MDM2 rapporto. Questi effetti sono stati completamente soppressi con l'aggiunta di un anticorpo monoclonale anti-TGFβ-1 anticorpo al mezzo di coltura. Presi insieme, questi risultati indicano che gli effetti citostatici innescato da melatonina e D3 sono probabilmente correlato ad un meccanismo complesso TGFβ-1-dipendente, che coinvolge una down-regulation sia MDM2 e Akt-fosforilazione.

Costa G.

**[Shift work and breast cancer].**

[Article in Italian]

G Ital Med Lav Ergon. 2010 Oct-Dec;32(4):454-7.

Dipartimento di Medicina del Lavoro Clinica del Lavoro L. Devoto, Università di Milano, Fondazione IRCCS Cà Granda, Ospedale Maggiore Policlinico, Milano. giovanni.costa@unimi.it

**Abstract**

The International Agency on Research on Cancer (IARC) has recently classified "shiftwork that involves circadian disruption" as "probably carcinogenic to humans" (Group 2A) on the basis of "limited evidence in humans for the carcinogenicity of shift-work that involves nightwork", and "sufficient evidence in experimental animals for the carcinogenicity of light during the daily dark period (biological night)". The epidemiologic evidence of a relationship between shift and night work and breast cancer in women is based upon nine studies, six of which suggest a moderately increased risk to develop breast cancer after prolonged exposure to shift and night work. The aim of this paper is to summarize the possible physio-pathological mechanisms (internal disruption of biological circadian rhythms and clock genes, melatonin suppression through light by night, sleep deprivation) and the problems connected with a proper risk assessment of the risk for breast cancer risk in women shift workers.

**[Lavoro a turni e cancro al seno].**

L'Agenzia Internazionale della Ricerca sul Cancro (IARC) ha recentemente classificato "turni che comporta disagi circadiani" come "probabilmente cancerogena per l'uomo"(Gruppo 2A) sulla base di "limitata evidenza per la cancerogenicità del lavoro a turni che riguarda il lavoro notturno ", e "prove sufficienti negli animali da esperimento per la cancerogenicità di luce durante il periodo giornaliero di buio (notte biologico) ". Le evidenze epidemiologiche di un rapporto tra il lavoro a turni e notturno e il cancro al seno nelle donne è basata su nove studi, sei dei quali suggeriscono un rischio moderatamente aumentato di sviluppare il cancro al seno dopo una prolungata esposizione a turni e lavoro notturno. Lo scopo di questo lavoro è quello di riassumere i possibili meccanismi fisio-patologici (rottura interna dei ritmi circadiani e dei geni orologio biologico, la soppressione di melatonina attraverso la luce di notte privazione del sonno) ed i problemi connessi con una corretta valutazione dei rischi del rischio di tumore al seno rischio in lavoratori a turni donne.

Jung-Hynes B, Schmit TL, Reagan-Shaw SR, Siddiqui IA, Mukhtar H, Ahmad N.

**Melatonin, a novel Sirt1 inhibitor, imparts antiproliferative effects against prostate cancer in vitro in culture and in vivo in TRAMP model.**

J Pineal Res. 2011 Mar;50(2):140-9. doi: 10.1111/j.1600-079X.2010.00823.x. Epub 2010 Nov 9.

Department of Dermatology Molecular and Environmental Toxicology Center University of Wisconsin Comprehensive Cancer Center; University of Wisconsin, Madison, WI, USA.

**Abstract**

We recently demonstrated that Sirt1, a NAD(+) -dependent histone deacetylase, was overexpressed in prostate cancer (PCa) and its inhibition resulted in a significant antiproliferative response in human PCa cells. Studies have suggested a link between Sirt1 and circadian rhythms, the disruption of which has been linked to cancer. Interestingly, a decreased production of the pineal melatonin has been shown to deregulate the circadian rhythm machinery and increase cancer risk. Furthermore, disruption in melatonin production and circadian rhythmicity has been associated with aging. Here, we challenged our hypothesis that melatonin will impart antiproliferative response against PCa via inhibiting Sirt1. We demonstrated that melatonin significantly inhibited Sirt1 protein and activity in vitro in multiple human PCa cell lines, and melatonin-mediated Sirt1 inhibition was accompanied with a significant decrease in the proliferative potential of PCa cells, but not of normal cells. Forced overexpression of Sirt1 partially rescued the PCa cells from melatonin's antiproliferative effects, suggesting that Sirt1 is a direct target of melatonin. Employing transgenic adenocarcinoma of mouse prostate (TRAMP) mice, we also demonstrated that oral administration of melatonin, at human-achievable doses, significantly inhibited PCa tumorigenesis as shown by decreases in (i) prostate and genitourinary weight, (ii) serum insulin-like growth factor-1 (IGF-1)/IGF-binding protein-3 (IGFBP3) ratio, (iii) mRNA and protein levels of the proliferation markers (PCNA, Ki-67). This anti-PCa response was accompanied with a significant decrease in Sirt1 in TRAMP prostate. Our data identified melatonin as a novel inhibitor of Sirt1 and suggest that melatonin can inhibit PCa growth via Sirt1 inhibition.

**La melatonina, un nuovo inibitore Sirt1, ha effetti antiproliferativi contro il cancro alla prostata in coltura in vitro e in vivo nel modello TRAMP**

Abbiamo recentemente dimostrato che SIRT1, un NAD (+) istone deacetilasi-dipendente, è stato overexpressed nel cancro della prostata (APC) e la sua inibizione portato ad una significativa risposta antiproliferativa in cellule umane PCa. Studi hanno suggerito un collegamento tra i ritmi circadiani e SIRT1, l'interruzione della quale è stato collegato al cancro. È interessante notare che una diminuzione della produzione della melatonina pineale ha dimostrato di deregolamentare il ritmo circadiano macchinari e aumentare il rischio di cancro. Inoltre, l'interruzione nella produzione di melatonina e ritmicità circadiana è stata associata con l'invecchiamento. Qui, abbiamo sfidato la nostra ipotesi che la melatonina impartirà la risposta antiproliferativa contro PCa via inibendo SIRT1. Abbiamo dimostrato che la melatonina inibisce significativamente SIRT1 proteina e l'attività in vitro in diverse linee cellulari umane di PCA e melatonina-mediata SIRT1 stato accompagnato da una significativa riduzione del potenziale proliferativo delle cellule APC, ma non delle cellule normali. Sovraespressione forzata di SIRT1 parzialmente salvato le cellule PCa da effetti antiproliferativi della melatonina, suggerendo che SIRT1 è un bersaglio diretto di melatonina. Impiegando adenocarcinoma della prostata mouse transgenici (TRAMP) topi, abbiamo anche dimostrato che la somministrazione orale di melatonina, a dosi umane realizzabili, ha inibito significativamente tumorigenesi PCa come dimostrato da diminuzioni (i), della prostata e del peso genito-urinario, (ii) l'insulina sierica-like il fattore di crescita-1 (IGF-1) / IGF-binding protein-3 (IGFBP3) rapporto, (iii) i livelli di mRNA e proteine dei marcatori di proliferazione (PCNA, Ki-

67). Questa risposta anti-PCA è stato accompagnato da una diminuzione significativa SIRT1 in prostata TRAMP. I nostri dati individuato la melatonina come un nuovo inibitore di SIRT1 e suggeriscono che la melatonina può inibire la crescita PCa via SIRT1 inibizione.

## OCTREOTIDE

1: Xing Z, Zhou Z, Yu R, Li S, Li C, Nilsson S, Liu Z.

**XAF1 expression and regulatory effects of somatostatin on XAF1 in prostate cancer cells.**

J Exp Clin Cancer Res. 2010 Dec 11;29(1):162. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 21143993.

### Abstract

#### ABSTRACT:

**BACKGROUND:** Somatostatin prevents cell proliferation by inducing apoptosis. Downregulation of the XAF1 transcript may occur during the development of prostate cancer. It is interesting to evaluate the potential regulatory effects of somatostatin on XAF1 expression during the development of prostate cancer cells.

**METHODS:** XAF1 mRNA and protein expression in human prostate epithelial cells RWPE-1, androgen dependent prostate cancer LNCaP, and androgen independent DU145 and PC3 cells were evaluated using RT-PCR and Western blot. The regulation of XAF1 mRNA and protein expression by somatostatin and its analogue Octreotide was evaluated.

**RESULTS:** Substantial levels of XAF1 mRNA and proteins were detected in RWPE-1 cells, whereas prostate cancer cells LNCaP, DU145 and PC3 exhibited lower XAF1 expression. Somatostatin and Octreotide up-regulated XAF1 mRNA and protein expression in all prostate cancer cell lines.

**CONCLUSIONS:** XAF1 down-regulation may contribute to the prostate cancer development. The enhanced XAF1 expression by somatostatin indicates a promising strategy for prostate cancer therapy

Xing Z, Zhou Z, Yu R, Li S, Li C, Nilsson S, Liu Z.

**Espressione di XAF1 e effetti regolatori della somatostatina su XAF1 in cellule prostatiche cancerose.**

J Exp Clin Cancer Res. 2010 Dec 11;29(1):162. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 21143993.

**BACKGROUND:** La somatostatina inibisce la proliferazione cellulare tramite l'induzione dell'apoptosi. Durante lo sviluppo del cancro prostatico si verifica una sotto espressione di XAF1. E' interessante valutare gli effetti regolatori della somatostatina sull'espressione di XAF1 durante lo sviluppo delle cellule prostatiche cancerose.

**METODI:** Nelle cellule umane epiteliali prostatiche RWPE-1 sono stati valutati i livelli di XAF1 mRNA e dell'espressione proteica, nelle cellule LNCaP androgeni dipendenti dal cancro prostatico, e nelle cellule DU145 e PC3 androgeni indipendenti dal cancro prostatico tramite la RT-PCR e Western blot. E' stata valutata la regolazione di XAF1 mRNA e dell'espressione proteica da parte della somatostatina e del suo analogo, l'octreotide.

**RISULTATI:** Nelle cellule RWPE-1 sono stati osservati livelli sostanziali di XAF1 mRNA e proteine, mentre le cellule cancerose prostatiche LNCaP, DU145 e PC3 hanno mostrato bassi livelli di XAF1. La somatostatina e l'octreotide regolano positivamente i livelli di XAF1 mRNA e la sua espressione proteica in tutte le linee cellulari cancerose prostatiche.

**CONCLUSIONI:** La regolazione negativa di XAF1 può contribuire allo sviluppo del carcinoma prostatico. L'aumento dell'espressione di XAF1 da parte della somatostatina indica una strategia promettente per la terapia del cancro prostatico.

10: Tanimura K, Onda S, Mitsunobu M.

**Effective made of octreotide intravenous administration for malignant gastrointestinal obstruction in terminal cancer patients.**

Gan To Kagaku Ryoho. 2010 Oct;37(10):1991-3. Japanese. PubMed PMID:20948271.

Continuous subcutaneous administration of octreotide acetate (SMS201-995: SMS) has not been done in Meiwa Hospital for malignant gastrointestinal obstruction in terminal patients for the following reasons: First, patients and families refuse an indwelling needle on the abdominal wall; second, an additional route limits daily activity; third, the needle site becomes inflamed or sclerosed; and fourth, an infusion pump is required. Hence, the effectiveness of three types of intravenous administration was investigated retrospectively in 15 patients in our hospital: 7 cases received intermittent IV drip infusion; 4 continuous IV drip infusion; and 4 bolus IV injection. As a result, 6 cases (86%), 2 cases (50%), and 1 case (25%), respectively, were successfully treated. These results suggested that intermittent IV administration of SMS is efficient, safe, and very convenient, while continuous IV administration is also efficient as long as the SMS potency is not reduced by mixed drugs.

Tanimura K, Onda S, Mitsunobu M.

**Efficacia della somministrazione intravenosa di octreotide nell'ostruzione gastrointestinale nei pazienti oncologici in stadio terminale**

Gan To Kagaku Ryoho. 2010 Oct;37(10):1991-3. Japanese. PubMed PMID:20948271.

La somministrazione sottocutanea di octreotide acetato nell'ostruzione gastrointestinale nei pazienti oncologici in stadio terminale non è ancora stata fatta nell'ospedale di Meiwa per le seguenti ragioni: Primo, i pazienti e i familiari rifiutano il posizionamento di un ago nella parete addominale; secondo, limita le attività giornaliere, terzo, il sito dove è presente l'ago si può infiammare; quarto, è necessaria una pompa di infusione. Perciò, sono stati osservati tre tipi di somministrazione intravenosa in 15 pazienti del nostro ospedale: 7 hanno ricevuto un'infusione goccia a goccia intermittente; 4 un'infusione goccia a goccia continua; e 4 un'iniezione. Rispettivamente 6 del primo caso (86%), 2 del secondo caso (50%) e 1 del terzo caso (25%) sono stati trattati con successo. Questi risultati dimostrano che la somministrazione intermittente di SMS è efficace, sicura e molto conveniente, mentre la somministrazione continua è efficace fintanto che la potenza di SMS non è ridotta dall'uso contemporaneo di altri farmaci.

12: Kleinberg DL, Ameri P, Singh B.

**Pasireotide, an IGF-I action inhibitor, prevents growth hormone and estradiol-induced mammary hyperplasia.**

Pituitary.2010 Oct 2. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 20890664.

Mammary hyperplasia increases breast cancer risk. Tamoxifen prevents breast cancer in women with atypical hyperplasia, but has serious side effects. As estradiol action requires IGF-I, direct inhibition of IGF-I action theoretically might be an efficacious alternative to tamoxifen. After hypophysectomy and oophorectomy, 21-day-old female rats were treated with GH and E(2.) After 7 days all terminal end buds (TEBs) and 75% of ducts became hyperplastic. Co-treatment with pasireotide, a somatostatin analog that blocks GH secretion and IGF-I action in the mammary gland, prevented hormone-induced hyperplasia. The number and size of TEBs and moderately or floridly hyperplastic ducts was reduced by pasireotide ( $P < 0.01$ ). In contrast, the same concentration of octreotide, which has a more selective somatostatin receptor subtype binding profile, was less effective than pasireotide. Tamoxifen inhibited hyperplasia when used alone with GH + E(2), but did not add to the inhibitory effect of pasireotide when the two treatments were combined. Both pasireotide and tamoxifen acted via the IGF-I receptor signaling pathway and both were found to inhibit mammary cell proliferation and stimulate apoptosis. The number of epithelial cells expressing phosphorylated insulin receptor substrate (IRS)-1 in response to GH and E(2) was reduced by pasireotide, as was staining intensity. These results support the concept that IGF-I inhibition, in this case by pasireotide, inhibits E(2) and GH-induced mammary hyperplasia. As tamoxifen did not further increase the inhibitory effect of pasireotide, the peptide appears to be at least as effective as tamoxifen in preventing GH + E(2)-induced mammary hyperplasia.

Kleinberg DL, Ameri P, Singh B.

**Pasireotide, un inibitore di IGF-I, inibisce la crescita dell'ormone e l'iperplasia mammaria indotta dall'estradiolo.**

Pituitary.2010 Oct 2. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 20890664.

L'iperplasia mammaria aumenta il rischio di tumore mammario. Il tamoxifene inibisce il tumore al seno nelle donne con iperplasia atipica, ma ha seri effetti collaterali. Come l'azione dell'estradiolo richiede IGF-I, teoricamente l'inibizione diretta di IGF-I potrebbe essere un'alternativa efficace al tamoxifene. Dopo ipofisectomia e ovariectomia, un ratto femmina di 21 anni è stata trattata con GH e E(2.). Dopo 7 giorni tutti i boccioli terminali (TEBs) e il 75% dei dotti sono diventati iperplastici. Il co-trattamento con pasireotide, un analogo della somatostatina che blocca la secrezione del GH e l'azione di IGF-I nelle ghiandole mammarie, inibisce l'iperplasia indotta dall'ormone. Il numero e la grandezza di (TEBs) e dei dotti iperplastici sono stati ridotti dal pasireotide. In contrasto, la stessa concentrazione di octreotide, che ha caratteristiche più adatte al legame con il recettore della somatostatina, è meno efficace del pasireotide. Il tamoxifene riduce l'iperplasia quando è usato da solo con GH + E(2), ma non raggiunge l'effetto inibitorio di pasireotide quando i due trattamenti sono combinati. Entrambi, sia il pasireotide che il tamoxifene agiscono tramite la via del recettore di IGF-I e tutti e due inibiscono la proliferazione delle cellule mammarie e stimolano l'apoptosi. Il numero di cellule epiteliali che esprimono il substrato del recettore insulinico fosforilato (IRS)-1 in risposta al GH e E(2) è ridotto dal pasireotide, come dimostra l'intensità della colorazione. Questi risultati supportano il concetto che l'inibizione di IGF-I in questo caso causata dal pasireotide, inibisce E(2) e l'iperplasia mammaria indotta da GH. Come il tamoxifene non aumenta l'effetto

inibitorio del pasireotide, il peptide sembra essere perlomeno efficace come il tamoxifene nell'inibizione dell'iperplasia mammaria indotta da GH + E(2).

14: Fleseriu M, Delashaw JB Jr, Cook DM.

**Acromegaly: a review of current medical therapy and new drugs on the horizon.**

Neurosurg Focus. 2010 Oct;29(4):E15.Review. PubMed PMID: 20887125.

Acromegaly is a disease that results from a growth hormone (GH)-secreting pituitary tumor. Clinically, the disease is characterized by excessive skeletal growth, soft tissue enlargement with disfigurement, and increased risk of cardiovascular death. The goals of treatment are the removal or reduction of the tumor mass via surgery and normalization of GH secretion. Another treatment goal is the preservation of normal pituitary function if possible. Transsphenoidal surgery by an experienced neurosurgeon is usually the first line of therapy, especially for small tumors. Surgeon expertise is crucial for outcome, with dedicated pituitary surgeons having better results. However, overall cure rates remain low because patients with these tumors usually present at an incurable stage. Therefore, medical therapy to control excess GH secretion plays a significant role in a large proportion of patients with acromegaly who are not cured by surgery or other forms of therapy, such as radiotherapy, and/or are awaiting the effects of radiotherapy. If surgery is not curative, lifelong monitoring and the control of excess GH is usually necessary by a care team experienced in handling this chronic disease. In the past decade major progress has occurred in the development of highly specific and selective pharmacological agents that have greatly facilitated more aggressive management of active acromegaly. Treatment approach should be individualized and take into consideration a patient's tumor size and location, symptoms, comorbid conditions, and preferences. Because a surgical cure can be difficult to achieve, all patients, even those with what seems to be a clinically and biochemically inactive disease, should undergo long-term biochemical testing and pituitary MR imaging.

Fleseriu M, Delashaw JB Jr, Cook DM.

**Acromegalia: una review sulla terapia medica corrente e nuovi farmaci all'orizzonte.**

Neurosurg Focus. 2010 Oct;29(4):E15.Review. PubMed PMID: 20887125.

L'acromegalia è una patologia che è causata da un tumore che si sviluppa dalla ghiandola pituitaria secernente l'ormone della crescita GH. Clinicamente la patologia è caratterizzata da un'eccessiva crescita dello scheletro, allargamento del tessuto molle con deturpazione, e aumentato rischio di morte cardiovascolare. Gli obiettivi del trattamento sono la rimozione o la riduzione della massa tumorale tramite la chirurgia e la normalizzazione della secrezione del GH. Un altro obiettivo terapeutico è la preservazione della funzione pituitaria se possibile. La chirurgia trans sfenoidale eseguita da un neurochirurgo esperto è di solito il trattamento di prima linea, specialmente per i tumori piccoli. Un chirurgo esperto è cruciale per un successo, con chirurghi esperti della ghiandola pituitaria si hanno risultati migliori. Tuttavia, i tassi di guarigione globale rimangono bassi perché i pazienti con questi tumori si presentano ad uno stadio avanzato. Pertanto, la terapia medica che controlla l'aumento della secrezione del GH gioca un ruolo fondamentale in molti pazienti con acromegalia che non sono curati dalla chirurgia o da altre forme di terapia, come la radioterapia, e/o in attesa degli effetti della radioterapia. Se la chirurgia non è curativa, sono necessari il monitoraggio della sopravvivenza e il controllo dell'aumento del GH da parte di un team di esperti di questa patologia cronica. Nella scorsa decade sono stati fatti progressi nello sviluppo di agenti farmacologici specifici e selettivi che hanno facilitato la gestione delle forme più aggressive di acromegalia. L'approccio al trattamento dovrebbe essere individualizzato prendendo in considerazione la grandezza e la localizzazione del tumore, i sintomi, le condizioni di comorbidità,

e le preferenze. Siccome il trattamento chirurgico può essere difficoltoso da effettuare, tutti i pazienti, anche a quelli in cui la patologia sembra essere clinicamente e biochimicamente inattiva, dovrebbero seguire un test biochimico a lungo termine e RM della ghiandola pituitaria.

16: Friedlander TW, Weinberg VK, Small EJ, Sharibb S J, Harzstark AL, Lin AM, Fong L, Ryan CJ.

**Effect of the somatostatin analog octreotide acetate on circulating insulin-like growth factor-1 and related peptides in patients with non-metastatic castration-resistant prostate cancer: Results of a phase II study.**

Urol Oncol. 2010 Sep 28. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 20884247.

**BACKGROUND:** Insulin-like growth factor (IGF) mediated signaling has been implicated in the growth of many tumor types including prostate cancer, and it is hypothesized that lowering circulating IGF levels in men with castration resistant prostate cancer (CRPC) will slow tumor growth. In this study, the efficacy of depot octreotide acetate was prospectively evaluated in patients with CRPC.

**METHODS:** Eligible patients had progressive non-metastatic CRPC. Octreotide acetate 30 mg was administered intramuscularly every 28 days. Changes in PSA, IGF-1, IGF-2, IGF binding protein-1 (IGFBP-1), and IGFBP-3 were evaluated over time.

**RESULTS:** Accrual was stopped early after a pre-planned interim analysis showed no prostate specific antigen (PSA) declines after 3 cycles of treatment among the first 13 patients enrolled. Median baseline PSA and IGF-1 measurements were 36.2 ng/ml and 162.6 ng/ml, respectively, and median time on treatment was 13 weeks. Radiographic progression occurred in 7 patients, PSA-only progression occurred in 5 patients, and 1 patient was taken off the study due to a grade 3 drug interaction. After 3 cycles of treatment IGF-1 significantly declined with a median -34.5% (P = 0.01) and IGFBP-1 significantly increased with a median 76.3% (P = 0.046). IGF-2 and IGFBP-3 were not significantly changed from baseline.

**CONCLUSIONS:** Octreotide acetate significantly lowers IGF-1 and raises IGFBP-1 levels in patients with non-metastatic CRPC, but does not result in sustained declines in PSA. While treatment with single-agent octreotide may not be warranted, its inclusion in combination regimens directly targeting the IGF-1 receptor on tumor cells may be of interest.

Friedlander TW, Weinberg VK, Small EJ, Sharibb S J, Harzstark AL, Lin AM, Fong L, Ryan CJ.

**Effetto dell'octreotide acetate analogo della somatostatina sulla circolazione del fattore di crescita insulinico 1 e peptidi correlati nei pazienti con cancro prostatico non metastatico: risultati di uno studio di fase II.**

Urol Oncol. 2010 Sep 28. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 20884247.

**BACKGROUND:** Il segnale mediato da IGF è coinvolto nella crescita di molti tipi di tumori come il cancro prostatico, ed è stato ipotizzato che bassi livelli circolanti di IGF in uomini con cancro prostatico con castrazione resistente (CRPC) rallentino la crescita del tumore. In questo studio, è stata valutata l'efficacia dell'octreotide acetato in pazienti con CRPC.

**METODI:** I pazienti considerati idonei erano affetti da CRPC non metastatica. E' stato somministrato per via intramuscolare ogni 28 giorni octreotide acetato 30 mg. Nel corso del tempo sono stati valutati cambiamenti in PSA, IGF-1, IGF-2, IGF binding protein-1 (IGFBP-1) e IGFBP-3.

**RISULTATI:** La somministrazione è stata sospesa precocemente dopo un'analisi interim pre-pianificata che non ha mostrato una diminuzione dell'antigene prostatico specifico (PSA) dopo 3

cicli di trattamento tra i 13 pazienti arruolati. I valori medi di PSA e di IGF-1 erano rispettivamente 36.2 ng/ml e 162.6 ng/ml, e il tempo medio di trattamento era di 13 settimane. In 7 pazienti si è verificata un progressione radiografica, in 5 pazienti una progressione legata al PSA e 1 paziente è stato eliminato dallo studio a causa dell'interazione di 3 farmaci. Dopo 3 cicli di trattamento IGF-1 è diminuito significativamente con una media di -34.5% (P = 0.01) e IGFBP-1 è aumentato con una media di 6.3% (P = 0.046). I valori di IGF-2 e IGFBP-3 non sono cambiati.

**CONCLUSIONI:** Nei pazienti con CRPC non metastatica l'octreotide acetato diminuisce significativamente i livelli di IGF-1 e aumenta i livelli di IGFBP-1, ma questo non porta ad una diminuzione di PSA. Mentre il trattamento con il solo octreotide potrebbe non essere giustificato, l'uso in combinazione con le terapie che hanno come target il recettore di IGF-1 nelle cellule tumorali potrebbe essere interessante.

18: Tang X, Takekoshi S, Itoh J, Umemura S, Shoji S, Terachi T, Osamura RY.

**Somatostatin analogue inhibits the mobility of prostate carcinoma cells: a new therapeutic method for advanced prostate carcinoma.**

Int J Oncol. 2010Nov;37(5):1077-83. PubMed PMID: 20878055.

The somatostatin analogue (SA) Octreotide has been used as a therapeutic reagent for somatostatin receptor type 2a (SSTR2a)-positive cancers. The purpose of this study is to detect SSTR2a in human prostate carcinomas and to elucidate the effects of SA on SSTR2a-positive prostate carcinoma cells to determine the potential of this drug as a new therapeutic method for advanced prostate carcinoma. Immunohistochemical study of SSTR2a was performed on 95 prostate carcinoma cases, and the results showed expression of SSTR2a in 14 of the 95 cases (14.74%); the histological grade (Gleason) and capsular invasion of the prostate carcinoma were directly related to SSTR2a expression. Among the ten cases of lymph node metastasis, SSTR2a expression was markedly higher. In vitro studies were performed using SSTR2a-positive prostate cancer cells, DU145 and PC3. Migration and invasion abilities of DU145 and PC3 cells were inhibited by SA in a dose-dependent manner. This inhibition was reversed by Rho-kinase inhibitor Y-27632. Morphological changes of the prostate cancer cells treated with SA and Y27632 corroborate the migration and invasion assays, although SA had no effect on proliferation of DU145 and PC3 cells. In conclusion, the somatostatin analogue may be beneficial for patients with advanced prostate carcinoma or to protect from distal metastasis if they are positive for SSTR2a.

Tang X, Takekoshi S, Itoh J, Umemura S, Shoji S, Terachi T, Osamura RY.

**L'analogo della somatostatina inibisce la mobilità delle cellule del carcinoma prostatico: un nuovo metodo terapeutico per il carcinoma prostatico in stadio avanzato.**

Int J Oncol. 2010Nov;37(5):1077-83. PubMed PMID: 20878055.

L'analogo della somatostatina (SA) l'octreotide è stato utilizzato come reagente terapeutico per il recettore della somatostatina di tipo 2a (SSTR2a). Lo scopo di questo studio è individuare SSTR2a nel carcinoma prostatico umano e chiarire gli effetti di SA sulle cellule del carcinoma prostatico positive a SSTR2a per determinare il potenziale di questo farmaco come nuovo metodo terapeutico per il carcinoma prostatico in stadio avanzato. In 95 casi di carcinoma prostatico è stato eseguito uno studio immunostochimico di SSTR2a, e i risultati hanno mostrato l'espressione di SSTR2a in 14 dei 95 casi (14.74%); il grado istologico e l'invasione capsulare del carcinoma prostatico sono correlati direttamente all'espressione di SSTR2a. Tra i 10 casi di metastasi linfonodali, l'espressione di SSTR2a è più alta. Sono stati eseguiti studi in vitro usando cellule prostatiche cancerose SSTR2a-positive, DU145 e PC3. La migrazione e l'abilità di invasione delle cellule DU145 e PC3 sono inibite da SA in modo dose dipendente. Questa inibizione viene invertita dall'inibitore della Rho-kinase Y-27632. Cambiamenti morfologici delle cellule prostatiche cancerose trattate con SA e Y27632 confermano i test che misurano la migrazione e l' invasione, sebbene SA non ha effetto sulla proliferazione delle cellule DU145 e PC3. In conclusione, l'analogo della somatostatina può essere un beneficio per i pazienti con carcinoma prostatico in stadio avanzato o può essere usato per proteggere i pazienti da metastasi distali se sono positivi a SSTR2a.

19: Porzio G, Aielli F, Verna L, Galletti B, Shoja E Razavi G, Ficorella C.

**Can malignant bowel obstruction in advanced cancer patients be treated at home?**

Support Care Cancer. 2010 Sep 25. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 20872024.

Eleven advanced cancer patients affected by malignant bowel obstruction (MBO) were treated at home with a combination of octreotide, metoclopramide, morphine, and dexamethasone. In all patients, we observed a prompt control of gastrointestinal symptoms and recovery of bowel movements within 1-5 days. Based on our results, a combination of drugs with different mechanisms of action allows an effective and safe treatment for MBO at home. Further studies with larger number of patients are warranted to confirm these preliminary data

Porzio G, Aielli F, Verna L, Galletti B, Shoja E Razavi G, Ficorella C.

**L'ostruzione intestinale maligna in pazienti con un tumore in stadio avanzato può essere trattata a casa?**

Support Care Cancer. 2010 Sep 25. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 20872024.

11 pazienti con un tumore in stadio avanzato affetti da ostruzione intestinale maligna (MBO) sono stati trattati a casa con una combinazione di octreotide, metoclopramide, morfina e dexametasone. In tutti i pazienti, abbiamo osservato un controllo rapido dei sintomi gastrointestinali e un recupero dei movimenti intestinali entro 1-5 giorni. Basandoci sui nostri risultati, una combinazione di farmaci con meccanismi di azione diversi permette un trattamento sicuro ed efficace da fare a casa. Per confermare questi dati preliminari sono necessari altri studi con un numero più elevato di pazienti.

21: Menda Y, O'Dorisio MS, Kao S, Khanna G, Michael S, Connolly M, Babich J, O'Dorisio T, Bushnell D, Madsen M.

**Phase I trial of 90Y-DOTATOC therapy in children and young adults with refractory solid tumors that express somatostatin receptors.**

J Nucl Med. 2010 Oct;51(10):1524-31. Epub 2010 Sep 16. PubMed PMID:20847174.

The purpose of this study was to conduct a phase I trial of (90)Y-DOTATOC to determine the dose-toxicity profile in children and young adults with somatostatin receptor-positive tumors.

**METHODS:** A 3 × 3 design was used to determine the highest tolerable dose of (90)Y-DOTATOC, with administered activities of 1.11, 1.48, and 1.85 GBq/m(2)/cycle given in 3 cycles at 6-wk intervals. An amino acid infusion was coadministered with the radiopharmaceutical for renal protection. Eligibility criteria included an age of 2-25 y, progressive disease, a positive lesion on (111)In-diethylenetriaminepentaacetic acid-D-Phe(1)-octreotide scanning, a glomerular filtration rate of 80 mL/min/1.73 m(2) or more, bone marrow cellularity of 40% or more or stored autologous hematopoietic stem cells, 60% or more on the Lansky Play Scale, and informed consent.

**RESULTS:** Seventeen subjects (age, 2-24 y) received at least 1 dose of (90)Y-DOTATOC; diagnoses included neuroblastoma, embryonal and astrocytic brain tumors, paraganglioma, multiple endocrine neoplasia IIB, and neuroendocrine tumors. No dose-limiting toxicities and no individual dose reductions due to renal or hematologic toxicity were noted. No complete responses were observed; 2 subjects experienced partial response, 5 had minor responses, 6 experienced stable disease, 2 had progressive disease, and 2 withdrew.

**CONCLUSION:** Peptide receptor radionuclide therapy with (90)Y-DOTATOC is safe in children and young adults and demonstrated a 12% partial response plus 29% minor response rate in patients with somatostatin receptor-positive tumors. No dose-limiting toxicities were observed. The recommended phase II dosing is 3 cycles of 1.85 GBq/m(2)/dose of (90)Y-DOTATOC coadministered with amino acids.

Menda Y, O'Dorisio MS, Kao S, Khanna G, Michael S, Connolly M, Babich J, O'Dorisio T, Bushnell D, Madsen M.

**Phase I trial of 90Y-DOTATOC therapy in children and young adults with refractory solid tumors that express somatostatin receptors.**

J Nucl Med. 2010 Oct;51(10):1524-31. Epub 2010 Sep 16. PubMed PMID:20847174.

Lo scopo di questo studio è quello di condurre un trial di fase I riguardo a (90)Y-DOTATOC per determinare la tossicità in base alla dose in bambini e giovani adulti con tumori positivi al recettore della somatostatina.

**METODI:** È stato usato un progetto 3 x 3 per determinare la dose tollerabile più alta di (90)Y-DOTATOC con attività di somministrazione di 1.11, 1.48, e 1.85 GBq/m(2)/cycle data in 3 cicli a intervalli di 6-wk. Insieme al radiofarmaco sono stati somministrati amminoacidi per la protezione renale. I criteri dei soggetti dello studio includevano un'età da 2 a 25 anni, patologia progressiva, una lesione positiva a (111)In-diethylenetriaminepentaacetic acid-D-Phe(1)-octreotide scanning, una percentuale di filtrazione glomerulare di 80 mL/min/1.73 m(2) o più, cellularità del midollo osseo pari al 40% o più o cellule staminali ematopoietiche autologhe memorizzate, 60% o più in Lansky Play Scale, e il consenso informato.

**RISULTATI:** 17 soggetti (età 2-24) hanno ricevuto almeno 1 dose di (90)Y-DOTATOC; le diagnosi includevano neuroblastoma, tumori del cervello astrocitici ed embrionali, paraganglioma, neoplasia multipla endocrina di tipo IIB e tumori neuroendocrini. Non sono state notate tossicità dose-dipendenti e riduzioni di dose individuali dovute alla tossicità renale ed ematologica. Non sono state osservate risposte complete; in 2 soggetti si è verificata una risposta parziale, in 5 una risposta minore, in 6 stabilità, in 2 progressione di malattia e 2 si sono ritirati.

**CONCLUSIONI:** La terapia con il recettore radionuclide peptidico di (90)Y-DOTATOC è sicura nei bambini e nei giovani adulti e ha mostrato 12% di risposta parziale più 29% di risposte minori in pazienti con tumori positivi al recettore della somatostatina. Non è stata osservata tossicità in base alle dosi. La dose raccomandata per la fase II è 3 cicli di 1.85 GBq/m<sup>2</sup>/dose (90)Y-DOTATOC co somministrato con amminoacidi.

25: Bakhtiar Y, Hirano H, Arita K, Yunoue S, Fujio S, Tominaga A, Sakoguchi T, Sugiyama K, Kurisu K, Yasufuku-Takano J, Takano K.

### **Relationship between cytokeratin staining patterns and clinico-pathological features in somatotropinoma.**

Eur J Endocrinol. 2010 Oct;163(4):531-9. Epub 2010 Aug 5. PubMed PMID: 20688896.

**OBJECTIVE:** Somatotropinoma are classified as densely and sparsely granulated adenoma, which typically exhibit a perinuclear pattern (PP) and a dot pattern (DP) in cytokeratin (CK) immunostaining respectively. Some exhibit a mixed pattern (MP). We studied the relationship between these somatotropinoma subtypes and their clinico-pathological features.

**METHODS:** The study population consisted of 141 Japanese acromegalic patients. We evaluated their clinical presentation and their response to provocation tests with TRH and LHRH and to suppression (octreotide) test. Tumour tissues were subjected to immunostaining for CAM-5.2, MIB-1, CD34, E-cadherin (CDH1) and p53 (TP53). In 43 cases (30 non-DP and 13 DP), we analysed gsp mutations (constitutively activating mutations of the G(s) $\alpha$  protein that is encoded by GNAS gene).

**RESULTS:** The 141 adenoma were categorised into three subtypes based on their CK staining patterns; 30 (21.3%) exhibited DP, 83 (58.9%) exhibited PP, and 28 (19.9%) exhibited MP. Compared with the other subtypes, DP adenoma were significantly larger, and their E-cadherin expression and response to TRH, LHRH and octreotide challenge were lower. The postoperative cure rate tended to be lower in DP adenoma. gsp mutations were detected in 25 of 43 cases examined (58.1%); 20 of the 30 non-DP (66.7%) and 5 of the 13 DP tumours (38.5%) were affected by the mutation.

**CONCLUSION:** DP somatotropinoma exhibit characteristic features. Compared with the non-DP subtypes, DP adenoma manifested a larger tumour size, a lower incidence of abnormal responses to TRH and LHRH challenge, a poor response to octreotide test and a lower expression of E-cadherin. gsp mutation was not exclusive for non-DP somatotropinoma.

Bakhtiar Y, Hirano H, Arita K, Yunoue S, Fujio S, Tominaga A, Sakoguchi T, Sugiyama K, Kurisu K, Yasufuku-Takano J, Takano K.

### **Relazione tra i pattern di colorazione citocheratina e caratteristiche clinico-patologiche nei somatotropinomi.**

Eur J Endocrinol. 2010 Oct;163(4):531-9. Epub 2010 Aug 5. PubMed PMID: 20688896.

**OBIETTIVO:** I somatotropinomi sono classificati come adenomi granulati densi e sparsi che, nella immunocolorazione alla citocheratina (CK) esibiscono tipicamente un pattern perinucleare (PP) e con puntini (DP). Alcuni esibiscono un pattern misto (MP). Abbiamo studiato la relazione tra questi sottotipi di somatotropinoma e le loro caratteristiche clinico-patologiche.

**METODI:** La popolazione studiata consiste di 141 pazienti acromegalici giapponesi. Abbiamo valutato gli aspetti clinici e la loro risposta ai test con TRH e LHRH e al test con octreotide. I tessuti tumorali sono stati sottoposti all'immunostaining per CAM-5.2, MIB-1, CD34, E-cadherin (CDH1) e p53 (TP53). In 43 casi (30 non-DP and 13 DP) abbiamo analizzato mutazioni di gsp.

**RISULTATI:** Basandosi sul pattern di colorazione di CK, i 141 adenomi sono stati caratterizzati in 3 sottotipi; 30 (21.3%) hanno evidenziato DP, 83 (58.9%) PP, e 28 (19.9%) MP. Confrontati agli altri sottotipi, gli adenomi DP sono piú grandi, e l'espressione della loro E-caderina e la risposta a TRH, LHRH e l'octreotide sono piú bassi. La percentuale di successo postoperatorio tende a essere piú bassa negli adenomi DP. Sono state evidenziate mutazioni gsp in 25 dei 43 casi esaminati (58.1%); in 20 dei 30 non-DP (66.7%) e 5 dei 13 tumori DP (38.5%) presentavano mutazioni.

**CONCLUSIONI:** I somatotropinomi DP evidenziano caratteristiche. Confrontati ai sottotipi non-DP, gli adenomi DP manifestano un tipo di tumore più grande, una risposta scarsa all'octreotide test e una bassa espressione di E-caderina. La mutazione in gsp non è esclusiva dei somatotropinomi non-DP.

27: Boss A, Bisdas S, Kolb A, Hofmann M, Ernemann U, Claussen CD, Pfannenbergl C, Pichler BJ, Reimold M, Stegger L.

**Hybrid PET/MRI of intracranial masses: initial experiences and comparison to PET/CT.**

J Nucl Med. 2010 Aug;51(8):1198-205. Epub2010 Jul 21. PubMed PMID: 20660388.

Simultaneous PET and MRI using new hybrid PET/MRI systems promises optimal spatial and temporal coregistration of structural, functional, and molecular image data. In a pilot study of 10 patients with intracranial masses, the feasibility of tumor assessment using a PET/MRI system comprising lutetium oxyorthosilicate scintillators coupled to avalanche photodiodes was evaluated, and quantification accuracy was compared with conventional PET/CT datasets.

**METHODS:** All measurements were performed with a hybrid PET/MRI scanner consisting of a conventional 3-T MRI scanner in combination with an inserted MRI-compatible PET system. Attenuation correction of PET/MR images was computed from MRI datasets. Diagnoses at the time of referral were low-grade astrocytoma (n = 2), suspicion of low-grade astrocytoma (n = 1), anaplastic astrocytoma (World Health Organization grade III; n = 1), glioblastoma (n = 2), atypical neurocytoma (n = 1), and meningioma (n = 3). In the glial tumors, (11)C-methionine was used for PET; in the meningiomas, (68)Ga-DOTATOC was administered. Tumor-to-gray matter and tumor-to-white matter ratios were calculated for gliomas, and tracer uptake of meningiomas was referenced to nasal mucosa. PET/MRI was performed directly after clinically indicated PET/CT examination.

**RESULTS:** In all patients, the PET datasets showed similar diagnostic image quality on the hybrid PET/MRI and the PET/CT studies; however, slight streak artifacts were visible in coronal and sagittal sections when using the higher intrinsic resolution of the PET/MRI insert. Prefiltering of images with a 4-mm gaussian filter at a resolution comparable to that of the PET/CT system virtually eliminated these artifacts. Although acquisition of the PET/MR images started at 30-60 min after PET/CT (20.4-min half-life of (11)C) acquisition, the signal-to-noise ratio was good enough, thus underlining the high sensitivity of the PET insert, compared with whole-body PET systems. The computed tumor-to-reference tissue ratios exhibited an excellent accordance between the PET/MRI and PET/CT systems, with a Pearson correlation coefficient of 0.98. Mean paired relative error was 7.9% +/- 12.2%. No significant artifacts or distortions were detected in the simultaneously acquired MR images using the PET/MRI scanner.

**CONCLUSION:** Structural, functional, and molecular imaging in patients with brain tumors is feasible with diagnostic imaging quality using simultaneous hybrid PET/MR image acquisition.

Boss A, Bisdas S, Kolb A, Hofmann M, Ernemann U, Claussen CD, Pfannenbergl C, Pichler BJ, Reimold M, Stegger L.

**Sistema ibrido PET/MRI delle masse intracraniche: prime esperienze e confronto con la PET/CT.**

J Nucl Med. 2010 Aug;51(8):1198-205. Epub2010 Jul 21. PubMed PMID: 20660388.

L'uso simultaneo della PET e della MRI in un nuovo sistema ibrido PET/MRI assicura una coregistrazione ottimale nello spazio e nel tempo di immagini strutturali, funzionali e molecolari. In uno studio di 10 pazienti con masse intracraniche, è stato valutato l'uso del sistema PET/MRI, composto da scintillatori lutezio ossiortosilicati accoppiato a fotodiodi, e l'accuratezza della quantificazione è stata comparata con la tecnica convenzionale PET/CT.

**METODI:** Tutte le misurazioni sono state eseguite con uno scanner PET/MRI costituito da uno scanner convenzionale 3-T MRI in combinazione con un sistema PET inserito MRI-compatibile. Le diagnosi erano astrocitoma di basso grado (n = 2), sospetto astrocitoma di basso grado (n = 1), astrocitoma anaplastico (World Health Organization grade III; n = 1), glioblastoma (n = 2),

neurocitoma atipico (n = 1) e meningioma (n = 3). Per i gliomi è stato calcolato il rapporto tra il tumore nella materia grigia e il tumore nella materia bianca e nei meningiomi la captazione del tracciante è riferita alla mucosa nasale. PET/MRI è stata usata direttamente dopo l'indicazione clinica dell'esame di PET/CT.

**RISULTATI:** In tutti i pazienti, i dati forniti dalla PET hanno mostrato immagini diagnostiche di qualità simile agli studi eseguiti con le tecniche di PET/MRI e di PET/CT; tuttavia, quando si usa l'alta risoluzione della PET/MRI sono visibili artefatti nelle sezioni coronali e sagittali. Prefiltrando l'immagine con un filtro 4-mm Gaussian ad una risoluzione comparata al sistema PET/CT si ha l'eliminazione degli artefatti. Sebbene l'acquisizione dell'immagine PET/MR inizia 30-60 minuti dopo l'acquisizione PET/CT, il segnale è abbastanza buono, questo sottolinea l'alta sensibilità dell'insero della PET, comparato con l'indagine PET esteso a tutto il corpo. Usando lo scanner PET/MRI non sono stati trovati artefatti o distorsioni nell'acquisizione simultanea delle immagini MR.

**CONCLUSIONI:** Usando simultaneamente il sistema PET/MR in tumori cerebrali è possibile ottenere immagini strutturali, funzionali e molecolari di qualità.

30: Waser B, Cescato R, Tamma ML, Maecke HR, Reubi JC.

**Absence of somatostatin SST(2) receptor internalization in vivo after intravenous SOM230 application in the AR42J animal tumor model.**

Eur J Pharmacol. 2010 Oct 10;644(1-3):257-62. Epub 2010 Jul 16. PubMed PMID: 20643121.

Among clinically relevant somatostatin functions, agonist-induced somatostatin receptor subtype 2 (sst(2)) internalization is a potent mechanism for tumor targeting with sst(2) affine radioligands such as octreotide. Since, as opposed to octreotide, the second generation multi-somatostatin analog SOM230 (pasireotide) exhibits strong functional selectivity, it appeared of interest to evaluate its ability to affect sst(2) internalization in vivo. Rats bearing AR42J tumors endogenously expressing somatostatin sst(2) receptors were injected intravenously with SOM230 or with the [Tyr(3), Thr(8)]-octreotide (TATE) analog; they were euthanized at various time points; tumors and pancreas were analyzed by immunohistochemistry for the cellular localization of somatostatin sst(2) receptors. SOM230-induced sst(2) internalization was also evaluated in vitro by immunofluorescence microscopy in AR42J cells. At difference to the efficient in vivo sst(2) internalization triggered by intravenous [Tyr(3), Thr(8)]-octreotide, intravenous SOM230 did not elicit sst(2) internalization: immunohistochemically stained sst(2) in AR42J tumor cells and pancreatic cells were detectable at the cell surface at 2.5min, 10min, 1h, 6h, or 24h after SOM230 injection while sst(2) were found intracellularly after [Tyr(3), Thr(8)]-octreotide injection. The inability of stimulating sst(2) internalization by SOM230 was confirmed in vitro in AR42J cells by immunofluorescence microscopy. Furthermore, SOM230 was unable to antagonize agonist-induced sst(2) internalization, neither in vivo, nor in vitro. Therefore, SOM230 does not induce sst(2) internalization in vivo or in vitro in AR42J cells and pancreas, at difference to octreotide derivatives with comparable sst(2) binding affinities. These characteristics may point towards different tumor targeting but also to different desensitization properties of clinically applied SOM230.

Waser B, Cescato R, Tamma ML, Maecke HR, Reubi JC.

**Assenza dell'internalizzazione del recettore della somatostatina SST(2) in vivo dopo l'applicazione intravenosa di SOM230 in un modello di tumore animale AR42J**

Eur J Pharmacol. 2010 Oct 10;644(1-3):257-62. Epub 2010 Jul 16. PubMed PMID: 20643121

Tra le funzioni clinicamente rilevanti della somatostatina l'internalizzazione del recettore della somatostatina di tipo 2 indotto dall'agonista è un potente meccanismo d'azione contro il tumore che prevede l'utilizzo di radioligandi affini a sst(2) come l'octreotide. Dal momento che, opposto all'octreotide, la seconda generazione degli analoghi della somatostatina SOM230 (pasireotide) esibiscono una forte funzione selettiva, è interessante valutare l'abilità di influenzare in vivo l'internalizzazione di sst(2). A ratti con tumore AR42J che esprimono i recettori della somatostatina sst(2) sono state iniettate SOM230 o [Tyr(3), Thr(8)]-octreotide (TATE) analog ; nei tumori e nel pancreas è stata analizzata tramite l'immunoistochimica la localizzazione cellulare del recettore della somatostatina sst(2). L'internalizzazione del recettore della somatostatina di tipo 2 indotto da SOM230 è stata valutata nelle cellule AR42J in vitro tramite il microscopio a fluorescenza. A differenza dell'efficienza dell'internalizzazione in vivo di sst(2) innescato dalla somministrazione intravenosa di [Tyr(3), Thr(8)]-octreotide, la somministrazione intravenosa di SOM230 non provoca l'internalizzazione di sst(2): dopo l'iniezione di SOM230 nelle cellule tumorali AR42J e nelle cellule pancreatiche sst(2) è rilevabile sulla superficie cellulare a 2.5min, 10min, 1h, 6h, or 24h mentre dopo l'iniezione di [Tyr(3), Thr(8)]-octreotide sst(2) si trova all'interno della cellula. L'incapacità da parte di SOM230 di stimolare l'internalizzazione di sst(2) è stata confermata nelle cellule AR42J in vitro tramite il microscopio a fluorescenza. Inoltre, SOM230 non è in grado di contrapporsi all'internalizzazione di sst(2) indotta dall'agonista, né in vivo, né in vitro. Perciò, nelle

cellule AR42J e nel pancreas SOM230 non induce l'internalizzazione di sst(2) in vivo o in vitro, a differenza dei derivati dell'octreotide che hanno affinità compatibile con sst(2). Queste caratteristiche possono essere utilizzate nei confronti di diversi tumori.

32: Kucukmetin A, Naik R, Galaal K, Bryant A, Dickinson HO.

**Palliative surgery versus medical management for bowel obstruction in ovarian cancer.**  
CochraneDatabase Syst Rev. 2010 Jul 7;(7):CD007792. Review. PubMed PMID: 20614464.

**BACKGROUND:** Ovarian cancer is the sixth most common cancer among women and is usually diagnosed at an advanced stage. Bowel obstruction is a common feature of advanced or recurrent ovarian cancer. Patients with bowel obstruction are generally in poor physical condition with a limited life expectancy. Therefore, maintaining their QoL with effective symptom control is the main purpose of the management of bowel obstruction.

**OBJECTIVES:** To compare the effectiveness and safety of palliative surgery (surgery performed to control the cancer, reduce symptoms and improve quality of life for those whose cancer is not able to be entirely removed) and medical management for bowel obstruction in women with ovarian cancer.

**SEARCH STRATEGY:** We searched the Cochrane Gynaecological Cancer Group Trials Register, The Cochrane Central Register of Controlled trials (CENTRAL), Issue 1 2009, MEDLINE and EMBASE up to February 2009. We also searched registers of clinical trials, abstracts of scientific meetings, reference lists of included studies and contacted experts in the field.

**SELECTION CRITERIA:** Studies that compared palliative surgery and medical interventions, in adult women diagnosed with ovarian cancer who had either full or partial obstruction of the bowel. Randomised controlled trials (RCTs) and non-RCTs that used multivariable statistical adjustment for baseline case mix were eligible.

**DATA COLLECTION AND ANALYSIS:** Two review authors independently assessed whether potentially relevant studies met the inclusion criteria, abstracted data and assessed risk of bias. One non-randomised study was identified so no meta-analyses were performed.

**MAIN RESULTS:** The search strategy identified 183 unique references of which 22 were identified as being potentially eligible on the basis of title and abstract. Only one study met our inclusion criteria and was included in the review. It analysed retrospective data for 47 women who received either palliative surgery (n = 27) or medical management with Octreotide (n = 20) and reported overall survival and perioperative mortality and morbidity. Women with poor performance status were excluded from surgery. Although six (22%) women who received surgery had serious complications of the operation and three (11%) died of complications, multivariable analysis found that women who received surgery had significantly ( $p < 0.001$ ) better survival than women who received Octreotide, after adjustment for important prognostic factors. However, the magnitude of this effect was not reported. Quality of life (QoL) was not reported and adverse events were incompletely documented.

**AUTHORS' CONCLUSIONS:** We found only low quality evidence comparing palliative surgery and medical management for bowel obstruction in ovarian cancer. Therefore we are unable to reach definite conclusions about the relative benefits and harms of the two forms of treatment, or to identify sub-groups of women who are likely to benefit from one treatment or the other. However, there is weak evidence in support of surgical management to prolong survival

Kucukmetin A, Naik R, Galaal K, Bryant A, Dickinson HO.

**Chirurgia palliativa contro gestione medica per l'ostruzione intestinale in casi di tumore ovarico**

CochraneDatabase Syst Rev. 2010 Jul 7;(7):CD007792. Review. PubMed PMID: 20614464.

**BACKGROUND:** Il cancro ovarico è il sesto tumore più diffuso tra le donne e solitamente viene diagnosticato in stadio avanzato. L'ostruzione intestinale è una caratteristica comune del tumore

ovarico ricorrente o in stadio avanzato. I pazienti con ostruzione intestinale sono generalmente in condizioni fisiche critiche con una limitata aspettativa di vita. Perciò, nella gestione dell'ostruzione intestinale il mantenimento del QoL con controllo dei sintomi è lo scopo principale.

**OBJECTIVES:** L'obiettivo è confrontare l'efficacia e la sicurezza della chirurgia palliativa (chirurgia eseguita per controllare il tumore, ridurre i sintomi e migliorare la qualità di vita in quei casi in cui non è possibile asportare il tumore) rispetto alla gestione medica che non prevede la chirurgia nelle donne con un tumore ovarico che presentano ostruzione intestinale.

**SEARCH STRATEGY:** Abbiamo cercato il Cochrane Gynaecological Cancer Group Trials Register, The Cochrane Central Register of Controlled trials (CENTRAL), Issue 1 2009, MEDLINE . Abbiamo cercato registri di trials clinici, abstract di congressi scientifici, liste di referenti di alcuni studi e abbiamo contattato esperti nel campo.

**SELECTION CRITERIA:** Studi che confrontano la chirurgia palliativa e l'intervento medico, in donne adulte con diagnosi di cancro ovarico che abbiano una ostruzione intestinale totale o parziale. Sono stati considerati idonei studi randomizzati (RCTs) e non-RCTs che hanno utilizzato metodi statistici multivariabili per casi misti.

**DATA COLLECTION AND ANALYSIS:** E' stato valutato se gli studi rilevanti avevano criteri di inclusione, dati e rischi di bias. E' stato identificato uno studio non randomizzato perciò la meta-analisi non è stata eseguita.

**MAIN RESULTS:** La strategia adottata ha identificato 183 riferimenti di cui 22 sono stati identificati come potenzialmente idonei sulla base del titolo e dell'abstract. Solo uno studio possedeva i requisiti ed è stato inserito nella review. Esso analizza dati retrospettivi di 47 donne che hanno ricevuto sia chirurgia palliativa (n = 27) sia l'octreotide (n = 20) ed è stata riportata la sopravvivenza totale e la morbilità e mortalità perioperatoria. Le donne con un basso livello di performance status sono state escluse dall'intervento chirurgico. Sebbene 6 donne che hanno eseguito l'intervento hanno avuto serie complicazioni e 3 sono decedute per complicazioni, l'analisi multi variabile ha mostrato che le donne sottoposte ad intervento hanno una sopravvivenza maggiore rispetto alle donne in cui è stato somministrato l'octreotide, dopo aver eseguito adattamenti in base ad importanti fattori di prognosi. Tuttavia, la grandezza di questo effetto non è stata riportata. La qualità della vita non è stata riportata ed eventi avversi sono stati documentati in maniera incompleta.

**AUTHORS' CONCLUSIONS:** Abbiamo trovato evidenze poco numerose riguardo all'uso della chirurgia palliativa rispetto alla gestione medica che non prevede la chirurgia nei casi di cancro ovarico con ostruzione intestinale. Perciò non siamo in grado di trarre delle conclusioni sui benefici delle due forme di trattamento, o di identificare sottogruppi di donne che hanno beneficiato di uno dei due trattamenti. Tuttavia, l'evidenza che l'uso della chirurgia porti ad un prolungamento della sopravvivenza è debole.

41: De Martino MC, Hofland LJ, Lamberts SW.

**Somatostatin and somatostatin receptors: from basic concepts to clinical applications.**

Prog Brain Res.2010;182:255-80. PubMed PMID: 20541669.

Somatostatin (SS) and SS receptors (sst) are broadly expressed in the human body where they exert many physiological actions. Moreover, they can be expressed in many pathological tissues. Particularly, a high density of sst has been described in human neuroendocrine tumors (NETs). SS and sst have a therapeutic and diagnostic value in several clinical conditions. For this reason stable SS-analogues have been developed. Among SS-analogues, octreotide, octreotide long-acting-release (LAR), lanreotide-sustained-release (SR) and lanreotide autogel (ATG) are approved for clinical use and pasireotide is in a late phase of clinical development. Presently, the SS-analogues are the standard treatment option for acromegalic patients and play a prominent role in the symptomatic control of patients with gastroenteropancreatic-neuroendocrine tumors (GEP-NETs). SS-analogues are able to control hormonal hypersecretion and reduce tumoral growth in the majority of cases. However, some patients are resistant to SS-analogue treatment and other patients (often GEP-NETs), after a variable period of treatment, develop tachyphylaxis to these compounds. The mechanisms behind this treatment resistance or tachyphylaxis are presently under investigation. The understanding of these mechanisms might help to develop new treatment modalities for patients not responding to the currently available SS-analogues. The high tumoral expression level of sst, characteristic of many NETs, has been the rationale to develop radiolabelled SS-analogues to visualize sst-expressing tumors and to treat unresectable tumors. Indeed, SS-analogues coupled with  $(^{111}\text{In})$  are used to perform sst-scintigraphy, which is a very useful first-line imaging technique in the diagnosis and follow-up of GEP-NETs. Moreover, SS-analogues conjugated to  $(^{111}\text{In})$  or to other radioisotopes, such as  $(^{177}\text{Lu})$  or  $(^{90}\text{Y})$ , have promising effects in the treatment of advanced NETs. sst are expressed in some non-neuroendocrine tumors as well and in some non-tumoral diseases, suggesting that SS-analogues might have a role in the diagnosis and treatment of these pathological conditions as well. The development of novel SS-analogues with new pharmacokinetic and pharmacodynamic characteristics may further improve the clinical applications of such compounds.

De Martino MC, Hofland LJ, Lamberts SW.

**Somatostatina e recettori: dai concetti di base alle applicazioni cliniche.**

Prog Brain Res.2010;182:255-80. PubMed PMID: 20541669.

La somatostatina (SS) e i recettori della somatostatina (sst) sono espressi nel corpo umano dove esercitano molte funzioni fisiologiche. Inoltre, possono essere espressi in molti tessuti patologici. In particolare, un'alto numero di sst sono stati descritti nei tumori neuroendocrini (NETs). In molte condizioni cliniche severe SS e sst hanno un valore diagnostico e terapeutico. Per questo motivo sono stati prodotti analoghi stabili di SS. Tra gli analoghi di SS octreotide, octreotide long-acting-release (LAR), lanreotide-sustained-release (SR) and lanreotide autogel (ATG) sono stati approvati per l'uso clinico e il pasireotide è nell'ultima fase di sviluppo. Attualmente, gli analoghi della somatostatina rappresentano il trattamento standard per l'acromegalia e hanno un ruolo fondamentale nel controllo sintomatico dei pazienti con tumori neuroendocrini gastroenteropancreatici (GEP-NETs). Nella maggioranza dei casi gli analoghi di SS sono in grado di controllare l'ipersecrezione ormonale e ridurre la crescita tumorale. Tuttavia, alcuni pazienti sono resistenti al trattamento con gli analoghi della somatostatina e altri pazienti (often GEP-NETs), dopo un periodo di trattamento, sviluppano tachifilassi ai componenti. Il meccanismo della resistenza al trattamento e dello sviluppo di tachifilassi è sotto osservazione. La comprensione di

questi meccanismi potrebbe aiutare nello sviluppo di nuove modalità di trattamento per i pazienti che non rispondono agli analoghi di SS. Gli alti livelli di espressione di ssts, caratteristica di molti NETs, potrebbe portare allo sviluppo di analoghi di SS radiomarcati per visualizzare l'espressione di sst nei tumori e per trattare i tumori resecabili. Inoltre, analoghi di SS insieme a  $(111)\text{In}$  sono usati per la scintigrafia sst, che è molto utile nella diagnosi e nel follow up dei casi di GEP-NETs. Inoltre, gli analoghi di SS coniugati a  $(111)\text{In}$  o ad altri radioisotopi, come  $(177)\text{Lu}$  o  $(90)\text{Y}$ , potrebbero avere effetti promettenti nel trattamento di NETs. in stadio avanzato. Ssts sono espressi anche in alcuni tumori non neuroendocrini come in alcune patologie non tumorali, questo suggerisce che gli analoghi di SS potrebbero avere un ruolo nella diagnosi e nel trattamento di queste patologie. Lo sviluppo di nuovi analoghi di SS con caratteristiche farmacocinetiche e farmacodinamiche nuove può portare ad un miglioramento delle applicazioni cliniche di questi composti

47: Zhang J, Jin W, Wang X, Wang J, Zhang X, Zhang Q.

**A novel octreotide modified lipid vesicle improved the anticancer efficacy of doxorubicin in somatostatin receptor 2 positive tumor models.**

Mol Pharm. 2010 Aug 2;7(4):1159-68. PubMedPMID: 20524673.

**Abstract**

Octreotide (Oct) is a potential ligand due to its high affinity to somatostatin receptors (SSTRs), especially subtype 2 (SSTR2), as many tumor cells specifically overexpress SSTR2. In this study, we conjugated Oct to the PEG end of DSPE-PEG and prepared a novel doxorubicin (DOX)-loaded and Oct-modified sterically stabilized liposomes (Oct-SSL-DOX), in order to facilitate intracellular delivery of chemotherapeutic agent to the related tumor cells through active targeting and finally improve its antitumor activity. Three cells were proved to be different in expression level of SSTR2 and were used as model or control. It was demonstrated by fluorescence spectrophotometry, confocal laser scanning microscopy and flow cytometry that active sterically stabilized liposomes (SSL) increased intracellular delivery of DOX in SSTR2-positive cells, through a mechanism of receptor-mediated endocytosis. Compared to SSL, Oct modification on SSL exhibited little effect on the physicochemical properties of SSL. However, it reduced the circulation time of loaded-DOX to some extent in rats, increased cytotoxicity in SSTR2-positive tumor cells, enhanced drug accumulation in tumor tissue and improved anticancer efficacy in SSTR2-overexpressing tumor model. The correlation was found among intracellular uptake, cytotoxicity, drug distribution in tumor and pharmacodynamics of Oct-SSL-DOX, but not the pharmacokinetics based on plasma drug concentration. In summary, octreotide-modified SSL might be a promising system for the treatment of SSTR2-overexpressing cancers

**L'octreotide modificata in vescicole lipidiche migliora l'efficacia antitumorale della doxorubicina nel recettore della somatostatina : 2 modelli tumorali positivi.**

Octreotide (OCT) è un ligando potenziale a causa della sua alta affinità per i recettori della somatostatina (SSTRs), in particolare il sottotipo 2 (SSTR2), specificatamente sovra espresso in molte cellule tumorali. In questo studio, abbiamo coniugato l' octreotide fino alla fine della PEG DSPE-PEG e preparato un nuova doxorubicina (DOX) caricata con octreotide modificata in liposomi stabilizzati stericamente (SSL-Ott-DOX), al fine di facilitare la distribuzione intracellulare di agente chemioterapico alle cellule tumorali correlate bersagliandole attivamente, e, infine, migliorare la sua attività antitumorale.

Per tre cellule è stato dimostrato che esistono diversi livelli di espressione di SSTR2 utilizzati poi come modello o controllo. E' stato dimostrato con spettrofotometria a fluorescenza, microscopia confocale a scansione laser e citometria a flusso che attiva i liposomi stabilizzati stericamente (SSL), che è aumentata la distribuzione intracellulare di DOX in cellule SSTR2-positive, attraverso un meccanismo di endocitosi mediata da recettori. Rispetto a SSL, l'octreotide modificata su SSL esposto ha poco effetto sulle proprietà fisico-chimiche della SSL. Tuttavia, ha ridotto il tempo di circolazione di distribuzione della DOX in una certa misura nel ratto, incrementando la citotossicità nelle cellule tumorali SSTR2-positivo e un maggiore accumulo del farmaco nel tessuto tumorale

migliorando l'efficacia antitumorale nel modello di tumore SSTR2-sovrappreso. La correlazione è stata trovata tra captazione intracellulare, la citotossicità, la distribuzione del farmaco nel tumore e la farmacodinamica di Oct-SSL-DOX, ma non la farmacocinetica basata sulla concentrazione plasmatica di farmaco. In sintesi, octreotide-modificato SSL potrebbe essere un sistema promettente per il trattamento di tumori SSTR2-sovrappresi.

53: Pisarek H, Pawlikowski M, Kunert-Radek J, Winczyk K.

### **Does the response of GH-secreting pituitary adenomas to octreotide depend on the cellular localization of the somatostatin receptor subtypes SSTR2 and SSTR5?**

Endokrynol Pol. 2010Mar-Apr;61(2):178-81. PubMed PMID: 20464704.

#### **Abstract**

**INTRODUCTION:** The immunohistochemical examination of somatostatin receptor (SSTR) subtypes expression in different endocrine tumours, including pituitary adenomas, revealed membranous or cytoplasmic distribution of SSTR1-5. Currently used long-acting somatostatin analogue octreotide prefers SSTR2 and SSTR5 subtypes. In an earlier study a positive correlation between the summarized score of SSTR2A + SSTR2B expressions and growth hormone (GH) response to octreotide administration was found, independently of receptor distribution within the cell. In this study we searched for the relationship between the GH inhibitory response to acute octreotide administration and SSTR2A, SSTR2B, and SSTR5 cellular localization.

**MATERIAL AND METHODS:** Thirteen acromegalic patients underwent a test of acute administration of octreotide before surgery. The drop in GH was defined as the percentage of the basal value. The pituitary adenomas from these patients were immunostained to determine the hormonal phenotype and expression of SSTR subtypes. The subcellular distribution pattern of SSTR subtypes - membranous or cytoplasmic - was determined.

**RESULTS:** In the majority of specimens, cytoplasmic localization of receptor subtypes was observed, although membrane or mixed cytoplasmicmembranous localized immunopositivity also occurred. The drop in GH after octreotide administration varied between 57.1-96.7% (mean 82.1%). Among the patients with the cytoplasmic localization of SSTR5, the decrease in GH was significantly higher (92.0 +/- 7.0%). A tendency towards the higher response in patients with cytoplasmic localization of SSTR2A and 2B was also observed (86.8% and 87.0%, respectively).

**CONCLUSIONS:** It seems that cytoplasmic localization of SSTR5, SSTR2A, and SSTR2B is connected with enhanced GH inhibition after octreotide administration. It is possible that this somatostatin analogue alters the localization of subtypes SSTR2A and SSTR2B through the receptor internalization. As a consequence, the SSTR-immunopositivity in cell cytoplasm is increased. The cytoplasmic but not the membranous localization is connected with the higher responsiveness to the octreotide in somatotropinomas.

### **La risposta di adenomi ipofisari GH-secerenti all'octreotide dipendono dalla localizzazione cellulare dei sottotipi del recettore della somatostatina SSTR2 e SSTR5?**

**INTRODUZIONE:** L'analisi immunoistochimica del recettore di somatostatina (SSTR) espresso in diversi tumori endocrini, inclusi adenomi pituitari, ha rivelato la distribuzione membranosa o citoplasmatica di SSTR1-5. Attualmente viene utilizzata octreotide un' analogo della somatostatina che ha una lunga durata d'azione, e preferisce sottotipi SSTR2 e SSTR5. In uno studio precedente è stata trovata una correlazione positiva tra la quantità complessiva di sintesi sstr2A + espressioni SSTR2B e ormone della crescita (GH) in risposta alla somministrazione di octreotide, indipendentemente dalla distribuzione del recettore all'interno della cellula. In questo studio abbiamo cercato la relazione tra la risposta del GH inibitorio alla somministrazione acuta di octreotide e la localizzazione cellulare di sstr2A, SSTR2B e SSTR5.

**MATERIALI E METODI:** Tredici pazienti acromegalici sottoposti a una prova di somministrazione acuta di octreotide prima dell'intervento chirurgico. Il calo di GH è stato definito

come la percentuale del valore basale. Gli adenomi pituitari da questi pazienti sono stati sottoposti a immunocromatografia per determinare il fenotipo ormonale e l'espressione dei sottotipi SSTR. E' stato quindi determinato il modello di distribuzione subcellulare dei sottotipi SSTR - membranoso o citoplasmatico -

**RISULTATI:** Nella maggior parte dei campioni, è stata osservata la localizzazione citoplasmatica dei sottotipi del recettore, anche se l'immuno-positività si è anche verificata a livello membranale o misto (citoplasmatico-membranoso). Il calo del GH dopo la somministrazione di octreotide variava tra il 57,1-96,7% (media 82,1%). Tra i pazienti con la localizzazione citoplasmatica di SSTR5, la diminuzione del GH era significativamente più alta (92,0 + / - 7,0%). E' stata anche osservata una tendenza verso la risposta più alta nei pazienti con localizzazione citoplasmatica di sstr2A e 2B (86,8% e 87,0%, rispettivamente).

**CONCLUSIONI:** Sembra che la localizzazione citoplasmatica di SSTR5, sstr2A, e SSTR2B sia collegata con una maggiore inibizione del GH dopo la somministrazione di octreotide. E' possibile che questo analogo della somatostatina, alteri la localizzazione dei sottotipi sstr2A e SSTR2B attraverso l'internalizzazione recettoriale. Di conseguenza, l' immunopositività di SSTR nel citoplasma delle cellule è aumentata. Il citoplasma, ma non la localizzazione membranosa è collegato con la capacità di risposta superiore per l'octreotide nei somatotropinomi.

64: Aisner SC, Dahlberg S, Hameed MR, Ettinger DS, Schiller JH, Johnson DH, Aisner J, Loehrer PJ

**Epidermal growth factor receptor, C-kit, and Her2/neu immunostaining in advanced or recurrent thymic epithelial neoplasms staged according to the 2004 World Health Organization in patients treated with octreotide and prednisone: an Eastern Cooperative Oncology Group study.**

.J Thorac Oncol. 2010 Jun;5(6):885-92. PubMed PMID: 20421818.

**Abstract**

**BACKGROUND:** Advanced or recurrent nonresectable thymic epithelial tumors show only a modest response to standard chemotherapy. A recent study using octreotide and prednisone in thymic tumors, Eastern Cooperative Oncology Group study E1C97, was conducted to verify the activity of octreotide for thymic tumors. The aim of this study was to determine whether epidermal growth factor receptor (EGFR) immunoreactivity correlated with outcomes and to identify new biologic markers for potential targeted therapy. Three markers, EGFR, C-kit, and Her2/neu, were selected for evaluation in patients with advanced thymic epithelial tumors treated on E1C97.

**METHODS:** Of the 42 patients entered onto E1C97, 34 patients (World Health Organization [WHO] categories: type A = 1, type AB = 1, type B1 = 10, type B2 = 11 type B3 = 8, and type C = 3) had sufficient tissue available for immunohistologic study. Each tumor was assessed to have 0, 1+, 2+, or 3+ immunoreactivity in the cytoplasm or membranes of the neoplastic cells for Her2/neu and EGFR and for the presence or absence of C-kit immunoreactivity.

**RESULTS:** EGFR immunoreactivity of 2+ or 3+ was associated with more aggressive thymic tumors (WHO types B2 and B3). However, strong EGFR immunoreactivity was not consistently seen with thymic carcinoma. The presence of EGFR within cells was associated with a significantly improved progression-free survival (PFS) and a trend for overall survival (OS). Twelve patients demonstrated C-kit immunoreactivity; the lack of C-kit immunoreactivity was significantly associated with superior PFS but not OS. Her2/neu immunoreactivity was uniformly negative for all tumors evaluated. There was no association between response and biomarker status.

**CONCLUSIONS:** High EGFR immunoreactivity is seen in more aggressive thymic neoplasms as classified according to the 2004 WHO, but regardless of classification, the presence of EGFR in tumor cells (1+, 2+, and 3+) is associated with improved performance free survival (PFS) and a trend for better OS. In contrast, the absence of C-kit immunoreactivity was associated with improved PFS. These data suggest that EGFR and C-kit may be prognostic, and further studies of these markers in subcategories of thymic malignancies is warranted.

**Immunocromatografia dei recettori della crescita epidermale, c-kit, e Her2/neu in neoplasie avanzate del timo o recidivanti epiteliali secondo la World Health Organization 2004 in pazienti trattati con octreotide e prednisone: uno studio dell'Eastern Cooperative Oncology Group.**

**BACKGROUND:** Nei tumori epiteliali timici non asportabili, avanzati o ricorrenti si può visualizzare solo una modesta risposta alla chemioterapia standard. La Eastern Cooperative Oncology Group E1C97 ha recentemente condotto uno studio con octreotide e prednisone nei tumori del timo per verificare l'attività di octreotide. Lo scopo di questo studio era di determinare se recettore del fattore di crescita epidermico (EGFR) aveva una immuno-reattività correlata con i risultati per individuare nuovi marcatori biologici per il potenziale di una terapia mirata. Tre

marcatori, EGFR, c-kit, e Her2/neu, sono stati selezionati per la valutazione nei pazienti con tumori epiteliali timici trattati su E1C97.

**METODI:** Dei 42 pazienti inseriti sulla E1C97, 34 pazienti (Organizzazione mondiale della sanità [Oms] categorie: tipo A = 1, tipo AB = 1, tipo = 10 B1, B2 tipo = 11 di tipo B3 = 8, e il tipo C = 3 ) avevano tessuto sufficiente a disposizione per lo studio immunohistologico. Ogni tumore è stato valutato pari a 0, 1 +, 2 + o 3 + immunoreattività nel citoplasma o nelle membrane di cellule neoplastiche per Her2/neu e EGFR e per la presenza o l'assenza di immunoreattività C-kit.

**RISULTATI:**L' immunoreattività di EGFR di 2 + o 3 + è stata associata con i tumori più aggressivi del timo (OMS tipi B2 e B3). Tuttavia, l'immunoreattività EGFR forte non è stata sempre vista come carcinoma timico. La presenza di EGFR all'interno delle cellule è stata associata con una sopravvivenza significativamente migliorata libera da progressione (PFS) e a un trend di sopravvivenza globale (OS). Dodici pazienti hanno dimostrato immunoreattività di c-kit, la mancanza di immunoreattività C-kit era significativamente associata alla sopravvivenza libera da progressione superiore, ma non dal sistema operativo. Immunoreattività Her2/neu era uniformemente negativa per tutti i tumori valutati. Non c'è stata associazione tra la risposta e lo stato del biomarker.

**CONCLUSIONI:** Un'alta immunoreattività EGFR è vista nei tumori timici più aggressivi come classificati in base all'OMS del 2004 ma indipendentemente dalla loro classificazione, si associa la presenza di EGFR nelle cellule tumorali (1 +, 2 + e 3 +) con migliori performance di sopravvivenza libera da (PFS) e una tendenza per una migliore OS. Al contrario, l'assenza di immunoreattività c-Kit è stata associata con una migliore sopravvivenza libera da progressione. Questi dati suggeriscono che l'EGFR e di c-kit può essere prognostico, e ulteriori studi di questi marcatori in sottocategorie di tumori maligni del timo è giustificata.

67: Hisanaga T, Shinjo T, Morita T, Nakajima N, Ikenaga M, Tanimizu M, Kizawa Y, Maeno T, Shima Y, Hyodo I.

**Multicenter prospective study on efficacy and safety of octreotide for inoperable malignant bowel obstruction.**

Jpn J Clin Oncol. 2010 Aug;40(8):739-45. Epub 2010 Apr 21. PubMed PMID: 20410056.

**Abstract**

**OBJECTIVE:** The aim of this study was to evaluate the efficacy and safety of octreotide for malignant bowel obstruction in a multicenter study.

**METHODS:** Terminally ill patients diagnosed with inoperable malignant bowel obstruction were treated with octreotide 300 microg/day. The primary endpoint was the overall improvement rate of subjective abdominal symptoms. The degrees of nausea, vomiting, abdominal pain, distension, anorexia, fatigue, thirst and overall quality of life were evaluated by the self-rating scores selected from the MD Anderson Symptoms Inventory and Kurihara's Face Scale.

**RESULTS:** Forty-nine patients were enrolled in the study, and 46 patients received study treatment, including 17 gastric, 13 colorectal, 7 ovarian and other cancers. The median survival time was 25 days. The number of vomiting episodes significantly correlated with the MD Anderson Symptoms Inventory nausea and vomiting scores ( $P < 0.001$ ) before octreotide treatment. Of 43 patients evaluable for efficacy, the scores of all the MD Anderson Symptoms Inventory items except abdominal pain and the number of vomiting episodes improved during the first 4 days of octreotide treatment ( $P < 0.0062$ ). The MD Anderson Symptoms Inventory scores were decreased in 59-72% of patients, and overall quality-of-life scores improved in 56% of patients. No serious adverse events were observed.

**CONCLUSIONS:** The high improvement rate in abdominal symptoms suggested the efficacy of octreotide in terminally ill patients with malignant bowel obstruction.

**Studio prospettico multicentrico sulla efficacia e la sicurezza dell'octreotide per occlusione intestinale maligna inoperabile.**

**OBIETTIVO:** Lo scopo di questo studio era di valutare l'efficacia e la sicurezza dell' octreotide per occlusione intestinale maligna in uno studio multicentrico.

**METODI:** malati terminali con diagnosi di occlusione intestinale maligna inoperabile sono stati trattati con octreotide 300 microg / die. L'endpoint primario era il tasso complessivo di miglioramento della sintomatologia soggettiva addominale. I gradi di nausea, vomito, dolore addominale, distensione, anoressia, stanchezza, la sete e la qualità complessiva della vita sono stati valutati attraverso punteggi di auto-valutazione selezionati dal MD Anderson Sintomi Inventario e Kurihara's Face Scale.

**RISULTATI:** Quarantanove pazienti sono stati arruolati nello studio, e 46 pazienti hanno ricevuto il trattamento in studio, tra cui 17 gastrico, 13 colon-retto, 7 tipi di cancro ovarico e di altro tipo. La sopravvivenza mediana è stata di 25 giorni. Il numero di episodi di vomito hanno avuto una correlazione significativa con l'MD Anderson nausea Sintomi portando valutazione ( $P < 0,001$ ) prima del trattamento con octreotide. Dei 43 pazienti valutabili per l'efficacia, i punteggi di tutti gli MD Anderson Sintomi, tranne il dolore addominale e il numero di episodi di vomito, sono migliorati durante i primi 4 giorni di trattamento con octreotide ( $P < 0,0$  mila sessantadue). I

punteggi dei sintomi dell'MD Anderson erano diminuiti in 59-72% dei pazienti, e in generale i punteggi di qualità della vita erano migliorati nel 56% dei pazienti. Non sono stati osservati gravi eventi avversi.

**CONCLUSIONI:** L'elevato tasso di miglioramento dei sintomi addominali suggerisce l'efficacia dell' octreotide in pazienti in fase terminale con occlusione intestinale maligna.

71: Villaume K, Blanc M, Gouysse G, Walter T, Couderc C, Nejjar M, Vercherat C, Cordier-Bussat M, Roche C, Scoazec JY.

**VEGF secretion by neuroendocrine tumor cells is inhibited by octreotide and by inhibitors of the PI3K/AKT/mTOR pathway.**

Neuroendocrinology. 2010;91(3):268-78. Epub 2010 Apr 13. PubMed PMID: 20389030.

Gastroenteropancreatic (GEP) endocrine tumors are hypervascular tumors able to synthesize and secrete high amounts of VEGF. We aimed to study the regulation of VEGF production in GEP endocrine tumors and to test whether some of the drugs currently used in their treatment, such as somatostatin analogues and mTOR inhibitors, may interfere with VEGF secretion. We therefore analyzed the effects of the somatostatin analogue octreotide, the mTOR inhibitor rapamycin, the PI3K inhibitor LY294002, the MEK1 inhibitor PD98059 and the p38 inhibitor SB203850 on VEGF secretion, assessed by ELISA and Western blotting, in three murine endocrine cell lines, STC-1, INS-r3 and INS-r9. Octreotide and rapamycin induced a significant decrease in VEGF production by all three cell lines; LY294002 significantly inhibited VEGF production by STC-1 and INS-r3 only. We detected no effect of PD98059 whereas SB203850 significantly inhibited VEGF secretion in INS-r3 and INS-r9 cells only. By Western blotting analysis, we observed decreased intracellular levels of VEGF and HIF-1 $\alpha$  under octreotide, rapamycin and LY294002. For rapamycin and LY294002, this effect was likely mediated by the inhibition of the mTOR/HIF-1/VEGF pathway. In addition to its well-known anti-secretory effects, octreotide may also act through the inhibition of the PI3K/Akt pathway, as suggested by the decrease in Akt phosphorylation detected in all three cell lines. In conclusion, our study points out to the complex regulation of VEGF synthesis and secretion in neoplastic GEP endocrine cells and suggests that the inhibition of VEGF production by octreotide and rapamycin may contribute to their therapeutic effects.

Villaume K, Blanc M, Gouysse G, Walter T, Couderc C, Nejjar M, Vercherat C, Cordier-Bussat M, Roche C, Scoazec JY.

**La secrezione di VEGF nelle cellule tumorali neuroendocrine è inibita dall'octreotide e dagli inibitori della via di segnale PI3K/AKT/mTOR**

I tumori endocrine gastroenteropancreatici sono tumori ipervascolarizzati capaci di sintetizzare e secernere alti livelli di VEGF. Il nostro scopo è quello di studiare nei tumori endocrini GEP la regolazione della produzione di VEGF e testare alcuni farmaci usati correntemente nel trattamento, come gli analoghi della somatostatina e gli inibitori di mTOR, che possono interferire con la secrezione di VEGF. Abbiamo analizzato gli effetti dell'octreotide, analogo della somatostatina, della rapamicina, inibitore di mTOR, di LY294002, l'inibitore di PI3K, di PD98059, inibitore di MEK1 e di SB203850, inibitore di p38 sulla secrezione di VEGF, tramite i test ELISA e Western blot, in tre linee cellulari murine, STC-1, INS-r3 e INS-r9. L'octreotide e la rapamicina inducono una diminuzione nella produzione di VEGF in tutte e tre le linee cellulari; LY294002 inibisce la produzione di VEGF nelle linee STC-1 e INS-r3. Non abbiamo osservato nessun cambiamento dovuto a PD98059 mentre SB203850 inibisce la secrezione di VEGF nelle cellule INS-r3 e INS-r9. Tramite il Western blot, abbiamo osservato livelli intracellulari diminuiti di VEGF e HIF-1 $\alpha$  dovuti all'octreotide, alla rapamicina e a LY294002. Per la rapamicina e LY294002, questo effetto è mediato dall'inibizione della via di segnale mTOR/HIF-1/VEGF. In aggiunta agli effetti anti-secretori già noti, l'octreotide può agire tramite l'inibizione della via PI3K/Akt, come suggerito dalla diminuzione della fosforilazione di Akt osservata in tutte e tre le linee cellulari. In conclusione, i nostri studi, sottolineando la complessa regolazione della sintesi di VEGF nelle

cellule endocrine neoplastiche GEP, hanno mostrato che l'inibizione nella produzione di VEGF tramite l'octreotide e la rapamicina può essere di aiuto nel trattamento terapeutico.

82: Oberg K.

**Cancer: antitumor effects of octreotide LAR, a somatostatin analog.**

Nat Rev Endocrinol. 2010 Apr;6(4):188-9. PubMed PMID: 20336162.

Treatment of nonfunctioning neuroendocrine tumors with somatostatin analogs has been controversial, given the low antitumor effects of these drugs. The ProMid study group now reports that octreotide lar (long-acting release) has a substantial antitumor effect, with longer progression-free survival compared with placebo in patients with well-differentiated neuroendocrine tumors and low tumor burden.

Oberg K.

**Cancro: effetti antitumorali dell'octreotide LAR, un analogo della somatostatina.**

Nei tumori neuroendocrini il trattamento con gli analoghi della somatostatina è controverso, considerato il basso effetto antitumorale di questi farmaci. Lo studio ProMid ha riportato che l'octreotide lar (a rilascio prolungato) nei pazienti con tumori neuroendocrini ben differenziati e nei tumori meno severi ha un effetto antitumorale sostanziale, con una sopravvivenza in assenza di progressione di malattia elevata se confrontata con il placebo.

93: Caroli A, Antiga L, Cafaro M, Fasolini G, Remuzzi A, Remuzzi G, Ruggenenti P.

**Reducing polycystic liver volume in ADPKD: effects of somatostatin analogue octreotide.**

Clin J Am Soc Nephrol. 2010 May;5(5):783-9. Epub 2010 Feb 25. PubMed PMID: 20185596; PubMed Central PMCID: PMC2863977.

**BACKGROUND AND OBJECTIVES:** No medical treatment is available for polycystic liver disease, a frequent manifestation of autosomal-dominant polycystic kidney disease (ADPKD). In a prospective, randomized, double-blind, crossover study, 6 months of octreotide (40 mg every 28 days) therapy limited kidney volume growth more effectively than placebo in 12 patients with ADPKD.

**DESIGN, SETTING, PARTICIPANTS, & MEASUREMENTS:** In this secondary, post hoc analysis of the above study, octreotide-induced changes in liver volumes compared with placebo and the relationship between concomitant changes in liver and kidney volumes were evaluated. Those analyzing liver and kidney volumes were blinded to treatment.

**RESULTS:** Liver volumes significantly decreased from 1595 +/- 478 ml to 1524 +/- 453 ml with octreotide whereas they did not appreciably change with placebo. Changes in liver volumes were significantly different between the two treatment periods (-71 +/- 57 ml versus +14 +/- 85 ml). Octreotide-induced liver volume reduction was fully explained by a reduction in parenchyma volume from 1506 +/- 431 ml to 1432 +/- 403 ml. Changes in liver volumes were significantly correlated with concomitant changes in kidney volumes ( $r = 0.67$ ) during octreotide but not during placebo treatment. Liver and kidney volume changes significantly differed with both treatments (octreotide: -71 +/- 57 ml versus +71 +/- 107; placebo: +14 +/- 85 ml versus +162 +/- 114), but net reductions in liver (-85 +/- 103 ml) and kidney (-91 +/- 125 ml) volume growth on octreotide versus placebo were similar.

Caroli A, Antiga L, Cafaro M, Fasolini G, Remuzzi A, Remuzzi G, Ruggenenti P.

**Riduzione del volume del fegato policistico in ADPKD: effetti dell'octreotide, analogo della somatostatina.**

**BACKGROUND AND OBJECTIVES:** Nel caso della patologia del fegato policistico, che è una manifestazione frequente nella patologia renale policistica autosmica-dominante (ADPKD), non è disponibile nessun trattamento terapeutico. In uno studio prospettivo, randomizzato, in doppio cieco, crociato effettuato su 12 pazienti con ADPKD, la terapia di 6 mesi con octreotide (40 mg ogni 28 giorni) diminuisce il volume del rene più del placebo.

**DESIGN, SETTING, PARTICIPANTS, & MEASUREMENTS:** Nell'analisi secondaria dello studio precedente sono stati valutati i cambiamenti nel volume del fegato indotti dall'octreotide confrontati al placebo e la relazione tra i cambiamenti concomitanti nel volume del fegato e del rene.

**RISULTATI:** Il volume del fegato è diminuito da 1595 +/- 478 ml a 1524 +/- 453 con l'octreotide mentre non sono stati apprezzati cambiamenti con il placebo. I cambiamenti nel volume del fegato erano diversi tra i due trattamenti (-71 +/- 57 ml versus +14 +/- 85 ml). La riduzione del volume del fegato indotta dall'octreotide si spiega dalla riduzione del volume del parenchima da 1506 +/- 431 m a 1432 +/- 403 ml. Durante l'assunzione di octreotide i cambiamenti nel volume del fegato sono correlati con cambiamenti concomitanti nel volume del rene ( $r = 0.67$ ) ma non durante l'assunzione del placebo. I cambiamenti nel volume del fegato e del rene differivano significativamente in base ai due trattamenti (octreotide: -71 +/- 57 ml versus +71 +/- 107; placebo: +14 +/- 85 ml versus +162

+/- 114), ma le riduzioni nette nel volume del fegato (-85 +/- 103 ml) e del rene (-91 +/- 125 ml) dovute all'octreotide e al placebo erano simili.

97: Heston TF, Wahl RL.

### **Molecular imaging in thyroid cancer.**

Cancer Imaging. 2010 Jan 20;10(1):1-7. Review. PubMed PMID: 20159663.

Molecular imaging plays an important role in the evaluation and management of thyroid cancer. The routine use of thyroid scanning in all thyroid nodules is no longer recommended by many authorities. In the initial work-up of a thyroid nodule, radioiodine imaging can be particularly helpful when the thyroid stimulating hormone level is low and an autonomously functioning nodule is suspected. Radioiodine imaging can also be helpful in the 10-15% of cases for which fine-needle aspiration biopsy is indeterminate. Therapy of confirmed thyroid cancer frequently involves administration of iodine-131 after surgery to ablate remnant tissue. In the follow-up of thyroid cancer patients, increased thyroglobulin levels will often prompt the empiric administration of 131I followed by whole body radioiodine imaging in the search for recurrent or metastatic disease. 131I imaging of the whole body and blood pharmacokinetics can be used to determine if higher doses of 131I can be given in thyroid cancer. The utility of [18F]fluorodeoxyglucose (FDG) positron emission tomography (PET) is steadily increasing. FDG is primarily taken up by dedifferentiated thyroid cancer cells, which are poorly iodine avid. Thus, it is particularly helpful in the patient with an increased thyroglobulin but negative radioiodine scan. FDG PET is also useful in the patient with a neck mass but unknown primary, in patients with aggressive (dedifferentiated) thyroid cancer, and in patients with differentiated cancer where histologic transformation to dedifferentiation is suspected. In rarer types of thyroid cancer, such as medullary thyroid cancer, FDG and other tracers such as 99mTc sestamibi, [11C]methionine, [111In]octreotide, and [68Ga]somatostatin receptor binding reagents have been utilized. 124I is not widely available, but has been used for PET imaging of thyroid cancer and will likely see broader applicability due to the advantages of PET methodology.

Heston TF, Wahl RL.

### **Immagini molecolari nel cancro alla tiroide.**

Le immagini molecolari hanno un ruolo importante nella valutazione e nella gestione del tumore della tiroide. L'uso routinario dello scanning in tutti i noduli della tiroide, non è raccomandato da molti. Nell'iniziale work-up del nodulo alla tiroide, l'immagine radioiodio può essere di particolare aiuto quando i livelli dell'ormone tiroideo sono bassi e si sospetta un nodulo funzionante autonomamente. L'immagine radioiodio può essere inoltre di aiuto nel 10-15% dei casi in cui la biopsia tramite ago aspirato è risultata indeterminata. Dopo l'intervento chirurgico di ablazione del tessuto rimanente la terapia del cancro alla tiroide include la somministrazione di iodina-131. Nel follow-up di pazienti con tumore alla tiroide, livelli aumentati di tireoglobuline hanno suggerito la somministrazione empirica di 131I seguita dall'immagine radioiodio total body per la ricerca di metastasi o recidive. L'immagine 131I total body e la farmacocinetica possono essere usati per determinare se, nel cancro alla tiroide, possono essere utilizzate alte dosi di 131I. L'uso di [18F]fluorodeoxyglucose (FDG) positron emission tomography (PET) è aumentato. E' particolarmente utile nei pazienti che presentano una massa a livello del collo ancora sconosciuta, nei pazienti con un tumore alla tiroide aggressivo, e nei pazienti con tumore differenziato dove si sospetta una trasformazione istologica verso la dedifferenziazione. Nei tipi rari di cancro alla tiroide, come il cancro alla tiroide midollare, FDG e altre tracce come 99mTc sestamibi, [11C]methionine, [111In]octreotide, and [68Ga] sono stati utilizzati reagenti che si legano al recettore della somatostatina. 124I non è disponibile, ma nel tumore alla tiroide è stato usato per immagini PET e potrà essere applicato a causa dei vantaggi della metodologia PET.

102: Heute D, Kostron H, von Guggenberg E, Ingorokva S, Gabriel M, Dobrozemsky G, Stockhammer G, Virgolini IJ.

### **Response of recurrent high-grade glioma to treatment with (90)Y-DOTATOC.**

J Nucl Med. 2010 Mar;51(3):397-400. Epub 2010 Feb 11. PubMed PMID: 20150267.

The treatment of patients with high-grade malignant glioma still represents an unsolved clinical problem. We report the treatment of 3 patients who had World Health Organization grade IV recurrent glioblastoma: a 23-y-old woman and 2 men aged 61 and 62 y.

**METHODS:** All 3 patients were treated with the somatostatin receptor radiopharmaceutical (90)Y-labeled [1,4,7,10-tetraazacyclododecane-N,N',N'',N'''-tetraacetic acid(0)-d-Phe(1),Tyr(3)]octreotide (DOTATOC). A cumulated dose of 1.7-2.2 GBq given in 3 or 4 cycles was locally injected into a previously implanted catheter system.

**RESULTS:** Treatment was successful in all 3 patients, with only minor side effects reported. After treatment, MRI and PET showed complete remission in one patient and partial remission in the other patients. These findings correlated well with clinical improvement and improved quality of life.

**CONCLUSION:** Receptor-mediated radionuclide therapy by locally injected (90)Y-DOTATOC is feasible and well tolerated. This approach represents an attractive strategy for the treatment of locally recurring or progressing glioblastoma.

Heute D, Kostron H, von Guggenberg E, Ingorokva S, Gabriel M, Dobrozemsky G, Stockhammer G, Virgolini IJ.

### **Risposte del glioma ad alto grado ricorrente al trattamento con (90)Y-DOTATOC.**

Il trattamento dei pazienti con un glioma di alto grado rappresenta un problema ancora da risolvere. Abbiamo riportato il trattamento di 3 pazienti affetti da glioblastoma ricorrente di IV grado: una donna di 23 anni e 2 uomini di 61 e 62 anni.

**METODI:** Tutti e tre i pazienti sono stati trattati con octreotide (90)Y-labeled [1,4,7,10-tetraazacyclododecane-N,N',N'',N'''-tetraacetic acid(0)-d-Phe(1),Tyr(3)]octreotide (DOTATOC). Una dose di 1.7-2.2 GBq data in 3 o 4 cicli è stata iniettata localmente tramite un catetere impiantato precedentemente.

**RISULTATI:** Il trattamento è stato un successo in tutti e tre i pazienti, con effetti collaterali di lieve entità. Dopo il trattamento, la MRI e la PET hanno mostrato una remissione completa in un paziente e una remissione parziale negli altri due pazienti. Queste scoperte correlano con il miglioramento clinico e della qualità di vita.

**CONCLUSIONI:** La terapia radionuclide mediata dal recettore tramite iniezioni di (90)Y-DOTATOC è possibile e ben tollerata. Questo approccio rappresenta una strategia attraente per il trattamento del glioblastoma ricorrente o in progressione.

105: Martinez-Alonso M, Llecha N, Mayorga ME, Sorolla A, Dolcet X, Sanmartin V, Abal L, Casanova JM, Baradad M, Yeramian A, Egido R, Puig S, Vilella R, Matias-Guiu X, Marti RM.

**Expression of somatostatin receptors in human melanoma cell lines: effect of two different somatostatin analogues, octreotide and SOM230, on cell proliferation.**

J Int Med Res. 2009 Nov-Dec;37(6):1813-22. PubMed PMID: 20146879.

Somatostatin analogues (SAs) are potential anticancer agents. This study was designed to investigate the expression of somatostatin receptors (SSTRs) in melanoma cells and the effect of two SAs on cell proliferation and viability. Eighteen primary and metastatic human cutaneous melanoma cell lines were treated with octreotide and SOM230. Expression of SSTR1, SSTR2, SSTR3 and SSTR5 was assessed by real-time polymerase chain reaction. Proliferation, viability and cell death were assessed using standard assays. Inhibition was modelled by mixed-effect regression. Melanoma cells expressed one or more SSTR. Both SAs inhibited proliferation of most melanoma cell lines, but inhibition was < 50%. Neither SA affected cell viability or induced cell death. The results suggest that melanoma cell lines express SSTRs. The SAs investigated, under the conditions used in this study, did not, however, significantly inhibit melanoma growth or induce cell death. Novel SAs, combination therapy with SAs and their anti-angiogenic properties should be further investigated.

Martinez-Alonso M, Llecha N, Mayorga ME, Sorolla A, Dolcet X, Sanmartin V, Abal L, Casanova JM, Baradad M, Yeramian A, Egido R, Puig S, Vilella R, Matias-Guiu X, Marti RM.

**Espressione dei recettori della somatostatina in linee cellulari di melanoma umano: effetti di due differenti analoghi della somatostatina, l'octreotide e SOM230, sulla proliferazione cellulare.**

Gli analoghi della somatostatina (SAs) sono potenziali agenti antitumorali. Questo studio è stato studiato per investigare l'espressione dei recettori della somatostatina (SSTRs) nelle cellule di melanoma e gli effetti di due SAs sulla proliferazione e sulla vitalità cellulare. 18 linee cellulari di melanoma cutaneo umano primario e metastatico sono state trattate con octreotide e SOM230. L'espressione di SSTR1, SSTR2, SSTR3 and SSTR5 è stata valutata tramite la real-time PCR. L'inibizione è stata calcolata tramite effetto di regressione. Le cellule di melanoma esprimevano uno o più SSTR. I SAs inibivano la proliferazione di molte linee cellulari di melanoma, ma l'inibizione era minore al 50%. Nessuno dei SAs influenzava la vitalità cellulare o induceva la morte cellulare. I risultati hanno mostrato che le linee cellulari di melanoma esprimevano SSTRs. I SAs studiati, nelle condizioni di questo studio, non inibiscono significativamente la crescita del melanoma o la morte cellulare, ma dovrebbe essere studiati nuovi SAs, una terapia combinata con SAs e le loro proprietà anti-angiogeniche.

107: Steffen IG, Mehl S, Heuck F, Elgeti F, Furth C, Amthauer H, Ruf J.

**Attenuation correction of somatostatin receptor SPECT by integrated low-dose CT: is there an impact on sensitivity?**

Clin Nucl Med. 2009 Dec;34(12):869-73. PubMed PMID: 20139819.

**AIM:** Somatostatin receptor scintigraphy (SRS) is an established imaging modality for neuroendocrine tumors (NET). Additional single photon emission computed tomography (SPECT-CT) not only permits image fusion but also attenuation correction (AC) of SPECT data. This study evaluated whether attenuation corrected SPECT-images (SPECT[AC]) are more sensitive than nonattenuation corrected SPECT-reconstructions (SPECT[NAC]) for the detection of NET lesions.

**METHODS:** The imaging data (planar In-111-octreotide scintigraphy and SPECT-CT) of 50 consecutive patients (28 male; 22 female; age, 34-80; mean, 65 years) with NET were included in this retrospective analysis. SPECT data were reconstructed with and without integrated CT-based AC and then analyzed by 2 experienced readers for the presence of pathologic uptake in a blinded consensus reading. Fused SPECT-CT, contemporary CT/MRI, and clinical as well as imaging follow-up served as a reference standard. All foci were rated in both the SPECT(NAC)- and SPECT(AC)-reconstructions for intensity and contrast using a 6-point-score ("0 = no uptake/no delineation from surrounding tissue" to "5 = very high uptake/very strong delineation from surrounding tissue"). The scores were analyzed in a 6 x 6 contingency table using the McNemar Bowker test.

**RESULTS:** A total of 222 pathologic foci were detected by SPECT(NAC) and 227 foci by SPECT(AC), respectively. In 67 of 227 foci (29.5%), focus intensity/contrast increased after AC, whereas only 5 foci showed a decrease ( $P < 0.001$ ). Sensitivity increased by 2.2% ( $P = 0.025$ ; 95% CI: 0.02%-4.1%) as 5 foci were detected only by SPECT(AC). However, as these 3 patients were already diagnosed with systemic disease, there was no influence on the therapeutic strategy chosen.

**CONCLUSION:** Attenuation correction of somatostatin receptor scintigraphy-SPECT significantly improves focus visualization and, albeit slightly, also significantly increases sensitivity.

**SCOPO:** La scintigrafia del recettore della somatostatina è una tecnica utilizzata nei tumori neuroendocrini (NET). La tomografia compiuta ad emissione di un singolo fotone (SPECT-CT) non permette solo un'immagine di fusione ma anche di correzione di attenuazione (AC) dei dati SPECT. Questo studio valuta se l'attenuazione corretta con immagini SPECT (SPECT[AC]) è più sensibile della non attenuazione delle ricostruzioni corrette SPECT (SPECT[NAC]) per il rilevamento delle lesioni nei casi di NET.

**METODI:** I dati dell'immagine (planar In-111-octreotide scintigraphy and SPECT-CT) di 50 pazienti (28 maschi, 22 femmine, età 34-80 media 65 anni) con NET sono stati inclusi in questo studio. I dati SPECT sono stati ricostruiti con e senza AC CT-based integrato e analizzati da 2 lettori esperti nella individuazione della consistenza della lesione in cieco. SPECT-CT, CT/MRI, e la clinica come le immagini sono servite come standard di riferimento. Tutti i foci sono stati valutati in entrambe le SPECT(NAC)- and SPECT(AC)-reconstructions per intensità e contrasto usando 6-point-score. I risultati sono stati analizzati in una tabella di contingenza 6 x 6 usando il test McNemar Bowker.

**RISULTATI:** Un totale di 222 foci patologici sono stati valutati tramite SPECT(NAC) e 227 tramite SPECT(AC). In 67 dei 227 foci (29.5%), l'intensità/contrasto del focus aumenta dopo AC, mentre solo in 5 foci è stata mostrata una diminuzione ( $P < 0.001$ ). La sensibilità aumenta del 2.2% ( $P = 0.025$ ; 95% CI: 0.02%-4.1%) se i 5 foci sono valutati solo con SPECT(AC). Tuttavia, siccome

in questi 3 pazienti era stata fatta una diagnosi di malattia sistemica, non vi sono influenze sulla strategia terapeutica effettuata.

**CONCLUSIONI:** La correzione attenuativa della scintigrafia-SPECT del recettore della somatostatina migliora la visualizzazione del focus e aumenta significativamente la sensibilità.

119:Nguyen HD, Galitz MS, Mai VQ, Clyde PW, Glister BC, Shakir MK.

### **Management of coexisting thyrotropin/growth-hormone-secreting pituitary adenoma and papillary thyroid carcinoma: a therapeutic challenge.**

Thyroid. 2010 Jan;20(1):99-103.PubMed PMID: 20067380.

**BACKGROUND:** A thyrotropin (TSH)-secreting pituitary adenoma coexisting with differentiated thyroid carcinoma is rare. There have been only four previously reported cases; three were treated with thyroidectomy followed by pituitary resection and one was treated with thyroidectomy alone.

**METHODS:** We hereby report the fifth case, in which a patient presented with a TSH/growth-hormone-secreting pituitary macroadenoma coexisting with papillary thyroid carcinoma (PTC).

**RESULTS:** She underwent biochemical testing, ophthalmologic examination, thyroid ultrasonography, Tc-99m-pertechnetate thyroid scan, whole-body positron emission tomography, (111)In-octreotide scan, thyroid fine-needle aspiration biopsy, octreotide treatment, total thyroidectomy, recombinant human TSH radioactive iodine remnant ablation, and continued treatment with octreotide and levothyroxine after thyroidectomy. She has remained asymptomatic for 24 months without biochemical or radiological evidence of pituitary hormone oversecretion, pituitary adenoma enlargement, and PTC recurrence.

**CONCLUSION:** To our knowledge, this is the first case of a TSH/growth-hormone-secreting pituitary macroadenoma coexisting with PTC being successfully treated with octreotide and levothyroxine after thyroidectomy and recombinant human TSH-stimulated radioactive iodine remnant ablation.

### **Gestione di Adenoma ipofisario secernente ormone della crescita/tireotropina e di cacinoma papillare della tiroide: una sfida terapeutica**

**BACKGROUND:** La coesistenza dell' adenoma pituitario tireotropina (TSH) secernente con il carcinoma differenziato della tiroide è rara. Ci sono stati solo quattro casi precedentemente segnalati, tre sono stati trattati con tiroidectomia seguita da resezione pituitaria e uno è stato trattato solo con tiroidectomia.

**METODI:** Con la presente relazione il quinto caso, in cui un paziente presentava macroadenoma ipofisario secernente TSH, coesisteva con carcinoma papillare della tiroide (PTC).

**RISULTATI:**La paziente ha subito:

test biochimici, l'esame oftalmologico, ecografia tiroidea, scansione della tiroide Tc-99m-pertechnetato, tomografia ad emissione di positroni, (111) scansione con octreotide, ago aspirato della tiroide, trattamento con octreotide, tiroidectomia totale, ricombinante TSH umano radioattivo residuo ablazione iodio, e la continuazione del trattamento con octreotide e levotiroxina dopo tiroidectomia. La paziente è rimasta asintomatica per 24 mesi senza evidenza radiologica di ipersecrezione di ormone ipofisario, l'allargamento adenoma pituitario, e la reiterazione PTC.

**CONCLUSIONE:** A nostra conoscenza, questo è il primo caso di adenoma ipofisario secernente ormone della crescita/tireotropina che coesiste con PTC a essere trattati con successo con octreotide e levotiroxina dopo tiroidectomia e ablazione del TSH umano ricombinante-iodio radioattivo residuo stimolato.

122: Prete SD, Montella L, Caraglia M, Maiorino L, Cennamo G, Montesarchio V, Piai G, Febbraro A, Tarantino L, Capasso E, Palmieri G, Guarrasi R, Bianco M, Mamone R, Savastano C, Pisano A, Vincenzi B, Sabia A, D'Agostino A, Faiola V, Addeo R.

**Sorafenib plus octreotide is an effective and safe treatment in advanced hepatocellular carcinoma: multicenter phase II So.LAR. study.**

Cancer ChemotherPharmacol. 2010 Oct;66(5):837-44. Epub 2009 Dec 30. PubMed PMID: 20041325.

**PURPOSE:** Advanced hepatocellular carcinoma (HCC) not eligible for local therapies has limited chances of cure. Sorafenib is a multikinase inhibitor with proven activity in advanced HCC. Octreotide is used in this setting with conflicting results. Treatment with sorafenib and long-acting octreotide was tested in advanced HCC to evaluate safety and activity.

**METHODS:** Fifty patients with advanced HCC, Child-Pugh A or B, received sorafenib at a dosage of 800 mg/day for 28 days with a following week of rest and long-acting octreotide at a dose of 40 mg, administered every 28 days.

**RESULTS:** All patients were assessable for safety and efficacy. Sixteen patients out of 50 (34%) were naïve from other therapies, while all the others were previously treated with local and/or systemic treatments. We achieved 5 partial responses (10%), 33 stable diseases (66%) and 12 progressions of disease (24%). Median time to progression was 7.0 months (95% CI, 3.0-10.9 months), and median overall survival was 12 months (95% CI, 6.3-17.4 months). Treatment was well tolerated. Diarrhoea (6%) and hypertension (4%) were the most frequent grade 3 toxicities.

**CONCLUSIONS:** Our data suggest that the combination between sorafenib and long-acting octreotide is active and well tolerated in patients with advanced HCC and could represent another efficacious chance for the management of this population.

**Octreotide Sorafenib plus è un trattamento efficace e sicuro nel carcinoma epatocellulare avanzato: studio multicentrico di fase II So.LAR.**

**SCOPO:** Pazienti affetti da carcinoma epatocellulare (HCC) avanzato non possono beneficiare di terapie locali, e questo ha limitato le possibilità di cura. Sorafenib è un inibitore della chinasi con attività dimostrata in carcinoma epatico avanzato. Octreotide è utilizzato in questa impostazione, con risultati contrastanti. Il trattamento con sorafenib e octreotide a lunga azione è stato testato in carcinoma epatico avanzato per valutare la sicurezza e l'attività.

**METODI:** Cinquanta pazienti con carcinoma epatocellulare avanzato, di Child-Pugh A o B, hanno ricevuto sorafenib alla dose di 800 mg / die per 28 giorni con una settimana di riposo e di seguito octreotide a lunga azione alla dose di 40 mg, somministrato ogni 28 giorni .

**RISULTATI:** Tutti i pazienti erano valutabili per la sicurezza ed efficacia. Sedici pazienti su 50 (34%) non sono stati trattati con altre terapie, mentre tutti gli altri sono stati precedentemente trattati con locali e / o sistemici. Abbiamo ottenuto 5 risposte parziali (10%), 33 malattie stabile (66%) e 12 progressioni di malattia (24%). Il tempo mediano alla progressione è stato di 7,0 mesi (95% CI, 3,0-10,9 mesi), e la sopravvivenza globale mediana è stata di 12 mesi (95% CI, 6,3-17,4 mesi). Il

trattamento è stato ben tollerato. Diarrea (6%) ed ipertensione (4%) sono la più frequente tossicità di grado 3.

**CONCLUSIONI:** I nostri dati suggeriscono che la combinazione tra sorafenib e octreotide a lunga azione è attivo e ben tollerato nei pazienti con carcinoma epatico avanzato e potrebbe rappresentare un'altra occasione efficace per la gestione di questa popolazione.

123:Yoshioka S, Tsujie M, Ebisui C, Okubo K, Akitake H, Otsuka M, Maekawa T, Hama N, Kashiwazaki M, Taniguchi M, Konishi M, Fujimoto T.

**[A case of successful treatment using octreotide acetate for occlusive ileus in terminal stage cancer].**

[Article in Japanese]

Gan To Kagaku Ryoho. 2009 Nov;36(12):2266-8. Japanese. PubMed PMID: 20037391.

We report a 35-year-old female bearing ovarian cancer who was suffering from intestinal obstruction due to multiple recurrences. The treatment of 300 microg/day of octreotide acetate was started. The symptom of obstruction, such as vomiting and nausea, caused by intestinal obstruction was suddenly controlled and the quality of life was improved. Octreotide acetate can be applied for the management of intestinal obstruction caused by metastases at the terminal stage of cancer.

**Un caso di successo del trattamento con octreotide acetato per ileo occlusivi in fase terminale di cancro.**

Segnaliamo un tumore ovarico in paziente di 35 anni femmina che soffriva di occlusione intestinale a causa di recidive multiple. E' stato avviato Il trattamento di 300 microg / die di acetato di octreotide. Il sintomo di ostruzione, quali vomito e nausea, causato da ostruzione intestinale è stato improvvisamente controllato e la qualità della vita è migliorata. Acetato di octreotide può essere applicato per la gestione di ostruzione intestinale causata da metastasi allo stadio terminale di cancro.

132: Bornschein J, Drozdov I, Malfertheiner P.

### **Octreotide LAR: safety and tolerability issues.**

Expert Opin Drug Saf. 2009 Nov;8(6):755-68. Review. PubMed PMID: 19998528.

**BACKGROUND:** Somatostatin analogues are the cornerstone in therapy of acromegaly and functioning neuroendocrine tumors. Long-acting retard formulations have improved patient survival and contributed considerably to quality of life. The first such compound was octreotide LAR ('long-acting release'), characterized by high affinity to somatostatin receptor subtypes 2 and 5, which has to be injected intramuscularly every 4 weeks.

**OBJECTIVE:** The aim was to screen all octreotide LAR-related literature and assess the compound's profile for safety and tolerability.

**METHODS:** An extensive literature search has been performed using the MEDLINE database to retrieve data from clinical studies evaluating the efficacy and tolerability of octreotide LAR.

**RESULTS/CONCLUSION:** Octreotide LAR is well tolerated; however, diarrhea and gallstone formation were identified as the main adverse events. Impairment of glucose homeostasis was a regular phenomenon, but its occurrence was unpredictable. General side effects such as headache, abdominal discomfort or fatigue were also reported. According to incidental case reports, administration during pregnancy appears to be safe for both mother and child; however, definitive evidence is missing. In addition, octreotide LAR has been evaluated for further indications including treatment of solid tumor entities, due to its antiproliferative effect. Currently, several compounds (lanreotide, SOM230) with a broader receptor spectrum are under evaluation and may improve treatment efficacy and lower incidence of side effects

### **Octreotide LAR: problemi di sicurezza e tollerabilità.**

**BACKGROUND:** analoghi della somatostatina sono la pietra miliare nella terapia di acromegalia e il funzionamento dei tumori neuroendocrini. Formulazioni a lunga durata d'azione hanno migliorato la sopravvivenza del paziente ed ha contribuito notevolmente alla qualità della vita. Il primo composto, è stato octreotide LAR ('rilascio lunga durata d'azione'), caratterizzato da alta affinità per i recettori per la somatostatina sottotipi 2 e 5, che deve essere iniettato per via intramuscolare ogni 4 settimane.

**OBIETTIVO:** L'obiettivo è stato quello di passare in rassegna tutta la letteratura di octreotide correlata con LAR e valutare il profilo del composto per la sicurezza e la tollerabilità.

**METODI:** E' stata effettuata una vasta ricerca di letteratura utilizzando il database MEDLINE per recuperare i dati da studi clinici che hanno valutato l'efficacia e la tollerabilità di octreotide LAR.

**RISULTATI / CONCLUSIONI:** L'octreotide LAR è ben tollerato, tuttavia, la diarrea e la formazione di calcoli biliari sono stati identificati come i principali eventi avversi. Compromissione dell'omeostasi del glucosio era un fenomeno normale, ma la sua presenza è stata imprevedibile. Sono stati anche segnalati effetti indesiderati generali quali cefalea, disturbi addominali o di affaticamento. Secondo le segnalazioni di casi accidentali, la somministrazione durante la gravidanza sembra essere sicura sia per la madre e il bambino, tuttavia, la prova definitiva è mancante. Inoltre, l'octreotide LAR è stato valutato per ulteriori indicazioni compreso il trattamento di soggetti con tumori solidi, grazie al suo effetto antiproliferativo. Attualmente, diversi composti

(lanreotide, SOM230) con uno spettro recettoriale più ampio sono in fase di valutazione e possono migliorare l'efficacia del trattamento e la più bassa incidenza di effetti collaterali.

151: Schöniger-Hekele M, Kettenbach J, Peck-Radosavljevic M, Müller C.

**Octreotide treatment of patients with hepatocellular carcinoma--a retrospective single centre controlled study.**

J Exp Clin Cancer Res. 2009 Nov 3;28:142. PubMed PMID:19887008; PubMed Central PMCID: PMC2779805.

**BACKGROUND:** Studies of treatment with octreotide of patients with hepatocellular carcinoma (HCC) gave conflicting results. We analyzed retrospectively the survival of our patients treated with octreotide monotherapy and compared it to stage-matched patients who received either TACE, multimodal therapy or palliative care.

**METHODS:** 95 patients seen at the department of Gastroenterology and Hepatology, Medical University of Vienna with HCC in BCLC stage A or B, who received either TACE, multimodal therapy, long-acting octreotide or palliative care were reviewed for this retrospective study.

**RESULTS:** Survival rates of patients with BCLC stage B and any "active" treatment (long-acting octreotide, TACE or multimodal therapy) were significantly higher (22.4, 22.0, 35.5 months) compared to patients who received palliative care only (2.9 months). Survival rates of patients with BCLC stage A and "active" treatment (31.4, 37.3, 40.2 months) compared to patients who received only palliative care (15.1 months) did not show statistically significant differences. Octreotide monotherapy showed a similar outcome compared to patients who received TACE or multimodal therapy.

**CONCLUSION:** Survival under octreotide treatment was not different compared to TACE or multimodal therapy and might be a therapeutic option for patients with HCC.

**Trattamento con octreotide di pazienti con carcinoma epatocellulare**

**BACKGROUND:** Gli studi di trattamento con octreotide dei pazienti con carcinoma epatocellulare (HCC) ha dato risultati contrastanti. Abbiamo analizzato retrospettivamente la sopravvivenza dei nostri pazienti trattati in monoterapia con octreotide e confrontata con pazienti che hanno ricevuto la terapia multimodale cure palliative.

**METODI:** 95 pazienti visitati presso il dipartimento di Gastroenterologia ed Epatologia, Università Medica di Vienna con HCC in stadio BCLC A o B, che hanno ricevuto, chemioembolizzazione epatica (TACE) o la terapia multimodale, octreotide a lunga azione o le cure palliative sono state riviste per questo studio retrospettivo.

**RISULTATI:** I tassi di sopravvivenza dei pazienti con stadio B BCLC ed eventuali trattamenti "attivi" (octreotide a lunga azione, TACE o terapia multimodale) erano significativamente più alti (22,4, 22,0, 35,5 mesi) rispetto ai pazienti che hanno ricevuto le cure palliative solo (2,9 mesi) . I tassi di sopravvivenza dei pazienti con BCLC fase A e di trattamento "attiva" (31,4, 37,3, 40,2 mesi) rispetto ai pazienti che hanno ricevuto solo delle cure palliative (15,1 mesi) non hanno mostrato differenze statisticamente significative. Octreotide monoterapia ha mostrato un risultato simile rispetto ai pazienti che hanno ricevuto la terapia TACE o multimodale.

**CONCLUSIONE:** la sopravvivenza in trattamento con octreotide non è stato diverso rispetto alla TACE o terapia multimodale e potrebbe essere una opzione terapeutica per i pazienti con HCC.

155: Sui C, Ma Q, Nan K, Xiao J, Suo A, Sha H, Zhao L.

**hSSTR2 expression and octreotide treatment reverses multidrug resistance of BxPC-3 human pancreatic cancer cells.**

Oncol Rep. 2009 Dec;22(6):1391-6. PubMed PMID: 19885591.

Pancreatic cancer is generally refractory to most chemotherapeutic agents. We investigated whether hSSTR2 expression and octreotide treatment reverse multidrug resistance of human pancreatic cancer cells. We used pancreatic cancer cells that were transfected by using a lentivirus expression system, which allowed stable expression of the hSSTR2 gene in the pancreatic cancer cells. BxPC-3 cells were transfected with hSSTR2 through a lentivirus vector pWP XL-MOD-SSTR2 in order to enable the expression of hSSTR2. The transfected cells were treated with different concentrations of octreotide and with the chemotherapeutic agents cisplatin, epirubicin, fluorouracil and gemcitabine. The changes in IC50 following treatment with chemotherapeutic agents were determined, and the expression of different MDR indicating marker genes, multidrug resistance gene-1 (MDR1), multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2), and lung resistance-related protein (LRP), were evaluated. Octreotide treatment of the transfected cells significantly decreased the IC50 of chemotherapeutic agents in a dose-dependent manner. hSSTR2 gene transfection decreased MDR1, MRP2 and LRP expression by 57, 47 and 56%, respectively ( $P < 0.01$ ), and octreotide treatment (1.6 microg/ml) for 48 h, decreased it further by 88, 73 and 87%, respectively ( $P < 0.01$ ). These data suggested that the down-regulation of MDR genes is responsible for the improvement in the chemotherapeutic sensitivity of hSSTR2-expressing pancreatic cancer cells, when these cells are subjected to octreotide treatment.

**L' espressione di hSSTR2 e il trattamento con octreotide inverte la multiresistenza ai farmaci BxPC-3 di cellule umane di cancro del pancreas.**

Il tumore al pancreas è generalmente refrattario alla maggior parte degli agenti chemioterapici. Abbiamo studiato se l' espressione hSSTR2 e il trattamento con octreotide poteva invertire la resistenza multifarmaco delle cellule umane di cancro del pancreas. Abbiamo utilizzato cellule del tumore pancreatico che sono state transfettate con un sistema di espressione lentivirus, che ha permesso l'espressione stabile del gene hSSTR2 nelle cellule tumorali del pancreas. Le cellule BxPC-3 sono state transfettate con hSSTR2 attraverso un lentivirus vettore PWP XL-MOD-SSTR2 al fine di consentire l'espressione di hSSTR2. Le cellule transfettate sono state trattate con differenti concentrazioni di octreotide e con gli agenti chemioterapici cisplatino, epirubicina, fluorouracile e gemcitabina. I cambiamenti nella IC50 in seguito a trattamento con agenti chemioterapici sono stati determinati, e l'espressione di diversi geni marcatori MDR che indicano, multidrug resistance gene-1 (MDR1), multidrug proteine associate alla resistenza 2 (MRP2), del polmone e della proteina di resistenza-correlate (LRP) , sono stati valutati. Il trattamento con octreotide delle cellule transfettate ha ridotto significativamente i valori di IC50 di agenti chemioterapici in modalità dose-dipendente. La transfezione del gene hSSTR2 ha diminuito, espressione di MDR1 MRP2 e LRP del 57, 47 e 56%, rispettivamente ( $P < 0,01$ ), e con il trattamento con octreotide (1,6 microg / ml) per 48 ore, è diminuito ulteriormente da 88, 73 e 87 %, rispettivamente ( $P < 0,01$ ). Questi dati suggeriscono che la down-regolazione dei geni MDR è responsabile per il miglioramento della sensibilità di chemioterapici nelle cellule del cancro al pancreas che esprimono hSSTR2 quando queste sono sottoposte a trattamento con octreotide

169: Nguyen-Khac E, Ollivier I, Aparicio T, Moullart V, Hugentobler A, Lebtahi R, Lobry C, Susini C, Duhamel C, Hommel S, Cadranel JF, Joly JP, Barbare JC, Tramier B, Dupas JL.

### **Somatostatin receptor scintigraphy screening in advanced hepatocarcinoma: A multi-center French study.**

Cancer Biol Ther. 2009 Nov;8(21):2040-1.

**BACKGROUND:** Somatostatin receptor scintigraphy (SRS) has been reported for receptor (SSTR) screening in advanced hepatocarcinoma (aHC) prior to somatostatin analogue treatment.

**AIMS:** To evaluate SSTR screening with SRS in aHC patients.

**RESULTS:** Seventy aHC patients (63 men) aged 65 +/- 11 y were included, with alcohol, viral or other causes cirrhosis in 35 (50%), 23 (33%), 12 (17%) cases respectively. CLIP score was 2.7 +/- 1.7, with more than three nodules in 37 (53%) cases. Largest nodule measured 7.6 +/- 4.5 cm. Median alpha-fetoprotein was 574 UI/mL. SRS was positive in 25/70 (35.7%) livers and 7/17 (41.2%) metastatic sites. Positive SRS patients differed from others for tumor size (9.2 +/- 4 vs. 6.7 +/- 4.6 cm, p = 0.03), prothrombin time (PT) (75.2 +/- 15.2 vs. 61.9 +/- 19%, p = 0.005), albumin (34.1 +/- 5.9 vs. 30.5 +/- 7.2 g/L, p = 0.04) and Child-Pugh (6.7 +/- 1.8 vs. 7.7 +/- 2.3, p = 0.04). After multivariate analysis, only PT was associated with positive SRS (p = 0.028). Immunohistochemistry was positive for SSTR2s in 6/7 tumors (SRS uptake in 5/6 cases).

**METHODS:** SRS was performed prior treatment, with images at 4, 24 and 48 h. For seven tumors, SSTR2 subtype was detected immunohistochemically.

**CONCLUSIONS:** In advanced hepatocarcinoma, we report SRS uptake in 35.7% of livers and 41.2% of metastatic sites. SRS value in screening patients for somatostatin analogue treatment remains to be assessed.

### **Scintigrafia del recettore della somatostatina screening in epatocarcinoma avanzato: uno studio multicentrico francese.**

**BACKGROUND:** è stata valutata scintigrafia del recettore della somatostatina (SRS) per il recettore (SSTR) attraverso screening in epatocarcinoma avanzato (AHC) prima del trattamento analogo della somatostatina.

**OBIETTIVI:** valutare SSTR con SRS in pazienti AHC.

**RISULTATI:** Sono stati inclusi Settanta pazienti con AHC (63 uomini) di età compresa tra 65 +/- 11, derivante da alcol in 35 casi (50%), cirrosi virale in 23 casi (33%) o altre cause in 12 casi (17%). Sono stati evidenziati più di tre noduli in 37 casi (53%). Il nodulo più grande misura 7,6 +/- 4,5 cm. Mediana di alfa-fetoproteina è 574 UI / mL. SRS è risultata positiva in 25/70 (35,7%), fegato e siti metastatici 7 / 17 (41,2%),. SRS positiva nei pazienti differiva dagli altri per le dimensioni del tumore (9.2 +/- 4 vs 6,7 +/- 4,6 cm, p = 0,03), tempo di protrombina (PT) (75.2 +/- 15,2 vs 61,9 +/- 19%, p = 0,005), l'albumina (34,1 +/- 5.9 vs 30,5 +/- 7.2 g / L, p = 0,04) e Child-Pugh (6,7 +/- 1,8 vs 7,7 +/- 2.3, p = 0,04). Dopo analisi multivariata, solo PT è stato associato con SRS positiva (p = 0,028). Immunoistochimica è stata positiva per SSTR2s in 6 / 7 tumori (captazione SRS in 5 / 6 casi).

**METODI:** E' stato eseguito un trattamento preventivo con SRS con immagini a 4, 24 e 48 h. la rivelazione è stata fatta immunoistochimicamente per sette tumori, sottotipo SSTR2.

**CONCLUSIONI:** Nell' epatocarcinoma avanzato, si segnala la captazione di SRS nel 35,7% del fegato e nel 41,2% dei siti metastatici. Il valore di SRS nello screening per il trattamento di pazienti per gli analoghi della somatostatina rimane da valutare.

174: Papacharalampous GX, Chrysovergis AI, Tsiambas E, Pappas SV, Vlastarakos PV, Vlastarakos PV, Nikolopoulos TP.

### **Laryngeal paragangliomas - controversies in diagnosis and management.**

J BUON. 2009 Jul-Sep;14(3):405-9. Review. PubMed PMID: 19810130.

Paragangliomas of the larynx are rare neuroendocrine tumors with difficulties in diagnosis and management. A review of the literature was carried out, using Medline and other available databases. Electronic links and related books were also included. The most reliable diagnostic imaging procedures are MRI, CT scan, and octreotide scintigraphy. Complete surgical excision with the maximal possible preservation of the laryngeal function is the treatment of choice. Many different surgical techniques have been reported but open surgical procedures seem to provide better results with lower recurrence rates, although endoscopic approaches and laser surgery have also been used with variable results. The use of long-acting depot octreotide has been used for the relief of symptoms and stabilization of the disease, especially in inoperable lesions with positive initial octreotide scintigraphy imaging. Detailed preoperative assessment and treatment planning in individual basis are essential in the management of these tumors.

### **Paragangliomi laringei - controversie nella diagnosi e nella gestione.**

I paragangliomi della laringe sono rari tumori neuroendocrini con difficoltà nella diagnosi e nella gestione. E' stata effettuata una revisione della letteratura, utilizzando Medline ed altri database disponibili. Sono stati inoltre inclusi i collegamenti elettronici e i libri di riferimento. Le procedure di diagnostica per immagini più affidabili sono RM, TAC e scintigrafia con octreotide. La completa escissione chirurgica con la conservazione massimo possibile della funzione laringea è il trattamento di scelta. Diverse tecniche chirurgiche sono state riportate, ma procedure chirurgiche aperte sembrano fornire risultati migliori, con tassi di recidiva inferiore, anche se gli approcci endoscopici e la chirurgia laser sono stati utilizzati anche con risultati variabili. L'uso di octreotide a lunga azione è stato usato per il sollievo dei sintomi e la stabilizzazione della malattia, soprattutto nelle lesioni non operabili con scintigrafia iniziale positiva. Una dettagliata valutazione preoperatoria e la pianificazione del trattamento in base individuale, sono indispensabili nella gestione di questi tumori.

181: Milardovic R, Corssmit EP, Stokkel M.

### **Value of 123I-MIBG Scintigraphy in Paraganglioma.**

Neuroendocrinology. 2010;91(1):94-100. Epub 2009 Sep 25. PubMed PMID: 19786729.

**AIM:** The aim of the study was to evaluate the current role of (123)I-MIBG scintigraphy in the detection and follow-up of patients with paragangliomas.

**MATERIALS AND METHODS:** 117 patients were referred for diagnostic (123)I-MIBG scintigraphy based on a strong clinical suspicion, positive familial history and genetic testing, or for follow-up of paragangliomas. (123)I-MIBG images were analyzed and correlated with (111)In-octreotide scintigraphy, CT or MRI results. Accuracy of the imaging method was calculated per patient and per tumor per site.

**RESULTS:** A total of 117 patients were referred for (123)I-MIBG diagnostic imaging; 80 patients were diagnosed with paraganglioma; 66 patients had a single neuroendocrine tumor and 14 patients multiple tumors. The total number of all lesions in these patients was 172. (123)I-MIBG scintigraphy demonstrated 65 lesions in 56 patients (overall sensitivity: 56.3%, specificity: 84%). Lesion-per-site analysis revealed that sensitivity and specificity significantly varied per tumor site (lowest sensitivity for the head and neck: 17.5% and lowest specificity for the abdomen: 87.5%). Hormones were elevated in 85 patients: 55 (123)I-MIBG tumors were positive and 35 tumors were negative. In 16 patients (13.7%) with a genetic burden and a single neuroendocrine tumor, (123)I-MIBG whole-body imaging was successful at detecting a second tumor. In 2 patients (1.7%) with paragangliomas, (123)I-MIBG unexpectedly detected metastases, so the restaging was properly done.

**CONCLUSION:** (123)I-MIBG scintigraphy remains important in pheochromocytoma and functioning neuroendocrine tumors. The value of (123)I-MIBG scintigraphy is high in familial syndromes with multiple neuroendocrine tumors at different sites, multifocal tumors, and relapsing and metastatic disease.

### **Valore della scintigrafia I-MIBG in paraganglioma**

**Scopo:** Lo scopo dello studio era di valutare il ruolo attuale della scintigrafia I-MIBG nella diagnosi e follow-up dei pazienti con paragangliomas

**MATERIALI E METODI:** 117 pazienti sono stati sottoposti a scintigrafia diagnostica con I-MIBG basato su un forte sospetto clinico, positiva storia familiare e test genetici, o per il follow-up di paraganglioma. Le immagini di I-MIBG sono state analizzate e correlate con le scintigrafie con octreotide, e con i risultati TC o RM. Accuratezza del metodo di imaging è stato calcolato per ogni paziente e per ogni sito di tumore.

**RISULTATI:** Un totale di 117 pazienti sono stati sottoposti a I-MIBG diagnostico; 80 pazienti sono stati diagnosticati con paraganglioma, 66 pazienti avevano un tumore neuroendocrino singolo e 14 pazienti con tumori multipli. Il numero totale di tutte le lesioni in questi pazienti era di 172. La scintigrafia con MIBG I-65 ha dimostrato le lesioni in 56 pazienti (sensibilità complessiva: 56,3%, specificità: 84%). Le analisi lesione-per-sito ha rivelato che la sensibilità e la specificità significativamente variata per sito del tumore (la più bassa sensibilità per la testa e il collo: 17,5% e più bassa specificità per l'addome: 87,5%). Gli ormoni sono stati elevati in 85 pazienti: 55. I-MIBG tumori erano positivi e 35 tumori erano negativi. In 16 pazienti (13,7%) con un peso genetico e di un singolo tumore neuroendocrino, I-MIBG imaging di tutto il corpo è riuscito a individuare un

secondo tumore. In 2 pazienti (1,7%) con paragangliomi, I-MIBG ha inaspettatamente rilevato metastasi, quindi la ristadiatione è stata fatta correttamente.

**CONCLUSIONE:** la scintigrafia con I-MIBG rimane importante nel feocromocitoma e nel funzionamento dei tumori neuroendocrini. Il valore della scintigrafia con I-MIBG è alta nelle sindromi familiari con più tumori neuroendocrini in sedi diverse, i tumori multifocali, recidivanti e malattia metastatica.

184: Nyuyki F, Plotkin M, Graf R, Michel R, Steffen I, Denecke T, Geworski L, Fahdt D, Brenner W, Wurm R.

### **Potential impact of (68)Ga-DOTATOC PET/CT on stereotactic radiotherapy planning of meningiomas.**

Eur J Nucl Med Mol Imaging.2010 Feb;37(2):310-8. Epub 2009 Sep 18. PubMed PMID:19763565.

**PURPOSE:** Since meningiomas show a high expression of somatostatin receptor subtype 2, PET with (68)Ga-DOTATOC was proposed as an additional imaging modality beside CT and MRI for planning radiotherapy. We investigated the impact of (68)Ga-DOTATOC-PET/CT on the definition of the "gross tumour volume" (GTV) in meningiomas, in order to assess the potential value of this method.

**METHODS:** Prior to radiotherapy, 42 patients with meningiomas (26 f, 16 m, mean age 55) underwent MRI and (68)Ga-DOTATOC-PET/CT examinations. History: operated n = 24, radiotherapy n = 1, operation and radiotherapy n = 8, no treatment n = 9. PET/CT and MRI data were co-registered using a BrainLAB workstation. For comparison, the GTV was defined first under consideration of CT and MRI data, then using PET data.

**RESULTS:** 3/42 patients were excluded from the analysis (two with negative PET results, one with an extensive tumour, not precisely delineable by MRI or PET/CT). The average GTV(CT/MRI) was 22(+/-19)cm(3); GTV(PET) was 23(+/-20)cm(3). Additional GTV, obtained as a result of PET was 9(+/-10)cm(3) and was observed in patients with osseous infiltration. In some pre-treated patients there were intratumoural areas (as identified in CT/MRI) without SR-expression (7(+/-11)cm(3)). Common GTV as obtained by both CT/MRI and PET was 15(+/-14)cm(3). The mean bi-directional difference between the GTV(CT/MRI) and GTV(PET) accounted to 16(+/-15)cm(3) (93%, p < 0.001). In a subgroup of seven patients with multiple meningiomas, PET showed a total of 19 lesions; nine of them were not recognizable by CT or MRI.

**CONCLUSION:** (68)Ga-DOTATOC-PET enables delineation of SR-positive meningiomas and delivers additional information to both CT and MRI regarding the planning of stereotactic radiotherapy. The acquisition on a PET/CT scanner helps to estimate the relation of PET findings to anatomical structures and is especially useful for detection of osseous infiltration. (68)Ga-DOTATOC-PET also allows detection of additional lesions in patients with multiple meningiomas.

### **Impatto potenziale di Ga-DOTATOC PET / TC per la pianificazione di radioterapia stereotassica dei meningiomi**

**SCOPO:** Poiché i meningiomi mostrano una elevata espressione del sottotipo di recettore della somatostatina 2, è stata proposta la PET con Ga-DOTATOC come una modalità di visualizzazione aggiuntiva oltre TC e RM per la pianificazione di radioterapia. Abbiamo studiato l'inserimento di Ga-DOTATOC-PET/CT sulla definizione del "volume tumorale lordo" (GTV) nei meningiomi, al fine di valutare il valore potenziale di questo metodo.

**METODI:** Prima di radioterapia, 42 pazienti con meningioma (26 f, 16 m, età media 55) sono stati sottoposti a risonanza magnetica e esami Ga-DOTATOC-PET/CT. Storia: n = 24 operati, radioterapia n = 1, il funzionamento e la radioterapia n = 8, no trattamento n = 9. I dati di PET / TC e RM sono stati co-registrati utilizzando una workstation BrainLAB. Per confronto, la GTV è stata definita prima in considerazione dei dati di TC e RM, quindi utilizzando i dati PET.

**RISULTATI:** 3 / 42 pazienti sono stati esclusi dall'analisi (due con esito negativo PET, uno con un tumore esteso, non proprio delineabile dalla RM o PET / CT). La media GTV (TC / RM) era di 22 (+ / -19) cm (3); GTV (PET) è stato 23 (+ / -20) cm (3). Ulteriori GTV, ottenuto a seguito di PET è stato di 9 (+ / -10) cm (3) ed è stato osservato nei pazienti con infiltrazione ossea. In alcuni pazienti

pre-trattati vi erano aree intratumorale (come individuato al CT / MRI) senza SR-espressione (7 (+ / -11) cm (3)). Comune GTV come ottenuti da entrambe le TAC / RM e la PET era di 15 (+ / -14) cm (3). La differenza media bi-direzionale tra il GTV (TC / RM) e GTV (PET) hanno rappresentato a 16 (+ / -15) cm (3) (93%,  $p < 0,001$ ). In un sottogruppo di sette pazienti con meningiomi multipli, la PET ha mostrato un totale di 19 lesioni, nove di loro non erano riconoscibili da TC o RM. **CONCLUSIONE:** Ga-DOTATOC-PET permette di delineazione dei meningiomi SR-positivi e fornisce informazioni aggiuntive per TC e RM per quanto riguarda la pianificazione della radioterapia stereotassica. L'acquisizione su un / scanner PET TAC consente di stimare il rapporto dei risultati in PET per strutture anatomiche ed è particolarmente utile per la rilevazione di infiltrazione ossea. Ga-DOTATOC-PET consente inoltre il rilevamento di ulteriori lesioni in pazienti con meningiomi multipli.

193: Kumagai K, Saikawa Y, Fukuda K, Ito R, Igarashi T, Tsuwano S, Nakamura R, Takahashi T, Takeuchi H, Kitagawa Y.

**Octreotide acetate successfully treated a bowel obstruction caused by peritoneally disseminated gastric cancer, thereby enabling the subsequent use of oral S-1 chemotherapy.**

Int J Clin Oncol. 2009 Aug;14(4):372-5. Epub 2009 Aug 25. PubMed PMID: 19705252.

A 68-year-old woman presented with severe bowel obstruction and was subsequently diagnosed with stage IV gastric cancer with peritoneal dissemination. She was immediately stabilized in the hospital with the placement of a nasointestinal tube. Abdominal computed tomography showed multiple intraperitoneal nodules consistent with peritoneal dissemination of the gastric cancer. The patient's inability to tolerate oral intake was a contraindication to using S-1 chemotherapy, currently one of the most effective medications used for gastric cancer in Japan. Therefore, she was initially treated with octreotide acetate (OA). Her bowel obstruction was sufficiently attenuated on the seventh day after the initiation of treatment with OA to permit the initiation of oral S-1, along with low-dose cisplatin (CDDP) and radiation. S-1 was orally administered at a dose of 100 mg/day per body (80 mg/m<sup>2</sup> per day) on days 1-28, and CDDP was infused at a dose of 7.8 mg/day per body (6 mg/m<sup>2</sup> per day) on days 1-5, 8-12, and 15-19. Radiation therapy (2 Gy/day for 5 days/week) was performed with the chemotherapy. Despite no change being shown on her imaging findings with the chemotherapy, the patient's bowel obstruction resolved and she was able to tolerate both liquids and solid food orally. She was discharged 2 months after admission. Seven months after beginning the chemotherapy, she was still doing well on outpatient chemotherapy with S-1 and CDDP, and had no decline in her quality of life or progression of her disease.

**Occlusione intestinale causata da cancro gastrico peritoneale diffuso trattata con Octreotide acetato con successo, consentendo così al successivo utilizzo chemioterapia orale di S-1.**

Una donna di 68 anni ha presentato un'ostruzione intestinale grave ed è stato successivamente diagnosticato un cancro allo stadio IV gastrico con diffusione peritoneale. È stata immediatamente stabilizzata in ospedale con il posizionamento di un tubo nasointestinale. La tomografia computerizzata addominale ha mostrato dei noduli multipli intraperitoneali con coerente diffusione peritoneale del tumore gastrico. L'incapacità della paziente di tollerare l'assunzione orale è stata una controindicazione all'utilizzo di chemioterapia S-1, attualmente uno dei più efficaci farmaci utilizzati per il cancro gastrico in Giappone. Pertanto, è stata inizialmente trattata con octreotide acetato (OA). La sua occlusione intestinale era sufficientemente attenuata il settimo giorno dopo l'inizio del trattamento con OA per consentire l'apertura orale di S-1, insieme a basse dosi di cisplatino (CDDP) e radiazione. S-1 è stato somministrato per via orale alla dose di 100 mg / giorno, (80 mg / m<sup>2</sup> al giorno) nei giorni 1-28, e CDDP è stato infuso alla dose di 7,8 mg / giorno (6 mg / m<sup>2</sup> al giorno) nei giorni 1-5, 8-12, e 15-19. La radioterapia (2 Gy / die per 5 giorni alla settimana) è stata effettuata con la chemioterapia. Nonostante sulla paziente nessun cambiamento viene mostrato i risultati di formazione immagine con la chemioterapia, l'ostruzione intestinale della paziente si è risolta ed è stata in grado di tollerare sia liquidi e cibi solidi per via orale. È stata dimessa due mesi dopo il ricovero. Sette mesi dopo aver iniziato la chemioterapia, stava ancora bene con la chemioterapia ambulatoriale e con S-1 e CDDP, e non aveva alcun declino nella sua qualità di vita o nella progressione della sua malattia.

201: Msaouel P, Galanis E, Koutsilieris M

**Somatostatin and somatostatin receptors: implications for neoplastic growth and cancer biology.**

Expert Opin Investig Drugs. 2009 Sep;18(9):1297-316. Review. PubMed PMID: 19678799.

Somatostatin agonists (SM-As) are capable of achieving durable symptomatic relief and significant clinical responses in certain tumours. Herein, we review the diverse direct and indirect mechanisms of antineoplastic activity elicited by SM-As as well as the hurdles that complicate their use as monotherapies in a broader range of malignancies. Emphasis is placed on recent clinical attempts to neutralise the IGF-mediated survival factor effects in the bone metastasis microenvironment in advanced prostate cancer. The first clinical trials of this 'anti-survival factor manipulation' strategy utilised the ability of SM-As to suppress the growth hormone-dependent liver-derived IGF-I bioavailability in combination with other drugs, such as dexamethasone, zoledronate and oestrogens, acting systemically and at the bone metastasis microenvironment. These regimens restored androgen ablation responsiveness in stage D3 prostate cancer patients and successfully produced objective clinical responses while only mild toxicities were observed. Furthermore, we focus on the preclinical experimental data of a targeted SM-A coupled to the super-potent doxorubicin derivative AN-201. The resulting conjugate (AN-238) has shown increased antitumour potency with a favourable toxicity profile. The potential use of novel SM-As as anticancer drugs is discussed in relation to data suggesting other direct and indirect treatment approaches pertaining to the somatostatin system.

**Somatostatina e recettori della somatostatina: implicazioni nella crescita neoplastica e nella biologia del cancro.**

Gli agonisti della somatostatina (SM-As) sono in grado di dare durevole sollievo sintomatico e significative risposte cliniche in alcuni tumori. Qui, passiamo in rassegna i diversi meccanismi diretti e indiretti delle attività antineoplastica suscitato da SM-As, nonché gli ostacoli che complicano il loro uso come monoterapia in una più ampia gamma di neoplasie. L'accento è posto sui recenti tentativi clinici di neutralizzare gli effetti del fattore di sopravvivenza IGF-mediato nelle metastasi del microambiente osseo nel carcinoma della prostata avanzato.

Le prime sperimentazioni cliniche di questa strategia 'anti-manipolazione del fattore di sopravvivenza' ha utilizzato la capacità di SM-As per sopprimere la crescita ormone dipendente del fegato derivata dalla biodisponibilità di IGF-I in combinazione con altri farmaci, come il desametasone, zoledronate ed estrogeni, sostituito sistematicamente al microambiente di metastasi ossee. Questi regimi restaurati ablazione degli androgeni di risposta nei pazienti con cancro della prostata in fase D3 hanno prodotto con successo risposte cliniche obiettive, mentre è stata osservata solo lieve tossicità. Inoltre, ci si è concentrati sui dati preclinici sperimentali di un mirato SM-A accoppiato alla doxorubicina super-potente derivato AN-201. Il coniugato risultante (AN-238) ha mostrato una maggiore efficacia antitumorale con un profilo di tossicità favorevole. Il potenziale uso di un SM-As come farmaci antitumorali è discusso in relazione ai dati che suggeriscono altri trattamenti diretti e indiretti relativi al sistema di somatostatina.

203: Bertagna F, Giubbini R, Savelli G, Pizzocaro C, Rodella C, Biasiotto G, Lucchini S, Maroldi R, Rosenbaum J, Alavi A.

**A patient with medullary thyroid carcinoma and right ventricular cardiac metastasis treated by (90)Y-Dotatoc.**

Hell J Nucl Med. 2009 May-Aug;12(2):161-4. PubMed PMID: 19675872.

Medullary thyroid carcinoma (MTC) is rare derived from C cells of the thyroid gland and represents approximately 5% of all thyroid carcinomas. We report a case of a 74 years old male with MTC, diagnosed in 2002 and treated with total thyroidectomy and lymphadenectomy. A metastatic lesion was diagnosed on the right ventricle by indium-111-octreoscan, fluorine-18-fluorodeoxyglucose-positron emission tomography/computerized tomography, echocardiography, magnetic resonance imaging, high resolution computed tomography and was confirmed by histopathology. We present the results of treatment of this patient with yttrium-90-DOTA-tyr(3)-octreotide.

**Un paziente con carcinoma midollare della tiroide e del ventricolo cardiaco destro metastasi trattati con Y-DOTATOC**

Il carcinoma midollare della tiroide (MTC) è raro e deriva dalle cellule C della tiroide e rappresenta circa il 5% di tutti i carcinomi della tiroide. Segnaliamo un caso di 74 anni maschio con MTC, diagnosticata nel 2002 e trattata con tiroidectomia totale e linfadenectomia. È stata diagnosticata una lesione metastatica del ventricolo destro attraverso indio-111-OctreoScan, l'emissione di fluoro-18-fluorodeossiglucosio-positrone tomografia / tomografia computerizzata, ecocardiografia, risonanza magnetica, la tomografia computerizzata ad alta risoluzione ed è stata confermata da esame istopatologico. Vi presentiamo i risultati del trattamento di questo paziente con ittrio-90-DOTA-Tyr (3)-octreotide.

224: Singh SP, Yang D, Ravoori M, Han L, Kundra V.

### **In vivo functional and anatomic imaging for assessment of in vivo gene transfer.**

Radiology. 2009 Sep;252(3):763-71. Epub 2009 Jul 8. PubMed PMID: 19587310; PubMed Central PMCID: PMC2734889.

**PURPOSE:** To assess whether a combination of in vivo anatomic and functional imaging can help quantify expression of somatostatin receptor type 2 (SSTR2)-based reporters after in vivo gene transfer.

**MATERIALS AND METHODS:** All animal experiments were approved by an institutional animal care and use committee. Six nude mice bearing two subcutaneous L3.6pl (human pancreatic cancer) tumors were injected intratumorally with an adenovirus containing a human somatostatin receptor type 2 gene chimera (Ad-HA-SSTR2) or a control adenovirus containing green fluorescent protein (Ad-GFP). Two days later, magnetic resonance (MR) imaging was performed to derive tumor weight and analyze morphology. Intravenous injection of Food and Drug Administration-approved indium 111 octreotide was followed by gamma camera imaging (planar imaging and single photon emission computed tomography [SPECT]) the next day. Region-of-interest analysis followed. The procedure was also performed in six nude mice with slow-growing MDA-MB-435 (human breast carcinoma) tumors, which allowed serial imaging 3 days and 2 weeks after adenovirus injection. After imaging, excised tumor weight and biodistribution were assessed. Statistical analyses included a Student t test and linear regression.

**RESULTS:** With both tumor types, ex vivo and image-based in vivo biodistribution demonstrated greater uptake (percentage of injected dose per gram) in tumors infected with Ad-HA-SSTR2 than in those infected with Ad-GFP ( $P < .05$ ). Furthermore, in vivo and ex vivo biodistribution analysis correlated (ex vivo vs planar and MR imaging:  $r = 0.87$ ,  $P < .05$ ,  $n = 24$ ; ex vivo vs SPECT and MR imaging:  $r = 0.84$ ,  $P < .05$ ,  $n = 24$ ). Moreover, in vivo biodistribution distinguished greater expression at the earlier time point in MDA-MB-435 tumors infected with Ad-HA-SSTR2 from waning expression at the later time point ( $P < .05$ ).

**CONCLUSION:** A combination of in vivo functional and anatomic imaging methods can help quantify gene expression after in vivo gene transfer.

### **In vivo immagine funzionale e anatomica per la valutazione del trasferimento genico in vivo.**

**SCOPO:** Per valutare se una combinazione in vivo di immagini anatomica e funzionale può contribuire a quantificare l'espressione del recettore della somatostatina tipo 2 (SSTR2) a base di giornalisti, dopo il trasferimento genico in vivo.

**MATERIALI E METODI:** Tutti gli esperimenti sugli animali sono stati approvati da un comitato istituzionale per l'uso degli animali. A sei topi nudi sono stati iniettati L3.6pl (umane di cancro del pancreas), i tumori sono stati iniettati intratumorally con un adenovirus contenente un tipo di recettore umano della somatostatina 2 chimera gene (Ad-HA-SSTR2) o un controllo adenovirus che contiene una proteina fluorescente verde (Ad-GFP) Due giorni dopo, la risonanza magnetica (RM) è stato effettuato per ricavare il peso del tumore e di analizzare la morfologia. L'iniezione endovenosa di indio-111 octreotide è stata seguita il giorno successivo da immagini gamma fotocamera (planare e singolo fotone tomografia computerizzata a emissione di [SPECT]). E' stata eseguita una analisi di regione di interesse.

La procedura è stata effettuata anche in sei topi nudi con crescita lenta dei tumori MDA-MB-435 (carcinoma mammario umano), che ha permesso di dare una serie di immagini 3 giorni e 2

settimane dopo l'iniezione di adenovirus. Dopo l'imaging, stati valutati il peso del tumore asportato e la biodistribuzione. Le analisi statistiche includono un test t di Student e la regressione lineare.

**RISULTATI:** Con entrambi i tipi di tumore, ex vivo e di immagini basata sulla biodistribuzione in vivo hanno dimostrato maggiore diffusione (percentuale di dose iniettata per grammo) nei tumori infettati con Ad-HA-SSTR2 che in quelli infettati con Ad-GFP ( $P < .05$ ). Inoltre, in vivo ed ex vivo analisi della biodistribuzione correlata (ex vivo imaging vs planare e MR:  $r = 0.87$ ,  $P < 0.05$ ,  $n = 24$ ; ex vivo vs SPECT e RM:  $r = 0.84$ ,  $P < .05$ ,  $n = 24$ ). Inoltre, nella biodistribuzione in vivo è stato distinta una maggiore espressione nel tempo di osservazione precedente e in MDA-MB-435 tumori infettati con Ad-HA-SSTR2 di espressione calante al secondo momento di osservazione ( $P < .05$ ).

**CONCLUSIONE:** Una combinazione di metodi in vivo attraverso immagini funzionali e anatomiche può aiutare a quantificare l'espressione genica dopo il trasferimento genico in vivo.

226: Hauser P, Hanzély Z, Máthé D, Szabó E, Barna G, Sebestyén A, Jeney A, Schuler D, Fekete G, Garami M.

**Effect of somatostatin analogue octreotide in medulloblastoma in xenograft and cell culture study.**

Pediatr Hematol Oncol. 2009 Jul-Aug;26(5):363-74. PubMed PMID: 19579083.

**BACKGROUND:** The effect and possible timing of nonradiolabeled somatostatin analogue octreotide are still not determined in the treatment of medulloblastoma, while the presence of somatostatin receptor type-2 (SSTR2) is proved in the majority of medulloblastoma by several authors.

**PROCEDURES:** Daoy, SSTR2A positive medulloblastoma cell culture was tested with octreotide in monotherapy and combined with cisplatin, etoposide, and vincristine. Daoy medulloblastoma mice xenograft was treated with octreotide alone.

**RESULTS:** In monolayer cell culture high-dose octreotide (44 microM) resulted in mitotic inhibition with parallel increment of apoptosis. Combination with cytostatic drugs did not result in additive or synergistic effect, but vincristine was partially antagonized. In medulloblastoma xenograft, octreotide monotherapy (100 microg/kg/day for 10 days) resulted in partial tumor growth inhibition.

**CONCLUSIONS:** High concentration of nonradiolabeled octreotide may have role in the treatment of medulloblastoma by long-term administration. Concomitant administration of octreotide with widely used cytostatic drugs against medulloblastoma will not have beneficial impact

**Effetto della somatostatina (analogo dell'octreotide) nel medulloblastoma in xenotrapianto e studio della cultura delle cellule.**

**BACKGROUND:** L'effetto e la possibile tempistica di octreotide analogo della somatostatina (non radioattivi) non sono ancora determinate nel trattamento del medulloblastoma, mentre la presenza del tipo di recettore della somatostatina-2 (SSTR2) è dimostrata nella maggior parte dei medulloblastoma da diversi autori.

**PROCEDURE:** sstr2A positivo nella coltura cellulare di medulloblastoma è stato testato con octreotide in monoterapia e in combinazione con cisplatino, etoposide, vincristina. Medulloblastoma Daoy nei topi trapiantati è stato trattato solo con octreotide.

**RISULTATI:** Nella cultura il monostrato cellulare con octreotide ad alte dosi (44 microM) ha determinato l'inibizione mitotica con incremento parallelo di apoptosi. L'associazione con farmaci citostatici non ha provocato effetti additivi o sinergici, ma la vincristina è stata parzialmente antagonizzata. In medulloblastoma xenotrapianto e la monoterapia con octreotide (100 microg / kg / die per 10 giorni) ha portato ad una parziale inibizione della crescita tumorale.

**CONCLUSIONI:** L'alta concentrazione di octreotide non radioattiva può avere un ruolo nel trattamento del medulloblastoma con la somministrazione a lungo termine. La somministrazione concomitante di octreotide, con farmaci citostatici ampiamente usato contro il medulloblastoma non avranno un impatto benefico.

230: Guo TK, Hao XY, Ma B, Yang KH, Li YP, Li HL, Gu YH, Cai H, Liu YL, Li Y, Zhan WP

**Octreotide for advanced hepatocellular carcinoma: a meta-analysis of randomized controlled trials.**

J Cancer Res Clin Oncol. 2009 Dec;135(12):1685-92. Epub 2009 Jun 18. PubMed PMID: 19536563.

**PURPOSE:** To evaluate the effectiveness of octreotide in advanced hepatocellular carcinoma participants on the basis of randomized controlled trials.

**METHODS:** We searched the Cochrane Center Register of Controlled Trials in The Cochrane Library, PubMed, EMBASE, Chinese Biomedical Literature Database, China Journal Full-text Database, Chinese Scientific Journals Database up to June 2008 in any language. Randomized controlled trials of octreotide for advanced hepatocellular carcinoma were selected and evaluated by two investigators. Any disagreement was solved by discussion. Analyses were performed using Review Manager 4.2.

**RESULTS:** Six randomized controlled trials totaling 352 participants were included. The median survival time was reported in four randomized controlled trials. The results between the octreotide group and the control group (the placebo or best supportive care group) were as follows: 13.0 versus 4.0 months, 1.93 versus 1.97 months, 4.7 versus 5.3 months, and 7.0 versus 2.5 months. Three randomized controlled trials reported 6-month survival rates and 12-month survival rates and meta-analysis results in these two outcomes [(RR 1.35, 95% CI 0.92-1.97); (RR 1.35, 95% CI 0.66-11.16) respectively] were not found to be statistically significant by random-effects model. When we analyzed 6-month survival rates by fixed-effect model (RR 1.30, 95% CI 1.02-1.66), meta-analysis result reached statistical significance.

**CONCLUSIONS:** As for the limitations of the included trials, the result may not demonstrate a significant superiority of octreotide administration in participants with advanced hepatocellular carcinoma from the available evidence

**Octreotide per il carcinoma epatocellulare avanzato: una meta-analisi di studi randomizzati controllati**

**SCOPO:** Valutare l'efficacia di octreotide in carcinoma epatocellulare avanzato, sulla base di studi randomizzati controllati.

**METODI:** Abbiamo cercato la Cochrane Center Registro delle sperimentazioni cliniche controllate nella biblioteca coreana, in PubMed,

EMBASE, nella letteratura biomedica cinese, nei Database, nel datadase dei testi completi della gazzetta cinese, nelle riviste scientifiche cinesi fino a giugno 2008 in qualsiasi lingua. Gli studi randomizzati controllati di octreotide per carcinoma epatocellulare avanzato sono stati selezionati e valutati da due investigatori. Qualsiasi controversia è stata risolta dalla discussione. Le analisi sono state effettuate utilizzando Review Manager 4.2

**RISULTATI:** Sono stati inclusi sei studi randomizzati e controllati per un totale di 352 partecipanti. La sopravvivenza mediana è stata riportata in quattro studi clinici randomizzati e controllati. I risultati tra il gruppo octreotide e il gruppo di controllo (placebo o il miglior gruppo di supporto di cura) sono state le seguenti: 13,0 versus 4,0 mesi, 1,93 contro 1,97 mesi, 4,7 versus 5,3 mesi, e 7,0 versus 2,5 mesi. Sono riportati i tassi di sopravvivenza dei tre studi clinici controllati e randomizzati a 6 mesi e tassi di sopravvivenza a 12 mesi ed i risultati di meta-analisi di questi due

risultati [(RR 1,35, 95% CI 0,92-1,97); (RR 1,35, IC 95% 0,66-11,16) rispettivamente ] non sono risultati statisticamente significativi a seconda del modello ad effetti casuali. Quando abbiamo analizzato i tassi di sopravvivenza a 6 mesi in base al modello fisso-effetto (RR 1,30, IC 95% 1,02-1,66), risultato meta-analisi ha raggiunto la significatività statistica.

**CONCLUSIONI:** Per quanto riguarda i limiti degli studi inclusi, il risultato non può dimostrare una superiorità significativa della somministrazione di octreotide in soggetti con carcinoma epatocellulare avanzato dalle prove disponibili.

232:Ito J, Sekiya M, Miura K, Yoshimi K, Suzuki T, Seyama K, Izumi H, Uekusa T, Takahashi K.

**Refractory recurrent thymoma successfully treated with long-acting somatostatin analogue and prednisolone.**

Intern Med. 2009;48(12):1061-4. Epub 2009 Jun 15. PubMed PMID: 19525599.

The patient was 54-year-old woman diagnosed as recurrent invasive thymoma (type B3; WHO classification). Although partial response was obtained by systemic chemotherapy (PAC: cisplatin, doxorubicin, cyclophosphamide), the tumor started to become enlarged after cessation of chemotherapy. Combined treatment of octreotide and prednisolone was administered because various chemotherapies, including PAC, were not effective. After seven months, the tumor size was markedly decreased. The combination of octreotide and prednisolone should be considered as one of the choices of treatment in patients with recurrent thymom

**Timoma ricorrente refrattaria trattati con successo a lunga azione con analogo della somatostatina e prednisolone**

La paziente era donna di 54 anni a cui era stato diagnosticato un ricorrente timoma invasivo (tipo B3; classificazione WHO). Sebbene una risposta parziale è stata ottenuta con la chemioterapia sistemica (PAC: cisplatino, doxorubicina, ciclofosfamide), il tumore ha iniziato a diventare allargato dopo la cessazione della chemioterapia. Il trattamento combinato di octreotide e prednisolone è stato amministrato a causa di chemioterapie varie, compresi i PAC, e non sono stati efficaci. Dopo sette mesi, la dimensione del tumore era notevolmente diminuito. La combinazione di octreotide e prednisolone dovrebbe essere considerata come una delle scelte di trattamento nei pazienti con timoma recidivo.

233: Treszl A, Schally AV, Seitz S, Szalontay L, Rick FG, Szepeshazi K, Halmos G.

**Inhibition of human non-small cell lung cancers with a targeted cytotoxic somatostatin analog, AN-162.**

Peptides. 2009 Sep;30(9):1643-50. Epub 2009 Jun 12. PubMed PMID: 19524629.

Human non-small cell lung cancers (NSCLCs) express receptors for somatostatin. The cytotoxic analog of somatostatin AN-162 (AEZS-124), consisting of doxorubicin linked to a somatostatin analog RC-121 binds to receptors for somatostatin and is targeted to tumors expressing these receptors. The aim of this study was to investigate the effect of targeted cytotoxic somatostatin analog AN-162 on a panel of human NSCLC cell lines (A549, H460, H838, H1299) in vitro (at 0.5-100 microM concentrations) and in vivo on H460 and H1299 NSCLCs xenografted into nude mice (at the dose of 2.5 micromol/kg, i.v., once a week). The expression of mRNA for somatostatin receptor subtypes was investigated by RT-PCR in cell lines and tumor tissues. Somatostatin receptor proteins were also characterized by ligand competition assay and Western blotting. AN-162 significantly decreased cell proliferation in vitro and tumor growth ( $p < 0.05$  vs. all groups) of H460 and H1299 NSCLCs in vivo. Based on real-time PCR array data, AN-162 induced several apoptosis-related genes in vivo in both models. Our results suggest that cytotoxic somatostatin analog AN-162 (AEZS-124) should be considered for the further development of a therapy of patients with NSCLC.

**L'inibizione del tumore polmonare a cellule non-piccole con un analogo della somatostatina citotossico mirato, AN-162.**

Il cancro ai polmoni non a piccole cellule (NSCLCs) esprime i recettori per la somatostatina. L'analogo citotossico della somatostatina AN-162 (AEZS-124), comprendente doxorubicina legato ad un analogo della somatostatina RC-121 si lega ai recettori per la somatostatina e si rivolge a tumori che esprimono questi recettori. Lo scopo di questo studio è stato studiare l'effetto mirato di un analogo della somatostatina citotossico AN-162 su un pannello di linee cellulari umane di NSCLC (A549, H460, H838, H1299) in vitro (a concentrazioni di 0,5-100 microM) e in vivo su H460 e NSCLCs H1299 in topi nudi trapiantati (alla dose di 2,5 micromol / kg, iv, una volta a settimana). L'espressione di mRNA per i sottotipi del recettore per la somatostatina è stata valutata mediante RT-PCR nelle linee di cellule e tessuti tumorali. Le proteine del recettore della somatostatina sono state anche caratterizzate dal saggio di concorrenza ligando e Western blotting. AN-162 è diminuito in modo significativo la proliferazione cellulare in vitro e la crescita del tumore ( $p < 0.05$  vs tutti i gruppi) di NSCLCs H460 e H1299 in vivo. Sulla base dei dati real-time PCR array, AN-162 ha indotto apoptosi diversi geni correlati in vivo in entrambi i modelli. I nostri risultati suggeriscono che l' analogo citotossico della somatostatina AN-162 (AEZS-124) dovrebbe essere considerata per l'ulteriore sviluppo di una terapia di pazienti con NSCLC.

234: Kilian M, Gregor JI, Heukamp I, Helmecke K, Hanel M, Wassersleben B, Walz MK, Schimke I, Kristiansen G, Wenger FA.

### **Impact of Octreotide and SOM-230 on liver metastasis and hepatic lipidperoxidation in ductal pancreatic adenocarcinoma in Syrian Hamster.**

Clin Exp Metastasis. 2009;26(7):719-27. Epub 2009 Jun 12. PubMed PMID: 19521786.

Octreotide is a somatostatin analogue binding on two receptor subtypes. In previous trials Octreotide showed inhibitory effects on tumour growth and liver metastasis in experimental pancreatic cancer. Thus we evaluated whether the new somatostatin analogue SOM-230 binding on 4 receptor subtypes has superior effects on carcinogenesis in pancreatic carcinoma. About 120 Syrian hamsters were randomised into six groups (n = 20): Gr.1: Aqua/Aqua, Gr.2: BOP/Aqua, Gr.3: Aqua/Octreotide, Gr.4: BOP/Octreotide, Gr.5: Aqua/SOM-230, Gr.6: BOP/SOM-230. Tumour groups 2,4,6 subcutaneously received 10 mg/kg body weight N-nitrosobis-2-oxopropylamin (BOP) weekly for 10 weeks, healthy control Gr.1,3,5 were given aqua. In the 17th week therapy started with Octreotide and SOM-230 for 16 weeks, after 32 weeks animals were sacrificed. Pancreas and liver were histopathologically analysed. Hepatic lipidperoxidation was determined by activities of antioxidative enzymes glutathione-peroxidase (GSH-Px) and superoxididismutase (SOD) as well as concentration of thiobarbituric-acid reactive substances (TBARS). Incidence of liver metastases was 88.2% in Gr.2 (BOP/Aqua), it was decreased in Gr.4 (BOP/Octreo: 40%) and Gr.6 (BOP/SOM-230: 50%) (P < 0.05). Mean number/animal and mean-2-dimensional size of liver metastases did not differ between tumour groups. Comparing GSH-Px-activity in intrametastatic and extrametastatic hepatic tissue revealed a significant increase extrametastatically in Gr.2 (BOP/Aqua) and Gr.6 (BOP/SOM-230). SOD-activity in liver metastases was decreased in Gr.2 (1,801) (P < 0.05) versus Gr.4 (8,304) and Gr.6 (7,038). Intrametastatic TBARS concentration was increased in Gr.2 compared to Gr.4 (BOP/Octreotid) and Gr.6 (BOP/SOM-230) (P < 0.05). Octreotide and SOM-230 equally reduced liver metastasis in ductal pancreatic adenocarcinoma probably by a reduction of lipidperoxidation.

### **Impatto di octreotide e di SOM-230 su metastasi del fegato e lipidperossidazione epatica in adenocarcinoma pancreatico duttale in Siria Hamster.**

Octreotide è un analogo della somatostatina legante due sottotipi di recettori. Studi precedenti hanno dimostrato gli effetti inibitori dell'octreotide sulla crescita del tumore e delle metastasi del fegato nel cancro pancreatico sperimentale. Così abbiamo valutato se l'analogo della somatostatina nuovo SOM-230 legante 4 sottotipi di recettori ha effetti superiori sulla carcinogenesi nel carcinoma pancreatico. Circa 120 criceti siriani sono stati randomizzati in sei gruppi (n = 20): Gr.1: Aqua / Aqua, Gr.2: BOP / Aqua, Gr.3: Aqua / octreotide, Gr.4: BOP / octreotide, Gr.5 : Aqua/SOM-230, Gr.6: BOP/SOM-230. I tumori dei gruppi 2,4,6 via sottocutanea hanno ricevuto 10 mg / kg di peso corporeo di N-nitrosobis-2-oxopropylamin (BOP) alla settimana per 10 settimane, ai gruppi di controllo sani Gr.1, 3,5 è stata data aqua. La diaciasettesima settimana di terapia è iniziata con Octreotide e SOM-230 per 16 settimane, dopo 32 settimane gli animali sono stati sacrificati. Pancreas e fegato sono stati analizzati histopatologicamente.

La lipidoperossidazione epatica è stata determinata dalle attività degli enzimi antiossidanti glutatione-perossidasi (GSH-Px) e superossidodismutasi (SOD), nonché sostanze a concentrazione di acido tiobarbiturico-reattiva (TBARS). L'incidenza di metastasi epatiche è stata 88,2% nel Gr.2 (BOP / Aqua), era diminuita in Gr.4 (BOP / Octreo: 40%) e Gr.6 (BOP/SOM-230: 50%) (P < 0,05 ).

Il numero medio / animale e la dimensione media-2-dimensionale delle metastasi epatiche non differivano tra i gruppi di tumore. Confrontando la GSH-Px-attività intrametastatica ed extrametastatica il tessuto epatico ha rivelato un aumento significativo extrametastaticamente in Gr.2 (BOP / Aqua) e Gr.6 (BOP/SOM-230). SOD-attività nelle metastasi epatiche è risultata diminuita in Gr.2 (1.801) (P <0,05) rispetto a Gr.4 (8.304) e Gr.6 (7.038). La concentrazione intrametastatica TBARS è aumentata in Gr.2 rispetto al Gr.4.

238: Saeed P, Tanck MW, Freling N, Baldeschi L, Mourits MP, Bennink RJ.

**Somatostatin receptor scintigraphy for optic nerve sheath meningiomas.**

Ophthalmology. 2009 Aug;116(8):1581-6. Epub 2009 Jun 4. PubMed PMID: 19500849.

**OBJECTIVE:** To investigate the value of somatostatin receptor scintigraphy (SSRS) in the diagnosis of optic nerve sheath meningiomas (ONSMs).

**DESIGN:** Prospective, comparative case series.

**PARTICIPANTS:** SSRS was used to investigate 68 orbits in 61 patients diagnosed with an orbital tumor.

**METHODS:** Patients were injected intravenously with 200 MBq of indium-111 ((111)In)-octreotide. SSRS with single photon emission computed tomography (SPECT) was performed 24 hours after injection.

**MAIN OUTCOME MEASURES:** The (111)In-octreotide uptake in orbital lesions was determined by semiquantitative uptake-ratio analysis (lesion/brain) on attenuation-corrected transverse SPECT slices.

**RESULTS:** All orbital meningiomas, including 14 ONSMs and 12 sphenoidal meningiomas, showed high median (111)In-octreotide uptake ratios of 7.2 (range, 4.6-15.4) and 16.3 (range, 4.6-15.4), respectively. In 7 patients with a diagnosis of ONSM, the SSRS uptake ratio was significantly decreased 2.7 (1-6.8) after treatment with 54 Gy of radiotherapy. Median uptake ratios of other tumors were vascular anomalies/vascular tumors, 1.2 (range, 0.5-3.3); non-Hodgkin lymphomas, 2.9 (range, 0.9-4.2); optic nerve gliomas, 1.5 (range, 0.2-3.3); and idiopathic orbital inflammation, 1.6 (range, 1.4-1.9). By using a threshold uptake ratio of 5.9, the sensitivity of SSRS with (111)In-octreotide for ONSM was 100%, with a specificity of 97.2%.

**CONCLUSIONS:** SSRS is a useful additional tool in diagnosing ONSM and has 100% sensitivity and 97% specificity at a threshold uptake ratio of 5.9

### **Scintigrafia della guaina del nervo ottico del recettore della somatostatina**

**OBIETTIVO:** studiare il valore della scintigrafia del recettore della somatostatina (SSRS) nella diagnosi dei meningiomi della guaina del nervo ottico (ONSMs).

**DESIGN:** prospettico, serie di casi comparativa.

**PARTECIPANTI:** SSRS è stato utilizzato per indagare 68 orbite in 61 pazienti con diagnosi di un tumore orbitale.

**METODI:** I pazienti sono stati iniettati per via endovenosa con 200 MBq di indio-111 ((111) In)-octreotide. SSRS con tomografia ad emissione di singolo fotone (SPECT) è stata eseguita 24 ore dopo l'iniezione.

**MISURE PRINCIPALI DI RISULTATO:** La captazione di (111) In-octreotide nelle lesioni orbitali è stata determinata mediante analisi semiquantitativa captazione-ratio (lesione / cervello) in attenuazione con correzione fette trasversali SPECT.

**RISULTATI:** Tutti i meningiomi orbitale, di cui 14 ONSMs e 12 meningiomi sfeno-orbitale, hanno mostrato rapporti di captazione di (111)In-octreotide medio alta di 7,2 (range 4,6-15,4) e 16.3 (range 4,6-15,4), rispettivamente. In 7 pazienti con una diagnosi di ONSM, il rapporto di captazione SSRS era significativamente diminuito 2,7 (1-6,8) dopo trattamento di radioterapia con 54 Gy. Rapporti di assorbimento medio di altri tumori sono anomalie vascolari / tumori vascolari, 1.2 (range 0,5-3,3), linfomi non-Hodgkin, 2.9 (range: 0,9-4,2), gliomi del nervo ottico, 1.5 (range: 0,2-3,3), e infiammazione orbitale idiopatica, 1.6 (range: 1,4-1,9). Utilizzando un rapporto di assorbimento soglia di 5,9, la sensibilità di SSRS con (111) In-octreotide per ONSM è stata del 100%, con una specificità del 97,2%.

242: Jia WD, Xu GL, Wang W, Wang ZH, Li JS, Ma JL, Ren WH, Ge YS, Yu JH, Liu WB.

**A somatostatin analogue, octreotide, inhibits the occurrence of second primary tumors and lung metastasis after resection of hepatocellular carcinoma in mice.**

Tohoku J Exp Med. 2009;218(2):155-60. PubMed PMID: 19478472.

Occurrence of second primary tumors and metastasis remains the major obstacles to prolonged survival of patients with primary hepatocellular carcinoma (HCC). A somatostatin analogue, octreotide, has been previously reported to inhibit the growth of human HCC xenografts in nude mice through its anti-angiogenic activity. It is therefore important to investigate whether octreotide could prevent second primary hepatomas or distant metastasis following resection of primary HCC. In this study, nude mice, bearing the human HCC xenografts with highly metastatic potential (LCI-D20) in the left liver lobe, underwent tumor resection, and received intraperitoneal administration of octreotide or saline as a control for 35 consecutive days. Compared with the control group, octreotide at the doses of 100 and 200 microg/kg/day significantly inhibited the growth ( $P < 0.001$  and  $P < 0.001$ , respectively) and incidence of second primary tumors ( $P = 0.016$  and  $P = 0.001$ , respectively), decreased lung metastasis ( $P < 0.001$  and  $P < 0.001$ , respectively), and prolonged the life span ( $P = 0.029$  and  $P = 0.006$ , respectively). Moreover, intratumoral angiogenesis quantified by microvessel density as well as serum and tissue vascular endothelial growth factor (VEGF) levels were considerably decreased in octreotide-treated animals compared to the control animals. These findings suggest that octreotide may prevent the occurrence of second primary hepatomas and lung metastasis after resection of primary HCC, which may be partially attributed to down-regulation of VEGF and subsequent reduction in tumor angiogenesis. Octreotide administration may be useful as an adjuvant therapy to improve survival of patients with HCC.

### **Un analogo della somatostatina, octreotide, inibisce l'insorgenza di secondi tumori primari e delle metastasi polmonari dopo resezione del carcinoma epatocellulare nei topi.**

La presenza di secondi tumori primari e di metastasi rimane uno dei principali ostacoli alla prolungata sopravvivenza di pazienti con carcinoma epatocellulare primario (HCC). Un analogo della somatostatina, octreotide, è stato precedentemente segnalato per inibire la crescita HCC in topi nudi attraverso le sue attività anti-angiogenica. E' quindi importante per verificare se l'octreotide potrebbe impedire secondi epatomi primario o metastasi a distanza dopo resezione di primaria HCC. In questo studio, dei topi nudi, recanti eterotraspianti HCC con molto potenziale metastatico (LCI-D20) nel lobo epatico sinistro, hanno subito la resezione del tumore, e hanno ricevuto la somministrazione intraperitoneale di octreotide o di soluzione fisiologica come controllo per 35 giorni consecutivi.

Rispetto al gruppo di controllo, octreotide alle dosi di 100 e 200 microg / kg / die ha inibito significativamente la crescita ( $P < 0,001$  e  $P < 0,001$ , rispettivamente) e l'incidenza di secondi tumori primari ( $p = 0,016$  e  $p = 0,001$ , rispettivamente), da dato diminuzione della metastasi polmonare ( $p < 0,001$  e  $p < 0,001$ , rispettivamente), ed ha prolungato la durata della vita ( $p = 0,029$  e  $p = 0,006$ , rispettivamente). Inoltre, l'angiogenesi intratumorale quantificata dalla densità dei microvasi così come siero e nel tessuto fattore di crescita vascolare endoteliale (VEGF) erano notevolmente diminuiti negli animali trattati con octreotide rispetto agli animali di controllo. Questi risultati suggeriscono che l'octreotide può prevenire il verificarsi di secondi epatomi primari e delle metastasi polmonari dopo resezione di epatocarcinoma primario, che può essere parzialmente attribuito a down-regulation di VEGF e conseguente riduzione nell'angiogenesi tumorale. La somministrazione di octreotide può essere utile come terapia adiuvante per migliorare la sopravvivenza dei pazienti con HCC.

251: Waser B, Tamma ML, Cescato R, Maecke HR, Reubi JC.

### **Highly efficient in vivo agonist-induced internalization of sst2 receptors in somatostatin target tissues.**

J Nucl Med. 2009 Jun;50(6):936-41. Epub 2009 May 14. Erratum in: J Nucl Med. 2009 Oct;50(10):1578. PubMed PMID: 19443580.

The successful peptide receptor imaging of tumors, as exemplified for somatostatin receptors, is based on the overexpression of peptide receptors in selected tumors and the high-affinity binding to these tumors of agonist radioligands that are subsequently internalized into the tumor cells in which they accumulate. Although in vitro studies have shown ample evidence that the ligand-receptor complex is internalized, in vivo evidence of agonist-induced internalization of peptide receptors, such as somatostatin receptors, is missing.

**METHODS:** Rats subcutaneously transplanted with the somatostatin receptor subtype 2 (sst(2))-expressing AR42J tumor cells were treated with intravenous injections of various doses of the sst(2) agonist [Tyr(3), Thr(8)]-octreotide (TATE) or of the sst(2) antagonist 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-N,N',N'',N''',-tetraacetic acid (DOTA)-Bass and were sacrificed at various times ranging from 2.5 min to 24 h after injection. The tumors and pancreas were then removed from each animal. All tissue samples were processed for sst(2) immunohistochemistry using sst(2)-specific antibodies.

**RESULTS:** Compared with the sst(2) receptors in untreated animals, which localized at the plasma membrane in pancreatic and AR42J tumor cells, the sst(2) receptors in treated animals are detected intracellularly after an intravenous injection of the agonist TATE. Internalization is fast, as the receptors are already internalizing 2.5 min after TATE injection. The process is extremely efficient, as most of the cell surface receptors internalize into the cell and are found in endosomelike structures after TATE injection. The internalization is most likely reversible, because 24 h after injection the receptors are again found at the cell surface. The process is also agonist-dependent, because internalization is seen with high-affinity sst(2) agonists but not with high-affinity sst(2) antagonists. The same internalization properties are seen in pancreatic and AR42J tumor cells. They can further be confirmed in vitro in human embryonic kidney-sst(2) cells, with an immunofluorescence microscopy-based sst(2) internalization assay.

**CONCLUSION:** These animal data strongly indicate that the process of in vivo sst(2) internalization after agonist stimulation is fast, extremely efficient, and fully functional under in vivo conditions in neoplastic and physiologic sst(2) target tissues. This molecular process is, therefore, likely to be responsible for the high and long-lasting uptake of sst(2) radioligands seen in vivo in sst(2)-expressing tumors.

### **Internalizzazione agonista Altamente efficiente indotta dai recettori sst2 della somatostatina nei tessuti bersaglio**

Il successo di “imaging” del peptide recettore di tumori, come esemplificato per i recettori della somatostatina, è basato sulla sovraespressione di recettori del peptide nei tumori selezionati e sull’alta affinità di legame per questi tumori di radioleganti agonista che successivamente vengono internalizzati nelle cellule tumorali in cui si accumulano. Sebbene gli studi in vitro hanno ampiamente dimostrato che il complesso ligando-recettore è interiorizzato, in vivo l’evidenza di internalizzazione- agonisti dei recettori del peptide indotta, come i recettori per la somatostatina, è mancante.

**METODI:** I topi trapiantati per via sottocutanea con il sottotipo di recettore della somatostatina 2 (sst (2)) cellule tumorali che esprimono AR42J sono stati trattati con iniezioni endovenose di varie dosi del SST (2) agonista [Tyr (3), Thr (8)]-octreotide (TATE) o del SST (2) antagonista 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N, N ', N'', l'acido N''',- tetraacetico (DOTA)-Bass e sono stati sacrificati in tempi diversi che vanno da 2,5 min a 24 ore dopo l'iniezione. I tumori del pancreas sono stati poi rimossi da ogni animale. Tutti i campioni di tessuto sono stati trattati per sst (2) immunoistochimica utilizzando anticorpi sst (2)-specifiche.

**RISULTATI:** Se confrontati con i recettori sst(2) negli animali non trattati, che sono localizzati nella membrana plasmatica delle cellule pancreatiche e tumorali AR42J, i recettori sst(2) negli

animali trattati sono valutati intracellularmente dopo un'iniezione intravenosa dell'agonista TATE. L'internalizzazione è veloce, i recettori stanno già internalizzando 2.5 min dopo l'iniezione di TATE. Il processo è estremamente efficiente, la maggior parte delle cellule di superficie dei recettori internalizzano dentro le cellule e sono stati trovati in endosomi simili a strutture dopo l'iniezione di TATE. L'internalizzazione è reversibile, perché 24 ore dopo l'iniezione i recettori si trovano sulla superficie cellulare. Il processo è agonista-dipendente, perché l'internalizzazione è stata osservata con affinità alta agli agonisti di sst(2) ma non agli antagonisti di sst(2). Le stesse proprietà di internalizzazione sono state mostrate nelle cellule pancreatiche e tumorali AR42J. Anche se devono essere confermate in vitro in cellule embrionali umane di rene, con un test di immunofluorescenza microscopica basata su sst(2).

**CONCLUSIONI:** Questi dati indicano che il processo di internalizzazione di sst(2) in vivo dopo la stimolazione dell'agonista è veloce, estremamente efficiente, e funzionale in vivo in tessuti neoplastici e fisiologici. Questo processo molecolare potrebbe essere, perciò, responsabile nei tumori che esprimono sst(2) della captazione a lunga durata dei radioligandi di sst(2) osservati in vivo).

252: Wang CH, Zheng WB, Qiang O, Tang CW.

**Effects of non-cytotoxic drugs on the growth of multidrug-resistance human gastric carcinoma cell line.**

J Dig Dis. 2009 May;10(2):91-8. PubMed PMID: 19426390.

**Abstract**

**OBJECTIVE:** To investigate the effects of the non-cytotoxic drug (cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitor and octreotide) on growth of the multidrug-resistant human gastric carcinoma cell line SGC-7901/ADR.

**METHODS:** The effects of non-cytotoxic drug on the growth of SGC-7901 and SGC-7901/ADR cells were evaluated by (3)H-thymidine incorporation assay. The apoptosis of cells was measured by the TdT-mediated dUTP nick end-labeling assay (TUNEL) and flow cytometric assay. Western blotting was used to analysis the expression of cyclooxygenase (COX-2) protein in SGC-7901 cells and SGC-7901/ADR cells and P-glycoprotein (P-gp) from SGC-7901/ADR cells with variable treatments. Activator protein-1 binding activity was examined by electrophoretic mobility shift assay.

**RESULTS:** (3)H-thymidine incorporation into SGC-7901/ADR cells treated with celecoxib was significantly lower than that of control group (471.3 +/- 79.7 cpm vs 917.5 +/- 130.8 cpm,  $P < 0.05$ ). When combined with octreotide, celecoxib presented lower (3)H-thymidine incorporations than its used alone and decreased to 53.3% of that amount original. Either celecoxib or the combination group markedly induced apoptosis in SGC-7901/ADR cells. COX-2 protein in the SGC-7901/ADR cells was higher than in that of the SGC-7901 cells (1.543 +/- 0.052 vs 0.564 +/- 0.021,  $P < 0.05$ ). The inhibition of P-gp could be achieved with celecoxib alone and combination with octreotide (0.486 +/- 0.012, 0.252 +/- 0.014 vs 0.941 +/- 0.033,  $P < 0.05$ ). Moreover, AP-1 binding activity could be suppressed by non-cytotoxic drug and showed a synergistic effect.

**CONCLUSION:** The combination of non-cytotoxic drug significantly improved the inhibitive effects on the growth of multidrug-resistant human gastric cancer cells.

### **Effetti di farmaci non citotossici sulla crescita di una linea cellulare cancerosa gastrica umana che presenta una multidrug-resistance**

**OBIETTIVO:** Indagare gli effetti di un farmaco non citotossico (inibitore della ciclossigenasi-2 (COX-2) e octreotide) sulla crescita di una linea cellulare tumorale gastrica umana SGC-7901/ADR resistente a molti farmaci.

**METODI:** Sono stati valutati gli effetti del farmaco non citotossico sulla crescita di SGC-7901 e SGC-7901/ADR tramite il test di incorporazione della (3)H-timidina. L'apoptosi cellulare è stata misurata tramite il test TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end-labeling) e il test a flusso citometrico. Il Western blot è stato usato per analizzare l'espressione della proteina cicloossigenasi (COX-2) nelle cellule SGC-7901 e SGC-7901/ADR e la P-glicoproteina (P-gp) nelle cellule SGC-7901/ADR con diversi trattamenti. L'attività di legame dell'attivatore proteico 1 è stata esaminata tramite il test di mobilità elettroforetica.

**RISULTATI:** L'incorporazione di (3)H-timidina nelle cellule SGC-7901/ADR trattate con celecoxib è stata inferiore rispetto a quella del gruppo di controllo (471.3 +/- 79.7 cpm vs 917.5 +/- 130.8 cpm,  $P < 0.05$ ). Se combinato all'octreotide celecoxib presenta bassi livelli di incorporazione di (3)H-timidina rispetto a quando è usato da solo e il livello diminuisce del 53.3 % rispetto a quello iniziale. Nelle cellule SGC-7901/ADR sia celecoxib che la combinazione dei due induce apoptosi. I livelli della proteina COX-2 nelle cellule SGC-7901/ADR sono più alti che nelle cellule SGC-7901 (1.543 +/- 0.052 vs 0.564 +/- 0.021,  $P < 0.05$ ). L'inibizione di P-gp può avvenire con celecoxib da solo e in combinazione con octreotide (0.486 +/- 0.012, 0.252 +/- 0.014 vs 0.941 +/- 0.033,  $P < 0.05$ ). Inoltre, l'attività di AP-1 può essere soppressa dal farmaco non citotossico e mostra un effetto sinergico.

**CONCLUSIONI:** La combinazione di un farmaco non citotossico migliora significativamente gli effetti inibitori sulla crescita di cellule cancerose gastriche umane che presentano una multidrug-resistance.

253: Luboldt W, Zöphel K, Wunderlich G, Abramyuk A, Luboldt HJ, Kotzerke J.

**Visualization of somatostatin receptors in prostate cancer and its bone metastases with Ga-68-DOTATOC PET/CT.**

Mol Imaging Biol. 2010 Jan-Feb;12(1):78-84.Epub 2009 May 7. PubMed PMID: 19421819.

**PURPOSE:** To assess DOTATOC-affine somatostatin receptor expression in advanced prostate cancer and its bone metastases with regard to DOTATOC-mediated receptor therapies, using a Ga-68-DOTATOC PET/CT.

**PROCEDURES:** Twenty consecutive patients with advanced prostate cancer underwent bone scintigraphy, followed by Ga-68-DOTATOC PET/CT within 3 weeks. Through side-by-side comparison with bone scintigraphy, the number of visible bone metastases on PET was determined. In addition, in cases of visible metastases, the maximum standard uptake value (SUV(max)) of Ga-68-DOTATOC was measured in the metastases and in normal bone. In patients who did not undergo a prostatectomy (n = 12), the SUV(max) was additionally measured in the prostate and in adjacent tissue. For focal lesions, the difference in SUV(max) (Delta SUV(max)) between the metastases and normal bone was calculated. For patients still having their prostate, a Delta SUV(max) between the prostate and its adjacent tissue was calculated.

**RESULTS:** Sixty four of 216 metastases (30%) were visible in 13 patients with focal metastases. Of six patients with diffuse metastases (superscan), one showed diffuse metastases, three showed a total of ten focal metastases, and two showed no correlate on PET. One patient with a neuroendocrine prostate cancer showed no correlate on PET. The maximum Delta SUV(max) between metastases and normal bone was 4.9 (mean = 1.6 +/- 0.9) and between the prostate and adjacent tissue 5.9 (mean = 2.8 +/- 1.6).

**CONCLUSIONS:** In prostate cancer and its bone metastases, DOTATOC-affine somatostatin receptors (subtype 2 and 5) can be visualized with Ga-68-DOTATOC PET/CT. But their expression is so weak that other conjugates should be tested for receptor-mediated therapies which are better at addressing the prostate cancer-specific somatostatin receptor subtypes 1 and 4-or even other receptors.

### **Visualizzazione dei recettori della somatostatina nel cancro prostatico e le metastasi ossee tramite Ga-68-DOTATOC PET/CT.**

**SCOPO:** Valutare l'espressione del recettore della somatostatina DOTATOC-affine nel cancro prostatico avanzato e nelle metastasi ossee prestando attenzione alle terapie del recettore mediato da DOTATOC, usando la tecnica Ga-68-DOTATOC PET/CT.

**PROCEDURE:** 28 pazienti con cancro prostatico in fase avanzata hanno eseguito una scintigrafia ossea, seguita da Ga-68-DOTATOC PET/CT entro 3 settimane. Attraverso il confronto con la scintigrafia ossea, è stato determinato il numero delle metastasi ossee visibili alla PET. In aggiunta, in caso di metastasi visibili, è stato misurato nelle metastasi e nelle ossa normali il massimo valore standard di Ga-68-DOTATOC. Nei pazienti che non avevano subito una prostatectomia (n = 12), è stato misurato il valore di SUV(max) nella prostata e nei tessuti adiacenti. Per le lesioni focali, è stata calcolata la differenza nel valore di SUV(max) tra le metastasi e l'osso normale. Per i pazienti che hanno la prostata, è stato calcolato il valore di Delta SUV(max) tra la prostata e i tessuti adiacenti.

**RISULTATI:** Sono state osservate metastasi in 64 dei 216 casi (30%), in 13 pazienti metastasi focali. Dei 6 pazienti con metastasi diffuse, una ha mostrato metastasi diffuse, 3 un totale di 10 metastasi focali e due non hanno mostrato correlazione con la PET. Un paziente con cancro prostatico neuroendocrino non ha mostrato correlazione tramite la PET. Il valore massimo di Delta SUV(max) tra le metastasi e l'osso normale era di 4.9 (mean = 1.6 +/- 0.9) e tra la prostata e i tessuti adiacenti di 5.9 (mean = 2.8 +/- 1.6).

**CONCLUSIONI:** Nel cancro prostatico e nelle metastasi dell'osso, i recettori della somatostatina (sottotipi 2 e 5) DOTATOC-affini possono essere visualizzati tramite Ga-68-DOTATOC PET/CT. Ma la loro espressione è così debole che, per le terapie mediate dal recettore, dovrebbero essere

testati altri coniugati che potrebbe essere più adatti ad indirizzare i sottotipi 1 e 4 del recettore della somatostatina specifico per il cancro prostatico o altri recettori.

274: Chen JS, Liang QM, Li HS, Yang J, Wang S, Long JW.

**Octreotide inhibits growth of colonic cancer SW480 cells by modulating the Wnt/P-catenin pathway.**

Pharmazie. 2009 Feb;64(2):126-31. PubMed PMID: 19320286.

Somatostatin can suppress the growth of various tumor cells including colonic cancer. Activated Wnt/ beta-catenin signaling pathway plays a critical role in tumorigenesis and development of colorectal cancer. However, the effect of somatostatin on Wnt/beta-catenin signaling pathway remains unknown. Thus, we investigated the effect of octreotide on Wnt/beta-catenin signaling pathway in human colonic cancer cell SW480. The results of 3-(4,5-imethyl thiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) and flow cytometric assays showed that octreotide inhibited growth, induced apoptosis and arrested the G1 cell cycle of SW480 cells in a dose-dependent manner. We demonstrated that octreotide significantly up-regulated and down-regulated 13 genes and 17 genes in Wnt/beta-catenin signaling using microarray, respectively. Furthermore, as evidenced by western blot, beta-catenin protein level decreased, whereas phosphorylated beta-catenin protein level increased under octreotide. The present study reveals that octreotide can inhibit human colonic cancer cell growth through inhibition of Wnt/beta-catenin signaling pathway.

### **Octreotide inhibits growth of colonic cancer SW480 cells by modulating the Wnt/P-catenin pathway.**

La somatostatina può sopprimere la crescita di vari tumori cellulari incluso il cancro al colon. La via di segnale Wnt/ beta-catenina ha un ruolo critico nella tumorigenesi e nello sviluppo del cancro colonrettale. Tuttavia, l'effetto della somatostatina sul segnale Wnt/ beta-catenina rimane sconosciuto. Abbiamo osservato l'effetto dell'octreotide sulla via di segnale Wnt/ beta-catenina nelle cellule del cancro al colon SW480. I risultati di 3-(4,5-imethyl thiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) e del test del flusso citometrico hanno mostrato che l'octreotide inibisce la crescita, induce apoptosi e arresta le cellule SW480 in fase G1 in maniera dose-dipendente. Abbiamo dimostrato che l'octreotide regola sovra esprimendo e sotto esprimendo 13 geni e 17 geni della via del segnale Wnt/ beta-catenina usando i microarray, rispettivamente. Inoltre, come si evince dal western blot, il livello della proteina beta-catenina diminuisce, mentre sotto l'octreotide il livello della proteina beta-catenina aumenta. Il presente studio rivela che l'octreotide può inibire la crescita del cancro cellulare al colon tramite l'inibizione della via di segnale Wnt/beta-catenina.

275: Bartolomei M, Bodei L, De Cicco C, Grana CM, Cremonesi M, Botteri E, Baio SM, Aricò D, Sansovini M, Paganelli G.

### **Peptide receptor radionuclide therapy with (90)Y-DOTATOC in recurrent meningioma.**

**PURPOSE:** Meningiomas are generally benign and in most cases surgery is curative. However, for high-grade histotypes or partially resected tumours, recurrence is fairly common. External beam radiation therapy (EBRT) is usually given in such cases but is not always effective. We assessed peptide receptor radionuclide therapy (PRRT) using (90)Y-DOTATOC in a group of patients with meningioma recurring after standard treatments in all of whom somatostatin receptors were strongly expressed on meningioma cell surfaces.

**METHODS:** Twenty-nine patients with scintigraphically proven somatostatin subtype 2 receptor-positive meningiomas were enrolled: 14 had benign (grade I), 9 had atypical (grade II) and 6 had malignant (grade III) disease. Patients received intravenous (90)Y-DOTATOC for 2-6 cycles for a cumulative dose in the range of 5-15 GBq. Clinical and neuroradiological evaluations were performed at baseline, during and after PRRT.

**RESULTS:** The treatment was well tolerated in all patients. MRI 3 months after treatment completion showed disease stabilization in 19 of 29 patients (66%) and progressive disease in the remaining 10 (34%). Better results were obtained in patients with grade I meningioma than in those with grade II-III, with median time to progression (from beginning PRRT) of 61 months in the low-grade group and 13 months in the high-grade group.

**CONCLUSION:** PRRT with (90)Y-DOTATOC can interfere with the growth of meningiomas. The adjuvant role of this treatment, soon after surgery, especially in atypical and malignant histotypes, deserves further investigation.

### **Peptide terapia radionuclide recettore con (90) Y-DOTATOC in meningioma ricorrente.**

**SCOPO:** I meningiomi sono generalmente benigni e nella maggior parte dei casi l'intervento chirurgico è curativo. Tuttavia, per istotipi di alto grado o tumori parzialmente resecati, la ricorrenza è abbastanza comune. La terapia a fasci esterni di radiazioni (EBRT) è di solito dato in questi casi, ma non è sempre efficace. Abbiamo valutato la terapia del peptide (PRRT) radionuclide recettore con (90) Y-DOTATOC in un gruppo di pazienti con meningioma ricorrente dopo le terapie standard in tutti i recettori per la somatostatina dei quali sono state espresse con forza sulla superficie delle cellule del meningioma.

**METODI:** A ventinove pazienti sono stati diagnosticati due meningiomi dopo scintigrafia positiva dei sottotipi di recettori della somatostatina e sono stati successivamente arruolati per lo studio: 14 erano benigne (I grado), 9 erano atipici (grado II) e 6 erano maligni (grado III) della malattia. I pazienti hanno ricevuto per via endovenosa (90) Y-DOTATOC per 2-6 cicli per una dose cumulativa nel range di 5-15 GBq. Sono state effettuate Valutazioni cliniche e neuroradiologiche di base, durante e dopo PRRT.

**RISULTATI:** Il trattamento è stato ben tollerato in tutti i pazienti. La RM 3 mesi dopo il completamento del trattamento ha mostrato la stabilizzazione della malattia in 19 dei 29 pazienti (66%) e malattia progressiva nei rimanenti 10 (34%). I risultati migliori sono stati ottenuti nei pazienti con meningioma di I grado piuttosto che in quelli con grado II-III, con il tempo mediano alla progressione (da inizio PRRT) di 61 mesi nel gruppo con il grado inferiore e 13 mesi nel gruppo con grado superiore.

**CONCLUSIONE:** PRRT con (90) Y-DOTATOC possono interferire con la crescita dei meningiomi. Il ruolo di questo trattamento adiuvante, subito dopo l'intervento, soprattutto in istotipi atipici e maligni, merita ulteriori indagini.

276: Horiguchi K, Yamada M, Satoh T, Hashimoto K, Hirato J, Tosaka M, Yamada S, Mori M.

**Transcriptional activation of the mixed lineage leukemia-p27Kip1 pathway by a somatostatin analogue.**

**PURPOSE:** Mixed lineage leukemia (MLL) is a histone methyltransferase that activates gene transcription and associates with menin. In multiple endocrine neoplasia type 1 (Men1), a mutation of menin caused decreased expression of the p27(Kip1) and p18(Ink4C) genes and deregulated cell growth. We hypothesized that the same pathway might be involved in sporadic pituitary adenomas.

**EXPERIMENTAL DESIGN:** mRNA levels for MLL, Men1, p27(Kip1), and p18(Ink4C) were measured in specimens of several sporadic pituitary adenomas, and a search for clinical parameters revealed that octreotide treatment affected the level of expression of some genes tested. To study molecular mechanisms, we cloned and characterized the MLL promoter region and used small interfering RNA for MLL and specific inhibitors for signal transduction pathways.

**RESULTS:** A strong correlation between MLL and p27(Kip1) mRNA levels was observed in prolactinomas and growth hormone-secreting adenomas, and these levels were attenuated except in growth hormone-secreting adenomas treated with a somatostatin analogue, octreotide. Conversely, the patients treated with octreotide showed high levels of MLL-p27(Kip1) mRNA. Experiments in vitro showed that octreotide increased MLL and p27(Kip1) protein and mRNA levels, and overexpression of MLL induced a marked increase in p27(Kip1) promoter activity. Furthermore, octreotide stimulated the promoter activity of the MLL gene through phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and mitogen-activated protein kinase pathways. In addition, incubation with an inhibitor for methyltransferase, MTA, and knockdown of MLL completely inhibited the octreotide-induced expression of p27(Kip1).

**CONCLUSIONS:** The MLL-p27(Kip1) pathway was down-regulated in the pituitary adenomas, and octreotide increased the p27(Kip1) level, at least in part, by sequential transcriptional stimulation of the MLL and p27(Kip1) genes through phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and mitogen-activated protein kinase pathways

#### **Attivazione trascrizionale della leucemia ibrida acuta- p27Kip1 da parte di un analogo della somatostatina.**

**SCOPO:** MLL (leucemia a linea cellulare mista con markers mieloidi e linfoidi) è un istone metiltransferasi che attiva la trascrizione genica del gene Menin e associati. Nella neoplasia endocrina multipla di tipo 1 (MEN1), è una mutazione di menin causato dalla ridotta espressione dei geni p27 (Kip1) e p18 (Ink4C) e dal deregolamentato della crescita cellulare. Abbiamo ipotizzato che lo stesso percorso possa essere coinvolto in sporadici adenomi pituitari.

**Disegno sperimentale:** i livelli di mRNA per MLL, MEN1, p27 (Kip1) e p18 (Ink4C) sono stati misurati nei campioni di diversi adenomi pituitari sporadici, e dalla ricerca di parametri clinici è emerso che il trattamento con octreotide colpisce il livello di espressione di alcuni geni testati. Per studiare i meccanismi molecolari, abbiamo clonato e caratterizzato la regione promotore MLL e usato piccoli RNA interferenti per MLL e inibitori specifici per le vie di trasduzione del segnale

**RISULTATI:** una forte correlazione tra MLL e p27 (Kip1) i livelli di mRNA è stata osservata in prolattinomi e adenomi secernenti ormone della crescita, e questi livelli sono stati attenuati, tranne negli adenomi con secrezione di ormone della crescita trattati con un analogo della somatostatina, octreotide. Viceversa, nei pazienti trattati con octreotide ha mostrato alti livelli di MLL-p27 (Kip1) mRNA. Esperimenti in vitro hanno dimostrato che l'octreotide aumenta l' MLL e p27 (Kip1) e i livelli di proteine e di mRNA, e la sovraespressione di MLL induce un marcato aumento dell'attività del promotore di p27 (Kip1). Inoltre, l'octreotide stimola l'attività del promotore del gene MLL attraverso 3-kinase/Akt fosfatidilinositolo e ha attività mitogena nella via della proteina

chinasi. Inoltre, l'incubazione con un inibitore per metiltransferasi, MTA, inibisce completamente la-espressione di p27 indotta da octreotide (Kip1).

**CONCLUSIONI:** La via MLL-p27 (Kip1) sembra regolata negli adenomi pituitari, dall'octreotide e l'aumentato livello di p27 (Kip1), almeno in parte, è dato dalla stimolazione sequenziale trascrizionale dei geni p27 e MLL (Kip1) attraverso fosfatidilinositolo 3 -kinase/Akt nella via della proteina chinasi.

277: Barbare JC, Bouché O, Bonnetain F, Dahan L, Lombard-Bohas C, Faroux R, Raoul JL, Cattan S, Lemoine A, Blanc JF, Bronowicki JP, Zarski JP, Cazorla S, Gargot D, Thevenot T, Diaz E, Bastie A, Aparicio T, Bedenne L.

**Treatment of advanced hepatocellular carcinoma with long-acting octreotide: a phase III multicentre, randomised, double blind placebo-controlled study.**

Eur J Cancer. 2009Jul;45(10):1788-97. Epub 2009 Mar 19. PubMed PMID: 19303768.

**BACKGROUND:** A previous study reported a significant survival benefit for octreotide compared with no treatment in patients with advanced hepatocellular carcinoma (HCC). This was investigated further in this multicentre study.

**PATIENTS AND METHODS:** Two hundred and seventy two patients with HCC who were ineligible for curative treatments or had relapsed following potentially curative therapies were randomised to receive long-acting octreotide, 30 mg as an intramuscular injection once every 4 weeks for up to 2 years, or placebo.

**RESULTS:** At the time of the final analysis, median overall survival (OS) was 6.53 months (95% confidence interval [CI], 4.8-8.3) for octreotide versus 7.03 months (95% CI, 5.43-8.53) for placebo ( $p=0.34$ ). Progression-free survival ( $p=0.26$ ) also did not differ significantly between the two treatment groups. No objective responses were achieved in the octreotide group but 33% of patients achieved disease stabilisation for a mean time of 5.5 months (95% CI, 1.1-9.9). The median time until definitive global health score deterioration (according to QLQ-C30) was 2.3 months (95% CI, 1.4-3.7) in the octreotide and 4 months (95% CI, 2.2-5.7) in the placebo group ( $p=0.09$ ). There were four objective responses in the placebo group. Octreotide was well tolerated; seven patients reported severe adverse events possibly related to octreotide and there were no cases of haematoma or cholecystitis.

**CONCLUSIONS:** In patients with advanced HCC, octreotide has a favourable safety profile but does not improve OS and could have a negative impact on quality of life.

**Trattamento del carcinoma epatocellulare avanzato con octreotide a lunga azione: uno studio multicentrico di fase III, randomizzato, in doppio cieco, placebo-controllato.**

**BACKGROUND:** Uno studio precedente ha riportato un significativo vantaggio di sopravvivenza con l'octreotide rispetto a nessun trattamento nei pazienti con carcinoma epatocellulare (HCC). Ciò è stato ulteriormente analizzato in questo studio multicentrico.

**PAZIENTI E METODI:** 272 pazienti con HCC che non erano eleggibili per trattamenti curativi o avevano avuto una recidiva dopo potenziali terapie curative sono stati randomizzati a ricevere octreotide a lunga azione, 30 mg per iniezione intramuscolare una volta ogni 4 settimane per un massimo di 2 anni, o placebo.

**RISULTATI:** Al momento dell'analisi finale, la mediana di sopravvivenza globale (OS) è stato 6,53 mesi (95% intervallo di confidenza [CI], 4,8-8,3) per l'octreotide versus 7,03 mesi (95% CI, 5,43-8,53) per il placebo ( $p = 0,34$ ). Anche la sopravvivenza libera da progressione ( $p = 0,26$ ) non differiva significativamente tra i due gruppi di trattamento. No ci sono state risposte obiettive nel gruppo dell'octreotide, ma il 33% dei pazienti ha raggiunto la stabilizzazione della malattia per un tempo medio di 5,5 mesi (95% CI, 1,1-9,9). Il tempo mediano fino al definitivo deterioramento globale (secondo QLQ-C30) è stato di 2,3 mesi (95% CI, 1,4-3,7) nell' octreotide e di 4 mesi (95% CI, 2,2-5,7) nel gruppo placebo ( $p = 0,09$ ). C'erano quattro risposte obiettive nel gruppo placebo. Octreotide è stato ben tollerato, sette pazienti hanno riportato eventi avversi gravi, possibilmente correlati alla octreotide e non ci sono stati casi di ematoma o colecistite.

**In conclusione,** nei pazienti con carcinoma epatocellulare avanzato, l'octreotide ha un profilo di

sicurezza favorevole, ma non migliora OS e potrebbe avere un impatto negativo sulla qualità della vita.

282: Iten F, Muller B, Schindler C, Rasch H, Rochlitz C, Oertli D, Maecke HR, Muller-Brand J, Walter MA.

## **[(90)Yttrium-DOTA]-TOC response is associated with survival benefit in iodine-refractory thyroid cancer: long-term results of a phase 2 clinical trial.**

Cancer. 2009 May 15;115(10):2052-62. PubMed PMID:19280592.

**BACKGROUND:** The authors aimed to explore the efficacy of (90)Yttrium-1,4,7,10-tetraazacyclododecane N,N',N'',N'''-tetraacetic acid [(90)Y-DOTA]-Tyr(3)-octreotide (TOC) in advanced iodine-refractory thyroid cancer.

**METHODS:** In a phase 2 trial, the authors investigated biochemical response (assessed by serum thyroglobulin levels), survival, and the long-term safety profile of systemic [(90)Y-DOTA]-TOC treatment in metastasized iodine-refractory thyroid cancer. Adverse events were assessed according to the National Cancer Institute criteria. Survival analyses were performed by using multiple regression models.

**RESULTS:** A total of 24 patients were enrolled. A median cumulative activity of 13.0 GBq (range, 1.7-30.3 GBq) was administered. Response was found in 7 (29.2%) patients. Eight (33.3%) patients developed hematologic toxicity grade 1-3, and 4 (16.7%) patients developed renal toxicity grade 1-4. The median survival was 33.4 months (range, 3.6-126.8 months) from time of diagnosis and 16.8 months (range, 1.8-99.1 months) from time of first [(90)Y-DOTA]-TOC treatment. Response to treatment was associated with longer survival from time of diagnosis (hazard ratio [HR], 0.17; 95% confidence interval [CI], 0.03-0.92; P = .04) and from time of first [(90)Y-DOTA]-TOC therapy (HR, 0.20; 95% CI, 0.04-0.94; P = .04). The visual grade of scintigraphic tumor uptake was not associated with treatment response (odds ratio [OR], 0.98; 95% CI, 0.26-3.14; P = 1.00).

**CONCLUSIONS:** Response to [(90)Y-DOTA]-TOC in metastasized iodine-refractory thyroid cancer was associated with longer survival. Upcoming trials should aim to increase the number of treatment cycles.

### **La risposta a Itrio 90-DOTATOC è associata a benefici di sopravvivenza nel tumore della tiroide refrattario allo Iodio**

Uno studio di fase II ha valutato l'efficacia di (90)Y-DOTA-Tyr(3)-octreotide ( TOC ) nel tumore della tiroide avanzato e refrattario allo Iodio.

E' stata valutata la risposta biochimica ( in base ai livelli sierici di tiroglobulina ), la sopravvivenza e il profilo di sicurezza a lungo termine del trattamento sistemico con 90Y-DOTATOC nel cancro metastatico della tiroide refrattario allo Iodio.

Gli eventi avversi sono stati valutati in accordo ai criteri del National Cancer Institute ( NCI ).

In totale sono stati arruolati nello studio 24 pazienti ai quali è stata somministrata un'attività cumulativa mediana di 13 GBq ( intervallo, 1.7-30.3 GBq ). Sono state osservate risposte in 7 ( 29.2% ) pazienti.

Otto ( 33.3% ) pazienti hanno sviluppato tossicità ematologica di grado 1-3 e 4 ( 16.7% ) pazienti tossicità renale di grado 1-4.

La sopravvivenza mediana è stata di 33.4 mesi dal momento della diagnosi e 16.8 mesi dal momento del primo trattamento con 90Y-DOTATOC.

La risposta al trattamento è risultata associata a una maggiore sopravvivenza dal momento della

diagnosi ( hazard ratio [ HR ] 0.17; P=0.04 ) e dal momento del primo trattamento con 90Y-DOTA-TOC ( HR=0.20; P=0.04 ).

Il grado virtuale di assorbimento del tumore alla scintigrafia non è risultato associato a risposta al trattamento ( odds ratio [ OR ] 0.98; P=1 ).

In conclusione, la risposta a 90Y-DOTATOC nel tumore della tiroide metastatico e refrattario allo Iodio è risultata associata a una maggiore sopravvivenza.

### **Radiological imaging change in a malignant bowel obstruction patient treated with octreotide.**

Support Care Cancer. 2009Jun;17(6):753-5. Epub 2009 Mar 11. PubMed PMID: 19277723.

**INTRODUCTION:** Malignant bowel obstruction (MBO) is a complication in advanced cancer patients with abdominal and pelvic malignancy. Recent research has established the efficacy of octreotide for MBO-related symptom relief. The mechanism that octreotide increases water absorption in case of MBO has not been demonstrated except for experimental animal and normal human model. **CASE REPORT:** We present a 60-year-old man with pancreatic cancer and MBO treated with octreotide. Radiological imaging showed the disappearance of large-volume fluid retention in the small intestine with alleviating vomiting within 2 days. This radiological change might result from the effect of octreotide increasing water absorption in intestine tract.

### **Cambiamento di imaging radiologico in un paziente con occlusione intestinale maligno trattati con octreotide**

**INTRODUZIONE:** L'occlusione intestinale maligna (MBO) è una complicanza nei pazienti con cancro avanzato con malignità addominale e pelvica. Recenti ricerche hanno stabilito l'efficacia di octreotide per il sollievo dei sintomi MBO-related. Il meccanismo attraverso il quale l'octreotide aumenta l'acqua di assorbimento in caso di gestione buy-out non è stato dimostrato, tranne che per gli animali sperimentali e un modello umano normale. **RAPPORTO DI CASO:** Presentiamo un uomo di 60 anni con carcinoma del pancreas e MBO trattati con octreotide. L'imaging radiologico ha mostrato la scomparsa di ritenzione di liquidi di grandi volumi nel piccolo intestino con diminuzione degli episodi di vomito entro 2 giorni. Questo cambiamento radiologico potrebbe derivare dagli effetti dell'octreotide e l'aumento di assorbimento di acqua nel tratto intestinale.

284: Ferone D, Montella L, De Chiara A, Hofland LJ, Lamberts SW, Palmieri G.

### **Somatostatin receptor expression in thymic tumors.**

Front Biosci. 2009 Jan1;14:3304-9. PubMed PMID: 19273275.

Detection of thymic tumors by (111In-DTPA0)octreotide scintigraphy and the antitumor effect exerted by somatostatin (SS) analogs suggest significant expression of SS receptors (SSRs) in these tumors. We measured SSR subtype (sst)2A and sst3 expression by immunohistochemistry (IHC) in 14 thymic tumors previously studied by SSR scintigraphy (SRS). Scintigraphy showed significant (111In-DTPA0)octreotide uptake in 13/14 tumors (tumor-to-background ratios: 1.4- to 6-fold). By IHC, 4 tumors were positive for sst2A and sst3; two for sst2A and five tumors for sst3. Three tumors were completely negative. Overall, 11/14 (approximately 78% of cases) expressed at least one SSR subtype. Staining was highly heterogeneous: sst2A was confined to malignant epithelial cells or within stromal structures, and sst3 was predominantly associated with thymocytes. SRS provides immediate visualization of primary and metastatic lesions, while IHC reveals SSR subtype expression. This joined approach could help to select SS analogs beneficial for therapy.

### **Espressione dei recettori della somatostatina nei tumori del timo.**

La valutazione dei tumori del timo tramite la scintigrafia (111In-DTPA0)octreotide e gli effetti antitumorali esercitati dagli analoghi della somatostatina suggeriscono che in questi tumori vi sia un'espressione significativa dei recettori SS(SSRs). Abbiamo misurato l'espressione dei sottotipi 2A e sst3 tramite la immunostochimica (IHC) in 14 tumori del timo precedentemente studiati tramite la scintigrafia SSR (SRS). La scintigrafia ha mostrato una captazione di (111In-DTPA0)octreotide significativa in 13/14 tumori. Tramite IHC, 4 tumori erano positivi per sst2A and sst3; 2 per sst2A e 5 tumori per sst3. Tre tumori erano completamente negativi. 11/14 esprimevano almeno uno dei sottotipi SSR. La colorazione era eterogenea: sst2A era confinato a cellule epiteliali maligne o entro le strutture stromali, e sst3 associato ai timociti. SRS migliora la visualizzazione di lesioni primarie o metastatiche, mentre IHC ha rivelato l'espressione del sottotipo SSR . Questo approccio può aiutare a selezionare analoghi di SS utili per la terapia.

**Highlights of regional meeting of Italian Southern Oncological Group (GOIM): focus on hepatocellular carcinoma: biological and clinical background, therapeutic guide-lines and perspectives.**

7 November 2008, Naples, Italy. Expert Opin Investig Drugs. 2009 Mar;18(3):373-8. PubMed PMID: 19243288.

This Italian meeting, co-sponsored by the Italian Southern Oncological Group (GOIM), focused on different aspects of hepatocellular carcinoma (HCC). Topics included epidemiological studies, identification of environmental and genetic risk factors, the molecular mechanisms of pathogenesis, new diagnostic approaches and standard and novel treatment modalities. HCC remains a major health problem worldwide. It is the fifth most common cancer in the world, and the third most common cause of cancer-related death. The goal of HCC management is 'cancer control', reduction in its incidence and mortality as well as improvement in the quality of life of patients with HCC and their families. HCC epidemiology in Campania and the role of hepatitis viruses C and B in the pathogenesis of this cancer were described. Subsequently, state of the art and perspectives on the transduction pathways as therapeutic targets in HCC were evaluated. Another session was about HCC diagnosis by imaging techniques. The last session was dedicated to clinical treatment of this cancer, the role of liver transplantation, surgical resection, loco-regional procedures and systemic treatment modalities. Finally, the final results of the So.Lar. study on the Sorafenib + octreotide long-acting release (LAR) combination were presented.

**Highlights di un meeting regionale del Gruppo Oncologico del Sud Italia (GOIM): focus on carcinoma epatocellulare: background biologico e clinico, , line-guida terapeutiche e prospettive.**

Questo meeting italiano, co-sponsorizzato dal Gruppo Oncologico del Sud Italia, si è concentrato sui differenti aspetti del carcinoma epatocellulare (HCC). Gli argomenti includevano studi epidemiologici, identificazione di fattori di rischio ambientali e genetici, il meccanismo molecolare della patogenesi, approcci diagnostici nuovi e modalità di trattamento nuovi e standard. HCC rimane il più grande problema di salute mondiale. E' il quinto tra i più comuni tumori nel mondo, e la terza causa di morte collegata al cancro. L'obiettivo della gestione di HCC è il cancer control, la riduzione della incidenza e della mortalità come il miglioramento della qualità di vita dei pazienti con HCC e delle loro famiglie. E' stata descritta l'epidemiologia di HCC in Campania e il ruolo dei virus epatitici C e B nella patogenesi di questo cancro. Successivamente, sono stati valutati lo stato dell'arte e le prospettive delle vie di trasduzione del segnale come target terapeutici. Un'altra sessione riguardava la diagnosi di HCC tramite le immagini. L'ultima sessione era dedicata al trattamento clinico di questo tumore, il ruolo del trapianto di fegato, la resezione chirurgica, le procedure in loco e le modalità di trattamento sistemico. Infine, sono stati presentati i risultati finali dello studio So.Lar. sull'uso di Sorafenib + octreotide long-acting release (LAR).

293: Erten C, Karaca B, Kucukzeybek Y, Gorumlu G, Cengiz E, Gul MK, Atmaca H, Uzunoglu S, Karabulut B, Sanli UA, Uslu R.

**Regulation of growth factors in hormone- and drug-resistant prostate cancer cells by synergistic combination of docetaxel and octreotide.**

BJU Int. 2009 Jul;104(1):107-14. Epub 2009 Feb 3. PubMed PMID: 19191785.

**OBJECTIVE** To evaluate the effects of combined treatment with docetaxel and octreotide, a somatostatin analogue, on human hormone- and drug-refractory prostate cancer cell lines, PC-3 and DU-145, and on some growth factors related to tumour growth and angiogenesis in prostate cancer. **MATERIALS AND METHODS** A cell proliferation assay was used to assess the cytotoxicity of the drugs. To verify apoptosis, both DNA fragmentation (by enzyme-linked immunosorbent assay) and caspase 3/7 activity were measured. We also investigated the effect of combined docetaxel and octreotide on growth factors secreted from prostate cancer cells using a human growth factor antibody array. **RESULTS** The combination of docetaxel and octreotide resulted in significant synergistic cytotoxic activity and apoptosis, which was dose- and time-dependent. The combined treatment also resulted in significantly less secretion of stem cell factor and platelet-derived growth factor-AB in PC-3 cells, and transforming growth factor-beta and basic fibroblast growth factor in DU-145 cells, than in untreated controls. **CONCLUSION** Octreotide, a somatostatin analogue, combined with docetaxel might provide a rationale treatment option for hormone-refractory prostate cancer cells, not only by direct inhibition of cell proliferation but also by inhibiting the secretion of growth factors.

**Regolazione dei fattori di crescita nelle cellule cancerose prostatiche ormoni e farmaco-resistenti tramite la combinazione sinergica di docetaxel e octreotide**

**OBIETTIVI:** Valutare gli effetti del trattamento combinato con docetaxel e octreotide, un analogo della somatostatina, sulle cellule cancerose prostatiche refrattarie ai farmaci e agli ormoni umani, PC-3 e DU-145, e su alcuni fattori di crescita legati alla crescita tumorale e all'angiogenesi nel cancro prostatico.

**MATERIALI E METODI:** Un test di proliferazione cellulare è stato usato per valutare la citotossicità dei farmaci. Per verificare l'apoptosi, sono state misurate la frammentazione del DNA e l'attività delle caspasi 3/7. Abbiamo anche indagato l'effetto dell'uso combinato del docetaxel e octreotide sui fattori di crescita secreti dalle cellule cancerose prostatiche usando un anticorpo umano anti-fattore di crescita.

**RISULTATI:** La combinazione di docetaxel e octreotide è risultata in un'attività citotossica sinergica e apoptosi, che era tempo e dose-dipendente. Il trattamento combinato ha portato a una diminuzione della secrezione dei fattori delle cellule staminali e dei fattori di crescita AB derivato dalle piastrine nelle cellule PC-3, e alla trasformazione del fattore di crescita beta e del fattore di crescita dei fibroblasti nelle cellule DU-145 rispetto ai controlli non trattati.

**CONCLUSIONI:** L'octreotide, un analogo della somatostatina, combinato con docetaxel può migliorare il trattamento delle cellule cancerose prostatiche refrattarie all'ormone, non solo tramite l'inibizione diretta della proliferazione cellulare ma anche tramite l'inibizione della secrezione dei fattori di crescita.

**Malignant irreversible intestinal obstruction: the powerful association of octreotide to corticosteroids, antiemetics, and analgesics.**

Am J Hosp Palliat Care. 2009 Apr-May;26(2):84-8. Epub 2008 Dec 16. PubMed PMID: 19088264.

In the case of malignant intestinal obstruction, surgery often carries important mortality and morbidity risks, and feasibility is neither realistic nor reasonable. A total of 4 clinical cases of intestinal obstruction caused by advanced gastrointestinal cancers in their terminal phase are described. The association of analgesics, corticosteroids, antiemetics, and octreotide was effective to relieve symptoms of intestinal obstruction for the remaining lifetime. The insertion of a nasogastric tube was avoided in 3 of 4 cases. Death occurred 51, 56, and 64 days after clinical and radiological diagnosis of irreversible intestinal obstruction. This combination of drugs appears very powerful and well tolerated. The relatively long survival that was observed should encourage future studies of longer half-life somatostatin analogues with no need of continuous infusion or multiple daily injections.

**Ostruzione intestinale irreversibile maligna: l'associazione potente dell'octreotide ai corticosteroidi, antiemetici e analgesici.**

Nel caso di ostruzione intestinale maligna, la chirurgia spesso porta a rischi alti di mortalità e morbilità, e la praticabilità non è né realistica né ragionevole. Sono descritti 4 casi di ostruzione intestinale causata da cancro gastrointestinale in fase avanzata nella fase terminale. L'associazione di analgesici, corticosteroidi, antiemetici e octreotide allevia sintomi dell'ostruzione intestinale. L'inserzione di un tubo naso gastrico è stata evitata in 3 o 4 casi. La morte avviene 51, 56 e 64 giorni dopo la diagnosi clinica e radiologica di ostruzione intestinale irreversibile. Questa combinazione di farmaci appare molto potente e ben tollerata. La sopravvivenza relativa che è stata osservata dovrebbe incoraggiare studi futuri su analoghi della somatostatina per evitare il bisogno di iniezioni giornaliere o infusioni continue.

**Octreotide uptake in intracranial metastasis of pancreatic ductal adenocarcinoma origin in a patient with a prolonged clinical course.**

Dig Dis Sci.2009 Jan;54(1):188-90. Epub 2008 Nov 5. PubMed PMID: 18985450.

We describe a case with prolonged survival of 2 years in a female patient with pancreatic ductal adenocarcinoma who, at diagnosis, already had liver spread and eventually succumbed to brain metastases which scanned positive with [(111)In-DTPA] octreotide scintiscan (OctreoScan). Subsequently, the patient underwent a craniotomy for resection of the metastases, but her condition deteriorated. A chromogranin A stain was negative, showing that there was no neuroendocrinal component to the cerebral secondaries. In contrast, tumor labeling with a monoclonal antibody associated with a favorable prognosis in pancreatic neoplasms was positive. There is mounting evidence that somatostatin receptor status confers a relatively favorable prognosis in pancreatic adenocarcinoma, although OctreoScan-positive brain metastases have not been previously reported.

**Captazione dell'octreotide in metastasi intracraniche dell'adenocarcinoma duttale pancreatico originato in un paziente con corso clinico prolungato**

Abbiamo descritto un caso con sopravvivenza di 2 anni in un paziente donna con adenocarcinoma pancreatico che, alla diagnosi, presentava già metastasi diffuse al fegato e al cervello positiva allo scanner con [(111)In-DTPA] octreotide scintiscan (OctreoScan). Successivamente, il paziente ha subito una craniotomia per la resezione delle metastasi, ma le sue condizioni sono peggiorate. La colorazione con cromogranina A era negativa, mostrando che non c'era una componente neuroendocrina nelle manifestazioni cerebrali secondarie. In contrasto, un anticorpo monoclonale associato con una prognosi favorevole in neoplasie pancreatiche evidenziava il tumore. Ci sono molte evidenze che nell'adenocarcinoma pancreatico il recettore della somatostatina conferisca una prognosi relativamente favorevole, sebbene non siano state evidenziate metastasi cerebrali positive all'OctreoScan.

**Paclitaxel-octreotide conjugates in tumor growth inhibition of A549 human non-small cell lung cancer xenografted into nude mice.**

Eur J Pharmacol. 2008 Dec 28;601(1-3):23-9. Epub 2008 Oct 28. PubMed PMID: 18983839.

Targeted chemotherapy is a novel approach to cancer therapies. This study evaluated the anti-tumor effects of conjugates made by coupling cytotoxic paclitaxel to the somatostatin analog octreotide in A549 human non-small-cell lung cancer (NSCLC) cells xenografted into nude mice. Two cytotoxic somatostatin analogs, paclitaxel-octreotide and 2paclitaxel-octreotide, were prepared by the coupling of one or two paclitaxel molecules with an octreotide molecule. A549 xenografts expressed mRNAs for type 1, 2, 4, and 5 somatostatin receptors. Immunohistology revealed that type 2 somatostatin receptors were mainly located in tumor cell membrane but type 5 somatostatin receptors were found in tumor cell membrane and cytoplasm. Significant tumor growth inhibition was achieved by 2paclitaxel-octreotide at 150 nM/kg and 300 nM/kg. 2paclitaxel-octreotide also significantly extended the tumor doubling time and significantly reduced tumor microvessel density at these doses. Moreover, there was more fragmented DNA in the 2paclitaxel-octreotide single and double dose groups than in the controls. Paclitaxel was ineffective and more toxic than the conjugate as shown by the significant decline of body weight in Paclitaxel group on Days 6, 12, and 26 compared to those treated with 2paclitaxel-octreotide ( $P < 0.05$ ). White blood cell counts in the paclitaxel single and double dose groups were also significantly less than in the controls ( $P < 0.05$ ). In conclusion, the targeting conjugate 2paclitaxel-octreotide made by coupling two molecules of cytotoxic paclitaxel to one somatostatin analog octreotide could enhance tumor growth inhibition and reduce toxicity in comparison to using the cytotoxic paclitaxel alone.

**Coniugati paclitaxel-octreotide nell'inibizione della crescita tumorale di cellule di cancro umane A549 non a piccole cellule xeno trapiantate in topi nudi.**

La chemioterapia mirata è un nuovo approccio alle terapie per il cancro. Questo studio ha valutato gli effetti anti-tumorali dei coniugati costituiti dall'accoppiamento del paclitaxel citotossico all'analogo della somatostatina, l'octreotide, in cellule cancerose polmonari non a piccole cellule A549 xenotrapiantate in topi nudi. Due analoghi della somatostatina citotossici, paclitaxel-octreotide e 2paclitaxel-octreotide, sono stati preparati tramite l'accoppiamento di uno o due molecole di paclitaxel con una molecola di octreotide. I topi xenotrapiantati con A549 esprimono mRNAs dei tipi 1, 2, 4, e 5 dei recettori della somatostatina. L'immunoistologia ha rivelato che i recettori della somatostatina di tipo 2 sono localizzati principalmente nelle membrane cellulari del tumore e nel citoplasma. L'inibizione della crescita tumorale è raggiunta tramite 2paclitaxel-octreotide at 150 nM/kg e 300 nM/kg. 2paclitaxel-octreotide estende significativamente il tumore con tempo doppio e, a queste dosi, riduce la densità dei microvasi del tumore. Sono stati osservati più frammenti di DNA nei gruppi con singola o doppia dose di 2paclitaxel-octreotide rispetto ai controlli. Paclitaxel è inefficace e più tossico rispetto ai coniugati come mostrato dalla diminuzione significativa del peso corporeo nel gruppo Paclitaxel ai giorni 6, 12 e 26 se confrontato con quelli trattati con 2paclitaxel-octreotide ( $P < 0.05$ ). La conta dei globuli bianchi nel gruppo paclitaxel a singola e doppia dose risulta meno significativa che nei controlli ( $P < 0.05$ ). In conclusione, 2paclitaxel-octreotide costituito da due molecole di paclitaxel citotossico e una di octreotide, analogo della somatostatina, può aumentare l'inibizione della crescita tumorale e ridurre la tossicità se confrontato all'uso del paclitaxel citotossico da solo.

Lamberts SW, Hofland LJ.

**Differential regulation of human dopamine D2 and somatostatin receptor subtype expression by glucocorticoids in vitro.**

J Mol Endocrinol. 2009 Jan;42(1):47-56. Epub 2008 Oct 13. PubMed PMID: 18852217.

Dopamine agonists (DA) and somatostatin (SS) analogues have been proposed in the treatment of ACTH-producing neuro-endocrine tumours that cause Cushing's syndrome. Inversely, glucocorticoids (GCs) can differentially influence DA receptor D(2) or SS receptor subtype (sst) expression in rodent models. If this also occurs in human neuro-endocrine cells, then cortisol-lowering therapy could directly affect the expression of these target receptors. In this study, we investigated the effects of the GC dexamethasone (DEX) on D(2) and sst expression in three human neuro-endocrine cell lines: BON (carcinoid) and TT (medullary thyroid carcinoma) versus DMS (small cell lung cancer), which is severely GC resistant. In BON and TT, sst(2) mRNA was strongly down-regulated in a dose-dependent manner (IC(50) 0.84 nM and 0.16 nM), whereas sst(5) and especially D(2) were much more resistant to DEX treatment. Sst(2) down-regulation was abrogated by a GC receptor antagonist and reversible in time upon GC withdrawal. At the protein level, DEX also induced a decrease in the total number of SS (-52%) and sst(2)-specific (-42%) binding sites. Pretreatment with DEX abrogated calcitonin inhibition by sst(2)-preferring analogue octreotide in TT. In DMS, DEX did not cause significant changes in the expression of these receptor subtypes. In conclusion, we show that GCs selectively down-regulate sst(2), but not D(2) and only to a minor degree sst(5) in human neuro-endocrine BON and TT cells. This mechanism may also be responsible for the low expression of sst(2) in corticotroph adenomas and underwrite the current interest in sst(5) and D(2) as possible therapeutic targets for a medical treatment of Cushing's disease.

**Regolazione differenziale della dopamina umana D2 e dell'espressione del sottotipo del recettore della somatostatina tramite i glucocorticoidi in vitro.**

Nel trattamento nei tumori neuroendocrini produttori di ACTH che causano la sindrome di Cushing sono stati proposti gli agonisti della dopamina (DA) e gli analoghi della somatostatina. Viceversa, i glucocorticoidi (GCs) possono influenzare differenzialmente il recettore DA di D(2) o l'espressione del sottotipo del recettore SS in modelli murini. Se questo accade anche nelle cellule neuroendocrine umane, la terapia per abbassare il colesterolo può influenzare direttamente l'espressione di questi recettori. In questo studio, abbiamo indagato gli effetti del dexametasone GC (DEX) su D(2) e sull'espressione di sst in 3 linee cellulari umane neuroendocrine: BON (carcinoid) e TT (carcinoma midollare tiroideo) contro DMS (tumore polmonare a piccole cellule), che è resistente a GC. In BON and TT, sst(2) mRNA è fortemente sotto regolato in un modo dose-dipendente (IC(50) 0.84 nM and 0.16 nM), mentre sst(5) e D(2) sono più resistenti al trattamento DEX. La sottoregolazione di Sst(2) è abrogata dall'antagonista al recettore GC e reversibile nel tempo dopo l'annullamento di GC. A livello proteico, DEX induce anche una diminuzione nel numero di SS (-52%) e dei siti di legame sst(2)-specifici (-42%). In TT un pretrattamento con DEX causa una inibizione della calcitonina tramite l'analogo, octreotide. In DMS, DEX non causa cambiamenti significativi nell'espressione di questi sottotipi recettoriali. In conclusione, abbiamo mostrato che nelle cellule umane neuroendocrine TT e BON GCs sotto regola selettivamente sst(2), ma non D(2) e solo in grado minore sst(5). Questo meccanismo potrebbe essere responsabile della bassa espressione di sst(2) negli adenomi corticotrofi e assicura l'interesse in sst(5) and D(2) come possibili target terapeutici per il trattamento nella sindrome di Cushing.

319: Astner ST, Bundschuh RA, Beer AJ, Ziegler SI, Krause BJ, Schwaiger M, Molls M, Grosu AL, Essler M.

## **Assessment of tumor volumes in skull base glomus tumors using Gluc-Lys[(18)F]-TOCA positron emission tomography.**

Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2009 Mar 15;73(4):1135-40. Epub 2008 Sep 9. PubMed PMID: 18786781.

**PURPOSE:** To assess a threshold for Gluc-Lys[(18)F]-TOCA positron emission tomography (PET) in target volume delineation of glomus tumors in the skull base and to compare with MRI-based target volume delineation.

**METHODS AND MATERIALS:** The threshold for volume segmentation in the PET images was determined by a phantom study. Nine patients with a total of 11 glomus tumors underwent PET either with Gluc-Lys[(18)F]-TOCA or with (68)Ga-DOTATOC (in 1 case). All patients were additionally scanned by MRI. Positron emission tomography and MR images were transferred to a treatment-planning system; MR images were analyzed for lesion volume by two observers, and PET images were analyzed by a semiautomated thresholding algorithm.

**RESULTS:** Our phantom study revealed that 32% of the maximum standardized uptake value is an appropriate threshold for tumor segmentation in PET-based target volume delineation of gross tumors. Target volume delineation by MRI was characterized by high interobserver variability. In contrast, interobserver variability was minimal if fused PET/MRI images were used. The gross tumor volumes (GTVs) determined by PET (GTV-PET) showed a statistically significant correlation with the GTVs determined by MRI (GTV-MRI) in primary tumors; in recurrent tumors higher differences were found. The mean GTV-MRI was significantly higher than mean GTV-PET. The increase added by MRI to the common volume was due to scar tissue with strong signal enhancement on MRI.

**CONCLUSIONS:** In patients with glomus tumors, Gluc-Lys[(18)F]-TOCA PET helps to reduce interobserver variability if an appropriate threshold for tumor segmentation has been determined for institutional conditions. Especially in patients with recurrent tumors after surgery, Gluc-Lys[(18)F]-TOCA PET improves the accuracy of GTV delineation.

## **Valutazione del volume del tumore nei tumori della base del globo usando la tomografia ad emissione di positroni Gluc-Lys[(18)F]-TOCA**

**SCOPO:** Valutare la soglia tramite la tomografia ad emissione di positroni Gluc-Lys[(18)F]-TOCA nella delineazione del volume target dei tumori del globo nello scheletro di base e confrontare con la delineazione del volume target tramite la MRI.

**METODI E MATERIALI:** La soglia per la segmentazione del volume nelle immagini PET è stata determinata da uno studio fantasma. Nove pazienti su 11 con tumori del globo hanno eseguito PET con Gluc-Lys[(18)F]-TOCA o con (68)Ga-DOTATOC (in 1 caso). Tutti i pazienti sono stati scansionati con MRI. Le immagini di tomografia ad emissione di positroni e MR sono state trasferite a un sistema di trattamento pianificato; le immagini MR sono state analizzate per lesioni di volume da due osservatori, e le immagini della PET sono state analizzate tramite un algoritmo di determinazione della soglia semiautomatico.

**RISULTATI:** Il nostro studio fantasma ha rivelato che 32% del massimo valore standard di captazione è un'appropriato valore soglia per la segmentazione del tumore nella delineazione del volume target basato sulla PET di grossi tumori. La delineazione del volume target tramite MRI è caratterizzata da una variabilità alta. In contrasto, la variabilità è minima se si usano le due tecniche PET/MRI. I volumi grandi del tumore (GTVs) determinati dalla PET (GTV-PET) hanno mostrato una correlazione statisticamente significativa con GTVs determinati da MRI (GTV-MRI) nei tumori primari; nei tumori ricorrenti sono state trovate elevate differenze. La media GTV-MRI era significativamente più alta della media GTV-PET. L'aumento aggiunto da MRI al volume comune è dovuto alla cicatrice del tessuto con forti segnali di aumento su MRI.

CONCLUSIONI: Nei pazienti con tumori del glomo, Gluc-Lys[(18)F]-TOCA PET aiuta a ridurre la variabilità se viene determinata un'appropriata soglia per la segmentazione tumorale. Specialmente nei pazienti con tumori ricorrenti dopo la chirurgia, Gluc-Lys[(18)F]-TOCA PET migliora l'accuratezza della delineazione di GTV.

**Insulin-like growth factor-1 is essential to the increased mortality caused by excess growth hormone: a case of thyroid cancer and non-Hodgkin's lymphoma in a patient with pituitary acromegaly.**

Med Oncol. 2009;26(1):62-6. Epub 2008 Jul 29. PubMed PMID: 18663612.

The effects of growth hormone are mediated in part by stimulating the production of insulin-like growth factor-1. Insulin-like growth factor-1 has significant effects on cell proliferation and differentiation, it is a potent mitogen, and it is a powerful inhibitor of programmed cell death (apoptosis). Insulin-like growth factor-1 also has a well-established role in the transformation of normal cells to malignant cells. Case reports on a possible association between elevated growth hormone and cancer risk in a variety of patient groups have been published. Here, we describe clinical and laboratory findings for a patient with acromegaly who first developed thyroid cancer, and then, in the follow up period, probably due to poorly controlled insulin-like growth factor-1 levels, developed a large cell non-Hodgkin's lymphoma. A search revealed that a case with these peculiarities had not previously been reported.

**Il fattore di crescita insulino-simile-1 è determinante per l'aumento di mortalità causato da eccesso di ormone della crescita: un caso di tumore alla tiroide e l'linfoma non-Hodgkin nei pazienti con acromegalia pituitaria.**

Gli effetti dell'ormone della crescita sono mediati in parte stimolando la produzione del fattore di crescita insulino-simile-1. Il fattore di crescita insulino-simile-1 ha effetti significativi sulla proliferazione e differenziazione cellulare, è un potente mitogeno, ed è un potente inibitore della morte cellulare programmata (apoptosi). Fattore di crescita insulino-simile-1 ha anche un ruolo ben definito nella trasformazione di cellule normali in cellule maligne. Sono stati pubblicati casi clinici su una possibile associazione tra l'ormone della crescita elevata e rischio di cancro in una varietà di gruppi di pazienti. Qui, descriviamo i risultati clinici e di laboratorio per un paziente con acromegalia, che per primi hanno sviluppato un cancro alla tiroide, e poi, nel periodo di follow up, probabilmente a causa di un mancato controllo dei livelli del fattore di crescita insulino-simile-1, ha sviluppato un linfoma non-Hodgkin. Una ricerca ha rivelato che casi con queste caratteristiche non sono stati precedentemente segnalati.

## **Somatostatin-dopamine ligands in the treatment of pituitary adenomas.**

Rev Endocr Metab Disord. 2009 Jun;10(2):83-90. Epub 2008 Jul 24. Review. PubMed PMID: 18651224.

Somatostatin receptors (sst1-5) and dopamine receptor 2 (D2DR) are well expressed and co-localized in several human pituitary adenomas, suggesting possible functional interactions in the control of hormonal hypersecretion and tumor cell growth. The present review describes the expression and functionality of these receptors in the different classes of human pituitary adenomas. The sst2 agonists, octreotide and lanreotide, control GH hypersecretion and tumor growth in about 65% of somatotropinomas. The D2DR agonists, bromocriptine and cabergoline, control about 90% of prolactinomas. Such drugs are much less effective in the control of the others pituitary adenomas also expressing ssts and D2DR receptors. The second part summarizes the current knowledge on new chimeric compounds with sst2, sst5, and D2DR affinity. Such ligands bearing distinct ssts and DRD2 pharmacophores may synergistically produce an increased control of secretion and/or of proliferation in the different types of pituitary adenomas. The mechanisms of action of such chimeric molecules through increased binding affinities, prolonged bioavailability, ligand-induced modulation of receptors heterodimerization, are discussed.

### **I ligandi somatostatina e dopamine nell'adenoma pituitario**

Recettori della somatostatina (sst1-5) e della dopamina 2 (D2DR) sono ben espressi e co-localizzati in diversi adenomi ipofisari umani, suggerendo possibili interazioni funzionali nel controllo di ipersecrezione ormonale e crescita delle cellule tumorali. La revisione attuale descrive l'espressione e la funzionalità di questi recettori in diverse classi di adenomi pituitari umani. Sst2, octreotide e lanreotide, sono agonisti nel controllo della crescita del tumore in circa il 65% dei somatotropinomi. D2DR, bromocriptina e cabergolina, controllano circa il 90% dei prolattinomi. Tali farmaci sono molto meno efficaci nel controllo degli altri adenomi pituitari esprimendo anche i recettori SST e D2DR. La seconda parte riassume le attuali conoscenze di nuovi composti chimerici con sst2, sst5, e l'affinità D2DR. Tali leganti ssts distinti e farmacofori DRD2 possono sinergicamente produrre un maggiore controllo della secrezione e / o di proliferazione in diversi tipi di adenomi pituitari. I meccanismi di azione di tali molecole chimeriche attraverso una maggiore affinità di legame, prolungata la biodisponibilità, eterodimerizzazione ligando-modulazione indotta di recettori, sono discussi.

## **Somatostatin and dopamine receptors as targets for medical treatment of Cushing's Syndrome.**

Rev Endocr Metab Disord. 2009 Jun;10(2):91-102. Epub 2008 Jul 19. Review. PubMed PMID: 18642088.

Somatostatin (SS) and dopamine (DA) receptors are widely expressed in neuroendocrine tumours that cause Cushing's Syndrome (CS). Increasing knowledge of specific subtype expression within these tumours and the ability to target these receptor subtypes with high-affinity compounds, has driven the search for new SS- or DA-based medical therapies for the various forms of CS. In Cushing's disease, corticotroph adenomas mainly express dopamine receptor subtype 2 (D(2)) and somatostatin receptor subtype 5 (sst(5)), whereas sst(2) is expressed at lower levels. Activation of these receptors can inhibit ACTH-release in primary cultured corticotroph adenomas and compounds that target either sst(5) (pasireotide, or SOM230) or D(2) (cabergoline) have shown significant efficacy in subsets of patients in recent clinical studies. Combination therapy, either by administration of both types of compounds separately or by treatment with novel somatostatin-dopamine chimeric molecules (e.g. BIM-23A760), appears to be a promising approach in this respect. In selected cases of Ectopic ACTH-producing Syndrome (EAS), the sst(2)-preferring compound octreotide is able to reduce cortisol levels effectively. A recent study showed that D(2) receptors are also significantly expressed in the majority of EAS and that cabergoline may decrease cortisol levels in subsets of these patients. In both normal adrenal tissue as well as in adrenal adenomas and carcinomas that cause CS, sst and DA receptor expression has been demonstrated. Although selected cases of adrenal CS may benefit from sst or DA-targeted treatment, its total contribution to the treatment of these patients is likely to be low as surgery is effective in most cases.

### **I recettori della somatostatina e della dopamina come bersagli per il trattamento medico della sindrome di Cushing.**

I recettori della somatostatina (SS) e della dopamina (DA) sono ampiamente espresse in tumori neuroendocrini che causano la sindrome di Cushing (CS). Aumentare la conoscenza di espressione del sottotipo specifico all'interno di questi tumori e la capacità di indirizzare questi sottotipi di recettori con composti ad alta affinità, ha guidato la ricerca verso nuove terapie o SS-DA-basati per le varie forme di CS. Nella malattia di Cushing, gli adenomi corticotropi esprimono soprattutto recettori dopaminergici sottotipo 2 (D (2)) e recettori della somatostatina sottotipo 5 (sst (5)), mentre sst (2) è espressa a livelli inferiori. L'attivazione di questi recettori è in grado di inibire la liberazione ACTH in adenomi corticotropi primari e composti, sia sst (5) (pasireotide, o SOM230) o D (2) (cabergolina) hanno dimostrato un'efficacia significativa nei sottogruppi di pazienti in recenti studi clinici. La terapia di combinazione, o per la somministrazione di entrambi i tipi di composti separatamente o di trattamento con molecole chimeriche nuove somatostatina-dopamina (ad esempio, BIM-23A760), sembra essere un approccio promettente in questo senso. In casi selezionati di produzione ectopica ACTH- Syndrome (EAS), il sst (2)-octreotide è un composto in grado di ridurre efficacemente i livelli di cortisolo. Uno studio recente ha mostrato che D (2) recettori sono anche significativamente espressi nella maggior parte delle EAS e che la cabergolina può ridurre i livelli di cortisolo in sottoinsiemi di questi pazienti. E' stata dimostrata in entrambi i tessuti normali surrenali così come in adenomi surrenali e carcinomi che causano CS, SST e l'espressione dei recettori DA

Anche se casi selezionati di surrenale CS possono beneficiare di un trattamento o SST DA-mirato, il suo contributo totale per il trattamento di questi pazienti, come la chirurgia, è probabilmente bassa è efficace in molti casi.



## **Impact of different anticancer regimens on biomarkers of angiogenesis in patients with advanced hepatocellular cancer.**

Cancer Res Clin Oncol. 2009 Feb;135(2):271-81. Epub 2008 Jul 19. PubMed PMID: 18642029.

**OBJECTIVE:** Advanced hepatocellular cancer (HCC) is a highly vascularised tumor with limited treatment options. We wanted to evaluate the impact of different treatments on systemic biomarkers linked to angiogenesis.

**METHODS:** Two subsequent prospective, randomised, phase-I/II trials in patients with advanced HCC were performed. A total of 38 patients was randomised to a total of 4 regimens consisting of 3 cycles of 4 weeks each: Trial 1 included group 1 receiving octreotide 30 mg im on day 1, and group 2 octreotide 30 mg on day 1 plus Imatinib 400 mg po daily; Trial 2 included group 3 with oxaliplatin on day 1 (60 mg-90 mg/m<sup>2</sup>), and group 4 with oxaliplatin on day 1, 8, 15 (20 mg-30 mg/m<sup>2</sup>) in combination with octreotide 30 mg on day 1 plus imatinib 400 mg po daily. Primary outcome measure was the relative changes in plasma biomarkers over time.

**RESULTS:** Time-to-progression and overall survival was not different between the two study trials. Within group 1-4, the mean relative increase from baseline to week 12 of treatment was 17, 18, 37, and 2% for s-E-selectin; -1, 90, 10, and -9% for VEGF-A; 18, 84, 141, and 74% for PDGF-BB, and 111, 142, 30, and 7% for serum AFP, respectively.

**CONCLUSIONS:** The increase of plasma levels for s-E-selectin and PDGF-BB seen in patients receiving chemotherapy alone may reflect activation of angiogenesis. In contrast, low-dose metronomic chemotherapy in combination with anti-angiogenic drugs seems to correlate with the least increase in biomarkers. Imatinib-octreotide temporarily leads to a decrease in PDGF-BB, whereas octreotide alone had no effect on PDGF-BB plasma levels.

## **Impatto di differenti regimi terapeutici antitumorali sui biomarcatori di angiogenesi in pazienti con carcinoma epatocellulare avanzato.**

**OBIETTIVO:** Il cancro avanzato epatocellulare (HCC) è un tumore altamente vascolarizzato con opzioni limitate di trattamento. Abbiamo voluto valutare l'impatto di diversi trattamenti sistemici sui biomarcatori legati alla angiogenesi.

**METODI:** Sono stati effettuati due studi prospettici successivi, randomizzati, phase-I/II nei pazienti con HCC. Un totale di 38 pazienti è stato randomizzato ad un totale di 4 regimi composto da 3 cicli di 4 settimane ciascuno: Trial 1 incluso il gruppo 1 riceve octreotide 30 mg il giorno 1 e gruppo 2 octreotide 30 mg al giorno 1 plus Imatinib 400 mg PO tutti i giorni; Trial 2 incluso il gruppo 3 con oxaliplatino il giorno 1 (60 mg-90 mg / m<sup>2</sup>), e il gruppo 4 con oxaliplatino al giorno 1, 8, 15 (20 mg-30 mg / m<sup>2</sup>) in combinazione con octreotide 30 mg al giorno 1 plus imatinib 400 mg PO al giorno. La misura del risultato primario a lungo termine era il cambiamento relativo in biomarcatori plasmatici nel tempo.

**RISULTATI:** Il tempo di progressione e la sopravvivenza globale non era differente tra i due processi di studio. All'interno del gruppo 1-4, l'aumento medio rispetto al basale alla settimana 12 di trattamento è stata di 17, 18, 37, e 2% per sE-selectina, -1, 90, 10, e -9% per il VEGF-A; 18, 84, 141, e 74% per il PDGF-BB, e 111, 142, 30, e del 7% per il siero AFP, rispettivamente.

**CONCLUSIONI:** L'aumento dei livelli plasmatici di sE-selectina e PDGF-BB osservati nei pazienti sottoposti a chemioterapia da sola può riflettere l'attivazione dell'angiogenesi. Al contrario, la chemioterapia a basso dosaggio metronomica in associazione con farmaci anti-angiogenici sembra essere correlato con il minimo aumento di biomarcatori. Imatinib-octreotide porta temporaneamente ad una diminuzione PDGF-BB, mentre l'octreotide da solo non ha avuto effetto sui livelli plasmatici di PDGF-BB.

## **RETINOIDI**

3: Chu KJ, Lai EC, Yao XP, Zhang HW, Lau WY, Fu XH, Lu CD, Shi J, Cheng SQ.

**Vitamin analogues in chemoprevention of hepatocellular carcinoma after resection or ablation--a systematic review and meta-analysis.**

Asian J Surg. 2010Jul;33(3):120-6. PubMed PMID: 21163409.

**OBJECTIVE:** While hepatic resection or local ablative therapy may provide a potentially curative treatment for hepatocellular carcinoma (HCC), more than half of these patients develop recurrent HCC within 5 years after treatment. Thus identification of any therapy which can decrease or delay the incidence of recurrence will improve the results of treatment. However, no chemopreventive agent has been approved for HCC.

**METHODS:** A MEDLINE database, Embase, Cancerlit (National Cancer Institute), and CBM (Chinese Biomedical Database) search from 1990 to 2009 was performed to identify relevant articles using the keywords "hepatocellular carcinoma," "vitamin analogue," and "chemoprevention." Additional papers were identified by a manual search of the references from the key articles. The fixed effect model was used for a meta-analysis.

**RESULTS:** Oral administration of acyclic retinoids (vitamin A analogue), and menatetrenone (vitamin K2 analogue) have been tested as chemopreventive agents after hepatic resection or local ablative therapy for HCC. There were one and four randomised, controlled trials (RCTs) which evaluated the efficacy of polyphenolic acid and menatetrenone, respectively. All studies were conducted in Japan. One RCT showed the preventive effect of polyphenolic acid in lowering the incidence of HCC recurrence after hepatic resection or percutaneous ethanol injection, and this effect lasted up to 199 weeks after randomization (or 151 weeks after completion of retinoid administration). Four RCTs evaluated the preventive efficacy of menatetrenone on HCC recurrence after hepatic resection or local ablative therapy. The results of three studies, as well as the meta-analysis of all four studies, showed significantly better tumour recurrence-free survival. The beneficial effect on the overall survival was less definite.

**CONCLUSION:** There is evidence to suggest that chemopreventive therapy after partial hepatectomy or local ablative therapy is beneficial in prolonging disease-free survival, but the evidence is less for an effect on the overall survival. To confirm the beneficial role of vitamin A or K analogues in the chemoprevention of HCC further and larger randomised trials are now required.

**Analoghi della Vitamina nella chemioprevenzione del carcinoma epatocellulare dopo resezione o ablazione - una revisione sistematica e una meta-analisi.**

**OBIETTIVO:** Mentre resezione epatica o terapia ablativa locale può fornire un trattamento potenzialmente curativo per carcinoma epatocellulare (HCC), più della metà di questi pazienti di sviluppare HCC ricorrente entro 5 anni dopo il trattamento. Pertanto l'identificazione di qualsiasi terapia che può fare diminuire o ritardare l'incidenza di recidiva possa migliorare i risultati del trattamento. Tuttavia, nessun agente chemiopreventivo è stato approvato per il carcinoma epatocellulare.

**METODI:** Un database di Medline, Embase, Cancerlit (National Cancer Institute), e CBM (cinese Biomedico di database) Ricerca 1990-2009 è stata effettuata per identificare gli articoli pertinenti utilizzando le parole chiave "carcinoma epatocellulare", "analogo della vitamina" e "chemioprevenzione." "Ulteriori documenti sono stati individuati da una ricerca manuale dei riferimenti dagli articoli chiave. Il modello ad effetti fissi è stato utilizzato per una meta-analisi.

**RISULTATI:** La somministrazione orale di retinoidi aciclici (vitamina A analogica), e menatetrenone (vitamina K2 analogici) sono stati testati come agenti chemiopreventivi dopo

resezione epatica o locale terapia ablativa per HCC. Ci sono stati uno e quattro studi randomizzati e controllati (RCT), che ha valutato l'efficacia di acido polyprenoic e menatetrenone, rispettivamente. Tutti gli studi sono stati condotti in Giappone. Uno studio randomizzato ha dimostrato l'effetto preventivo di acido polyprenoic nel ridurre l'incidenza di recidive di HCC dopo resezione epatica o iniezione percutanea di etanolo, e questo effetto è durato fino a 199 settimane dopo la randomizzazione (o 151 settimane dopo il completamento della somministrazione di retinoidi). Quattro studi randomizzati ha valutato l'efficacia preventiva di menatetrenone sulla recidiva di HCC dopo resezione epatica o locale terapia ablativa. I risultati di tre studi, così come la meta-analisi di tutti e quattro gli studi, hanno dimostrato la sopravvivenza del tumore significativamente migliore libera da recidive. L'effetto benefico sulla sopravvivenza globale è risultato meno preciso. CONCLUSIONE: Ci sono prove che suggeriscono che la terapia chemiopreventivi dopo epatectomia parziale o locale terapia ablativa è utile nel prolungare la sopravvivenza libera da malattia, ma l'evidenza è meno per un effetto sulla sopravvivenza globale. Per confermare il ruolo benefico della vitamina A o analoghi K nella chemioprevenzione del carcinoma epatocellulare ulteriori trial randomizzati e più grandi sono ora necessari.

## **Retinoic acid receptor modulators: a perspective on recent advances and promises.**

Expert Opin Ther Pat. 2011 Jan;21(1):55-63. Epub 2010 Nov 20. PubMed PMID: 21091043.

**IMPORTANCE OF THE FIELD:** Retinoids are currently used in the clinic for the treatment of skin diseases and acute promyelocytic leukemia and are known to contribute to early development and organogenesis in embryo and throughout life. Most of these activities are primarily due to the binding of the retinoid to the retinoic acid receptors (RARs, subtypes  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ ). Ligand modulates, via allosteric conformational changes, the ability of RARs to interact with different sets of co-regulators. Structure-based insights on the ligand-binding domain of the ligand-bound RARs have clearly linked retinoid function to co-activator (CoA) recruitment for agonists, CoA dissociation for antagonists and corepressor stabilization for inverse agonists.

**AREAS COVERED IN THIS REVIEW:** To help understand ligand-modulated RAR action as a consequence of its interaction with different sets of co-regulators, we present the chemical engineering of subsets of retinoid chemotypes (rexinoids, i.e., the ligands of the retinoid X receptors,  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ , with impact in the treatment of cancer and metabolic diseases, are not covered) that display the whole range of ligand functions, including subtype- and isotype-selectivities.

**WHAT THE READER WILL GAIN:** An understanding of the correlation of retinoid ligand structure and function. Structural insights into ligand action and retinoid chemotypes. Potential for clinical application of retinoid receptor modulators.

**TAKE HOME MESSAGE:** Potential pharmacological/therapeutic applications of these chemical tools extend beyond cancer prevention and therapy to the treatment of autoimmune and neurodegenerative diseases.

## **Modularori dei recettori dell'acido retinoico: un punto di vista sui recenti progressi e le promesse**

**IMPORTANZA DEL CAMPO:** I retinoidi sono attualmente utilizzati in clinica per il trattamento delle malattie della pelle e di leucemia acuta promielocytic e sono noti per contribuire allo sviluppo precoce e organogenesi in embrione e per tutta la vita. La maggior parte di queste attività sono principalmente dovuti al legame del retinoidi per i recettori dell'acido retinoico (RAR, sottotipi  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ). Ligand modula, attraverso allosterico cambiamenti conformazionali, la capacità di RARs di interagire con i diversi gruppi di co-regolamentazione. Intuizioni struttura-in base al dominio ligand-vincolante del RARs ligando-bound sono chiaramente collegati retinoidi funzione di co-attivatore (CoA) di reclutamento per gli agonisti, dissociazione CoA per gli antagonisti e stabilizzazione corepressor per agonisti inversi.

Aree trattate in questa RECENSIONE: Per aiutare a comprendere l'azione RAR ligando-modulata come conseguenza della sua interazione con diversi gruppi di co-regolamentazione, vi presentiamo l'ingegneria chimica di sottoinsiemi di chemiotipi retinoidi (rexinoidi, vale a dire, i ligandi dei recettori dei retinoidi X ,  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ , con un impatto nel trattamento del cancro e delle malattie metaboliche, non sono coperti) che mostrano l'intera gamma di funzioni di legante, compresi sottotipi e isotipo-selettività.

Ciò che il lettore acquisterà: La comprensione della correlazione dei retinoidi ligando struttura e funzione. Intuizioni strutturali in azione ligando e chemiotipi retinoidi. Potenziale per l'applicazione clinica di modulatori dei recettori retinoidi.

**TAKE HOME MESSAGGIO:** potenziale farmacologico / applicazioni terapeutiche di questi strumenti chimici vanno al di là di prevenzione e terapia dei tumori al trattamento di malattie autoimmuni e neurodegenerative.

13: Tang XH, Gudas LJ.

**Retinoids, retinoic acid receptors, and cancer.**

Annu RevPathol. 2010 Jan 15. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 21073338.

Retinoids (i.e., vitamin A, all-trans retinoic acid, and related signaling molecules) induce the differentiation of various types of stem cells. Nuclear retinoic acid receptors mediate most but not all of the effects of retinoids. Retinoid signaling is often compromised early in carcinogenesis, which suggests that a reduction in retinoid signaling may be required for tumor development. Retinoids interact with other signaling pathways, including estrogen signaling in breast cancer. Retinoids are used to treat cancer, in part because of their ability to induce differentiation and arrest proliferation. Delivery of retinoids to patients is challenging because of the rapid metabolism of some retinoids and because epigenetic changes can render cells retinoid resistant. Successful cancer therapy with retinoids is likely to require combination therapy with drugs that regulate the epigenome, such as DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibitors, as well as classical chemotherapeutic agents. Thus, retinoid research benefits both cancer prevention and cancer treatment.

**Retinoidi, recettori dell'acido retinoico e cancro.**

Retinoidi (cioè, la vitamina A, all-trans retinoico, e le relative molecole di segnalazione) inducono la differenziazione dei vari tipi di cellule staminali. Recettori dell'acido retinoico nucleare mediano la maggior parte ma non tutti gli effetti dei retinoidi. Segnalazione dei retinoidi è spesso compromessa precoce nella cancerogenesi, il che suggerisce che una riduzione di segnalazione dei retinoidi possono essere necessari per lo sviluppo del tumore. Retinoidi interagire con altre vie di segnalazione, tra cui gli estrogeni segnalazione nel cancro della mammella. I retinoidi sono usati per trattare il cancro, in parte a causa della loro capacità di indurre la differenziazione e la proliferazione arresto. Consegnare dei retinoidi per i pazienti è impegnativo a causa del rapido metabolismo di alcuni retinoidi e perché i cambiamenti epigenetici possono rendere le cellule resistenti retinoidi. Terapia del cancro di successo con i retinoidi è probabile che richiedono la terapia di combinazione con farmaci che regolano il epigenoma, come DNA metiltransferasi e inibitori delle istone deacetilasi, oltre a classici chemioterapici. Pertanto, le prestazioni di ricerca retinoidi sia la prevenzione del cancro e il trattamento del cancro.

16: Bourguet W, de Lera AR, Gronemeyer H.

**Inverse agonists and antagonists of retinoid receptors.**

Methods Enzymol. 2010;485:161-95. PubMed PMID: 21050917.

Nuclear receptors (NRs) are ligand-inducible transcription factors that regulate a plethora of cell biological phenomena, thus orchestrating complex events like development, organ homeostasis, immune function, and reproduction. Due to their regulatory potential, NRs are major drug targets for a variety of diseases, including cancer and metabolic diseases, and had a major societal impact following the development of contraceptives and abortifacients. Not surprisingly in view of this medical and societal importance, a large amount of diverse NR ligands have been generated and the corresponding structural and functional analyses have provided a deep insight into the molecular basis of ligand action. What we have learnt is that ligands regulate, via allosteric conformational changes, the ability of NRs to interact with different sets of coregulators which in turn recruit enzymatically active complexes, the workhorses of the ligand-induced epigenetic and transcription-regulatory events. Thus, ligands essentially direct the communication of a given NR with its intracellular environment at the chromatin and extragenomic level to modulate gene programs directly at the chromatin level or via less well-understood extranuclear actions. Here we will review our current structural and mechanistic insight into the functionalities of subsets of retinoid and rexinoid ligands that act generically as antagonists but follow different mechanistic principles, resulting in "classical" or neutral antagonism, or inverse agonism. In addition, we describe the chemical features and guidelines for the synthesis of retinoids/rexinoids that exert specific functions and we provide protocols for a number of experimental approaches that are useful for studies of the agonistic and antagonistic features of NR ligands.

### **Agonisti inversi ed antagonisti dei recettori dei retinoidi**

I recettori nucleari (NR) sono fattori di trascrizione ligando-inducibili che regolano una pletera di fenomeni biologici delle cellule, così orchestrato eventi complessi come lo sviluppo, l'omeostasi di organi, la funzione immunitaria, e la riproduzione. A causa della loro potenziale di regolamentazione, NR sono importanti bersagli farmacologici per una varietà di malattie, compreso il cancro e le malattie metaboliche, e avuto un forte impatto sociale a seguito dello sviluppo di contraccettivi e abortivi. Non sorprende che in vista di questa rilevanza medica e sociale, una grande quantità di leganti NR diverse sono state generate e le analisi strutturali e funzionali corrispondenti hanno fornito una comprensione in profondità la base molecolare di azione legante. Quello che abbiamo imparato è che ligandi regolano, via allosterico cambiamenti conformazionali, la capacità di NR di interagire con i diversi gruppi di coregulators che a sua volta recluta complessi enzimaticamente attiva, il cavallo di battaglia del-ligando indotta da eventi epigenetici e trascrizione-regolamentazione. Quindi, in sostanza, ligandi diretta la comunicazione di una NR dato con il suo ambiente intracellulare a livello della cromatina e extragenomic di modulare i programmi gene direttamente a livello della cromatina o via meno ben capito azioni extranucleare. Qui ci sarà rivedere la nostra visione attuale strutturali e meccanicistici nelle funzionalità di sottoinsiemi di ligandi retinoidi e rexinoid genericamente che agiscono come antagonisti ma seguire diversi principi meccanicistici, con conseguente "classica" o antagonismo neutro o agonismo inverso. Inoltre, si descrivono le caratteristiche chimiche e le linee guida per la sintesi dei retinoidi / rexinoidi che esercitano funzioni specifiche e protocolli per fornire una serie di approcci sperimentali che sono utili per gli studi delle caratteristiche agonisti e antagonisti di ligandi NR.

17: Mizuno CS, Paul S, Suh N, Rimando AM.

## **Synthesis and biological evaluation of retinoid-chalcones as inhibitors of colon cancer cell growth.**

Bioorg Med Chem Lett. 2010 Dec 15;20(24):7385-7. Epub 2010 Oct 14. PubMed PMID: 21041085.

Based on the observed anticancer activity of chalcones and retinoids, a novel class of retinoid-chalcone hybrids was designed and synthesized. As part of our ongoing studies to discover natural product based anticancer compounds, the retinoid-chalcone hybrids were tested against the colon cancer cell line HT-29. Retinoid like moiety was introduced through Friedel-Crafts alkylation of toluene. Among the synthesized compounds, the cyano derivative (E)-3-(3-oxo-3-(3,5,5,8,8-pentamethyl-5,6,7,8-tetrahydronaphthalen-2-yl)prop-1-enyl)benzotrile 8 showed submicromolar inhibitory activity with an IC(50) of 0.66  $\mu$ M.

## **Sintesi e valutazione biologica di retinoidi calconi come inibitori della crescita delle cellule tumorali del colon.**

Sulla base delle attività antitumorale osservata di calconi e retinoidi, una nuova classe di ibridi retinoidi calcone è stato progettato e sintetizzato. Come parte dei nostri studi in corso per scoprire i composti antitumorali a base di prodotti naturali, gli ibridi retinoidi calcone sono stati testati contro la linea cellulare di cancro del colon HT-29. Frazione retinoidi come è stata introdotta attraverso l'alchilazione di Friedel-Crafts di toluene. Tra i composti sintetizzati, il derivato ciano (E) -3 - (3-oxo-3-(3,5,5,8,8-pentamethyl-5 ,6,7,8-tetrahydronaphthalen-2-ile) prop-1-enil) benzonitrile 8 presentavano submicromolar attività inibitoria con un IC (50) di 0,66 micron.

**[Expression of nuclear hormone receptors PPAR, LXR and RXR in the liver and lipid and glucose levels in blood in susceptible and resistant to hepatocarcinogenesis mice strains].**

Biomed Khim. 2010 Jul-Aug;56(4):480-9. Russian. PubMed PMID:21032898.

Earlier it was shown that male mice of the DD/He strain were highly susceptible to ortho-aminoasotoluene (OAT) induced hepatocarcinogenesis, and resistant to spontaneous liver tumor development as compared to the CC57BR/Mv strain. In the present work we have made a comparative investigation of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR), liver X-receptor (LXR) and retinoic X-receptor (RXR) mRNA levels in liver as well as concentrations of corticosterone, glucose, lipids and insulin in blood of male DD/He and CC57BR/Mv mice. Using the multiplex RT-PCR method it was found that PPAR-alpha, PPAR-gamma, RXR-alpha and RXR-beta mRNA content was essentially decreased in the liver of DD mice as compared to mice of the CC57BR strain. No significant interstrain differences of LXR-alpha and LXR-beta mRNA content were found. In DD micetere was more then the 3-fold decrease of blood content of corticosterone, which is involved in PPAR and RXR regulation. DD mice demonstrated a significant decrease in blood serum glucose and insulin concentrations as well as higher reactivity to insulin as compared with CC57BR mice. Elevated blood total cholesterol and cholesterol HDL level were found in DD mice whereas triglyceride content was basically the same in both mouse strains. It is known that glucocorticoids, PPAR and RXR play crucial role in transcription regulation of inflammation response. Therefore our data allow to suggest that decreased corticosterone level in blood, PPAR and RXR mRNA content in liver of the DD strain may lead to induction of inflammation by OAT exposure, resulting in a high incidence of tumorigenesis in this strain.

**[Espressione dei recettori ormonali nucleari PPAR, LXR e RXR nel fegato e livelli di lipidi e di glucosio nel sangue in ceppi sensibili e resistenti alla epatocarcinogenesi di topi].**

In precedenza è stato dimostrato che i topi maschi del DD / E ceppo erano altamente sensibili a orto-aminoasotoluene (OAT) indotta epatocarcinogenesi, e resistenti a sviluppo spontaneo del tumore al fegato rispetto al ceppo CC57BR/Mv. Nel presente lavoro abbiamo fatto un esame comparativo dei perossisomi recettore proliferator-activated (PPAR), fegato X-recettore (LXR) e X-recettore retinoico (RXR) i livelli di mRNA nel fegato come pure le concentrazioni di corticosterone, glucosio, lipidi e di insulina nel sangue di maschio GG / Lui e CC57BR/Mv topi. Utilizzando il metodo multiplex RT-PCR è stato accertato che PPAR-alfa PPAR-gamma, RXR-alfa e beta-RXR contenuto di mRNA era essenzialmente diminuita nel fegato di topi DD rispetto ai topi del ceppo CC57BR. Nessuna significativa differenza di interstrain LXR-alfa e beta-LXR contenuto di mRNA sono stati trovati. In DD micetere era più quindi il calo di 3 volte il contenuto di sangue di corticosterone, che è coinvolto nella regolazione PPAR e RXR. DD topi hanno dimostrato una significativa riduzione del glucosio nel sangue e nel siero concentrazioni di insulina e maggiore reattività all'insulina rispetto ai topi CC57BR. colesterolo totale e HDL elevato livello di colesterolo sono stati trovati nei topi C. considerando che il contenuto di trigliceridi era fondamentalmente la stessa in entrambi i ceppi di topi. E 'noto che i glucocorticoidi, PPAR e RXR gioco di ruolo cruciale nella regolazione della trascrizione della risposta infiammatoria. Pertanto i nostri dati suggeriscono che permettono di diminuzione del livello di corticosterone nel sangue, PPAR e RXR contenuto di mRNA nel fegato del ceppo DD può portare ad induzione di infiammazione in caso di esposizione OAT, determinando una elevata incidenza di tumorigenesi in questo ceppo.

23: Ben-Amotz O, Arber N, Kraus S.

### **Colorectal cancer chemoprevention: the potential of a selective approach.**

Expert Rev Anticancer Ther. 2010Oct;10(10):1559-62. PubMed PMID: 20942626.

Comment on : Nature. 2010 Apr 15;464(7291):1058-61.

Colorectal cancer (CRC) is a leading cause of cancer death, and therefore demands special attention. Novel recent approaches for the chemoprevention of CRC focus on selective targeting of key pathways. We review the study by Zhang and colleagues, evaluating a selective approach targeting APC-deficient premalignant cells using retinoid-based therapy and TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). This study demonstrates that induction of TRAIL-mediated death signaling contributes to the chemopreventive value of all-trans-retinyl acetate (RAc) by sensitizing premalignant adenoma cells for apoptosis without affecting normal cells. We discuss these important findings, raise few points that deserve consideration, and may further contribute to the development of RAc-based combination therapies with improved efficacy. The authors clearly demonstrate a synergistic interaction between TRAIL, RAc and APC, which leads to the specific cell death of premalignant target cells. The study adds to the growing body of literature related to CRC chemoprevention, and provides solid data supporting a potentially selective approach for preventing CRC using RAc and TRAIL.

### **Chemioprevenzione del cancro coloretale: le potenzialità di un approccio selettivo.**

Il cancro coloretale (CRC) è una delle principali cause di morte per cancro, e richiede pertanto una particolare attenzione. Nuovi approcci di recente per la chemioprevenzione del CRC concentrarsi sul targeting selettivo delle vie principali. Esaminiamo lo studio di Zhang e colleghi, valutando un approccio selettivo targeting cellule premaligne APC-carenti con terapia a base di retinoidi e TNF-correlati che inducono apoptosi ligand (TRAIL). Questo studio dimostra che l'induzione di morte TRAIL-mediata segnalazione contribuisce al valore chemiopreventivo di all-trans-retinil acetato (RAC) attraverso la sensibilizzazione adenoma delle cellule premaligne per l'apoptosi senza intaccare le cellule normali. Discuteremo questi risultati importanti, sollevare alcuni punti che meritano considerazione, e può ulteriormente contribuire allo sviluppo di terapie combinate a base di RAC con maggiore efficacia. Gli autori dimostrano chiaramente una interazione sinergica tra TRAIL, RAC e APC, che porta alla morte cellulare di cellule bersaglio premaligne. Lo studio si aggiunge alla crescente mole di letteratura relative al chemioprevenzione CRC, e fornisce dati solido sostegno di un approccio potenzialmente selettivo per la prevenzione CRC con CCR e TRAIL.

**[New possibilities of targeted therapy in the treatment of hepatocellular carcinoma with the help of molecular biology].**

Orv Hetil. 2010 Oct 24;151(43):1763-8. Review. Hungarian. PubMed PMID: 20940115.

Hepatocellular carcinoma (HCC) has a poor prognosis. Approximately 85% of patients are not candidates for curative treatments at the time of diagnosis; hence palliative modalities (transcatheter arterial chemoembolisation, radiofrequency ablation, systemic chemotherapy) are used. Systemic chemotherapies have disappointing results. The increasing knowledge in the molecular biology of HCC will increase the possibilities of targeted therapy. The multi-tyrosine kinase inhibitor sorafenib is the only drug which has approved. The VEGF-inhibitors (bevacizumab, sunitinib), EGFR-blocker agents (erlotinib), as well as the inhibition of mTOR (rapamycin) are promising. Combination of sorafenib or other anti-angiogenic agents with local ablative procedure (transcatheter arterial chemoembolisation, radiofrequency ablation), or with curative hepatectomy also can be favorable. Alteration of Wnt pathway, retinoid compounds, inhibition of the cell cycle as well as the proteasome, and epigenetic therapy can be other potential promising targets in HCC.

**[Nuove possibilità di una terapia mirata nel trattamento del carcinoma epatocellulare con l'aiuto della biologia molecolare].**

Il carcinoma epatocellulare (HCC), ha una prognosi sfavorevole. Circa il 85% dei pazienti non sono candidati per trattamenti curativi, al momento della diagnosi, di conseguenza le modalità palliative (chemioembolizzazione arteriosa transcatetere, l'ablazione con radiofrequenza, la chemioterapia sistemica) vengono utilizzati. Chemioterapici sistemici sono risultati deludenti. La conoscenza sempre più nella biologia molecolare del carcinoma epatocellulare aumenterà le possibilità di terapia mirata. Il multi-tirosina chinasi sorafenib è il solo farmaco che ha approvato. Il inibitori VEGF (bevacizumab, sunitinib), gli agenti EGFR-bloccante (erlotinib), così come l'inibizione di mTOR (rapamicina) sono promettenti. Combinazione di Sorafenib o di altri agenti anti-angiogenici con locali procedura ablativa (chemioembolizzazione arteriosa transcatetere, l'ablazione con radiofrequenza), o con epatectomia curativo anche può essere favorevole. Alterazione del pathway Wnt, composti retinoidi, l'inibizione del ciclo cellulare e la terapia proteosoma, e epigenetici possono essere altri potenziali bersagli promettenti in HCC.

## **All Trans Retinoic Acid and Cancer.**

Immunopharmacol Immunotoxicol. 2010 Oct 8. [Epub ahead of print]PubMed PMID: 20929432.

All-trans retinoic acid (ATRA) is an active metabolite of vitamin A under the family retinoid. Retinoids, through their cognate nuclear receptors, exert potent effects on cell growth, differentiation and apoptosis, and have significant promise for cancer therapy and chemoprevention. Differentiation therapy with ATRA has marked a major advance and become the first choice drug in the treatment of acute promyelocytic leukemia (APL). Conversions of 13-cis-retinoic acid and 9-cis-retinoic acid to all-trans-retinoic acid is very rapid. Currently, two distinct families of retinoid responsive nuclear receptors have been identified and characterized: retinoic acid receptors (RARs) and retinoid receptors (RXRs), each of which include three isoforms,  $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$ . ATRA is being increasingly included in anti-tumour therapeutical schemes for the treatment of various tumoral diseases such as Kaposi's sarcoma, head and neck squamous cell carcinoma, ovarian carcinoma, bladder cancer, neuroblastoma and has shown antiangiogenic effects in several systems, inhibiting proliferation in vascular smooth muscle cells (VSMCs) and anti-inflammatory in Rheumatoid arthritis. This review helps to understand in details about the ATRA and its role on cancer and it is predicted that modulating the activity of ATRA will soon provide novel prevention and treatment approaches for the cancer patients.

### **Acido trans retinoico (ATRA) e il cancro**

Acido all-trans retinoico (ATRA) è un metabolita attivo della vitamina A sotto la retinoidi famiglia. I retinoidi, attraverso i loro recettori nucleari cognate, esercitano potenti effetti sulla crescita cellulare, la differenziazione e l'apoptosi, e hanno una significativa promessa per la terapia del cancro e la chemioprevenzione. Differenziazione terapia con ATRA ha segnato un importante passo avanti e diventare il farmaco di prima scelta nel trattamento della leucemia promielocitica acuta (APL). Conversioni di acido 13-cis-retinoico e l'acido 9-cis-retinoico in acido all-trans retinoico è molto rapido. Attualmente, due distinte famiglie di recettori dei retinoidi reattiva nucleare sono stati individuati e caratterizzati: i recettori dell'acido retinoico (RAR) e recettori dei retinoidi (RXR), ognuno dei quali comprende tre isoforme,  $\alpha$ ,  $\beta$ , e  $\gamma$ . ATRA è sempre più compreso nei regimi terapeutici anti-tumoral per la cura di varie patologie tumorali come il sarcoma di Kaposi, la testa e carcinoma a cellule squamose del collo, carcinoma ovarico, carcinoma della vescica, il neuroblastoma e ha mostrato effetti antiangiogenici in diversi sistemi, la proliferazione inibendo in vascolare cellule muscolari lisce (VSMC) e anti-infiammatori nell'artrite reumatoide. Questa recensione aiuta a capire in dettaglio circa l'ATRA e il suo ruolo sul cancro e si prevede che modulando l'attività di ATRA fornirà presto nuovi prevenzione e approcci terapeutici per i malati di cancro.

## **RAR $\alpha$ 1 control of mammary gland ductal morphogenesis and wnt1-tumorigenesis.**

Breast Cancer Res. 2010 Oct 5;12(5):R79. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 20923554.

**INTRODUCTION:** Retinoic acid signaling pathways are disabled in human breast cancer suggesting a controlling role in normal mammary growth that might be lost in tumorigenesis. We tested a single receptor isotype, RAR $\alpha$ 1 (retinoic acid receptor isotype alpha, isoform 1), for its role in mouse mammary gland morphogenesis and mouse mammary tumor virus (MMTV)-wingless-related MMTV integration site 1 (wnt1)-induced oncogenesis.

**METHODS:** The role of RAR $\alpha$ 1 in mammary morphogenesis was tested in RAR $\alpha$ 1-knockout (KO) mice and in mammary tumorigenesis in bi-genic (RAR $\alpha$ 1/KO crossed with MMTV-wnt1) mice. We used whole mounts analysis, stem cells/progenitor quantification, mammary gland repopulation, quantitative polymerase chain reaction (Q-PCR), test of tumor-free survival, tumor fragments and cell transplantation.

**RESULTS:** In two genetic backgrounds (129/B1-6 and FVB) the neo-natal RAR $\alpha$ 1/KO-mammary epithelial tree was two-fold larger and the pubertal tree had two-fold more branch points and five-fold more mature end buds, a phenotype that was predominantly epithelial cell autonomous. The stem/progenitor compartment of the RAR $\alpha$ 1/KO mammary, defined as CD24<sup>low</sup>/ALDH<sup>high</sup> activity was increased by a median 1.7-fold, but the mammary stem cell (MaSC)-containing compartment, (CD24<sup>low</sup>/CD29<sup>high</sup>), was larger (approximately 1.5-fold) in the wild type (wt)-glands, and the mammary repopulating ability of the wt-gland epithelium was approximately two-fold greater. In MMTV-wnt1 transgenic glands the progenitor (CD24<sup>low</sup>/ALDH<sup>high</sup> activity) content was 2.6-fold greater than in the wt and was further increased in the RAR $\alpha$ 1/KO-wnt1 glands. The tumor-free survival of RAR $\alpha$ 1/KO-wnt1 mice was significantly (P = 0.0002, Kaplan Meier) longer, the in vivo growth of RAR $\alpha$ 1/KO-wnt1 transplanted tumor fragments was significantly (P = 0.01) slower and RAR $\alpha$ 1/KO-wnt1 tumors cell suspension produced tumors after much longer latency.

**CONCLUSIONS:** In vitamin A-replete mice, RAR $\alpha$ 1 is required to maintain normal mammary morphogenesis, but paradoxically, also efficient tumorigenesis. While its loss increases the density of the mammary epithelial tree and the content of luminal mammary progenitors, it appears to reduce the size of the MaSC-containing compartment, the mammary repopulating activity, and to delay significantly the MMTV-wnt1-mammary tumorigenesis. Whether the delay in tumorigenesis is solely due to a reduction in wnt1 target cells or due to additional mechanisms remains to be determined. These results reveal the intricate nature of the retinoid signaling pathways in mammary development and carcinogenesis and suggest that a better understanding will be needed before retinoids can join the armament of effective anti-breast cancer therapies.

## **RAR $\alpha$ 1 controllo della morfogenesi della ghiandola mammaria duttale e wnt1-tumorigenisi.**

Breast Cancer Res. 2010 Oct5;12(5):R79. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 20923554.

**INTRODUZIONE:** L'acido retinoico vie di segnalazione sono disattivate nel carcinoma mammario umano suggerendo un ruolo di controllo della crescita mammaria normale che potrebbero essere persi nella tumorigenisi. Abbiamo testato un isotipo unico recettore, RAR $\alpha$ 1 (acido retinoico recettore alfa isotipo, isoforma 1), per il suo ruolo nella morfogenesi della ghiandola mammaria mouse e mouse del tumore mammario virus (MMTV)-senza ali legate sito d'integrazione MMTV 1 (wnt1)-oncogenesi indotto.

**METODI:** Il ruolo della RAR $\alpha$ 1 nella morfogenesi mammaria è stato testato in RAR $\alpha$ 1-knockout (KO), topi e nella tumorigenisi mammaria in bi-genico (RAR $\alpha$ 1/KO incrociate con MMTV-wnt1) topi. Abbiamo usato tutto monta analisi, le cellule staminali / progenitrici quantificazione,

ripopolamento della ghiandola mammaria, quantitative reazione a catena della polimerasi (Q-PCR), test di sopravvivenza senza tumore, i frammenti del tumore e trapianto di cellule.

**RISULTATI:** In due ambiti di provenienza genetica (129/B1-6 e FVB) il neo-natale albero  $RAR\alpha 1/KO$ -mammary epiteliali è stato due volte più grande e l'albero puberale aveva dei punti di ramificazione di due volte più di cinque volte e boccioli di fine più maturo, un fenotipo che è stata prevalentemente cellule epiteliali autonome. Il / vano staminali progenitrici delle mammaria  $RAR\alpha 1/KO$ , definito come l'attività  $CD24^{low}/ALDH^{high}$  è stato aumentato da una mediana di 1,7 volte, ma le cellule staminali mammarie (MASC) contenenti vano, ( $CD24^{low}/CD29^{high}$ ), è stato più grande (circa 1,5 volte) nel wild type (WT)-ghiandole mammarie e la capacità di ripopolare l'epitelio WT-ghiandola è stata di circa due volte maggiore. In MMTV-wnt1 ghiandole transgenico il progenitore ( $CD24^{low}/ALDH^{high}$  attività) il contenuto era 2,6 volte maggiore rispetto al peso ed è stato ulteriormente accresciuto nel  $RAR\alpha 1/KO$ -wnt1 ghiandole. La sopravvivenza senza tumore della  $RAR\alpha 1/KO$ -wnt1 topi è stata significativamente ( $P = 0.0002$ , Kaplan Meier) più lunga, la crescita in vivo di  $RAR\alpha 1/KO$ -wnt1 frammenti di tumore trapiantato era significativamente ( $P = 0,01$ ) più lento e  $RAR\alpha 1/KO$ - wnt1 Tumori delle cellule sospensione prodotto tumori dopo una latenza molto più lungo.

**CONCLUSIONI:** Nei topi vitamina A-pieno,  $RAR\alpha 1$  è necessario per mantenere morfogenesi mammaria normale, ma, paradossalmente, anche tumorigenesi efficiente. Mentre la sua perdita aumenta la densità degli alberi epiteliali mammarie e il contenuto dei progenitori mammaria luminale, sembra ridurre la dimensione del compartimento contenente MASC, l'attività di ripopolamento mammary, e di ritardare in modo significativo la tumorigenesi MMTV-wnt1-mammaria. Se il ritardo nella genesi dei tumori è dovuto esclusivamente alla riduzione wnt1 cellule bersaglio o dovuta a meccanismi supplementari rimane da stabilire. Questi risultati rivelano la natura complessa delle vie di segnalazione dei retinoidi nella carcinogenesi mammaria e sviluppo e suggeriscono che una migliore comprensione saranno necessari prima che i retinoidi possono unire l'armamento di efficaci terapie anti-cancro al seno.

## **Role of retinoic acid in the modulation of benzo(a)pyrene-DNA adducts in human hepatoma cells: implications for cancer prevention.**

Toxicol Appl Pharmacol. 2010 Dec 15;249(3):224-30. Epub 2010 Oct 1. PubMed PMID: 20888851; PubMed Central PMCID: PMC3001276.

Carcinogen-DNA adducts could lead to mutations in critical genes, eventually resulting in cancer. Many studies have shown that retinoic acid (RA) plays an important role in inducing cell apoptosis. Here we have tested the hypothesis that levels of carcinogen-DNA adducts can be diminished by DNA repair and/or by eliminating damaged cells through apoptosis. Our results showed that the levels of total DNA adducts in HepG2 cells treated with benzo(a)pyrene (BP, 2  $\mu$ M)+RA (1  $\mu$ M) were significantly reduced compared to those treated with BP only ( $P=0.038$ ). In order to understand the mechanism of attenuation of DNA adducts, further experiments were performed. Cells were treated with BP (4  $\mu$ M) for 24h to initiate DNA adduct formation, following which the medium containing BP was removed, and fresh medium containing 1  $\mu$ M RA was added. The cells were harvested 24h after RA treatment. Interestingly, the levels of total DNA adducts were lower in the BP/RA group ( $390 \pm 34$ ) than those in the BP/DMSO group ( $544 \pm 33$ ),  $P=0.032$ . Analysis of cell apoptosis showed an increase in BP+RA group, compared to BP or RA only groups. Our results also indicated that attenuation of BP-DNA adducts by RA was not primarily due to its effects on CYP1A1 expression. In conclusion, our results suggest a mechanistic link between cellular apoptosis and DNA adduct formation, phenomena that play important roles in BP-mediated carcinogenesis. Furthermore, these results help understand the mechanisms of carcinogenesis, especially in relation to the chemopreventive properties of nutritional apoptosis inducers.

## **Ruolo dell'acido retinoico nella modulazione dell'addotto (alterazioni molecolari definite dal legame covalente al DNA di composti di tipo aromatico) benzo (a) pirene -DNA in cellule di epatoma umano: implicazioni per la prevenzione del cancro.**

Gli addotti cancerogenici di DNA potrebbe portare a mutazioni nei geni critici, con il rischio nel cancro. Molti studi hanno dimostrato che l'acido retinoico (RA) svolge un ruolo importante nell'induzione di apoptosi cellulare. Qui abbiamo testato l'ipotesi che i livelli di addotti cancerogeno-DNA può essere diminuito di riparazione del DNA e / o eliminando le cellule danneggiate attraverso l'apoptosi. I nostri risultati hanno mostrato che i livelli di addotti di DNA totale nelle cellule HepG2 trattate con il benzo (a) pirene (BP, 2 mM) + RA (1 micron) sono risultati significativamente ridotti rispetto a quelli trattati solo con BP ( $P = 0,038$ ). Al fine di comprendere il meccanismo di attenuazione di addotti di DNA, ulteriori esperimenti sono stati effettuati. Le cellule sono state trattate con BP (4 mM) per 24 ore per avviare la formazione di addotti di DNA, in seguito alla quale il terreno contenente BP è stato rimosso, e terreno di coltura fresco contenente 1 mM RA è stato aggiunto. Le cellule sono state raccolte 24 ore dopo il trattamento con RA. È interessante notare che i livelli di addotti di DNA totale erano più bassi nel gruppo RA BP ( $390 \pm 34$ ) rispetto a quelli nel gruppo BP DMSO ( $544 \pm 33$ ),  $P = 0,032$ . Analisi di apoptosi delle cellule ha mostrato un aumento nel gruppo BP + RA, rispetto ai gruppi BP o RA solo. I nostri risultati hanno anche indicato che l'attenuazione di addotti di DNA mediante BP-RA non è stato dovuto principalmente ai suoi effetti sulla espressione di CYP1A1. In conclusione, i nostri risultati suggeriscono un legame meccanicistico tra l'apoptosi cellulare e la formazione di addotti di DNA, fenomeni che giocano un ruolo importante nella carcinogenesi BP-mediata. Inoltre, questi risultati aiutano a capire i meccanismi della carcinogenesi, in particolare in relazione alle proprietà chemiopreventivo di induttori dell'apoptosi nutrizionale.

72: Hölzel M, Huang S, Koster J, Ora I, Lakeman A, Caron H, Nijkamp W, Xie J, Callens T, Asgharzadeh S, Seeger RC, Messiaen L, Versteeg R, Bernardis R.

**NF1 is a tumor suppressor in neuroblastoma that determines retinoic acid response and disease outcome.**

Cell. 2010 Jul 23;142(2):218-29. PubMed PMID: 20655465; PubMed Central PMCID: PMC2913027.

Retinoic acid (RA) induces differentiation of neuroblastoma cells in vitro and is used with variable success to treat aggressive forms of this disease. This variability in clinical response to RA is enigmatic, as no mutations in components of the RA signaling cascade have been found. Using a large-scale RNAi genetic screen, we identify crosstalk between the tumor suppressor NF1 and retinoic acid-induced differentiation in neuroblastoma. Loss of NF1 activates RAS-MEK signaling, which in turn represses ZNF423, a critical transcriptional coactivator of the retinoic acid receptors. Neuroblastomas with low levels of both NF1 and ZNF423 have extremely poor outcome. We find NF1 mutations in neuroblastoma cell lines and in primary tumors. Inhibition of MEK signaling downstream of NF1 restores responsiveness to RA, suggesting a therapeutic strategy to overcome RA resistance in NF1-deficient neuroblastomas.

**NF1 è un soppressore tumorale del neuroblastoma che determina la risposta all'acido retinoico e l'esito della malattia.**

L'acido retinoico (RA) induce la differenziazione delle cellule di neuroblastoma in vitro ed è utilizzato con successo variabile per trattare le forme aggressive di questa malattia. Questa variabilità nella risposta clinica di RA è enigmatico, in quanto non le mutazioni nei componenti della cascata della RA di segnalazione sono stati trovati. Utilizzando uno schermo di grandi dimensioni RNAi genetica, identificare il crosstalk tra oncosoppressore NF1 e acido retinoico differenziazione, indotta in neuroblastoma. Perdita di NF1 attiva RAS-MEK segnalazione, che a sua volta reprime ZNF423, un coattivatore critico trascrizionale dei recettori dell'acido retinoico. Neuroblastomi con bassi livelli di entrambi NF1 e ZNF423 avere esito estremamente povere. Troviamo mutazioni NF1 nelle linee di cellule di neuroblastoma e nei tumori primari. L'inibizione di MEK segnalazione a valle di NF1 ripristina la risposta alla RA, suggerendo una strategia terapeutica per superare la resistenza RA nei neuroblastomi NF1-carenti.

73: Bushue N, Wan YJ.

### **Retinoid pathway and cancer therapeutics.**

Adv Drug Deliv Rev. 2010 Oct 30;62(13):1285-98. Epub 2010 Aug 3. PubMed PMID: 20654663; PubMedCentral PMCID: PMC2991380.

The retinoids are a class of compounds that are structurally related to vitamin A. Retinoic acid, which is the active metabolite of retinol, regulates a wide range of biological processes including development, differentiation, proliferation, and apoptosis. Retinoids exert their effects through a variety of binding proteins including cellular retinol-binding protein (CRBP), retinol-binding proteins (RBP), cellular retinoic acid-binding protein (CRABP), and nuclear receptors i.e. retinoic acid receptor (RAR) and retinoid x receptor (RXR). Because of the pleiotropic effects of retinoids, understanding the function of these binding proteins and nuclear receptors assists us in developing compounds that have specific effects. This review summarizes our current understanding of how retinoids are processed and act with an emphasis on the application of retinoids in cancer treatment and prevention.

### **Retinoidi percorso e terapie contro il cancro.**

I retinoidi sono una classe di composti che sono strutturalmente simili alla vitamina A. L'acido retinoico, che è il metabolita attivo del retinolo, regola una vasta gamma di processi biologici tra cui lo sviluppo, la differenziazione, proliferazione e apoptosi. I retinoidi esercitano i loro effetti attraverso una varietà di proteine di legame tra cellulari proteina retinolo-legante (CRBP), proteine RBP (RBP), proteina cellulare retinoico vincolanti (CRABP), e recettori nucleari cioè recettore dell'acido retinoico (RAR) e retinoidi x recettore (RXR). A causa degli effetti pleiotropici dei retinoidi, capire la funzione di queste proteine leganti e recettori nucleari ci assiste nello sviluppo di composti che hanno effetti specifici. Questa revisione riassume la nostra attuale comprensione di come i retinoidi sono trasformati e agire con particolare attenzione per l'applicazione dei retinoidi nel trattamento del cancro e della prevenzione.

76: Xu Y, Wang T, Tang R, Tang S.

Tumour Biol. 2010 Dec;31(6):589-95.Epub 2010 Jul 15. PubMed PMID: 20632143.

### **All-trans retinoic acid is capable of inducing folate receptor $\beta$ expression in KG-1 cells.**

The high expression of folate receptor (FR) on cancer cells might be a potential target for cancer therapy. In this study, the FR- $\beta$  expression and the modulation effect of all-trans retinoic acid (ATRA) in a number of cancer cell lines were analyzed. The gateway of ATRA activity on FR- $\beta$  expression was further studied by a panel of retinoid activators and inhibitors. The results revealed that ATRA was capable of upregulating the expression of FR- $\beta$  protein in KG-1 cells in a dosage-dependent manner, not in KG-1a, NB4, HL60, 293, L1210, JAR, and Hela cells. FR- $\beta$  mRNA expression in KG-1 cells was higher when ATRA was present in culture medium at  $10^{-6}$  mol/L for 5 days, and it went down to baseline when ATRA was removed from the medium, vice versa. The upregulation of FR- $\beta$  expression in KG-1 cells by ATRA was not associated with cell proliferation and differentiation. In addition, activators of retinoid acid receptor (RAR) $\alpha$  and RAR $\gamma$ , CD336, and CD2781 also induced FR- $\beta$  expression. The induction of FR- $\beta$  expression by CD336 could be inhibited by RAR $\gamma$  antagonist CD2665; RAR $\beta$  agonist CD-417 and CD-2314 as well as retinoid X receptor (RXR) agonist LG100364 could not induce FR- $\beta$  expression. These results indicate that ATRA within a certain range of concentration could reversibly induce the expression of FR- $\beta$  in a dosage- and cell type-dependent manner, and its action in KG-1 cells might be associated with the signal transduction of retinoid receptor RAR $\alpha$  and RAR $\gamma$ , rather than RAR $\beta$  and RXRs.

### **L'acido all-trans retinoico è in grado di indurre l'espressione del recettore $\beta$ folato in cellule kg-1.**

L'elevata espressione del recettore del folato (FR) sulle cellule tumorali potrebbe essere un potenziale bersaglio per la terapia del cancro. In questo studio, l'espressione FR- $\beta$  e l'effetto di modulazione di tutte le trans retinoico (ATRA) in una serie di linee di cellule di cancro sono stati analizzati. Il gateway di attività ATRA sull'espressione FR- $\beta$  è stato ulteriormente studiato da un gruppo di attivatori e inibitori retinoidi. I risultati hanno rivelato che era in grado di ATRA upregulating l'espressione della proteina FR- $\beta$  in kg-1 le cellule in modo dose-dipendente, non in KG-1a, NB4, HL60, 293, L1210, JAR, e le cellule Hela.

FR- $\beta$  espressione di mRNA in kg-1 di cellule è stata maggiore quando ATRA era presente nel terreno di coltura a  $10^{-6}$  mol / L per 5 giorni, ed è andato giù al basale quando ATRA è stato rimosso dal mezzo, viceversa. La sovraregolazione di espressione FR- $\beta$  in kg-1 da cellule ATRA non è stata associata alla proliferazione e differenziazione cellulare. Inoltre, gli attivatori dei recettori dell'acido retinoidi (RAR)  $\alpha$  e RAR $\gamma$ , CD336, e CD2781 espressione anche indotto FR- $\beta$ . L'induzione dell'espressione FR- $\beta$  da CD336 potrebbe essere inibita da RAR $\gamma$  CD2665 antagonista; RAR $\beta$  agonista CD-417 e CD-2.314 nonché retinoidi recettore X (RXR) LG100364 agonista non poteva indurre espressione FR- $\beta$ . Questi risultati indicano che l'ATRA in un determinato intervallo di concentrazione potrebbe reversibilmente indurre l'espressione della FR- $\beta$  in un dosaggio e modalità a seconda del tipo di cellule, e la sua azione in kg-1 le cellule potrebbero essere associati con la trasduzione del segnale del recettore retinoide RAR $\alpha$  e RAR $\gamma$ , piuttosto che RAR $\beta$  e RXRs.

85: Perri M, Pingitore A, Cione E, Vilardi E, Perrone V, Genchi G.

**Proliferative and anti-proliferative effects of retinoic acid at doses similar to endogenous levels in Leydig MLTC-1/R2C/TM-3 cells.**

Biochim Biophys Acta. 2010 Sep;1800(9):993-1001. Epub 2010 Jun 25. PubMed PMID: 20600628.

**BACKGROUND:** Vitamin A is suggested to be protective against oxidative stress. However, different authors observed pro-oxidant effects of retinoids both in experimental works and clinical trials. These discordances are the bases for the investigation of the proliferative and anti-proliferative properties of retinoic acid (RA) in biological systems.

**METHODS:** Cell viability is determined with the MTT assay. Oxidative stress parameters are detected measuring catalase (CAT) and glutathione S-transferase (GST) enzymatic activities. FABP5 mRNA levels are measured by RT-PCR. Autophagy and apoptosis are analyzed by Monodansylcadaverine (MDC) staining and TUNEL assay, respectively.

**RESULTS AND CONCLUSIONS:** RA, at nutraceutic/endogenous doses (10-200 nM), increases cell viability of testes tumor Leydig cell lines (MLTC-1 and R2C) and modulates antioxidant enzyme activities, as CAT and GST. RA is able to induce proliferation through non-classical and redox-dependent mechanisms accompanied by increased levels of FABP5 mRNA. The redox environment of the cell is currently thought to be extremely important for controlling either apoptosis or autophagy. Apoptosis occurs at pharmacological doses, while autophagy, which plays a critical role in removing damaged or surplus organelles in order to maintain cellular homeostasis, is triggered at the critical concentration of 500 nM RA, both in normal and tumoral cells. Slight variations of RA concentrations are evaluated as a threshold value to distinguish between the proliferative or anti-proliferative effects.

**GENERAL SIGNIFICANCE:** Although retinoids have a promising role as antineoplastic agents, physiological levels of RA play a key role in Leydig cancer progression, fostering proliferation and growth of testicular tumoral mass.

**Effetti proliferativi e anti-proliferativi dell'acido retinoico a dosaggi simili a livelli endogeni in cellule di Leydig MLTC-1/R2C/TM-3.**

**BACKGROUND:** La vitamina A è suggerito per essere protettivo contro lo stress ossidativo. Tuttavia, diversi autori osservano gli effetti pro-ossidanti dei retinoidi, sia in opere sperimentali e studi clinici. Queste discordanze sono le basi per l'indagine della proliferativa e le proprietà anti-proliferative di acido retinoico (RA), nei sistemi biologici.

**METODI:** La vitalità cellulare è determinata con il test MTT. Parametri di stress ossidativo sono rilevati misura catalasi (CAT) e glutatione S-transferasi (GST), attività enzimatiche. FABP5 livelli di mRNA sono misurati mediante RT-PCR. L'autofagia e l'apoptosi sono analizzati da Monodansylcadaverine (MDC) di colorazione e saggio TUNEL, rispettivamente

**RISULTATI E CONCLUSIONI:** RA, a nutraceutico / endogeno dosi (10-200 nM), aumenta la vitalità delle cellule del tumore testicoli linee di cellule di Leydig (MLTC-1 e R2C) e modula le attività degli enzimi antiossidanti, come CAT e GST. RA è in grado di indurre la proliferazione attraverso meccanismi non-classica e redox-dipendente accompagnata da aumento dei livelli di mRNA FABP5. L'ambiente redox della cellula è attualmente ritenuta estremamente importante per il controllo o apoptosi o autofagia. L'apoptosi si verifica alle dosi farmacologiche, mentre l'autofagia, che svolge un ruolo cruciale nel rimuovere gli organelli danneggiati o surplus per mantenere l'omeostasi cellulare, viene attivato alla concentrazione critica di 500 Nm RA, sia in cellule normali e tumorali. Piccole variazioni delle concentrazioni di RA sono valutati come un valore soglia per distinguere tra gli effetti proliferativi o anti-proliferativa.

SIGNIFICATO GENERALE: Anche se i retinoidi hanno un ruolo promettente come agenti antineoplastici, i livelli fisiologici di RA svolgono un ruolo chiave nella progressione del tumore di Leydig, favorendo la proliferazione e la crescita della massa tumorale del testicolo.

87: Kropotova ES, Tychko RA, Zinov'eva OL, Zyrianova AF, Khankin SL, Cherkes VL, Aliev VA, Beresten' SF, Oparina Nlu, Mashkova TD.

#### **[Downregulation of AKR1B10 gene expression in colorectal cancer].**

Mol Biol (Mosk). 2010 Mar-Apr;44(2):243-50.Russian. PubMed PMID: 20586184.

Colorectal cancer is one of the most common cancers in the world. In our work changes of AKR1B1 and AKR1B10 gene expression levels in colorectal tumors were studied. Their potential diagnostic value was previously shown for several other cancer types. These genes encode aldose reductases, which belong to the aldo-keto reductases superfamily consisting of enzymes capable to reduce numerous aromatic and aliphatic aldehydes and ketones. They are also involved into retinoid metabolism and cancerogenesis. We have carried out comparative analysis of mRNA levels of AKR1B1 and AKR1B10 genes in paired samples of normal and colorectal tumor tissues using RT-PCR and quantitative PCR. We have shown for the first time the decrease of activity of these genes in colorectal carcinomas. Significant reduction of AKR1B10 mRNA level was detected in the most of tumor samples (88%, 65/74) even at the early stages of malignancy, and in more than 60% of cases this downregulation was much higher than 10 folds. The decrease of AKR1B1 mRNA level was shown in 10% of tumors only. Therefore, we have detected quite different mRNA expression patterns in colorectal cancer for these two structurally similar genes. These data could indicate different functional roles of these two genes in colorectum. The significant decrease of AKR1B10 mRNA in most samples of colorectal cancer could be considered as potential diagnostic marker of this type of cancer.

#### **La bassa regolazione del gene AKR1B10 nel cancro del colon retto.**

Il cancro coloretale è uno dei tumori più comuni nel mondo. Nel nostro lavoro di cambiamenti AKR1B1 e AKR1B10 livelli di espressione genica nei tumori del colon-retto sono stati studiati. Il loro potenziale valore diagnostico è stato precedentemente mostrato per diversi altri tipi di cancro. Questi geni codificano aldose reductasi, che appartengono alla aldo-cheto reductasi superfamiglia composto da enzimi in grado di ridurre numerosi aldeidi alifatici e aromatici e chetoni. Essi sono anche coinvolti nel metabolismo dei retinoidi e di cancerogenesi. Abbiamo effettuato un'analisi comparativa dei livelli di mRNA di AKR1B1 AKR1B10 e geni in campioni appaiati di tessuti normali e tumorali del colon-retto mediante RT-PCR e PCR quantitativa. Abbiamo dimostrato per la prima volta, la diminuzione di attività di questi geni nei carcinomi del colon-retto. Significativa riduzione del livello di AKR1B10 mRNA è stata rilevata nella maggior parte dei campioni di tumore (88%, 65/74), anche nelle fasi iniziali di malignità, e in oltre il 60% dei casi questo tipo down-regulation è stato molto superiore al 10 pieghe. La diminuzione del livello di mRNA AKR1B1 è stato mostrato nel 10% dei tumori solo. Pertanto, abbiamo rilevato ben diverso pattern di espressione di mRNA nel cancro coloretale di questi due geni strutturalmente simili. Questi dati potrebbero indicare differenti ruoli funzionali di questi due geni in colon-retto. Il significativo calo delle AKR1B10 mRNA nella maggior parte dei campioni di cancro coloretale potrebbe essere considerato come potenziale marcatore diagnostico di questo tipo di cancro.

95: Alfonso HS, Reid A, de Klerk NH, Olsen N, Mina R, Ambrosini GL, Beilby J, Berry G, Musk BA.

**Retinol supplementation and mesothelioma incidence in workers earlier exposed to blue asbestos (Crocidolite) at Wittenoom, Western Australia.**

Eur J Cancer Prev. 2010 Sep;19(5):355-9. PubMed PMID: 20571403.

Owing to the high rates of malignant mesothelioma in workers exposed to crocidolite earlier at Wittenoom and evidence of protection against cancer by vitamin A, a population-based cancer prevention programme providing retinol supplements (25 000 IU/day) was commenced in 1990. The former workers at Wittenoom known to be alive and living in Western Australia in June 1990 constitute the study population. The participants were classified into two groups: those who received supplemental retinol (intervention group) and those who received none (comparison group). The relative rate of mesothelioma for those receiving retinol was estimated using Cox regression, adjusting for cumulative asbestos exposure and age at first exposure to asbestos. Nine hundred and twenty-eight former Wittenoom workers received retinol at some stage of the programme, whereas 1471 workers never received retinol (comparison group). Those who received retinol were younger, had a greater exposure to asbestos and smoked less than the comparison group. There were 65 cases of mesothelioma in the retinol group and 88 in the comparison group. After adjustment, the hazard ratio was 0.99 (95% confidence interval=0.70-1.41). This result did not alter when the participants who received only retinol once or those who received beta-carotene earlier were excluded from the analysis. In conclusion, this study provides little support for possible preventive effects of retinol against mesothelioma in workers exposed to blue asbestos.

**Supplementazione di Retinolo e incidenza del mesotelioma nei lavoratori precedentemente esposti all'amianto blu (crocidolite) a Wittenoom, Western Australia.**

A causa degli alti tassi di mesotelioma maligno in lavoratori esposti a crocidolite prima al Wittenoom e la prova di protezione contro il cancro con vitamina A, una basata sulla popolazione programma di prevenzione del cancro, fornire integrazioni retinolo (25 000 UI / die) è stato avviato nel 1990. I lavoratori ex Wittenoom noti per essere vivi e vegeti in Western Australia nel giugno 1990, costituiscono la popolazione dello studio. I partecipanti sono stati classificati in due gruppi: quelli che hanno ricevuto retinolo supplementare (gruppo intervento) e quelli che hanno ricevuto nessuna (gruppo di controllo). Il tasso relativo di mesotelioma per coloro che ricevono il retinolo è stato stimato utilizzando la regressione di Cox, la regolazione per l'esposizione all'amianto cumulativi e età alla prima esposizione all'amianto. Novecento e 28 ex lavoratori Wittenoom ricevuto retinolo in qualche fase del programma, mentre 1.471 lavoratori non ha mai ricevuto retinolo (gruppo di controllo). Coloro che hanno ricevuto retinolo erano più giovani, avevano una maggiore esposizione ad amianto e di fumare di meno rispetto al gruppo di confronto. Ci sono stati 65 casi di mesotelioma nel gruppo di retinolo e 88 nel gruppo di confronto. Dopo aggiustamento, l'hazard ratio è stato di 0,99 (intervallo di confidenza 95% = 0,70-1,41). Questo risultato non ha alterato quando i partecipanti che hanno ricevuto solo una volta retinolo o coloro che hanno ricevuto il beta-carotene in precedenza sono stati esclusi dall'analisi. In conclusione, questo studio fornisce poco sostegno per possibili effetti preventivi del retinolo contro il mesotelioma in lavoratori esposti ad amianto blu.

102: Hoffman E, Mielicki WP.

**[All-trans retinoic acid (ATRA) in prevention and cancer therapy].**

Postepy Hig Med Dosw (Online). 2010 Jun 9;64:284-90. Review.Polish. PubMed PMID: 20558866.

Retinoids are useful pharmacological agents in therapy and prevention of cancer. All-trans retinoic acid (ATRA) is applied in chemoprevention and differentiation therapy of some cancers with particularly impressive results in the management of acute promyelocytic leukemia (APL). ATRA plays a major role in regulating growth and differentiation of a wide variety of normal and malignant cell types. ATRA mediates these effects by regulating gene transcription. Nuclear retinoic acid receptors (RARs) are considered to be the mediators of most of the effects of ATRA on gene expression. We present a current state of knowledge on the effects of ATRA on cell growth and differentiation as well as describe RARs and their role in the cellular mechanism of ATRA action. A particular attention was paid to the effects of ATRA on proliferation and differentiation of cancer cells.

**[acido all-trans retinoico (ATRA) nella terapia di prevenzione e cancro].**

I retinoidi sono utili agenti farmacologici nella terapia e nella prevenzione del cancro. L'acido all-trans retinoico (ATRA) è applicato in terapia chemioprevenzione e differenziazione di alcuni tipi di cancro, con risultati particolarmente impressionante nella gestione della leucemia promielocitica acuta (APL). ATRA gioca un ruolo importante nella regolazione della crescita e differenziazione di una grande varietà di tipi di cellule normali e maligni. ATRA media questi effetti, regolando la trascrizione del gene. Recettori dell'acido retinoico nucleare (RAR) sono considerati i mediatori della maggior parte degli effetti di ATRA sull'espressione genica. Vi presentiamo uno stato attuale delle conoscenze sugli effetti di ATRA sulla crescita e la differenziazione cellulare e delineare RARs e il loro ruolo nel meccanismo d'azione cellulare ATRA. Particolare attenzione è stata riservata agli effetti di ATRA sulla proliferazione e differenziazione delle cellule tumorali. [acido all-trans retinoico (ATRA) nella prevenzione e nella terapia del cancro.

103: Jacobs ET, Martínez ME, Campbell PT, Conti DV, Duggan D, Figueiredo JC, Haile RW, LeRoy EC, Poynter JN, Thompson PA, Baron JA.

### **Genetic variation in the retinoid X receptor and calcium-sensing receptor and risk of colorectal cancer in the Colon Cancer Family Registry.**

Carcinogenesis. 2010 Aug;31(8):1412-6. Epub2010 Jun 17. PubMed PMID: 20558521; PubMed Central PMCID: PMC2915636.

Genetic variants in the calcium/vitamin D metabolic pathway may be related to risk for colorectal cancer. While several investigations of vitamin D receptor (VDR) polymorphisms and colorectal cancer have been conducted, no studies to date have evaluated the association of genetic variation in the heterodimer partner for VDR, the retinoid X receptor (RXR). Another important gene in this pathway is the calcium-sensing receptor (CASR). Employing a discordant-sibship case-control design, we examined the association between single nucleotide polymorphisms (SNPs) in RXRA and CASR and risk for colorectal cancer overall and by colorectal subsite and microsatellite instability (MSI) status using data from the Colon Cancer Family Registry. No gene-level relationships between RXRA or CASR and colorectal cancer overall were observed. However, for RXRA SNP rs7861779, a high-interest SNP selected for study a priori, there was a statistically significantly increased risk for proximal colorectal cancer among those with at least one A allele [odds ratio (OR) = 1.42; 95% confidence interval (CI) = 1.03-1.97]. Another selected RXRA SNP, rs12004589, was significantly associated with risk of MSI-high cancers (OR = 2.27; 95% CI = 1.13-4.56). Additionally, CASR SNP rs1801726 was significantly associated with a reduced risk for rectal cancer (OR = 0.53; 95% CI = 0.29-0.96). These results provide support that RXRA SNPs rs7861779 and rs12004589 and CASR SNP rs1801726 may be important markers for colorectal neoplasia. Further work is needed to elucidate their role in the carcinogenic pathway.

### **La variazione genetica del recettore X dei retinoidi e dei recettori calcio sensibili e il rischio di tumore del colon-retto del registro della famiglia di tumori del colon.**

Varianti genetiche nel calcio / vitamina D via metabolica può essere collegato al rischio di tumore del colon-retto. Mentre diverse inchieste del recettore della vitamina D (VDR) e polimorfismi del colon-retto sono stati condotti, nessuno studio fino ad oggi hanno valutato l'associazione di variazioni genetiche nel partner eterodimero per VDR, il recettore retinoide X (RXR). Un altro gene importante in questo percorso è il recettore sensibile al calcio (CASR). Impiegando una discordante-sibship design caso-controllo, abbiamo esaminato l'associazione tra polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) in RXRA e CASR e rischio per il tumore coloretale globale e per sito secondario del colon-retto e di instabilità dei microsatelliti (MSI) utilizzando dati di stato per il Cancro Colon famiglia anagrafica . No rapporti gene-livello tra RXRA o CASR e globale del cancro del colon-retto sono stati osservati. Tuttavia, per RXRA SNP rs7861779, un SNP ad alto interesse selezionati per lo studio a priori, c'è stato un rischio statisticamente significativo per prossimale del colon-retto tra quelle con almeno un allele A ratio [odds (OR) = 1,42; intervallo di confidenza del 95% (CI) = 1,03-1,97]. Un altro selezionato RXRA SNP, rs12004589, era significativamente associato al rischio di tumori MSI-alta (OR = 2.27, IC 95% = 1,13-4,56). Inoltre, CASR SNP rs1801726 era significativamente associato ad un ridotto rischio di tumore del retto (OR = 0.53, IC 95% = ,29-,96). Questi risultati forniscono il supporto che RXRA SNPs rs7861779 e rs12004589 e CASR SNP rs1801726 possono essere indicatori importanti per neoplasia coloretale. Sono necessari ulteriori lavori per chiarire il loro ruolo nel percorso cancerogeni.

109: Arrieta O, González-De la Rosa CH, Aréchaga-Ocampo E, Villanueva-Rodríguez G, Cerón-Lizárraga TL, Martínez-Barrera L, Vázquez-Manríquez ME, Ríos-Trejo MA, Alvarez-Avitia MA, Hernández-Pedro N, Rojas-Marín C, De la Garza J.

**Randomized phase II trial of All-trans-retinoic acid with chemotherapy based on paclitaxel and cisplatin as first-line treatment in patients with advanced non-small-cell lung cancer.**

J Clin Oncol. 2010 Jul 20;28(21):3463-71. Epub 2010 Jun 14. PubMedPMID: 20547984.

**PURPOSE:** This randomized phase II trial evaluated whether the combination of cisplatin and paclitaxel (PC) plus all-trans retinoic acid (ATRA) increases response rate (RR) and progression-free survival (PFS) in patients with advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC) with an acceptable toxicity profile and its association with the expression of retinoic acid receptor beta 2 (RAR-beta2) as a response biomarker.

**PATIENTS AND METHODS:** Patients with stages IIIB with pleural effusion and IV NSCLC were included to receive PC, and randomly assigned to receive ATRA 20 mg/m<sup>2</sup>/d (RA/PC) or placebo (P/PC) 1 week before treatment until two cycles were completed. RAR-beta2 expression was analyzed in tumor and adjacent lung tissue.

**RESULTS:** One hundred seven patients were included, 55 in the P/PC group and 52 in the RA/PC group. RR for RA/PC was 55.8% (95% CI, 46.6% to 64.9%) and for P/PC, 25.4% (95% CI, 21.3 to 29.5%; P = .001). The RA/PC group had a longer median PFS (8.9 v 6.0 months; P = .008). Multivariate analysis of PFS showed significant differences for the RA/PC group (hazard ratio, 0.62; 95% CI, 0.4 to 0.95). No significant differences in toxicity grade 3/4 were found between groups, except for hypertriglyceridemia (10% v 0%) in RA/PC (P = .05). Immunohistochemistry and reverse-transcriptase polymerase chain reaction assays showed expression of RAR-beta2 in normal tissues of all tumor samples, but only 10% of samples in the tumor tissue.

**CONCLUSION:** Adding ATRA to chemotherapy could increase RR and PFS in patients with advanced NSCLC with an acceptable toxicity profile. A phase III clinical trial is warranted to confirm these findings.

**Studio randomizzato di fase II di acido all-trans retinoico con chemioterapia a base di paclitaxel e cisplatino come trattamento di prima linea nei pazienti con carcinoma polmonare avanzato non a piccole cellule.**

**SCOPO:** Questo studio randomizzato di fase II ha valutato se la combinazione di cisplatino e paclitaxel (PC) più acido all-trans retinoico (ATRA) aumenta la percentuale di risposta (RR) e la sopravvivenza libera da progressione (PFS) in pazienti con avanzato non a piccole cellule cancro del polmone (NSCLC) con un profilo di tossicità accettabile e la sua associazione con l'espressione del recettore beta dell'acido retinoico 2 (RAR-beta2) come biomarcatori di risposta.

**PAZIENTI E METODI:** I pazienti con stadi IIIB con versamento pleurico e IV NSCLC sono stati inclusi per ricevere PC, e assegnati in modo casuale a ricevere 20 mg / m<sup>2</sup> ATRA / d (RA / PC) o placebo (P / PC) 1 settimana prima il trattamento fino a due cicli sono stati completati. RAR-beta2 espressione è stata analizzata nel tumore e nel tessuto polmonare adiacente.

**RISULTATI:** Un centinaio di sette pazienti sono stati inclusi, 55 nel gruppo PC P e 52 nel gruppo RA PC. RR per RA / PC era il 55,8% (IC 95%, 46,6% al 64,9%) e per P / PC, il 25,4% (95% CI, 21,3-29,5%, p = .001). Il / RA gruppo PC ha avuto un PFS mediana più lunga (8,9 contro 6,0 mesi, p = 0,008). L'analisi multivariata di PFS ha mostrato differenze significative per il / gruppo PC RA (hazard ratio, 0,62, 95% CI, 0,4 a 0,95). Nessuna differenza significativa nella tossicità di grado 3 / 4 sono stati trovati tra i gruppi, ad eccezione di ipertrigliceridemia (10% vs 0%) in AR / PC (P = .05). Immunoistochimica e reverse-transcriptase di reazione a catena della polimerasi analisi hanno mostrato l'espressione di RAR-beta2 nei tessuti normali di tutti i campioni del tumore, ma solo il

10% dei campioni di tessuto tumorale.  
CONCLUSIONE: L'aggiunta di ATRA alla chemioterapia potrebbe aumentare RR e PFS in pazienti con NSCLC in stadio avanzato con un profilo di tossicità accettabile. Uno studio clinico di fase III è garantita per confermare questi risultati.

112: Trojanowicz B, Sekulla C, Lorenz K, Köhrle J, Finke R, Dralle H, Hoang-Vu C.

### **Proteomic approach reveals novel targets for retinoic acid-mediated therapy of thyroid carcinoma.**

Mol Cell Endocrinol. 2010 Aug 30;325(1-2):110-7. Epub 2010 Jun 9. PubMed PMID: 20538039.

Our previous studies demonstrated that retinoic acid (RA)-induced reduction of both, the key glycolytic enzyme ENO1 and proliferation-promoting c-Myc, resulted in decreased vitality and invasiveness of the follicular thyroid carcinoma cell lines FTC-133 and FTC-238. By employing two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry, we identified proteins affected by RA treatment. In addition to previously reported decrease in ENO1 expression, we found that RA led to significantly reduced levels of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), pyruvate kinase isoenzymes M1/M2 (PKM1/M2), peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A (PPIA), transketolase (TKT), annexin A2 (ANXA2), glutathione S-transferase P (GSTP1) and peroxiredoxin 2 (PRDX2) as compared to untreated control. The same proteins investigated on thyroid tissues were found to be significantly up-regulated in follicular, papillary and undifferentiated thyroid carcinomas when compared with goiter and adenoma tissues. These findings identify new target proteins for RA-mediated anti-tumor and re-differentiation therapies and provide novel insights into treatments for thyroid carcinoma.

### **La proteomica rivela nuovi obiettivi per la terapia con acido retinoico-mediata del carcinoma della tiroide.**

I nostri studi precedenti hanno dimostrato che l'acido retinoico (RA)-indotta riduzione sia, l'enzima chiave glicolitico ENO1 e la proliferazione di promozione c-Myc, ha provocato la vitalità ridotta invasività e delle linee di carcinoma tiroideo follicolare cellule FTC-133 e FTC-238. Con l'ausilio di elettroforesi bidimensionale e spettrometria di massa, abbiamo identificato le proteine influenzati dal trattamento RA. Oltre alla diminuzione già segnalati nel ENO1 espressione, abbiamo scoperto che RA portato a livelli significativamente ridotto di deidrogenasi gliceraldeide-3-fosfato (GAPDH), la piruvato chinasi M1/M2 isoenzimi (PKM1/M2), peptidil-prolil cis-trans isomerasi A (PPIA), transchetolasi (TKT), A2 annessina (ANXA2), glutatione S-transferasi P (GSTP1) e perossiredossina 2 (PRDX2) rispetto al controllo non trattato. Le stesse proteine indagato sui tessuti della tiroide sono risultati significativamente up-regolata nei carcinomi della tiroide follicolare, papillare e indifferenziato rispetto ai tessuti gozzo e adenoma. Questi risultati identificare le proteine nuovo obiettivo per RA-mediata anti-tumorale e terapie ri-differenziazione e di fornire spunti romanzo in trattamenti per il carcinoma della tiroide.

114: Benelli R, Monteghirfo S, Venè R, Tosetti F, Ferrari N.

**The chemopreventive retinoid 4HPR impairs prostate cancer cell migration and invasion by interfering with FAK/AKT/GSK3beta pathway and beta-catenin stability.**

Mol Cancer. 2010 Jun 10;9:142. PubMed PMID: 20537156; PubMed Central PMCID: PMC2898704.

**BACKGROUND:** Prostate cancer shows an extremely slow progression, appearing in its metastatic, hormone refractory phenotype mostly in elderly men. The chemopreventive targeting of this tumor could accordingly delay its malignancy over life expectancy. The cancer chemopreventive retinoid N-(4 hydroxyphenyl)retinamide (4HPR) has already been shown to restrain prostate cancer growth in vitro and in vivo, though its mechanisms of action are only partially explained.

**RESULTS:** We found that 4HPR impairs DU145 and PC3 prostate cancer cells migration and invasion by down-regulating FAK and AKT activation and by enhancing beta-catenin degradation, causing the downregulation of target genes like cyclin D1, survivin and VEGF. This non-migratory phenotype was similarly produced in both cell lines by stable silencing of beta-catenin. 4HPR was able to decrease AKT phosphorylation also when powerfully upregulated by IGF-1 and, consequently, to impair IGF-1-stimulated cell motility. Conversely, the expression of constitutively active AKT (myr-AKT) overcame the effects of 4HPR and beta-catenin-silencing on cell migration. In addition, we found that BMP-2, a 4HPR target with antiangiogenic activity, decreased prostate cancer cell proliferation, migration and invasion by down-regulating the pathway described involving AKT phosphorylation, beta-catenin stability and cyclin D1 expression.

**CONCLUSION:** These data point to 4HPR as a negative regulator of AKT phosphorylation, effectively targeting the beta-catenin pathway and inducing a relatively benign phenotype in prostate cancer cells, limiting neoangiogenesis and cell invasion.

**La chemioprevenzione dei retinoidi 4 HPR ostacola la migrazione e l'invasione di cellule di cancro alla prostata interferendo con la via FAK/AKT/GSK3beta e la stabilità di beta-catenina.**

**BACKGROUND:** Il cancro della prostata mostra una progressione estremamente lenta, che figurano nel suo metastatico, fenotipo ormono-refrattario per lo più negli uomini anziani. La chemioprevenzione targeting di questo tumore potrebbe ritardare di conseguenza la sua malignità su aspettativa di vita. La chemioprevenzione del cancro retinoidi N-(4 idrossifenil) retinamide (4HPR) ha già dimostrato di frenare la crescita del cancro della prostata in vitro e in vivo, anche se i suoi meccanismi di azione sono solo in parte spiegato.

**RISULTATI:** Abbiamo trovato che 4HPR danneggia DU145 e PC3 cellule di cancro alla prostata migrazione e l'invasione di down-regolazione di attivazione FAK e AKT e rafforzando la degradazione della beta-catenina, causando il down-regulation dei geni bersaglio come ciclina D1, survivina e VEGF. Questo fenotipo non migratori è stata prodotta in modo simile in entrambe le linee cellulari mettendo a tacere stabile della beta-catenina. 4HPR stato in grado di diminuire fosforilazione di AKT anche quando fortemente upregulated di IGF-1 e, di conseguenza, di compromettere l'IGF-1-stimolata motilità cellulare. Al contrario, l'espressione di AKT costitutivamente attivo (MYR-AKT) ha superato gli effetti della 4HPR e beta-catenina-silencing sulla migrazione delle cellule. Inoltre, abbiamo riscontrato che BMP-2, un obiettivo 4HPR ad azione antiangiogenica, diminuzione del cancro alla prostata proliferazione delle cellule, la migrazione e l'invasione di down-regolazione del pathway descritto coinvolge la fosforilazione AKT, stabilità beta-catenina e di espressione della ciclina D1.

**CONCLUSIONE:** Questi dati al punto 4HPR come un regolatore negativo della fosforilazione di AKT, in modo efficace il targeting via beta-catenina e di indurre un fenotipo relativamente benigna

in cellule tumorali della prostata, limitando neoangiogenesi e l'invasione delle cellule.

122:Jones G.

### **Vitamin D analogs.**

Endocrinol Metab Clin North Am. 2010Jun;39(2):447-72, table of contents. Review. PubMed PMID: 20511062.

Vitamin D has gone through a renaissance with the association of vitamin D deficiency with a wide array of common diseases including breast, colorectal and prostate cancers, cardio-vascular disease, autoimmune conditions and infections. Vitamin D analogs constitute a valuable group of compounds which can be used to regulate gene expression in functions as varied as calcium and phosphate homeostasis, as well as cell growth regulation and cell differentiation of a wide spectrum of cell types. This review will discuss the full range of vitamin D compounds currently available, some of their possible uses, and potential mechanisms of action.

### **Vitamina D e analoghi**

La vitamina D è passato attraverso una rinascita con l'associazione di carenza di vitamina D con una vasta gamma di malattie comuni compresi seno, colon-retto e della prostata, malattie cardio-vascolari, malattie autoimmuni e le infezioni. Analoghi della vitamina D costituiscono un gruppo importante di composti che possono essere utilizzate per regolare l'espressione genica nelle funzioni diversi come omeostasi del calcio e fosfato, nonché il regolamento la crescita delle cellule e la differenziazione delle cellule di un ampio spettro di tipi cellulari. Questa recensione discuterà l'intera gamma di vitamina D composti attualmente disponibili, alcuni dei loro possibili utilizzi, e potenziali meccanismi di azione.

123: Papi A, Rocchi P, Ferreri AM, Orlandi M.

**RXRgamma and PPARgamma ligands in combination to inhibit proliferation and invasiveness in colon cancer cells.**

Cancer Lett. 2010 Nov 1;297(1):65-74. Epub 2010 May 26. PubMed PMID: 20510503.

Nuclear retinoid X receptors (RXRs) and peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) are potential candidates as drug target for cancer prevention and treatment. We investigated if the retinoid 6-OH-11-O-hydroxyphenanthrene (IIF) potentiates the antitumoral properties of PPARgamma ligands as ciglitazone and pioglitazone, on two colon cancer cell lines: HCA-7 and HCT-116. Drugs inhibited cell growth and induced apoptosis synergistically. The combination resulted in a decrease of cyclooxygenase-2, metalloproteinases-2 and -9 expression level and activity while PPARgamma, RXRgamma and tissue inhibitors of metalloproteinase-1 and -2 expression were increased. Finally, IIF potentiated PPAR transcriptional activity by enhancement of peroxisome proliferator response elements transactivation.

2010 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

**Ligandi RXR gamma e ligandi PPAR-gamma in combinazione per inibire la proliferazione e invasività nelle cellule tumorali del colon.**

Nucleare recettori dei retinoidi X (RXR) e peroxisome proliferator-activated recettori (PPARs) sono candidati potenziali come bersaglio di farmaci per la prevenzione e trattamento del cancro. Abbiamo studiato se il retinoid 6-OH-11-O-hydroxyphenanthrene (IIF) potenzia le proprietà antitumorali of PPARgamma ligandi come ciglitazone e pioglitazone, su due linee cellulari del cancro al colon. HCA-7 e HCT-116 Farmaci inibito la crescita cellulare e apoptosi indotta sinergicamente La combinazione ha determinato un calo di cyclooxygenase-2, metalloproteinasi-2 e -9 e livello di espressione. attività mentre PPARgamma, RXRgamma e inibitori tissutali delle metalloproteasi-1 e -2 espressione sono state aumentate. Infine, IIF attività trascrizionale di PPAR potenziato valorizzazione del peroxisome proliferator transattivazione elementi di risposta.

125: Singh AT, Evens AM, Anderson RJ, Beckstead JA, Sankar N, Sassano A, Bhalla S, Yang S, Plataniias LC, Forte TM, Ryan RO, Gordon LI.

**All trans retinoic acid nanodisks enhance retinoic acid receptor mediated apoptosis and cell cycle arrest in mantle cell lymphoma.**

Br J Haematol. 2010 Jul;150(2):158-69. Epub 2010 May 9. PubMed PMID: 20507312; PubMed Central PMCID: PMC2907750.

Mantle cell lymphoma (MCL) is characterized by translocation t(11;14)(q13;q32), aggressive clinical behaviour, and poor patient outcomes following conventional chemotherapy. New treatment approaches are needed that target novel biological pathways. All trans retinoic acid (ATRA) is a key retinoid that acts through nuclear receptors that function as ligand-inducible transcription factors. The present study evaluated cell killing effects of ATRA-enriched nanoscale delivery particles, termed nanodisks (ND), on MCL cell lines. Results show that ATRA-ND induced cell death more effectively than naked ATRA (dimethyl sulphoxide) or empty ND. ATRA-ND induced reactive oxygen species (ROS) generation to a greater extent than naked ATRA. The antioxidant, N-acetylcysteine, inhibited ATRA-ND induced apoptosis. Compared to naked ATRA, ATRA-ND enhanced G1 growth arrest, up-regulated p21 and p27, and down regulated cyclin D1. At ATRA concentrations that induced apoptosis, expression levels of retinoic acid receptor-alpha (RARalpha) and retinoid X receptor-gamma (RXRgamma) were increased. Compared to naked ATRA, ATRA-ND significantly stimulated transcriptional activity of RARA in a model carcinoma cell line. Furthermore, the RAR antagonist, Ro 41-5253, inhibited ATRA-ND induced ROS generation and prevented ATRA-ND induced cell growth arrest and apoptosis. In summary, incorporation of ATRA into ND enhanced the biological activity of this retinoid in cell culture models of MCL.

**I nanodisk all-trans acido retinoico aumentano l'apoptosi mediata da recettori dell'acido retinoico e arrestano il ciclo cellulare nel linfoma a cellule del mantello**

Linfoma a cellule del mantello (MCL) è caratterizzata dalla traslocazione t(11;14)(q13;q32), il comportamento clinico aggressivo, e poveri esiti dei pazienti dopo la chemioterapia convenzionale. Nuovi metodi di trattamento sono necessari nuovi percorsi, che biologico bersaglio. L'acido all trans retinoico (ATRA) è un retinoide chiave che agisce attraverso i recettori nucleari che funzionano come fattori di trascrizione ligando-inducibile. Il presente studio ha valutato gli effetti delle cellule uccisione di ATRA arricchita di particelle nanometriche di consegna, denominato nanodisks (ND), su linee cellulari MCL. I risultati mostrano che ATRA-ND morte cellulare indotta da più efficacemente di nudo ATRA (dimetilsolfossido) o ND vuoto. ATRA-ND indotta specie reattive dell'ossigeno (ROS) in misura superiore a nudo ATRA. L'antiossidante, N-acetilcisteina, inibito l'apoptosi indotta da ATRA-ND. Rispetto a nudo ATRA, ATRA-ND avanzata G1 arresto della crescita, p21 and up-regolato p27 e ciclina D1 giù regolamentato. A concentrazioni di ATRA che l'apoptosi indotta, i livelli di espressione del recettore dell'acido retinoico alfa (RARalpha) e recettore retinoide X-gamma (RXRgamma) sono stati aumentati. Rispetto a nudo ATRA, ATRA-ND notevolmente stimolato l'attività trascrizionale di RARA in una linea cellulare modello di carcinoma. Inoltre, l'antagonista RAR, Ro 41-5.253, inibito ATRA-ND indotta generazione di ROS e impedito ATRA-ND indotta arresto della crescita cellulare e apoptosi. In sintesi, l'incorporazione di ATRA in ND rafforzata l'attività biologica di questo retinoidi in modelli cellulari cultura del MCL.

150: Zhang Z, Kovalenko P, Cui M, Desmet M, Clinton SK, Fleet JC.

**Constitutive activation of the mitogen-activated protein kinase pathway impairs vitamin D signaling in human prostate epithelial cells.**

J Cell Physiol. 2010Aug;224(2):433-42. PubMed PMID: 20432439; PubMed Central PMCID: PMC2916698.

We studied the effect of prolonged activation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling on 1,25 dihydroxyvitamin D (1,25(OH)(2)D(3)) action in the immortalized human prostate epithelial cell line RWPE1 and its Ki-Ras transformed clone RWPE2. 1,25(OH)(2)D(3)-treatment caused growth arrest and induced gene expression in both cell lines but the response was blunted in RWPE2 cells. Vitamin D receptor (VDR) levels were lower in RWPE2 cells but VDR over-expression did not increase vitamin-D-mediated gene transcription in either cell line. In contrast, MAPK inhibition restored normal vitamin D transcriptional responses in RWPE2 cells and MAPK activation with constitutively active MEK1R4F reduced vitamin-D-regulated transcription in RWPE1 cells. 1,25(OH)(2)D(3)-mediated transcription depends upon the VDR and its heterodimeric partner the retinoid X receptor (RXR) so we studied whether changes in the VDR-RXR transcription complex occur in response to MAPK activation. Mutation of putative phosphorylation sites in the activation function 1 (AF-1) domain (S32A, T82A) of RXRalpha restored 1,25(OH)(2)D(3)-mediated transactivation in RWPE2 cells. Mammalian two-hybrid and co-immunoprecipitation assays revealed a vitamin-D-independent interaction between steroid receptor co-activator-1 (SRC-1) and RXRalpha that was reduced by MAPK activation and was restored in RWPE2 cells by mutating S32 and T82 in the RXRalpha AF-1 domain. Our data show that a common contributor to cancer development, prolonged activation of MAPK signaling, impairs 1,25(OH)(2)D(3)-mediated transcription in prostate epithelial cells. This is due in part to the phosphorylation of critical amino acids in the RXRalpha AF-1 domain and impaired co-activator recruitment.

**Attivazione costitutiva della via della protein chinasi mitogeno-attivata ostacola segnalazione di vitamina D in cellule epiteliali della prostata umana.**

Abbiamo studiato l'effetto di attivazione prolungata della proteina chinasi mitogeno-attivata (MAPK) segnalazione 1,25 diidrossivitamina D (1,25 (OH) (2) D (3)) l'azione nel immortalato umano linea di cellule epiteliali della prostata e dei suoi RWPE1 Ki-Ras trasformato RWPE2 clone. 1,25 (OH) (2) D (3)-trattamento ha causato l'arresto della crescita e l'espressione genica indotta in entrambe le linee cellulari, ma la risposta è stata smussata nelle cellule RWPE2. Recettore della vitamina D (VDR) i livelli erano più bassi nelle cellule RWPE2 ma VDR sovra-espressione non ha aumentato la trascrizione del gene della vitamina-D-mediata in entrambe le linee cellulari. Al contrario, l'inibizione di MAPK ripristinato la normale vitamina D risposte trascrizionale in cellule RWPE2 e attivazione di MAPK con costitutivamente attiva trascrizione MEK1R4F ridotti di vitamina D-regolato in RWPE1 cellule. 1,25 (OH) (2) trascrizione D (3)-mediata dipende dal VDR e il suo partner eterodimerica il recettore retinoide X (RXR), così abbiamo studiato se l'evoluzione del complesso di trascrizione VDR-RXR si verificano in risposta all'attivazione di MAPK. Mutazione di putativi siti di fosforilazione nella funzione di attivazione 1 (AF-1) dominio (S32A, T82A) di RXRalpha restaurato 1,25 (OH) (2) transattivazione D (3)-mediata in cellule RWPE2. Mammiferi doppio ibrido e saggi di co-immunoprecipitazione hanno rivelato un'interazione vitamina-D-indipendenti tra recettori steroidei co-attivatore-1 (SRC-1) e RXRalpha che è stata ridotta di MAPK e fu restaurata in cellule RWPE2 da mutazione S32 e T82 in l'obiettivo AF-1 RXRalpha dominio. I nostri dati mostrano che un contributo comune per lo sviluppo del cancro, l'attivazione prolungata di MAPK segnalamento, ostacola 1,25 (OH) (2) D (3) trascrizione-mediata

in cellule epiteliali della prostata. Ciò è dovuto in parte alla fosforilazione della critica aminoacidi nel dominio AF-1 RXRalpha e ridotta assunzione di co-attivatore.

152: Cho YM, Yang AH, Kim BY, Han YH.

**The cleavage fragment of retinoid X receptor-alpha ligand binding domain inhibits radiosensitization by retinoic acid.**

Oncol Rep. 2010 Jun;23(6):1715-20. PubMed PMID: 20428830.

Retinoid X receptor-alpha (RXR alpha) fragments are known to be produced in some cancer cells by proteolytic cleavage. Previous finding that ligand binding domain (LBD) fragment of RXR alpha specifically inhibits retinoic acid receptor-gamma (RAR gamma) activity led us to investigate the functional role of RXR alpha LBD fragment in radiosensitization by retinoic acid (RA). Ectopic expression of RXR alpha LBD fragment in cells that do not have a detectable endogenous RXR alpha LBD fragment, blocked synergistic radiosensitizing action of RA, as determined by growth inhibition, cell death and colony formation assays. However, H460 cell, which has an endogenous RXR alpha LBD fragment, was not radiosensitized by RA regardless of the ectopic RXR alpha LBD fragment expression. These results were paralleled with the pattern of p21 Waf1/Cip1 induction by the treatment of RA in combination with ionizing radiation (IR). Taken together, we hypothesize that the RXR alpha LBD fragment may act as a negative regulator of radiosensitizing effect of RA by restricting the RAR gamma-mediated biological response to RA.

**Il frammento di spaccatura del dominio di legame recettore-alpha ligand X retinoid inibisce radiosensibilmente attraverso l'acido retinoico.**

Frammenti di retinoidi X-recettore alfa (alfa RXR) sono noti per essere prodotti in alcune cellule tumorali per scissione proteolitica. Precedente accertamento dominio di legame del ligando (LBD) frammento di RXR alfa inibisce specificamente l'acido retinoico recettore-gamma (RAR gamma) di attività ci ha portato ad indagare il ruolo funzionale di RXR alfa LBD frammento in radiosensibilizzanti da acido retinoico (RA). Espressione ectopica di RXR alfa LBD frammento in cellule che non hanno un rilevabile endogeno alfa frammento RXR LBD, ha bloccato l'azione sinergica radiosensibilizzante di RA, come determinato dalla inibizione della crescita, la morte cellulare e saggi di formazione di colonie. Tuttavia, la cella H460, che ha un alfa endogeno frammento RXR LBD, non era radiosensitized da RA indipendentemente dalla espressione ectopica alfa frammento RXR LBD. Questi risultati sono stati in parallelo con il modello di p21 WAF1/CIP1 induzione dal trattamento di RA in combinazione con radiazioni ionizzanti (IR). Nel loro insieme, abbiamo ipotizzato che l'alfa RXR LBD frammento può agire come un regolatore negativo di radiosensibilizzante effetto di RA, limitando la gamma-mediata risposta biologica RAR a RA.

173: Fan J, Eastham L, Varney ME, Hall A, Adkins NL, Chetel L, Sollars VE, Georgel P, Niles RM.

### **Silencing and re-expression of retinoic acid receptor beta2 in human melanoma.**

Pigment Cell Melanoma Res. 2010 Jun;23(3):419-29. Epub 2010 Mar 29. Erratum in: Pigment Cell Melanoma Res. 2010 Oct;23(5):722. Chetel, Lora [added]. PubMed PMID: 20374520.

Many melanoma cells are resistant to the anti-proliferative effect of all trans retinoic acid (ATRA). Retinoic Acid Receptor-beta2 (RAR-beta2) mediates the ATRA growth inhibition. We found a correlation between the anti-proliferative activity of ATRA and expression of RAR-beta2. There was not a strict correlation between DNA methylation of RAR-beta gene and its expression. There was no difference in global and RARbeta specific nucleosome repeat length (NRL) in melanoma and melanocytes or between control and ATRA treated cells. Pan-acetylation of H3 and H4 within the RAR-beta gene promoter was higher in cells expressing RAR-beta2. All trans retinoic acid treatment of responsive cells did not change pan-acetylation of H3/H4, but addition of ATRA to non-responsive cells increased H4 pan-acetylation. Phytochemicals or the histone deacetylase inhibitor Trichostatin A did not restore expression of RAR-beta2. Treatment of WM1366 melanoma cells with 5-aza 2'-deoxycytidine reactivated RAR-beta2 gene expression and restored the ability of ATRA to further induce the expression of this gene. Therefore, promoter methylation is responsible for silencing of RAR-beta2 in some melanoma cells and pan-acetylation of H3 likely plays a permissive role in expression of RAR-beta2.

### **Silenziamento e ri-espressione del recettore beta2 dell'acido retinoico nel melanoma**

Cellule di melanoma molti sono resistenti agli effetti anti-proliferativo di tutti i trans retinoico (ATRA). Acido Retinoico recettore beta2 (RAR-beta2) media l'inibizione della crescita ATRA. Abbiamo trovato una correlazione tra l'attività anti-proliferativa di ATRA e l'espressione di RAR-beta2. Non c'era una stretta correlazione tra la metilazione del DNA del gene RAR-beta e la sua espressione. Non c'era alcuna differenza a livello globale e RARbeta lunghezza specifica ripetere nucleosoma (NRL) nel melanoma e melanociti o tra controllo e cellule trattate con ATRA. Pan-acetilazione di H3 e H4 nel promotore del gene RAR-beta è stata maggiore nelle cellule che esprimono RAR-beta2. Tutti i trattamenti trans retinoico di cellule responsive non cambia pan-acetilazione di H3/H4, ma l'aggiunta di ATRA a cellule non-responsive aumentato H4 pan-acetilazione. Phytochemicals o la istone deacetilasi inibitore tricostatina A non ripristinare l'espressione di RAR-beta2. Il trattamento di cellule di melanoma WM1366 con 5-aza-2'-deossicitidina riattivato RAR-beta2 espressione genica e restaurato la capacità di ATRA di indurre ulteriormente l'espressione di questo gene. Pertanto, la metilazione del promotore è responsabile per il silenziamento di RAR-beta2 in alcune cellule di melanoma e pan-acetilazione di H3 gioca probabilmente un ruolo permissivo nella espressione di RAR-beta2.

175: He BC, Chen L, Zuo GW, Zhang W, Bi Y, Huang J, Wang Y, Jiang W, Luo Q, Shi Q, Zhang BQ, Liu B, Lei X, Luo J, Luo X, Wagner ER, Kim SH, He CJ, Hu Y, Shen J, Zhou Q, Rastegar F, Deng ZL, Luu HH, He TC, Haydon RC.

**Synergistic antitumor effect of the activated PPARgamma and retinoid receptors on human osteosarcoma.**

Clin Cancer Res. 2010 Apr 15;16(8):2235-45. Epub 2010 Apr 6. PubMed PMID: 20371684.

**PURPOSE:** Osteosarcoma is the most common primary malignancy of bone. The long-term survival of osteosarcoma patients hinges on our ability to prevent and/or treat recurrent and metastatic lesions. Here, we investigated the activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) and retinoid receptors as a means of differentiation therapy for human osteosarcoma.

**EXPERIMENTAL DESIGN:** We examined the endogenous expression of PPARgamma and retinoid receptors in a panel of osteosarcoma cells. Ligands or adenovirus-mediated overexpression of these receptors were tested to inhibit proliferation and induce apoptosis of osteosarcoma cells. Osteosarcoma cells overexpressing the receptors were introduced into an orthotopic tumor model. The effect of these ligands on osteoblastic differentiation was further investigated.

**RESULTS:** Endogenous expression of PPARgamma and isotypes of retinoic acid receptor (RAR) and retinoid X receptor (RXR) is detected in most osteosarcoma cells. Troglitazone, 9-cis retinoic acid (RA), and all-trans RA, as well as overexpression of PPARgamma, RARalpha, and RXRalpha, inhibit osteosarcoma cell proliferation and induce apoptosis. A synergistic inhibitory effect on osteosarcoma cell proliferation is observed between troglitazone and retinoids, as well as with the overexpression pairs of PPARgamma/RARalpha, or PPARgamma/RXRalpha. Overexpression of PPARgamma, RARalpha, RXRalpha, or in combinations inhibits osteosarcoma tumor growth and cell proliferation in vivo. Retinoids (and to a lesser extent, troglitazone) are shown to promote osteogenic differentiation of osteosarcoma cells and mesenchymal stem cells.

**CONCLUSIONS:** Activation of PPARgamma, RARalpha, and RXRalpha may act synergistically on inhibiting osteosarcoma cell proliferation and tumor growth, which is at least partially mediated by promoting osteoblastic differentiation of osteosarcoma cells.

**Effetti antitumorali sinergici dei recettori di PPARgamma e dei retinoidi in caso di osteosarcoma**

**SCOPO:** osteosarcoma è il tumore maligno più comune primario del tessuto osseo. La sopravvivenza a lungo termine dei pazienti osteosarcoma dipende dalla nostra capacità di prevenire e / o trattare le lesioni ricorrenti e metastatici. Qui, abbiamo studiato l'attivazione del recettore gamma attivato (PPAR-gamma) e recettori dei retinoidi come mezzo di terapia di differenziazione per osteosarcoma umano.

**Disegno sperimentale:** Abbiamo esaminato l'espressione endogena di PPARgamma e recettori dei retinoidi in un pannello di cellule di osteosarcoma. Leganti o sovraespressione adenovirus-mediata di questi recettori sono stati testati per inibire la proliferazione e induce l'apoptosi delle cellule di osteosarcoma. cellule Osteosarcoma iperesprimenti i recettori sono state introdotte in un modello di tumore ortotopica. L'effetto di questi ligandi sulla differenziazione osteoblastica è stata ulteriormente approfondita.

**RISULTATI:** espressione endogena di PPARgamma e isotipi del recettore dell'acido retinoico (RAR) e recettore retinoide X (RXR) viene rilevato in cellule più osteosarcoma. Troglitazone, 9-cis acido retinoico (RA), e all-trans RA, così come la sovraespressione di PPAR-gamma, RARalpha, e RXRalpha, inibiscono la proliferazione delle cellule di osteosarcoma ed indurre apoptosi. Un effetto sinergico inibitorio sulla proliferazione delle cellule osteosarcoma è osservata tra troglitazone e retinoidi, così come con le coppie sovraespressione di PPARgamma / RARalpha, o PPARgamma /

RXRalpha. Sovraespressione di PPAR-gamma, RARalpha, RXRalpha, o in combinazioni osteosarcoma inibisce la crescita tumorale e la proliferazione cellulare in vivo. Retinoidi (e in misura minore, troglitazone) sono indicati per promuovere la differenziazione delle cellule di osteosarcoma osteogenico e cellule staminali mesenchimali.

**CONCLUSIONI:** L'attivazione di PPAR-gamma, RARalpha, e RXRalpha possono agire sinergicamente per inibire la proliferazione delle cellule di osteosarcoma e la crescita tumorale, che è almeno in parte mediata attraverso la promozione di differenziazione delle cellule osteoblastiche osteosarcoma.

182: Lee JH, Yoon JH, Yu SJ, Chung GE, Jung EU, Kim HY, Kim BH, Choi DH, Myung SJ, Kim YJ, Kim CY, Lee HS.

**Retinoic acid and its binding protein modulate apoptotic signals in hypoxic hepatocellular carcinoma cells.**

Cancer Lett. 2010Sep 28;295(2):229-35. Epub 2010 Mar 28. PubMed PMID: 20350780.

Hypoxia induces survival signals in hepatocellular carcinoma (HCC). We attempted to find a hypoxia-induced signal that could be used for modulating HCC cell death. Cellular retinoic acid binding protein-II (CRABP-II) expression was significantly increased in hypoxic HCC cells. Treatment with retinoic acid (RA), a ligand for CRABP-II, induced HCC cell apoptosis more effectively in hypoxia than in normoxia, whereas hypoxia-induced CRABP-II expression attenuated RA-induced apoptosis. Inhibition of CRABP-II enhanced RA-induced apoptosis and sensitized RA-resistant HCC cells to RA cytotoxicity by attenuating p42/44 MAPK and Akt activation. Therefore, RA/CRABP-II signal modulation is therapeutically implicated in infiltrative HCCs exposed to hypoxia.

**L'acido retinoico e le proteine legate modulano i segnali apoptotici nelle cellule con carcinoma epatocellulare ed ipossia**

L'ipossia induce segnali di sopravvivenza nel carcinoma epatocellulare (HCC). Abbiamo tentato di trovare un segnale di ipossia indotto che potrebbe essere utilizzato per modulare la morte delle cellule HCC. Cellular acido retinoico legame proteina-II (CRABP-II) espressione è risultata significativamente aumentata in cellule ipossiche HCC. Il trattamento con acido retinoico (RA), un ligando per CRABP-II, ha indotto apoptosi delle cellule di HCC in modo più efficace in ipossia che in normossia, mentre l'ipossia indotta espressione CRABP-II attenuato RA-indotto apoptosi. L'inibizione di CRABP-II migliorata RA-apoptosi indotta e sensibilizzate cellule RA-resistenti HCC di citotossicità RA attenuando p42/44 MAPK e l'attivazione di Akt. Pertanto, RA / segnale CRABP-II modulazione è terapeuticamente implicato in HCC infiltrativa esposti a ipossia.

188: Donkena KV, Karnes RJ, Young CY.

**Vitamins and prostate cancer risk.**

Molecules. 2010 Mar 12;15(3):1762-83. Review. PubMed PMID: 20336012.

Prostate cancer (PC) is the second most common cancer in men worldwide. Its prevention and treatment remain a challenge to clinicians. Here we review the relationship of vitamins to PC risk. Many vitamins and related chemicals, including vitamin A, retinoids, several B vitamins, vitamin C, vitamin D and vitamin E have shown their anti-cancer activities as anti-oxidants, activators of transcription factors or factors influencing epigenetic events. Although laboratory tests including the use of animal models showed these vitamins may have anti-PC properties, whether they can effectively prevent the development and/or progression of PC in humans remains to be intensively studied subjects. This review will provide up-to-date information regarding the recent outcomes of laboratory, epidemiology and/or clinical trials on the effects of vitamins on PC prevention and/or treatment.

**Vitamine e rischio di cancro prostatico.**

Il cancro della prostata (PC) è il secondo tumore più comune negli uomini di tutto il mondo. La sua prevenzione e il trattamento rimangono una sfida per i clinici. Qui passiamo in rassegna il rapporto di vitamine al rischio di PC. Molte vitamine e prodotti chimici correlati, tra cui la vitamina A, retinoidi, diverse vitamine del gruppo B, vitamina C, vitamina D e vitamina E hanno dimostrato la loro attività anti-cancro, anti-ossidanti, attivatori dei fattori di trascrizione o di fattori che influenzano gli eventi epigenetici. Anche se i test di laboratorio tra cui l'uso di modelli animali ha mostrato queste vitamine possono avere proprietà anti-PC, sia che si può impedire efficace lo sviluppo e / o la progressione di PC negli esseri umani deve essere ancora studiata soggetti. L'analisi offrirà a informazioni aggiornate per quanto riguarda i risultati recenti di laboratorio, epidemiologia e / o studi clinici sugli effetti delle vitamine in materia di prevenzione PC e / o trattamento.

189: Kapetanovic IM, Horn TL, Johnson WD, Cwik MJ, Detrisac CJ, McCormick DL.

**Murine oncogenicity and pharmacokinetics studies of 9-cis-UAB30, an RXR agonist, for breast cancer chemoprevention.**

Int J Toxicol. 2010 Mar-Apr;29(2):157-64.PubMed PMID: 20335511.

The synthetic retinoic acid analog, 9-cis-UAB30 [(2E,4E,6Z,8E)-8-(3',4'-dihydro-1'(2'H)-naphthalen-1'-ylidene)-3,7-dimethyl-2,4,6-octatrienoic acid], is a specific ligand for the retinoid X receptor. Murine oncogenicity and pharmacokinetics studies were performed as part of the preclinical development of 9-cis-UAB30 for breast cancer chemoprevention. In the oncogenicity study, TSG-p53((+/-)) (p53 knockout) mice (25 per sex per group) received daily gavage exposure to 9-cis-UAB30 doses of 0 (control), 30, 100, or 300 mg/kg/d for 6 months. Positive controls received p-cresidine (400 mg/kg/d) for 6 months. 9-cis-UAB30 had no biologically significant effects on survival, body weight, body weight gain, clinical signs, hematology, or clinical chemistry but induced dose-related hepatomegaly in both sexes and decreased thymus weights in high-dose females. Gross and microscopic pathology provided no evidence of 9-cis-UAB30 toxicity or oncogenicity; by contrast, p-cresidine induced urinary bladder neoplasms in more than 60% of male and female mice. It was concluded that 9-cis-UAB30 is not oncogenic in p53((+/-)) mice. In the pharmacokinetics study, C57BL/6 mice received daily gavage exposure to 9-cis-UAB30 (100 or 300 mg/kg/d) for 1 or 7 days. Pharmacokinetic parameters were similar after 1 and 7 days of dosing. Dose-related peak plasma levels of 9-cis-UAB30 were seen between 0.25 and 3 hours; volume of distribution was comparable at both dose levels. Increases in area under the curve were less than proportional to dose and were associated with an increased rate of apparent clearance and decreased elimination half-life. These results suggest decreased absorption and/or possible induction of clearance mechanisms. Enzyme induction may underlie the hepatomegaly seen in mice treated with 9-cis-UAB30 for 6 months in the oncogenicity study.

**Oncogenicità murina e studi farmacocinetici di 9-cis-UAB30, un agonista di RXR, per la chemio prevenzione del tumore al seno.**

L'analogo sintetico acido retinoico, 9-cis-UAB30 [(2E, 4E, 6Z, 8E) -8 - (3 ', 4'-diidro-1' (2'H)-naftalen-1 '-ilidene) -3 ,7-dimetil-2] acido ,4,6-octatrienoico, è un ligando specifico per il recettore X dei retinoidi. studi di oncogenesi murino e la farmacocinetica sono state effettuate come parte dello sviluppo preclinico di 9-cis-UAB30 per la chemioprevenzione del cancro al seno. Nello studio di oncogenesi, ((+/-)) TSG-p53 (p53 knockout) topo (25 per sesso per gruppo) hanno ricevuto esposizione giornaliera al "gavage" 9-cis-UAB30 dosi di 0 (controllo), 30, 100 o 300 mg / kg / die per 6 mesi. I controlli positivi ricevuti p-cresidine (400 mg / kg / die) per 6 mesi. 9-cis-UAB30 biologicamente non ha avuto effetti significativi sulla sopravvivenza, il peso corporeo, aumento di peso corporeo, i segni clinici ed ematologici o chimica clinica, ma indotta epatomegalia dose-correlato in entrambi i sessi e la riduzione del peso del timo nelle donne ad alto dosaggio. Gross e patologia microscopica non hanno fornito alcuna evidenza di tossicità 9-cis-UAB30 o oncogenesi, al contrario, p-cresidine indotte neoplasie della vescica urinaria in oltre il 60% dei topi maschi e femmine. Si è concluso che 9-cis-UAB30 non è oncogena in p53 ((+/-)) topi. Nello studio di farmacocinetica, topi C57BL / 6 hanno ricevuto esposizione quotidiana sonda gastrica per 9-cis-UAB30 (100 o 300 mg / kg / die) per 1 o 7 giorni. I parametri farmacocinetici sono risultati simili dopo il 1 ° e 7 giorni di somministrazione. Dose-correlato dei livelli plasmatici di picco di 9-cis-UAB30 sono stati osservati tra le ore 0,25 e 3; volume di distribuzione è paragonabile a entrambi i livelli di dose. Aumenta in area sotto la curva erano meno che proporzionali alla dose e sono state associate con un aumentato tasso di clearance apparente e diminuzione della emivita di eliminazione. Questi risultati suggeriscono diminuito assorbimento e / o induzione di meccanismi di

clearance. induzione enzimatica può essere alla base del epatomegalia nei topi trattati con 9-cis-UAB30 per 6 mesi nello studio di oncogenesi.

194: Creutzig U, Zimmermann M, Dworzak M, Urban C, Henze G, Kremens B, Lakomek M, Bourquin JP, Stary J, Reinhardt D.

**Favourable outcome of patients with childhood acute promyelocytic leukaemia after treatment with reduced cumulative anthracycline doses.**

Br J Haematol. 2010 May;149(3):399-409. Epub 2010 Mar 8. PubMed PMID: 20230404.

Acute promyelocytic leukaemia (APL) treatment often includes high cumulative doses of anthracyclines, which can cause long-term cardiotoxicity. Here, we report the favourable outcome in 81 paediatric APL patients treated according to the consecutive acute myeloid leukaemia-Berlin/Frankfurt/Muenster (AML-BFM) trials -93/-98/-2004 with an anthracycline-cytarabine regimen in combination with all-trans-retinoid acid (ATRA). Outcomes achieved by treatment with a reduced cumulative anthracycline dose (350 mg/m<sup>2</sup>) were comparable to those reported for studies with higher doses. Five-year overall survival of the total cohort was 89 +/- 4% and event-free survival (pEFS) was 73 +/- 6%. Overall survival was similar when comparing AML-BFM trial periods (trial 93: 88 +/- 8%, 98: 85 +/- 7% and 2004: 94 +/- 8%, P((logrank)) = 0.63). Seventy-five (93%) patients achieved complete remission. Most fatal events occurred during the first 6 weeks of treatment. Long-term cardiotoxicity was observed in one patient. Two patients suffered from secondary haematological malignancies. Salvage treatment was effective in 7/9 patients (78%) with relapsed APL, who now are long-term survivors after second line combination treatment with arsenic trioxide (4/7 patients) and stem cell transplantation (5/7 patients). Our results demonstrate that - combined with ATRA - a lower cumulative anthracycline dose can be used safely to maintain high cure rates and promote the reduction of long-term sequelae, such as cardiotoxicity in APL patients.

**Risultati favorevoli di pazienti con leucemia promielocitica acuta dopo il trattamento con dosi cumulative di antraciclina**

La leucemia acuta promielocitica acuta (APL) il trattamento spesso include alte dosi cumulative di antracicline, che può causare cardiotossicità a lungo termine. Qui, segnaliamo l'esito favorevole in 81 pazienti pediatrici LPA e trattati secondo le leukaemia-Berlin/Frankfurt/Muenster consecutivi mieloide acuta (AML-BFM) -93/-98/-2004 studi con un regime di antracicline, citarabina in associazione a tutti -acido trans-retinoidi (ATRA). Risultati ottenuti dal trattamento con una dose ridotta cumulativa di antraciclina (350 mg / m (2)) sono paragonabili a quelli riportati per gli studi con dosi più alte. Cinque anni di sopravvivenza della coorte totale era di 89 + / - 4% e la sopravvivenza libera da eventi (PEFS) era 73 + / - 6%. La sopravvivenza globale è risultata simile se si confrontano i periodi di prova AML-BFM (trial 93: 88 + / - 8%, 98: 85 + / - 7% e il 2004: 94 + / - 8%, P ((logrank)) = 0,63). Settantacinque (93%) pazienti hanno ottenuto una remissione completa. Maggior parte degli eventi fatali si sono verificati durante le prime 6 settimane di trattamento. cardiotossicità a lungo termine è stata osservata in un paziente. Due pazienti hanno sofferto di secondaria neoplasie ematologiche. trattamento di salvataggio si è dimostrato efficace in 7 / 9 pazienti (78%) con recidiva di APL, che ora sono sopravvissuti a lungo termine dopo trattamento di seconda linea combinazione con triossido di arsenico (4 / 7 pazienti) e trapianto di cellule staminali (5 / 7 pazienti). I nostri risultati dimostrano che - combinato con l'ATRA - una dose cumulativa di antracicline inferiori possono essere utilizzate in modo sicuro per mantenere elevati tassi di guarigione e di promuovere la riduzione delle sequele a lungo termine, come la cardiotossicità in pazienti con APL.

195: Zage PE, Zeng L, Palla S, Fang W, Nilsson MB, Heymach JV, Zweidler-McKay PA.

**A novel therapeutic combination for neuroblastoma: the vascular endothelial growth factor receptor/epidermal growth factor receptor/rearranged during transfection inhibitor vandetanib with 13-cis-retinoic acid.**

Cancer. 2010 May 15;116(10):2465-75. PubMed PMID: 20225331.

**BACKGROUND:** High-risk cases of neuroblastoma have poor survival rates, and novel therapies are needed. Vandetanib (ZD6474, Zactima) is an inhibitor of the vascular endothelial growth factor receptor, epidermal growth factor receptor, and rearranged during transfection (RET) tyrosine kinases, which have each been implicated in neuroblastoma pathogenesis. The authors hypothesized that vandetanib combined with 13-cis-retinoic acid (CRA), a differentiating agent used in most current neuroblastoma treatment regimens, would be effective against neuroblastoma tumor models.

**METHODS:** The authors evaluated the effects of vandetanib with and without CRA on RET phosphorylation and on the proliferation and survival of human neuroblastoma cell lines in vitro. Using a subcutaneous mouse xenograft model of human neuroblastoma, they analyzed tumors treated with CRA, vandetanib, and the combination of vandetanib plus CRA for growth, gross and histologic appearance, vascularity, and apoptosis.

**RESULTS:** Vandetanib treatment inhibited RET phosphorylation and resulted in induction of apoptosis in the majority of neuroblastoma cell lines in vitro, whereas CRA treatment induced morphologic differentiation and cell-cycle arrest. Treatment with vandetanib plus CRA resulted in more significant reduction in neuroblastoma cell viability than either alone. In a mouse xenograft model, the combination of vandetanib with CRA demonstrated significantly more growth inhibition than either alone, via both reduction in tumor vascularity and induction of apoptosis.

**CONCLUSIONS:** Vandetanib induces neuroblastoma tumor cell death in vitro and reduces tumor growth and vascularity in vivo. The combination of vandetanib with CRA was more effective in reducing tumor growth than either treatment alone. The antitumor effects of vandetanib plus CRA suggest a novel combination for use in neuroblastoma patients.

**Una nuova terapia combinata per il neuroblastoma: il recettore del fattore di crescita endoteliale vascolare/il recettore del fattore di crescita epidermico/ riarrangiati durante la trasfezione dell'inibitore vandetanib con l'acido 13-cis-retinoic acid.**

**BACKGROUND:** casi ad alto rischio di neuroblastoma hanno tassi di sopravvivenza poveri, e nuove terapie sono necessarie. Vandetanib (ZD6474, Zactima) è un inibitore del recettore del fattore di crescita vascolare endoteliale, epidermal growth factor receptor, e rielaborati durante la transfezione (RET) tirosin-chinasi, che sono stati entrambi implicati nella patogenesi del neuroblastoma. Gli autori hanno ipotizzato che Vandetanib combinazione con l'acido 13-cis-retinoico (CRA), un agente differenziante impiegato in regimi terapeutici più attuali di trattamento del neuroblastoma, che sia efficace contro modelli di tumore neuroblastoma.

**METODI:** Gli autori hanno valutato gli effetti di Vandetanib con e senza CRA sulla fosforilazione di RET e sulla proliferazione e la sopravvivenza di linee di cellule di neuroblastoma umano in vitro. Utilizzando un modello di xenotrapianto sottocutaneo topo di neuroblastoma umano, hanno analizzato i tumori trattati con CRA, Vandetanib, e la combinazione di più Vandetanib CRA per l'aspetto della crescita, al lordo ed istologica, vascolarizzazione, e l'apoptosi.

**RISULTATI:** trattamento Vandetanib inibito la fosforilazione di RET e portato a induzione di apoptosi nella maggior parte delle linee di cellule di neuroblastoma in vitro, mentre la differenziazione di trattamento morfologiche indotte CRA e l'arresto del ciclo cellulare. Il trattamento con Vandetanib più CRA provocato più significativa riduzione della vitalità delle cellule di neuroblastoma che da soli. In un modello di xenotrapianto mouse, la combinazione di Vandetanib con il CRA ha dimostrato di inibizione della crescita significativamente più da solo,

attraverso sia la riduzione della vascolarizzazione del tumore e induzione di apoptosi. **CONCLUSIONI:** Vandetanib tumore induce la morte delle cellule di neuroblastoma in vitro e riduce la crescita tumorale e la vascolarizzazione in vivo. La combinazione di Vandetanib con il CRA è stato più efficace nel ridurre la crescita tumorale di ciascun trattamento da solo. Gli effetti antitumorali di Vandetanib più CRA suggerire una nuova combinazione per l'uso in pazienti con neuroblastoma.

202: Saito K, Kobayashi K, Mizuno Y, Furihata T, Chiba K.

**Constitutive androstane/active receptor is a target of retinoic acid receptor in humans.**  
Biochem Pharmacol. 2010 Jul 1;80(1):129-35. Epub 2010 Mar 6. PubMed PMID:20211151.

Nuclear receptor constitutive androstane/active receptor (CAR) is well known as a transcription factor regulating many genes that encode drug-metabolizing enzymes and factors modulating hepatic gluconeogenesis. However, there have been few studies on regulation of the CAR gene itself. In this study, we examined the involvement of retinoic acid receptor alpha (RAR alpha) in transcriptional regulation of the CAR gene in the liver. The expression levels of CAR mRNA in human primary hepatocytes and HepG2 cells were increased by all-trans retinoic acid. Activities of the human CAR promoter containing a region (termed cRARE) located at +1453/+1469 within intron 1 were increased by co-expression of RAR alpha in HepG2 cells. In addition, introduction of mutation into cRARE abolished transcriptional activation of the promoter by RAR alpha. The results of gel mobility shift assay and chromatin immunoprecipitation assay showed that RAR alpha was bound to cRARE. These results suggest that RAR alpha transactivated the human CAR gene by binding to cRARE located at +1453/+1469 within intron 1 of the gene. In contrast, the rat CAR gene was not activated by exposure to all-trans retinoic acid, probably due to the lack of a region corresponding to cRARE in the human CAR gene. Although the physiological significance of RAR alpha-dependent up-regulation of CAR in the human liver remains to be clarified, retinoid metabolism may be regulated by the up-regulation of CAR.

**L'androstano costitutivo/il recettore attivo è un target per il recettore dell'acido retinoico nell'uomo**

Androstano recettore nucleare costitutivo / recettore attivo (AUTO) è ben conosciuto come un fattore di trascrizione che regolano molti geni che codificano gli enzimi che metabolizzano farmaci e dei fattori modulanti la gluconeogenesi epatica. Tuttavia, ci sono stati pochi studi sulla regolazione del gene della macchina stessa. In questo studio, abbiamo esaminato il coinvolgimento del recettore dell'acido retinoico alfa (RAR alfa) nella regolazione trascrizionale del gene AUTO nel fegato. I livelli di espressione di mRNA CAR in epatociti primari umani e le cellule HepG2 sono stati aumentati di acido all-trans retinoico. Le attività del promotore CAR umano contenenti una regione (la cosiddetta cRARE) situato a 1.453 / 1.469 entro introne 1 sono stati aumentati dalla co-espressione di RAR alfa nelle cellule HepG2. Inoltre, l'introduzione di mutazione in cRARE abolito l'attivazione trascrizionale del promotore di RAR alfa. I risultati del test gel dello spostamento di mobilità e di immunoprecipitazione della cromatina test hanno mostrato che RAR alfa è stato associato a cRARE. Questi risultati suggeriscono che RAR alfa transactivated il gene umano CAR legandosi a cRARE situato a 1.453 / 1.469 entro introne 1 del gene. Al contrario, il gene CAR ratto non è stato attivato da esposizione a acido all-trans retinoico, probabilmente a causa della mancanza di una regione corrispondente al cRARE nel gene CAR umano. Anche se il significato fisiologico di RAR alfa-dipendente up-regolazione del CAR nel fegato umano resta da chiarire, il metabolismo dei retinoidi possono essere regolati dalla up-regolazione di auto.

207: Yan TD, Wu H, Zhang HP, Lu N, Ye P, Yu FH, Zhou H, Li WG, Cao X, Lin YY, He JY, Gao WW, Zhao Y, Xie L, Chen JB, Zhang XK, Zeng JZ.

**Oncogenic potential of retinoic acid receptor-gamma in hepatocellular carcinoma.**  
Cancer Res. 2010 Mar 15;70(6):2285-95. Epub 2010 Mar 2. PubMed PMID: 20197465.

Retinoic acid receptors (RAR; alpha, beta, and gamma), members of the nuclear receptor superfamily, mediate the pleiotropic effects of the vitamin A metabolite retinoic acid (RA) and derivatives (retinoids) in normal and cancer cells. Abnormal expression and function of RARs are often involved in the growth and development of cancer. However, the underlying molecular mechanisms remain largely elusive. Here, we report that levels of RARgamma were significantly elevated in tumor tissues from a majority of human hepatocellular carcinoma (HCC) and in HCC cell lines. Overexpression of RARgamma promoted colony formation by HCC cells in vitro and the growth of HCC xenografts in animals. In HepG2 cells, transfection of RARgamma enhanced, whereas downregulation of RARgamma expression by siRNA approach impaired, the effect of RA on inducing the expression of alpha-fetoprotein, a protein marker of hepatocarcinogenesis. In studying the possible mechanism by which overexpression of RARgamma contributed to liver cancer cell growth and transformation, we observed that RARgamma resided mainly in the cytoplasm of HCC cells, interacting with the p85alpha regulatory subunit of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K). The interaction between RARgamma and p85alpha resulted in activation of Akt and NF-kappaB, critical regulators of the growth and survival of cancer cells. Together, our results show that overexpression of RARgamma plays a role in the growth of HCC cells through nongenomic activation of the PI3K/Akt and NF-kappaB signaling pathways.

#### **Potenziale oncogenico del recettore-gamma dell'acido retinoico nel carcinoma epatocellulare**

I recettori dell'acido retinoico (RAR, alfa, beta e gamma), i membri della superfamiglia dei recettori nucleari, mediano gli effetti pleiotropici della vitamina A metabolita acido retinoico (RA) e derivati (retinoidi) in cellule normali e tumorali. Anormale espressione e la funzione della RARs sono spesso coinvolti nella crescita e nello sviluppo del cancro. Tuttavia, i meccanismi molecolari sottostanti rimangono in gran parte sfuggente. Qui, segnaliamo che i livelli di RARgamma erano significativamente elevati nei tessuti del tumore da una maggioranza di umani carcinoma epatocellulare (HCC) e in linee cellulari di carcinoma epatocellulare. La sovraespressione di RARgamma promossa formazione di colonie di cellule di HCC in vitro e la crescita di xenotrapianti HCC negli animali. In cellule HepG2, trasfezione di RARgamma rafforzata, mentre down-regulation di espressione RARgamma approccio siRNA compromessa, l'effetto della RA sul inducendo l'espressione di alfa-fetoproteina, un marker di proteine epatocarcinogenesi. Nello studiare il possibile meccanismo con cui sovraespressione di RARgamma contribuito alla crescita delle cellule del cancro del fegato e della trasformazione, abbiamo osservato che RARgamma risiedeva principalmente nel citoplasma delle cellule di HCC, interagendo con la subunità p85alpha regolamentare della fosfatidilinositolo 3-chinasi (PI3K). L'interazione tra RARgamma e p85alpha comportato l'attivazione di Akt e NF-kB, i regolatori critici della crescita e la sopravvivenza delle cellule tumorali. Insieme, i nostri risultati mostrano che la sovraespressione di RARgamma gioca un ruolo nella crescita delle cellule HCC attraverso l'attivazione del PI3K/AKT non genomica e delle vie di segnalazione NF-kB.

209: Huang HW, Chen GH, Chang HR, Chow HC, Leung AY, Liang R, Wu DP.

**[Differentiating effect of PPARgamma ligand rosiglitazone and all trans-retinoic acid on myeloma cells and its possible mechanism].**

Zhonghua Zhong Liu Za Zhi. 2009 Dec;31(12):885-9. Chinese. PubMed PMID: 20193324.

**OBJECTIVE:** To investigate the effects of PPARgamma ligand (rosiglitazone, RGZ) as well as combined with all trans-retinoic acid (ATRA) on human myeloma cells and try to explore the possible mechanism.

**METHODS:** Human myeloma cell lines U266 and RPMI-8226 cells were treated with RGZ in the presence or absence of ATRA. Cell proliferation was evaluated by [(3)H] thymidine incorporation, cell cycle distribution and CD49e expression were analyzed by flow cytometry, morphology changes were evaluated by Wright-Giemsa staining, and p27(Kip1) and p21(Waf1) expression was detected by Western blotting.

**RESULTS:** The exposure to RGZ induced proliferation inhibition in both cell lines in a dose-dependent manner. After cultured with 5 micromol/L RGZ, the proportion of U266 and RPMI-8226 cells in phase G(0)/G(1) was (45.2 +/- 6.7)% and (40.3 +/- 7.3)%, respectively (P < 0.05). The proportion of the cells in phase G(2)/M and S was (52.2 +/- 7.4)% and (57.4 +/- 9.5)%, respectively (P < 0.05). These changes were more evident when the RGZ concentration was increased to 10 micromol/L. A combination of RGZ with ATRA enhanced the growth inhibition and cell cycle arrest effects of RGZ. The RGZ-treated myeloma cells displayed morphological characteristics of cell differentiation, and more evident signs of differentiation were observed when RGZ was combined with ATRA. These changes were confirmed by the detection of CD49e expression. The expression of p27(Kip1) and p21(Waf1) in myeloma cells was up-regulated by RGZ and this change was more apparent when RGZ was used in combination with ATRA.

**CONCLUSION:** RGZ can induce cell cycle arrest and cell differentiation in myeloma cells which maybe caused by up-regulation of p27(Kip1) and p21(Waf1) expression. ATRA can enhance these effects of RGZ on multiple myeloma cells and combined use of these two drugs may show a synergistic effect on myeloma cells.

**Effetto differenziante del rosiglitazone ligando di PPARgamma e dell'acido tutto-trans-retinoico sulle cellule con myeloma e possibili meccanismi**

**OBIETTIVO:** Per studiare gli effetti dei ligandi PPAR-gamma (rosiglitazone, RGZ), nonché in combinazione con tutti acido trans-retinoico (ATRA) su cellule di mieloma umano e cercare di esplorare il possibile meccanismo.

**METODI:** Human mieloma linee cellulari U266 e RPMI-8.226 cellule sono state trattate con RGZ in presenza o assenza di ATRA. La proliferazione cellulare è stata valutata da [(3) H] timidina, il ciclo di distribuzione di cellule e l'espressione CD49e sono stati analizzati mediante citometria di flusso, le variazioni della morfologia sono stati valutati da Wright-Giemsa, e p27 (Kip1) e p21 (Waf1) espressione è stata rilevata da Western blotting.

**RISULTATI:** L'esposizione al RGZ indotto l'inibizione della proliferazione in entrambe le linee cellulari in modo dose-dipendente. Dopo aver colto con 5 micromoli / L RGZ, la percentuale di U266 e RPMI-8.226 cellule in fase G (0) / G (1) è stato (45,2 + / - 6,7)% e (40,3 + / - 7,3)%, rispettivamente ( P <0,05). La percentuale di cellule in fase di G (2) / M e S è stata (52,2 + / - 7,4)% e (57,4 + / - 9,5)%, rispettivamente (P <0,05). Questi cambiamenti sono stati più evidenti quando la concentrazione RGZ è stato aumentato a 10 micromol / L. Una combinazione di RGZ con ATRA migliorato l'inibizione della crescita cellulare e gli effetti arresto del ciclo di RGZ. Le cellule del mieloma RGZ-trattati presentano caratteristiche morfologiche del differenziamento cellulare, e più evidenti segni di differenziazione sono stati osservati quando RGZ è stato combinato con ATRA. Queste modifiche sono state confermate dal rinvenimento di espressione CD49e. L'espressione di p27 (Kip1) e p21 (Waf1) in cellule di mieloma è up-regolato da RGZ e questo cambiamento è stato

più evidente quando RGZ stato usato in combinazione con ATRA. CONCLUSIONE: RGZ possono indurre arresto del ciclo cellulare e la differenziazione delle cellule in cellule di mieloma che forse causato da up-regolazione di p27 (Kip1) e p21 (Waf1) espressione. ATRA può aumentare questi effetti di RGZ sulle cellule del mieloma multiplo e l'uso combinato di questi due farmaci può avere un effetto sinergico sulle cellule del mieloma.

210: Luo P, Yang X, Ying M, Chaudhry P, Wang A, Shimada H, May WA, Adams GB, Mock D, Triche TJ, He Q, Wu L.

### **Retinoid-suppressed phosphorylation of RARalpha mediates the differentiation pathway of osteosarcoma cells.**

Oncogene. 2010 May13;29(19):2772-83. Epub 2010 Mar 1. PubMed PMID: 20190807.

Although retinoic acid (RA) is a potent agent that coordinates inhibition of proliferation with differentiation of many cell types, RA-mediated signaling pathways in osteosarcoma cell differentiation are uncharacterized. In this study, we show that in human U2OS osteosarcoma cells, decreased phosphorylation of RA receptor alpha (RARalpha) by RA treatment or overexpressing a phosphorylation-defective mutant RARalphaS77A results in the inhibition of proliferation and induction of differentiation, and that U2OS cells transduced with RARalphaS77A suppresses tumor formation in nude mice. Moreover, using different human primary osteosarcoma cells and human mesenchymal stem cells for gene expression analysis, we found that either RA or RARalphaS77A induces many of the same differentiation response pathways and signaling molecules involved in U2OS cell differentiation. In addition, overexpression of the fibroblast growth factor 8f (FGF8f), one of the downstream targets induced by both RA and RARalphaS77A in U2OS cells, inhibits proliferation and induces expression of osteoblastic differentiation regulators. Hence, these data strongly suggest that RA-suppressed phosphorylation of RARalpha induces FGF8f expression to mediate differentiation response pathway in U2OS osteosarcoma cells.

### **I retinoidi che inibiscono la fosforilazione di RARalfa mediano la via di differenziazione nelle cellule con osteosarcoma**

Sebbene l'acido retinoico (RA) è un potente agente che coordina l'inibizione della proliferazione con la differenziazione di molti tipi di cellule, le vie di segnalazione RA-mediata nella differenziazione delle cellule di osteosarcoma sono caratterizzati. In questo studio, dimostriamo che in cellule umane di osteosarcoma U2OS, diminuzione della fosforilazione del recettore alfa RA (RARalpha) di trattamento con RA o sovraesprimono un mutante fosforilazione risultati difettosi RARalphaS77A l'inibizione della proliferazione e di induzione di differenziazione, e che le cellule trasdotte con U2OS RARalphaS77A sopprime la formazione del tumore nei topi nudi. Inoltre, utilizzando differenti cellule umane di osteosarcoma primarie e cellule staminali mesenchimali per l'analisi di espressione genica, abbiamo scoperto che o RA o RARalphaS77A induce molte delle stesse vie risposta differenziazione e di molecole di segnalazione coinvolte nella differenziazione delle cellule U2OS. Inoltre, l'iperespressione del fattore di crescita dei fibroblasti 8f (FGF8f), uno dei bersagli a valle, sia indotta da RA e RARalphaS77A U2OS nelle cellule, inibisce la proliferazione e induce l'espressione di regolatori di differenziazione osteoblastica. Pertanto, questi dati suggeriscono che il RA-soppresso fosforilazione di RARalpha induce l'espressione FGF8f di mediare la risposta percorso di differenziazione in cellule di osteosarcoma U2OS.

214: Yasmin R, Kannan-Thulasiraman P, Kagechika H, Dawson MI, Noy N.

**Inhibition of mammary carcinoma cell growth by RXR is mediated by the receptor's oligomeric switch.**

J Mol Biol. 2010 Apr 16;397(5):1121-31. Epub 2010 Feb 24. PubMed PMID:20188110; PubMed Central PMCID: PMC2847374.

Ligands that activate the nuclear receptor retinoid X receptor (RXR) display potent anticarcinogenic activities, but the mechanisms by which these compounds inhibit carcinoma cell growth are poorly understood. While RXR can regulate gene expression due to its intrinsic ligand-activated transcription function, this receptor can also regulate transcription by functioning as a ligand-controlled DNA architectural factor. It was thus reported that apo-RXR self-associates into tetramers and that each dimer within these tetramers can separately bind to an RXR response element. Hence, DNA binding by RXR tetramers may bring distant genomic regions into close physical proximity. As ligand binding induces the dissociation of RXR tetramers into dimers, it can alter gene expression by modulating the DNA architecture. Here, we show that inhibition of mammary carcinoma cell growth by RXR ligands stems from the ability of these compounds to regulate the oligomeric state of RXR and is independent of the direct intrinsic transcriptional activity of the receptor. The data suggest that compounds that trigger dissociation of RXR tetramers may comprise a novel class of anticarcinogenic agents.

**L'inibizione della crescita delle cellule con carcinoma mammario causata da RXR è mediata dall'accensione dei recettori oligomerici**

Ligandi che attivano il recettore nucleare recettore retinoide X (RXR), display potente attività antitumorale, ma i meccanismi con cui questi composti inibiscono la crescita delle cellule di carcinoma sono capiti male. Mentre RXR può regolare l'espressione genica per la sua funzione intrinseca di trascrizione ligando-attivato, questo recettore può anche regolare la trascrizione di operare come fattore di DNA ligando-controllato architettonico. E 'stato quindi segnalato che apo-RXR auto-soci in tetrameri e che ogni dimero all'interno di questi tetrameri separatamente possono associare a un elemento di risposta RXR. Quindi, di legame al DNA da tetrameri RXR possono portare lontano regioni genomiche in stretta vicinanza fisica. Come ligando induce la dissociazione di tetrameri RXR in dimeri, può alterare l'espressione genica modulando l'architettura del DNA. Qui si dimostra che l'inibizione della crescita delle cellule di carcinoma mammario dai ligandi RXR deriva dalla capacità di questi composti a regolare lo stato oligomerica di RXR ed è indipendente dalla diretta attività intrinseca trascrizionale del recettore. I dati suggeriscono che i composti che attivano dissociazione dei tetrameri RXR possono comprendere una nuova classe di agenti antitumorali.

**Vitamin D: a pleiotropichormone.**

Kidney Int. 2010 Jul;78(2):140-5. Epub 2010 Feb 24. PubMed PMID:20182414.

The secosteroid hormone 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D(3) (1,25(OH)(2)D(3)) is the natural ligand for the vitamin D receptor, a member of the nuclear receptor superfamily. Upon binding of the ligand, the vitamin D receptor heterodimerizes with the retinoid X receptor and binds to vitamin D response elements in the promoter region of target genes to induce/repress their expression. The target genes that have been identified so far are heterogeneous in nature and reflect the great spectrum of biological activities of 1,25(OH)(2)D(3). Within the last two decades, the receptor has been shown to be present not only in classical target tissues such as bone, kidney, and intestine, but also in many other nonclassical tissues, for example, in the immune system (T and B cells, macrophages, and monocytes), in the reproductive system (uterus, testis, ovary, prostate, placenta, and mammary glands), in the endocrine system (pancreas, pituitary, thyroid, and adrenal cortex), in muscles (skeletal, smooth, and heart muscles), and in brain, skin, and liver. Besides the almost universal presence of vitamin D receptors, different cell types (for example, keratinocytes, monocytes, bone, placenta) are capable of metabolizing 25-hydroxyvitamin D(3) to 1,25(OH)(2)D(3) by the enzyme 25(OH)D(3)-1 $\alpha$ -hydroxylase, encoded by CYP27B1. The combined presence of CYP27B1 and the specific receptor in several tissues introduced the idea of a paracrine/autocrine role for 1,25(OH)(2)D(3). Moreover, it has been demonstrated that 1,25(OH)(2)D(3) can induce differentiation and inhibit proliferation of normal and malignant cells. Moreover, vitamin D deficiency is associated with an increased risk for nearly all major human diseases such as cancer, autoimmune diseases, cardiovascular, and metabolic diseases. In addition to the treatment of bone disorders with 1,25(OH)(2)D(3), these newly discovered functions open perspectives for the use of 1,25(OH)(2)D(3) as an immune modulator (for example, for the treatment of autoimmune diseases or prevention of graft rejection), inhibitor of cell proliferation, and inducer of cell differentiation (cancer).

**Vitamina D: un ormone pleiotropico**

L'ormone secosteroid 1 $\alpha$ ,25-diidrossivitamina D (3) (1,25 (OH) (2) D (3)) è il naturale ligando per il recettore della vitamina D, un membro della superfamiglia dei recettori nucleari. Al legame del ligando, il recettore della vitamina D heterodimerizes con il recettore retinoide X e si lega alla vitamina D elementi di risposta nella regione del promotore dei geni bersaglio per indurre / reprimere la loro espressione. I geni bersaglio che sono stati identificati finora sono di natura eterogenea e riflettono il grande spettro di attività biologiche di 1,25 (OH) (2) D (3). Negli ultimi due decenni, il recettore ha dimostrato di essere presente non solo nei tessuti bersaglio classico come le ossa, reni e intestino, ma anche in molti altri tessuti non classici, ad esempio, nel sistema immunitario (le cellule T e B, macrofagi e monociti), nel sistema riproduttivo (dell'utero, del testicolo, ovaio, prostata, placenta, e le ghiandole mammarie), nel sistema endocrino (pancreas, ghiandola pituitaria, la tiroide, e la corteccia surrenale), nei muscoli (scheletrico, liscio e muscoli del cuore), e nel cervello, della pelle e del fegato. Oltre alla presenza pressoché universale recettori della vitamina D, diversi tipi di cellule (per esempio, i cheratinociti, monociti, osseo, placenta) sono in grado di metabolizzare 25-idrossivitamina D (3) a 1,25 (OH) (2) D (3) dall'enzima 25 (OH) D (3)-1 $\alpha$ -idrossilasi, codificati da CYP27B1. La presenza combinata di CYP27B1 e il recettore specifico in diversi tessuti ha introdotto l'idea di un paracrina / autocrino ruolo di 1,25 (OH) (2) D (3). Inoltre, è stato dimostrato che 1,25 (OH) (2) D (3) può indurre la differenziazione e inibire la proliferazione delle cellule normali e maligne. Inoltre, la carenza di vitamina D è associato ad un aumentato rischio per quasi tutte le principali malattie umane come il cancro, malattie autoimmuni, cardiovascolari e le malattie metaboliche. In aggiunta al trattamento di disturbi ossei con 1,25 (OH)

(2) D (3), prospettive di queste funzioni di recente scoperta apre per l'uso di 1,25 (OH) (2) D (3), un modulatore immunitario (per esempio, per il trattamento delle malattie autoimmuni o di prevenzione del rigetto del trapianto), inibitore della proliferazione cellulare, e induttore di differenziazione delle cellule (cancro).

218: Amor KT, Rashid RM, Mirmirani P.

**Does D matter? The role of vitamin D in hair disorders and hair follicle cycling.**

Dermatol Online J. 2010 Feb 15;16(2):3.Review. PubMed PMID: 20178699.

**BACKGROUND:** The role of vitamin D in the proliferation and differentiation of keratinocytes is well known within the field of dermatology.

**OBJECTIVE:** We sought to evaluate the role that vitamin D and the vitamin D receptor play in the hair cycle and assess how this can be clinically applied to the treatment of hair disorders.

**METHODS:** A MEDLINE search (1955-July 2009) was performed to find relevant articles pertaining to vitamin D, the vitamin D receptor, and hair loss.

**RESULTS:** The vitamin D receptor, independent of vitamin D, plays an important role in hair cycling, specifically anagen initiation. The role of vitamin D in hair follicle cycling is not as well understood.

**LIMITATIONS:** The review is broad and there are limited human studies available to date.

**CONCLUSION:** Additional studies to evaluate the role of vitamin D in the hair cycle should be done. Treatments that up regulate the vitamin D receptor may be successful in treating hair disorders and are a potential area of further study.

**La vitamina D è importante? Il ruolo della vitamina D nei disordini del cuoio capelluto e nel ricambio follicolare**

**BACKGROUND:** Il ruolo della vitamina D nella proliferazione e la differenziazione dei cheratinociti è ben noto nel campo della dermatologia.

**OBIETTIVO:** Abbiamo cercato di valutare il ruolo che la vitamina D e la vitamina D gioca recettore nel ciclo del capello e valutare come questo può essere clinicamente applicata al trattamento delle patologie dei capelli.

**METODI:** una ricerca su Medline (1955-luglio 2009) è stata stampata per trovare gli articoli pertinenti relativi alla vitamina D, il recettore della vitamina D, e la perdita di capelli.

**RISULTATI:** Il recettore della vitamina D, indipendente di vitamina D, gioca un ruolo importante nel ciclo del capello, in particolare l'iniziazione anagen. Il ruolo della vitamina D nel ciclo del capello pilifero non è ben compreso.

**LIMITI:** la rassegna è ampia e ci sono limitati di studi sull'uomo ad oggi disponibili.

**CONCLUSIONE:** ulteriori studi per valutare il ruolo della vitamina D nel ciclo del capello dovrebbe essere fatto. Trattamenti che fino regolano il recettore della vitamina D può avere successo nel trattamento dei disturbi dei capelli e sono una potenziale area di ulteriori studi.

219: DiPaola RS, Chen YH, Stein M, Vaughn D, Patrick-Miller L, Carducci M, Roth B, White E, Wilding G.

**A randomized phase II trial of mitoxantrone, estramustine and vinorelbine or bcl-2 modulation with 13-cis retinoic acid, interferon and paclitaxel in patients with metastatic castrate-resistant prostate cancer: ECOG3899.**

J Transl Med. 2010 Feb 24;8:20. PubMed PMID: 20178647; PubMed CentralPMCID: PMC2837641.

**BACKGROUND:** To test the hypothesis that modulation of Bcl-2 with 13-cis retinoic acid (CRA)/interferon-alpha2b (IFN) with paclitaxel (TAX), or mitoxantrone, estramustine and vinorelbine (MEV) will have clinical activity in men with metastatic castrate-resistant prostate cancer (CRPC).

**METHODS:** 70 patients were treated with either MEV (Arm A) in a 3-week cycle or CRA/IFN/TAX with an 8-week cycle (Arm B). Patients were assessed for response, toxicity, quality of life (QOL), and the effect of treatment on Bcl-2 levels in peripheral blood mononuclear cells (PBMC).

**RESULTS:** The PSA response rates were 50% and 23%, measurable disease response rates (CR+PR) 14% and 15%, and median overall survival 19.4 months and 13.9 months on Arm A and Arm B respectively. Transient grade 4 neutropenia occurred in 18 and 2 patients, and grade 3 to 4 thrombosis in 7 patients and 1 patient in Arm A and Arm B respectively. Patients on Arm B reported a clinically significant decline in QOL between baseline and week 9/10 (.71 s.d.), and a significantly lower level of QOL than Arm A ( $p = 0.01$ ). As hypothesized, Bcl-2 levels decreased with CRA/IFN therapy only in Arm B ( $p = 0.03$ ).

**CONCLUSIONS:** Treatment with MEV was well tolerated and demonstrated clinical activity in patients with CRPC. Given the adverse effect of CRA/IFN/TAX on QOL, the study of other novel agents that target Bcl-2 family proteins is warranted. The feasibility of measuring Bcl-2 protein in a cooperative group setting is hypothesis generating and supports further study as a marker for Bcl-2 targeted therapy.

**Un trial randomizzato di fase II con mitoxantrone, estramustino e vinorelbine o modulazione di bcl-2 con l'acido retinoico 13-cis, interferone e paclitaxel nei pazienti con cancro alla prostata metastatico resistente alla castrazione**

**BACKGROUND:** Per verificare l'ipotesi che la modulazione di Bcl-2 con 13-cis retinoico (CRA) / interferone-alpha2b (IFN) con paclitaxel (TAX), o mitoxantrone, estramustina e vinorelbina (MEV) avranno attività clinica negli uomini con carcinoma della prostata metastatico castrare-resistente (CRPC).

**METODI:** 70 pazienti sono stati trattati con MEV (braccio A) in un ciclo di 3 settimane o CRA / IFN / Tasse con un ciclo di 8 settimane (braccio B). I pazienti sono stati valutati per la risposta, la tossicità, la qualità della vita (QOL), e l'effetto del trattamento sui livelli di Bcl-2 nelle cellule mononucleari del sangue periferico (PBMC).

**RISULTATI:** Le percentuali di risposta del PSA sono stati 50% e del 23%, i tassi di risposta malattia misurabile (CR + PR) 14% e il 15%, e la sopravvivenza globale mediana 19,4 mesi e 13,9 mesi in braccio A e B, rispettivamente, Arm. Transitori di neutropenia di grado 4 si è verificato in pazienti di 18 e 2, e di grado 3-4 trombosi in 7 pazienti ed 1 paziente nel braccio A e B, rispettivamente, del braccio. I pazienti in braccio B clinicamente riportato un calo significativo della qualità della vita tra il basale e la settimana 9 / 10 (0,71 sd), e un livello significativamente più basso della qualità di vita del braccio A ( $p = 0,01$ ). Come ipotizzato, i livelli di Bcl-2 è diminuita con CRA / terapia con IFN solo nel braccio B ( $p = 0,03$ ).

**CONCLUSIONI:** Il trattamento con MEV è stato ben tollerato e ha dimostrato attività clinica in

pazienti con CRPC. Data l'effetto negativo della CRA / IFN / FISCALE sulla qualità della vita, lo studio di nuovi agenti altro obiettivo che Bcl-2 proteine della famiglia è garantito. La fattibilità di misurare proteina Bcl-2 in un contesto di gruppo cooperativo sta generando ipotesi e sostiene ulteriori studi come marker per Bcl-2 terapia mirata.

221: Fernández-Calotti P, Pastor-Anglada M.

**All-trans-retinoic acid promotes trafficking of human concentrative nucleoside transporter-3 (hCNT3) to the plasma membrane by a TGF-beta1-mediated mechanism.**

J Biol Chem. 2010 Apr30;285(18):13589-98. Epub 2010 Feb 19. PubMed PMID: 20172853; PubMed CentralPMCID: PMC2859520.

Human concentrative nucleoside transporter-3 (hCNT3) is a sodium-coupled nucleoside transporter that exhibits high affinity and broad substrate selectivity, making it the most suitable candidate for mediating the uptake and cytotoxic action of most nucleoside-derived drugs. The drug of this class most commonly used in the treatment of chronic lymphocytic leukemia (CLL) is the pro-apoptotic nucleoside analog fludarabine (Flu), which enters CLL cells primarily through human equilibrative nucleoside transporters (hENTs). Although CLL cells lack hCNT3 activity, they do express this transporter protein, which is located mostly in the cytosol. The aim of our study was to identify agents and mechanisms capable of promoting hCNT3 trafficking to the plasma membrane. Here, we report that all-trans-retinoic acid (ATRA), currently used in the treatment of acute promyelocytic leukemia (APL), increases hCNT3-related activity through a mechanism that involves trafficking of pre-existing hCNT3 proteins to the plasma membrane. This effect is mediated by the autocrine action of transforming growth factor (TGF)-beta1, which is transcriptionally activated by ATRA in a p38-dependent manner. TGF-beta1 acts through activation of ERK1/2 and the small GTPase RhoA to promote plasma membrane trafficking of the hCNT3 protein.

**L'acido tutto trans retinoico promuove il traffico di trasportatori-3 (hCNT3) di nucleoside concentrate alla membrana plasmatica tramite un meccanismo mediato da TGF-beta1**

Trasportatore nucleosidico dell'uomo di concentrazione-3 (hCNT3) è un nucleoside sodio-coupled trasportatore che presenta elevata affinità e selettività del substrato ampio, diventando così il candidato più adatto per mediare l'assorbimento e l'azione citotossica della maggior parte dei farmaci nucleosidici-derivati. Il farmaco di questa classe più comunemente usati nel trattamento della leucemia linfocitica cronica (LLC) è il pro-apoptotico analogo nucleosidico Fludarabina (Flu), che entra nelle cellule CLL umana in primo luogo attraverso i trasportatori nucleosidici equilibrativo (hENTs). Anche se le cellule CLL mancanza hCNT3 attività, lo fanno esprimere questa proteina trasportatrice, che si trova prevalentemente nel citoplasma. Lo scopo del nostro studio è stato quello di identificare gli agenti ed i meccanismi in grado di promuovere hCNT3 traffico alla membrana plasmatica. Qui, segnaliamo che tutti i trans retinoico (ATRA), attualmente utilizzati nel trattamento della leucemia promielocitica acuta (APL), aumenta l'attività hCNT3 connesse attraverso un meccanismo che coinvolge il traffico di una preesistente hCNT3 proteine della membrana plasmatica. Questo effetto è mediato dall'azione autocrina del fattore di crescita trasformante (TGF)-beta1, che è trascrizionalmente attivato da ATRA in un modo p38-dipendente. TGF-beta1 agisce attraverso l'attivazione di ERK1 / 2 e la piccola GTPasi RhoA per promuovere il traffico di membrana plasmatica della proteina hCNT3.

**Beta-carotene and lung cancer in smokers: review of hypotheses and status of research.**

Nutr Cancer. 2009 Nov;61(6):767-74. Review. PubMed PMID: 20155614.

A number of epidemiological studies have reported associations of beta-carotene plasma levels or intake with decreased lung cancer risk. However, intervention studies in smokers have unexpectedly reported increased lung tumor rates after high, long-term, beta-carotene supplementation. Recently, detailed analyses by stratification for smoking habits of several large, long-term intervention or epidemiological trials are now available. The ATBC study, the CARET study, the Antioxidant Polyp Prevention trial, and the E3N study provide evidence that the adverse effects of beta-carotene supplementation are correlated with the smoking status of the study participants. In contrast, the Physician Health Study, the Linxian trial, and a pooled analysis of 7 epidemiological cohort studies have not supported this evidence. The ferret and A/J mouse lung cancer model have been used to investigate the mechanism of interaction of beta-carotene with carcinogens in the lung. Both models have specific advantages and disadvantages. There are a number of hypotheses concerning the beta-carotene/tobacco smoke interaction including alterations of retinoid metabolism and signaling pathways and interaction with CYP enzymes and pro-oxidation/DNA oxidation. The animal models consistently demonstrate negative effects only in the ferret, and following dosing with beta-carotene in corn oil at pharmacological dosages. No effects or even protective effects against smoke or carcinogen exposure were observed when beta-carotene was applied at physiological dosages or in combination with vitamins C and E, either as a mixture or in a stable formulation. In conclusion, human and animal studies have shown that specific circumstances, among them heavy smoking, seem to influence the effect of high beta-carotene intakes. In normal, healthy, nonsmoking populations, there is evidence of beneficial effects.

**Beta-carotene e tumore al polmone nei fumatori: review di ipotesi e stato della ricerca.**

Un certo numero di studi epidemiologici hanno segnalato le associazioni dei livelli plasmatici di beta-carotene o con rischio di aspirazione polmonare è diminuita di cancro. Tuttavia, studi di intervento nei fumatori sono inaspettatamente riportato un aumento dei tassi di tumore al polmone dopo alto, a lungo termine, la supplementazione di beta-carotene. Recentemente, analisi dettagliate di stratificazione per abitudine al fumo di alcuni grandi, l'intervento a lungo termine o studi epidemiologici sono ora disponibili. Lo studio ATBC, lo studio CARET, l'antiossidante Polipo processo di prevenzione, e lo studio E3N fornire la prova che gli effetti negativi della supplementazione di beta-carotene sono correlate con l'abitudine al fumo dei partecipanti allo studio. Al contrario, il Medico Health Study, il processo Linxian, e un'analisi aggregata di 7 studi di coorte epidemiologici non hanno sostenuto queste prove. Il furetto e A / J modello del mouse del cancro polmonare sono stati utilizzati per studiare il meccanismo di interazione di beta-carotene con sostanze cancerogene nei polmoni. Entrambi i modelli hanno specifici vantaggi e svantaggi. Ci sono una serie di ipotesi riguardanti l'interazione fumo beta-carotene/tobacco comprese le alterazioni del metabolismo dei retinoidi e di vie di segnalazione e di interazione con gli enzimi CYP e ossidazione pro-oxidation/DNA. I modelli animali dimostrino effetti negativi solo per il furetto, e dopo la somministrazione di beta-carotene in olio di mais a dosaggi farmacologici. Nessun effetto o anche effetti protettivi contro il fumo o l'esposizione cancerogeno sono stati osservati quando i beta-carotene è stato applicato a dosaggi fisiologici o in combinazione con vitamine C ed E, sia come una miscela o in una formulazione stabile. In conclusione, gli studi umani e animali hanno dimostrato che le circostanze specifiche, tra cui forti fumatori, sembrano influenzare l'effetto di alta assunzione di beta-carotene. Nel normale, sano, le popolazioni non fumatori, vi è evidenza di effetti benefici.

227: Bartik L, Whitfield GK, Kaczmarska M, Lowmiller CL, Moffet EW, Furnick JK, Hernandez Z, Haussler CA, Haussler MR, Jurutka PW.

**Curcumin: a novel nutritionally derived ligand of the vitamin D receptor with implications for colon cancer chemoprevention.**

J Nutr Biochem. 2010 Dec;21(12):1153-61. Epub 2010 Feb 12. PubMed PMID: 20153625; PubMed Central PMCID: PMC2891903.

The nuclear vitamin D receptor (VDR) mediates the actions of 1,25-dihydroxyvitamin D(3) (1,25D) to regulate gene transcription. Recently, the secondary bile acid, lithocholate (LCA), was recognized as a novel VDR ligand. Using reporter gene and mammalian two-hybrid systems, immunoblotting, competitive ligand displacement and quantitative real-time PCR, we identified curcumin (CM), a turmeric-derived bioactive polyphenol, as a likely additional novel ligand for VDR. CM (10(-5) M) activated transcription of a luciferase plasmid containing the distal vitamin D responsive element (VDRE) from the human CYP3A4 gene at levels comparable to 1,25D (10(-8) M) in transfected human colon cancer cells (Caco-2). While CM also activated transcription via a retinoid X receptor (RXR) responsive element, activation of the glucocorticoid receptor (GR) by CM was negligible. Competition binding assays with radiolabeled 1,25D confirmed that CM binds directly to VDR. In mammalian two-hybrid assays employing transfected Caco-2 cells, CM (10(-5) M) increased the ability of VDR to recruit its heterodimeric partner, RXR, and steroid receptor coactivator-1 (SRC-1). Real-time PCR studies revealed that CM-bound VDR can activate VDR target genes CYP3A4, CYP24, p21 and TRPV6 in Caco-2 cells. Numerous studies have shown chemoprotection by CM against intestinal cancers via a variety of mechanisms. Small intestine and colon are important VDR-expressing tissues where 1,25D has known anticancer properties that may, in part, be elicited by activation of CYP-mediated xenobiotic detoxification and/or up-regulation of the tumor suppressor p21. Our results suggest the novel hypothesis that nutritionally-derived CM facilitates chemoprevention via direct binding to, and activation of, VDR.

**Curcumina: un nuovo ligando nutrizionale derivato dal recettore della vitamina D con implicazioni per la chemioprevenzione del cancro al colon**

Il nucleare recettore della vitamina D (VDR) media le azioni di 1,25-diidrossivitamina D (3) (1,25 D) per regolare la trascrizione genica. Recentemente, l'acido biliare secondaria, lithocholate (LCA), è stato riconosciuto come un ligando VDR romanzo. Utilizzando gene reporter e di mammiferi sistemi a due ibridi, immunoblotting, spostamento competitivo ligando e PCR quantitativa in tempo reale, abbiamo identificato la curcumina (CM), un polifenolo curcuma derivati bioattivi, come un romanzo probabile ulteriore ligando per VDR. CM (10 (-5) M) trascrizione attivati di un plasmide contenente la luciferasi distale elemento reattivo vitamina D (VDRE) del gene CYP3A4 umana a livelli paragonabili a 1,25 D (10 (-8) M) nel cancro del colon umano transfettate celle (Caco-2). Mentre CM attivato anche la trascrizione attraverso un recettore retinoide X (RXR) elemento sensibile, l'attivazione del recettore dei glucocorticoidi (GR) a cura di CM era trascurabile. analisi della concorrenza vincolante con radiomarcato 1,25 D CM ha confermato che si lega direttamente alla VDR. Nei mammiferi test del doppio ibrido che impiegano transfettate cellule Caco-2, CM (10 (-5) M) ha aumentato la capacità di VDR di reclutare i suoi partner eterodimerica, RXR, e coattivatore recettori steroidei-1 (SRC-1). studi di PCR in tempo reale hanno rivelato che VDR CM-bound in grado di attivare i geni bersaglio VDR CYP3A4, CYP24, p21 e TRPV6 in cellule Caco-2. Numerosi studi hanno dimostrato chemoprotection da CM contro i tumori intestinali attraverso una varietà di meccanismi. tenue e del colon sono importanti VDR-esprimono tessuti in cui ha conosciuto 1,25 D proprietà antitumorali che potrebbero, in parte, essere provocato da attivazione di mediato da CYP disintossicazione xenobiotici e / o up-regulation del tumore

soppressore p21. I nostri risultati suggeriscono l'ipotesi che il romanzo di vista nutrizionale-derived CM facilita la chemioprevenzione via diretta attivazione vincolanti, e di, VDR.

229: Egan JB, Thompson PA, Ashbeck EL, Conti DV, Duggan D, Hibler E, Jurutka PW, Leroy EC, Martínez ME, Mount D, Jacobs ET.

### **Genetic polymorphisms in vitamin D receptor VDR/RXRA influence the likelihood of colon adenoma recurrence.**

CancerRes. 2010 Feb 15;70(4):1496-504. Epub 2010 Feb 9. PubMed PMID: 20145122.

Low circulating levels of vitamin D affect colorectal cancer risk. The biological actions of the hormonal form of vitamin D, 1,25(OH)(2)D(3), are mediated by the vitamin D receptor (VDR), which heterodimerizes with retinoid X receptors (RXR). Using a single nucleotide polymorphism (SNP) tagging approach, we assessed the association between genetic variations in RXRA and VDR and odds of recurrent (metachronous) colorectal neoplasia in a pooled population of two studies. A total of 32 tag SNPs in RXRA and 42 in VDR were analyzed in 1,439 participants. A gene-level association was observed for RXRA and any (P = 0.04) or proximal (P = 0.03) metachronous neoplasia. No gene-level associations were observed for VDR, nor was any single SNP in VDR related to any metachronous adenoma after correction for multiple comparisons. In contrast, the association between RXRA SNP rs7861779 and proximal metachronous neoplasia was of borderline statistical significance [odds ratio (OR), 0.68; 95% confidence interval (95% CI), 0.53-0.86; unadjusted P = 0.001; adjusted P = 0.06], including when observed independently in each individual study. Haplotypes within linkage blocks of RXRA support an approximately 30% reduction in odds of metachronous neoplasia arising in the proximal colon among carriers of specific haplotypes, which was strongest (OR(proximal), 0.67; 95% CI, 0.52-0.86) for carriers of a CGGGCA haplotype (rs1805352, rs3132297, rs3132296, rs3118529, rs3118536, and rs7861779). Our results indicate that allelic variation in RXRA affects metachronous colorectal neoplasia, perhaps of particular importance in the development of proximal lesions.

### **I polimorfismi genetici nel recettore della vitamina D VDR/RXRA influenza la probabilità di recidive nell'adenoma al colon**

Bassi livelli circolanti di vitamina D influenzano il rischio del cancro del colon-retto. Le azioni biologiche della forma ormonale della vitamina D, 1,25 (OH) (2) D (3), sono mediate dal recettore della vitamina D (VDR), che heterodimerizes con recettori dei retinoidi X (RXR). Utilizzando un singolo polimorfismo del nucleotide (SNP) approccio tagging, abbiamo valutato l'associazione tra varianti genetiche in RXRA e VDR e le probabilità di recidiva (metacroni) neoplasia coloretale in una popolazione combinata di due studi. Un totale di 32 SNPs tag in RXRA e 42 in VDR sono stati analizzati in 1.439 partecipanti. Una associazione gene-level è stato osservato per RXRA ed eventuali (P = 0,04) o prossimale (P = 0,03) neoplasia metacroni. Nessuna associazione gene-level sono stati osservati per VDR, né è stato un singolo SNP in VDR collegato a nessuno adenomi metacroni dopo la correzione per confronti multipli. Al contrario, l'associazione tra RXRA SNP rs7861779 e neoplasia prossimale metacroni era di statistica borderline [significato odds ratio (OR), 0.68, intervallo di confidenza al 95% (95% CI), 0,53-0,86, p non aggiustata = 0,001; P aggiustato = 0.06 ], anche se osservato in modo indipendente in ciascuno studio individuale. Aplotipi all'interno dei blocchi di linkage RXRA sostegno di una riduzione di circa il 30% in quote di neoplasia metacroni sorti nel colon prossimale tra i vettori di aplotipi specifici, che è stato più forte (OR (prossimale), 0,67, 95% CI, 0,52-0,86) per i vettori di un aplotipo CGGGCA (rs1805352, rs3132297, rs3132296, rs3118529, rs3118536 e rs7861779). I nostri risultati indicano che la variazione allelica in RXRA colpisce metacrono neoplasia del colon-retto, forse, di particolare importanza per lo sviluppo di lesioni prossimali.

235: Alotaibi H, Yaman E, Salvatore D, Di Dato V, Telkoparan P, Di Lauro R, Tazebay UH.

**Intronic elements in the Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter gene (NIS) interact with retinoic acid receptors and mediate initiation of transcription.**

Nucleic Acids Res. 2010 Jun;38(10):3172-85. Epub 2010 Jan 31. PubMed PMID: 20123735; PubMed Central PMCID: PMC2879507.

Activity of the sodium/iodide symporter (NIS) in lactating breast is essential for iodide (I<sup>-</sup>) accumulation in milk. Significant NIS upregulation was also reported in breast cancer, indicating a potential use of radioiodide treatment. All-trans-retinoic acid (tRA) is a potent ligand that enhances NIS expression in a subset of breast cancer cell lines and in experimental breast cancer models. Indirect tRA stimulation of NIS in breast cancer cells is very well documented; however, direct upregulation by tRA-activated nuclear receptors has not been identified yet. Aiming to uncover cis-acting elements directly regulating NIS expression, we screened evolutionary-conserved non-coding genomic sequences for responsiveness to tRA in MCF-7. Here, we report that a potent enhancer in the first intron of NIS mediates direct regulation by tRA-stimulated nuclear receptors. In vitro as well as in vivo DNA-protein interaction assays revealed direct association between retinoic acid receptor-alpha (RARalpha) and retinoid-X-receptor (RXR) with this enhancer. Moreover, using chromatin immunoprecipitation (ChIP) we uncovered early events of NIS transcription in response to tRA, which require the interaction of several novel intronic tRA responsive elements. These findings indicate a complex interplay between nuclear receptors, RNA Pol-II and multiple intronic RAREs in NIS gene, and they establish a novel mechanistic model for tRA-induced gene transcription.

**Elementi intronici nel gene Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> (NIS) interagiscono con I recettori dell'acido retinoico e mediano l'inizio della trascrizione**

Attività del sodio / symporter ioduro (NIS) in allattamento al seno è essenziale per ioduro (I<sup>-</sup>) accumulo nel latte. Significativo upregulation NIS è stata riportata anche nel cancro al seno, indicando un potenziale utilizzo di trattamento radioiodio. All-trans-retinoico (TRA) è un ligando potente che esalta NIS espressione in un sottoinsieme di linee di cellule e carcinoma mammario in modelli sperimentali cancro al seno. Stimolazione indiretta tRA di NIS in cellule di carcinoma mammario è molto ben documentato, tuttavia, l'aumento da recettori nucleari TRA-attivata, non è ancora stato identificato. Con l'obiettivo di scoprire cis-acting elementi direttamente regolazione NIS dell'espressione, abbiamo selezionato evolutivo conservate non codificanti sequenze genomiche per la rispondenza alle tRA in MCF-7. Qui, segnaliamo che un potenziatore potente nel primo introne del NIS media regolazione diretta da TRA-stimolati recettori nucleari. In vitro e in vivo test di interazione DNA-proteina hanno rivelato un'associazione diretta tra l'acido retinoico recettore alfa (RARalpha) e retinoidi-X-recettore (RXR) con questo enhancer. Inoltre, usando immunoprecipitazione della cromatina (ChIP) abbiamo scoperto primi eventi di NIS trascrizione in risposta a tRA, che richiedono l'interazione di diversi nuovi elementi intronici tRA reattiva. Questi risultati indicano una complessa interazione tra recettori nucleari, RNA Pol-II e più RAREs introniche in gene NIS, e stabiliscono un nuovo modello meccanicistico per la trascrizione del gene TRA-indotta.

239: Lee SM, Lee JY, Choi JE, Lee SY, Park JY, Kim DS.

**Epigenetic inactivation of retinoid X receptor genes in non-small cell lung cancer and the relationship with clinicopathologic features.**

Cancer Genet Cytogenet. 2010 Feb;197(1):39-45. PubMedPMID: 20113835.

Retinoid X receptors (RXRs) are nuclear receptors for retinoids that play a critical role in the regulation of growth and differentiation in normal and tumor cells. Deregulation of RXR expression has been reported in non-small cell lung cancer (NSCLC); however, the mechanism underlying the impaired expression of RXRs in lung cancer is not known. Aberrant methylation of promoter CpG islands is known to be a major mechanism for inactivation of tumor suppressor genes. We investigated the methylation status of the RXR genes in 139 surgically resected NSCLCs and correlated the results with the clinicopathologic characteristics of the patients. Methylation in the tumors was detected in all three genes: RXRA, 5.7%; RXRB, 4.3%; RXRG, 23.7%. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis showed that RXRG methylation correlates with mRNA expression. Methylation of the RXRG gene was not significantly associated with the prognosis of patients. When the patients were categorized by smoking status, however, the effect of RXRG methylation on prognosis was significantly different between never- and ever-smokers ( $P=0.003$ , test for homogeneity). Specifically, RXRG methylation was associated with a significantly worse survival in never-smokers; a trend to better survival outcome was observed for ever-smokers, although not statistically significant. This finding suggests that methylation-associated downregulation of the RXRG gene may play a differential role in the carcinogenesis of NSCLCs according to smoking status, but further studies are needed to confirm this.

**Inattivazione epigenetica dei geni del recettore X dei retinoidi nel tumore al polmone non a piccole cellule e relazione con le caratteristiche clinicopatologiche**

Recettori dei retinoidi X (RXR) sono recettori nucleari per i retinoidi che svolgono un ruolo critico nella regolazione della crescita e la differenziazione in cellule normali e tumorali. La deregolamentazione di espressione RXR è stata riportata nel carcinoma polmonare non a piccole cellule (NSCLC), ma il meccanismo sottostante l'espressione alterata di RXRs nel cancro del polmone non è noto. metilazione aberrante di isole CpG promotore è noto per essere un importante meccanismo di inattivazione di geni oncosoppressori. Abbiamo studiato lo stato di metilazione dei geni RXR nel 139 NSCLCs resezione chirurgica e correlati ai risultati con le caratteristiche clinicopatologica dei pazienti. Metilazione nei tumori è stata rilevata in tutti e tre i geni: RXRA, 5,7%; RXRB, 4,3%; RXRG, il 23,7%. Reverse catena della transcriptase-polimerasi reazione analisi ha mostrato che la metilazione RXRG correla con l'espressione di mRNA. Metilazione del gene RXRG non era significativamente associato con la prognosi dei pazienti. Quando i pazienti sono stati classificati per abitudine al fumo, tuttavia, l'effetto della metilazione RXRG sulla prognosi era significativamente differente tra mai e mai fumatori ( $P = 0,003$ , test per l'omogeneità). In particolare, la metilazione RXRG era associata con una sopravvivenza significativamente peggiore nel non-fumatori; una tendenza al risultato migliore sopravvivenza è stata osservata per sempre-fumatori, anche se non statisticamente significativa. Questa scoperta suggerisce che downregulation-metilazione del gene associato RXRG può giocare un ruolo nella carcinogenesi differenziale di NSCLCs secondo lo stato di fumatore, ma sono necessari ulteriori studi per confermare questa.

240: Jiménez-Lara AM, Aranda A, Gronemeyer H.

**Retinoic acid protects human breast cancer cells against etoposide-induced apoptosis by NF-kappaB-dependent but cIAP2-independent mechanisms.**

Mol Cancer. 2010 Jan 26;9:15. PubMed PMID:20102612; PubMed Central PMCID: PMC2825243.

**BACKGROUND:** Retinoids, through their cognate nuclear receptors, exert potent effects on cell growth, differentiation and apoptosis, and have significant promise for cancer therapy and chemoprevention. These ligands can determine the ultimate fate of target cells by stimulating or repressing gene expression directly, or indirectly through crosstalking with other signal transducers.

**RESULTS:** Using different breast cancer cell models, we show here that depending on the cellular context retinoids can signal either towards cell death or cell survival. Indeed, retinoids can induce the expression of pro-apoptotic (i.e. TRAIL, TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand, Apo2L/TNFSF10) and anti-apoptotic (i.e. cIAP2, inhibitor of apoptosis protein-2) genes. Promoter mapping, gel retardation and chromatin immunoprecipitation assays revealed that retinoids induce the expression of this gene mainly through crosstalk with NF-kappaB. Supporting this crosstalk, the activation of NF-kappaB by retinoids in T47D cells antagonizes the apoptosis triggered by the chemotherapeutic drugs etoposide, camptothecin or doxorubicin. Notably apoptosis induced by death ligands (i.e. TRAIL or antiFAS) is not antagonized by retinoids. That knockdown of cIAP2 expression by small interfering RNA does not alter the inhibition of etoposide-induced apoptosis by retinoids in T47D cells reveals that stimulation of cIAP2 expression is not the cause of their anti-apoptotic action. However, ectopic overexpression of a NF-kappaB repressor increases apoptosis by retinoids moderately and abrogates almost completely the retinoid-dependent inhibition of etoposide-induced apoptosis. Our data exclude cIAP2 and suggest that retinoids target other regulator(s) of the NF-kappaB signaling pathway to induce resistance to etoposide on certain breast cancer cells.

**CONCLUSIONS:** This study shows an important role for the NF-kappaB pathway in retinoic acid signaling and retinoic acid-mediated resistance to cancer therapy-mediated apoptosis in breast cancer cells, independently of cIAP2. Our data support the use of NF-kappaB pathway activation as a marker for screening that will help to develop novel retinoids, or retinoid-based combination therapies with improved efficacy.

**L'acido retinoico protegge le cellule con tumore mammario contro l'etoposide che induce apoptosi tramite meccanismi dipendenti da NF-kappaB ma indipendenti da cIAP2**

**BACKGROUND:** retinoidi, attraverso i loro recettori nucleari cognate, esercitano potenti effetti sulla crescita cellulare, la differenziazione e l'apoptosi, e hanno una significativa promessa per la terapia del cancro e la chemioprevenzione. Questi ligandi in grado di determinare il destino ultimo delle cellule bersaglio, stimolando o reprimendo l'espressione genica, direttamente o indirettamente, attraverso crosstalking con trasduttori di segnale.

**RISULTATI:** Usando diverse cellule di cancro al seno modelli, mostriamo qui che a seconda del contesto cellulare retinoidi possono segnalare o verso la morte delle cellule o la sopravvivenza cellulare. Infatti, i retinoidi possono indurre l'espressione della pro-apoptotici (cioè TRAIL, TNF-Related Apoptosis-Indurre Ligand, Apo2L/TNFSF10) e anti-apoptotica (cioè cIAP2, inibitore della proteina di apoptosis-2) geni. mappatura Promotore, ritardo gel e saggi di immunoprecipitazione della cromatina ha rivelato che i retinoidi indurre l'espressione di questo gene principalmente attraverso crosstalk con NF-kB. A supporto di questa diafonia, l'attivazione di NF-kB dai retinoidi nelle cellule T47D antagonizza l'apoptosi innescata dalla chemioterapici etoposide droga, camptotecina o doxorubicina. In particolare l'apoptosi indotta da ligandi di morte (cioè TRAIL o antiFAS) non è antagonizzato dai retinoidi. Che colpo di cIAP2 espressione da parte dei piccoli RNA interferenti non modifica l'inibizione di etoposide apoptosi indotta dai retinoidi nelle cellule

T47D rivela che la stimolazione di cIAP2 espressione non è la causa della loro azione anti-apoptotica. Tuttavia, la sovraespressione ectopica di NF- $\kappa$ B apoptosi repressore aumenta moderatamente retinoidi e abroga quasi completamente l'inibizione retinoidi-dipendente di etoposide apoptosi indotta. I nostri dati escludono cIAP2 e suggeriscono che i retinoidi target altro regolatore (s), della NF- $\kappa$ B via di segnalazione di indurre resistenza a etoposide su alcune cellule del cancro al seno.

**CONCLUSIONI:** Questo studio dimostra un ruolo importante per la via di NF- $\kappa$ B in acido retinoico segnalazione e acido retinoico resistenza all'apoptosi mediata da cancro terapia mediata in cellule di cancro al seno, indipendentemente cIAP2. I nostri dati supportano l'uso del percorso di attivazione di NF- $\kappa$ B come marker per lo screening che servirà a sviluppare retinoidi romanzo, o terapie combinate a base di retinoidi con maggiore efficacia.

242: Kim J, Kim MK, Lee JK, Kim JH, Son SK, Song ES, Lee KB, Lee JP, Lee JM, Yun YM.

**Intakes of vitamin A, C, and E, and beta-carotene are associated with risk of cervical cancer: a case-control study in Korea.**

Nutr Cancer. 2010;62(2):181-9.PubMed PMID: 20099192.

Cervical cancer is one of the most common gynecological malignancies in Korea, although the incidence has been declining in recent years. This study explored whether antioxidant vitamin intakes influenced the risk of cervical cancer. The association between antioxidant vitamin intakes and cervical cancer risk was calculated for 144 cervical cancer cases and 288 age-matched, hospital-based controls using unconditional logistic regression models. Cases reported statistically lower mean dietary intakes of vitamin A, beta-carotene, and vitamin C than did controls. Total intakes of vitamins A and E, which included both dietary and supplement intake, were also lower in cases. Those patients in the highest quartiles of dietary vitamin A, beta-carotene, and vitamin C intakes had statistically significantly lower cervical cancer risks than those in the lowest quartiles for vitamin A, beta-carotene, and vitamin C: odds ratio (OR) = 0.36 [95% confidence interval (CI) = 0.19-0.69], OR = 0.48 (CI = 0.26-0.88), and OR = 0.36 (CI = 0.18-0.69), respectively. Total intakes of vitamins A, C, and E were strongly inversely associated with cervical cancer risk: OR = 0.35 (CI = 0.19-0.65), OR = 0.35 (CI = 0.19-0.66), and OR = 0.53 (CI = 0.28-0.99), respectively. The findings support a role for increased antioxidant vitamin intake in decreasing the risk of cervical cancer. These associations need to be assessed in large prospective studies with long-term follow-up.

**L'assunzione di vitamina A, C ed E e beta-carotene sono associate al rischio di tumore cervicale: uno studio caso-controllo fatto in Korea**

Il cancro cervicale è una delle neoplasie più frequenti ginecologiche in Corea, anche se l'incidenza è in calo negli ultimi anni. Questo studio ha esaminato se l'assunzione di vitamine antiossidanti influenzato il rischio di cancro cervicale. L'associazione tra assunzione di vitamine antiossidanti e rischio di cancro del collo dell'utero è stato calcolato per 144 casi di cancro del collo dell'utero e 288 di pari età, i controlli su base ospedaliera utilizzando incondizionato modelli di regressione logistica. I casi segnalati statisticamente più bassa media di assunzione di vitamina A, beta-carotene e vitamina C rispetto ai controlli. Totale assunzioni delle vitamine A ed E, che includeva sia assunzione con la dieta e integrare, erano minori nei casi. I pazienti nel più alto quartile di vitamina A nella dieta, beta-carotene, vitamina C e le prese erano significativamente più bassi rischi di cancro del collo dell'utero rispetto a quelli nel più basso quartile di vitamina A, beta-carotene e vitamina C: odds ratio (OR) = 0,36 [95% intervallo di confidenza (CI) = 0,19-0,69], OR = 0.48 (IC = 0,26-0,88), e OR = 0.36 (IC = 0,18-0,69), rispettivamente. Assunzioni totali di vitamine A, C ed E sono stati fortemente inversamente associata al rischio di cancro del collo dell'utero: OR = 0.35 (IC = 0,19-0,65), OR = 0.35 (IC = 0,19-0,66), e OR = 0.53 (IC = 0.28-0,99), rispettivamente. I risultati confermano un ruolo per una maggiore assunzione di vitamina antiossidante nel diminuire il rischio di cancro cervicale. Queste associazioni devono essere valutate in ampi studi prospettici di lungo periodo di follow-up.

253: Li N, Kelsh RN, Croucher P, Roehl HH.

**Regulation of neural crest cell fate by the retinoic acid and Pparg signalling pathways.** *Development*. 2010Feb;137(3):389-94. PubMed PMID: 20081187; PubMed Central PMCID: PMC2858905.

Although the regulation of osteoblast and adipocyte differentiation from mesenchymal stem cells has been studied for some time, very little is known about what regulates their appearance in discrete regions of the embryo. Here we show that, as in other vertebrates, zebrafish osteoblasts and adipocytes originate in part from cephalic neural crest (CNC) precursors. We investigated the roles that the retinoic acid (RA) and Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (Pparg) pathways play in vivo and found that both pathways act on CNC to direct adipocyte differentiation at the expense of osteoblast formation. In addition, we identify two distinct roles for RA in the osteoblast lineage: an early role in blocking the recruitment of osteoblasts and a later role in mature osteoblasts to promote bone matrix synthesis. These findings might help to increase our understanding of skeletal and obesity-related diseases and aid in the development of stem cell-based regenerative therapies.

**Regolazione del destino delle cellule della cresta neurale tramite l'acido retinoico e le vie di segnale di Pparg.**

Anche se il regolamento di osteoblasti e la differenziazione degli adipociti a partire da cellule staminali mesenchimali, è stato studiato per qualche tempo, si sa molto poco di ciò che regola la loro comparsa in regioni discrete dell'embrione. Qui si dimostra che, come in altri vertebrati, gli osteoblasti zebrafish e adipociti provengono in parte dalla cresta neurale cefalica (CNC) precursori. Abbiamo studiato il ruolo che l'acido retinoico (RA) e recettore gamma-attivata (PPARG) percorsi giocare in vivo ed ha trovato che entrambi i percorsi atto sul CNC per dirigere differenziazione degli adipociti a spese della formazione degli osteoblasti. Inoltre, abbiamo identificare due ruoli distinti per l'AR nel lignaggio degli osteoblasti: presto un ruolo nel bloccare l'assunzione di osteoblasti e un ruolo più avanti in osteoblasti maturi per promuovere la sintesi della matrice ossea. Questi risultati potrebbero contribuire ad aumentare la nostra comprensione della scheletrici e delle malattie correlate all'obesità e gli aiuti per lo sviluppo di terapie con cellule staminali a base rigenerativa.

256: Nitti M, Furfaro AL, Cevasco C, Traverso N, Marinari UM, Pronzato MA, Domenicotti C.

**PKC delta and NADPH oxidase in retinoic acid-induced neuroblastoma cell differentiation.** Cell Signal. 2010 May;22(5):828-35. Epub 2010 Jan 13. PubMed PMID: 20074641.

The role of reactive oxygen species (ROS) in the regulation of signal transduction processes has been well established in many cell types and recently the fine tuning of redox signalling in neurons received increasing attention. With regard to this, the involvement of NADPH oxidase (NOX) in neuronal pathophysiology has been proposed but deserves more investigation. In the present study, we used SH-SY5Y neuroblastoma cells to analyse the role of NADPH oxidase in retinoic acid (RA)-induced differentiation, pointing out the involvement of protein kinase C (PKC) delta in the activation of NOX. Retinoic acid induces neuronal differentiation as revealed by the increased expression of MAP2, the decreased cell doubling rate, and the gain in neuronal morphological features and these events are accompanied by the increased expression level of PKC delta and p67(phox), one of the components of NADPH oxidase. Using DPI to inhibit NOX activity we show that retinoic acid acts through this enzyme to induce morphological changes linked to the differentiation. Moreover, using rottlerin to inhibit PKC delta or transfection experiments to overexpress it, we show that retinoic acid acts through this enzyme to induce MAP2 expression and to increase p67(phox) membrane translocation leading to NADPH oxidase activation. These findings identify the activation of PKC delta and NADPH oxidase as crucial steps in RA-induced neuroblastoma cell differentiation.

**PKC delta e NADPH ossidasi nella differenziazione delle cellule di neuroblastoma indotta dall'acido retinoico.**

Il ruolo delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) nella regolazione dei processi di trasduzione del segnale è stato ben consolidata in molti tipi di cellule e, recentemente, la messa a punto di segnalazione redox nei neuroni ricevuto un'attenzione crescente. Riguardo a questo, il coinvolgimento di NADPH ossidasi (NOX) in fisiopatologia neuronale è stato proposto, ma merita più indagini. Nel presente studio, abbiamo usato cellule di neuroblastoma SH-SY5Y per analizzare il ruolo della NADPH ossidasi in acido retinoico (RA) differenziazione, indotta, sottolineando il coinvolgimento della proteina chinasi C (PKC) nel delta l'attivazione di NOX. L'acido retinoico induce la differenziazione neuronale, come rivelato dalla aumentata espressione di MAP2, la riduzione del tasso di raddoppiamento delle cellule, e il guadagno in neuronale caratteristiche morfologiche e questi eventi sono accompagnati dal livello aumentata espressione di PKC delta e p67 (phox), uno dei componenti della NADPH ossidasi. Utilizzo di DPI per inibire l'attività di NOX si dimostra che l'acido retinoico agisce attraverso questo enzima per indurre cambiamenti morfologici legati alla differenziazione. Inoltre, usando rottlerin di inibire PKC delta o esperimenti di trasfezione di iperespressione di essa, si dimostra che l'acido retinoico agisce attraverso questo enzima per indurre l'espressione MAP2 e per aumentare la p67 (phox) traslocazione della membrana che porta a NADPH ossidasi di attivazione. Questi risultati di identificare l'attivazione di PKC delta e NADPH ossidasi come una tappa fondamentale verso RA-differenziazione delle cellule di neuroblastoma indotte.

265: Hill SM, Frasch T, Xiang S, Yuan L, Duplessis T, Mao L.

### **Molecular mechanisms of melatonin anticancer effects.**

Integr Cancer Ther. 2009 Dec;8(4):337-46. PubMedPMID: 20050373.

The authors have shown that, via activation of its MT1 receptor, melatonin modulates the transcriptional activity of various nuclear receptors and the proliferation of both ER alpha+ and ER alpha- human breast cancer cells. Employing dominant-negative (DN) and dominant-positive (DP) G proteins, it was demonstrated that G alpha i2 proteins mediate the suppression of estrogen-induced ER alpha transcriptional activity by melatonin, whereas the G alpha q proteins mediate the enhancement of retinoid-induced RAR alpha transcriptional activity by melatonin. In primary human breast tumors, the authors' studies demonstrate an inverse correlation between ER alpha and MT1 receptor expression, and confocal microscopic studies demonstrate that the MT1 receptor is localized to the caveoli and that its expression can be repressed by estrogen and melatonin. Melatonin, via activation of its MT1 receptor, suppresses the development and growth of breast cancer by regulation of growth factors, regulation of gene expression, regulation of clock genes, inhibition of tumor cell invasion and metastasis, and even regulation of mammary gland development. The authors have previously reported that the clock gene, Period 2 (Per2), is not expressed in human breast cancer cells but that its reexpression in breast cancer cells results in increased expression of p53 and induction of apoptosis. The authors demonstrate that melatonin, via repression of ROR alpha transcriptional activity, blocks the expression of the clock gene BMAL1. Melatonin's blockade of BMAL1 expression is associated with the decreased expression of SIRT1, a member of the Silencing Information Regulator family and a histone and protein deacetylase that inhibits the expression of DNA repair enzymes (p53, BRCA1 & 2, and Ku70) and the expression of apoptosis-associated genes. Finally, the authors developed an MMTV-MT1-flag mammary knock-in transgenic mouse that displays reduced ductal branching, ductal epithelium proliferation, and reduced terminal end bud formation during puberty and pregnancy. Lactating female MT1 transgenic mice show a dramatic reduction in the expression of beta-casein and whey acidic milk proteins. Further analyses showed significantly reduced ER alpha expression in mammary glands of MT1 transgenic mice. These results demonstrate that the MT1 receptor is a major transducer of melatonin's actions in the breast, suppressing mammary gland development and mediating the anticancer actions of melatonin through multiple pathways.

### **Meccanismi molecolari degli effetti antitumorali della melatonina**

Gli autori hanno dimostrato che, attraverso l'attivazione dei suoi recettori MT1, la melatonina modula l'attività trascrizionale di diversi recettori nucleari e la proliferazione di entrambe le alpha ER + e ER alfa-cellule umane di cancro al seno. Impiegando dominante negativo (DN) e dominante-positivi (DP) proteine G, è stato dimostrato che le proteine G alfa i2 mediano la soppressione di attività estrogeno-ER alfa trascrizionale indotta dalla melatonina, mentre le proteine G alfa q mediano la valorizzazione del retinoide indotta RAR alfa attività trascrizionale di melatonina. In tumori primari del seno umano, gli studi degli autori 'dimostrano una correlazione inversa tra alfa e ER espressione dei recettori MT1 e confocale studi microscopici dimostrano che il recettore MT1 è localizzato nella caveoli e che la sua espressione può essere repressa da estrogeni e melatonina. La melatonina, attraverso l'attivazione del suo recettore MT1, sopprime lo sviluppo e la crescita del cancro al seno con il regolamento di fattori di crescita, regolazione dell'espressione genica, regolazione dei geni orologio, l'inibizione di invasione delle cellule tumorali e metastasi, e anche il regolamento di sviluppo della ghiandola mammaria. Gli autori hanno riportato in precedenza che il gene orologio, Period 2 (PER2), non è espressa nelle cellule umane di cancro al seno, ma che la sua reexpression nei risultati di cancro al seno cellule aumentata espressione di p53 e l'induzione di apoptosi. Gli autori dimostrano che la melatonina, attraverso la repressione di

attività alfa ROR trascrizionale, blocca l'espressione del gene orologio BMAL1. blocco della melatonina di BMAL1 espressione è associata con la ridotta espressione di SIRT1, un membro della famiglia tacere Informazioni Regolatore e di un istone e deacetilasi proteina che inibisce l'espressione degli enzimi di riparazione del DNA (p53, BRCA1 e 2, e Ku70) e l'espressione di apoptosi geni associati. Infine, gli autori hanno sviluppato un mammaria MMTV-MT1-flag knock-in topi transgenici che visualizza ridotto duttale ramificazione, la proliferazione dell'epitelio duttale e riduzione della formazione di gemma terminale durante la pubertà e la gravidanza. Lactating topi femmina MT1 transgenici mostrano una drastica riduzione dell'espressione di beta-caseina e siero proteine del latte acido. Ulteriori analisi hanno dimostrato significativamente ridotta espressione di ER alfa nelle ghiandole mammarie di topi transgenici MT1. Questi risultati dimostrano che il recettore MT1 è un trasduttore principale delle azioni della melatonina nel petto, che sopprimono lo sviluppo della ghiandola mammaria e mediere le azioni anticancro della melatonina attraverso diverse vie.

267: Phipps SM, Love WK, White T, Andrews LG, Tollefsbol TO.

**Retinoid-induced histone deacetylation inhibits telomerase activity in estrogen receptor-negative breast cancer cells.**

Anticancer Res. 2009 Dec;29(12):4959-64. PubMed PMID:20044602; PubMed Central PMCID: PMC2888005.

**BACKGROUND:** Multiple mechanisms regulate cancer-associated telomerase activity at the level of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) transcription which may serve as novel targets for anticancer approaches.

**MATERIALS AND METHODS:** The effects of prolonged all-trans retinoic acid (ATRA) exposure on hTERT regulation in estrogen receptor-negative SK-BR-3 breast cancer cells were examined.

**RESULTS:** ATRA had a profound effect on the morphology and proliferation rate of the SK-BR-3 cells. ATRA also hindered the ability of these cancer cells to grow independently, rendering them more like normal somatic cells. The effect of ATRA on the decrease of telomerase activity was found to be associated with a rapid decrease in histone H3-lysine 9 acetylation (H3-K9-Ac) of the hTERT promoter. Extended-exposure to ATRA in these cells also caused the initiation of a putative compensatory mechanism, counteracting the induced surge in apoptosis.

**CONCLUSION:** A rapid decrease of H3-K9 acetylation at the hTERT promoter could be an important mechanism by which ATRA shuts down telomerase activity and mediates its antitumor effects in estrogen receptor-negative breast cancer cells.

**La deacetilazione degli istoni indotta dai retinoidi inibisce l'attività telomerasica nelle cellule con carcinoma mammario negative per i recettori degli estrogeni**

**BACKGROUND:** molteplici meccanismi regolano l'attività della telomerasi associata al cancro a livello della trascrittasi inversa della telomerasi umana (hTERT), trascrizione che può servire come nuovi bersagli per approcci antitumorali.

**MATERIALI E METODI:** Gli effetti di una prolungata esposizione all'acido all-trans retinoico (ATRA) sulla regolamentazione hTERT in estrogeni negativi per il recettore SK-BR-3 cellule di carcinoma mammario sono stati esaminati.

**RISULTATI:** ATRA avuto un profondo effetto sul tasso di morfologia e la proliferazione delle cellule SK-BR-3. ATRA anche ostacolato la capacità di queste cellule tumorali a crescere in maniera indipendente, rendendoli più simili a normali cellule somatiche. L'effetto di ATRA sulla diminuzione dell'attività della telomerasi è stato trovato per essere associato ad una rapida diminuzione delle istone H3-lisina 9 acetilazione (H3-K9-Ac), del promotore di hTERT. Extended esposizione a ATRA in queste cellule anche causato l'avvio di un meccanismo di compensazione putativa, contrastare l'impennata indotta in apoptosi.

**CONCLUSIONE:** Una rapida diminuzione di acetilazione H3-K9 al promotore hTERT potrebbe essere un importante meccanismo mediante il quale ATRA si chiude l'attività della telomerasi e media i suoi effetti antitumorali delle cellule della mammella recettore-negativo cancro.

268: Redova M, Chlapek P, Loja T, Zitterbart K, Hermanova M, Sterba J, VeselskaR.

**Influence of LOX/COX inhibitors on cell differentiation induced by all-trans retinoic acid in neuroblastoma cell lines.**

Int J Mol Med. 2010 Feb;25(2):271-80. PubMed PMID: 20043138.

We investigated the possible modulation by LOX/ COX inhibitors of all-trans retinoic acid (ATRA)-induced cell differentiation in two established neuroblastoma cell lines, SH-SY5Y and SK-N-BE(2). Caffeic acid, as an inhibitor of 5-lipoxygenase, and celecoxib, as an inhibitor of cyclooxygenase-2, were chosen for this study. The effects of the combined treatment with ATRA and LOX/COX inhibitors on neuroblastoma cells were studied using cell morphology assessment, detection of differentiation markers by immunoblotting, measurement of proliferation activity, and cell cycle analysis and apoptosis detection by flow cytometry. The results clearly demonstrated the potential of caffeic acid to enhance ATRA-induced cell differentiation, especially in the SK-N-BE(2) cell line, whereas application of celecoxib alone or with ATRA led predominantly to cytotoxic effects in both cell lines. Moreover, the higher sensitivity of the SK-N-BE(2) cell line to combined treatment with ATRA and LOX/COX inhibitors suggests that cancer stem cells are a main target for this therapeutic approach. Nevertheless, further detailed study of the phenomenon of enhanced cell differentiation by expression profiling is needed.

**L'influenza degli inibitori LOX/COX sulla differenziazione cellulare è indotta dall'acido tutto-trans-retinoico nelle line cellulari di neuroblastoma**

Abbiamo studiato la possibile modulazione da LOX / COX inibitori di acido all-trans retinoico (ATRA) indotta differenziazione cellulare in due linee istituito cellule di neuroblastoma, SH-SY5Y e SK-N-BE (2). Acido caffeico, come un inibitore della 5-lipossigenasi, e celecoxib, come un inibitore della cicloossigenasi-2, sono stati scelti per questo studio. Gli effetti del trattamento combinato con ATRA e LOX / inibitori COX su cellule di neuroblastoma sono state studiate mediante valutazione della morfologia delle cellule, l'individuazione di marcatori di differenziazione mediante immunoblotting, misurazione delle attività di proliferazione, e l'analisi del ciclo cellulare e apoptosi rilevamento mediante citometria a flusso. I risultati hanno chiaramente dimostrato il potenziale di acido caffeico per migliorare ATRA-indotta differenziazione cellulare, specialmente nel SK-N-BE (2) linea cellulare, che l'applicazione di celecoxib da solo o con ATRA ha portato prevalentemente agli effetti citotossici in entrambe le linee cellulari. Inoltre, la maggiore sensibilità della SK-N-BE (2) linea cellulare al trattamento combinato con l'ATRA e LOX / inibitori COX suggerisce che le cellule staminali tumorali sono il bersaglio principale di questo approccio terapeutico. Tuttavia, ulteriore studio dettagliato del fenomeno della differenziazione cellulare arricchita da profili di espressione è necessario.

273: Maillard V, Kuriki K, Lefebvre B, Boutron-Ruault MC, Lenoir GM, Joulin V, Clavel-Chapelon F, Chajès V.

### **Serum carotenoid, tocopherol and retinol concentrations and breast cancer risk in the E3N-EPIC study.**

Int J Cancer. 2010 Sep 1;127(5):1188-96. PubMed PMID: 20039325.

Evidence of a protective effect of fruit and vegetable intake on breast cancer risk is inconsistent. Epidemiologic cohort studies based on blood carotenoid intakes as biomarkers of consumption of fruits and vegetable in individuals are still scarce and findings are discrepant. The study population included women in the E3N Study, the large French component of the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). During an average of 7 years follow-up, 366 cases of incident invasive breast cancer (84 premenopausal women and 282 postmenopausal women) among 19,934 women who completed a dietary questionnaire and had available blood samples at baseline (1995-1998) were included in the study. Controls were randomly matched on age, menopausal status at blood collection, fasting status at blood collection, date and collection center. Serum carotenoids, tocopherols and retinol concentrations were assessed by high pressure liquid chromatography. Odds ratios for breast cancer risk adjusted for established breast cancer risk factors were calculated by quintile of serum micronutrient concentrations. No significant associations between breast cancer risk and serum carotenoids (highest versus lowest quintile, odds ratio (OR) = 0.74, 95% confidence interval (CI) = 0.47-1.16, p for trend 0.38), tocopherols (OR = 0.68, 95% CI = 0.41-1.10, p for trend 0.26) and retinol (OR = 0.85, 95% CI = 0.53-1.35, p for trend 0.34) were found. Our findings did not support the hypothesis that lipophilic antioxidant micronutrients found in fruits and vegetables protect against breast cancer, at least in postmenopausal women.

### **Concentrazioni di carotenoidi, tocoferoli e retinolo nel siero e rischio di cancro al seno nello studio EPIC-E3N.**

La prova di un effetto protettivo di frutta e verdura sul rischio di cancro al seno è incoerente. Gli studi epidemiologici di coorte basati sui consumi di sangue di carotenoidi come biomarcatori di consumo di frutta e verdura in individui sono ancora scarsi ed i risultati sono discrepanti. La popolazione dello studio comprendeva donne nello studio E3N, la grande componente francese della Studio prospettico europeo sul cancro e nutrizione (EPIC). Durante una media di 7 anni di follow-up, 366 casi di carcinoma mammario invasivo incidente (84 donne in premenopausa e 282 donne in postmenopausa) tra le 19.934 donne che hanno completato un questionario dietetico e aveva a disposizione campioni di sangue al basale (1995-1998) sono stati inclusi nella studio. I controlli sono stati abbinati in modo casuale su età, stato menopausale alla raccolta del sangue, a digiuno di stato nella raccolta del sangue, data e centro di raccolta. Siero carotenoidi, tocoferoli e le concentrazioni di retinolo sono stati valutati mediante cromatografia liquida ad alta pressione. odds ratio per il rischio di cancro al seno aggiustato per fattori di rischio di cancro al seno stabiliti sono stati calcolati per quintile delle concentrazioni sieriche di micronutrienti. Nessuna associazione significativa tra rischio di cancro al seno carotenoidi e siero (quintile più alto versus più basso, odds ratio (OR) = 0,74, intervallo di confidenza al 95% (CI) = 0,47-1,16, p per trend 0,38), tocoferoli (OR = 0,68, 95% CI = 0,41-1,10, p per trend 0,26) e retinolo (OR = 0,85, 95% CI = 0,53-1,35, p per trend 0,34) sono stati trovati. I nostri risultati non supportano l'ipotesi che micronutrienti antiossidanti lipofili presenti nella frutta e verdura proteggono dal cancro al seno, almeno nelle donne in postmenopausa.

280: Manolescu DC, Sima A, Bhat PV.

**All-trans retinoic acid lowers serum retinol-binding protein 4 concentrations and increases insulin sensitivity in diabetic mice.**

J Nutr. 2010 Feb;140(2):311-6. Epub 2009 Dec 23. PubMed PMID:20032483.

Recent investigations have demonstrated that elevated serum retinol-binding protein 4 (RBP4) secreted from adipose tissue plays a role in the development of systemic insulin resistance, and lowering RBP4 improves insulin sensitivity. These observations provide a rationale for the development of new antidiabetic agents aimed at reducing serum RBP4 concentrations. In this study, we sought to determine whether retinoic acid (RA) administration decreases serum RBP4 and suppresses insulin resistance in diabetic ob/ob mice. All-trans RA [100 µg/(mouse) in corn oil] was administered by stomach intubation to a group of ob/ob mice, with the control group receiving the vehicle for 16 d. Body weight and food intake were monitored. Glucose and insulin tolerance tests were performed. We quantified serum RBP4 and retinol by Western blotting and HPLC, respectively. RA treatment reduced body weight ( $P < 0.05$ ), basal serum glucose ( $P < 0.001$ ), serum retinol ( $P < 0.01$ ), and RBP4 ( $P < 0.05$ ). It improved insulin sensitivity and decreased the retinol:RBP4 ratio ( $P < 0.05$ ). These studies suggest that RA is an effective antidiabetic agent that could be considered in the treatment of type 2 diabetes.

**L'acido all-trans retinoico abbassa le concentrazioni di (RBP 4) e aumenta la sensibilità all'insulina in topi diabetici.**

Recenti indagini hanno dimostrato che elevati livelli sierici di proteina retinolo-binding 4 (RBP4) secreto dal tessuto adiposo ha un ruolo nello sviluppo di insulino-resistenza sistemica, e RBP4 abbassamento migliora la sensibilità all'insulina. Queste osservazioni forniscono un razionale per lo sviluppo di nuovi farmaci antidiabetici volte a ridurre le concentrazioni di RBP4 siero. In questo studio, abbiamo cercato di determinare se l'acido retinoico (RA) la somministrazione del siero diminuisce RBP4 e dell'insulina sopprime la resistenza in diabetici ob / ob topi. All-trans RA [100 µg / (mouse) in olio di mais] è stata amministrata da intubazione stomaco a un gruppo di ob / ob topi, con il gruppo di controllo che riceve il veicolo per 16 d. Il peso corporeo e l'assunzione di cibo sono stati monitorati. Glucosio e test di tolleranza all'insulina sono stati effettuati. Abbiamo quantificato RBP4 siero e retinolo dal macchiare occidentale e HPLC, rispettivamente. Trattamento con RA riduzione del peso corporeo ( $p < 0,05$ ), glicemia basale ( $P < 0,001$ ), retinolo nel siero ( $P < 0,01$ ), e RBP4 ( $P < 0,05$ ). Ha migliorato la sensibilità all'insulina e ridotto il retinolo: rapporto RBP4 ( $P < 0,05$ ). Questi studi suggeriscono che la RA è un efficace agente antidiabetico che potrebbe essere considerato nel trattamento del diabete di tipo 2.

283: Sallmon H, Hoene V, Weber SC, Dame C.

**Differentiation of human SH-SY5Y neuroblastoma cells by all-trans retinoic acid activates the interleukin-18 system.**

J Interferon Cytokine Res. 2010 Feb;30(2):55-8. PubMed PMID: 20028206.

The clinical prognosis of children with high-stage neuroblastoma is still poor. Therapeutic approaches include surgery and cellular differentiation by retinoic acid, but also experimental interleukin-based immune modulation. However, the molecular mechanisms of all-trans retinoic acid (ATRA)-induced differentiation of neuroblastoma cells are incompletely understood. Herein, we examined the effect of ATRA on the activity of the interleukin-18 (IL-18) system in human SH-SY5Y neuroblastoma cells. It is shown that SH-SY5Y cells express IL-18 receptor (IL-18R) and the secreted antagonist IL-18-binding protein (IL-18BP), but no IL-18. SH-SY5Y cells are highly sensitive to ATRA treatment and react by cellular differentiation from a neuroblastic toward a more neuronal phenotype. This was associated with induction of IL-18 and reduction of IL-18BP expression, while IL-18R expression remained stable. Thereby, we identified the IL-18 system as a novel target of ATRA in neuroblastoma cells that might contribute to the therapeutic properties of retinoids in treatment of neuroblastoma.

**La differenziazione delle cellule umane di neuroblastoma SH-SY5Y attraverso l'acido all-trans retinoico attiva il sistema di interleuchina-18.**

J Interferon Cytokine Res. 2010 Feb;30(2):55-8. PubMed PMID: 20028206.

La prognosi clinica di bambini con neuroblastoma alto stadio è ancora scarsa. Gli approcci terapeutici includono la chirurgia e la differenziazione cellulare da acido retinoico, ma anche sperimentale modulazione interleuchina-based immunitario. Differenziazione, tuttavia, i meccanismi molecolari di tutto-trans retinoico (ATRA)-indotta delle cellule di neuroblastoma sono completamente sconosciuto. Qui, abbiamo esaminato l'effetto di ATRA sull'attività della interleuchina-18 (IL-18) sistema di cellule umane di neuroblastoma SH-SY5Y. E 'dimostrato che le cellule SH-SY5Y esprimere recettore IL-18 (IL-18R) e la proteina secreta antagonista IL-18-binding (IL-18BP), ma non di IL-18. Cellule SH-SY5Y sono altamente sensibili al trattamento con ATRA e reagire con differenziazione cellulare da un neuroblastic verso un fenotipo più neuronale. Ciò è stata associata con l'induzione di IL-18 e la riduzione di espressione di IL-18BP, mentre l'espressione di IL-18R è rimasta stabile. In tal modo, abbiamo identificato il sistema di IL-18 come un nuovo bersaglio di ATRA in cellule di neuroblastoma che potrebbero contribuire alle proprietà terapeutiche dei retinoidi nel trattamento del neuroblastoma.

297: Friling S, Bergsland M, Kjellander S.

**Activation of Retinoid X Receptor increases dopamine cell survival in models for Parkinson's disease.**

BMC Neurosci.2009 Dec 11;10:146. PubMed PMID: 20003337; PubMed Central PMCID: PMC2800113.

**BACKGROUND:** Parkinson's disease (PD) is caused by degeneration of dopamine (DA) neurons in the ventral midbrain (vMB) and results in severely disturbed regulation of movement. The disease inflicts considerable suffering for the affected and their families. Today, the opportunities for pharmacological treatment are meager and new technologies are needed. Previous studies have indicated that activation of the nuclear receptor Retinoid X Receptor (RXR) provides trophic support for DA neurons. Detailed investigations of these neurotrophic effects have been hampered by the lack of readily available DA neurons in vitro. The aim of this study was to further describe the potential neurotrophic actions of RXR ligands and, for this and future purposes, develop a suitable in vitro-platform using mouse embryonic stem cells (mESCs).

**RESULTS:** We studied the potential neurotrophic effects of the RXR ligand LG100268 (LG268) and the RXR-Nurr1 ligand XCT0139508 (XCT) in neuronal cultures derived from rat primary vMB and mESCs. RXR ligands protect DA neurons from stress, such as that induced by the PD-modeling toxin 6-hydroxy dopamine (6-OHDA) and hypoxia, but not from stress induced by oxidative hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) or the excitotoxic agent kainic acid (KA). The neurotrophic effect is selective for DA neurons. DA neurons from rat primary vMB and mESCs behaved similarly, but the mESC-derived cultures contained a much higher fraction of DA cells and thus provided more accessible experimental conditions.

**CONCLUSIONS:** RXR ligands rescue DA neurons from degeneration caused by the PD simulating 6-OHDA as well as hypoxia. Thus, RXR is a novel promising target for PD research. mESC-derived DA cells provide a valid and accessible in vitro-platform for studying PD inducing toxins and potential trophic agents.

**L'attivazione del recettore X dei retinoidi aumenta la sopravvivenza delle cellule della dopamina in modelli per la malattia di Parkinson.**

**BACKGROUND:** il morbo di Parkinson (PD) è causata dalla degenerazione della dopamina (DA) i neuroni del mesencefalo ventrale (VMB) ed i risultati nella regolazione gravemente disturbati di movimento. La malattia infligge sofferenze per i colpiti e le loro famiglie. Oggi, le possibilità di trattamento farmacologico sono scarsi e le nuove tecnologie sono necessari. Precedenti studi hanno indicato che l'attivazione del recettore nucleare retinoidi X Receptor (RXR) fornisce il supporto trofico per i neuroni DA. Indagini particolareggiate di questi effetti neurotrofici sono stati ostacolati dalla mancanza di disponibili neuroni DA in vitro. Lo scopo di questo studio era di descrivere ulteriormente le azioni potenziale neurotrofico di leganti RXR e, per questo e per scopi futuri, elaborare un adeguato in vitro-platform usando le cellule staminali embrionali di topo (mESCs).

**RISULTATI:** Abbiamo studiato i potenziali effetti neurotrofici del RXR ligando LG100268 (LG268) e il Nurr1 XCT0139508 ligando RXR (XCT) in colture neuronali derivate da VMB primari di ratto e mESCs. ligandi RXR proteggere i neuroni DA dallo stress, come quella indotta dalla dopamina la tossina PD-6-idrossi modellazione (6-OHDA) e ipossia, ma non da stress indotta da perossido di idrogeno ossidativo (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) o il eccitotossico acido cainico agente (KA ). L'effetto neurotrofico è selettivo per i neuroni DA. neuroni DA da VMB primari di ratto e mESCs si comportavano allo stesso modo, ma le culture mesc-derivati conteneva una frazione molto più elevato di cellule DA e così previste condizioni sperimentali più accessibile.

CONCLUSIONI: ligandi RXR salvataggio DA neuroni dalla degenerazione causata dal PD simulando 6-OHDA così come ipossia. Così, RXR è un nuovo bersaglio promettente per la ricerca PD. mesc-derivate le cellule DA fornire un valido e accessibile in vitro-piattaforma per lo studio di PD e le tossine che inducono potenziali agenti trofici.

302: Furugaki K, Pokorna K, Le Pogam C, Aoki M, Reboul M, Bajzik V, Krief P, Janin A, Noguera ME, West R, Charron D, Chomienne C, Pla M, Moins-Teisserenc H, Padua RA.

Blood. 2010 Jan 21;115(3):653-6. Epub 2009 Nov 19. PubMed PMID: 19965687.

**DNA vaccination with all-trans retinoic acid treatment induces long-term survival and elicits specific immune responses requiring CD4+ and CD8+ T-cell activation in an acute promyelocytic leukemia mouse model.**

DNA vaccination and all-trans retinoic acid (ATRA) result in a survival advantage in a mouse model of acute promyelocytic leukemia (APL). Depletion of CD4(+) or CD8(+) cells abolished this effect. CD4(+) depletions of long-term survivors resulted in relapse and death within 3 months, thus demonstrating the need of both CD4(+) and CD8(+) subsets for the generation of DNA-driven antileukemic immune responses and underscoring a crucial role of CD4(+) cells in the maintenance of durable remissions. Degranulation and cytotoxic carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester-based assays showed major histocompatibility complex-restricted APL-specific T cell-mediated immune responses. Sorted APL-specific CD8(+)CD107a(+) T cells showed an increase of antileukemic activity. Effectors from ATRA + DNA-treated mice were shown to secrete interferon-gamma when stimulated with either APL cells or peptides from the promyelocytic leukemia-RARalpha vaccine-derived sequences as detected by ELISpot assays. Our results demonstrate that DNA vaccination with ATRA confers the effective boosting of interferon-gamma-producing and cytotoxic T cells in the leukemic mice.

**La vaccinazione al DNA, con trattamento all-trans retinoico induce la sopravvivenza a lungo termine e suscita risposte immunitarie specifiche che richiedono l'attivazione di CD4 + e CD8 + delle cellule T in un topo con leucemia promielocitica acuta.**

DNA vaccinazione e all-trans retinoico (ATRA) comportano un vantaggio di sopravvivenza in un modello murino di leucemia promielocitica acuta (APL). L'esaurimento delle cellule CD4 (+) o CD8 (+) le cellule abolito questo effetto. CD4 (+) esaurimento dei sopravvissuti a lungo termine ha portato in ricaduta e di morte entro 3 mesi, ciò dimostra la necessità di entrambi i CD4 (+) e CD8 (+) sottoinsiemi per la generazione di risposte antileucemica DNA-driven immunitario e sottolineando un ruolo cruciale di CD4 (+) le cellule nel mantenimento della remissione durevole. Degranolazione e citotossici carbosifluoresceina diacetato saggi succinimidyl a base di esteri hanno mostrato maggiore di istocompatibilità complesso APL-restricted-T specifiche risposte immunitaria cellulo-mediata. CD8 Ordinati APL-specifici (+) CD107a (+) le cellule T ha mostrato un aumento di attività antileucemica. Effettori dai topi ATRA + DNA-trattati hanno dimostrato di secernere interferone-gamma, quando stimolato sia con le cellule APL o peptidi di leucemia promielocitica sequenze-RARalpha vaccino-derivati, come rilevato da ELISPOT. I nostri risultati dimostrano che la vaccinazione con DNA ATRA conferisce il potenziamento effettivo di interferone-gamma-produzione e le cellule T citotossiche nei topi leucemici.

306: Poulain S, Lacomme S, Battaglia-Hsu SF, du Manoir S, Brochin L, Vignaud JM, Martinet N.

### **Signalling with retinoids in the human lung: validation of new tools for the expression study of retinoid receptors.**

BMC Cancer. 2009 Dec 4;9:423.PubMed PMID: 19961602; PubMed Central PMCID: PMC2797528.

**BACKGROUND:** Retinoid Receptors are involved in development and cell homeostasis. Alterations of their expressions have been observed in lung cancer. However, retinoid chemoprevention trials in populations at risk to develop such tumors have failed. Therefore, the pertinence of new clinical trials using second generation retinoid requires prior better understanding of retinoid signalling. This is our aim when validating extensively research tools, focused on Retinoic Acid Receptor beta, whose major role in lung cancer is documented.

**METHODS:** Biocomputing was used to assess the genomic organization of RAR beta. Its putative RAR-beta1' promoter features were investigated experimentally. Specific measures realized, with qRT-PCR Syber Green assays and a triplex of Taqman probes, were extensively validated to establish Retinoid Receptors mRNAs reference values for in vivo normal human bronchial cells, lung tumors and cell lines. Finally, a pan-RAR-beta antibody was generated and extensively validated by western-blot and immunoprecipitation.

**RESULTS:** No promoter-like activity was found for RAR-beta1'. RAR-beta2 mRNAs increase signs the normal differentiation of the human bronchial epithelium while a decrease is observed in most lung cancer cell lines. Accordingly, it is also, along with RXR beta, down-regulated in lung tumors. When using nuclear extracts of BEAS-2B and normal lung cells, only the RAR-beta2 long protein isoform was recognized by our antibody.

**CONCLUSION:** Rigorous samples processing and extensive biocomputing, were the key factors for this study. mRNA reference values and validated tools can now be used to advance researches on retinoid signalling in the lung.

### **La segnalazione dei retinoidi nel polmone umano: la validazione di nuovi strumenti per lo studio dell'espressione dei recettori dei retinoidi.**

**BACKGROUND:** recettori dei retinoidi sono coinvolti nell'omeostasi di sviluppo e delle cellule. Alterazioni delle loro espressioni sono state osservate nel cancro del polmone. Tuttavia, sperimentazioni di chemioprevenzione dei retinoidi nelle popolazioni a rischio di sviluppare tumori è fallito. Pertanto, la pertinenza delle nuove sperimentazioni cliniche con retinoidi di seconda generazione richiede la comprensione preliminare meglio di segnalazione dei retinoidi. Questo è il nostro obiettivo durante la convalida ampiamente strumenti di ricerca, incentrata sulla beta del recettore acido retinoico, il cui maggior ruolo nel cancro del polmone è documentata.

**METODI:** bioinformatica è stato utilizzato per valutare l'organizzazione genomica di RAR beta. Il suo presunto RAR-beta1 'caratteristiche promotore sono stati studiati sperimentalmente. Misure specifiche realizzato, con qRT-PCR Syber saggi verde e un triplex di sonde TaqMan, sono state ampiamente validate per stabilire recettori dei retinoidi mRNA valori di riferimento per in vivo normali cellule umane bronchiali, tumori polmonari e linee cellulari. Infine, un anticorpo pan-RAR-beta è stato generato e ampiamente validate tramite western-blot e immunoprecipitazione.

**RISULTATI:** Nessuna attività promotore-come è stato trovato per RAR-beta1 '. RAR-beta2 mRNA segni aumentare la normale differenziazione dell'epitelio bronchiale umano mentre una diminuzione si osserva in linee più cellule cancro ai polmoni. Di conseguenza, è anche, insieme a RXR beta, down-regolato nei tumori del polmone. Quando si utilizzano estratti nucleari di cellule polmonari BEAS-2B e normale, solo il RAR-beta2 isoforma proteica a lungo è stato riconosciuto dai nostri anticorpi.

CONCLUSIONE: rigorosa elaborazione campioni e bioinformatica estesa, sono stati i fattori chiave per questo studio. valori di riferimento e strumenti validati mRNA può ora essere usata per avanzare ricerche su segnalazione dei retinoidi nel polmone.

311: Tang XH, Albert M, Scognamiglio T, Gudas LJ.

**A DNA methyltransferase inhibitor and all-trans retinoic acid reduce oral cavity carcinogenesis induced by the carcinogen 4-nitroquinoline 1-oxide.**

Cancer Prev Res (Phila). 2009Dec;2(12):1100-10. Epub 2009 Dec 1. PubMed PMID: 19952362; PubMed Central PMCID: PMC2877493.

The transcriptional silencing of some cell cycle inhibitors and tumor suppressors, such as p16 and retinoic acid receptor beta(2), by DNA hypermethylation at CpG islands is commonly found in human oral squamous carcinoma cells. We examined the effects of the DNA methyltransferase inhibitor 5-Aza-2'-deoxycytidine (5-Aza; 0.25 mg/kg body weight), all-trans retinoic acid (RA; given at 100 microg/kg body weight and 1 mg/kg body weight), and the combination of 5-Aza and the low-dose RA on murine oral cavity carcinogenesis induced by the carcinogen 4-nitroquinoline 1-oxide (4-NQO) in a mouse model. All the drug treatments were done for 15 weeks after a 10-week 4-NQO treatment. Mice in all drug treatment groups showed decreases in the average numbers of neoplastic tongue lesions. The combination of 5-Aza and RA effectively attenuated tongue lesion severity. Although all drug treatments limited the increase in the percentage of proliferating cell nuclear antigen-positive cells and the decrease in the percentage of p16-positive cells caused by the 4-NQO treatment in mouse tongue epithelial regions without visible lesions and in the neoplastic tongue lesions, the combination of 5-Aza and RA was the most effective. Collectively, our results show that the combination of a DNA demethylating drug and RA has potential as a strategy to reduce oral cavity cancer in this 4-NQO model.

**Un inibitore della DNA metiltransferasi e acido all-trans retinoico riducono la carcinogenesi della cavità orale indotta dal cancerogeno 4-nitrochinolina 1-ossido.**

Il silenziamento trascrizionale di inibitori del ciclo cellulare e alcuni soppressori tumorali, come il p16 e acido retinoico recettore beta (2), da ipermetilazione del DNA su isole CpG si trova comunemente in cellule umane di carcinoma squamoso orale. Abbiamo esaminato gli effetti dell'inibitore DNA metiltransferasi 5-Aza-2'-deossicitidina (5-Aza; 0,25 mg / kg di peso corporeo), l'acido all-trans retinoico (RA; dato a 100 microg / kg di peso corporeo e 1 mg / kg di peso corporeo), e la combinazione di 5-Aza e il basso dosaggio RA su murino cavità orale carcinogenesi indotta dal 4-nitrochinolina cancerogeno 1-ossido (4-NQO) in un modello murino. Tutti i trattamenti farmacologici sono stati fatti per 15 settimane dopo un trattamento di 10 settimane 4-NQO. Topi in tutti i gruppi di trattamento della droga ha consentito una riduzione del numero medio di lesioni neoplastiche lingua. La combinazione di 5-Aza e RA efficacemente attenuato la gravità della lesione lingua. Anche se tutti i trattamenti farmacologici limitato l'aumento della percentuale di cellule proliferanti cellule antigene nucleare-positivi e la diminuzione della percentuale di cellule p16-positivo causati dal trattamento di 4 NQO nelle regioni di lingua mouse epiteliali senza lesioni visibili e nelle lesioni neoplastiche lingua La combinazione di 5-Aza e RA è stato il più efficace. Collettivamente, i nostri risultati dimostrano che la combinazione di un DNA demetilanti droga e RA ha un potenziale come una strategia per ridurre il cancro della cavità orale in questo modello 4-NQO.

**Oxidative stress in MCF-7 cells is involved in the effects of retinoic acid-induced activation of protein kinase C-delta on insulin-like growth factor-I secretion and synthesis.**

Growth Horm IGF Res. 2010Apr;20(2):101-9. Epub 2009 Nov 22. PubMed PMID: 19932628.

It is known that all-trans retinoic acid (RA) is a useful therapeutic anticancer agent in breast cancer that acts by inducing apoptosis and growth inhibition. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) is also known to be a growth hormone that plays an important role in cell proliferation and apoptosis. We examined the relationships between RA-induced protein kinase C (PKC)-delta, the secretion and synthesis of IGF-I, and oxidative stress. RA at  $10^{-8}$ M and  $10^{-7}$ M increased PKC-delta phosphorylation (the ratio of phosphorylated to total PKC-delta) ( $p < 0.05$ ) and decreased the secretion and synthesis of IGF-I ( $p < 0.05$ ) compared to control, with the effects peaking for treatment with  $10^{-7}$ M RA for 72h. The silencing of PKC-delta prevented the RA-induced inhibition of the secretion and synthesis of IGF-I and cell viability ( $p < 0.05$ ). Application of  $10^{-7}$ M RA for 72h increased the level of thiobarbituric-acid-reactive substances and the expression of inducible nitric oxide synthase relative to control ( $p < 0.05$ ). These increases were blocked by suppressing PKC-delta and by pretreatment with the antioxidants glutathione and diphenyleneiodonium ( $p < 0.05$ ). These antioxidants also reversed the RA-induced inhibition of the secretion and synthesis of IGF-I and cell viability to control levels ( $p < 0.05$ ). The effects of suppressing IGF-I demonstrate that IGF-I plays a critical role in the RA-induced inhibition of the cell viability. These results indicate that the anticancer effects of RA are mediated by inhibition of the secretion and synthesis of IGF-I, and involve a PKC-delta-dependent mechanism, and they provide evidence of an interaction between PKC-delta and reactive oxygen species.

**Lo stress ossidativo nelle cellule MCF-7 è coinvolto negli effetti dell'attivazione da parte dell'acido retinoico della proteina chinasi C-delta sulle secrezione e la sintesi del fattore di crescita insulino-simile I.**

E' noto che acido all-trans retinoico (RA) è un agente antitumorale utile nel cancro della mammella che agisce inducendo apoptosi e inibizione della crescita. fattore di crescita insulino-simile I (IGF-I) è anche conosciuto per essere un ormone della crescita che gioca un ruolo importante nella proliferazione cellulare e apoptosi. Abbiamo esaminato le relazioni tra RA-indotta della proteina chinasi C (PKC)-delta, la secrezione e la sintesi di IGF-I, e lo stress ossidativo. RA a  $10^{-8}$  M e  $10^{-7}$  M aumentata fosforilazione PKC-delta (il rapporto tra fosforilato a totale PKC-delta) ( $p < 0,05$ ) e diminuisce la secrezione e la sintesi di IGF-I ( $p < 0,05$ ) rispetto al controllo, con un picco per gli effetti del trattamento con  $10^{-7}$  M RA per 72 ore. Il silenziamento di PKC-delta impedito l'inibizione RA-indotta della secrezione e la sintesi di IGF-I e la vitalità cellulare ( $p < 0,05$ ). Applicazione di  $10^{-7}$  M di RA 72h aumentato il livello di sostanze tiobarbiturico-acido-reattiva e l'espressione di ossido nitrico sintasi inducibile rispetto ai controlli ( $p < 0,05$ ). Questi aumenti sono stati bloccati da sopprimere PKC-delta e dal pretrattamento con il glutatione antiossidanti e diphenyleneiodonium ( $p < 0,05$ ). Questi antiossidanti invertito anche l'inibizione RA-indotta della secrezione e la sintesi di IGF-I e la vitalità delle cellule per controllare i livelli ( $p < 0,05$ ). Gli effetti della soppressione di IGF-I dimostrare che l'IGF-I svolge un ruolo critico nella zona di indotto l'inibizione della vitalità cellulare. Questi risultati indicano che gli effetti antitumorali di RA sono mediati dalla inibizione della secrezione e la sintesi di IGF-I, e soggetta a un meccanismo PKC-delta-dipendente, e non diano prova di una interazione tra le specie di ossigeno PKC-delta e reattiva.

322: Wang A, Alimova IN, Luo P, Jong A, Triche TJ, Wu L.

**Loss of CAK phosphorylation of RAR{alpha} mediates transcriptional control of retinoid-induced cancer cell differentiation.**

FASEB J. 2010 Mar;24(3):833-43.Epub 2009 Nov 16. PubMed PMID: 19917671; PubMed Central PMCID: PMC2830139.

Although the role of the classic retinoic acid (RA)-induced genomic pathway in cancer cell differentiation is well recognized, the underlying mechanisms remain to be dissected. Retinoic acid receptor alpha (RARalpha) is a transcription factor activated by RA, and its serine 77 (RARalphaS77) is the main residue phosphorylated by the cyclin-dependent kinase (CDK)-activating kinase (CAK) complex. We report here that in both human myeloid leukemia and mouse embryonic teratocarcinoma stem cells, either RA-suppressed CAK phosphorylation of RARalpha or mutation of RARalphaS77 to alanine (RARalphaS77A) coordinates CAK-dependent G(1) arrest with cancer cell differentiation by transactivating RA-target genes. Both hypophosphorylated RARalpha and RARalphaS77A reduce binding to retinoic acid-responsive elements (RARE) in the promoters of RA-target genes while stimulating gene transcription. The enhanced transactivation and reduced RARalpha-chromatin interaction are accompanied by RARalpha dissociation from the transcriptional repressor N-CoR and are association with the coactivator NCoA-3. Such effects of decreased CAK phosphorylation of RARalphaS77 on mediating RA-dependent transcriptional control of cancer cell differentiation are examined correspondingly in both RA-resistant myeloid leukemia and embryonic teratocarcinoma stem RARalpha(-/-) cells. These studies demonstrate, for the first time, that RA couples G(1) arrest to transcriptional control of cancer cell differentiation by suppressing CAK phosphorylation of RARalpha to release transcriptional repression.-Wang, A., Alimova, I. N., Luo, P. Jong, A., Triche, T. J., Wu, L. Loss of CAK phosphorylation of RARalpha mediates transcriptional control of retinoid-induced cancer cell differentiation.

**La perdita di fosforilazione CAK di RAR {alfa} media il controllo trascrizionale di differenziazione di cellule del cancro indotto dall'acido retinoico.**

Anche se il ruolo del classico acido retinoico (RA)-indotta via genomica nella differenziazione di cellule di cancro è ampiamente riconosciuto, i meccanismi alla base devono ancora essere sezionato. L'acido retinoico alfa recettori (RARalpha) è un fattore di trascrizione attivato da RA, e il suo serina 77 (RARalphaS77) è il principale residuo fosforilato dalle chinasi ciclina-dipendente (CDK)-attivazione di chinasi (CAK) complesse. Segnaliamo qui che in entrambi leucemia mieloide umana e teratocarcinoma cellule staminali embrionali di topo, sia soppresso RA-fosforilazione di CAK RARalpha o mutazione di RARalphaS77 di alanina (RARalphaS77A) coordina CAK-dipendente G (1) arresto con la differenziazione di cellule di cancro da transactivating RA- geni bersaglio. Sia ipofosforilata RARalpha e RARalphaS77A vincolante per ridurre l'acido retinoico elementi-reattiva (RARE) nei promotori dei geni bersaglio RA pur stimolando la trascrizione del gene. La transattivazione migliorata e ridotta interazione RARalpha-cromatina sono accompagnati da dissociazione RARalpha dal repressore trascrizionale di N-CoR e sono di associazione con l'coattivatore NCoA-3. Tali effetti di diminuzione della fosforilazione CAK RARalphaS77 sulla mediazione RA-dipendente il controllo trascrizionale del differenziamento di cellule di cancro sono esaminati di conseguenza sia in leucemia mieloide RA-resistenti e staminali embrionali teratocarcinoma RARalpha cellule (-/-). Questi studi dimostrano, per la prima volta, che le coppie RA G (1) arresto per il controllo trascrizionale del differenziamento di cellule di cancro sopprimendo fosforilazione CAK di RARalpha di rilasciare trascrizionale repression.-Wang, A., Alimova, IN, Luo, P. Jong , A., Triche, TJ, Wu, L. Perdita di fosforilazione CAK di RARalpha mediare il controllo trascrizionale di differenziazione del cancro indotta dai retinoidi cella.

326: Murakami M, Ito H, Hagiwara K, Yoshida K, Sobue S, Ichihara M, Takagi A, Kojima T, Tanaka K, Tamiya-Koizumi K, Kyogashima M, Suzuki M, Banno Y, Nozawa Y, Murate T.

**ATRA inhibits ceramide kinase transcription in a human neuroblastoma cell line, SH-SY5Y cells: the role of COUP-TFI.**

J Neurochem. 2010Jan;112(2):511-20. Epub 2009 Nov 7. PubMed PMID: 19903244.

Ceramide is the central lipid in the sphingolipid metabolism. Ceramide kinase (CERK) and its product, ceramide 1-phosphate, have been implicated in various cellular functions. However, the regulatory mechanism of CERK gene expression remains to be determined. Here, we examined CERK mRNA level during all-trans retinoic acid (ATRA)-induced differentiation of a human neuroblastoma cell line, SH-SY5Y. ATRA reduced CERK mRNA and protein levels. Over-expression and small interfering RNA (siRNA) of CERK revealed that CERK is inhibitory against ATRA-induced neuronal differentiation and cell growth arrest. ATRA inhibited the transcriptional activity of 5'-promoter of CERK. Truncation and mutation study suggests that ATRA-responsible region was mainly located in the tandem retinoic acid responsive elements (RARE) between -40 bp and the first exon. The electrophoresis mobility shift assay revealed that ATRA produced two retarded bands, which were erased by antibody against chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor I (COUP-TFI), RARalpha, and RXRalpha, respectively. DNA pull-down assay confirmed increased binding of these transcription factors to RARE. Transient expression of RAR, RXR, and COUP-TFI and siRNA transfection of these genes revealed that COUP-TFI inhibited CERK mRNA. Furthermore, chromatin immunoprecipitation assay showed the recruitment of co-repressors as well as three transcription factors. These results suggest that COUP-TFI was the ATRA-responsive suppressive transcription factor of CERK gene transcription.

**ATRA inibisce la trascrizione ceramide chinasi in una linea cellulare umana di neuroblastoma, SH-SY5Y: il ruolo della COUP-TFI.**

Ceramide è la centrale di lipidi nel metabolismo degli sfingolipidi. Ceramide chinasi (CERK) e del suo prodotto, ceramide 1-fosfato, sono stati coinvolti in varie funzioni cellulari. Tuttavia, il meccanismo di regolazione dell'espressione genica CERK rimane da stabilire. Qui, abbiamo esaminato CERK livelli di mRNA durante tutto-trans retinoico (ATRA) indotta da una differenziazione di una linea cellulare umana di neuroblastoma, SH-SY5Y. ATRA ridotto CERK mRNA e proteine. Over-espressione e piccoli RNA interferenti (siRNA) di CERK rivelato che CERK è inibitorio contro ATRA-indotta differenziazione neuronale e arresto della crescita delle cellule. ATRA inibisce l'attività trascrizionale di 5'-promotore della CERK. Troncamento studio suggerisce che la mutazione e regione ATRA-responsabile è stata localizzata soprattutto negli elementi di acido retinoico tandem reattiva (RARE) fra -40 bp e il primo esone. La mobilità saggio di elettroforesi turno rivelato che ATRA prodotto due bande di ritardo, che sono stati cancellati da anticorpi contro il fattore di trascrizione a monte ovoalbumina promotore pollo I (COUP-TFI), RARalpha, e RXRalpha, rispettivamente. DNA di pull-down assay confermato un aumento di legame di questi fattori di trascrizione ai rari. Espressione transitoria di RAR, RXR, COUP-TFI e trasfezione di siRNA e di questi geni ha rivelato che COUP-TFI inibito CERK mRNA. Inoltre, test di immunoprecipitazione della cromatina ha mostrato l'assunzione di co-repressori e tre fattori di trascrizione. Questi risultati suggeriscono che COUP-TFI è stato il fattore ATRA-reattiva trascrizione soppressiva di trascrizione del gene CERK.

328: Jenab M, Salvini S, van Gils CH, Brustad M, Shakya-Shrestha S, Buijsse B, Verhagen H, Touvier M, Biessy C, Wallström P, Bouckaert K, Lund E, Waaseth M, Roswall N, Joensen AM, Linseisen J, Boeing H, Vasilopoulou E, Dilis V, Sieri S, Sacerdote C, Ferrari P, Manjer J, Nilsson S, Welch AA, Travis R, Boutron-Ruault MC, Niravong M, Bueno-de-Mesquita HB, van der Schouw YT, Tormo MJ, Barricarte A, Riboli E, Bingham S, Slimani N.

**Dietary intakes of retinol, beta-carotene, vitamin D and vitamin E in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition cohort.**

Eur J Clin Nutr. 2009 Nov;63 Suppl 4:S150-78. PubMed PMID:19888271.

**OBJECTIVES:** To describe the intake of the fat-soluble nutrients retinol, beta-carotene, vitamin E and vitamin D and their food sources among 27 redefined centres in 10 countries participating in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study.

**METHODS:** Between 1995 and 2000, 36,034 subjects (age range: 35-74 years) completed a single standardized 24-h dietary recall using a computerized interview software program (EPIC-SOFT). Intakes of the fat-soluble nutrients were estimated using the standardized EPIC Nutrient Database.

**RESULTS:** For all the nutrients, in most centres, men had a higher level of intake than did women, even after adjustments for total energy intake and anthropometric confounders. Distinct regional gradients from northern to southern European countries were observed for all nutrients. The level intake of beta-carotene and vitamin E also showed some differences by level of education, smoking status and physical activity. No meaningful differences in the nutrient intake were observed by age range.

**CONCLUSIONS:** These results show differences by study centre, gender, age and various lifestyle variables in the intake of retinol, beta-carotene, vitamin E and vitamin D between 10 European countries.

**Assunzione di retinolo, beta-carotene, vitamina D e vitamina E nella dieta: studio prospettico europeo sul cancro di coorte e la Nutrizione.**

**OBIETTIVI:** Per per descrivere l'apporto dei nutrienti liposolubili retinolo, beta-carotene, vitamina E e vitamina D e le loro fonti di cibo tra i 27 centri ridefinito in 10 paesi che partecipano alla Studio prospettico europeo sul cancro e nutrizione (EPIC) di studio.

**METODI:** Tra il 1995 e il 2000, 36.034 soggetti (età: 35-74 anni) ha completato un unico standardizzato nelle 24-h dietetici utilizzando un programma software informatici dell'intervista (EPIC-SOFT). L'assunzione di sostanze nutrienti liposolubili sono stati stimati utilizzando il standardizzato EPIC nutrienti database.

**RISULTATI:** Per tutti i nutrienti, nella maggior parte dei centri, gli uomini avevano un più alto livello di assunzione di fatto le donne, anche dopo gli aggiustamenti per l'assunzione totale di energia e di fattori confondenti antropometrici. Gradienti distinti regionali dal nord al sud i paesi europei sono stati osservati per tutte le sostanze nutritive. Il livello di assunzione di beta-carotene e la vitamina E ha anche mostrato alcune differenze per livello di istruzione, abitudine al fumo e attività fisica. Nessuna differenza significativa nella assunzione di nutrienti sono stati osservati per fasce di età.

**CONCLUSIONI:** Questi risultati mostrano differenze da centro di studio, sesso, età e le variabili in diversi stili di vita per l'assunzione di retinolo, beta-carotene, vitamina E e vitamina D tra 10 paesi europei.

333: Orellano EA, Rivera OJ, Chevres M, Chorna NE, González FA.

**Inhibition of neuronal cell death after retinoic acid-induced down-regulation of P2X7 nucleotide receptor expression.**

Mol Cell Biochem. 2010 Apr;337(1-2):83-99. Epub2009 Nov 1. PubMed PMID: 19882109.

Apoptosis is a major mechanism for cell death in the nervous system during development. P2X(7) nucleotide receptors are ionotropic ATP receptors that mediate cell death under pathological conditions. We developed an in vitro protocol to investigate the expression and functional responses of P2X(7) nucleotide receptors during retinoic acid (RA)-induced neuronal differentiation of human SH-SY5Y neuroblastoma cells. Neuronal differentiation was examined measuring cellular growth arrest and neuritic processes elongation. We found that SH-SY5Y cells treated for 5 days with RA under low serum content exhibited a neuron-like phenotype with neurites extending more than twice the length of the cell body and cell growth arrest. Concurrently, we detected the abolishment of intracellular-free calcium mobilization and the down-regulation of P2X(7) nucleotide receptor protein expression that protected differentiated cells from neuronal cell death and reduced caspase-3 cleavage-induced by P2X(7) nucleotide receptor agonist. The role of P2X(7) nucleotide receptors in neuronal death was established by selectively antagonizing the receptor with KN-62 prior to its activation. We assessed the involvement of protein kinases and found that p38 signaling was activated in undifferentiated after nucleotide stimulation, but abolished by the differentiating RA pretreatment. Importantly, P2X(7) receptor-induced caspase-3 cleavage was blocked by the p38 protein kinase specific inhibitor PD169316. Taken together, our results suggest that RA treatment of human SH-SY5Y cells leads to decreased P2X(7) nucleotide receptor protein expression thus protecting differentiated cells from extracellular nucleotide-induced neuronal death, and p38 signaling pathway is critically involved in this protection of RA-differentiated cells.

**Inibizione della morte delle cellule neuronali dopo la regolazione negativa dell'espressione del recettore nucleotidico di P2X7 indotta dall'acido retinoico**

L'apoptosi è un importante meccanismo di morte cellulare nel sistema nervoso durante lo sviluppo. P2X (7) sono recettori ionotropici nucleotide ATP recettori che mediano la morte delle cellule in condizioni patologiche. Abbiamo sviluppato un protocollo in vitro per studiare l'espressione e le risposte funzionali di P2X (7) recettori nucleotidici durante l'acido retinoico (RA)-indotta la differenziazione neuronale di cellule umane di neuroblastoma SH-SY5Y. differenziamento neuronale è stata esaminata la misura di arresto della crescita cellulare e neuritiche allungamento dei processi. Abbiamo trovato che le cellule SH-SY5Y trattate per 5 giorni con RA sotto siero a basso contenuto esibito un fenotipo simil-neurone con neuriti di estensione superiore a due volte la lunghezza del corpo cellulare e arresto della crescita delle cellule. Contemporaneamente, abbiamo rilevato l'abolizione della mobilitazione del calcio intracellulare-free e la down-regulation dei P2X (7) l'espressione della proteina recettore nucleotide che proteggeva le cellule differenziate da morte delle cellule neuronali e ridotto caspasi-3 scissione indotta da P2X (7) agonista del recettore nucleotide . Il ruolo di P2X (7) recettori nucleotide nella morte neuronale è stata istituita dal selettivamente antagonista del recettore con KN-62 prima della sua attivazione. Abbiamo valutato il coinvolgimento della proteina chinasi e ha scoperto che p38 segnalazione è stata attivata nel indifferenziato dopo la stimolazione dei nucleotidi, ma abolita dal pretrattamento differenziando RA. È importante sottolineare che P2X (7) recettore indotta caspasi-3 scissione è stata bloccata dalla proteina p38, inibitore della chinasi PD169316 specifici. Nel loro insieme, i nostri risultati suggeriscono che il trattamento di cellule umane RA SH-SY5Y conduce alla diminuzione P2X (7) l'espressione della proteina recettore nucleotide proteggendo così le cellule differenziate da nucleotide extracellulare indotta morte neuronale, e p38 via di segnalazione è criticamente coinvolta in questa tutela della RA -cellule differenziate.

336: Kusakabe M, Watanabe K, Emoto N, Aki N, Kage H, Nagase T, Nakajima J, Yatomi Y, Ohishi N, Takai D.

**Impact of DNA demethylation of the G0S2 gene on the transcription of G0S2 in squamous lung cancer cell lines with or without nuclear receptor agonists.**

Biochem Biophys Res Commun. 2009 Dec 25;390(4):1283-7. Epub2009 Oct 28. PubMed PMID: 19878646.

We recently identified that DNA methylation of the G0S2 gene was significantly more frequent in squamous lung cancer than in non-squamous lung cancer. However, the significance of G0S2 methylation levels on cancer cells is not yet known. We investigated the effect of G0S2 methylation levels on cell growth, mRNA expression, and chromatin structure using squamous lung cancer cell lines and normal human bronchial epithelial cells. DNA methylation and mRNA expression of G0S2 were inversely correlated, and in one of the squamous lung cancer cell lines, LC-1 sq, G0S2 was completely methylated and suppressed. Overexpression of G0S2 in LC-1 sq did not show growth arrest or apoptosis. The G0S2 gene has been reported to be a target gene of all-trans retinoic acid and peroxisome proliferator-activated receptor agonists. We treated LC-1 sq with 5-Aza-2'-deoxycytidine, Trichostatin A, all-trans retinoic acid, Wy 14643, or Pioglitazone either alone or in combination. Only 5-Aza-2'-deoxycytidine restored mRNA expression of G0S2. Chromatin immunoprecipitation revealed that histone H3 lysine 9 was methylated regardless of DNA methylation or mRNA expression. In summary, mRNA expression of G0S2 was regulated mainly by DNA methylation in squamous lung cancer cell lines. When the G0S2 gene was methylated, nuclear receptor agonists could not restore mRNA expression of G0S2 and did not show any additive effect on mRNA expression of G0S2 even after the treatment with 5-Aza-2'-deoxycytidine.

**Impatto della demetilazione del DNA del gene G0S2 sulla trascrizione di G0S2 nelle linee cellulari squamose di polmone con o senza agonisti dei recettori nucleari**

Abbiamo recentemente identificato che la metilazione del DNA del gene G0S2 era significativamente più frequente nel carcinoma squamoso polmonare che nel cancro del polmone non-squamoso. Tuttavia, l'importanza dei livelli di metilazione G0S2 sulle cellule di cancro non è ancora noto. Abbiamo studiato l'effetto dei livelli di metilazione G0S2 sulla crescita cellulare, l'espressione di mRNA, e la struttura della cromatina mediante squamose del polmone linee di cellule tumorali e normali cellule epiteliali bronchiali umane. metilazione del DNA e l'espressione di mRNA di G0S2 erano inversamente correlati, e in una delle linee di cellule di cancro squamoso polmonare, LC-1 mq, G0S2 è stato completamente denaturato e soppressa. Sovraespressione di G0S2 in LC-1 sq non ha mostrato un arresto della crescita o apoptosi. Il gene G0S2 è stato segnalato per essere un gene target di acido all-trans retinoico e agonisti dei recettori peroxisome proliferator-activated. Abbiamo trattato LC-1 mq con 5-Aza-2'-deossicitidina, tricostatina A, acido all-trans retinoico, Wy 14.643, Pioglitazone o da soli o in combinazione. Solo 5-Aza-2'-deossicitidina espressione di mRNA restaurato G0S2. immunoprecipitazione della cromatina ha rivelato che istone H3 lisina 9 è stato metilato, indipendentemente della metilazione del DNA o di espressione di mRNA. In sintesi, l'espressione di mRNA di G0S2 era regolata principalmente dalla metilazione del DNA in linee di cellule di cancro squamoso polmonare. Quando il gene è stato G0S2 metilato, agonisti del recettore nucleare non possa ripristinare l'espressione di mRNA di G0S2 e non ha mostrato alcun effetto additivo sulla espressione di mRNA di G0S2 anche dopo il trattamento con 5-Aza-2'-deossicitidina.

338: Feng L, Hernandez RE, Waxman JS, Yelon D, Moens CB.

**Dhrs3a regulates retinoic acid biosynthesis through a feedback inhibition mechanism.**

Dev Biol.2010 Feb 1;338(1):1-14. Epub 2009 Oct 27. PubMed PMID: 19874812; PubMed Central PMCID: PMC2858591.

Retinoic acid (RA) is an important developmental signaling molecule responsible for the patterning of multiple vertebrate tissues. RA is also a potent teratogen, causing multi-organ birth defects in humans. Endogenous RA levels must therefore be tightly controlled in the developing embryo. We used a microarray approach to identify genes that function as negative feedback regulators of retinoic acid signaling. We screened for genes expressed in early somite-stage embryos that respond oppositely to treatment with RA versus RA antagonists and validated them by RNA in situ hybridization. Focusing on genes known to be involved in RA metabolism, we determined that *dhrs3a*, which encodes a member of the short-chain dehydrogenase/reductase protein family, is both RA dependent and strongly RA inducible. *Dhrs3a* is known to catalyze the reduction of the RA precursor all-trans retinaldehyde to vitamin A; however, a developmental function has not been demonstrated. Using morpholino knockdown and mRNA over-expression, we demonstrate that *Dhrs3a* is required to limit RA levels in the embryo, primarily within the central nervous system. *Dhrs3a* is thus an RA-induced feedback inhibitor of RA biosynthesis. We conclude that retinaldehyde availability is an important level at which RA biosynthesis is regulated in vertebrate embryos.

**Dhrs3a regola la biosintesi dell'acido retinoico tramite un meccanismo a feedback di inibizione**

L'acido retinoico (RA) è un'importante molecola di segnalazione di sviluppo responsabile del patterning di molteplici tessuti vertebrati. RA è anche una potente sostanza cancerogena, provocando difetti di nascita multi-organo nell'uomo. Livelli endogeni di RA deve quindi essere strettamente controllati negli embrioni. Abbiamo usato un approccio di microarray per identificare i geni che fungono da regolatori feedback negativo di acido retinoico segnalazione. Siamo sottoposti a screening per geni espressi nei primi embrioni somite fasi che rispondono in modo opposto al trattamento con antagonisti versus RA RA e convalidato loro RNA ibridazione in situ. Concentrandosi sui geni noti per essere coinvolti nel metabolismo RA, abbiamo determinato che *dhrs3a*, che codifica per un membro della deidrogenasi a catena corta / proteine della famiglia reductasi, è sia dipendente e fortemente inducibile RA RA. *Dhrs3a* è in grado di catalizzare la riduzione del precursore RA retinaldehyde tutto trans alla vitamina A, comunque, in funzione dello sviluppo non è stata dimostrata. Utilizzando atterramento morpholino e sovra-espressione di mRNA, dimostriamo che *Dhrs3a* è tenuto a limitare i livelli RA nell'embrione, soprattutto all'interno del sistema nervoso centrale. *Dhrs3a* è pertanto un inibitore feedback RA indotto della biosintesi RA. Concludiamo che la disponibilità retinaldehyde è un importante livello a cui è regolata la biosintesi RA negli embrioni dei vertebrati.

354: Epping MT, Meijer LA, Bos JL, Bernards R.

**UNC45A confers resistance to histone deacetylase inhibitors and retinoic acid.**

Mol Cancer Res. 2009Nov;7(11):1861-70. Epub 2009 Oct 20. PubMed PMID: 19843631.

To identify potential biomarkers of therapy response, we have previously done a large-scale gain-of-function genetic screen to identify genes whose expression confers resistance to histone deacetylase inhibitors (HDACi). This genetic screen identified two genes with a role in retinoic acid signaling, suggesting that HDACi target retinoic acid signaling as part of their anticancer effect. We study here a third gene identified in this genetic screen, UNC45A, and assess its role in retinoic acid signaling and responses to HDACi using cell-based proliferation and differentiation assays and transcriptional reporter gene assays. The vertebrate Unc45 genes are known for their roles in muscle development and the assembly and cochaperoning of the muscle motor protein myosin. Here, we report that human UNC45A (GCUNC45) can render transformed cells resistant to treatment with HDACi. We show that UNC45A also inhibits signaling through the retinoic acid receptor alpha. Expression of UNC45A inhibits retinoic acid-induced proliferation arrest and differentiation of human neuroblastoma cells and inhibits the induction of endogenous retinoic acid receptor target genes. These data establish an unexpected role for UNC45A in causing resistance to both HDACi drugs and retinoic acid. Moreover, our data lend further support to the notion that HDACi exert their anticancer effect, at least in part, through an effect on retinoic acid signaling.

**UNC45A conferisce resistenza agli inibitori della deacetilasi degli istoni e all'acido retinoico.**

Per identificare potenziali biomarcatori della risposta alla terapia, abbiamo fatto in precedenza screening genetico su larga scala guadagno di funzione di identificare i geni la cui espressione conferisce resistenza agli inibitori della deacetilasi degli istoni (HDACi). Questo schermo genetico ha identificato due geni con un ruolo in acido retinoico segnalazione, suggerendo che l'acido retinoico obiettivo HDACi segnalazione come parte del loro effetto antitumorale. Studiamo qui un terzo gene identificato in questa schermata genetico, UNC45A, e valutare il suo ruolo in acido retinoico di segnalazione e le risposte alle HDACi utilizzando la proliferazione cellulare basato su analisi e test di differenziazione e di trascrizione del gene reporter. I geni Unc45 vertebrati sono noti per il loro ruolo nello sviluppo muscolare e il montaggio e cochaperoning della miosina proteine muscolari del motore. Qui, segnaliamo che umano UNC45A (GCUNC45) può rendere trasformato cellule resistenti al trattamento con HDACi. Abbiamo dimostrato che anche UNC45A inibisce il segnale attraverso il recettore dell'acido retinoico alfa. Espressione di UNC45A retinoico inibisce la proliferazione indotta arresto e la differenziazione delle cellule di neuroblastoma umano ed inibisce l'induzione di geni endogeni di acido retinoico recettore bersaglio. Questi dati istituire un ruolo inaspettato per UNC45A nel causare resistenza ai farmaci, sia HDACi e acido retinoico. Inoltre, i nostri dati di prestare un ulteriore sostegno all'idea che HDACi esercitano il loro effetto antitumorale, almeno in parte, con un effetto sui acido retinoico segnalazione.

356: Komi Y, Sogabe Y, Ishibashi N, Sato Y, Moriwaki H, Shimokado K, Kojima S.

**Acyclic retinoid inhibits angiogenesis by suppressing the MAPK pathway.**

LabInvest. 2010 Jan;90(1):52-60. Epub 2009 Oct 19. PubMed PMID: 19841617.

Acyclic retinoid (ACR) is currently under clinical trial as an agent to suppress the recurrence of hepatocellular carcinoma (HCC) through its ability to induce apoptosis in premature HCC cells. ACR has an anticancer effect in vivo as well, although it shows weak apoptosis-inducing activity against mature HCC cells, suggesting the existence of an additional action mechanism. In this study, we investigated the antiangiogenic activity of ACR. ACR inhibited angiogenesis within chicken chorioallantoic membrane (CAM) in as similar a manner as all-trans retinoic acid (atRA). Although suppression of angiogenesis by atRA was partially rescued by the simultaneous addition of angiopoietin-1, suppression of angiogenesis by ACR was not rescued under the same condition at all. Conversely, although suppression of angiogenesis by ACR was partially inverted by the simultaneous addition of vascular endothelial growth factor (VEGF), suppression of angiogenesis by atRA was not affected under the same condition. These results suggested that mechanisms underlying the suppression of angiogenesis by ACR and atRA were different. ACR selectively inhibited the phosphorylation of VEGF receptor 2 (VEGFR2) and of extracellular signal-regulated kinase (ERK) without changing their protein expression levels, and inhibited endothelial cell growth, migration, and tube formation. The inhibition of the phosphorylation of ERK, endothelial growth, migration, tube formation, and angiogenesis by ACR was rescued by the overexpression of constitutively active mitogen-activated protein kinase (MAPK). Finally, ACR, but not atRA, inhibited HCC-induced angiogenesis in a xenografted CAM model. These results delineate the novel activity of ACR as an antiangiogenic through a strong inhibition of the VEGFR2 MAPK pathway.

**L'acido retinoico aciclico inibisce l'angiogenesi tramite la soppressione della via di segnale MAPK.**

I retinoidi aciclici (ACR) è attualmente in sperimentazione clinica come agente per sopprimere la recidiva di carcinoma epatocellulare (HCC), attraverso la sua capacità di indurre l'apoptosi in cellule di HCC precoce. ACR ha un effetto antitumorale in vivo pure, ma che dimostra capacità di indurre l'apoptosi debole attività nei confronti di cellule mature HCC, suggerendo l'esistenza di un meccanismo di ulteriori interventi. In questo studio, abbiamo studiato l'attività antiangiogenica di ACR. ACR inibito l'angiogenesi all'interno di pollo membrana corionallantoidea (CAM) in maniera più simile all-trans retinoico (ATRA). Anche se la soppressione di angiogenesi da ATRA è stato parzialmente salvato con l'aggiunta simultanea di angiopoietina-1, la soppressione della angiogenesi ACR non è stato liberato nelle stesse condizioni a tutti. Al contrario, anche se la soppressione di angiogenesi ACR è stata parzialmente invertito mediante l'aggiunta simultanea di fattore di crescita vascolare endoteliale (VEGF), la soppressione della angiogenesi atRA non è stato interessato alle stesse condizioni. Questi risultati suggeriscono che i meccanismi alla base della soppressione della angiogenesi ACR e atRA erano diverse. ACR selettivamente inibito la fosforilazione del recettore VEGF 2 (VEGFR2) e di extracellulare signal-regulated chinasi (ERK) senza modificare i loro livelli di espressione della proteina, ed hanno inibito la crescita delle cellule endoteliali, la migrazione e la formazione del tubo. L'inibizione della fosforilazione di ERK, di crescita endoteliale, l'immigrazione, la formazione del tubo, e l'angiogenesi ACR è stata salvata dalla sovraespressione di costitutivamente attiva mitogeno-attivata della proteina chinasi (MAPK). Infine, ACR, ma non atRA, inibito HCC-angiogenesi indotta in un modello CAM xenotrapiantati. Questi risultati delineano l'attività romanzo di ACR come antiangiogenic attraverso una forte inibizione del pathway VEGFR2 MAPK.

361: Jung JK, Park SH, Jang KL.

**Hepatitis B virus X protein overcomes the growth-inhibitory potential of retinoic acid by downregulating retinoic acid receptor-beta2 expression via DNA methylation.**

J Gen Virol. 2010 Feb;91(Pt2):493-500. Epub 2009 Oct 14. PubMed PMID: 19828754.

Aberrant promoter methylation of retinoic acid receptor-beta(2) (RAR-beta(2)) is frequently detected in hepatitis B virus (HBV)-positive hepatocellular carcinoma (HCC); however, the mechanism of methylation and its biological significance are unknown. This study showed that HBx, the principal oncogene product of HBV, induced promoter hypermethylation of RAR-beta(2) via upregulation of DNA methyltransferases 1 and 3a, resulting in downregulation of its expression in human HCC cells. In addition, HBx abolished the potential of retinoic acid (RA) to downregulate levels of G(1)-checkpoint regulators including p16, p21 and p27, resulting in activation of E2F1 in the presence of RA. As a consequence, HBx-expressing cells were less susceptible to RA-induced cell growth inhibition compared with control cells. These effects almost completely disappeared when levels of RAR-beta(2) in HBx-expressing cells were restored by treatment with a universal DNA methylation inhibitor, 5-aza-2'-deoxycytidine. As RAR-beta(2) is a major executor of the anti-tumour potential of RA, its epigenetic downregulation by HBx is likely to be an important step during HBV-mediated tumorigenesis.

**La proteina X del virus dell'epatite B sfugge al potenziale inibitorio sulla crescita dell'acido retinoico regolando negativamente l'espressione del recettore beta2 dell'acido retinoico tramite la metilazione del DNA**

Promotore metilazione aberrante del recettore dell'acido retinoico-beta (2) (RAR-beta (2)) è spesso rilevato in virus dell'epatite B (HBV) carcinoma positivi epatocellulare (HCC), tuttavia, il meccanismo di metilazione e il suo significato biologico sono sconosciuti . Questo studio ha dimostrato che HBX, il prodotto principale oncogene di HBV, ipermetilazione del promotore indotta di RAR-beta (2) via sovraregolazione di DNA metiltransferasi 1 e 3 bis, con conseguente down-regulation della sua espressione in cellule di HCC. Inoltre, HBX abolito il potenziale di acido retinoico (RA) per downregulate livelli di G (1)-regolatori checkpoint tra cui p16, p21 e p27, con conseguente attivazione di E2F1 in presenza di artrite reumatoide. Di conseguenza, HBX che esprimono le cellule sono state meno soggette a RA-inibizione della crescita cellulare indotta rispetto alle cellule di controllo. Questi effetti quasi completamente scomparso quando i livelli di RAR-beta (2) in HBX cellule che esprimono sono stati restaurati dal trattamento con un inibitore della metilazione del DNA universale, 5-aza-2'-deossicitidina. Come RAR-beta (2) è un esecutore principale del potenziale anti-tumorale di RA, il suo downregulation epigenetico di HBX è probabile che sia un passo importante durante la tumorigenesi HBV-mediata.

363: Garcia-Ramírez M, Hernández C, Villarroel M, Canals F, Alonso MA, Fortuny R, Masmiquel L, Navarro A, García-Arumí J, Simó R.

**Interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP) is downregulated at early stages of diabetic retinopathy.**

Diabetologia. 2009 Dec;52(12):2633-41. Epub 2009 Oct 13. PubMedPMID: 19823802.

**AIMS/HYPOTHESIS:** Interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP) plays a major role in the visual cycle and is essential to the maintenance of photoreceptors. The aim of this study was to determine whether a decrease in IRBP production exists in the early stages of diabetic retinopathy.

**METHODS:** Vitreous samples from diabetic patients with proliferative and non-proliferative diabetic retinopathy (PDR, NPDR), and from non-diabetic patients with macular hole (control group) were selected for IRBP quantitative assessment by proteomic analysis (fluorescence-based difference gel electrophoresis) and western blot. Human post mortem eyes (n = 16) from diabetic donors without clinically detectable retinopathy and from non-diabetic donors (n = 16) were used to determine IRBP (also known as RBP3) mRNA levels (RT-PCR) and protein content (western blot and confocal microscopy). Retinal neurodegeneration was assessed by measuring glial fibrillar acidic protein (GFAP) and the apoptotic rate. Y79 human retinoblastoma cells were used to test the effects of glucose, TNF-alpha and IL-1beta on IRBP expression and IRBP levels.

**RESULTS:** Intravitreal IRBP concentration was significantly lower in PDR < NPDR < control in proteomic and western blot analysis. IRBP mRNA levels and IRBP protein content were significantly lower in the retinas from diabetic donors than in those from non-diabetic donors. Increased GFAP and a higher degree of apoptosis were observed in diabetic retinas compared with non-diabetic retinas. A dose-dependent downregulation of IRBP mRNA expression and IRBP content was detected with glucose, TNF-alpha and IL-1beta in cultures of Y79 human retinoblastoma cells.

**CONCLUSIONS/INTERPRETATION:** Underproduction of IRBP is an early event in the human diabetic retina and is associated with retinal neurodegeneration. The mechanisms leading to this deficit deserve further investigation.

**Nella retinopatia diabetica in stadio iniziale la proteina legata all'interfotorecettore retinoide è regolata negativamente**

**AIMS / IPOTESI:** proteina Interphotoreceptor retinoidi vincolanti (IRBP) svolge un ruolo fondamentale nel ciclo della visione ed è essenziale per il mantenimento dei fotorecettori. Lo scopo di questo studio era di determinare se un calo della produzione IRBP esiste nelle fasi iniziali della retinopatia diabetica.

**METODI:** I campioni del vitreo di pazienti diabetici con proliferativa e non retinopatia diabetica proliferante (PDR, NPDR), e da pazienti non-diabetici con foro maculare (gruppo di controllo) sono stati selezionati per la valutazione quantitativa IRBP mediante analisi proteomica (fluorescenza a base di gel elettroforesi differenza ) e western blot. Human occhi post mortem (n = 16) da donatori senza retinopatia diabetica clinicamente rilevabili e da donatori non-diabetici (n = 16) sono stati utilizzati per determinare IRBP (noto anche come RBP3) i livelli di mRNA (RT-PCR) e di proteine (western macchia e microscopia confocale). neurodegenerazione retinica è stata valutata attraverso la misurazione della proteina gliale fibrillare acida (GFAP) e il tasso di apoptosi. cellule di retinoblastoma umano Y79 sono stati utilizzati per testare gli effetti del glucosio, TNF-alfa e di IL-1beta sull'espressione IRBP e livelli IRBP.

**RISULTATI:** intravitreali concentrazione IRBP era significativamente inferiore nel controllo PDR <NPDR <in analisi proteomica e macchia occidentale. IRBP livelli di mRNA e di proteine IRBP erano significativamente più bassi nella retina da donatori diabetici che in quelli da donatori non-diabetici. Aumento GFAP e un maggior grado di apoptosi sono stati osservati in retine diabetici

rispetto ai non diabetici retine. Un down-regulation dose-dipendente di espressione di mRNA e contenuto IRBP IRBP è stata rilevata con glucosio, TNF-alfa e di IL-1beta in colture di cellule di retinoblastoma umano Y79. CONCLUSIONI / INTERPRETAZIONE: sottoproduzione di IRBP è un evento precoce nella retina umana diabetico ed è associata con neurodegenerazione retinica. I meccanismi che portano a questo deficit meritano ulteriori indagini.

365: Barnard JH, Collings JC, Whiting A, Przyborski SA, Marder TB.

#### **Synthetic retinoids: structure-activity relationships.**

Chemistry. 2009 Nov2;15(43):11430-42. PubMed PMID: 19821467.

Retinoid signalling pathways are involved in numerous processes in cells, particularly those mediating differentiation and apoptosis. The endogenous ligands that bind to the retinoid receptors, namely all-trans-retinoic acid (ATRA) and 9-cis-retinoic acid, are prone to double-bond isomerisation and to oxidation by metabolic enzymes, which can have significant and deleterious effects on their activities and selectivities. Many of these problems can be overcome through the use of synthetic retinoids, which are often much more stable, as well as being more active. Modification of their molecular structures can result in retinoids that act as antagonists, rather than agonists, or exhibit a large degree of selectivity for particular retinoid-receptor isotypes. Several such selective retinoids are likely to be of value as pharmaceutical agents with reduced toxicities, particularly in cancer therapy, as reagents for controlling cell differentiation, and as tools for elucidating the precise roles that specific retinoid signalling pathways play within cells.

#### **Retinoidi sintetici: rapporto funzione-struttura.**

Vie di segnalazione dei retinoidi sono coinvolti in numerosi processi nelle cellule, in particolare quelle di mediazione differenziazione e apoptosi. I ligandi endogeni che si legano ai recettori dei retinoidi, cioè l'acido all-trans retinoico (ATRA) e di acido 9-cis-retinoico, sono inclini a isomerizzazione del doppio legame e all'ossidazione di enzimi metabolici, che possono avere effetti significativi e deleteri sulla le loro attività e selettività. Molti di questi problemi possono essere superati attraverso l'uso di retinoidi sintetici, che sono spesso molto più stabile, oltre ad essere più attivo. Modifica delle loro strutture molecolari può portare a retinoidi che agiscono come antagonisti, agonisti e non, o presentano un elevato grado di selettività per particolari isotipi retinoidi-recettore. Diversi retinoidi selettivi quali sono suscettibili di essere di valore come agenti farmaceutici con tossicità ridotta, soprattutto nella terapia del cancro, come reagenti per la differenziazione delle cellule di controllo, e come strumenti per chiarire il ruolo preciso che specifiche vie di segnalazione dei retinoidi svolgono all'interno delle cellule.

**Vitamin D endocrine system and psoriasis vulgaris--review of the literature.**

ActaDermatovenerol Croat. 2009;17(3):187-92. Review. PubMed PMID: 19818218.

Vitamin D exerts its physiological functions on calcium and bone metabolism in humans through the active metabolite 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>(1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>). The other spectrum of vitamin D activities includes important effects on cellular proliferation, differentiation and the immune system. These effects are mediated through the intracellularly located vitamin D receptor (VDR). VDR is a member of the steroid, estrogen and retinoid receptor gene family of proteins that mediate transcriptional activities of the respective ligands. The VDR complex binds in the nucleus to the vitamin D responsive element on the gene. Several polymorphisms of the vitamin D receptor (VDR) gene have been described including FokI in exon 2, BsmI and ApaI in intron 8 and TaqI in exon 9. Alterations in vitamin D-1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> levels and polymorphisms of VDR gene have been shown to be associated with several malignant or autoimmune diseases such as sclerosis multiplex, breast cancer, diabetes mellitus, malignant melanoma, and psoriasis vulgaris. The effects of VDR gene polymorphisms including immunomodulation, stimulation of cellular differentiation and inhibition of proliferation make it a possible candidate for therapy of psoriasis as well as for the psoriasis gene modification. The objective of this article is to present the state-of-the-art in the VDR gene polymorphism research in psoriasis vulgaris.

**Review sul sistema endocrino della vitamina D e sulla psoriasi vulgaris.**

La vitamina D esercita le sue funzioni fisiologiche sul calcio e sul metabolismo osseo in esseri umani attraverso il metabolita attivo D<sub>3</sub> 1,25-diidrossivitamina (1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>). Lo spettro di altre attività della vitamina D include importanti effetti sulla proliferazione cellulare, differenziamento e il sistema immunitario. Questi effetti sono mediati attraverso il recettore della vitamina D si trova all'interno delle cellule (VDR). VDR è un membro di steroidi, gli estrogeni e retinoidi famiglia gene del recettore di proteine che mediano le attività trascrizionale dei rispettivi ligandi. La lega VDR complesso nel nucleo all'elemento vitamina D reattivo sul gene. Diversi polimorfismi del recettore della vitamina D (VDR) del gene sono state descritte anche FokI nell'esone 2, BSMI e APAI in introne 8 e TaqI nell'esone 9. Alterazioni della vitamina D-1, 25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> livelli e polimorfismi del gene VDR sono stati indicati per essere associati a diverse malattie maligne o autoimmuni come la sclerosi multipla, tumore al seno, diabete mellito, melanoma maligno, e psoriasi vulgaris. Gli effetti dei polimorfismi del gene VDR compresi immunomodulazione, la stimolazione della differenziazione cellulare e l'inibizione della proliferazione lo rendono un possibile candidato per la terapia della psoriasi così come per la modificazione genetica della psoriasi. L'obiettivo di questo articolo è quello di presentare lo stato dell'arte nella ricerca polimorfismo del gene VDR nella psoriasi vulgaris.

376: Syed Z, Cheepala SB, Gill JN, Stein J, Nathan C, Digiovanni J, Batra V, Adegboyega P, Kleiner HE, Clifford JL.

**All-trans retinoic acid suppresses Stat3 signaling during skin carcinogenesis.**

Cancer Prev Res (Phila). 2009Oct;2(10):903-11. Epub 2009 Sep 29. PubMed PMID: 19789299.

Squamous cell carcinoma (SCC) of the skin is the most clinically aggressive form of nonmelanoma skin cancer. We have determined the effects of all-trans retinoic acid (ATRA), a naturally occurring chemopreventive retinoid, on signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3) signaling during the development of skin SCC. Stat3 is a transcription factor that plays a critical role in cell proliferation and survival, and it is constitutively active in several malignant cell types. We have previously shown that Stat3 is required for the initiation, promotion, and progression of skin SCC. ATRA is a highly efficient suppressor of tumor formation in the two-stage mouse skin carcinogenesis model and we have shown that this effect correlates with the suppression of the B-Raf/Mek/Erk signaling pathway. In this study, we have determined the pattern of Stat3 phosphorylation throughout the course of the two-stage protocol, both in the presence and absence of ATRA. We have used both SENCAR mice and K5.Stat3C transgenic mice, which express the Stat3C protein, a constitutively active form of Stat3, in the skin. Using Western blotting and immunohistochemical staining with phosphospecific antibodies, we show that coadministration of ATRA suppressed the 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced phosphorylation of Stat3 in both models, but was only able to suppress tumor formation in the SENCAR mice. Surprisingly, ATRA actually enhanced tumor formation in 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-treated K5.Stat3C mice. We hypothesize that ATRA blocks tumor formation, at least in part, by targeting events upstream of Stat3, such as the B-Raf/Mek/Erk pathway, and that in the K5.Stat3C mice, in which Stat3 activity is constitutive, it cannot suppress tumor formation.

**L'acido retinoico tutto-trans sopprime il segnale di Stat3 durante la carcinogenesi della pelle.**

Il carcinoma a cellule squamose (SCC) della pelle è la forma più aggressiva di cancro clinicamente non-melanoma della pelle. Abbiamo determinato gli effetti di tutte le trans retinoico (ATRA), un retinoide naturale chemiopreventivi, sul trasduttore di segnale e attivatore della trascrizione 3 (Stat3) di segnalazione durante lo sviluppo di pelle SCC. Stat3 è un fattore di trascrizione che gioca un ruolo critico nella proliferazione cellulare e la sopravvivenza, ed è costitutivamente attivo in diversi tipi di cellule maligne. Abbiamo precedentemente dimostrato che Stat3 è richiesto per l'iniziazione, la promozione, e la progressione della pelle SCC. ATRA è un soppressore altamente efficiente di formazione del tumore nel modello a due fasi carcinogenesi mouse pelle e abbiamo dimostrato che questo effetto è correlato con la soppressione della via B-Raf/Mek/Erk segnalazione. In questo studio, abbiamo determinato il pattern di fosforilazione Stat3 durante tutto il corso del protocollo in due fasi, sia in presenza che in assenza di ATRA. Abbiamo usato sia SENCAR topi e topi K5.Stat3C transgenici, che esprimono la proteina Stat3C, una forma costitutivamente attiva di Stat3, nella pelle. Utilizzo di Western blotting e immunoistochimica con anticorpi phosphospecific, si dimostra che la somministrazione concomitante di ATRA soppresso il 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetato-fosforilazione di STAT3 indotta in entrambi i modelli, ma è stato solo in grado di sopprimere la formazione del tumore nei topi SENCAR. Sorprendentemente, ATRA effettivamente migliorato la formazione del tumore in 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetato-topi trattati K5.Stat3C. Ipotizziamo che ATRA tumore blocca la formazione, almeno in parte, prendendo di mira gli eventi a monte della Stat3, come ad esempio il percorso B-Raf/Mek/Erk, e che nei topi K5.Stat3C, in cui l'attività Stat3 è costitutivo, non si può sopprimere la formazione di tumori.

397: Weiss FU, Marques IJ, Woltering JM, Vlecken DH, Aghdassi A, Partecke LI, Heidecke CD, Lerch MM, Bagowski CP.

**Retinoic acid receptor antagonists inhibit miR-10a expression and block metastatic behavior of pancreatic cancer.**

Gastroenterology. 2009 Dec;137(6):2136-45.e1-7. Epub 2009 Sep 10. PubMed PMID:19747919.

**BACKGROUND & AIMS:** The infiltrating ductal adenocarcinoma of the pancreas is among the most lethal of all solid malignancies, largely owing to a high frequency of early metastasis. We identified microRNA-10a (miR-10a) as an important mediator of metastasis formation in pancreatic tumor cells and investigated the upstream and downstream regulatory mechanisms of miR-10a.

**METHODS:** Northern blot analysis revealed increased expression levels of miR-10a in metastatic pancreatic adenocarcinoma. The role of miR-10a was analyzed by Morpholino and short interfering RNA transfection of pancreatic carcinoma cell lines and resected specimens of human pancreatic carcinoma. Metastatic behavior of primary pancreatic tumors and cancer cell lines was tested in xenotransplantation experiments in zebrafish embryos.

**RESULTS:** We show that miR-10a expression promotes metastatic behavior of pancreatic tumor cells and that repression of miR-10a is sufficient to inhibit invasion and metastasis formation. We further show that miR-10a is a retinoid acid target and that retinoic acid receptor antagonists effectively repress miR-10a expression and completely block metastasis. This antimetastatic activity can be prevented by specific knockdown of HOX genes, HOXB1 and HOXB3. Interestingly, suppression of HOXB1 and HOXB3 in pancreatic cancer cells is sufficient to promote metastasis formation.

**CONCLUSIONS:** These findings suggest that miR-10a is a key mediator of metastatic behavior in pancreatic cancer, which regulates metastasis via suppression of HOXB1 and HOXB3. Inhibition of miR-10a expression (with retinoic acid receptor antagonists) or function (with specific inhibitors) is a promising starting point for antimetastatic therapies.

**Nel tumore al pancreas gli antagonisti del recettore dell'acido retinoico inibiscono l'espressione di miR-10a e bloccano lo sviluppo di metastasi.**

**CONTESTO ED OBIETTIVI:** L'adenocarcinoma duttale infiltrante del pancreas è tra le più letale di tutte le neoplasie solide, in gran parte a causa di un'alta frequenza di metastasi precoce. Abbiamo identificato microRNA-10a (miR-10a) come un importante mediatore della formazione di metastasi nelle cellule tumorali del pancreas e studiato i meccanismi di regolamentazione a monte ea valle di miR-10a.

**METODI:** Northern blot analisi ha rivelato un aumento dei livelli di espressione di miR-10a in adenocarcinoma pancreatico metastatico. Il ruolo di miR-10a è stato analizzato da Morpholino e breve RNA interferente trasfezione di linee cellulari di carcinoma pancreatico ed esemplari resecati di carcinoma pancreatico umano. comportamento metastatico dei tumori primitivi del pancreas e le linee di cellule di cancro è stato testato in esperimenti in xenotrapianti embrioni di zebrafish.

**RISULTATI:** Si dimostra che l'espressione di miR-10a favorisce un comportamento metastatico delle cellule tumorali pancreatiche e che la repressione di miR-10a è sufficiente a inibire la formazione di invasione e metastasi. Ci mostrano inoltre che miR-10a è un obiettivo che l'acido retinoico e acido retinoico antagonisti del recettore reprimere efficacemente espressione di miR-10a e bloccare completamente metastasi. Questa attività antimetastatica può essere evitato specifici atterramento di geni HOX, HOXB1 e HOXB3. È interessante notare che la soppressione delle cellule tumorali e HOXB1 HOXB3 nel pancreas è sufficiente per promuovere la formazione di metastasi.

**CONCLUSIONI:** Questi risultati suggeriscono che il miR-10a è un mediatore chiave del comportamento metastatico nel cancro del pancreas, che regola le metastasi attraverso la

soppressione di HOXB1 e HOXB3. L'inibizione dell'espressione del miR-10a (con antagonisti del recettore dell'acido retinoico) o la funzione (con gli inibitori specifici) è un punto di partenza promettente per le terapie antimetastatiche.

401: Nolting J, Daniel C, Reuter S, Stuelten C, Li P, Sucov H, Kim BG, Letterio JJ, Kretschmer K, Kim HJ, von Boehmer H.

**Retinoic acid can enhance conversion of naive into regulatory T cells independently of secreted cytokines.**

J Exp Med. 2009 Sep 28;206(10):2131-9. Epub 2009 Sep 8. PubMed PMID: 19737861; PubMed Central PMCID: PMC2757891.

It has been reported that retinoic acid (RA) enhances regulatory T (T reg) cell conversion by inhibiting the secretion of cytokines that interfere with conversion. This report shows that these conclusions provide a partial explanation at best. First, RA not only interfered with cytokine secretion but also with the ability of these cytokines to inhibit T reg cell conversion of naive T cells. Furthermore, RA enhanced conversion even in the absence of inhibitory cytokines. The latter effect depended on the RA receptor alpha (RAR alpha) but did not require Smad3, despite the fact that RA enhanced Smad3 expression. The RAR alpha 1 isoform was not essential for RA-dependent enhancement of transforming growth factor beta-driven conversion, suggesting that conversion can also be mediated by RAR alpha 2. Interleukin (IL)-6 strongly reduced RAR alpha expression levels such that a deficiency of the predominant RAR alpha 1 isoform leaves too little RAR alpha 2 for RA to inhibit the generation of Th17 cells in the presence of IL-6.

**L'acido retinoico è in grado di migliorare la conversione da cellule naïve a cellule T regolatorie indipendentemente dalle citochine**

È stato riportato che l'acido retinoico (RA) aumenta la conversione delle cellule T regolatorie (T reg) inibendo la secrezione di citochine che interferiscono con la conversione. Questo rapporto mostra che queste conclusioni forniscono una spiegazione parziale al meglio. In primo luogo, RA non solo interferisce con la secrezione di citochine, ma anche con la capacità di queste citochine di inibire la conversione delle cellule T reg di cellule T naïve. Inoltre, RA favorisce la conversione anche in assenza di citochine inibitorie. Quest'ultimo effetto dipendeva dalla RA recettore alfa (RAR alfa), ma non richiedeva Smad3, nonostante il fatto che il RA esprimeva un'attività migliore di Smad3. Il RAR alfa 1 isoforma non era essenziale per la valorizzazione RA-dipendente di trasformare il fattore di conversione di crescita beta-driven, suggerendo che la trasformazione può anche essere mediata da RAR alfa 2. Interleuchina (IL) -6 fortemente ridotto i livelli di espressione di RAR alfa tale che un difetto della predominante RAR alfa 1 isoforma foglie di RAR alfa troppo poco 2 per RA per inibire la generazione di cellule Th17 in presenza di IL-6.

404: Shankaranarayanan P, Rossin A, Khanwalkar H, Alvarez S, Alvarez R, Jacobson A, Nebbioso A, de Lera AR, Altucci L, Gronemeyer H.

**Growth factor-antagonized rexinoid apoptosis involves permissive PPARgamma/RXR heterodimers to activate the intrinsic death pathway by NO.**

Cancer Cell. 2009 Sep 8;16(3):220-31. PubMed PMID:19732722.

Growth factor (GF) deprivation and/or blocking of cognate signaling can induce apoptosis and is the basis of several cancer treatment paradigms. We observed that RXR agonists (rexinoids) induce apoptosis of tumor cells when GF support is abrogated. This "rexinoid apoptosis" involves activation of both iNOS and eNOS by RXR-PPARgamma and results in production of apoptogenic NO. IGF/EGF-induced IGF receptor 1-mediated MAP kinase blocks rexinoid apoptosis by RXR phosphorylation. Combining rexinoids with the MAPK inhibitor U0126 induced apoptosis in human cancer cells in vitro and ex vivo and blocked xenograft growth in vivo. Our results suggest a regulatory mechanism in which GF signaling antagonizes RXR-PPARgamma-mediated default apoptosis to sustain cell life.

**L'apoptosi del fattore di crescita antagonizzata dal rexinoide coinvolge gli eterodimeri PPARgamma/RXR permissivi all'attivazione della via di segnale apoptica intrinseca tramite NO.**

Fattore di crescita (GF) privazione e / o il blocco dei cognate segnalazione può indurre l'apoptosi ed è la base di paradigmi diversi trattamento del cancro. Abbiamo osservato che gli agonisti RXR (rexinoidi) inducono apoptosi delle cellule tumorali quando il supporto GF è abrogata. Questo "apoptosi rexinoid" implica l'attivazione di eNOS e iNOS sia da RXR-PPARgamma e risultati nella produzione di NO citotossici. IGF / EGF-indotta recettore IGF 1-mediata MAP chinasi rexinoid blocca l'apoptosi dalla fosforilazione RXR. Rexinoidi combinazione con l'inibitore della MAPK U0126 apoptosi indotta nelle cellule tumorali umane in vitro ed ex vivo e ha bloccato la crescita xenograft in vivo. I nostri risultati suggeriscono un meccanismo normativo in cui GF segnalazione antagonizza l'apoptosi default RXR-PPARgamma-mediata per sostenere la vita delle cellule.

406: Nagl F, Schönhofer K, Seidler B, Mages J, Allescher HD, Schmid RM, Schneider G, Saur D.

**Retinoic acid-induced nNOS expression depends on a novel PI3K/Akt/DAX1 pathway in human TGW-nu-I neuroblastoma cells.**

Am J Physiol Cell Physiol. 2009 Nov;297(5):C1146-56. Epub 2009 Sep 2. PubMed PMID: 19726747.

Neuronal nitric oxide synthase (nNOS)-derived nitric oxide (NO) acts as a neurotransmitter and intracellular signaling molecule in the central and peripheral nervous system. NO regulates multiple processes like neuronal development, plasticity, and differentiation and is a mediator of neurotoxicity. The nNOS gene is highly complex with 12 alternative first exons, exon 1a-1l, transcribed from distinct promoters, leading to nNOS variants with different 5'-untranslated regions. Transcriptional control of the nNOS gene is not understood in detail. To investigate regulation of nNOS gene expression by retinoic acid (RA), we used the human neuroblastoma cell line TGW-nu-I as a model system. We show that RA induces nNOS transcription in a protein synthesis-dependent fashion. We identify the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt signaling pathway and the atypical orphan nuclear receptor DAX1 (NR0B1) as critical mediators involved in RA-induced nNOS gene transcription. RA treatment increases DAX1 expression via PI3K/Akt signaling. Upregulation of DAX1 expression in turn induces nNOS transcription in response to RA. These results identify nNOS as a target gene of a novel RA/PI3K/Akt/DAX1-dependent pathway in human neuroblastoma cells and stress the functional importance of the transcriptional regulator DAX1 for nNOS gene expression in response to RA treatment.

**Nelle cellule di neuroblastoma umano TGW-nu-I l'espressione di nNOS indotta dall'acido retinoico dipende dalla nuova via di segnale PI3K/Akt/DAX1.**

Ossido nitrico sintasi neuronale (nNOS)-derivati di ossido nitrico (NO) agisce come neurotrasmettitore e la molecola di segnalazione intracellulare nel sistema nervoso centrale e periferico. NO regola più processi come lo sviluppo neuronale, la plasticità e la differenziazione ed è un mediatore di neurotossicità. Il gene nNOS è molto complesso con 12 esoni prima alternativa, 1a esone-1L, trascritto da parte di promotori distinti, portando a nNOS varianti con diverse regioni 5'-non tradotta. Controllo trascrizionale del gene nNOS non è capire in dettaglio. Per studiare regolazione dell'espressione genica nNOS da acido retinoico (RA), abbiamo utilizzato la linea cellulare umana di neuroblastoma TGW-nu-mi come sistema modello. Abbiamo dimostrato che RA induce nNOS trascrizione in un modo la sintesi proteica-dipendente. Identifichiamo la fosfatidilinositolo 3-chinasi (PI3K) / Akt via di segnalazione e la atipico recettore orfano nucleare DAX1 (NR0B1) in qualità di mediatori critici coinvolti nel RA-trascrizione indotto gene nNOS. Trattamento con RA aumenta DAX1 espressione PI3K/AKT via di segnalazione. Upregulation DAX1 di espressione a sua volta induce la trascrizione nNOS in risposta al RA. Questi risultati identificano nNOS come gene bersaglio di un percorso romanzo RA/PI3K/Akt/DAX1-dependent in cellule di neuroblastoma umano e sottolineano l'importanza funzionale del regolatore trascrizionale DAX1 per nNOS espressione genica in risposta al trattamento con RA.

407: Savickiene J, Treigyte G, Magnusson KE, Navakauskiene R.

**Response of retinoic acid-resistant KG1 cells to combination of retinoic acid with diverse histone deacetylase inhibitors.**

Ann N Y Acad Sci. 2009 Aug;1171:321-33. PubMedPMID: 19723072.

Acute promyelocytic leukemia KG1 cells with t(11;17) PLZF-RARalpha respond poorly to the differentiation inducer all-trans retinoic acid (RA), and the reason for the RA resistance is the recruitment of histone deacetylase by PLZF-RARalpha. Here, we demonstrate that histone deacetylase inhibitors (HDACIs), FK228, BML-210, phenyl butyrate, and vitamin B3, in different combinations with RA, act as KG1 cell growth inhibitors. Partial differentiation to granulocytes was induced by 3 micromol/L RA, and its combination with HDAC inhibitors did not enhance RA-induced but potentiated apoptosis. HDACIs induced accumulation of hyperacetylated histone H4. Chromatin immunoprecipitation analysis has revealed phenyl butyrate and its combinations with RA and vitamin B3 cause histone H4 acetylation in the p21 promoter regions corresponding to p53 and/or Sp1 sites. This was coincident with the activation of the transcription factor p53-binding activity to the p21 promoter in electrophoretic mobility shift assay. The results indicate the possibility of using the combination of agents for therapeutic strategy in RA-resistant acute myeloid leukemia to produce both differentiation and apoptosis.

**Risposta delle cellule KG1 resistenti all'acido retinoico con inibitori della deacetilasi di diversi istoni**

La leucemia acuta promielocitica KG1 cellule con t (11; 17) alfa PLZF-RAR rispondono poco al induttore di differenziazione tutto-trans retinoico (RA), e la ragione per la resistenza RA è l'assunzione di istone deacetilasi da PLZF-RARalpha. Qui, abbiamo dimostrato che gli inibitori delle istone deacetilasi (HDACIs), FK228, BML-210, butirrato fenile, e vitamina B3, in diverse combinazioni con RA, agiscono come inibitori della crescita delle cellule KG1. Differenziazione parziale di granulociti è stata indotta da 3 micromoli / L RA, e la sua combinazione con gli inibitori HDAC non aumentare RA-indotto, ma potenziato apoptosi. HDACIs indotta da accumulo di H4 hyperacetylated. Analisi di immunoprecipitazione della cromatina ha rivelato butirrato di fenile e le sue combinazioni con RA e vitamina B3 acetilazione dell'istone H4 causa nelle regioni del promotore p21 corrispondenti a p53 e / o Sp1 siti. Questa è stata coincidente con l'attivazione del fattore di trascrizione p53 attività vincolante per il promotore p21 nel test elettroforetica dello spostamento di mobilità. I risultati indicano la possibilità di utilizzare la combinazione di agenti per la strategia terapeutica in RA-resistenti leucemia mieloide acuta per produrre sia la differenziazione e l'apoptosi.

417: Patel P, Subhas G, Gupta A, Chang YJ, Mittal VK, McKendrick A.

**Oral vitamin A enhances the effectiveness of formalin 8% in treating chronic hemorrhagic radiation proctopathy.**

Dis Colon Rectum. 2009 Sep;52(9):1605-9. PubMed PMID:19690489.

**PURPOSE:** Chronic radiation proctopathy occurs in 5 to 20% of patients receiving radiation therapy, with rectal bleeding as its most common presentation. Although formalin treatment for rectal bleeding is promising, improvement is possible. Given the success of vitamin A in other radiation-induced treatments, we studied the efficacy of combining formalin with vitamin A in controlling bleeding symptoms of chronic radiation proctopathy.

**METHODS:** A retrospective review (1993-2007) was performed of patients presenting with features of chronic radiation proctopathy. Formalin 8% in a buffered solution was applied to the affected mucosa with use a tip applicator, and 10,000 units of vitamin A were given orally on a daily basis. Formalin treatments were repeated at three-week to four-week intervals until symptoms resolved.

**RESULTS:** A comparison was made between patients who received formalin alone (n = 30) and those who received formalin in combination with vitamin A (n = 34). The 64 patients had a mean age of 79 years (range, 54-90 years). The combination group required fewer treatments (mean, 1.9) and a shorter time (11 weeks) for resolution of symptoms compared with the formalin-alone group (mean, 5.2 and 31 weeks, respectively) (P < 0.001). The overall success rate in controlling bleeding was only 64% in the formalin-alone group when compared with 94% in the combination group.

**CONCLUSIONS:** When vitamin A was added to the regimen, a significant reduction was observed in the number of treatments and the time needed for resolution of symptoms, and there was an increased overall success rate. This combination represents a simple, effective, and well tolerated method of controlling hemorrhagic chronic radiation proctopathy.

**La vitamina A aumenta l'efficacia della formalina all'8% nel trattamento della proctopatia cronica emorragica da radiazioni.**

**SCOPO:** radiazione cronica proctopathy si verifica nel 5-20% dei pazienti sottoposti a radioterapia, con sanguinamento rettale, come la sua presentazione più comune. Sebbene il trattamento formalina per sanguinamento rettale è promettente, il miglioramento è possibile. Visto il successo di vitamina A in altri trattamenti di radiazione indotta, abbiamo studiato l'efficacia di formalina combinandosi con la vitamina A nel controllare i sintomi di sanguinamento proctopathy radiazione cronica.

**METODI:** Una rassegna retrospettiva (1993-2007) è stato effettuato dei pazienti che presentano con le caratteristiche della radiazione proctopathy cronica. Formalina 8% in una soluzione tamponata è stata applicata alla mucosa affetti da utilizzare un applicatore con la punta, e 10.000 unità di vitamina A sono stati somministrati per via orale su una base quotidiana. formalina trattamenti sono stati ripetuti ogni tre settimane per quattro settimane di intervallo fino a sintomi si sono risolti.

**RISULTATI:** stato effettuato un confronto tra i pazienti che hanno ricevuto formalina da solo (n = 30) e quelli che hanno ricevuto formalina in associazione con la vitamina A (n = 34). I 64 pazienti avevano un'età media di 79 anni (range 54-90 anni). Il gruppo di combinazione richiesta minor numero di trattamenti (media 1,9) e un tempo più breve (11 settimane) per la risoluzione dei sintomi rispetto al gruppo formalina-alone (media, 5.2 e 31 settimane, rispettivamente) (P <0,001). Il tasso di successo complessivo di sanguinamenti controllo è stato solo il 64% nel gruppo in formalina solo se confrontato con il 94% nel gruppo di combinazione.

**CONCLUSIONI:** Quando la vitamina A è stato aggiunto al regime, una riduzione significativa è stata osservata nel numero di trattamenti e il tempo necessario per la risoluzione dei sintomi, e vi era un aumento del tasso di successo complessivo. Questa combinazione rappresenta un metodo

semplice, efficace e ben tollerata di controllo emorragica proctopathy croniche radiazioni.

419: Chen S, Wang K, Wan YJ.

#### **Retinoids activate RXR/CAR-mediated pathway and induce CYP3A.**

Biochem Pharmacol. 2010 Jan 15;79(2):270-6. Epub 2009 Aug 15. PubMed PMID: 19686701; PubMed Central PMCID: PMC2784018.

Retinoids and carotenoids are frequently used as antioxidants to prevent cancer. In this study, a panel of retinoids and carotenoids was examined to determine their effects on activation of RXR/CAR-mediated pathway and regulation of CYP3A gene expression. Transient transfection assays of HepG2 cells revealed that five out of thirteen studied retinoids significantly induced RXRalpha/CAR-mediated activation of luciferase activity that is driven by the thymidine kinase promoter linked with a PXR binding site in the CYP3A4 gene [tk-(3A4)(3)-Luc reporter]. All-trans retinoic acid (RA) and 9-cis RA were more effective than CAR agonist TCBOPOP in induction of the tk-(3A4)(3)-Luc reporter. Addition of retinoid and TCBOPOP further enhanced the inducibility and the induction was preferentially mediated by RXRalpha/CAR and RXRgamma/CAR heterodimer. Chromatin immunoprecipitation assay showed that retinoids recruit RXRalpha and CAR to the proximal ER6 and distal XREM nuclear receptor response elements of the CYP3A4 gene promoter. The experimental data demonstrate that retinoids can effectively regulate CYP3A gene expression through the RXR/CAR-mediated pathway.

#### **I retinodi attivano la via di segnale mediata da RXR/CAR e inducono CYP3A.**

I retinoidi e di carotenoidi sono spesso utilizzati come antiossidanti per prevenire il cancro. In questo studio, un gruppo di retinoidi e di carotenoidi è stato esaminato per determinare gli effetti sulla attivazione di RXR / via CAR-mediata e la regolazione dell'espressione genica CYP3A. Saggi di trasfezione transiente di cellule HepG2 ha rivelato che cinque dei tredici retinoidi studiato in modo significativo indotto RXRalpha / attivazione CAR-mediata delle attività luciferasi che è guidata dal promotore della timidina chinasi legata con un sito PXR vincolante nel gene CYP3A4 [TK-(3A4) (3) reporter]-Luc. Acido all-trans retinoico (RA) e 9-cis RA sono più efficaci di agonista TCBOPOP CAR induzione del reporter TK-(3A4) (3)-Luc. L'aggiunta di retinoidi e TCBOPOP ulteriormente rafforzato l'inducibilità e l'induzione era preferenzialmente mediata da RXRalpha / CAR e RXRgamma / eterodimero CAR. Saggio di immunoprecipitazione della cromatina ha dimostrato che i retinoidi reclutare RXRalpha e auto alla ER6 prossimale e distale XREM recettore nucleare elementi di risposta del promotore del gene CYP3A4. I dati sperimentali dimostrano che i retinoidi possono effettivamente regolare l'espressione genica attraverso il CYP3A RXR / via CAR-mediata.

**Retinoids and proliferative verrucous leukoplakia (PVL). A preliminary study.**

Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2010 Jan 1;15(1):e3-9. PubMedPMID: 19680182.

**OBJECTIVE:** A study is made of the efficacy and adverse effects of retinoid therapy applied to the white lesions of proliferative verrucous leukoplakia (PVL).

**MATERIAL AND METHODS:** The results of retinoid therapy were evaluated in 17 patients diagnosed with PVL. Topical retinoids were used in 5 patients, in the form of two daily applications of 0.1% 13-cis-retinoic acid in orabase for an average of 6.17+/-3.13 months. Systemic retinoids were used in 11 patients, with the administration of 25 mg/day of acitretin in tablet form for an average of 5.41+/-2.02 months. One patient successively received the topical and systemic retinoid formulations. The course and results were evaluated on a blind basis by two investigators. The adverse effects of the medication were also assessed.

**RESULTS:** Clinical improvement was recorded for 7 lesions (38.8%) (six involving systemic treatment and one as a result of topical application). Clinical worsening was recorded in the same proportion (5 lesions with systemic therapy and two with topical treatment), while four lesions (22.4%) showed no changes (one lesion with systemic therapy and three with topical treatment). Adverse effects were documented in all the patients administered the systemic formulation, versus in only one patient administered topical retinoids. The most frequent problems were desquamation and pruritus.

**CONCLUSION:** Although topical or systemic retinoic acid produces some improvement in about one-third of all patients with PVL, further studies are needed to assess the efficacy and safety of these products, in view of the important percentage of individuals who worsen despite therapy, and the frequent appearance of adverse effects.

**I retinoidi e la leucoplachia verrucosa proliferativa (PVL). Uno studio preliminare**

**OBIETTIVO:** Uno studio è fatto di efficacia e gli effetti avversi della terapia con retinoidi applicata alle lesioni proliferative bianco di leucoplachia verrucosa (PVL).

**MATERIALI E METODI:** I risultati della terapia con retinoidi sono stati valutati in 17 pazienti con diagnosi di PVL. retinoidi topici sono stati utilizzati in 5 pazienti, sotto forma di due applicazioni giornaliere di 0,1% di acido 13-cis-retinoico in orabase per una media di 6,17 + / -3,13 mesi. retinoidi sistemici sono stati utilizzati in 11 pazienti, con la somministrazione di 25 mg / die di Acitretina in forma di pastiglie per una media di 5,41 + / -2,02 mesi. Un paziente ha successivamente ricevuto la formulazioni topiche e sistemiche retinoidi. Il corso ed i risultati sono stati valutati "alla cieca" da due investigatori. Gli effetti negativi del farmaco sono stati valutati.

**RISULTATI:** Il miglioramento clinico è stato registrato per 7 lesioni (38,8%) (sei un trattamento sistemico che coinvolge e uno a seguito di applicazione topica). Peggioramento clinico è stato registrato nella stessa proporzione (5 lesioni con la terapia sistemica e due con trattamento topico), mentre quattro lesioni (22,4%) non hanno mostrato variazioni (una lesione con terapia sistemica e tre con il trattamento topico). Gli effetti avversi sono stati documentati in tutti i pazienti trattati con la formulazione sistemica, in contrapposizione a un solo paziente somministrato retinoidi topici. I problemi più frequenti sono state desquamazione e prurito.

**CONCLUSIONE:** Anche se per uso topico o sistemico acido retinoico produce qualche miglioramento in circa un terzo di tutti i pazienti con PVL, sono necessari ulteriori studi per valutare l'efficacia e la sicurezza di questi prodotti, in considerazione della percentuale importante di persone che worsen nonostante la terapia, e la frequente comparsa di effetti avversi.

428: Chen X, Welner RS, Kincade PW.

**A possible contribution of retinoids to regulation of fetal B lymphopoiesis.**

Eur J Immunol. 2009 Sep;39(9):2515-24.PubMed PMID: 19662635; PubMed Central PMCID: PMC2787240.

We recently found that all trans retinoic acid (ATRA) accelerated B lymphocyte formation. In the current study, we address the question whether retinoids account for the rapid lymphopoiesis that is characteristic of fetal progenitors. Surprisingly, addition of ATRA to fetal liver cultures actually reduced B lymphopoiesis. A pan-retinoid receptor antagonist selectively suppressed lymphocyte formation from fetal and adult progenitors, suggesting some normal contribution of retinoids to this process. Consistent with this role, B lymphopoiesis was compromised in the marrow of mice with prolonged vitamin A deficiency. Recently identified B1 progenitors from adult marrow were similar to adult B2 progenitors in that their differentiation was stimulated by ATRA. The inhibitory response observed with fetal cells was seen when adult progenitors were exposed to high doses in culture or when adult mice were treated with ATRA for 2 wk. In addition to explosive lymphocyte generation, fetal progenitors tend to be less IL-7 dependent than their adult counterparts, but ATRA did not make fetal progenitors IL-7 independent. We conclude that all known categories of B lineage progenitors are responsive to retinoids and probably regulated by these compounds under physiological conditions. Retinoids may account in part for rapid differentiation in fetal life, but not all unique features of fetal progenitors.

**Un possibile contributo di retinoidi alla regolazione fetale della linfopoiesi B.**

Abbiamo recentemente scoperto che tutti i trans retinoico (ATRA) ha accelerato la formazione di linfociti B. In questo studio, abbiamo esaminato la questione se retinoidi considerazione per il linfopoiesi rapido che è caratteristico di cellule progenitrici fetali. Sorprendentemente, l'aggiunta di ATRA a culture fegato fetale effettivamente ridotto linfopoiesi B. Un antagonista del recettore pan-retinoide selettivo di formazione dei linfociti soppressa da cellule progenitrici fetali ed adulti, suggerendo qualche contributo normale dei retinoidi a questo processo. Coerentemente con questo ruolo, linfopoiesi B è stata compromessa nel midollo di topi con la vitamina Una carenza prolungata. Recentemente identificato B1 progenitrici del midollo adulto sono stati simili a progenitori B2 adulti nella loro differenziazione che è stato stimolato da ATRA. La risposta di inibizione osservato con cellule fetali si è visto quando progenitori degli adulti sono stati esposti ad alte dosi di cultura o quando topi adulti sono stati trattati con ATRA per 2 sett. Oltre alla produzione di linfociti esplosivo, progenitori fetale tendono ad essere meno IL-7 dipendenti rispetto ai loro colleghi adulti, ma non ha fatto ATRA fetale progenitori IL-7 indipendenti. Concludiamo che tutte le categorie conosciute di progenitori lignaggio B sono sensibili ai retinoidi e probabilmente regolata da questi composti in condizioni fisiologiche. I retinoidi possono spiegare in parte la differenziazione rapida nella vita fetale, ma non tutte le caratteristiche uniche di progenitori fetale.

431: Ahn EH, Chang CC, Talmage DA.

**Loss of anti-proliferative effect of all-trans retinoic acid in advanced stage of breast carcinogenesis.**

Anticancer Res. 2009Aug;29(8):2899-904. PubMed PMID: 19661293.

**BACKGROUND:** Mechanisms by which the inhibitory effect of retinoic acid on tumor growth is attenuated as tumors progress to more advanced stages are unclear.

**MATERIALS AND METHODS:** This study utilizes a novel cell culture system of human breast epithelial cells (HBEC). Immortal (M13SV1), weakly tumorigenic (M13SV1-R2), and highly tumorigenic (M13SV1-R2N1) transformed Type I HBEC were derived sequentially from the same parental Type I HBEC (stem cells) developed from reduction mammoplasty of healthy women. Effects of all-trans retinoic acid (AT-RA) on the growth, protein expression of RAR-alpha, beta and gamma, and RARE transcriptional activation were determined. Results and

**CONCLUSION:** AT-RA reduces proliferation rates of immortal and weakly tumorigenic cells, but not highly tumorigenic cells. This loss of response of highly tumorigenic cells to AT-RA is associated with overexpression of p185(c-erbB2/neu). It is not associated with decreased RAR-alpha, beta or gamma expression, or activation by AT-RA; RAR-alpha, beta and gamma are expressed and AT-RA increases RARE transcriptional activity in all cell lines tested in this study.

**Perdita dell'effetto antiproliferativo dell'acido tutto-trans-retinoico nella carcinogenesi mammaria in stadio avanzato.**

**BACKGROUND:** meccanismi per cui l'effetto inibitorio dell'acido retinoico sulla crescita del tumore è attenuato come progresso tumori a stadi più avanzati non sono chiari.

**MATERIALI E METODI:** Lo studio utilizza un cellulare nuovo sistema coltura delle cellule epiteliali mammarie umane (HBEC). Immortal (M13SV1), debolmente oncogeno (M13SV1-R2), ed altamente cancerogeno (M13SV1-R2N1) sono trasformati HBEC di tipo I sono stati ricavati in sequenza dal parentale stesso tipo I HBEC (cellule staminali), sviluppato da mastoplastica riduttiva delle donne sane. Effetti di all-trans retinoico (AT-RA) sulla crescita, espressione di proteine di RAR-alfa, beta e gamma, e l'attivazione RARE trascrizionale sono stati determinati. Risultati e

**CONCLUSIONE:** AT-RA riduce il tasso di proliferazione delle cellule tumorali immortale e debolmente, ma non cellule altamente cancerogeni. Questa perdita di risposta delle cellule tumorali altamente di AT-RA è associata con iperespressione di P185 (c-erbB2/neu). Non è associato con una diminuzione di RAR-alfa, beta o gamma di espressione, o l'attivazione di AT-RA; RAR-alfa, beta e gamma sono espressi e aumenta AT-RA RARE attività trascrizionale in tutte le linee cellulari testate in questo studio.

437: Bonofiglio D, Cione E, Qi H, Pingitore A, Perri M, Catalano S, Vizza D, Panno ML, Genchi G, Fuqua SA, Andò S.

**Combined low doses of PPARgamma and RXR ligands trigger an intrinsic apoptotic pathway in human breast cancer cells.**

Am J Pathol. 2009 Sep;175(3):1270-80. Epub 2009 Jul 30. PubMed PMID: 19644018; PubMed Central PMCID: PMC2731145.

Ligand activation of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)gamma and retinoid X receptor (RXR) induces antitumor effects in cancer. We evaluated the ability of combined treatment with nanomolar levels of the PPARgamma ligand rosiglitazone (BRL) and the RXR ligand 9-cis-retinoic acid (9RA) to promote antiproliferative effects in breast cancer cells. BRL and 9RA in combination strongly inhibit cell viability in MCF-7, MCF-7TR1, SKBR-3, and T-47D breast cancer cells, whereas MCF-10 normal breast epithelial cells are unaffected. In MCF-7 cells, combined treatment with BRL and 9RA up-regulated mRNA and protein levels of both the tumor suppressor p53 and its effector p21(WAF1/Cip1). Functional experiments indicate that the nuclear factor-kappaB site in the p53 promoter is required for the transcriptional response to BRL plus 9RA. We observed that the intrinsic apoptotic pathway in MCF-7 cells displays an ordered sequence of events, including disruption of mitochondrial membrane potential, release of cytochrome c, strong caspase 9 activation, and, finally, DNA fragmentation. An expression vector for p53 antisense abrogated the biological effect of both ligands, which implicates involvement of p53 in PPARgamma/RXR-dependent activity in all of the human breast malignant cell lines tested. Taken together, our results suggest that multidrug regimens including a combination of PPARgamma and RXR ligands may provide a therapeutic advantage in breast cancer treatment.

**Bassi dosi di PPARgamma e ligandi di RXR innescano una via di segnalazione apoptica intrinseca nelle cellule umane con tumore mammario.**

Attivazione di Ligand peroxisome proliferator-activated recettore (PPAR) gamma e recettore retinoide X (RXR) induce effetti antitumorali nel cancro. Abbiamo valutato la capacità di trattamento combinato con i livelli nanomolari del rosiglitazone ligando PPARgamma (BRL) e l'RXR ligando acido 9-cis-retinoico (9RA) per promuovere effetti antiproliferativi in cellule di cancro al seno. BRL e 9RA in combinazione con forza di inibire la vitalità cellulare in MCF-7, MCF-7TR1, SKBR-3 e T-47D cellule di cancro al seno, mentre MCF-10 cellule epiteliali mammarie normali sono inalterati. In cellule MCF-7, il trattamento combinato con BRL e 9RA mRNA up-regolato e livelli della proteina p53 sia del tumore-soppressore p21 e la sua effetttrici (WAF1/CIP1). Funzionale esperimenti indicano che il sito nucleare di fattore-kappaB nel promotore di p53 è necessario per la risposta trascrizionale a BRL più 9RA. Abbiamo osservato che la via intrinseca apoptotici in cellule MCF-7 mostra una sequenza coordinata di eventi, comprese le perturbazioni del potenziale della membrana mitocondriale, il rilascio di citocromo c, forte caspasi 9 attivazione e, infine, la frammentazione del DNA. Un vettore di espressione per p53 antisense abrogata l'effetto biologico di entrambi i ligandi, che implica il coinvolgimento di p53 in PPARgamma / attività RXR-dipendente in tutte le linee cellulari umane di seno maligno testati. Presi insieme, i nostri risultati suggeriscono che i regimi più farmaci con una combinazione di PPAR-gamma e RXR ligandi può fornire un vantaggio terapeutico nel trattamento del carcinoma mammario.

449: Epplein M, Shvetsov YB, Wilkens LR, Franke AA, Cooney RV, Le Marchand L, Henderson BE, Kolonel LN, Goodman MT.

**Plasma carotenoids, retinol, and tocopherols and postmenopausal breast cancer risk in the Multiethnic Cohort Study: a nested case-control study.**

Breast Cancer Res. 2009;11(4):R49. Epub 2009 Jul 20. PubMed PMID: 19619335; PubMed Central PMCID: PMC2750110.

**INTRODUCTION:** Assessments by the handful of prospective studies of the association of serum antioxidants and breast cancer risk have yielded inconsistent results. This multiethnic nested case-control study sought to examine the association of plasma carotenoids, retinol, and tocopherols with postmenopausal breast cancer risk.

**METHODS:** From the biospecimen subcohort of the Multiethnic Cohort Study, 286 incident postmenopausal breast cancer cases were matched to 535 controls on age, sex, ethnicity, study location (Hawaii or California), smoking status, date/time of collection and hours of fasting. We measured prediagnostic circulating levels of individual carotenoids, retinol, and tocopherols. Conditional logistic regression was used to compute odds ratios and 95% confidence intervals.

**RESULTS:** Women with breast cancer tended to have lower levels of plasma carotenoids and tocopherols than matched controls, but the differences were not large or statistically significant and the trends were not monotonic. No association was seen with retinol. A sensitivity analysis excluding cases diagnosed within 1 year after blood draw did not alter the findings.

**CONCLUSIONS:** The lack of significant associations in this multiethnic population is consistent with previously observed results from less racially-diverse cohorts and serves as further evidence against a causal link between plasma micronutrient concentrations and postmenopausal breast cancer risk.

**I carotenoidi del plasma, il retinolo, e i tocoferoli e rischio di cancro al seno postmenopausale in uno studio di coorte multi-etnico: uno studio caso-controllo.**

**INTRODUZIONE:** le valutazioni del pugno di studi prospettici della associazione di antiossidanti nel siero e rischio di cancro al seno hanno dato risultati contraddittori. Questo multi-etnica studio nested caso-controllo ha cercato di esaminare l'associazione di carotenoidi nel plasma, retinolo e tocoferoli in post-menopausa con rischio di cancro al seno.

**METODI:** Dal subcohort biospecimen della coorte multi-etnica di studio, 286 incidenti in post-menopausa casi di cancro al seno sono stati abbinati a 535 controlli su età, sesso, etnia, luogo di studio (Hawaii o in California), abitudine al fumo, data / ora di raccolta e le ore di digiuno . Abbiamo misurato prediagnostici livelli circolanti di carotenoidi individuale, retinolo e tocoferoli. Regressione logistica condizionale è stato utilizzato per calcolare gli odds ratio e intervalli di confidenza al 95%.

**RISULTATI:** Le donne con cancro al seno tendevano ad avere più bassi livelli plasmatici di carotenoidi e tocoferoli di controlli appaiati, ma le differenze non sono grandi o statisticamente significativi e le tendenze non sono stati monotona. Nessuna associazione è stata osservata con retinolo. Un'analisi di sensibilità esclusi i casi diagnosticati entro 1 anno dopo il prelievo di sangue non ha modificato i risultati.

**CONCLUSIONI:** La mancanza di associazioni significative in questa popolazione multi-etnica è coerente con i risultati precedentemente osservati da meno coorti razzialmente diversi e serve come ulteriore prova nei confronti di un nesso di causalità tra le concentrazioni plasmatiche di micronutrienti e post-menopausa il rischio di cancro al seno.

453: Krcmová L, Urbánek L, Solichová D, Kasparová M, Vlcková H, Melichar B, Sobotka L, Solich P.

**HPLC method for simultaneous determination of retinoids and tocopherols in human serum for monitoring of anticancer therapy.**

J Sep Sci. 2009 Aug;32(15-16):2804-11. PubMed PMID: 19606446.

A simple and rapid HPLC method requiring small volumes (250 microL) of human serum after C18 SPE sample preparation was developed using monolithic technology for simultaneous determination of all-trans-retinoic acid, 13-cis-retinoic acid, retinol, gamma- and alpha-tocopherol. The monolithic column, Chromolith Performance RP-18e (100x4.6 mm), was operated at ambient temperature. The mobile phase consisted of a mixture of acetonitrile (ACN) and 1% ammonium acetate in water (AMC) at pH 7.0. The mobile phase started at 98:2 (v/v) ACN/AMC (column pre-treatment) at a flow rate of 2 mL/min, then changed to 95:5 (v/v) ACN/AMC for 4 min at a flow rate of 1.5 mL/min and a further 3 min at a flow rate of 3.2 mL/min. Detection and identification were performed using a photodiode array detector. Retinol, 13-cis- and all-trans-retinoic acid were monitored at 325 nm. Both alpha- and gamma-tocopherol were detected at 295 nm. The total analysis time was 7.2 min. Tocol (synthesized tocopherol, not occurring in humans) was used as internal standard. The method was linear in the range of 0.125-10.00 micromol/L for all-trans-retinoic acid, 0.125-5.00 micromol/L for 13-cis-retinoic acid, 0.25-10.00 micromol/L for retinol, 0.5-50.00 micromol/L for gamma-tocopherol, and 0.5-50.00 micromol/L for alpha-tocopherol. The present method may be useful for monitoring of retinoids and tocopherols in clinical studies.

**Metodo HPLC per la determinazione simultanea dei retinoidi e dei tocoferoli nel siero umano per il monitoraggio della terapia antitumorale.**

Un metodo semplice e rapido HPLC richiedono piccoli volumi (250 microL) di siero umano, dopo la preparazione del campione SPE C18 è stata sviluppata utilizzando la tecnologia monolitica per la determinazione simultanea di acido all-trans retinoico, acido 13-cis-retinoico, retinolo, alfa e gamma--tocoferolo. La colonna monolitica, Chromolith Performance RP-18e (100x4.6 mm), è stato operato a temperatura ambiente. La fase mobile costituita da una miscela di acetonitrile (ACN) e acetato di ammonio 1% in acqua (AMC) a pH 7.0. La fase mobile iniziato a 98:2 (v / v) ACN / AMC (colonna di pre-trattamento), con un flusso di 2 ml / min, poi cambiato in 95:5 (v / v) ACN / AMC per 4 min a una portata di 1,5 ml / min e di un ulteriore 3 min con un flusso di 3,2 mL / min. Rilevazione e l'identificazione sono stati eseguiti utilizzando un rivelatore fotodiode array. Retinolo, 13-cis-e tutto-trans retinoico sono stati monitorati a 325 nm. Sia alfa e gamma-tocoferolo sono stati rilevati a 295 nm. Il tempo di analisi totale è stato di 7.2 min. Tocollo (tocoferolo di sintesi, non riscontrabili nell'uomo) è stato utilizzato come standard interno. Il metodo è stato lineare nel range di,125-10,00 micromol / L per l'acido all-trans retinoico, 0,125-5,00 micromol / L per l'acido 13-cis-retinoico, 0,25-10,00 micromol / L per il retinolo, 0,5-50,00 micromol / L per il gamma-tocoferolo, e 0,5-50,00 micromol / L per l'alfa-tocoferolo. Il presente metodo può essere utile per il monitoraggio dei retinoidi e tocoferoli negli studi clinici.

466: Hua S, Kittler R, White KP.

**Genomic antagonism between retinoic acid and estrogen signaling in breast cancer.**

Cell. 2009 Jun 26;137(7):1259-71. PubMedPMID: 19563758.

Retinoic acid (RA) triggers antiproliferative effects in tumor cells, and therefore RA and its synthetic analogs have great potential as anticarcinogenic agents. Retinoic acid receptors (RARs) mediate RA effects by directly regulating gene expression. To define the genetic network regulated by RARs in breast cancer, we identified RAR genomic targets using chromatin immunoprecipitation and expression analysis. We found that RAR binding throughout the genome is highly coincident with estrogen receptor alpha (ERalpha) binding, resulting in a widespread crosstalk of RA and estrogen signaling to antagonistically regulate breast cancer-associated genes. ERalpha- and RAR-binding sites appear to be coevolved on a large scale throughout the human genome, often resulting in competitive binding activity at nearby or overlapping cis-regulatory elements. The highly coordinated intersection between these two critical nuclear hormone receptor signaling pathways provides a global mechanism for balancing gene expression output via local regulatory interactions dispersed throughout the genome.

**Antagonismo genomico tra l'acido retinoico e il segnale degli estrogeni nel cancro al seno.**

L'acido retinoico (RA) innesca effetti antiproliferativi in cellule tumorali, e, pertanto, RA e dei suoi analoghi sintetici hanno un grande potenziale come agenti antitumorali. Recettori dell'acido retinoico (RAR) mediano gli effetti RA direttamente regolazione dell'espressione genica. Per definire la rete di genetica regolata da RARs nel cancro della mammella, abbiamo identificato RAR obiettivi genomici utilizzando immunoprecipitazione della cromatina e analisi di espressione. Abbiamo scoperto che RAR vincolanti in tutto il genoma è molto coincidente con l'alfa del recettore degli estrogeni (ERalfa) vincolante, risultando in un diafonia diffuso di RA e gli estrogeni a regolare segnalazione antagonisticamente geni associati al cancro al seno. ERalfa-RAR e siti di legame sembra essere coevolved su larga scala in tutto il genoma umano, si traducono spesso in concorrenza dell'attività di legame con gli elementi cis-regolatori nelle vicinanze o in sovrapposizione. L'intersezione altamente coordinato tra questi due recettori dell'ormone della critica nucleare vie di segnalazione fornisce un meccanismo globale per il bilanciamento di espressione genica in uscita tramite interazioni locali regolamentazione dispersi in tutto il genoma.

468: Luo P, Lin M, Lin M, Chen Y, Yang B, He Q.

**Function of retinoid acid receptor alpha and p21 in all-trans-retinoic acid-induced acute T-lymphoblastic leukemia apoptosis.**

Leuk Lymphoma. 2009 Jul;50(7):1183-9. PubMed PMID: 19557639.

All-trans-retinoic acid (ATRA) is a morphogenetic signalling molecule derived from vitamin A and is used clinically to target acute promyelocytic leukemia by inducing differentiation of immature blood cells. Retinoid signals are mediated by retinoic acid (RA) receptors (RARs) and retinoid X receptors (RXRs). Retinoic acid receptors consist of RARalpha, RARbeta and RARgamma isotypes. Among these components, RARalpha is preferentially bound to ATRA, which is used to treat acute T-lymphoblastic leukemia, yet the conditions and mechanisms remain unknown. In this study, we have demonstrated that, in human acute T-lymphoblastic leukemia Molt3 cells, inhibition of RA-induced proliferation results from massive cell death characterised by apoptosis. The effect of ATRA:RARalpha binding on apoptosis in Molt3 cells has been investigated. Consequently, it has been shown that, in RA-treated Molt3 cells, upregulation of p21 due to RA accompanies caspase 3/PARP activation which precedes the occurrence of apoptosis.

**Funzione di apoptosi del recettore alfa dell'acido retinoico e di p21 nella leucemia linfoblastica-T acuta indotta dall'acido tutto-trans retinoico.**

All-trans-retinoico (ATRA) è una molecola di segnalazione morfogenetica derivata dalla vitamina A ed è usato in clinica per target leucemia promielocitica acuta da indurre la differenziazione delle cellule del sangue immature. Segnali di retinoidi sono mediati da acido retinoico (RA) recettori (RAR) e recettori dei retinoidi X (RXR). Recettori dell'acido retinoico consistono RARalpha, RARbeta e isotipi RARgamma. Tra queste componenti, è RARalpha lega in modo preferenziale a ATRA, che viene usato per trattare la leucemia acuta linfoblastica T-, ma le condizioni ed i meccanismi non sono noti. In questo studio, abbiamo dimostrato che, nelle cellule umane di leucemia acuta linfoblastica T-Molt3, inibizione della RA-indotta proliferazione dei risultati da morte cellulare caratterizzata dalla massiccia apoptosi. L'effetto di ATRA: RARalpha vincolante per l'apoptosi nelle cellule Molt3 è stata studiata. Di conseguenza, è stato dimostrato che, nelle cellule Molt3 RA-trattati, l'aumento di p21 a causa di RA accompagna l'attivazione della caspasi 3/PARP che precede l'insorgenza di apoptosi.

475: Fernández CA, Puig-Domingo M, Lomeña F, Estorch M, Camacho Martí V, Bittini AL, Marazuela M, Santamaría J, Castro J, Martínez de Icaya P, Moraga I, Martín T, Megía A, Porta M, Mauricio D, Halperin I.

**Effectiveness of retinoic acid treatment for redifferentiation of thyroid cancer in relation to recovery of radioiodine uptake.**

J Endocrinol Invest. 2009 Mar;32(3):228-33. PubMed PMID:19542739.

**BACKGROUND:** Retinoic acid (RA) treatment has been used for redifferentiation of metastatic thyroid neoplasia that have lost radioiodine (<sup>131</sup>I) uptake with heterogeneous results.

**AIM:** Retrospective analysis of the recovery rate of <sup>131</sup>I uptake after RA treatment in patients from 11 Spanish hospitals.

**METHODS:** Twenty-seven patients (14 men, 13 women) with papillary [21], follicular [4], and oncocytic [2] thyroid cancer initially treated with total thyroidectomy plus <sup>131</sup>I, and with <sup>131</sup>I negative metastatic disease, were given 13-cis RA (0.66-1.5 mg/kg for 5-12 weeks) followed by a therapeutic <sup>131</sup>I dose (3700-7400 MBq); 3 months later thyroglobulin levels and computed tomography imaging were performed.

**RESULTS:** In 9 out of 27 cases (33%) (8 papillary, 1 follicular) optimal positive <sup>131</sup>I scan was observed after RA treatment; in the remaining 18, 10 had a suboptimal uptake (7 papillary, 2 follicular, 1 oncocytic) and in the rest there was no <sup>131</sup>I uptake recovery (6 papillary, 1 follicular, 1 oncocytic). In 17 positive responses to RA (either optimal or suboptimal) in which image follow-up was available, decrease or stabilization of metastatic growth was observed in 7, while tumor mass increased at short term in the remaining 10. No major side effects were detected.

**CONCLUSION:** Quite a high rate of <sup>131</sup>I uptake recovery after RA treatment may be obtained in advanced differentiated thyroid cancer, but the potential modification of the natural course of the disease is uncertain. A better biological characterization of these tumors allowing the identification of potential responders to RA may improve the outcome of RA adjuvant therapy.

**Efficacia del trattamento dell'acido retinoico per la ridifferenziazione del cancro alla tiroide in relazione al recupero di captazione del radioiodio.**

**BACKGROUND:** acido retinoico (RA) il trattamento è stato utilizzato per ridifferenziazione di neoplasia alla tiroide metastatico che hanno perso con iodio radioattivo (<sup>131</sup>I) l'assorbimento con risultati eterogenei.

**OBIETTIVO:** Analisi retrospettiva del tasso di recupero di <sup>131</sup>I captazione dopo il trattamento con RA in pazienti da 11 ospedali spagnoli.

**METODI:** Ventisette pazienti (14 uomini, 13 donne) con papillare [21], follicolare [4], e oncocytic [2], il cancro alla tiroide inizialmente trattati con tiroidectomia totale più <sup>131</sup>I, <sup>131</sup>I e con malattia metastatica negativo, sono stati dati 13 - cis RA (0,66-1,5 mg / kg per 5-12 settimane) seguito da una dose terapeutica <sup>131</sup>I (3.700-7.400 MBq), 3 mesi più tardi i livelli di tireoglobulina e imaging TC sono stati effettuati.

**RISULTATI:** In 9 su 27 casi (33%) (8 papillare, 1 follicolare) ottimale <sup>131</sup>I positivo scansione è stata osservata dopo trattamento con RA, nei restanti 18, 10 hanno un assorbimento subottimale (7 papillare, 2 follicolare, 1 oncocytic) e in il resto non vi era il recupero di assorbimento <sup>131</sup>I (6 papillare, follicolare 1, 1 oncocytic). In 17 risposte positive alla RA (sia ottimale o sub-ottimali) in cui è stata osservata l'immagine di follow-up erano disponibili, diminuzione o una stabilizzazione della crescita metastatica in 7, mentre la massa tumorale aumento a breve termine nei rimanenti 10. Assenza di effetti collaterali sono stati rilevati grossi.

**CONCLUSIONE:** Abbastanza un alto tasso di assorbimento <sup>131</sup>I recupero dopo il trattamento con RA possono essere ottenuti nel carcinoma differenziato della tiroide, ma il potenziale modifica del

corso naturale della malattia è incerta. Una migliore caratterizzazione biologica di questi tumori che permette l'identificazione di potenziali responder alla RA può migliorare il risultato della terapia coadiuvante RA.

486: Vivaldi A, Miasaki FY, Ciampi R, Agate L, Collecchi P, Capodanno A, Pinchera A, Elisei R.

**Re-differentiation of thyroid carcinoma cell lines treated with 5-Aza-2'-deoxycytidine and retinoic acid.**

Mol Cell Endocrinol. 2009 Aug13;307(1-2):142-8. Epub 2009 Apr 8. PubMed PMID: 19524134.

We studied cell growth rate, mechanisms of growth inhibition, phenotype re-differentiation, expression of RARalpha, beta, gamma and differentiation thyroid genes before and after combined treatment with 5-Aza-CdR and RA (5-Aza/RA) of human thyroid carcinoma cell lines (FRO, WRO, TT). Furthermore, the activity and localization of the re-expressed sodium-iodide-symporter (NIS) protein was analyzed. After 5-Aza/RA treatment, all cell lines showed a significant reduction in cell growth. This was associated with apoptosis in the TT, with inhibition of cell proliferation in the WRO, and with cell cycle impairment in FRO and WRO. FRO and WRO treated with 5-Aza/RA lost the ability to grow in soft agar. FRO re-expressed thyroid transcription factor-1 and thyroglobulin, TT and WRO re-expressed PAX-8 and FRO and TT re-expressed RARbeta and NIS mRNA. Despite this expression, they were unable to take up iodine: a cytoplasmic localization of NIS protein was demonstrated in FRO. In conclusion, besides a significant reduction in cell growth rate and in the ability to grow in soft agar, treatment with 5-Aza/RA partially re-differentiated FRO and induced expression of NIS mRNA and protein in FRO and TT, but this treatment was unable to restore the functional activity of NIS, likely because it was located into the cytoplasm without reaching the plasma membrane.

**Ridifferenziazione delle linee cellulari con carcinoma alla tiroide trattate con 5-Aza-2'-deossicitidina e acido retinoico**

Abbiamo studiato il tasso di crescita delle cellule, i meccanismi di inibizione della crescita, ridifferenziazione fenotipo, espressione di RARalpha, beta, gamma e dei geni tiroide differenziazione prima e dopo trattamento combinato con 5-Aza-CdR e RA (5-Aza/RA), della tiroide umani linee cellulari di carcinoma (FRO, WRO, TT). Inoltre, l'attività e la localizzazione del re-espresso-ioduro di sodio-symporter (NIS) di proteine è stata analizzata. Dopo il trattamento 5-Aza/RA, tutte le linee cellulari hanno dimostrato una significativa riduzione della crescita cellulare. Questa è stata associata con l'apoptosi nel TT, con l'inibizione della proliferazione cellulare in WRO, e con compromissione della funzione del ciclo cellulare in FRO e WRO. FRO e WRO trattati con 5-Aza/RA perso la capacità di crescere in agar soffice. FRO riespresso fattore di trascrizione tiroide-1 e tireoglobulina, TT e WRO riespresso PAX-8 e FRO e TT riespresso RARbeta e NIS mRNA. Nonostante questa espressione, non erano in grado di assumere iodio: una localizzazione citoplasmatica della proteina NIS è stata dimostrata in FRO. In conclusione, oltre ad una significativa riduzione nel tasso di crescita delle cellule e nella capacità di crescere in agar soffice, il trattamento con FRO 5-Aza/RA ripreso in parte differenziata e l'espressione indotta di NIS mRNA e proteine nelle FRO e TT, ma questo trattamento è stato in grado di ripristinare l'attività funzionale di NIS, probabilmente perché era situata nel citoplasma senza raggiungere la membrana plasmatica.

487: Tatebe H, Shimizu M, Shirakami Y, Sakai H, Yasuda Y, Tsurumi H, Moriwaki H.

**Acyclic retinoid synergises with valproic acid to inhibit growth in human hepatocellular carcinoma cells.**

Cancer Lett. 2009 Nov 28;285(2):210-7. Epub 2009 Jun 10. PubMed PMID: 19520494.

A malfunction of retinoid X receptor-alpha (RXRalpha) due to phosphorylation is associated with the development of hepatocellular carcinoma (HCC) and acyclic retinoid (ACR), which targets RXRalpha, can prevent the development of second primary HCC. Valproic acid (VPA), a histone deacetylase (HDAC) inhibitor, induces apoptosis and cell cycle arrest in cancer cells. VPA can also enhance the sensitivity of cancer cells to retinoids. The present study examined the possible combined effects of ACR plus VPA in HepG2 human HCC cell line. The combination of 5µM ACR and 1mM VPA, about the IC(25) value for both compounds, synergistically inhibited the growth of HepG2 cells without affecting the growth of Hc normal human hepatocytes. The combined treatment with ACR plus VPA also acted synergistically to induce apoptosis and G(0)-G(1) cell cycle arrest in HepG2 cells. This combination further exerted a synergistic inhibition of the phosphorylation of RXRalpha, ERK, Akt and GSK-3beta proteins and caused an accumulation of acetylated histones H3 and H4 proteins. VPA enhanced the ability of ACR to raise the cellular levels of RARbeta and p21(CIP1). The combination of these agents markedly increased both the RARE and RXRE promoter activities in HepG2 cells. These results suggest that ACR and VPA cooperatively increase the expression of RARbeta and p21(CIP1), while inhibiting the phosphorylation of RXRalpha, and these effects were associated with induction of apoptosis and the inhibition of cell growth in HepG2 cells. This combination might therefore be an effective regimen for the chemoprevention and chemotherapy of HCC.

**I retinoidi aciclici sinergizzano insieme all'acido valproico per inibire la crescita delle cellule con carcinoma epatocellulare umano.**

Un malfunzionamento del recettore retinoide X-alfa (RXRalpha) a causa di fosforilazione è associata con lo sviluppo del carcinoma epatocellulare (HCC) e retinoidi aciclici (ACR), che si rivolge RXRalpha, può prevenire lo sviluppo di un secondo primario HCC. Acido valproico (VPA), un istone deacetilasi (HDAC) inibitori, induce l'apoptosi e arresto del ciclo cellulare nelle cellule tumorali. VPA può anche aumentare la sensibilità delle cellule tumorali ai retinoidi. Il presente studio ha esaminato i possibili effetti combinati di ACR più VPA in linea cellulare umana HepG2 HCC. La combinazione di 5µM ACR e 1mM VPA, circa l'IC (25) di valore per entrambi i composti, sinergicamente inibito la crescita delle cellule HepG2 senza compromettere la crescita della Hc epatociti umani normali. Il trattamento combinato con ACR più VPA ha anche agito in sinergia per indurre l'apoptosi e G (0)-G (1) arresto del ciclo cellulare in cellule HepG2. Questa combinazione ulteriormente esercitato una inibizione sinergica della fosforilazione di RXRalpha, ERK, Akt e proteine GSK-3beta e ha causato un accumulo di istoni acetilati H3 e H4 proteine. VPA rafforzato la capacità delle ACR di innalzare i livelli cellulari di RARbeta e p21 (CIP1). La combinazione di questi farmaci è aumentata significativamente sia le attività di promotore RARE e RXRE in cellule HepG2. Questi risultati suggeriscono che ACR e VPA cooperativo aumentare l'espressione di p21 e RARbeta (CIP1), mentre inibisce la fosforilazione di RXRalpha, e questi effetti sono stati associati con l'induzione di apoptosi e l'inibizione della crescita cellulare nelle cellule HepG2. Questa combinazione potrebbe quindi essere un regime efficace per la chemioprevenzione e chemioterapia del carcinoma epatocellulare.

490: Fukui T, Kodera Y, Nishio K, Masuda N, Tamura T, Koizumi F.

**Synergistic interactions between the synthetic retinoid tamibarotene and glucocorticoids in human myeloma cells.**

Cancer Sci. 2009 Jun;100(6):1137-43. PubMed PMID: 19514122.

Tamibarotene (TM411) is a synthetic retinoic acid receptor- $\alpha$ / $\beta$  selective retinoid that is chemically more stable than all-trans retinoic acid. This study was designed to evaluate the activity of TM411 in multiple myeloma (MM) and the effects of TM411 combined with a glucocorticoid (GC). In vitro, five human myeloma cells were treated with TM411 alone, GC alone, or TM411 + GC. Cell survival was analyzed by the tetrazolium dye assay and the Hoechst 33342/propidium iodide double-staining method. The effect of TM411 + GC was assessed by the isobologram method. In vivo, the growth-inhibitory effects of the drugs on RPMI-8226 cell xenografts established in SCID mice were examined. The effects of the agents on IL-6-mediated signaling pathways were also analyzed by Western blotting. TM411 was 2- to 10-fold more potent, in terms of its growth-inhibitory effect, than all-trans retinoic acid. The combination of TM411 and GC was found to show a markedly synergistic interaction. While increased expressions of the IL-6 receptor, phosphorylated MAPK, and Akt were observed after exposure to GC, TM411 attenuated this increase in the expressions, suggesting that such modification of the effect of GC by TM411 might be the possible mechanism underlying the synergistic interaction. Furthermore, TM411 + GC showed a supra-additive inhibitory effect in a xenograft model as compared with TM411 or GC alone. These results imply that the combination of TM411 + GC might be highly effective against MM, and suggest the need for clinical evaluation of TM411 + GC for the treatment of MM.

**Interazioni sinergiche tra il retinoide sintetico tamibarotene e I glucocorticoidi nelle cellule di mieloma umano.**

Tamibarotene (TM411) è un retinoide sintetico receptor- $\alpha$ / $\beta$  acido retinoico selettivo che è chimicamente più stabile di acido all-trans retinoico. Questo studio è stato disegnato per valutare l'attività di TM411 nel mieloma multiplo (MM) e gli effetti della TM411 combinato con un glucocorticoide (GC). In vitro, cinque cellule di mieloma umano sono stati trattati con TM411 da solo, GC solo, o TM411 + GC. sopravvivenza delle cellule è stata analizzata con il test della tintura tetrazolio e la Hoechst 33342/propidium ioduro metodo a doppia colorazione. L'effetto di TM411 + GC è stata valutata mediante il metodo isobologram. In vivo, gli effetti di inibizione della crescita dei farmaci in RPMI-8.226 xenotrapianti di cellule prestabilite in topi SCID sono stati esaminati. Gli effetti degli agenti sulle vie di segnalazione IL-6-mediata sono stati analizzati anche dal macchiare occidentale. TM411 è stata di 2 - a 10 volte più potente, in termini del suo effetto di inibizione della crescita, di acido all-trans retinoico. La combinazione di TM411 e GC è stato trovato a mostrare una marcata interazione sinergica. Mentre le espressioni aumento del recettore IL-6, fosforilata MAPK e Akt sono stati osservati dopo l'esposizione al GC, TM411 attenuato questo aumento nelle espressioni, suggerendo che una tale modifica l'effetto dei GC da TM411 potrebbe essere il possibile meccanismo alla base della interazione sinergica. Inoltre, TM411 + GC hanno mostrato un effetto inibitorio sopra-additivi in un modello di xenotrapianto rispetto TM411 o GC. Questi risultati implicano che la combinazione di TM411 + GC potrebbe essere altamente efficace contro MM, e suggeriscono la necessità di una valutazione clinica di TM411 + GC per il trattamento del MM.

491: Lan L, Cui D, Luo Y, Shi BY, Deng LL, Zhang GY, Wang H.

**Inhibitory effects of retinoic acid on invasiveness of human thyroid carcinoma cell lines in vitro.**

J Endocrinol Invest. 2009 Oct;32(9):731-8. Epub . PubMed PMID: 19509478.

**BACKGROUND:** The prognosis of patients with metastasized thyroid carcinoma is not optimistic, necessitating the search for new treatment options.

**AIM:** Beneficial effects of retinoic acid (RA) have been suggested in thyroid cancer differentiation and the present study was performed to investigate the anti-metastatic potential of RA in respect of important determinants of metastatic behavior in thyroid carcinoma, focusing on the role of invasion-associated proteins.

**MATERIALS AND METHODS:** Differentiated thyroid carcinoma cell lines FTC-133 and XTC.UC1, and anaplastic thyroid cancer cell lines C643 and HTH74 were studied. All cell lines were cultured with alltrans-RA (ATRA) or the solvent ethanol. Invasion and adhesion potency in vitro was studied by transwell experiment and short-term adhesion assay. The involvement of invasion-associated proteins, urokinase type plasminogen activator (uPA), uPA receptor (uPAR), matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and E-cadherin, were investigated by semi-quantitative RT-PCR and Western blot.

**RESULTS:** In vitro invasion assay revealed that ATRA treatment could reduce the invasive potency in all the thyroid cancer cell lines, with the most significant effect in anaplastic cancer cells. Short-term adhesion assay suggested that ATRA increases cancer cell adhesion to extracellular matrix (ECM) in C643, HTH74 and XTC.UC1, probably through a transcriptional and translational regulation of some attachment molecules. RT-PCR and Western blot both revealed diminished expression of uPAR in all four carcinoma cell lines. In C643 and HTH74 cell lines, the expression of uPA was reduced and the expression of E-cadherin was increased, whereas the MMP-2 expression was not significantly down-regulated in ATRA-treated group. In ATRA-treated FTC-133 and XTC.UC1 cell lines, MMP-2 expression was decreased, but no significant changes in uPA and E-cadherin expression were observed.

**CONCLUSIONS:** The present study demonstrates the influence of ATRA on both important determinants of metastatic behavior ("de-adhesion" and proteolysis) in thyroid carcinoma cell lines, especially in anaplastic cancer cells. These findings may add to the explanations for beneficial effects of RA in the treatment of metastatic thyroid carcinomas.

**Effetti inibitori dell'acido retinoico sull'invasività delle linee cellulari di carcinoma alla tiroide umano in vitro.**

**BACKGROUND:** La prognosi dei pazienti con carcinoma metastatico della tiroide non è ottimista, che richiede la ricerca di nuove opzioni di trattamento.

**SCOPO:** Gli effetti benefici dell'acido retinoico (RA) sono state proposte nella differenziazione del cancro alla tiroide e il presente studio è stato eseguito per studiare il potenziale anti-metastatico di RA nei confronti di importanti determinanti del comportamento metastatico nel carcinoma della tiroide, incentrate sul ruolo di invasione -proteine associate.

**MATERIALI E METODI:** differenziato della tiroide linee cellulari di carcinoma FTC-133 e XTC.UC1, anaplastico della tiroide e delle cellule di cancro linee C643 e HTH74 sono stati studiati. Tutte le linee cellulari sono state coltivate con ALLTRANS-RA (ATRA) o l'etanolo solvente. potenza Invasion e adesione in vitro è stata studiata da esperimento transwell e dosaggio adesione a breve termine. Il coinvolgimento delle proteine associate invasione, attivatore del plasminogeno tipo urochinasi (uPA), uPA recettore (uPAR), matrice metalloproteinasi-2 (MMP-2) e E-caderina, sono stati esaminati da semi-RT-PCR quantitativa e Western Blot.

**RISULTATI:** In vitro l'invasione ha rivelato che il trattamento con ATRA potrebbero ridurre la

potenza invasiva in tutte le linee di cellule di cancro della tiroide, con l'effetto più significativo in cellule di cancro anaplastico. test di adesione a breve termine suggerito che ATRA cancro aumenta l'adesione delle cellule di matrice extracellulare (ECM) in C643, HTH74 e XTC.UC1, probabilmente attraverso una regolazione trascrizionale e traslazionale di alcune molecole di attaccamento. blot RT-PCR and Western sia rivelato diminuita espressione di uPAR in tutte le linee cellulari di carcinoma quattro. In linee cellulari C643 e HTH74, l'espressione di uPA è stato ridotto e l'espressione di E-caderina è stata aumentata, mentre l'espressione di MMP-2 non è stata significativamente down-regolato nel gruppo trattato con ATRA. In ATRA trattati con FTC-133 e XTC.UC1 linee cellulari, espressione di MMP-2 è diminuita, ma nessun cambiamento significativo nella uPA e di espressione E-caderina è stata osservata.

**CONCLUSIONI:** Il presente studio dimostra l'influenza di ATRA su entrambi importanti determinanti del comportamento metastatico ("de-adesione" e proteolisi) in linee cellulari di carcinoma della tiroide, in particolare in cellule di cancro anaplastico. Questi risultati possono aggiungere alle spiegazioni di effetti benefici di RA nel trattamento del carcinoma metastatico della tiroide.

501: Li M, Li H, Li C, Guo L, Liu H, Zhou S, Liu X, Chen Z, Shi S, Wei J, McNutt MA, Li G.

**Cytoplasmic alpha-fetoprotein functions as a co-repressor in RA-RAR signaling to promote the growth of human hepatoma Bel 7402 cells.**

Cancer Lett.2009 Nov 28;285(2):190-9. Epub 2009 Jun 6. PubMed PMID: 19501957.

The role of AFP in the retinoic acid-RAR signaling pathway was investigated in human hepatoma Bel 7402 cells. The results showed that AFP and RAR-beta were co-localized and interacted in cytoplasm. AFP may inhibit translocation of RAR-beta into the nucleus via competitive binding to RAR-beta with ATRA, which was reversed by AFP-siRNA transfection. Our data suggest that the ATRA resistance of Bel 7402 cells is at least in part attributable to their high level of cytoplasmic AFP. Thus, by counteracting the effect of AFP, it may be possible to increase the sensitivity of tumor cells to ATRA.

**Le funzioni dell'alfa-fetoproteina citoplasmatica come co-repressore nel segnale RA-RAR per promuovere la crescita dell'epatoma umano nelle cellule Bel 7402.**

Il ruolo di AFP in via retinoico RAR segnalazione è stata studiata in epatoma umano Bel 7.402 celle. I risultati hanno mostrato che AFP e RAR-beta sono stati co-localizzati e interagiscono nel citoplasma. AFP possono inibire la traslocazione di RAR-beta nel nucleo via del legame competitivo di RAR-beta con ATRA, che è stato compensato da transfezione AFP-siRNA. I nostri dati suggeriscono che la resistenza ATRA di Bel 7.402 cellule è almeno in parte attribuibile al loro elevato livello di citoplasmatica AFP. Così, contrastando l'effetto di AFP, può essere possibile per aumentare la sensibilità delle cellule tumorali di ATRA.

510: Kabat GC, Kim M, Adams-Campbell LL, Caan BJ, Chlebowski RT, Neuhaus ML, Shikany JM, Rohan TE; WHI Investigators.

**Longitudinal study of serum carotenoid, retinol, and tocopherol concentrations in relation to breast cancer risk among postmenopausal women.**

Am J Clin Nutr. 2009 Jul;90(1):162-9. Epub 2009 May 27. PubMed PMID: 19474140.

**BACKGROUND:** Prospective studies have examined the association of serum and plasma carotenoids and micronutrients and breast cancer; however, to date, studies have only assessed exposure at one point in time.

**OBJECTIVE:** This study analyzed baseline and repeated serum measurements of carotenoids, retinol, and tocopherols to assess their associations with postmenopausal breast cancer risk.

**DESIGN:** Serum concentrations of alpha-carotene, beta-carotene, beta-cryptoxanthin, lycopene, lutein + zeaxanthin, retinol, alpha-tocopherol, and gamma-tocopherol were measured in a 6% sample of women in the Women's Health Initiative clinical trials at baseline and at years 1, 3, and 6 and in a 1% sample of women in the observational study at baseline and at year 3. The association of baseline compounds and breast cancer risk was estimated by Cox proportional hazards models. In addition, repeated measurements were analyzed as time-dependent covariates. Of 5450 women with baseline measurements, 190 incident cases of breast cancer were ascertained over a median of 8.0 y of follow-up.

**RESULTS:** After multivariable adjustment, risk of invasive breast cancer was inversely associated with baseline serum alpha-carotene concentrations (hazard ratio for highest compared with the lowest tertile: 0.55; 95% CI: 0.34, 0.90; P = 0.02) and positively associated with baseline lycopene (hazard ratio: 1.47; 95% CI: 0.98, 2.22; P = 0.06). Analysis of repeated measurements indicated that alpha-carotene and beta-carotene were inversely associated with breast cancer and that gamma-tocopherol was associated with increased risk.

**CONCLUSIONS:** The present study, which was the first to assess repeated measurements of serum carotenoids and micronutrients in relation to breast cancer, adds to the evidence of an inverse association of specific carotenoids with breast cancer. The positive associations observed for lycopene and gamma-tocopherol require confirmation. This trial was registered at ClinicalTrials.gov as NCT00000611.

**Studi longitudinali delle concentrazioni dei carotenoidi nel siero, del retinolo e del tocoferolo in relazione al rischio di cancro al seno tra le donne in postmenopausa.**

**BACKGROUND:** Studi prospettici hanno esaminato l'associazione di carotenoidi nel siero e di plasma e micronutrienti e cancro al seno, tuttavia, ad oggi, gli studi hanno valutato l'esposizione solo ad un certo punto nel tempo.

**OBIETTIVO:** Questo studio ha analizzato basale e ripetuto le misurazioni del siero di carotenoidi, retinolo e tocoferoli per valutare le loro associazioni con rischio di carcinoma mammario in postmenopausa.

**DESIGN:** le concentrazioni sieriche di alfa-carotene, beta-carotene, beta-criptoxantina, il licopene, luteina + zeaxantina, retinolo, alfa-tocoferolo e gamma-tocoferolo sono state misurate in un campione del 6% delle donne nel Women's Health studi Iniziativa cliniche basale e ad anni 1, 3 e 6, e in un campione 1% delle donne nello studio osservazionale al basale ea 3 anni. L'associazione dei composti di partenza e il rischio di cancro al seno è stato stimato da modelli di rischio proporzionale di Cox. Inoltre, le misurazioni ripetute sono state analizzate come covariate tempo-dipendenti. Di 5.450 donne con misurazioni di riferimento, 190 casi incidenti di cancro della mammella sono state accertate nel corso di un mediano di 8,0 y del follow-up.

**RISULTATI:** Dopo aggiustamento multivariato, il rischio di carcinoma mammario invasivo è risultato inversamente associato con le concentrazioni sieriche basali di alfa-carotene (hazard ratio

per il massimo rispetto al terzile più basso: 0,55, 95% CI: 0,34, 0,90, P = 0,02) e positivamente associata con licopene basale (hazard ratio: 1,47, 95% CI: 0,98, 2,22, P = 0,06). Analisi di misure ripetute hanno indicato che l'alfa-carotene e beta-carotene sono stati inversamente associato con il cancro al seno e che la gamma-tocoferolo è stato associato ad aumento del rischio. CONCLUSIONI: Il presente studio, che è stato il primo a valutare misurazioni ripetute di siero di carotenoidi e micronutrienti in relazione al cancro al seno, si aggiunge alle evidenze di un'associazione inversa di carotenoidi specifici con cancro al seno. Le associazioni positivi osservati per il licopene e gamma-tocoferolo richiedono conferma. Questo studio è stato registrato presso [ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov) come [NCT00000611](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT00000611).

511: Tang XH, Su D, Albert M, Scognamiglio T, Gudas LJ.

**Overexpression of lecithin:retinol acyltransferase in the epithelial basal layer makes mice more sensitive to oral cavity carcinogenesis induced by a carcinogen.**

Cancer BiolTher. 2009 Jul;8(13):1212-3. Epub 2009 Jul 6. PubMed PMID: 19471114; PubMed Central PMCID: PMC2882701.

Lecithin:retinol acyltransferase (LRAT) is an enzyme that converts retinol (vitamin A) to retinyl esters. Its expression is often reduced in human cancers, including oral cavity cancers. We investigated the effects of ectopic expression of human lecithin:retinol acyltransferase (LRAT) on murine oral cavity carcinogenesis induced by the carcinogen 4-nitroquinoline 1-oxide (4-NQO). We targeted human LRAT expression specifically to the basal layer of mouse skin and oral cavity epithelia by using a portion of the human cytokeratin 14 (K14) promoter. High levels of human LRAT transgene transcripts were detected in the tongues and skin of adult transgenic positive (TG+) mice, but not in transgenic negative (TG-) mice. The retinyl ester levels in skin of LRAT TG+ mice were 32% +/- 5.4% greater than those in TG- mice, and topical treatment of the back skin with retinol resulted in greater increases in retinyl esters (from 6.9- to 14.3-fold in different TG+ mice) in TG+ mouse skin than in TG- mouse skin (1.3 fold). While carcinogen (4-NQO) treatment induced multifocal precancerous and cancer lesions in the tongues of both TG positive (n=16) and negative mice (n=22), higher percentages of transgenic positive mice (62.5%) developed more severe tongue lesions (grades 3 and 4) than transgenic negative mice (24.8%) after 4-NQO treatment (p < 0.05). Carcinogen treatment also resulted in greater percentages of transgenic positive mouse tongues with hyperplasia (71.4%), dysplasia (85.7%, p < 0.05), and carcinoma (28.6%) than transgenic negative mouse tongues (53.3%, 46.7%, and 20%, respectively). Moreover, we observed higher cyclooxygenase-2 (Cox-2) and lower RARbeta(2) mRNA levels in TG+ mouse tongues as compared to TG- mouse tongues after 4-NQO treatment (p < 0.05). Taken together, these data show that overexpression of human LRAT specifically in oral basal epithelial cells makes these cells more sensitive to carcinogen induced tumorigenesis.

**Sovraespressione di lecitina: retinolo-acetiltransferasi nel lato basale epiteliale porta ad una sensibilità maggiore alla carcinogenesi del cavo orale indotta da un carcinogeno**

Lecitina: aciltransferasi retinolo (LRAT) è un enzima che converte retinolo (vitamina A), agli esteri retinile. La sua espressione è spesso ridotta nei tumori umani, inclusi i tumori della cavità orale. Abbiamo studiato gli effetti di espressione ectopica di lecitina umana: aciltransferasi retinolo (LRAT) sulla carcinogenesi murina cavità orale indotta dal 4-nitrochinolina cancerogeno 1-ossido (4-NQO). Abbiamo mirato umana espressione LRAT specificamente allo strato basale della pelle del mouse e epitelio del cavo orale, utilizzando una parte dell'essere umano citocheratina 14 (K14) promotore. Alti livelli di transgene LRAT umano trascrizioni sono state rilevate le lingue e la pelle di adulti transgenici positivo (TG +) i topi, ma non in negativo transgenici (TG-) nei topi. I livelli di esteri retinile in pelle di LRAT TG + topi sono stati il 32% +/- 5,4% superiori a quelli TG-topi, e il trattamento topico della cute posteriore con retinolo tradotta in maggiore aumento esteri retinile (da 6,9 a 14,3 volte nei vari TG + topi) in TG + pelle di topo in pelle TG-mouse (1,3 volte). Mentre cancerogeno (4-NQO) il trattamento ha indotto multifocale lesioni precancerose e il cancro nelle lingue di entrambi positivi TG (n = 16) e nei topi negativo (n = 22), percentuali più elevate di topi transgenici positivi (62,5%) hanno sviluppato lesioni più gravi lingua (di grado 3 e 4) di topi transgenici negativo (24,8%) dopo trattamento di 4 NQO (p <0,05). trattamento cancerogeno anche tradotta in maggiore percentuale di transgenici lingue mouse positivo con l'iperplasia (71,4%), la displasia (85,7%, p <0,05), ed il carcinoma (28,6%) rispetto transgenici lingue mouse negativo (53,3%, 46,7% e del 20% , rispettivamente). Inoltre, abbiamo osservato superiore della cicloossigenasi-2 (Cox-2) e inferiore RARbeta (2) i livelli di mRNA in lingue TG + mouse rispetto

a lingue TG-mouse dopo il trattamento con 4-NQO ( $p < 0,05$ ). Presi insieme, questi dati dimostrano che la sovraespressione di LRAT specificamente umano in cellule basali epiteliali orali rende queste cellule più sensibili alla tumorigenesi cancerogeno indotto.

513: Zhao X, Graves C, Ames SJ, Fisher DE, Spanjaard RA.

**Mechanism of regulation and suppression of melanoma invasiveness by novel retinoic acid receptor-gamma target gene carbohydrate sulfotransferase 10.**

Cancer Res. 2009 Jun15;69(12):5218-25. Epub 2009 May 26. PubMed PMID: 19470764.

Retinoic acid (RA) induces growth arrest and differentiation of S91 murine melanoma cells and serves as a valuable model for this disease. RA acts through activation of RA receptors (RAR), which are members of the nuclear receptor superfamily of ligand-inducible transcription factors. Interestingly, differentiation is mediated by RARgamma, but not by RARalpha or RARbeta, suggesting that RARgamma possesses unique and uncharacterized molecular properties. To address this question, DNA microarrays in combination with RAR isoform-specific agonists were employed to identify novel RARgamma target genes that may play a role in this process. Here, we identified and validated carbohydrate sulfotransferase 10 (CHST10) as a novel RARgamma target gene in S91 cells. The RARgamma-inducible CHST10 promoter was obtained, and two atypical, independently functioning RA response elements were identified in a 425 bp region. Surprisingly, this fragment is bound by RARgamma, but not by RARalpha or RARbeta, thus providing a mechanism for the observed RARgamma-specific regulation. CHST10 is a sulfotransferase that forms HNK-1 glycan on neural cell adhesion proteins and glycolipids, and HNK-1 is thought to modulate cell adhesion and possibly metastasis. We show that CHST10 is also regulated by RARgamma in a significant subset of human melanoma cells, and three-dimensional cell culture migration assays suggest that CHST10 functions as a suppressor of invasiveness, but not proliferation, in these cells. Induction of CHST10 by RARgamma-activating retinoids may present a novel therapeutic strategy to inhibit invasiveness in a subset of melanoma patients.

**Meccanismo di regolazione e soppressione dell'invasività del melanoma tramite il gene target carboidrato sulfotransferasi 10 del recettore dell'acido retinoico gamma.**

L'acido retinoico (RA) induce l'arresto della crescita e la differenziazione delle cellule di melanoma murino S91 e serve come un modello valido per questa malattia. RA agisce attraverso l'attivazione dei recettori AR (RAR), che sono membri della superfamiglia del recettore nucleare di fattori di trascrizione ligando-inducibile. È interessante notare che la differenziazione è mediata da RARgamma, ma non da RARalpha o RARbeta, suggerendo che RARgamma possiede le proprietà molecolari unici e caratterizzati. Per rispondere a questa domanda, DNA microarrays, in combinazione con agonisti RAR isoforma-specifici sono stati utilizzati per identificare nuovi geni target RARgamma che può giocare un ruolo in questo processo. Qui, abbiamo identificato e validato sulfotransferase carboidrati 10 (CHST10) come un nuovo gene bersaglio RARgamma in S91 cellule. Il promotore CHST10 RARgamma-inducibile è stata ottenuta, e due atipici, indipendentemente funzionamento elementi di risposta RA sono state identificate in una regione di 425 bp. Sorprendentemente, questo frammento è vincolato da RARgamma, ma non da RARalpha o RARbeta, fornendo così un meccanismo per la regolazione osservato RARgamma-specific. CHST10 è un sulfotransferase che le forme HNK-1 glycan sulle proteine di adesione cellulare neurale e glicolipidi, e HNK-1 è pensato di modulare metastasi adesione delle cellule e possibilmente. Si dimostra che CHST10 è regolata anche da RARgamma in un significativo sottogruppo di cellule di melanoma umano, e tridimensionale di cellule saggi di migrazione cultura suggeriscono che le funzioni CHST10 come un soppressore di invasività, ma non proliferazione, in

queste cellule. Induzione di CHST10 da RARgamma-attivando retinoidi possono presentare una nuova strategia terapeutica per inibire l'invasività in un sottogruppo di pazienti con melanoma.

525: Wang S, Tricot G, Shi L, Xiong W, Zeng Z, Xu H, Zangari M, Barlogie B, Shaughnessy JD Jr, Zhan F.

**RARalpha2 expression is associated with disease progression and plays a crucial role in efficacy of ATRA treatment in myeloma.**

Blood. 2009 Jul 16;114(3):600-7. Epub 2009 May 20. PubMed PMID: 19458357; PubMed Central PMCID: PMC2713470.

Specific genetic alterations in multiple myeloma (MM) may cause more aggressive diseases. Paired gene array analysis on 51 samples showed that retinoic acid (RA) receptor alpha (RARalpha) expression significantly increased at relapse compared with diagnosis. RARalpha encodes 2 major isoforms: RARalpha1 and RARalpha2. In this study, we examined the function of RARalpha2 in MM. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) revealed ubiquitous RARalpha1 expression in MM cells, but RARalpha2 was expressed in 26 (32%) of 80 newly diagnosed patients and 10 (28%) of 36 MM cell lines. Patients with RARalpha2 expression had a significantly shorter overall survival on identical treatments. The presence of RARalpha2 remained significant on multivariate analysis. Knockdown of RARalpha2 but not RARalpha1 induced significant MM cell death and growth inhibition, and overexpressing RARalpha2 activated STAT3 and mitogen-activated protein kinase kinase (MEK)/extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling pathways. Interestingly, all-trans retinoic acid (ATRA) treatment induced potent cell death and growth inhibition in RARalpha2(+) but not RARalpha2(-) MM cells; overexpressing RARalpha2 in RARalpha2-deficient MM cells restored sensitivity to ATRA. Furthermore, ATRA treatment significantly inhibited the growth of RARalpha2-overexpressing MM tumors in severe combined immunodeficiency (SCID) mouse model. These findings provide a rationale for RA-based therapy in aggressive RARalpha2(+) MM.

**Nel mieloma l'espressione di RARalfa2 è associata alla progressione della patologia e ha un ruolo cruciale nell'efficacia del trattamento con ATRA.**

Specifiche alterazioni genetiche nel mieloma multiplo (MM) possono causare malattie più aggressive. Gemellaggio analisi di matrice gene su 51 campioni ha mostrato che l'acido retinoico (RA) del recettore alfa (RARalpha) espressione significativamente aumentato rispetto alla recidiva con la diagnosi. RARalpha codifica due isoforme principali: RARalpha1 e RARalpha2. In questo studio, abbiamo esaminato la funzione di RARalpha2 in mm. Reverse catena della trascrizione-polimerasi reazione (RT-PCR) ha rivelato onnipresente RARalpha1 espressione in cellule di MM, ma RARalpha2 è stato espresso in 26 (32%) dei 80 pazienti di nuova diagnosi e 10 (28%) di 36 linee cellulari di MM. I pazienti con espressione RARalpha2 hanno avuto una sopravvivenza significativamente più breve generale sui trattamenti identici. La presenza di RARalpha2 rimasto significativo all'analisi multivariata. Colpo di RARalpha2 ma non RARalpha1 indotto significativo morte cellulare MM e inibizione della crescita, e sovraespressione STAT3 RARalpha2 attivato e mitogeno-attivata proteina chinasi chinasi (MEK) / extracellulare signal-regulated chinasi (ERK) vie di segnalazione. Interessante, acido all-trans retinoico (ATRA), il trattamento ha indotto la morte delle cellule e potente inibizione della crescita in RARalpha2 (+) ma non RARalpha2 (-) le cellule MM; iperesprimenti RARalpha2 in RARalpha2-deficienti cellule di MM restaurato sensibilità al ATRA. Inoltre, il trattamento con ATRA ha inibito significativamente la crescita di tumori RARalpha2-overexpressing MM in immunodeficienza combinata grave (SCID) modello di mouse. Questi risultati forniscono una spiegazione razionale per la terapia a base di RA RARalpha2 aggressivo (+) MM.

526: Papi A, Tatenhorst L, Terwel D, Hermes M, Kummer MP, Orlandi M, Heneka MT.

**PPARgamma and RXRgamma ligands act synergistically as potent antineoplastic agents in vitro and in vivo glioma models.**

J Neurochem. 2009 Jun;109(6):1779-90. Epub 2009 May 11. PubMed PMID: 19457135.

Glioblastoma represent the most common primary brain tumor in adults and are currently considered incurable. We investigated antiproliferative and anti-invasive mechanisms of 6-OH-11-O-hydroxyfenantrene (IIF), a retinoid X receptor ligand, and pioglitazone (PGZ), a peroxisome proliferator-activated receptor gamma activator, in three different glioblastoma cell lines. A dose-dependent reduction of tumor invasion and strong decrease of matrix metalloproteinases 2 and 9 expression was observed, especially when a combination therapy of IIF and PGZ was administered. Combined treatment also markedly reduced proliferation and induced apoptosis in all glioma cell lines tested. This was in particular accompanied by decrease of antiapoptotic proteins Bcl2 and p53, while simultaneously pro-apoptotic cytochrome c, cleaved caspase 3, Bax and Bad levels increased. These in vitro findings were further substantiated in a murine glioma model in vivo, where oral administration of PGZ and IIF resulted in significantly reduced tumor volume and proliferation. Of note, treatment with nuclear receptor ligands was not only effective when the treatment was initiated shortly after the intraparenchymal seeding of the glioma cells, but even when initiated in the last third of the observation period. Collectively, our results demonstrate the effectiveness of a combined treatment of ligands of proliferator-activated receptor and retinoid X receptor against glioblastoma.

**I ligandi di PPARgamma e RXRgamma agiscono sinergicamente come potenti agenti neoplastici in vitro e in vivo nei modelli con glioma.**

Glioblastoma rappresentano il più comune tumore cerebrale primario negli adulti e sono attualmente considerate incurabili. Abbiamo studiato i meccanismi antiproliferativi e anti-invasiva di 6-OH-11-O-hydroxyfenantrene (IIF), un ligando del recettore retinoide X, e pioglitazone (PGZ), un peroxisome proliferator-activated receptor gamma attivatore, in tre diverse linee di cellule di glioblastoma. Una riduzione dose-dipendente di invasione tumorale e la forte diminuzione delle metalloproteinasi della matrice 2 e 9 l'espressione è stata osservata, soprattutto quando una terapia di combinazione di IIF e PGZ è stato somministrato. Il trattamento combinato anche marcatamente ridotta proliferazione e induce apoptosi nelle linee cellulari di glioma tutti testati. Questo è stato, in particolare, accompagnato da una riduzione di antiapoptotica Bcl2 proteine e p53, mentre il citocromo c contemporaneamente pro-apoptotici, sfaldati caspasi 3, Bax e livelli di Bad aumentati. Questi risultati in vitro sono stati ulteriormente comprovati in un modello murino glioma in vivo, in cui la somministrazione orale di PGZ IIF e portato a volume del tumore significativamente ridotta e la proliferazione. Da notare, il trattamento con ligandi dei recettori nucleari non è stata efficace solo quando il trattamento è stato iniziato poco dopo la semina intraparenchimale delle cellule del glioma, ma anche quando ha avviato nell'ultimo terzo del periodo di osservazione. Collettivamente, i nostri risultati dimostrano l'efficacia di un trattamento combinato di ligandi del recettore proliferator-activated e recettore retinoide X contro il glioblastoma.

531: Tabata C, Tabata R, Hirayama N, Yasumitsu A, Yamada S, Murakami A, Iida S, Tamura K, Terada T, Kuribayashi K, Fukuoka K, Nakano T.

**All-trans-retinoic acid inhibits tumour growth of malignant pleural mesothelioma in mice.**

Eur Respir J.2009 Nov;34(5):1159-67. Epub 2009 May 14. PubMed PMID: 19443527.

Malignant pleural mesothelioma (MPM) is an aggressive malignant tumour of mesothelial origin associated with asbestos exposure. Because MPM has limited response to conventional chemotherapy and radiotherapy, the prognosis is very poor. Several researchers have reported that cytokines such as interleukin (IL)-6 play an important role in the growth of MPM. Previously, it was reported that all-trans-retinoic acid (ATRA) inhibited the production and function of IL-6 and transforming growth factor (TGF)-beta1 in experiments using lung fibroblasts. We investigated whether ATRA had an inhibitory effect on the cell growth of MPM, the origin of which was mesenchymal cells similar to lung fibroblasts, using a subcutaneous xenograft mouse model. We estimated the tumour growth and performed quantitative measurements of IL-6, TGF-beta1 and platelet-derived growth factor (PDGF) receptor (PDGFR)-beta mRNA levels both of cultured MPM cells and cells grown in mice with or without the administration of ATRA. ATRA significantly inhibited MPM tumour growth. In vitro studies disclosed that the administration of ATRA reduced 1) mRNA levels of TGF-beta1, TGF-beta1 receptors and PDGFR-beta, and 2) TGF-beta1-dependent proliferation and PDGF-BB-dependent migration of MPM cells. These data may provide a rationale to explore the clinical use of ATRA for the treatment of MPM.

**Nei topi con mesotelioma pleurico maligno l'acido tutto-trans-retinoico inibisce la crescita tumorale.**

Il mesotelioma pleurico maligno (MPM) è un tumore aggressivo maligno di origine mesoteliali associato all'esposizione all'amianto. Perché MPM ha limitato la risposta alla chemioterapia e alla radioterapia convenzionale, la prognosi è molto povera. Diversi ricercatori hanno riportato che le citochine come l'interleuchina (IL) -6 svolgono un ruolo importante nella crescita di MPM. In precedenza, è stato riportato che l'acido all-trans retinoico (ATRA) ha inibito la produzione e la funzione di IL-6 e fattore di crescita trasformante (TGF)-beta1 in esperimenti usando fibroblasti polmonari. Abbiamo studiato se ATRA ha avuto un effetto inibitorio sulla crescita cellulare di MPM, la cui origine è stata cellule mesenchimali simili a fibroblasti di polmone, utilizzando un modello di topo per via sottocutanea xenotrapianto. Abbiamo stimato la crescita del tumore ed eseguito misurazioni quantitative di IL-6, i livelli di mRNA TGF-beta1 e il fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF) recettore (PDGFR)-beta sia di colture di cellule MPM e cellule coltivate in topi con o senza la somministrazione di ATRA. ATRA ha inibito significativamente la crescita tumorale MPM. Gli studi in vitro ha rivelato che la somministrazione di ATRA ridotto 1) i livelli di mRNA del TGF-beta1, TGF-beta1 recettori e PDGFR-beta, e 2) la proliferazione TGF-beta1-dipendente e la migrazione PDGF-BB-dipendente delle cellule MPM. Questi dati possono fornire una spiegazione razionale per esplorare l'uso clinico di ATRA per il trattamento del MPM.

534: Kourelis K, Vadoros G, Kourelis T, Goumas P, Sotiropoulou-Bonikou G.

**Retinoid X receptor overexpression desensitizes laryngeal epithelium to carcinogenic effects associated with epidermal growth factor receptor upregulation.**

J Otolaryngol Head Neck Surg. 2009 Apr;38(2):233-9. PubMed PMID:19442374.

**OBJECTIVE:** Squamous cell carcinomas (SCCs) of the larynx are sequelae of hyperplastic and dysplastic lesions. Epidermal growth factor receptor (EGFR) is found frequently overexpressed in SCCs of the head and neck, although its regulatory role is not fully elucidated. Conversely, retinoid X receptor alpha (RXRalpha) mediates the reversing effects of retinoids on head and neck carcinogenesis. We examined the expression of EGFR in relation to the progress of laryngeal tumorigenesis and how this association is modulated by concurrent RXR presence.

**DESIGN:** A retrospective study.

**SETTING:** A basic research anatomy laboratory, operating within a tertiary care institution.

**MATERIALS:** Tissue samples from 129 patients with premalignant or malignant laryngeal lesions.

**METHOD:** Paraffin-section immunohistochemistry.

**MAIN OUTCOME MEASURES:** EGFR immunoreactivity in relation to histopathology progression, in both the presence and absence of RXR immunoreexpression.

**RESULTS:** EGFR was upregulated along the epithelial deterioration toward neoplasia ( $p < .001$ ) but was unaffected by tumour grade. In RXRalpha-positive cases, a markedly stronger induction of EGFR occurred with malignant transformation compared with the epithelia immunonegative for the nuclear receptor.

**CONCLUSION:** This study suggests that RXRalpha confers to squamous cells a shielding effect against excessive mitogenic stimulation, which might be EGFR dependent. RXR-positive patients manifesting resistance to anti-EGFR agents could benefit from retinoid administration.

**La sovraespressione del recettore X dei retinoidi desensibilizza l'epitelio della laringe agli effetti carcinogenici associati alla regolazione positiva del recettore del fattore di crescita epidermico.**

**OBIETTIVO:** carcinomi a cellule squamose (SCC) della laringe sono postumi di lesioni iperplastiche e displastiche. Epidermal growth factor receptor (EGFR) si trova spesso sovra-espresso in SCC della testa e del collo, sebbene il suo ruolo di regolamentazione non è completamente chiarito. Al contrario, retinoidi recettore alfa X (RXRalpha) media gli effetti di inversione dei retinoidi sulla testa e sul collo carcinogenesi. Abbiamo esaminato l'espressione di EGFR in relazione al progresso della tumorigenesi della laringe e di come questa associazione è modulato dalla presenza RXR simultanee.

**DISEGNO:** Uno studio retrospettivo.

**REGOLAZIONE:** Un laboratorio di ricerca di base di anatomia, che operano all'interno di un istituto di cura terziaria.

**MATERIALI:** campioni di tessuto da 129 pazienti con lesioni precancerose della laringe o maligna.

**METODO:** immunoistochimica Paraffina-sezione.

**MISURE PRINCIPALI DI RISULTATO:** immunoreattività EGFR in relazione alla progressione istopatologia, sia in presenza che in assenza di immunoreexpression RXR.

**RISULTATI:** EGFR è up-regolato lungo il deterioramento epiteliale verso la neoplasia ( $p < .001$ ) ma non era influenzata dal grado del tumore. In casi RXRalpha-positivi, una induzione notevolmente più forte di EGFR si è verificato con trasformazione maligna rispetto al immunonegative epiteli per il recettore nucleare.

**CONCLUSIONE:** Questo studio suggerisce che RXRalpha conferisce alle cellule squamose un effetto di schermatura contro l'eccessiva stimolazione mitogenica, che potrebbe essere EGFR

dipendente. Pazienti RXR-positivi si manifestano resistenza agli agenti anti-EGFR potrebbero beneficiare di amministrazione rexinoid.

537: Cheepala SB, Yin W, Syed Z, Gill JN, McMillian A, Kleiner HE, Lynch M, Loganantharaj R, Trutschl M, Cvek U, Clifford JL.

### **Identification of the B-Raf/Mek/Erk MAP kinase pathway as a target for all-trans retinoic acid during skin cancer promotion.**

Mol Cancer. 2009 May 11;8:27. PubMed PMID: 19432991;PubMed Central PMCID: PMC2685120.

**BACKGROUND:** Retinoids have been studied extensively for their potential as therapeutic and chemopreventive agents for a variety of cancers, including nonmelanoma skin cancer (NMSC). Despite their use for many years, the mechanism of action of retinoids in the prevention of NMSC is still unclear. In this study we have attempted to understand the chemopreventive mechanism of all-trans retinoic acid (ATRA), a primary biologically active retinoid, in order to more efficiently utilize retinoids in the clinic.

**RESULTS:** We have used the 2-stage dimethylbenzanthracene (DMBA)/12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) mouse skin carcinogenesis model to investigate the chemopreventive effects of ATRA. We have compared the gene expression profiles of control skin to skin subjected to the 2-stage protocol, with or without ATRA, using Affymetrix 430 2.0 DNA microarrays. Approximately 49% of the genes showing altered expression with TPA treatment are conversely affected when ATRA is co-administered. The activity of these genes, which we refer to as 'counter-regulated', may contribute to chemoprevention by ATRA. The counter-regulated genes have been clustered into functional categories and bioinformatic analysis has identified the B-Raf/Mek/Erk branch of the MAP kinase pathway as one containing several genes whose upregulation by TPA is blocked by ATRA. We also show that ATRA blocks signaling through this pathway, as revealed by immunohistochemistry and Western blotting. Finally, we found that blocking the B-Raf/Mek/Erk pathway with a pharmacological inhibitor, Sorafenib (BAY43-9006), induces squamous differentiation of existing skin SCCs formed in the 2-stage model.

**CONCLUSION:** These results indicate that ATRA targets the B-Raf/Mek/Erk signaling pathway in the 2-stage mouse skin carcinogenesis model and this activity coincides with its chemopreventive action. This demonstrates the potential for targeting the B-Raf/Mek/Erk pathway for chemoprevention and therapy of skin SCC in humans. In addition our DNA microarray results provide the first expression signature for the chemopreventive effect of ATRA in a mouse skin cancer model. This is a potential source for novel targets for ATRA and other chemopreventive and therapeutic agents that can eventually be tested in the clinic.

### **Identificazione della via di segnale B-Raf/Mek/Erk MAP chinasi come target per l'acido tutto-trans-retinoico durante lo sviluppo del cancro alla pelle .**

**BACKGROUND:** I retinoidi sono stati studiati estesamente per il loro potenziale come agenti terapeutici e chemiopreventivi per una varietà di tumori, tra cui il cancro della pelle non melanoma (TCNM). Nonostante il loro uso per molti anni, il meccanismo d'azione dei retinoidi nella prevenzione di TCNM è ancora chiaro. In questo studio abbiamo cercato di capire il meccanismo chemiopreventivo di tutto-trans retinoico (ATRA), un retinoide primario biologicamente attiva, al fine di utilizzare in modo più efficiente i retinoidi nella clinica. **RISULTATI:** Abbiamo usato la dimethylbenzanthracene a 2 stadi (DMBA) / 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetato (TPA) pelle modello murino cancerogenesi per studiare gli effetti chemiopreventivi di ATRA. Abbiamo confrontato i profili di espressione genica di pelle di controllo per la pelle sottoposta al protocollo a 2 stadi, con o senza ATRA, utilizzando Affymetrix

430 2,0 DNA microarray. Circa il 49% dei geni che mostrano alterata espressione con il trattamento TPA sono inversamente influenzati ATRA è co-somministrato. L'attività di questi geni, che ci riferiamo come 'contro-regolata', possono contribuire alla chemioprevenzione con ATRA. I geni anti-regolamentato siano stati raggruppati in categorie funzionali e di analisi bioinformatica ha individuato il ramo B-Raf/Mek/Erk della via MAP chinasi come quella che contiene diversi geni la cui upregulation da TPA è bloccato da ATRA. Mostriamo anche che blocca ATRA segnalazione attraverso questa via, come rivelato da immunostochimica e Western blotting. Infine, abbiamo trovato che il blocco della via B-Raf/Mek/Erk con un inibitore farmacologico, Sorafenib (BAY43-9006), induce la differenziazione squamosa di SCC pelle esistente formata nel modello a 2 stadi. CONCLUSIONE: Questi risultati indicano che gli obiettivi ATRA B-Raf/Mek/Erk la via di segnalazione nel modello a 2 stadi carcinogenesi mouse pelle e questa attività coincide con la sua azione chemiopreventiva. Questo dimostra il potenziale di targeting B-Raf/Mek/Erk la via per la chemioprevenzione e la terapia di SCC pelle negli esseri umani. Inoltre i nostri risultati DNA microarray fornire la firma prima espressione per l'effetto chemiopreventivo di ATRA in un modello di mouse cancro della pelle. Questa è una fonte potenziale di nuovi obiettivi per ATRA e di altri agenti chemiopreventivi e terapeutici che possono eventualmente essere testato in clinica

544: Kim SH, Cho SS, Simkhada JR, Lee HJ, Kim SW, Kim TS, Yoo JC.

**Enhancement of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>- and all-trans retinoic acid-induced HL-60 leukemia cell differentiation by Panax ginseng.**

Biosci Biotechnol Biochem. 2009May;73(5):1048-53. Epub 2009 May 7. PubMed PMID: 19420713.

Ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer) has a wide range of therapeutic uses including cancer treatment. Human promyelocytic leukemia cells differentiate into monocytes or granulocytes when treated with 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> [1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>] or all-trans retinoic acid (ATRA). Treatment of HL-60 cells with zero to 100 microg/ml of a methanol extract of ginseng for 72 h induced a small increase in cell differentiation. Surprisingly, a synergistic induction of differentiation was observed when HL-60 cells were treated with ATRA or 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> and the extract. The inhibitors of protein kinase C (PKC) and extracellular signal-regulated kinase (ERK), but not of phosphoinositide 3-kinase (PI3-K), inhibited the HL-60 differentiation induced by the extract in combination with ATRA or 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, signifying that PKC and ERK were involved in the cell differentiation enhancement by the extract. These results suggest that the ability of a methanol extract of ginseng to enhance the differentiation potential of ATRA or 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> may improve the ultimate outcome of acute promyelocytic leukemia therapy.

**Aumento di 1,25-diidrossivitamina D<sub>3</sub>- e della differenziazione delle cellule leucemiche HL-60 indotta dall'acido tutto-trans retinoico tramite il ginseng Panax.**

Ginseng (*Panax ginseng* CA Meyer) ha una vasta gamma di usi terapeutici compreso il trattamento del cancro. Cellule di leucemia promielocitica umana differenziarsi in monociti o granulociti quando trattati con 1,25-diidrossivitamina D<sub>3</sub> [1,25 - (OH) (2) D (3)], o acido all-trans retinoico (ATRA). Il trattamento di cellule HL-60 con zero a 100 microg / ml di metanolo estratto di ginseng per 72 ore ha indotto un piccolo incremento nella differenziazione cellulare. Sorprendentemente, una induzione sinergica di differenziazione è stata osservata in cellule HL-60 sono stati trattati con ATRA o 1,25 - (OH) (2) D (3) e l'estratto. Gli inibitori della proteina chinasi C (PKC) ed extracellulare signal-regulated chinasi (ERK), ma non di fosfoinositide 3-chinasi (PI3-K), ha inibito la HL-60 differenziazione indotta dalla estratto in combinazione con ATRA o 1,25 - (OH) (2) D (3), a significare che la PKC e ERK sono stati coinvolti nella valorizzazione della differenziazione delle cellule da parte l'estratto. Questi risultati suggeriscono che la capacità di un estratto di ginseng metanolo per aumentare il potenziale di differenziazione di ATRA o 1,25 - (OH) (2) D (3) può migliorare il risultato finale della terapia con leucemia promielocitica acuta.

546: Han YH, Zhou H, Kim JH, Yan TD, Lee KH, Wu H, Lin F, Lu N, Liu J, Zeng JZ, Zhang XK.

**A unique cytoplasmic localization of retinoic acid receptor-gamma and its regulations.**

J Biol Chem. 2009 Jul 3;284(27):18503-14. Epub 2009 May 5. PubMed PMID: 19416983; PubMed Central PMCID: PMC2709335.

Recent evidence suggests that extranuclear action of retinoid receptors is involved in mediating the pleiotropic effects of retinoids. However, whether they reside in the cytoplasm remains elusive. Here, we showed that retinoic acid receptor-gamma (RARgamma) was cytoplasmic in confluent cells, or when cells were released from serum depletion or treated with growth factors. In studying the regulation of RARgamma subcellular localization, we observed that ectopically overexpressed RARgamma was mainly cytoplasmic irrespective of serum concentration and cell density. The cytoplasmic retention of RARgamma was inhibited by ligand retinoic acid (RA). In addition, coexpression of retinoid X receptor-alpha (RXRalpha) resulted in nuclear localization of RARgamma through their heterodimerization. Mutagenesis studies revealed that a C-terminal fragment of RXRalpha potently prevents RA-induced RARgamma nuclear localization and transcriptional function. Furthermore, our results showed that the cytoplasmic retention of RARgamma was due to the presence of its unique N-terminal A/B domain, which was subject to regulation by p38 MAPK-mediated phosphorylation. Deletion or mutation of the N-terminal A/B domain largely impaired its cytoplasmic localization. Together, our data demonstrate that the subcellular localization of RARgamma is regulated by complex interactions among ligand binding, receptor phosphorylation, and receptor dimerizations.

**Una localizzazione citoplasmatica unica del recettore dell'acido retinoico gamma e sua regolazione**

Prove recenti suggeriscono che l'azione extranucleare dei recettori dei retinoidi è coinvolto nel mediare gli effetti pleiotropici dei retinoidi. Tuttavia, se essi risiedono nel citoplasma resta sfuggente. Qui, abbiamo dimostrato che l'acido retinoico recettore-gamma (RARgamma) è stato citoplasmatica in cellule confluenti, o quando le cellule sono state rilasciate dalla riduzione dello strato di siero o trattati con fattori di crescita. Nello studiare la regolazione della localizzazione subcellulare RARgamma, abbiamo osservato che ectopicamente sovraespresso RARgamma era prevalentemente citoplasmatica a prescindere dalla concentrazione di siero e densità delle cellule. La ritenzione citoplasmatica di RARgamma è stato inibito da legante l'acido retinoico (RA). Inoltre, coespressione del recettore retinoide X-alfa (RXRalpha) ha determinato la localizzazione nucleare di RARgamma attraverso le loro eterodimerizzazione. Gli studi di mutagenesi hanno rivelato che un frammento C-terminale del RXRalpha impedisce potentemente RA-indotta di localizzazione nucleare RARgamma e la funzione della trascrizione. Inoltre, i nostri risultati hanno dimostrato che la ritenzione citoplasmatica di RARgamma era dovuta alla presenza di sua esclusiva N-terminal A / B del dominio, che è stata oggetto di regolamentazione da parte fosforilazione MAPK p38-mediata. La cancellazione o la mutazione del N-terminale A / B del dominio in gran parte compromessa la sua localizzazione citoplasmatica. Insieme, i nostri dati dimostrano che la localizzazione subcellulare di RARgamma è regolata da complesse interazioni tra ligando, fosforilazione recettoriale, e dimerizations recettore.

553: Kelly K, Kittelson J, Franklin WA, Kennedy TC, Klein CE, Keith RL, Dempsey EC, Lewis M, Jackson MK, Hirsch FR, Bunn PA, Miller YE.

**A randomized phase II chemoprevention trial of 13-CIS retinoic acid with or without alpha tocopherol or observation in subjects at high risk for lung cancer.**

Cancer Prev Res (Phila).2009 May;2(5):440-9. Epub 2009 Apr 28. PubMed PMID: 19401528.

No chemoprevention strategies have been proven effective for lung cancer. We evaluated the effect of 13-cis retinoic acid (13-cis RA), with or without alpha tocopherol, as a lung cancer chemoprevention agent in a phase II randomized controlled clinical trial of adult subjects at high risk for lung cancer as defined by the presence of sputum atypia, history of smoking, and airflow obstruction, or a prior surgically cured nonsmall cell lung cancer (disease free, >3 years). Subjects were randomly assigned to receive either 13-cis RA, 13-cis RA plus alpha tocopherol (13-cis RA/alpha toco) or observation for 12 months. Outcome measures are derived from histologic evaluation of bronchial biopsy specimens obtained by bronchoscopy at baseline and follow-up. The primary outcome measure is treatment "failure" defined as histologic progression (any increase in the maximum histologic score) or failure to return for follow-up bronchoscopy. Seventy-five subjects were randomized (27/22/26 to observations/13-cis RA/13-cis RA/alpha toco); 59 completed the trial; 55 had both baseline and follow-up bronchoscopy. The risk of treatment failure was 55.6% (15 of 27) and 50% (24 of 48) in the observation and combined (13 cis RA plus 13 cis RA/alpha toco) treatment arms, respectively (odds ratio adjusted for baseline histology, 0.97; 95% confidence interval, 0.36-2.66; P = 0.95). Among subjects with complete histology data, maximum histology score in the observation arm increased by 0.37 units and by 0.03 units in the treated arms (difference adjusted for baseline, -0.18; 95% confidence interval, -1.16 to 0.81; P = 0.72). Similar (nonsignificant) results were observed for treatment effects on endobronchial proliferation as assessed by Ki-67 immunolabeling. Twelve-month treatment with 13-cis RA produced nonsignificant changes in bronchial histology, consistent with results in other trials. Agents advancing to phase III randomized trials should produce greater histologic changes. The addition of alpha tocopherol did not affect toxicity.

**Un trial di chemioprevenzione randomizzato di fase II dell'acido retinoico 13-CIS con o senza l'alfa-tocoferolo o osservazione nei soggetti con alto rischio di cancro al polmone.**

No strategie di chemioprevenzione si sono dimostrati efficaci per il cancro polmonare. Abbiamo valutato l'effetto della 13-cis retinoico (13-cis RA), con o senza alfa tocoferolo, come agente di chemioprevenzione del cancro del polmone in una fase II, randomizzato e controllato studio clinico dei soggetti adulti ad alto rischio di cancro ai polmoni come definito dal presenza di atipie espettorato, storia di fumo, e di ostruzione delle vie aeree, o da un precedente curato chirurgicamente cellule di cancro al polmone nonsmall (libera da malattia,> 3 anni). I soggetti sono stati assegnati in modo casuale a ricevere 13-cis RA, 13-cis RA più alfa-tocoferolo (13-cis RA / toco alfa) o l'osservazione per 12 mesi. Le misure di outcome sono derivati dalla valutazione istologica di campioni biotici bronchiali broncoscopia ottenuti al basale e follow-up. L'outcome primario è il trattamento "insuccesso", definito come progressione istologica (un aumento del punteggio istologico massimo) o la mancata restituzione di follow-up broncoscopia. Settantacinque i soggetti sono stati randomizzati (27/22/26 a observations/13-cis RA/13-cis RA / toco alfa), 59 hanno completato lo studio, 55 avevano sia basale che al follow-up broncoscopia. Il rischio di fallimento del trattamento è stata del 55,6% (15 di 27) e il 50% (24 di 48) per l'osservazione e combinata (13 più 13 RA cis cis RA / toco alfa) i bracci di trattamento, rispettivamente (odds ratio aggiustato per istologia di base, 0,97; intervallo di confidenza 95% 0,36-2,66, p = 0,95). Tra i soggetti con i dati istologici completi, il punteggio massimo di istologia nel braccio di osservazione aumentato di 0,37 unità e di 0,03 unità nel braccio trattato (differenza aggiustata per basale, -0,18;

intervallo di confidenza 95%, -1,16 a 0,81, P = 0,72). Simile (non significativo) i risultati sono stati osservati per gli effetti del trattamento sulla proliferazione endobronchiale come valutato dal Ki-67 immunomarcatura. Dodici mesi di trattamento con 13-cis RA prodotto cambiamenti non significativi in istologia bronchiale, coerenti con i risultati di altri studi. Agenti di passare al trial di fase III randomizzato dovrebbe produrre alterazioni istologiche maggiore. L'aggiunta di alfa-tocoferolo non ha influenzato la tossicità.

554: Housley WJ, O'Connor CA, Nichols F, Puddington L, Lingenheld EG, Zhu L, Clark RB.

#### **PPARgamma regulates retinoic acid-mediated DC induction of Tregs.**

J LeukocBiol. 2009 Aug;86(2):293-301. Epub 2009 Apr 28. PubMed PMID: 19401386; PubMedCentral PMCID: PMC2814813.

CD4+ CD25+ Foxp3+ Tregs are critical regulators of immune responses and autoimmune diseases. nTregs are thymically derived; iTregs are converted in the periphery from CD4+ CD25- Foxp3- Tregs. Recent studies reported that GALT CD103+ DCs mediated enhanced iTreg conversion via the secretion of RA. However, the factors regulating RA secretion and hence, the induction of iTregs by DCs are not yet clear. Activation of the nuclear hormone receptor PPARgamma has been shown to induce RA expression in human DCs, and thus, we postulated that PPARgamma activation in DCs may be an important regulator of RA secretion and iTreg generation. Using in vitro and in vivo approaches, we now demonstrate that PPARgamma activation enhances iTreg generation through increased RA synthesis from murine splenic DCs. In addition, we demonstrate that inhibition of DC PPARgamma decreases iTreg generation, suggesting a role for endogenous PPARgamma ligands in this process. Overall, our findings suggest that PPARgamma may be important as a factor that stimulates DCs to produce RA and as a potential mechanism by which PPARgamma ligands ameliorate autoimmunity.

#### **PPARgamma regola l'induzione DC di Tregs mediata dall'acido retinoico.**

CD4 + CD25 + Foxp3 + Tregs sono regolatori critici delle risposte immunitarie e le malattie autoimmuni. nTregs sono thymically derivati; iTregs vengono convertiti in periferia da cellule CD4 + CD25-Foxp3-Tregs. Recenti studi hanno riferito che GALT CD103 + DCs mediata rafforzata iTreg conversione attraverso la secrezione di RA. Tuttavia, i fattori che regolano la secrezione di RA e, di conseguenza, l'induzione di iTregs dalle DC non sono ancora chiare. L'attivazione del recettore nucleare PPAR-gamma ormone ha dimostrato di indurre l'espressione RA nei PVS umana, e quindi, abbiamo ipotizzato che l'attivazione di PPARgamma nei PVS può essere un importante regolatore della secrezione di RA e la generazione di iTreg. Utilizzo in vitro e in vivo approcci, noi ora dimostrare che l'attivazione di PPAR-gamma migliora iTreg generazione attraverso una maggiore sintesi RA da DC murine splenica. Inoltre, abbiamo dimostrato che l'inibizione della DC PPARgamma diminuisce iTreg generazione, suggerendo un ruolo per i ligandi endogeni PPARgamma in questo processo. Nel complesso, i nostri risultati suggeriscono che PPARgamma può essere un importante fattore che stimola PVS di produrre RA e come un potenziale meccanismo attraverso il quale PPARgamma ligandi autoimmunità migliorare.

555: Weinstock MA, Lee KC, Chren MM, Marcolivio K; VATTC Trial Group.

### **Quality of life in the actinic neoplasia syndrome: The VA Topical Tretinoin Chemoprevention (VATTC) Trial.**

J Am Acad Dermatol. 2009 Aug;61(2):207-15. Epub 2009 Apr 26. PubMed PMID: 19398145.

**BACKGROUND:** Keratinocyte carcinomas (KCs) are the most common malignancies of the skin. As lesions have a low mortality rate, understanding quality-of-life (QoL) factors is necessary in their management.

**OBJECTIVE:** To assess QoL and associated patient characteristics in those with a history of keratinocyte carcinomas.

**METHODS:** We conducted a cross-sectional study of veterans with a history of KCs enrolled in a randomized controlled trial for chemoprevention of keratinocyte carcinomas. Study dermatologists counted actinic keratoses (AKs) and assessed for skin photodamage. QoL was assessed using Skindex-29 and KC-specific questions. Demographics were self-reported.

**RESULTS:** Participants (n = 931) enrolled at 5 clinical sites had worse QoL on all subscales (emotions, functioning, and symptoms) compared to a reference group of patients without skin disease. Univariate analysis demonstrated worse QoL associated with higher AK count, past 5-fluorouracil (5-FU) use, and greater sun sensitivity. Multivariate analysis demonstrated that higher AK count and past 5-FU use were independently related to diminished QoL. Higher comorbidities showed modest associations on the symptoms and functioning subscales. Number of previous KCs was not independently associated with any QoL differences.

**LIMITATIONS:** Study population may not be generalizable to the general population. Counting of AKs is of limited reliability. Previous 5-FU use is self reported.

**CONCLUSIONS:** A history of ever use of 5-FU and present AKs was strongly associated with worse QoL. We find it more useful to consider these patients as having the chronic condition "actinic neoplasia syndrome," whose burden may be best measured by factors other than their history of KCs.

### **Qualità della vita nella sindrome neoplasica actinica: The VA Topical Tretinoin Chemoprevention (VATTC) Trial.**

**BACKGROUND:** carcinomi cheratinociti (KC) sono le neoplasie più frequenti della pelle. Come lesioni hanno un basso tasso di mortalità, la comprensione della qualità della vita (QoL) fattori è necessario nella loro gestione.

**OBIETTIVO:** Per valutare la qualità di vita e le relative caratteristiche del paziente in quelli con una storia di carcinoma cheratinociti.

**METODI:** Abbiamo condotto uno studio cross-sezionale di veterani con una storia di KC arruolati in un trial controllato randomizzato per la chemioprevenzione del carcinoma cheratinociti. dermatologi Studio contati cheratosi attiniche (AK) e valutati per la pelle fotodanneggiamento. QoL è stata valutata utilizzando Skindex-29 e KC-domande specifiche. Demografia erano auto-riportati.

**RISULTATI:** I partecipanti (n = 931) iscritti alle 5 sedi cliniche era peggiore qualità della vita in tutte le sottoscale (emozioni, del funzionamento e sintomi) rispetto ad un gruppo di riferimento di pazienti senza malattia della pelle. L'analisi univariata ha dimostrato peggiore qualità di vita associata a più alto numero di AK, passato 5-fluorouracile (5-FU) utilizzare, e una maggiore sensibilità al sole. L'analisi multivariata ha dimostrato che l'elevato numero di AK e passato l'uso di 5-FU sono risultati indipendentemente correlati alla qualità della vita diminuisce. Superiore comorbidità ha mostrato associazioni modesto sui sintomi e sottoscale funzionamento. Numero di KC precedente non è stata associata in modo indipendente con tutte le differenze QoL.

**LIMITAZIONI:** popolazione di studio non possono essere generalizzabili alla popolazione generale. Conteggio della cheratosi attinica è di limitata affidabilità. Precedente uso di 5-FU è di per

sé

segnalato.

**CONCLUSIONI:** Una storia di sempre uso di 5-FU e AKs attuale è stata fortemente associata con una peggiore qualità della vita. Per noi è più utile considerare questi pazienti come aventi la condizione cronica "sindrome di neoplasia attiniche," il cui onere può essere meglio misurata da fattori diversi dal loro storia di KC.

556: Giaginis C, Katsamangou E, Tsourouflis G, Zizi-Serbetzoglou D, Kouraklis G, Theocharis S.

**Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and retinoid X receptor-alpha expression in pancreatic ductal adenocarcinoma: association with clinicopathological parameters, tumor proliferative capacity, and patients' survival.**

Med Sci Monit. 2009 May;15(5):BR148-56. PubMed PMID: 19396032.

**BACKGROUND:** Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR-gamma), a ligand-activated transcription factor that forms heterodimers with the retinoid X receptors (RXRs), is overexpressed in various tumors, regulating many aspects of cancer biology. The aim of the present study was to evaluate the clinical significance of PPAR-gamma and RXR-alpha expression in pancreatic adenocarcinoma.

**MATERIAL/METHODS:** PPAR-gamma and RXR-alpha protein expression was assessed immunohistochemically in tumoral samples of 65 pancreatic adenocarcinoma patients and statistically analyzed in relation to clinicopathological characteristics, tumor proliferative capacity, and patients' survival.

**RESULTS:** Of the 65 adenocarcinoma patients, 49 (75%) tested positive for PPAR-gamma and 55 (85%) stained positive for RXR-alpha. RXR-alpha positivity was significantly associated with tumor proliferative capacity and PPAR-gamma positivity ( $p=0.022$  and  $p=0.043$ , respectively). PPAR-gamma and RXR-alpha staining intensity were associated with the histopathological tumor grade ( $p=0.003$  and  $p=0.038$ , respectively). Significant associations of PPAR-gamma staining intensity and RXR-alpha expression with tumor size were also noted ( $p=0.041$  and  $p=0.038$ , respectively). Moderate and intense PPAR-gamma staining intensity was associated with shorter overall survival in univariate analysis (log-rank test,  $p=0.023$ ) and proved to be an independent prognostic factor in multivariate analysis ( $p=0.045$ ), whereas RXR-alpha failed to predict patients' survival.

**CONCLUSIONS:** These data revealed that both PPAR-gamma and RXR-alpha were associated with pancreatic cancer characteristics. PPAR-gamma, but not RXR-alpha, was found to be an independent prognostic indicator. However, further molecular and clinical studies are required to delineate the potential clinical application of PPAR-gamma and RXR-alpha in the prognosis and management of pancreatic adenocarcinoma patients.

**Il recettore gamma attivato dal proliferatore dei perossisomi e l'espressione del recettore alfa X dei retinoidi nell'adenocarcinoma duttale pancreatico: associazione con parametri clinico patologici, capacità proliferativa tumorale e sopravvivenza**

**BACKGROUND:** peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR-gamma), un fattore di trascrizione ligando-attivato che forma eterodimeri con i recettori dei retinoidi X (RXR), è sovraespresso in vari tumori, che regolano molti aspetti della biologia del cancro. Lo scopo del presente studio era di valutare il significato clinico di PPAR-gamma e l'espressione RXR-alfa in adenocarcinoma pancreatico.

**MATERIALE / METODI:** PPAR-gamma e la proteina RXR-alfa è stata valutata l'espressione immunoistochimica in campioni tumorali di 65 pazienti con adenocarcinoma pancreatico e statisticamente analizzati in relazione alle caratteristiche clinico-patologici, la capacità proliferativa del tumore e la sopravvivenza dei pazienti'.

RISULTATI: Dei 65 pazienti con adenocarcinoma, 49 (75%) sono risultati positivi per PPAR-gamma e 55 (dell'85%) tinto positivo per RXR-alfa. positività RXR-alfa è risultato significativamente associato con la capacità proliferativa del tumore e la positività PPAR-gamma ( $p = 0,022$  ep  $= 0,043$ , rispettivamente). PPAR-gamma e l'intensità di colorazione RXR-alfa sono stati associati con il grado istopatologico del tumore ( $p = 0,003$  ep  $= 0,038$ , rispettivamente). associazioni significative di PPAR-gamma intensità di colorazione e di espressione RXR-alfa con le dimensioni del tumore sono stati anche osservato ( $p = 0,041$  ep  $= 0,038$ , rispettivamente). Moderato e intenso PPAR-gamma un'intensità di colorazione è stata associata ad una minore sopravvivenza globale in analisi univariata (log-rank test,  $p = 0.023$ ) e si è dimostrato essere un fattore prognostico indipendente in analisi multivariata ( $p = 0.045$ ), mentre RXR-alfa non è riuscito a predire la sopravvivenza dei pazienti'.

CONCLUSIONI: Questi dati hanno rivelato che sia-PPAR-gamma e RXR-alfa sono stati associati con le caratteristiche cancro al pancreas. PPAR-gamma, ma non RXR-alfa, è risultato essere un indicatore prognostico indipendente. Gli studi, tuttavia, ulteriori molecolari e clinici sono necessari per delineare la possibile applicazione clinica di PPAR-gamma e RXR-alfa nella prognosi e la gestione dei pazienti con adenocarcinoma pancreatico.

557: Lee DD, Stojadinovic O, Krzyzanowska A, Vouthounis C, Blumenberg M, Tomic-Canic M.

### **Retinoid-responsive transcriptional changes in epidermal keratinocytes.**

J Cell Physiol. 2009 Aug;220(2):427-39. PubMed PMID: 19388012.

Retinoids (RA) have been used as therapeutic agents for numerous skin diseases, from psoriasis to acne and wrinkles. While RA is known to inhibit keratinocyte differentiation, the molecular effects of RA in epidermis have not been comprehensively defined. To identify the transcriptional targets of RA in primary human epidermal keratinocytes, we compared the transcriptional profiles of cells grown in the presence or absence of all-trans retinoic acid for 1, 4, 24, 48, and 72 h, using large DNA microarrays. As expected, RA suppresses the protein markers of cornification; however the genes responsible for biosynthesis of epidermal lipids, long-chain fatty acids, cholesterol, and sphingolipids, are also suppressed. Importantly, the pathways of RA synthesis, esterification and metabolism are activated by RA; therefore, RA regulates its own bioavailability. Unexpectedly, RA regulates many genes associated with the cell cycle and programmed cell death. This led us to reveal novel effects of RA on keratinocyte proliferation and apoptosis. The response to RA is very fast: 315 genes were regulated already after 1 h. More than one-third of RA-regulated genes function in signal transduction and regulation of transcription. Using in silico analysis, we identified a set of over-represented transcription factor binding sites in the RA-regulated genes. Many psoriasis-related genes are regulated by RA, some induced, others suppressed. These results comprehensively document the transcriptional changes caused by RA in keratinocytes, add new insights into the molecular mechanism influenced by RA in the epidermis and demonstrate the hypothesis-generating power of DNA microarray analysis.

### **Cambiamenti trascrizionali nella reazione dei retinoidi nei cheratinociti epidermici**

J Cell Physiol. 2009 Aug;220(2):427-39. PubMed PMID: 19388012.

Retinoidi (RA) sono stati utilizzati come agenti terapeutici per le malattie della pelle numerosi, da psoriasi a acne e rughe. Mentre RA è noto per inibire la differenziazione dei cheratinociti, gli effetti molecolari di RA in epidermide non sono state completamente definite. Per identificare i target trascrizionale di AR in cheratinociti primari epidermico umano, abbiamo confrontato i profili di trascrizione di cellule cresciute in presenza o in assenza di acido all-trans retinoico per 1, 4, 24, 48 e 72 h, usando i microarrays del DNA di grandi dimensioni. Come previsto, RA sopprime i marcatori proteici di cheratinizzazione, ma i geni responsabili della biosintesi dei lipidi epidermici, acidi grassi a catena lunga, colesterolo e sfingolipidi, sono soppressi. È importante sottolineare che i percorsi di sintesi RA, esterificazione e il metabolismo sono attivati da RA, pertanto, RA regola la sua biodisponibilità proprio. Inaspettatamente, RA regola molti geni associati con il ciclo cellulare e la morte cellulare programmata. Questo ci ha portato a rivelare effetti romanzo di RA sulla proliferazione dei cheratinociti e apoptosi. La risposta di RA è molto veloce: 315 geni sono stati regolati già dopo 1 h. Più di un terzo dei geni RA-regolati in funzione di trasduzione del segnale e regolazione della trascrizione. Utilizzando analisi in silico, abbiamo identificato una serie di sovra-rappresentati siti trascrizione fattore vincolante nei geni RA-regolamentato. Molti geni legati alla psoriasi sono regolati da RA, alcuni indotti, altri soppressi. Questi risultati ampiamente documentare i cambiamenti trascrizionali causate da RA nei cheratinociti, aggiungere nuove conoscenze sul meccanismo molecolare influenzata da RA nell'epidermide e dimostrare la potenza generatrice di ipotesi di analisi di DNA microarray.

558: Wu PY, Lin YC, Chang CL, Lu HT, Chin CH, Hsu TT, Chu D, Sun SH.

**Functional decreases in P2X7 receptors are associated with retinoic acid-induced neuronal differentiation of Neuro-2a neuroblastoma cells.**

Cell Signal. 2009Jun;21(6):881-91. PubMed PMID: 19385050.

Neuro-2a (N2a) cells are derived from spontaneous neuroblastoma of mouse and capable to differentiate into neuronal-like cells. Recently, P2X7 receptor has been shown to sustain growth of human neuroblastoma cells but its role during neuronal differentiation remains unexamined. We characterized the role of P2X7 receptors in the retinoic acid (RA)-differentiated N2a cells. RA induced N2a cells differentiation into neurite bearing and neuronal specific proteins, microtubule-associated protein 2 (MAP2) and neuronal specific nuclear protein (NeuN), expressing neuronal-like cells. Interestingly, the RA-induced neuronal differentiation was associated with decreases in the expression and function of P2X7 receptors. Functional inhibition of P2X7 receptors by P2X7 receptor selective antagonists, 5'-triphosphate, periodate-oxidized 2',3'-dialdehyde ATP (oATP), brilliant blue G (BBG) or A438079 induced neurite outgrowth. In addition, RA and oATP treatment stimulated the expression of neuron-specific class III beta-tubulin (TuJ1), and knockdown of P2X7 receptor expression by siRNA induced neurite outgrowth. To elucidate the possible mechanism, we found the levels of basal intracellular Ca<sup>2+</sup> concentrations ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) were decreased in either RA- or oATP-differentiated or P2X7receptor knockdown N2a cells. Simply cultured N2a cells in low Ca<sup>2+</sup> medium induced a 2-fold increase in neurite length. Treatment of N2a cells with ATP hydrolase apyrase and the P2X7 receptors selective antagonist oATP or BBG decreased cell viability and cell number. Nevertheless, oATP but not BBG decreased cell proliferation and cell cycle progression. These results suggest for the first time that decreases in expression/function of P2X7 receptors are involved in neuronal differentiation. We provide additional evidence shown that the ATP release-activated P2X7 receptor is important in maintaining cell survival of N2a neuroblastoma cells.

**Le diminuzione funzionali dei recettori P2X7 sono associate con il differenziamento neuronale acido retinoico-indotto delle cellule di neuroblastoma Neuro-2a.**

Neuro-2a (N2a) sono derivati da cellule di neuroblastoma spontanea di mouse e capaci di differenziarsi in cellule neuronali-like. Recentemente, recettore P2X7 ha dimostrato di sostenere la crescita di cellule di neuroblastoma umano, ma il suo ruolo durante la differenziazione neuronale resta unexamined. We caratterizzato il ruolo di P2X7 recettori dell'acido retinoico (RA)-cellule differenziate N2a. RA ha indotto N2a differenziazione delle cellule nel cuscinetto neurite e neuronali specifiche proteine, proteina associata ai microtubuli 2 (MAP2) e neuronale specifica proteina nucleare (NeuN), esprimendo le cellule neuronali-like. È interessante notare che la RA indotto la differenziazione neuronale è stato associato ad una diminuzione dell'espressione e della funzione di P2X7 recettori. inibizione funzionale dei recettori P2X7 da P2X7 antagonisti del recettore selettivo, 5'-trifosfato, periodato-ossidato 2', 3'-dialdeide ATP (OATP), blu brillante G (BBG) oppure A438079 indotto crescita dei neuriti. Inoltre, RA e il trattamento OATP stimolato l'espressione di neurone-specific classe III beta-tubulina (TuJ1), e colpo di P2X7 espressione dei recettori di crescita dei neuriti siRNA indotto. Per chiarire il possibile meccanismo, abbiamo trovato i livelli basali di concentrazioni intracellulari di Ca<sup>2+</sup> + ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) sono diminuiti in entrambi RA-o OATP dissociati o P2X7receptor atterramento cellule N2a. Basta una coltura di cellule N2a in basso Ca<sup>2+</sup> + medio ha indotto un aumento di 2 volte della lunghezza dei neuriti. Il trattamento di cellule con N2a apyrase idrolasi ATP e il P2X7 recettori antagonista selettivo OATP o BBG diminuzione della vitalità cellulare e numero di cellulare. Tuttavia, OATP ma non BBG diminuita proliferazione cellulare e la progressione del ciclo cellulare. Questi risultati suggeriscono per la prima volta che la diminuzione di espressione / funzione di P2X7 recettori sono coinvolti nella differentiation. We

neuronale fornire ulteriori prove dimostrato che il rilascio di ATP-activated recettore P2X7 è importante nel mantenimento della sopravvivenza cellulare di cellule di neuroblastoma N2a.

560: Watters JL, Gail MH, Weinstein SJ, Virtamo J, Albanes D.

### **Associations between alpha-tocopherol, beta-carotene, and retinol and prostate cancer survival.**

Cancer Res. 2009 May 1;69(9):3833-41. Epub 2009 Apr 21. PubMed PMID:19383902; PubMed Central PMCID: PMC2787239.

Previous studies suggest that carotenoids and tocopherols (vitamin E compounds) may be inversely associated with prostate cancer risk, yet little is known about how they affect prostate cancer progression and survival. We investigated whether serum alpha-tocopherol, beta-carotene, and retinol concentrations, or the alpha-tocopherol and beta-carotene trial supplementation, affected survival of men diagnosed with prostate cancer during the alpha-Tocopherol, beta-Carotene Cancer Prevention Study, a randomized, double-blind, placebo-controlled primary prevention trial testing the effects of beta-carotene and alpha-tocopherol supplements on cancer incidence in adult male smokers in southwestern Finland (n = 29,133). Prostate cancer survival was examined using the Kaplan-Meier method with deaths from other causes treated as censoring, and using Cox proportional hazards regression models with hazard ratios (HR) and 95% confidence intervals (CI) adjusted for family history of prostate cancer, age at randomization, benign prostatic hyperplasia, age and stage at diagnosis, height, body mass index, and serum cholesterol. As of April 2005, 1,891 men were diagnosed with prostate cancer and 395 died of their disease. Higher serum alpha-tocopherol at baseline was associated with improved prostate cancer survival (HR, 0.67; 95% CI, 0.45-1.00), especially among cases who had received the alpha-tocopherol intervention of the trial and who were in the highest quintile of alpha-tocopherol at baseline (HR, 0.51; 95% CI, 0.20-0.90) or at the 3-year follow-up measurement (HR, 0.26; 95% CI, 0.09-0.71). Serum beta-carotene, serum retinol, and supplemental beta-carotene had no apparent effects on survival. These findings suggest that higher alpha-tocopherol (and not beta-carotene or retinol) status increases overall prostate cancer survival. Further investigations, possibly including randomized studies, are needed to confirm this observation.

### **Associazioni tra retinolo alfa-tocoferolo e beta-carotene e la sopravvivenza del cancro alla prostata.**

Precedenti studi suggeriscono che i carotenoidi e tocoferoli (composti di vitamina E) possono essere inversamente associati al rischio di cancro alla prostata, ancora poco si sa su come influenzano la progressione del cancro alla prostata e sopravvivenza. Abbiamo studiato se sierici di alfa-tocoferolo, beta-carotene, e le concentrazioni di retinolo, o la supplementazione di prova di alfa-tocoferolo e beta-carotene, la sopravvivenza degli uomini colpiti con diagnosi di cancro alla prostata durante l'alfa tocoferolo, beta-Carotene Cancer Prevention Study, un randomizzato, in doppio cieco, controllato con placebo, di prevenzione primaria verificano gli effetti del beta-carotene e supplementi di alfa-tocoferolo sull'incidenza del cancro nei fumatori maschi adulti nel sud ovest della Finlandia (n = 29.133). sopravvivenza cancro alla prostata è stata esaminata con il metodo di Kaplan-Meier con morti per altre cause trattate come la censura, e l'utilizzo di modelli di regressione proporzionale di Cox pericoli con hazard ratio (HR) ed intervalli di confidenza al 95% (CI) aggiustato per storia familiare di cancro alla prostata, l'età al momento della randomizzazione, iperplasia prostatica benigna, l'età e stadio alla diagnosi, l'altezza, indice di massa corporea, e colesterolemia. A partire da aprile 2005, 1.891 uomini sono stati diagnosticati con cancro alla

prostata e 395 morti della loro malattia. Superiore alfa-tocoferolo siero al basale era associato ad un miglioramento della sopravvivenza cancro alla prostata (HR, 0,67; 95% CI, 0,45-1,00), soprattutto tra i casi che avevano ricevuto l'intervento di alfa-tocoferolo del processo e che erano nel più alto quintile di alfa-tocoferolo al basale (HR, 0,51; 95% CI, 0,20-0,90) o di 3 anni di follow-up di misura (HR, 0,26; 95% CI, 0,09-0,71). Siero beta-carotene, retinolo nel siero, e supplementari beta-carotene non ha avuto effetti evidenti sulla sopravvivenza. Questi risultati suggeriscono che l'aumento alfa-tocoferolo (e non di beta-carotene o retinolo) stato un incremento generale di sopravvivenza cancro alla prostata. Ulteriori indagini, eventualmente compresi gli studi randomizzati sono necessari per confermare questa osservazione.

566: Volate SR, Muga SJ, Issa AY, Nitcheva D, Smith T, Wargovich MJ.

### **Epigenetic modulation of the retinoid X receptor alpha by green tea in the azoxymethane-Apc Min/+ mouse model of intestinal cancer.**

Mol Carcinog. 2009 Oct;48(10):920-33.PubMed PMID: 19378291.

We investigated the possible mechanisms of inhibition of colorectal carcinogenesis by green tea (GT) in azoxymethane-treated (AOM) Apc(Min/+) mice. Mice received water or a 0.6% (w/v) solution of GT as the only source of beverage. GT treatment commenced at the 8th week of age and lasted for 8 wk. The treatment caused a statistically significant reduction in the number of newly formed tumors (28%,  $P < 0.05$ ). Immunohistochemical analysis showed that GT decreased the levels of beta-catenin and its downstream target cyclin D1. To probe a mechanism, we further investigated the expression of retinoic X receptor alpha (RXR alpha) in AOM/Apc(Min/+) tumors. Our results show that RXR alpha is selectively downregulated in AOM/Apc(Min/+) mouse intestinal tumors. In contrast, other retinoic receptors including retinoic acid receptor alpha (RAR alpha), RAR beta, RXR beta, and RXR gamma were all expressed in Apc(Min/+) adenomas. Furthermore, our results show that RXR alpha downregulation is an early event in colorectal carcinogenesis and is independent of beta-catenin expression. GT significantly increased the protein levels of RXR alpha. In addition, RT-PCR analysis showed that GT induced a similar increase in the levels of RXR alpha mRNA. Genomic bisulfite treatment of colonic DNA followed by pyrosequencing of 24 CpG sites in the promoter region of RXR alpha gene showed a significant decrease in CpG methylation with GT treatment. The results suggest that a low concentration of GT is sufficient to desilence RXR alpha and inhibit intestinal tumorigenesis in the Apc(Min/+) mouse.

### **Modulazione epigenetica del recettore retinoico alfa X attraverso tè verde nel modello murino di cancro intestinale azoxymethane-Apc Min +.**

Abbiamo studiato i possibili meccanismi di inibizione della carcinogenesi del colon-retto da tè verde (GT) in azoxymethane-trattati (AOM), Apc (Min / +) topi. I topi hanno ricevuto acqua o una soluzione allo 0,6% (w / v) di GT come unica fonte di bevanda. trattamento GT iniziato alla 8a settimana di età e di durata per 8 sett. Il trattamento ha causato una riduzione statisticamente significativa nel numero di tumori di nuova formazione (28%,  $P < 0,05$ ). L'analisi immunostochimica ha dimostrato che GT diminuito i livelli di beta-catenina e la sua destinazione a valle della ciclina D1. Per sondare un meccanismo, abbiamo ulteriormente studiato l'espressione del recettore alfa retinoico X (RXR alfa) in AOM / APC (Min / +) i tumori. I nostri risultati mostrano che RXR alfa è selettivamente inibiti in AOM / APC (Min / +) mouse tumori intestinali. Al contrario, altri recettori retinoico alfa compresi l'acido retinoico recettore (RAR alfa), RAR beta, RXR beta, RXR gamma e sono stati tutti espressi in Apc (Min / +) adenomi. Inoltre, i nostri risultati mostrano che downregulation RXR alfa è un evento precoce nella carcinogenesi del colon-retto ed è indipendente di espressione della beta-catenina. GT significativamente aumentato i livelli di proteina alfa RXR. Inoltre, l'analisi RT-PCR hanno dimostrato che GT ha indotto un aumento simile dei livelli di mRNA RXR alfa. trattamento del bisolfuro di DNA genomico colica seguita da pirosequenziamento di 24 siti CpG nella regione del promotore del gene alfa RXR ha mostrato una diminuzione significativa metilazione CpG con trattamento GT. I risultati suggeriscono che una bassa concentrazione di GT è sufficiente a desilence RXR alfa e inibire la tumorigenisi intestinale nel Apc (Min / +) del mouse.

568: Sadikoglou E, Magoulas G, Theodoropoulou C, Athanassopoulos CM, Giannopoulou E, Theodorakopoulou O, Drainas D, Papaioannou D, Papadimitriou E.

**Effect of conjugates of all-trans-retinoic acid and shorter polyene chain analogues with amino acids on prostate cancer cell growth.**

Eur J Med Chem. 2009 Aug;44(8):3175-87. Epub 2009 Mar 28. PubMed PMID: 19375825.

In the present work, a series of conjugates of amino acids with all-trans-retinoic acid (ATRA) and shorter polyene chain analogues were rationally designed, synthesized by coupling the succinimidyl active esters of the acidic retinoids with appropriately protected amino acids or peptides followed by deprotection, and examined for their possible effect on viability of human prostate cancer LNCaP cells. In contrast to ATRA, all conjugates bearing amino acids with polar side chains showed no inhibitory effect on LNCaP cell proliferation, while conjugates with alpha-amino acids with lipophilic side chain, such as 7, or linear amino acids, such as 9, significantly decreased prostate cancer LNCaP cell number. Interestingly, while the effect of ATRA was RARalpha-dependent, the effect of its active analogues was not inhibited by a selective RARalpha antagonist. Cell cycle analysis showed no effect on cell cycle, while quantitative analysis by annexin V-propidium iodide staining revealed that neither ATRA nor its analogues affected LNCaP cell apoptosis or necrosis. These results demonstrate that compounds 7 and 9 are potentially useful agents that warrant further preclinical development for treatment of prostate cancer.

**Effetto dei coniugati di acido all-trans retinoico e degli analoghi di polieni a catena amminoacidica corta sulla crescita delle cellule del cancro alla prostata.**

Nel presente lavoro, una serie di coniugati di amminoacidi con acido all-trans retinoico (ATRA) e più corta catena polienici analoghi sono stati razionalmente progettati, sintetizzati mediante accoppiamento degli esteri succinimidyl attiva dei retinoidi acide opportunamente protetti con amminoacidi o peptidi seguita da deprotezione, ed esaminare le loro possibili effetti sulla vitalità delle cellule umane del cancro alla prostata LNCaP. In contrasto con ATRA, tutti coniugati cuscinetto amminoacidi con catene laterali polari non ha mostrato alcun effetto inibitorio sulla proliferazione delle cellule LNCaP, mentre i coniugati con gli acidi alfa-amminoacidi con catena laterale lipofila, come 7, o lineare amminoacidi, come la 9, significativamente diminuito carcinoma prostatico LNCaP cella numero. È interessante notare che, mentre l'effetto di ATRA è stato RARalpha-dipendente, l'effetto dei suoi analoghi, attivi non è stato inibito da un antagonista selettivo RARalpha. Analisi del ciclo cellulare non ha mostrato alcun effetto sul ciclo cellulare, mentre l'analisi quantitativa mediante annessina V-ioduro di propidio colorazione è emerso che né ATRA né i suoi analoghi colpite apoptosi delle cellule LNCaP o necrosi. Questi risultati dimostrano che i composti 7 e 9 sono agenti potenzialmente utili che meritano un ulteriore sviluppo preclinico per il trattamento del cancro alla prostata.

570: Huang H, Wu D, Fu J, Chen G.

**Multiple myeloma cells undergo differentiation upon exposure to rosiglitazone and all-trans retinoic acid.**

Leuk Lymphoma. 2009 Jun;50(6):966-73. PubMed PMID: 19373597.

Activation of PPARgamma by its ligands has shown differentiating effects in solid tumors. However, few reports addressed its role in myeloma cells. Our study demonstrated that exposure to PPARgamma ligand (rosiglitazone, RGZ) induced proliferation inhibition and cell cycle arrest in myeloma cells. A combination of RGZ with all-trans retinoic acid (ATRA) can enhance the growth inhibition effects of RGZ. Further study shows that RGZ-treated myeloma cells displayed morphological characteristics of cell differentiation, and more evident signs of differentiation were observed when RGZ was combined with ATRA. These changes were confirmed by the detection of CD49e expression and light chain protein secretion. Similar results were also observed when primary CD138(+) cells were treated with RGZ and ATRA. Collectively, our study revealed that RGZ can induce cell differentiation in myeloma cells and concomitant treatment with ATRA can enhanced the effects of RGZ.

**Cellule del mieloma multiplo sottoposte ad una differenziazione in seguito all'esposizione di acido all-trans retinoico e rosiglitazone.**

L'attivazione di PPAR-gamma con i suoi ligandi ha mostrato effetti di differenziazione nei tumori solidi. Tuttavia, pochi studi affrontato il suo ruolo in cellule di mieloma. Il nostro studio ha dimostrato che l'esposizione ai ligandi PPAR-gamma (rosiglitazone, RGZ) inibizione della proliferazione indotta e arresto del ciclo cellulare in cellule di mieloma. Una combinazione di RGZ con tutti i trans retinoico (ATRA) può aumentare gli effetti di inibizione della crescita di RGZ. Ulteriori studi mostrano che le cellule del mieloma RGZ-trattati presentano caratteristiche morfologiche del differenziamento cellulare, ed i segni più evidenti di differenziazione sono stati osservati quando RGZ è stato combinato con ATRA. Queste modifiche sono state confermate dal rinvenimento di espressione e di luce CD49e secrezione di proteine a catena. Risultati simili sono stati osservati anche quando CD138 primaria (+) le cellule sono state trattate con ATRA e RGZ. Collettivamente, il nostro studio ha rivelato che RGZ può indurre la differenziazione delle cellule in cellule di mieloma e trattamento concomitante con ATRA può migliorato gli effetti di RGZ.

576: Poulain S, Evenou F, Carré MC, Corbel S, Vignaud JM, Martinet N.

### **Vitamin A/retinoids signalling in the human lung.**

Lung Cancer. 2009 Oct;66(1):1-7. Epub2009 Apr 5. Review. PubMed PMID: 19346027.

Vitamin A is used as a generic term for all vitamin A derivatives with retinol-like biological activity. Retinol is the main parent compound for vitamin A. It derives from carotenoids (provitamin A) and also directly from the pre-formed vitamin A contained in the diet. The term "retinoid" is a generic descriptor of compounds structurally related to vitamin A and the synthetic analogues of retinol with or without biological activity. Retinoic acid is the active cellular catabolite. Vitamin A/retinoids have been given cancer-preventive functions and subsequently used in clinical trials to reduce lung cancer incidence in high-risk individuals. The results obtained have been in contradiction with both in vivo and in vitro promising studies. It seems therefore necessary to develop a better understanding of the vitamin A/retinoids signalling pathways in the lung. With this aim, we summarise the relevant knowledge focussed on the lung.

### **Vitamina A / retinoidi: segnalazione nel polmone umano.**

La vitamina A è utilizzato come termine generico per tutti i derivati della vitamina A con retinolo-come attività biologica. Retinolo è il composto principale principale per la vitamina A. E 'deriva da carotenoidi (provitamina A) e anche direttamente dalla vitamina A preformata contenute nella dieta. Il termine "retinoidi" è un descrittore generico di composti strutturalmente correlata alla vitamina A e la analoghi sintetici del retinolo, con o senza attività biologica. L'acido retinoico è attivo il cataboliti cellulari. Vitamina A / retinoidi sono state date le funzioni di prevenzione del cancro e successivamente utilizzati nelle sperimentazioni cliniche per ridurre l'incidenza di cancro polmonare in soggetti ad alto rischio. I risultati ottenuti sono in contraddizione con sia in vivo e in vitro promettenti. Sembra quindi necessario sviluppare una migliore comprensione della vitamina A / retinoidi vie di segnalazione nel polmone. Con questo obiettivo, riassumiamo le conoscenze pertinenti concentrata sul polmone.

577: Huang S, Laoukili J, Epping MT, Koster J, Hölzel M, Westerman BA, Nijkamp W, Hata A, Asgharzadeh S, Seeger RC, Versteeg R, Beijersbergen RL, Bernards R.

Cancer Cell. 2009 Apr 7;15(4):328-40. PubMedPMID: 19345331; PubMed Central PMCID: PMC2693316.

Comment in: Cancer Cell. 2009 Apr 7;15(4):249-51.

**ZNF423 is critically required for retinoic acid-induced differentiation and is a marker of neuroblastoma outcome.**

Retinoids play key roles in differentiation, growth arrest, and apoptosis and are increasingly being used in the clinic for the treatment of a variety of cancers, including neuroblastoma. Here, using a large-scale RNA interference-based genetic screen, we identify ZNF423 (also known as Ebfaz, OAZ, or Zfp423) as a component critically required for retinoic acid (RA)-induced differentiation. ZNF423 associates with the RARalpha/RXRalpha nuclear receptor complex and is essential for transactivation in response to retinoids. Downregulation of ZNF423 expression by RNA interference in neuroblastoma cells results in a growth advantage and resistance to RA-induced differentiation, whereas overexpression of ZNF423 leads to growth inhibition and enhanced differentiation. Finally, we show that low ZNF423 expression is associated with poor disease outcome in neuroblastoma patients.

**ZNF423 è criticamente necessario per la differenziazione dell' acido retinoico indotto ed è risultato un marker per il neuroblastoma.**

I retinoidi giocano un ruolo chiave nella differenziazione, arresto della crescita e apoptosi e sono sempre più utilizzati in clinica per il trattamento di diversi tumori, tra cui il neuroblastoma. Qui, con un grande schermo interferenza RNA a base genetica, identifichiamo ZNF423 (noto anche come Ebfaz, OAZ, o Zfp423) come componente critica necessaria per l'acido retinoico (RA)-differenziazione indotta. Associa ZNF423 con il RARalpha / complesso recettoriale RXRalpha nucleare ed è essenziale per transattivazione in risposta ai retinoidi. Down-regulation di espressione ZNF423 da RNA interference in cellule di neuroblastoma risultati in un vantaggio di crescita e resistenza al RA differenziazione, indotta, mentre la sovraespressione di porta ZNF423 per inibizione della crescita e differenziazione avanzata. Infine, mostriamo che la bassa espressione ZNF423 è associato con esito sfavorevole in pazienti disease neuroblastoma.

581: Czeczuga-Semeniuk E, Jarzabek K, Lemancewicz D, Wołczyński S.

**The vitamin A family can significantly decrease the expression of ERbeta of ERs positive breast cancer cells in the presence or absence of ER ligands and paclitaxel.**

GynecolEndocrinol. 2009 May;25(5):287-93. PubMed PMID: 19340624.

Taxanes have high activity against breast cancer cells either as the single agent or in combination with other anticancer compounds. The aim of the study was to determine the effects of vitamin A compounds on the cytotoxic action of paclitaxel and on the expression of ERs in the MCF-7 breast cancer cells. Retinol and beta-carotene, but not retinoids, added to the culture exerted an effect on paclitaxel activity. However, only beta-carotene significantly reduced the percentage of proliferating cells (40.36% +/- 5.64,  $p < 0.01$ ). We observed that vitamin A and its derivatives combined with paclitaxel and estradiol decreased the percentage of proliferating cells, but only in comparison to estradiol group, whereas retinol and lycopene administered together with paclitaxel and tamoxifen decrease significantly the percentage of proliferating cells (36.85% +/- 4.71,  $p < 0.0001$  and 37.22% +/- 1.59,  $p < 0.0001$  respectively, compared with paclitaxel group). We have shown that paclitaxel increases the expression of ERalpha and ERbeta mRNA in MCF-7 line. The strongest effect of transcription inhibition ERalpha (2.5 times) and especially ERbeta (10 times) was observed after addition of 9-cis retinoic acid and paclitaxel. This data suggests a synergistic effect of the compounds on ERbeta down-regulation. Our results support the use of retinoid as treatment of ER positive breast cancer patients.

**La famiglia della vitamina A può ridurre in maniera significativa l'espressione di ERbeta delle cellule del cancro al seno ER positivo, in presenza o assenza di ligandi ER e paclitaxel.**

Taxani sono ad alta attività contro le cellule del cancro al seno sia come monoterapia o in combinazione con altri composti antitumorali. Lo scopo dello studio era di determinare gli effetti della vitamina A composti sulla azione citotossica di paclitaxel e l'espressione di ER-7 in cellule di cancro al seno MCF. Retinolo e beta-carotene, ma non retinoidi, aggiunto alla cultura ha esercitato un effetto sull'attività paclitaxel. Tuttavia, solo il beta-carotene ha ridotto significativamente la percentuale di cellule proliferanti (40,36% +/- 5,64,  $p < 0,01$ ). Abbiamo osservato che la vitamina A e suoi derivati in combinazione con paclitaxel e di estradiolo è diminuita la percentuale di cellule proliferanti, ma solo in confronto al gruppo di estradiolo, mentre retinolo e lycopene somministrato insieme a paclitaxel e diminuire in maniera significativa il tamoxifene la percentuale di cellule proliferanti (36,85% +/- 4,71,  $p < 0,0001$  e 37,22% +/- 1,59,  $p < 0,0001$ , rispettivamente, rispetto al gruppo paclitaxel). Abbiamo dimostrato che aumenta l'espressione di paclitaxel ERalfa e ERbeta mRNA in linea MCF-7. Il più forte effetto di inibizione ERalfa trascrizione (2,5 volte) e soprattutto ERbeta (10 volte) è stata osservata dopo l'aggiunta di 9-cis acido retinoico e paclitaxel. Questi dati suggeriscono un effetto sinergico dei composti in ERbeta down-regulation. I nostri risultati supportano l'uso di retinoidi è il trattamento di pazienti con carcinoma mammario ER positivo.

583: Schenk JM, Riboli E, Chatterjee N, Leitzmann MF, Ahn J, Albanes D, Reding DJ, Wang Y, Friesen MD, Hayes RB, Peters U.

**Serum retinol and prostate cancer risk: a nested case-control study in the prostate, lung, colorectal, and ovarian cancer screening trial.**

Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2009 Apr;18(4):1227-31.  
Epub 2009 Mar 31. PubMed PMID: 19336558; PubMed Central PMCID: PMC2717001.

Vitamin A (retinol) plays a key role in the regulation of cell growth and differentiation, and has been studied as a potential chemopreventive agent for prostate cancer. However, findings from epidemiologic studies on the association between circulating retinol concentrations and the risk of prostate cancer are inconsistent. We examined whether serum concentrations of retinol were associated with the risk of prostate cancer in a nested case-control study using 692 prostate cancer cases and 844 matched controls from the Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian Cancer Screening Trial. We estimated the risk of prostate cancer using multivariate, conditional logistic regression to calculate odds ratios and 95% confidence intervals for overall prostate cancer and aggressive disease (stage III or IV or Gleason >7; n = 269). Serum retinol concentrations were not associated with overall prostate cancer risk; however, the highest versus lowest concentrations of serum retinol were associated with a 42% reduction in aggressive prostate cancer risk (P(trend) = 0.02), with the strongest inverse association for high-grade disease (Gleason sum >7; odds ratio, 0.52; 95% confidence interval, 0.32-0.84; P(trend) = 0.01). Our results suggest that higher circulating concentrations of retinol are associated with a decreased risk of aggressive prostate cancer. Further research is needed to better understand the significance of elevations in serum retinol concentrations and the possible biological mechanisms through which retinol affects prostate cancer.

**Siero di retinolo e il rischio di cancro alla prostata: uno studio caso-controllo localizzato e prova di screening dei tumori della prostata, polmone, colon-retto, e ovaio.**

Vitamina A (retinolo) svolge un ruolo chiave nella regolazione della crescita cellulare e la differenziazione, ed è stato studiato come un potenziale agente chemiopreventivo per il cancro alla prostata. Tuttavia, i risultati di studi epidemiologici sulla associazione tra le concentrazioni circolanti di retinolo e il rischio di cancro alla prostata sono incoerenti. Abbiamo valutato se le concentrazioni sieriche di retinolo sono stati associati con il rischio di cancro alla prostata in uno studio caso-controllo nested con 692 casi di cancro alla prostata e 844 controlli appaiati dalla prostata, polmone, colon-retto, e Ovarian Cancer Screening Trial. Abbiamo stimato il rischio di cancro alla prostata con multivariata di regressione logistica condizionale per calcolare le odds ratio e il 95% intervalli di confidenza per il cancro alla prostata generale e malattia aggressiva (stadio III o IV o Gleason > 7; n = 269). Le concentrazioni di retinolo nel siero non sono stati associati al rischio globale cancro alla prostata, ma la concentrazione più alta rispetto al più basso di retinolo nel siero sono stati associati con una riduzione del 42% del rischio di cancro alla prostata aggressivo (P (trend) = 0,02), con la più forte associazione inversa per l'alta -grado della malattia (somma di Gleason > 7, odds ratio 0,52, 95% intervallo di confidenza, 0,32-0,84, p (trend) = 0,01). I nostri risultati indicano che alte concentrazioni circolanti di retinolo sono associati ad un ridotto rischio di cancro alla prostata aggressivo. Sono necessarie ulteriori ricerche per comprendere meglio il significato di un innalzamento delle concentrazioni di retinolo nel siero e le possibili meccanismi biologici attraverso i quali il retinolo colpisce il cancro alla prostata.

590: Müller P, Crofts JD, Newman BS, Bridgewater LC, Lin CY, Gustafsson JA, Ström A.

**SOX9 mediates the retinoic acid-induced HES-1 gene expression in human breast cancer cells.**

Breast Cancer Res Treat. 2010 Apr;120(2):317-26. Epub 2009 Mar 26. PubMed PMID: 19322650.

We have previously shown that the anti-proliferative effect of retinoic acid in human breast cancer cell line MCF-7 is dependent on HES-1 expression. Here we show that retinoic acid induces HES-1 expression via upregulation of transcription factor SOX9. By expressing a dominant negative form of SOX9, disrupting endogenous SOX9 activity, the retinoic acid-induced HES-1 mRNA expression was inhibited. We found an enhancer regulating HES-1 expression: two SOX9 binding sites upstream of the HES-1 gene that were capable of binding SOX9 in vitro. By performing chromatin immunoprecipitation, we showed that SOX9 binding to the HES-1 enhancer was induced by retinoic acid in vivo. In reporter assays, transfection of a SOX9 expression plasmid increased the activity of the HES-1 enhancer. The enhancer responded to retinoic acid; furthermore, the expression of a dominant negative SOX9 abolished this response. Taken together, we present here a novel transcriptional mechanism in regulating hormone-dependent cancer cell proliferation.

**SOX9 media la espressione del gene HES-1 indotta dall'acido retinoico in cellule umane di cancro al seno.**

Abbiamo precedentemente dimostrato che l'effetto anti-proliferativo di acido retinoico nella linea cellulare umana carcinoma mammario MCF-7 è dipendente HES-1 espressione. Qui ci mostrano che l'acido retinoico induce la HES-1 espressione attraverso sovraregolazione di SOX9 fattore di trascrizione. Esprimendo una forma dominante negativa di SOX9, interrompendo l'attività endogena SOX9, l'acido retinoico indotta HES-1 è stata inibita l'espressione di mRNA. Abbiamo trovato un esaltatore di regolazione HES-1 espressione: due siti di legame SOX9 a monte del gene della HES-1 che erano in grado di SOX9 legame in vitro. Con immunoprecipitazione della cromatina dello spettacolo, abbiamo dimostrato che SOX9 vincolante per la HES-1 enhancer è stata indotta da acido retinoico in vivo. In saggi reporter, la trasfezione di un plasmide di espressione SOX9 aumentato l'attività di enhancer HES-1. Il potenziatore risposto acido retinoico, inoltre, l'espressione di un dominante negativo SOX9 abolito questa risposta. Nel loro insieme, presentiamo qui un nuovo meccanismo di regolazione trascrizionale in ormone-dipendente la proliferazione delle cellule tumorali.

592: Qiao YL, Dawsey SM, Kamangar F, Fan JH, Abnet CC, Sun XD, Johnson LL, Gail MH, Dong ZW, Yu B, Mark SD, Taylor PR.

J Natl Cancer Inst. 2009 Apr 1;101(7):507-18. Epub 2009 Mar 24. Erratum in: J Natl Cancer Inst. 2010 Jan 20;102(2):140. PubMed PMID: 19318634; PubMed Central PMCID: PMC2664089.

### **Total and cancer mortality after supplementation with vitamins and minerals: follow-up of the Linxian General Population Nutrition Intervention Trial.**

Erratum in: J Natl Cancer Inst. 2010 Jan 20;102(2):140.

**BACKGROUND:** The General Population Nutrition Intervention Trial was a randomized primary esophageal and gastric cancer prevention trial conducted from 1985 to 1991, in which 29,584 adult participants in Linxian, China, were given daily vitamin and mineral supplements. Treatment with "factor D," a combination of 50 microg selenium, 30 mg vitamin E, and 15 mg beta-carotene, led to decreased mortality from all causes, cancer overall, and gastric cancer. Here, we present 10-year follow-up after the end of active intervention.

**METHODS:** Participants were assessed by periodic data collection, monthly visits by village health workers, and quarterly review of the Linxian Cancer Registry. Hazard ratios (HRs) and 95% confidence intervals (CIs) for the cumulative effects of four vitamin and mineral supplementation regimens were calculated using adjusted proportional hazards models.

**RESULTS:** Through May 31, 2001, 276 participants were lost to follow-up; 9727 died, including 3242 from cancer (1515 from esophageal cancer and 1199 from gastric cancer). Participants who received factor D had lower overall mortality (HR = 0.95, 95% CI = 0.91 to 0.99; P = .009; reduction in cumulative mortality from 33.62% to 32.19%) and gastric cancer mortality (HR = 0.89, 95% CI = 0.79 to 1.00; P = .043; reduction in cumulative gastric cancer mortality from 4.28% to 3.84%) than subjects who did not receive factor D. Reductions were mostly attributable to benefits to subjects younger than 55 years. Esophageal cancer deaths between those who did and did not receive factor D were not different overall; however, decreased 17% among participants younger than 55 (HR = 0.83, 95% CI = 0.71 to 0.98; P = .025) but increased 14% among those aged 55 years or older (HR = 1.14, 95% CI = 1.00 to 1.30; P = .047) [corrected]. Vitamin A and zinc supplementation was associated with increased total and stroke mortality; vitamin C and molybdenum supplementation, with decreased stroke mortality.

**CONCLUSION:** The beneficial effects of selenium, vitamin E, and beta-carotene on mortality were still evident up to 10 years after the cessation of supplementation and were consistently greater in younger participants. Late effects of other supplementation regimens were also observed.

### **La mortalità totale e il cancro dopo la supplementazione con vitamine e minerali: follow-up su una popolazione della regione del Linxian**

**BACKGROUND:** la popolazione generale Nutrizione Intervention Trial è stata una prevenzione primaria e randomizzato e esofagea del cancro gastrico. Lo studio è stato condotto dal 1985 al 1991, in cui sono stati date a 29.584 partecipanti adulti in Linxian, Cina, vitamina quotidiana e integratori minerali. Il trattamento con "fattore D", una combinazione di 50 microgrammi di selenio, 30 mg di vitamina E, e 15 mg di beta-carotene, ha portato alla diminuzione della mortalità per tutte le cause, il cancro in generale, e il cancro gastrico. Qui, vi presentiamo 10 anni di follow-up dopo la fine di un intervento attivo.

**METODI:** I partecipanti sono stati valutati mediante periodiche raccolte di dati, visite mensili da parte dei lavoratori di salute di villaggio, e la revisione trimestrale delle Linxian Cancer Registry. Hazard ratio (HR) e intervalli di confidenza al 95% (IC) per gli effetti cumulativi di quattro regimi

supplementazione di vitamine e minerali sono stati calcolati utilizzando adeguati modelli di rischio proporzionale.

RISULTATI: fino al 31 maggio 2001, 276 partecipanti sono stati persi al follow-up; 9.727 morti, di cui 3.242 per tumore (1515 da cancro esofageo e 1199 da cancro gastrico). I partecipanti che hanno ricevuto il fattore D avevano una minore mortalità totale (HR = 0,95, 95% CI = 0,91-0,99, p = 0,009; riduzione della mortalità cumulativa dal 33,62% al 32,19%) e cancro gastrico mortalità (HR = 0,89, IC 95% = 0,79-1,00, p = 0,043; riduzione cumulativa mortalità per cancro gastrico dal 4,28% al 3,84%) rispetto ai soggetti che non hanno ricevuto il fattore D. Riduzioni sono state in gran parte attribuibile alle prestazioni a soggetti di età inferiore ai 55 anni. Morti per cancro esofageo tra coloro che hanno o non hanno ricevuto il fattore D non sono risultati differenti generale, tuttavia, è diminuita del 17% tra i partecipanti di età inferiore ai 55 (HR = 0,83, 95% CI = 0,71-0,98, p = 0,025), ma sono aumentati del 14% tra quelli di 55 anni o più anziani (HR = 1.14, 95% CI = 1,00-1,30, p = 0,047) [corretto]. Supplementazione di vitamina A e zinco è stata associata ad un aumento della mortalità totale e ictus; supplementazione di vitamina C e molibdeno, con diminuzione della mortalità per ictus.

CONCLUSIONE: Gli effetti benefici del selenio, vitamina E e beta-carotene sulla mortalità sono ancora evidenti fino a 10 anni dopo la cessazione della supplementazione ed erano sempre più nei giovani partecipanti. Postumi di altri regimi di integrazione sono state anche osservate.

594: Li K, Zeng S, Gao J, Chen L, Wang Y.

### **The effect of vitamin A deficiency in maternal rats on tumor formation in filial rats.**

J Pediatr Surg. 2009Mar;44(3):565-70. PubMed PMID: 19302860.

**PURPOSE:** We established a vitamin A-deficient (VAD) model of pregnant rats to evaluate the effect of vitamin A deficiency in maternal rats on tumor formation in filial rats.

**METHODS:** Ten pregnant Wistar rats were divided into 2 groups: (1) VAD group, 6 rats were given nonvitamin A diet from 2 weeks before mating till delivery and (2) normal diet (ND) group, 4 rats were given normal diet. Twenty random neonatal rats from each group were killed on the next day of delivery. The rest neonates were given normal diet for 1 year until killed. Serum levels of vitamin A, morphology of the kidney, incidence of tumor formation, and retinoid X receptor (RXR) alpha messenger RNA (mRNA) expression in renal tissue were assessed for the filial rats.

**RESULTS:** Fifty-six and 49 neonatal rats were born for VAD group and ND group, respectively. The detection rate of nephrogenic rests (NRs) from neonates in VAD group (50%) was significantly higher than that in ND group (20%;  $P < .05$ ). The incidence of nephroblastoma was 13.9% in filial rats of VAD group and 0% for ND group. The detection rate of NRs for filial rats of VAD group (30.6%) was significantly higher than that of ND group (6.9%;  $P < .01$ ). The expression of RXRalpha mRNA in tumor tissue of the filial rats of VAD group ( $3.17 \pm 0.15$ ) was significantly lower than that in kidney tissue of ND group ( $3.58 \pm 0.20$ ;  $P < .01$ ).

**CONCLUSION:** Deficiency in vitamin A for pregnant rats resulted in renal dysplasia, increased NRs, and higher incidence of nephroblastoma.

### **L'effetto della carenza di vitamina A nei ratti materni sulla formazione di tumori nei ratti filiali.**

**SCOPO:** Abbiamo stabilito un deficit di vitamina A (VAD), il modello di ratte gravide per valutare l'effetto della carenza di vitamina A nei ratti materno sulla formazione di tumori nei ratti filiale.

**METODI:** Dieci ratte gravide Wistar sono stati divisi in 2 gruppi: (1) gruppo VAD, 6 ratti sono stati dati nonvitamin Una dieta da 2 settimane prima della fecondazione fino alla consegna e (2) dieta normale (ND) del gruppo, 4 ratti hanno ricevuto una dieta normale. Venti topi casuale neonatale da ciascun gruppo sono stati uccisi il giorno dopo della consegna. I neonati resto è stata data una dieta normale per 1 anno fino ucciso. I livelli sierici di vitamina A, la morfologia del rene, l'incidenza di formazione del tumore, e recettore retinoide X (RXR) alfa RNA messaggero (mRNA) espressione nel tessuto renale sono stati valutati per i topi filiale.

**RISULTATI:** Fifty-six e 49 ratti neonati sono nati per il gruppo e il gruppo ND VAD, rispettivamente. Il tasso di rilevamento di nefrogenico resti (NR) da neonati nel gruppo VAD (50%) era significativamente superiore a quella nel gruppo ND (20%,  $p < .05$ ). L'incidenza di nefroblastoma è stato di 13,9% nei ratti filiale del gruppo VAD e 0% per il gruppo ND. Il tasso di rilevamento di NR per i ratti filiale del gruppo VAD (30,6%) era significativamente superiore a quella del gruppo di ND (6,9%,  $p < .01$ ). L'espressione di mRNA RXRalpha nel tessuto tumorale dei topi filiale del gruppo VAD ( $3.17 \pm 0.15$ ) è risultata significativamente inferiore a quella nel tessuto renale del gruppo ND ( $3,58 \pm 0.20$ ,  $P < .01$ ).

**CONCLUSIONE:** la carenza di vitamina A per ratte gravide provocato displasia renale, aumento NR, e una maggiore incidenza di nefroblastoma.

597: Gao F, Tang Q, Yang P, Fang Y, Li W, Wu Y.

Int J LabHematol. 2010 Feb;32(1 Pt 1):e114-22. Epub 2009 Mar 11. PubMed PMID: 19302235.

**Apoptosis inducing and differentiation enhancement effect of oridonin on the all-trans-retinoic acid-sensitive and -resistant acute promyelocytic leukemia cells.**

We investigated the effects of oridonin (Ori), a diterpenoid isolated from *Rabdosia rubescens*, on apoptosis and differentiation of all-trans-retinoic acid (ATRA)-sensitive (NB4) and ATRA-resistant (NB4-R1) cells. The results showed that reactive oxygen species initiates Ori-induced apoptosis. In addition, we found that neither Ori nor ATRA (10 nM) alone induced marked cell differentiation, while co-treatment of these two compounds can induce differentiation of NB4 and NB4-R1 cells which was accompanied by increased RARalpha, C/EBPepsilon or C/EBPbeta. This is the first report to show that RARalpha could be accumulated by Ori which may be useful as a probe to investigate the mechanism of RARalpha catabolism. These results suggest that Ori is a potential candidate for acute promyelocytic leukemia cancer therapy.

**L'induzione dell'apoptosi e la valorizzazione dell'effetto di differenziazione delle cellule di leucemia promielocitica acuta sensibili all'acido all-trans retinoico e all'oridonin.**

Abbiamo studiato gli effetti di oridonin (Ori), un diterpenoide isolato dal *rubescens Rabdosia*, in apoptosi e la differenziazione di acido all-trans retinoico (ATRA)-sensibili (NB4) e ATRA-resistente (NB4-R1) cellule. I risultati hanno mostrato che le specie reattive di ossigeno inizia Ori-indotto apoptosi. Inoltre, abbiamo riscontrato che né Ori né ATRA (10 nM) da solo ha indotto la differenziazione marcata delle cellule, mentre il co-trattamento di questi due composti possono indurre la differenziazione delle cellule NB4 e NB4-R1, che è stata accompagnata da un aumento RARalpha, C / C o EBPEpsilon / EBPbeta. Questo è il primo a dimostrare che RARalpha potrebbe essere accumulati da Ori, che può essere utile come una sonda per studiare il meccanismo del catabolismo RARalpha. Questi risultati suggeriscono che Ori è un potenziale candidato per la terapia acuta promielocitica cancro leucemia.

**Enhanced effects of PPARgamma ligands and RXR selective retinoids in combination to inhibit migration and invasiveness in cancer cells.**

Oncol Rep. 2009 Apr;21(4):1083-9. PubMed PMID: 19288012.

Experimental data from in vitro and in vivo models indicate that peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) ligand activation regulates differentiation and induces cell growth arrest and apoptosis in a variety of cancer types. Thiazolidinediones such as ciglitazone (CGZ) constitute the most well-known synthetic ligands for PPARgamma. We previously reported a remarkable antitumor effect of the retinoid 6-OH-11-O-hydroxyphenantrene (IIF), synthetic retinoid X receptors (RXRs) agonist, on many cancer cell lines. Since PPARs bind to DNA as heterodimers with RXRs, in this study we investigated if IIF potentiates the antitumoral properties of the PPARgamma ligand CGZ in glioblastoma U87MG and melanoma G361 cells. Our results show that either IIF or CGZ inhibited cell growth and tissue invasion ability, but these properties were enhanced by using IIF and CGZ in combined treatment. Since matrix metalloproteinases (MMPs) play a major role in tumor cell invasion, we analyzed the effect of IIF and CGZ on MMP2 and MMP9 activity and expression. The addition of IIF to CGZ resulted in a decrease of MMP2 and MMP9 expression and activity, higher than when each agent was used alone. Furthermore, treatment with IIF and/or CGZ enhanced PPARgamma expression but both agents in combined treatment caused the maximum efficiency. Finally, we demonstrated that IIF can potentiate PPARgamma transcriptional activity induced by CGZ, by evaluation of peroxisome proliferator-responsive element transactivation. In conclusion, these findings suggest that the RXR selective retinoid IIF, in combination with the PPARgamma ligand CGZ, may provide a therapeutic advantage in cancer treatment.

**Miglioramento degli effetti dei ligandi PPAR-gamma e RXR retinoidi selettivi nell'inibire la migrazione e l'invasività di cellule tumorali.**

I dati sperimentali in vitro e in modelli in vivo indicano che il recettore peroxisome proliferator-activated (PPAR) attivazione ligando regola la differenziazione e induce arresto della crescita ed apoptosi delle cellule in una varietà di tipi di cancro. I tiazolidinedioni, come ciglitazone (CGZ) costituiscono i leganti più note sintetiche per PPARgamma. Precedentemente abbiamo segnalato un notevole effetto antitumorale della retinoidi recettori dei retinoidi 6-OH-11-O-hydroxyphenantrene (IIF), sintetiche X (RXR) agonista, su molte linee di cellule tumorali. Dal PPARs si legano al DNA come eterodimeri con RXR, in questo studio abbiamo indagato se IIF potenzia le proprietà antitumorali del PPARgamma ligando CGZ in U87MG glioblastoma e melanoma G361 cellule. I nostri risultati mostrano che sia IIF o CGZ inibito la crescita cellulare e la capacità di invasione dei tessuti, ma queste proprietà sono stati rafforzati utilizzando IIF e CGZ in trattamento combinato. Dal metalloproteinasi della matrice (MMP) svolgono un ruolo importante nella invasione delle cellule tumorali, abbiamo analizzato l'effetto della IIF e CGZ sull'attività MMP2 e MMP9 e di espressione. L'aggiunta di IIF a CGZ portato ad una diminuzione di MMP2 MMP9 e di espressione e di attività, superiore a quello in cui ogni agente è stato usato da solo. Inoltre, il trattamento con IIF e / o CGZ espressione migliore PPARgamma ma entrambi gli agenti in trattamento combinato ha causato la massima efficienza. Infine, abbiamo dimostrato che IIF può potenziare l'attività trascrizionale indotta da CGZ PPARgamma, mediante valutazione dei perossisomi transattivazione elemento proliferator-reattiva. In conclusione, questi risultati suggeriscono che i retinoidi RXR selettivo IIF, in combinazione con il ligando PPARgamma CGZ, può fornire un vantaggio terapeutico nel trattamento del cancro.

604: Al-Wadei HA, Schuller HM.

**Non-genomic inhibitory signaling of beta-carotene in squamous cell carcinoma of the lungs.**

Int J Oncol. 2009 Apr;34(4):1093-8.PubMed PMID: 19287967.

Studies have suggested that retinoids prevent lung cancer by interacting with nuclear retinoid receptors. However, clinical trials with beta-carotene increased lung cancer mortality. We recently showed that beta-carotene stimulates the proliferation of small airway-derived adenocarcinoma by increasing cAMP signaling. Here, we have tested the hypothesis that beta-carotene may stimulate squamous cell carcinoma cells via similar mechanisms. We determined the effects of beta-carotene in cell lines from squamous cell carcinomas and large airway epithelia on proliferation by MTT assays in the presence and absence of inhibitors. Signaling via cAMP/PKA was measured by immunoassays and PKA activation assay. Phosphorylated ERK1/2 was determined by Western blotting. beta-carotene significantly inhibited proliferation and phosphorylation of ERK1/2 by Galphas-mediated signaling involving adenylyl cyclase, cAMP, PKA and ERK1/2. These findings introduce a non-genomic inhibitory mechanism of beta-carotene and emphasize the need for the development of marker-guided lung cancer prevention.

**Iniditori non-genomici: segnalazione di beta-carotene nel carcinoma a cellule squamose del polmone.**

Alcuni studi hanno suggerito che i retinoidi prevenire il cancro al polmone, interagendo con recettori nucleari dei retinoidi. Tuttavia, studi clinici con beta-carotene, un aumento della mortalità cancro ai polmoni. Abbiamo recentemente dimostrato che il beta-carotene stimola la proliferazione delle piccole vie aeree adenocarcinoma derivati aumentando cAMP segnalazione. Qui, abbiamo testato l'ipotesi che il beta-carotene può stimolare le cellule carcinoma a cellule squamose attraverso meccanismi simili. Abbiamo determinato gli effetti del beta-carotene in linee cellulari di carcinoma a cellule squamose e gli epiteli delle vie aeree grande proliferazione di saggi MTT in presenza e in assenza di inibitori. Segnalazione via cAMP / PKA è stata misurata mediante test immunologici e test di attivazione PKA. Fosforilata di ERK1 / 2 è stato determinato mediante Western blotting. beta-carotene significativamente inibito la proliferazione e la fosforilazione di ERK1 / 2 da Galphas-mediata segnalazione che coinvolgono l'adenilato ciclasti, cAMP, PKA e ERK1 / 2. Questi risultati introdurre un meccanismo di non-genomica inibitori di beta-carotene e sottolineano la necessità per lo sviluppo della prevenzione del polmone marcatore guidata cancro.

612: Christov K.

**The novel RARbeta isoform (beta5) is a potential target of retinoids in breast cancer.**

Curr Cancer Drug Targets. 2009 Mar;9(2):142-7.Review. PubMed PMID: 19275755.

Retinoic acid receptor beta 2 (RARbeta2) isoform has been considered a putative tumor suppressor because it is expressed in normal cells but is lacking in most tumors, including breast cancer. Recently, we identified a novel RARbeta isoform (beta5) in breast cancer cells, which may serve as a potential target of retinoids in cancer prevention and therapy studies. In this review are summarized the data on the expression of RARbeta5 and of the previously identified RARbeta4 and RARbeta' isoforms in various breast cancer cell lines. We found that RARbeta5 may serve as a potential biomarker of resistance of breast cancer cells to retinoids and thus may have clinical implication in selecting patients that may benefit the most from clinical trials with retinoids.

**L'isoforma del RARbeta (beta5) è un potenziale bersaglio dei retinoidi nel cancro della mammella.**

Recettore beta dell'acido retinoico 2 (RARbeta2) isoforma è stata considerata un soppressore del tumore putativo, perché è espresso in cellule normali, ma è carente nella maggior parte dei tumori, tra cui il cancro al seno. Recentemente, abbiamo identificato una nuova isoforma RARbeta (beta5) in cellule di carcinoma mammario, che possono servire come un potenziale bersaglio dei retinoidi nella prevenzione del cancro e studi sulla terapia. In questa rassegna sono riassunti i dati relativi l'espressione di RARbeta5 e delle isoforme precedentemente individuati RARbeta4 e RARbeta 'in diverse linee di cellule di cancro al seno. Abbiamo trovato che RARbeta5 può servire come potenziale biomarker di resistenza delle cellule di cancro al seno ai retinoidi e quindi può avere implicazioni cliniche nella selezione dei pazienti che possono trarre i maggiori benefici da studi clinici con retinoidi.

613: Passeron T, Valencia JC, Namiki T, Vieira WD, Passeron H, Miyamura Y, Hearing VJ.

**Upregulation of SOX9 inhibits the growth of human and mouse melanomas and restores their sensitivity to retinoic acid.**

J Clin Invest. 2009Apr;119(4):954-63. doi: 10.1172/JCI34015. Epub 2009 Mar 9. PubMed PMID: 19273910;PubMed Central PMCID: PMC2662541.

Treatments for primary and metastatic melanomas are rarely effective. Even therapeutics such as retinoic acid (RA) that are successfully used to treat several other forms of cancer are ineffective. Recent evidence indicates that the antiproliferative effects of RA are mediated by the transcription factor SOX9 in human cancer cell lines. As we have previously shown that SOX9 is expressed in normal melanocytes, here we investigated SOX9 expression and function in human melanomas. Although SOX9 was expressed in normal human skin, it was increasingly downregulated as melanocytes progressed to the premalignant and then the malignant and metastatic states. Overexpression of SOX9 in both human and mouse melanoma cell lines induced cell cycle arrest by increasing p21 transcription and restored sensitivity to RA by downregulating expression of PRAME, a melanoma antigen. Furthermore, SOX9 overexpression in melanoma cell lines inhibited tumorigenicity both in mice and in a human ex vivo model of melanoma. Treatment of melanoma cell lines with PGD2 increased SOX9 expression and restored sensitivity to RA. Thus, combined treatment with PGD2 and RA substantially decreased tumor growth in human ex vivo and mouse in vivo models of melanoma. The results of our experiments targeting SOX9 provide insight into the pathophysiology of melanoma. Further, the effects of SOX9 on melanoma cell proliferation and RA sensitivity suggest the encouraging possibility of a noncytotoxic approach to the treatment of melanoma.

**La sovraregolazione di SOX9 inibisce la crescita dei melanomi umani nei topi e ripristina la loro sensibilità all'acido retinoico.**

Trattamenti per melanomi primari e metastatici sono raramente efficaci. Anche terapie come l'acido retinoico (RA) che sono usati con successo per il trattamento di varie altre forme di cancro sono inefficaci. Recenti evidenze indicano che gli effetti antiproliferativi di RA sono mediate dal fattore di trascrizione SOX9 in linee di cellule umane di cancro. Come abbiamo precedentemente dimostrato che SOX9 è espresso nei melanociti normali, qui abbiamo studiato l'espressione e la funzione SOX9 nei melanomi umani. Anche se SOX9 era espresso in pelle umana normale, si è sempre più inibiti come melanociti progredita al precancerose e poi gli Stati maligni e metastasi. Sovraespressione di SOX9 in entrambe le linee di melanoma umano e il mouse cellulare indotta arresto del ciclo cellulare, aumentando la trascrizione p21 e la sensibilità restaurato alla RA da downregulating espressione di PRAME, un antigene melanoma. Inoltre, la sovraespressione SOX9 in linee cellulari di melanoma inibito tumorigenicità sia nei topi e in un modello umano ex vivo di melanoma. Trattamento delle linee di cellule del melanoma, con espressione SOX9 PGD2 maggiore sensibilità e restaurato per RA. Quindi, il trattamento combinato con PGD2 e RA notevolmente diminuito la crescita tumorale in umana ex vivo e topo in modelli in vivo del melanoma. I risultati dei nostri esperimenti targeting SOX9 approfondire la conoscenza della fisiopatologia del melanoma. Inoltre, gli effetti di SOX9 sulla proliferazione delle cellule di melanoma e la sensibilità RA suggeriscono la possibilità di favorire un approccio noncytotoxic per il trattamento del melanoma.

614: Klopper JP, Sharma V, Berenz A, Hays WR, Loi M, Pugazhenti U, Said S, Haugen BR.

**Retinoid and thiazolidinedione therapies in melanoma: an analysis of differential response based on nuclear hormone receptor expression.**

Mol Cancer.2009 Mar 6;8:16. PubMed PMID: 19267912; PubMed Central PMCID: PMC2654861.

**BACKGROUND:** Metastatic melanoma has a high mortality rate and suboptimal therapeutic options. Molecular targeting may be beneficial using the rexinoid LGD1069, a retinoid x receptor selective agonist, and thiazolidinediones (TZD), PPARgamma selective ligands, as novel treatments.

**RESULTS:** Mouse xenograft models with human melanoma cell lines [A375(DRO) or M14(5-16)] were treated for 4 weeks with daily vehicle, RXR agonist (rexinoid, LGD1069, 30 mg/kg/d), PPARgamma agonist (TZD, rosiglitazone, 10 mg/kg/d) or combination. A375(DRO) tumor growth was significantly inhibited by either ligand alone and the combination had an additive effect. M14(5-16) tumors only responded to LGD1069 100 mg/kg/day. A375(DRO) sublines resistant to rexinoid, TZD and combination were generated and all three sublines had reduced PPARgamma expression but preserved RXR expression. shRNA knockdown of PPARgamma or RXRgamma attenuated the rexinoid, TZD and combination ligand-mediated decreased proliferation in A375(DRO) cells. Rexinoid (LGD1069) and retinoid (TTNPB) treatment of M14(5-16) cells resulted in decreased proliferation that was additive with combination of both rexinoid and retinoid. shRNA knockdown of RXRgamma resulted in a decreased response to either ligand.

**CONCLUSION:** A375 (DRO) melanoma cell growth is inhibited by rexinoid and TZD treatment, and this response is dependent on RXR and PPARgamma receptor expression. M14 (5-16) melanoma cell growth is inhibited by rexinoid and retinoid treatment, and this response is dependent on RXR expression. These findings may help guide molecular-based treatment strategies in melanoma and provide insight for mechanisms of resistance to nuclear receptor targeted therapies in certain cancers.

**Retinoidi e terapie al tiazolidinedione nel melanoma: l'analisi della risposta differenziale sulla base di espressione dei recettori ormonali nucleari.**

**BACKGROUND:** melanoma metastatico ha un alto tasso di mortalità e non ottimali opzioni terapeutiche. Targeting molecolare può essere utile utilizzare il LGD1069 rexinoid, un retinoide x recettore agonista selettivo, e tiazolidinedioni (TZD), ligandi PPAR-gamma selettiva, come trattamenti

**RISULTATI:** modelli di xenotrapianto Mouse con linee cellulari umane di melanoma [A375 (DRO) o M14 (5-16)] sono stati trattati per 4 settimane con veicoli al giorno, agonista RXR (rexinoid, LGD1069, 30 mg / kg / d), agonista PPAR-gamma (TZD, rosiglitazone, 10 mg / kg / die) o della combinazione. A375 (DRO) la crescita del tumore è stata significativamente inibita da una sola ligando e la combinazione ha avuto un effetto additivo. M14 (5-16) tumori solo risposto alla LGD1069 100 mg / kg / die. A375 (DRO) sublines resistente a rexinoid, TZD e la combinazione sono stati generati e tutti e tre sublines aveva ridotto espressione PPARgamma ma conservato RXR espressione. shRNA atterramento di PPARgamma o RXRgamma attenuato il rexinoid, TZD e la combinazione di proliferazione ligando mediata diminuita in A375 (DRO) cellule. Rexinoid (LGD1069) e retinoidi (TTNPB) trattamento di M14 (5-16) cellule portato a diminuzione della proliferazione che è stato additivo con la combinazione di entrambi rexinoid e retinoidi. colpo di shRNA RXRgamma portato ad una diminuzione della risposta a uno ligando.

**CONCLUSIONE:** A375 (DRO) la crescita delle cellule del melanoma è inibita dal trattamento rexinoid e TZD, e questa risposta dipende RXR e l'espressione del recettore PPAR-gamma. M14 (5-

16) la crescita delle cellule del melanoma è inibita dal trattamento retinoid e retinoidi, e questa risposta dipende espressione RXR. Questi risultati possono aiutare a guidare le strategie di trattamento a base molecolare nel melanoma e fornire la comprensione dei meccanismi di resistenza alle terapie mirate recettore nucleare in alcuni tipi di cancro.

616: Jeong NH, Song ES, Lee JM, Lee KB, Kim MK, Cheon JE, Lee JK, Son SK, Lee JP, Kim JH, Hur SY, Kwon YI.

### **Plasma carotenoids, retinol and tocopherol levels and the risk of ovarian cancer.**

Acta Obstet Gynecol Scand. 2009;88(4):457-62. PubMed  
PMID: 19266359.

Comment in: Acta Obstet Gynecol Scand. 2009;88(4):371-2.

**OBJECTIVE:** We investigated the relation between plasma carotenoids, retinol and tocopherol levels and ovarian cancer risk in Korean women.

**DESIGN:** Hospital-based case-control study.

**SETTING:** Six tertiary medical institutes in Korea.

**POPULATION:** Forty-five epithelial ovarian cancers and 135 age-matched controls.

**METHODS:** Preoperative plasma concentrations of beta-carotene, lycopene, zeaxanthin plus lutein, retinol, alpha-tocopherol, and gamma-tocopherol were measured by reverse-phase, gradient high-pressure liquid chromatography.

**MAIN OUTCOME MEASURES:** Odds ratios (OR) and 95% confidence intervals (95%CI) were estimated by tertiles to evaluate the effect of micronutrients on endometrial cancer risk after adjustment for body mass (BMI) index, menopause, parity, oral contraceptive use, smoking status, and alcohol consumption status.

**RESULTS:** Women in the highest tertile for beta-carotene had 0.12-times the risk of ovarian cancer of in the lowest tertile (OR 0.12; 95%CI 0.04-0.36). Women with the highest tertiles of lycopene (OR 0.09; 95%CI 0.03-0.32), zeaxanthin/lutein (OR 0.21; 95%CI 0.09-0.52), retinol (OR 0.45; 95%CI 0.21-0.98), alpha-tocopherol (OR 0.23; 95%CI 0.10-0.53) and gamma-tocopherol (OR 0.28; 95%CI 0.11-0.70) had lower risk of ovarian cancer than women in the lowest tertiles. Results were consistent across strata of socio-epidemiologic factors.

**CONCLUSIONS:** Micronutrients, specifically ss-carotene, lycopene, zeaxanthin, lutein, retinol, alpha-tocopherol, and gamma-tocopherol, may play a role in reducing the risk of ovarian cancer.

### **Plasma carotenoidi, retinolo, livelli di tocoferolo e il rischio di cancro ovarico.**

**OBIETTIVO:** Abbiamo studiato la relazione tra carotenoidi nel plasma, i livelli di retinolo e tocoferolo e rischio di cancro alle ovaie nelle donne coreane.

**DESIGN:** Hospital-based studio caso-controllo.

**REGOLAZIONE:** sei istituti terziario medici in Corea.

**POPOLAZIONE:** Quarantacinque cancro epiteliale ovarico e 135 controlli appaiati per età.

**METODI:** le concentrazioni plasmatiche preoperatoria di beta-carotene, licopene, luteina più zeaxantina, retinolo, alfa-tocoferolo e gamma-tocoferolo sono stati misurati con fase inversa, la pendenza ad alta pressione, cromatografia liquida.

Principali misure di esito: odds ratio (OR) e gli intervalli di confidenza al 95% (95% CI) sono stati stimati da terzili per valutare l'effetto di micronutrienti sul rischio di cancro endometriale dopo aggiustamento per massa corporea (BMI), indice, la menopausa, l'uso di parità, contraccettivi orali, abitudine al fumo, l'alcol e il consumo di status.

Principali misure di esito: odds ratio (OR) e gli intervalli di confidenza al 95% (95% CI) sono stati stimati da terzi per valutare l'effetto di micronutrienti sul rischio di cancro endometriale dopo aggiustamento per massa corporea (BMI), indice, la menopausa, l'uso di parità, contraccettivi orali, abitudine al fumo, l'alcol e il consumo di status.

RISULTATI: Le donne nel più alto terzile di beta-carotene era 0,12 volte il rischio di cancro ovarico del nel terzile più basso (OR 0,12, IC 95% 0,04-0,36). Le donne con il più alto terzili di licopene (OR 0,09, IC 95% 0,03-0,32), zeaxantina / luteina (OR 0,21, IC 95% 0,09-0,52), retinolo (OR 0,45, IC 95% 0,21-0,98), alfa-tocoferolo (OR 0,23, IC 95% 0,10-0,53) e gamma-tocoferolo (OR 0,28, IC 95% 0,11-0,70) avevano un minor rischio di cancro ovarico rispetto alle donne nel più basso terzili. I risultati erano coerenti tra strati di fattori socio-epidemiologici.

CONCLUSIONI: I micronutrienti, in particolare il beta-carotene, licopene, zeaxantina, luteina, retinolo, alfa-tocoferolo e gamma-tocoferolo, possono giocare un ruolo nel ridurre il rischio di cancro ovarico.

617: Song S, Guan B, Men T, Hoque A, Lotan R, Xu XC.

**Antitumor effect of retinoic acid receptor-beta2 associated with suppression of cyclooxygenase-2.**

Cancer Prev Res (Phila). 2009 Mar;2(3):274-80. Epub 2009 Mar 3. PubMed PMID: 19258542.

Retinoic acid receptor-beta2 (RAR-beta2) is a putative tumor suppressor gene in various cancers. To determine the underlying molecular mechanisms, we transfected RAR-beta2 cDNA into esophageal cancer TE-1 and TE-8 cells and found that RAR-beta2 suppressed tumor cell growth in vitro and tumor formation in nude mice in TE-8 cells, whereas the stable transfection of RAR-beta2 did not restore retinoid sensitivity or inhibit tumor formation in nude mouse in TE-1 cells. Molecularly, we revealed that RAR-beta2 antitumor activity was associated with expression and suppression of cyclooxygenase-2 (COX-2) in these tumor cell lines. Moreover, antisense RAR-beta2 cDNA induced COX-2 expression in TE-3 cells. Furthermore, when COX-2 expression is first blocked by using antisense COX-2 expression vector, the effect of RAR-beta2 is diminished in these tumor cells. In addition, we analyzed expression of RAR-beta2 and COX-2 mRNA in tissue specimens and found that RAR-beta2 expression is associated with low levels of COX-2 expression in esophageal cancer tissues. Induction of RAR-beta2 expression in oral leukoplakia tissues after the patients treated with 13-cis RA correlated with a reduction in COX-2 expression and clinical response. Our findings indicate that some of RAR-beta2 antitumor activities are mediated by suppression of COX-2 expression in some of these esophageal cancer cells. After correlating antitumor effect of RAR-beta2 with COX-2 expression in the published studies, we also found the association. Thus, further studies will determine whether manipulation of COX-2 expression in different cancers can antagonize RAR-beta2 activity.

**Effetto antitumorale del recettore dell'acido retinoico, beta 2 associato con soppressione della cicloossigenasi-2.**

Retinoico recettori beta2 (RAR-beta2) è un gene soppressore del tumore putativo in vari tipi di cancro. Per determinare i meccanismi molecolari sottostanti, si transfettate RAR-beta2 cDNA in cancro esofageo TE-1 e TE-8 celle e ha scoperto che RAR-beta2 soppresso crescita delle cellule tumorali in vitro e la formazione del tumore nei topi nudi in TE-8 cellule, mentre la transfezione stabile di RAR-beta2 non ripristinare la sensibilità retinoidi o inibire la formazione di tumori nel topo nudo in TE-1 celle. Molecularmente, ci ha rivelato che RAR-beta2 attività antitumorale è stata associata con l'espressione e la repressione della cicloossigenasi-2 (COX-2) in queste linee cellulari tumorali. Inoltre, antisense RAR-beta2 cDNA indotte COX-2 in TE-3 celle. Inoltre, quando espressione di COX-2 è il primo bloccato da utilizzare antisense COX-2 vettore di espressione, l'effetto di RAR-beta2 è diminuita in queste cellule tumorali. Inoltre, abbiamo analizzato l'espressione di RAR-beta2 e COX-2 mRNA nei campioni di tessuto e ha scoperto che RAR-beta2 espressione è associata a bassi livelli di espressione di COX-2 nei tessuti cancro esofageo. L'induzione di RAR-beta2 espressione nei tessuti leucoplachia orale dopo che i pazienti trattati con 13-cis RA correlato con una riduzione della COX-2 e la risposta clinica. I nostri risultati indicano che alcuni di RAR-beta2 attività antitumorale sono mediate dalla soppressione del COX-2 espressione in alcune di queste cellule di cancro esofageo. Dopo la correlazione effetto antitumorale di RAR-beta2 con COX-2 negli studi pubblicati, abbiamo trovato anche l'associazione. Quindi, ulteriori studi dovrà stabilire se la manipolazione della COX-2 espressione in diversi tipi di cancro possono antagonizzare RAR-beta2 attività.

624: Tsai FM, Shyu RY, Lin SC, Wu CC, Jiang SY.

**Induction of apoptosis by the retinoid inducible growth regulator RIG1 depends on the NC motif in HtTA cervical cancer cells.**

BMC Cell Biol. 2009 Feb 26;10:15. PubMed PMID: 19245694; PubMedCentral PMCID: PMC2656461.

**BACKGROUND:** Retinoid-inducible gene 1 (RIG1), also known as tazarotene-induced gene 3 or retinoic-acid receptor responder 3, is a growth regulator, which induces apoptosis and differentiation. RIG1 is classified into the NC protein family. This study investigated functional domains and critical amino acids associated with RIG1-mediated cell death and apoptosis.

**RESULTS:** Using enhanced green fluorescence protein (EGFP)-tagged RIG1 variants, RIG1 proteins with deletion at the NC domain significantly decreased cell death induced by RIG1, and fusion variants containing only the NC domain significantly induced apoptosis of HtTA cervical cancer cells. The EGFP-RIG1-induced apoptosis was significantly decreased in cells expressing N(112)C(113) motif double- (NC-->FG) or triple- (NCR-->FGE) mutated RIG1 variants. Using dodecapeptides, nuclear localization and profound cell death was observed in HtTA cells expressing wild type RIG1(111-123) or Leu121-mutated RIG1(111-123):L--> C peptide, but peptides double- or triple-mutated at the NC motif alone, RIG1(111-123):NC-->FG or RIG1(111-123):NCR-->FGE, were cytoplasmically localized and did not induce apoptosis. The RIG1(111-123) also induced apoptosis of A2058 melanoma cells but not normal human fibroblasts.

**CONCLUSION:** The NC domain, especially the NC motif, plays the major role in RIG1-mediated pro-apoptotic activity. The RIG1(111-123) dodecapeptide exhibited strong pro-apoptotic activity and has potential as an anticancer drug.

**L'induzione di apoptosi da parte del regolatore di crescita retinoico inducibile RIG 1 in cellule di cancro del collo dell'utero HtTA dipende da NC.**

**BACKGROUND:** retinoidi-inducibile gene 1 (RIG1), noto anche come Tazarotene-geniche indotte 3 o recettore di acido retinoico-responder 3, è un regolatore di crescita, che induce l'apoptosi e la differenziazione. RIG1 è classificato nella famiglia delle proteine NC. Questo studio ha esaminato domini funzionali e di critica aminoacidi associati con la morte cellulare mediata da RIG1 e apoptosi.

**RISULTATI:** Usando una maggiore proteina fluorescente verde (EGFP)-ha aggiunto RIG1 varianti, RIG1 proteine con l'eliminazione al dominio NC notevolmente diminuito la morte cellulare indotta da RIG1, e le varianti di fusione che contiene solo il dominio NC significativo indotto apoptosi delle cellule di cancro del collo dell'utero HtTA. L'apoptosi EGFP-RIG1-indotta è significativamente diminuita nelle cellule che esprimono N (112) C (113) motivo doppio (NC -> FG) o triplo (NCR -> FGE) mutato RIG1 varianti. Dodecapeptides Uso, localizzazione nucleare e la morte cellulare profonda è stata osservata nelle cellule che esprimono HtTA wild type RIG1 (111-123) o Leu121 mutato RIG1 (111-123): L -> peptide C, ma peptidi doppio o triplo-mutato in il motivo NC solo, RIG1 (111-123): NC -> FG o RIG1 (111-123): NCR -> FGE, sono stati cytoplasmically localizzato e non ha indotto apoptosi. Il RIG1 (111-123) anche l'apoptosi indotta di A2058 cellule di melanoma ma non fibroblasti umani normali.

**CONCLUSIONE:** Il dominio NC, soprattutto il motivo NC, gioca il ruolo principale nella RIG1 mediata da attività pro-apoptica. Il RIG1 (111-123) dodecapeptide esposto una forte attività pro-apoptica e ha un potenziale come farmaco antitumorale

628: Silva AC, Marassi MP, Mühlbauer M, Lourenço AL, Carvalho DP, Ferreira AC.

### **Retinoic acid effects on thyroid function of female rats.**

Life Sci. 2009 May 8;84(19-20):673-7. Epub 2009 Feb 21. PubMed PMID: 19233213.

**AIMS:** Retinoic acid is widely used in dermatological treatment and thyroid cancer management; however its possible side-effects on normal thyroid function remains unknown. We aimed to determine the effects of retinoic acid on thyroid function of adult female rats.

**MAIN METHODS:** Female Wistar rats were treated with all-trans-retinoic acid and 13-cis retinoic acid for 14 and 28 days. Then, rats were killed and thyroid function was evaluated.

**KEY FINDINGS:** Serum T4 and thyrotropin levels remained unchanged, while serum T3 increased in animals treated with all-trans-retinoic acid for 14 days. No changes were observed in hepatic or renal type 1 iodothyronine deiodinase (D1) activities, while thyroid D1 was higher in animals treated for 14 days with all-trans-retinoic acid, which could be related to the increased serum T3 levels. 13-cis retinoic acid increased thyroid iodide uptake after 28 days. These results show effects of retinoic acid treatment on these thyroid proteins: sodium/iodide symporter and deiodinase.

**SIGNIFICANCE:** Retinoic acid is able to interfere with normal thyroid function, increasing thyroid type 1 deiodinase activity, serum T3 levels and sodium/iodide symporter function. However, the effects are time- and retinoic acid isomer-dependent. Since serum thyrotropin levels did not change in any group, the effects observed are probably mediated by a direct retinoic acid effect on the normal thyroid.

### **Effetti dell'acido retinoico sulla funzione della tiroide nei ratti di sesso femminile.**

**OBIETTIVI:** L'acido retinoico è ampiamente usato nel trattamento dermatologico e gestione del cancro della tiroide, ma i suoi possibili effetti collaterali sulla normale funzione tiroidea rimane sconosciuto. Abbiamo l'obiettivo di determinare gli effetti dell'acido retinoico sulla funzione tiroidea di ratti adulti di sesso femminile.

**PRINCIPALI METODI:** Donna ratti Wistar sono stati trattati con acido all-trans retinoico e 13-cis acido retinoico per il 14 e 28 giorni. Poi, i ratti sono stati uccisi e la funzione tiroidea è stata valutata.

**PRINCIPALI RISULTATI:** il siero T4 e livelli di tireotropina è rimasto invariato, mentre il T3 sierico aumentato negli animali trattati con acido all-trans retinoico per 14 giorni. Nessun cambiamento è stato osservato nel tipo epatica o renale 1 iodotironina deiodinasi (D1) le attività, mentre la tiroide D1 è stata maggiore negli animali trattati per 14 giorni con acido all-trans retinoico, che potrebbe essere collegato ai livelli di T3 sierico aumentato. 13-cis retinoico aumentato assorbimento di ioduro tiroide dopo 28 giorni. Questi risultati mostrano effetti del trattamento con acido retinoico su queste proteine della tiroide: sodio / ioduro symporter e deiodinasi.

**SIGNIFICATO:** L'acido retinoico è in grado di interferire con la normale funzione della tiroide, aumentando di tipo tiroideo 1 attività deiodinasi, i livelli sierici di T3 e di sodio / funzione symporter ioduro. Tuttavia, gli effetti sono tempo e isomero acido retinoico-dipendente. Dato che i livelli sierici di tireotropina non è cambiata in qualsiasi gruppo, gli effetti osservati sono probabilmente mediate da un effetto diretto dell'acido retinoico sulla tiroide normale.

630: Ishiguro K, Rice AM, Rice KP, Sartorelli AC.

**Inhibition of all-trans retinoic acid-induced granulocytic differentiation of WEHI-3B D+ cells by forced expression of SCL (TAL1) and GATA-1.**

Leuk Res. 2009 Sep;33(9):1249-54. Epub 2009 Feb 20. PubMed PMID: 19230972; PubMed Central PMCID: PMC2780339.

All-trans retinoic acid (ATRA) induces granulocytic maturation of WEHI-3B D+ leukemia cells and LiCl enhances this maturation, while WEHI-3B D- cells are non-responsive to ATRA. Transfection of SCL, expressed in D- but absent in D+ cells, into D+ cells, caused resistance to ATRA, while transfection of GATA-1 into D+ cells produced resistance to the combination of ATRA and LiCl. SCL expression in D+ cells did not induce the expression of c-Kit, a putative target gene for SCL. LiCl, known to inhibit some kinases by displacing Mg<sup>2+</sup>, did not affect tyrosine kinase activity of the cytoplasmic domain of c-Kit.

**Inibizione della differenziazione granulocitica indotta dall'acido retinoico tutto-transdelle cellule WEHI-3B D+ tramite l'espressione forzata di SCL (TAL1) e GATA-1.**

All-trans retinoico (ATRA) induce la maturazione granulocitaria di WEHI-3B + D cellule leucemiche e LiCl valorizza questa maturazione, mentre WEHI-3B D-cellule non-responsivi agli ATRA. Trasfezione delle SCL, espresso in D-ma assente nelle cellule di D +, D + nelle cellule, causato resistenza a ATRA, mentre la trasfezione di GATA-1 in D + cellule prodotte resistenza alla combinazione di ATRA e LiCl. SCL espressione in D + cellule non ha indotto l'espressione del c-Kit, un gene bersaglio putativo per SCL. LiCl, noti per inibire alcune chinasi da Mg<sup>2+</sup> + spostamento, non ha influenzato l'attività tirosin-chinasi del dominio citoplasmatico di c-Kit.

641: Li J, Orr B, White K, Belogortseva N, Niles R, Boskovic G, Nguyen H, Dykes A, Park M.

**Chmp 1A is a mediator of the anti-proliferative effects of all-trans retinoic acid in human pancreatic cancer cells.**

Mol Cancer. 2009 Feb 12;8:7.PubMed PMID: 19216755.

**BACKGROUND:** We recently have shown that Charged multivesicular protein/Chromatin modifying protein1A (Chmp1A) functions as a tumor suppressor in human pancreatic tumor cells. Pancreatic cancer has the worst prognosis of all cancers with a dismal 5-year survival rate. Preclinical studies using ATRA for treating human pancreatic cancer suggest this compound might be useful for treatment of pancreatic cancer patients. However, the molecular mechanism by which ATRA inhibits growth of pancreatic cancer cells is not clear. The objective of our study was to investigate whether Chmp1A is involved in ATRA-mediated growth inhibition of human pancreatic tumor cells.

**RESULTS:** We performed microarray studies using HEK 293T cells and discovered that Chmp1A positively regulated Cellular retinol-binding protein 1 (CRBP-1). CRBP-1 is a key regulator of All-trans retinoic acid (ATRA) through ATRA metabolism and nuclear localization. Since our microarray data indicates a potential involvement of Chmp1A in ATRA signaling, we tested this hypothesis by treating pancreatic tumor cells with ATRA in vitro. In the ATRA-responsive cell lines, ATRA significantly increased the protein expression of Chmp1A, CRBP-1, P53 and phospho-P53 at serine 15 and 37 position. We found that knockdown of Chmp1A via shRNA abolished the ATRA-mediated growth inhibition of PanC-1 cells. Also, Chmp1A silencing diminished the increase of Chmp1A, P53 and phospho-P53 protein expression induced by ATRA. In the ATRA non-responsive cells, ATRA did not have any effect on the protein level of Chmp1A and P53. Chmp1A over-expression, however, induced growth inhibition of ATRA non-responsive cells, which was accompanied by an increase of Chmp1A, P53 and phospho-P53. Interestingly, in ATRA responsive cells Chmp1A is localized to the nucleus, which became robust upon ATRA treatment. In the ATRA-non-responsive cells, Chmp1A was mainly translocated to the plasma membrane upon ATRA treatment.

**CONCLUSION:** Collectively our data provides evidence that Chmp1A mediates the growth inhibitory activity of ATRA in human pancreatic cancer cells via regulation of CRBP-1. Our results also suggest that nuclear localization of Chmp1A is important in mediating ATRA signaling.

**Chmp 1A è un meidatore degli effetti antiproliferativi dell'acido retinoico tutto-trans nelle cellule cancerose pancreatiche umane**

**BACKGROUND:** Abbiamo recentemente hanno dimostrato che la proteina Charged multivescicolari / cromatina modifica protein1A (Chmp1A) funziona come un soppressore del tumore nelle cellule umane tumorali del pancreas. tumore al pancreas è la peggiore prognosi di tutti i tumori con un tasso di lugubre sopravvivenza a 5 anni. Gli studi preclinici con ATRA per il trattamento del carcinoma pancreatico umano suggeriscono che questo composto potrebbe essere utile per il trattamento di pazienti affetti da cancro pancreatico. Tuttavia, il meccanismo molecolare con cui ATRA inibisce la crescita delle cellule tumorali del pancreas non è chiaro. L'obiettivo del nostro studio è stato quello di indagare se Chmp1A è coinvolto nella inibizione della crescita ATRA-mediata delle cellule tumorali pancreatiche.

**RISULTATI:** Abbiamo condotto studi di microarray utilizzando cellule HEK 293T e ha scoperto che Chmp1A positivamente regolamentato proteina cellulare RBP 1 (CRBP-1). CRBP-1 è un regolatore chiave di All-trans retinoico (ATRA) attraverso il metabolismo ATRA e localizzazione nucleare. Dal momento che i nostri dati di microarray indica un potenziale coinvolgimento di Chmp1A in ATRA segnalazione, abbiamo testato questa ipotesi trattando le cellule tumorali del pancreas con ATRA in vitro. Nelle linee di cellule ATRA-reattiva, ATRA significativamente

aumentato l'espressione della proteina di Chmp1A, CRBP-1, P53 e P53 fosfo-serina a 15 e 37 posizione. Abbiamo scoperto che colpo di Chmp1A attraverso shRNA abolito l'inibizione della crescita ATRA-mediata di cellule PANC-1. Inoltre, mettendo a tacere Chmp1A diminuito l'aumento di Chmp1A, P53 e fosfo-espressione della proteina P53 indotto da ATRA. Nelle cellule ATRA non risponde, ATRA non ha avuto alcun effetto sul livello di proteine Chmp1A e P53. Chmp1A sovra-espressione, tuttavia, ha indotto l'inibizione della crescita delle cellule ATRA non risponde, che è stata accompagnata da un aumento di Chmp1A, P53 e fosfo-P53. È interessante notare che, nelle cellule sensibili Chmp1A ATRA è localizzata al nucleo che divenne robusta in seguito al trattamento con ATRA. Nelle cellule ATRA-non-reattiva, Chmp1A era principalmente traslocato alla membrana plasmatica in seguito a trattamento con ATRA.

CONCLUSIONE: Collettivamente i nostri dati dimostrano che Chmp1A media la crescita di attività inibitoria ATRA in cellule tumorali umane del pancreas attraverso il regolamento di CRBP-1. I nostri risultati suggeriscono inoltre che la localizzazione nucleare di Chmp1A è importante nella mediazione ATRA segnalazione.

647: Bonanni B, Lazzeroni M.

### **Retinoids and breast cancer prevention.**

RecentResults Cancer Res. 2009;181:77-82. Review. PubMed PMID: 19213560.

Preclinical models suggest that retinoids inhibit mammary carcinogenesis. Induction of apoptosis is a unique feature of fenretinide, the most studied retinoid in clinical trials of breast cancer chemoprevention due to its selective accumulation in breast tissue and its favorable toxicological profile. In a phase III breast cancer prevention trial, fenretinide showed a very strong trend of reduction of incidence of second breast malignancies in premenopausal women, which was confirmed by the 15-year follow-up. Interestingly, ovarian cancer incidence appeared reduced during treatment in the same trial. This warrants further research on fenretinide mechanisms of action and potential efficacy and provides the rationale for a phase III primary prevention trial in young women at high risk for breast cancer.

### **I retinoidi e la prevenzione del tumore al seno**

Modelli preclinici suggeriscono che i retinoidi inibiscono la carcinogenesi mammaria. L'induzione di apoptosi è una caratteristica unica di fenretinide, il più studiato dei retinoidi in studi clinici di chemioprevenzione del tumore al seno a causa della sua accumulazione selettiva nel tessuto del seno e il suo favorevole profilo tossicologico. In uno studio di fase di prevenzione del cancro al seno III, fenretinide ha mostrato un trend molto forte di riduzione di incidenza di neoplasie maligne secondo seno nelle donne in premenopausa, che è stato confermato dai 15 anni di follow-up. È interessante notare che l'incidenza del cancro ovarico apparsa ridotta durante il trattamento nello stesso studio. Questa ricerca garantisce ulteriormente sui meccanismi di fenretinide di efficacia d'azione e potenziali e fornisce il razionale per uno studio di fase III di prevenzione primaria in donne giovani ad alto rischio di cancro al seno.

649: Gill JK, Franke AA, Steven Morris J, Cooney RV, Wilkens LR, Le Marchand L, Goodman MT, Henderson BE, Kolonel LN.

**Association of selenium, tocopherols, carotenoids, retinol, and 15-isoprostane F(2t) in serum or urine with prostate cancer risk: the multiethnic cohort.**

Cancer Causes Control. 2009Sep;20(7):1161-71. Epub 2009 Feb 11. PubMed PMID: 19212706; PubMed Central PMCID:PMC2725220.

**OBJECTIVE:** We examine the association of antioxidants and 15-isoprostane F(2t) with risk of prostate cancer.

**METHODS:** We conducted a nested case-control study of serum antioxidant biomarkers (selenium, tocopherols, carotenoids, and retinol) and a urinary oxidation biomarker (15-isoprostane F(2t)) with risk of prostate cancer within the Multiethnic Cohort. Demographic, dietary, and other exposure information was collected by self-administered questionnaire in 1993-1996. We compared prediagnostic biomarker levels from 467 prostate cancer cases and 936 cancer free controls that were matched on several variables. Multivariate conditional logistic regression models were used to compute adjusted odds ratios (ORs) and 95% confidence intervals (CIs).

**RESULTS:** We observed that there was no overall association of serum concentrations of antioxidants and urinary concentrations of 15-isoprostane F(2t) with risk of prostate cancer or risk of advanced prostate cancer. However, we did observe an inverse association for serum selenium only among African-American men ( $p$  trend = 0.02); men in the third tertile of selenium concentrations had a 41% lower risk (95% CI: 0.38-0.93) of prostate cancer when compared to men in the first tertile.

**CONCLUSIONS:** Overall, our study found no association of serum antioxidants or 15-isoprostane F(2t) with the risk of prostate cancer. The observed inverse association of selenium with prostate cancer in African-Americans needs to be validated in other studies.

**Associazione di selenio, tocoferoli, carotenoidi, retinolo e 15-isoprostano F(2t) nel siero o nelle urine con il rischio di cancro prostatico: una coorte multi-etnica.**

**OBIETTIVO:** Abbiamo esaminare l'associazione di antiossidanti e F 15-isoprostano (2t), con il rischio di cancro alla prostata.

**METODI:** Abbiamo condotto uno studio caso-controllo nested di biomarcatori sierici di antiossidanti (selenio, tocoferoli, carotenoidi e retinolo) e un biomarker di ossidazione delle vie urinarie (F 15-isoprostano (2t)) con il rischio di cancro alla prostata all'interno della coorte multi-etnica. Demografiche, dietetici e altre informazioni di esposizione sono state raccolte dal questionario autosomministrato in 1993-1996. Abbiamo confrontato i livelli di biomarcatore prediagnostici da 467 casi di cancro alla prostata e 936 controlli di cancro libero che sono stati trovati in diverse variabili. Multivariata di regressione logistica condizionale modelli sono stati utilizzati per calcolare regolato odds ratio (OR) e intervalli di confidenza al 95% (IC).

**RISULTATI:** Abbiamo osservato che non c'è stata associazione complessiva delle concentrazioni sieriche di antiossidanti e le concentrazioni urinarie di F 15-isoprostano (2t), con il rischio di cancro alla prostata o di rischio di carcinoma della prostata avanzato. Tuttavia, abbiamo fatto osservare un'associazione inversa per il selenio siero solo tra gli uomini afro-americani (trend  $p$  = 0.02); uomini nel terzo terzile concentrazioni di selenio avevano un rischio inferiore del 41% (95% CI: 0,38-0,93), del cancro della prostata rispetto agli uomini nel primo terzile.

**CONCLUSIONI:** Nel complesso, il nostro studio ha trovato alcuna associazione di antiossidanti nel siero o F 15-isoprostano (2t), con il rischio di cancro alla prostata. L'associazione inversa osservata di selenio con tumore della prostata negli afro-americani deve essere convalidata in altri studi.

650: Das A, Banik NL, Ray SK.

**Retinoids induce differentiation and downregulate telomerase activity and N-Myc to increase sensitivity to flavonoids for apoptosis in human malignant neuroblastoma**

SH-SY5Y cells. *Int J Oncol.* 2009Mar;34(3):757-65. PubMed PMID: 19212680; PubMed Central PMCID: PMC2643361.

Human malignant neuroblastoma is characterized by poor differentiation and uncontrolled proliferation of immature neuroblasts. Retinoids such as all-trans-retinoic acid (ATRA), 13-cis-retinoic acid (13-CRA), and N-(4-hydroxyphenyl) retinamide (4-HPR) at low doses are capable of inducing differentiation, while flavonoids such as (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) and genistein (GST) at relatively high dose can induce apoptosis. We used combination of retinoid and flavonoid for controlling growth of malignant neuroblastoma SH-SY5Y cells. Cells were treated with a retinoid (1 microM ATRA, 1 microM 13-CRA, or 0.5 microM 4-HPR) for 7 days and then with a flavonoid (25 microM EGCG or 25 microM GST) for 24 h. Treatment of cells with a low dose of a retinoid for 7 days induced neuronal differentiation with downregulation of telomerase activity and N-Myc but overexpression of neurofilament protein (NFP) and subsequent treatment with a relatively high dose of a flavonoid for 24 h increased apoptosis in the differentiated cells. Besides, retinoids reduced the levels of inflammatory and angiogenic factors. Apoptosis was associated with increases in intracellular free  $[Ca^{2+}]$ , Bax expression, cytochrome c release from mitochondria and activities of calpain and caspases. Decreases in expression of calpastatin (endogenous calpain inhibitor) and baculovirus inhibitor-of-apoptosis repeat containing (BIRC) proteins (endogenous caspase inhibitors) favored apoptosis. Treatment of SH-SY5Y cells with EGCG activated caspase-8, indicating induction of the receptor-mediated pathway of apoptosis. Based on our observation, we conclude that combination of a retinoid and a flavonoid worked synergistically for controlling the malignant growth of human neuroblastoma cells.

**Nel neuroblastoma umano maligno i retinoidi inducono la differenziazione e regolano negativamente l'attività della telomerasi e di N-Myc per aumentare la sensibilità ai flavonoidi all'apoptosi**

Il neuroblastoma umano maligno è caratterizzato da scarsa differenziazione e la proliferazione incontrollata dei neuroblasti immaturi. I retinoidi come tutto trans retinoico (ATRA), acido 13-cis-retinoico (13-CRA), e N-(4-idrossifenil) retinamide (4-HPR) a basse dosi sono in grado di indurre la differenziazione, mentre i flavonoidi come (-)-epigallocatechina-3-gallato (EGCG) e genisteina (GST) a dosi relativamente elevate può indurre l'apoptosi. Abbiamo usato combinazione di retinoidi e di flavonoidi per controllare la crescita di cellule maligne SH-SY5Y neuroblastoma. Le cellule sono state trattate con un retinoide (1 microM ATRA, 1 microM 13-CRA, pari allo 0,5 microM 4-HPR) per 7 giorni e poi con un flavonoide (25 microM EGCG o 25 microM GST) per 24 h. Il trattamento delle cellule con una bassa dose di un retinoide per 7 giorni ha indotto la differenziazione neuronale con down-regulation di attività della telomerasi e N-Myc, ma sovraespressione di proteine neurofilamenti (PFN) e successivo trattamento con una dose relativamente alta di un flavonoide per 24 h aumentata apoptosi in le cellule differenziate. Inoltre, i retinoidi ridotto i livelli dei fattori infiammatori e angiogenico. L'apoptosi è stato associato ad un aumento intracellulare libero  $[Ca^{2+}]$ , espressione di Bax, rilascio del citocromo c dai mitocondri e le attività della calpaina e caspasi. Le diminuzioni di espressione di calpastatina (inibitore endogeno della calpaina) e baculovirus-inibitore di ripetere-apoptosi contenente (BIRC) proteine (inibitori della caspasi endogena) favorito apoptosi. Il trattamento delle cellule SH-SY5Y con EGCG attivato caspasi-8, che indica l'induzione della via mediata da recettori di apoptosi. Sulla base delle nostre osservazioni, possiamo concludere che la combinazione di un retinoide e un flavonoide lavorato sinergicamente per controllare la crescita maligna di cellule di neuroblastoma umano.

653: Stallings RL.

**MicroRNA involvement in the pathogenesis of neuroblastoma: potential for microRNA mediated therapeutics.**

Curr Pharm Des. 2009;15(4):456-62. Review. PubMed PMID: 19199973; PubMed Central PMCID: PMC2945477.

Neuroblastoma arises from precursor cells of the sympathetic nervous system and presently accounts for 15% of all childhood cancer deaths. These tumors display remarkable heterogeneity in clinical behavior, ranging from spontaneous regression to rapid progression and resistance to therapy. The clinical behavior of these tumors is associated with many factors, including patient age, histopathology and genetic abnormalities such as MYCN amplification. More recently, the dysregulation of some miRNAs, including the miR-17-5p-92 cluster and miR-34a, has been implicated in the pathobiology of neuroblastoma. MiR-17-5p-92 family members act in an oncogenic manner while miR-34a has tumor suppressor functions. The evidence for the contribution of miRNAs in the aggressive neuroblastoma phenotype is reviewed in this article, along with exciting possibilities for miRNA mediated therapeutics.

**Coinvolgimento di MicroRNA nella patogenesi del neuroblastoma: possibilità terapeutiche.**

Il neuroblastoma nasce da cellule precursori del sistema nervoso simpatico e attualmente rappresenta il 15% delle morti per cancro infantile. Questi tumori display notevole eterogeneità di comportamento clinico, che vanno dalla regressione spontanea a rapida progressione e la resistenza alla terapia. Il comportamento clinico di questi tumori è associata a numerosi fattori, tra cui l'età del paziente, istopatologia e anomalie genetiche come l'amplificazione MYCN. Più recentemente, la disregolazione di alcuni miRNA, tra cui il cluster-17-5p miR-92 e miR-34a, è stata implicata nella biologia e la patologia del neuroblastoma. MiR-17-5p-92 membri della famiglia agire in modo oncogeno mentre miR-34a ha funzioni di soppressore del tumore. Le prove per il contributo dei miRNA nel fenotipo aggressivo neuroblastoma è recensito in questo articolo, insieme con interessanti possibilità per miRNA terapeutica mediata.

667: Hoftijzer HC, Liu YY, Morreau H, van Wezel T, Pereira AM, Corssmit EP, Romijn JA, Smit JW.

**Retinoic acid receptor and retinoid X receptor subtype expression for the differential diagnosis of thyroid neoplasms.**

Eur J Endocrinol.2009 Apr;160(4):631-8. Epub 2009 Jan 20. PubMed PMID: 19155317.

**BACKGROUND:** Although differential expression of retinoic acid receptor (RAR) subtypes between benign and malignant thyroid tissues has been described, their diagnostic value has not been reported.

**AIM:** To investigate the diagnostic accuracy of RAR and retinoid X receptor (RXR) subtype protein expression for the differential diagnosis of thyroid neoplasms.

**METHODS:** We used a tissue array containing 93 benign thyroid tissues (normal thyroid, multinodular goiter, and follicular adenoma (FA)) and 77 thyroid carcinomas (papillary thyroid carcinoma (PTC), follicular thyroid carcinoma, and follicular variant of PTC (FVPTC)). Immunostaining was done for RAR and RXR subtypes. Staining was analyzed semiquantitatively based on receiver operating curve analyses and using hierarchical cluster analysis.

**RESULTS:** We found increased expression of cytoplasmic (c) RARA, cRARG, cRXRB and decreased expression of nuclear (n) RARB, nRARG, and nRXRA in thyroid carcinomas compared with benign tissues. We found three proteins differently expressed between FA and FTC and five proteins differentially expressed between FA and FVPTC, with high diagnostic accuracies. Using cluster analysis, the combination of negative staining of membranous RXRB and positive staining for cRXRB had a high positive predictive value (98%) for malignant thyroid disease, whereas the combination of positive nRXRA and negative cRXRB staining had a high predictive value (91%) for benign thyroid lesions.

**CONCLUSION:** We conclude that differences in RAR and RXR subtype protein expression may be valuable for the differential diagnosis of thyroid neoplasms. The results of this study and especially the value of cluster analysis have to be confirmed in subsequent studies.

**L'espressione del recettore dell'acido retinoico e del sottotipo del recettore X dei retinoidi per la diagnosi differenziale delle neoplasie della tiroide**

**BACKGROUND:** Anche se l'espressione differenziale dei recettori dell'acido retinoico (RAR) sottotipi tra tessuti tiroidei benigni e maligni è stato descritto, il loro valore diagnostico non è stato segnalato.

**OBIETTIVO:** Per studiare l'accuratezza diagnostica della RAR e recettore retinoide X (RXR), l'espressione della proteina sottotipo per la diagnosi differenziale delle neoplasie della tiroide.

**METODI:** È stata utilizzata una matrice di tessuto contenente 93 tessuti benigni della tiroide (tiroide normale, gozzo multinodulare, e adenoma follicolare (FA)) e 77 carcinomi della tiroide (carcinoma papillare della tiroide (PTC), carcinoma follicolare della tiroide, e la variante follicolare del PTC (FVPTC) ). Immunostaining è stato fatto per i sottotipi RAR e RXR. La colorazione è stata analizzata semiquantitativamente sulla base delle analisi della curva di funzionamento del ricevitore e l'utilizzo di analisi gerarchica dei cluster.

**RISULTATI:** Abbiamo trovato aumentata espressione di citoplasmatici (c) RARA, cRARG, cRXRB e diminuzione della espressione del nucleare (n) RARB, nRARG e nRXRA in carcinomi della tiroide rispetto al tessuto benigno. Abbiamo trovato tre proteine espresse in modo diverso tra FA e FTC e cinque proteine differenzialmente espresse tra FA e FVPTC, con elevata accuratezza diagnostica. Usando l'analisi dei cluster, la combinazione di colorazione negativa di membranose RXRB e positività per cRXRB aveva un alto valore predittivo positivo (98%) per i maligni malattie della tiroide, mentre la combinazione di nRXRA positivi e cRXRB colorazione negativa ha avuto un alto valore predittivo (91% ) per le lesioni benigne della tiroide.

CONCLUSIONE: Concludiamo che le differenze di espressione di RAR e RXR sottotipo proteina può essere prezioso per la diagnosi differenziale delle neoplasie della tiroide. I risultati di questo studio e, in particolare il valore della cluster analysis devono essere confermati in studi successivi.

676: Raif A, Marshall GM, Bell JL, Koach J, Tan O, D'andreti C, Thomas W, SekyereE, Norris M, Haber M, Kavallaris M, Cheung BB.

**The estrogen-responsive B box protein (EBBP) restores retinoid sensitivity in retinoid-resistant cancer cells via effects on histone acetylation.**

Cancer Lett. 2009 May 8;277(1):82-90. Epub2009 Jan 14. PubMed PMID: 19147277.

Retinoids have significant clinical activity in several human cancers, yet the factors determining retinoid sensitivity in cancer cells are still unclear. Retinoid-induced expression of retinoic acid receptor (RAR) beta(2) is a necessary component of the retinoid anticancer signal in cancer cells. We have previously identified the Estrogen-responsive B Box Protein (EBBP), a member of the Tripartite Motif (TRIM) protein family, as a novel RARbeta2 transcriptional regulator in the retinoid signal. Here we examined the mechanism of the EBBP effect on the retinoid anticancer signal. We assessed retinoid-responsive RARbeta2 transcription in retinoid-resistant breast and lung cancer cells in the presence of chromatin modifying agents. A histone deacetylase (HDAC) inhibitor alone, or in combination with retinoid, was more effective than a demethylating agent in restoring RARbeta2 transcription in resistant cells. Overexpression of EBBP alone markedly increased histone acetylation. The effect of EBBP on retinoid-responsive transcription appeared to be limited to genes with the retinoic acid response element (betaRARE) regulatory sequence, such as CYP26A1. EBBP inhibited cell growth by effects on cyclin D1 and Phospho-Rb, and, reduced cell viability in retinoid-resistant cancer cells. The viability of non-cancer cells was unaffected by EBBP overexpression. Taken together our data suggests that EBBP acts to de-repress transcription of RARbeta2 and CYP26A1, by modifying histone acetylation in retinoid-resistant cancer cells, and, is an important target for drug discovery in retinoid-resistant cancers.

**La proteina B responsiva agli estrogeni (EBBP) ripristina la sensibilità ai retinoidi nelle cellule cancerose resistenti ai retinoidi tramite effetti sull'acetilazione degli istoni**

I retinoidi hanno una significativa attività clinica in diversi tumori umani, ma i fattori che determinano la sensibilità dei retinoidi nelle cellule tumorali non sono ancora chiare. Indotta dai retinoidi espressione del recettore dell'acido retinoico (RAR) beta (2) è una componente necessaria del segnale antitumorale dei retinoidi nelle cellule tumorali. Abbiamo già individuato l'estrogeno-responsive B Box Protein (ebBP), un membro del motivo tripartito (TRIM) famiglia di proteine, come regolatore romanzo RARbeta2 trascrizionale nel segnale retinoidi. Qui abbiamo esaminato il meccanismo dell'effetto ebBP sul segnale anticancro retinoidi. Abbiamo valutato retinoidi-reattiva trascrizione RARbeta2 in seno retinoidi-resistenti e delle cellule del cancro del polmone in presenza di agenti cromatina modificando. Una delle istone deacetilasi (HDAC), un inibitore da solo o in combinazione con retinoidi, è stato più efficace di un agente demetilante nel ripristino RARbeta2 trascrizione nelle cellule resistenti. La sovraespressione di ebBP solo marcatamente aumentato l'acetilazione degli istoni. L'effetto di ebBP sulla trascrizione dei retinoidi-responsive sembrava limitata ai geni con l'elemento acido retinoico risposta (betaRARE) sequenza di regolamentazione, come CYP26A1. EbBP inibito la crescita delle cellule dagli effetti sul ciclina D1 e fosfo-Rb, e, ridotta vitalità cellulare nelle cellule tumorali retinoidi-resistente. La vitalità delle cellule non tumorali è stata influenzata dalla iperespressione ebBP. Nel loro insieme i nostri dati suggeriscono che ebBP atti di trascrizione de-repressione di RARbeta2 e CYP26A1, modificando acetilazione degli istoni nelle cellule tumorali retinoidi-resistente, e, è un obiettivo importante per la scoperta di farmaci retinoidi nei tumori resistenti.

687: Bohlken A, Cheung BB, Bell JL, Koach J, Smith S, Sekyere E, Thomas W, Norris M, Haber M, Lovejoy DB, Richardson DR, Marshall GM.

**ATP7A is a novel target of retinoic acid receptor beta2 in neuroblastoma cells.**

Br J Cancer. 2009 Jan13;100(1):96-105. PubMed PMID: 19127267; PubMed Central PMCID: PMC2634674.

Increased retinoic acid receptor beta (RARbeta(2)) gene expression is a hallmark of cancer cell responsiveness to retinoid anticancer effects. Moreover, low basal or induced RARbeta(2) expression is a common feature of many human cancers, suggesting that RARbeta(2) may act as a tumour suppressor gene in the absence of supplemented retinoid. We have previously shown that low RARbeta(2) expression is a feature of advanced neuroblastoma. Here, we demonstrate that the ABC domain of the RARbeta(2) protein alone was sufficient for the growth inhibitory effects of RARbeta(2) on neuroblastoma cells. ATP7A, the copper efflux pump, is a retinoid-responsive gene, was upregulated by ectopic overexpression of RARbeta(2). The ectopic overexpression of the RARbeta(2) ABC domain was sufficient to induce ATP7A expression, whereas, RARbeta(2) siRNA blocked the induction of ATP7A expression in retinoid-treated neuroblastoma cells. Forced downregulation of ATP7A reduced copper efflux and increased viability of retinoid-treated neuroblastoma cells. Copper supplementation enhanced cell growth and reduced retinoid-responsiveness, whereas copper chelation reduced the viability and proliferative capacity. Taken together, our data demonstrates ATP7A expression is regulated by retinoic acid receptor beta and it has effects on intracellular copper levels, revealing a link between the anticancer action of retinoids and copper metabolism.

**Nelle cellule di neuroblastoma ATP7A è un nuovo target del recettore dell'acido retinoico beta2.**

L'aumento del recettore beta dell'acido retinoico (RARbeta (2)) l'espressione genica è una caratteristica della risposta di cellule di cancro al retinoidi effetti antitumorali. Inoltre, basale basso o indotta RARbeta (2) espressione è una caratteristica comune a molti tumori umani, suggerendo che RARbeta (2) può agire come un gene oncosoppressore, in assenza di completare retinoidi. Abbiamo precedentemente dimostrato che un basso RARbeta (2) espressione è una caratteristica del neuroblastoma avanzato. Qui, abbiamo dimostrato che il dominio della ABC (2) proteina RARbeta da solo è stato sufficiente per la crescita effetti inibitori di RARbeta (2) su cellule di neuroblastoma. ATP7A, la pompa di efflusso di rame, è un gene retinoidi-sensibile, è stato up-regolato da sovraespressione ectopica di RARbeta (2). La sovraespressione ectopica del RARbeta (2) dominio di ABC è stato sufficiente a indurre l'espressione ATP7A, mentre, RARbeta (2) siRNA bloccato l'induzione dell'espressione ATP7A in cellule di neuroblastoma trattate con retinoidi. Down-regulation forzata di ATP7A ridotto efflusso di rame e la vitalità aumentata delle cellule di neuroblastoma trattate con retinoidi. Supplementazione di rame maggiore crescita cellulare e la riduzione dei retinoidi-reattività, mentre la chelazione del rame ridotto la redditività e la capacità proliferativa. Nel loro insieme, i nostri dati dimostrano ATP7A espressione è regolata da recettore beta dell'acido retinoico ed ha effetti sui livelli intracellulari di rame, che rivela un legame tra l'azione antitumorale di retinoidi e di metabolismo del rame

**Nicotinamide cooperates with retinoic acid and 1,25-dihydroxyvitamin D(3) to regulate cell differentiation and cell cycle arrest of human myeloblastic leukemia cells.**

Oncology. 2009;76(2):91-100. Epub 2009 Jan 6. PubMed PMID: 19127080; PubMed Central PMCID: PMC2826433.

Nicotinamide, the amide derivative of vitamin B(3), cooperates with retinoic acid (RA), a form of vitamin A, and 1,25-dihydroxyvitamin D(3) (D3), to regulate cell differentiation and proliferation of human myeloblastic leukemia cells. In human myeloblastic leukemia cells, RA or D3 are known to cause MAPK signaling leading to myeloid or monocytic differentiation and G0 cell cycle arrest. In this process, RA or D3 induces the early expression of CD38, a receptor that causes ERK signaling and propels further differentiation. Our study demonstrates that nicotinamide in combination with RA or D3 affected induced expression levels of CD38, CD11b and CD14, suggesting a cooperative function of nicotinamide and RA or D3. Nicotinamide transiently retarded the initial RA- or D3-induced expression of CD38, which subsequently reached the same nearly 100% expression. Nicotinamide induced ERK activation and further enhanced the RA-induced ERK activation, but the D3-induced ERK activation was diminished by nicotinamide, although levels still exceeded those induced by RA, suggesting lineage-specific nicotinamide responses. Nicotinamide enhanced both RA- and D3-induced CD11b expression, inducible oxidative metabolism, and G0 cell cycle arrest, accelerating their induced occurrence in all instances. Consistent with this, the RA- or D3-induced downregulation of PARP was enhanced by nicotinamide. Nicotinamide thus regulated RA- or D3-induced differentiation and G0 arrest, causing a transient delay in certain early aspects of the progression to terminal differentiation but ultimately accelerating the occurrence of terminally, functionally differentiated G0 cells.

**Nelle cellule leucemiche mieloblastiche umane la nicotinamide coopera con l'acido retinoico e la 1,25-didrossivitamina D(3) nella regolazione della differenziazione cellulare e nell'arresto del ciclo cellulare.**

Nicotinamide, amido derivato della vitamina B (3), collabora con l'acido retinoico (RA), una forma di vitamina A, e di 1,25-diidrossivitamina D (3) (D3), a regolare la differenziazione e proliferazione cellulare umana di leucemia mieloblastica cellule. In cellule umane di leucemia mieloblastica, AR o D3 sono noti per causare MAPK segnalazione che portano alla differenziazione mieloide o monocitica e G0 del ciclo cellulare arresto. In questo processo, AR o D3 induce l'espressione precoce di CD38, un recettore che provoca ERK di segnalazione e di differenziazione spinge oltre. Il nostro studio dimostra che nicotinamide, in combinazione con AR o D3 colpiti ha indotto livelli di espressione di CD38, CD11b e CD14, suggerendo una funzione cooperativa di nicotinamide e RA o D3. Nicotinamide transitoriamente ritardato l'iniziale o RA-D3-espressione indotta di CD38, che successivamente ha raggiunto la stessa espressione di quasi il 100%. Nicotinamide indotta da attivazione ERK e ulteriormente rafforzato l'attivazione RA-indotta ERK, ma l'attivazione D3-indotta ERK è stato diminuito dalla nicotinamide, anche se i livelli ancora superiori a quelle indotte da RA, suggerendo risposte nicotinamide lineage-specifiche. Nicotinamide esaltata sia RA-D3 e indotta espressione CD11b, inducibile metabolismo ossidativo, e la cella arresto G0 del ciclo, accelerando la loro presenza ha indotto in tutti i casi. Coerentemente con questo, la RA-D3-o down-regulation indotto di PARP è stata rafforzata dalla nicotinammide. Nicotinamide così regolamentato RA-D3 o differenziazione, indotta e l'arresto G0, causando un ritardo transitorio in alcuni aspetti iniziali della progressione a differenziazione terminale, ma in ultima analisi, accelerando la comparsa di terminali, le cellule G0 funzionalmente differenziate.

691: Formelli F, Meneghini E, Cavadini E, Camerini T, Di Mauro MG, De Palo G, Veronesi U, Berrino F, Micheli A.

### **Plasma retinol and prognosis of postmenopausal breast cancer patients.**

Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2009 Jan;18(1):42-8.PubMed PMID: 19124479.

**BACKGROUND:** The role of retinol (vitamin A) in breast cancer prognosis has never been investigated in postmenopausal women. We prospectively assessed the long-term prognostic role of retinol plasma levels in a cohort of postmenopausal breast cancer patients. Patients and

**METHODS:** We investigated 208 women self-reported as postmenopausal operated on for T(1-2)N(0)M(0) breast cancer who participated in a chemoprevention trial as controls and never received chemotherapy or hormone therapy. Plasma samples were collected 3 months (median) after surgery and assayed within 3 weeks for retinol. Minimum and median potential follow-up were 12 and 15 years, respectively. The main analyses were on all women and on a subgroup ages  $\geq 55$  years, assumed too old to be in perimenopause. The main end point was breast cancer death. Breast cancer survival was estimated by the Kaplan-Meier method. The hazard ratios of breast cancer death by retinol level were estimated by Cox models stratified for age, where relevant, and recruitment period, and adjusted for tumor size and histology.

**RESULTS:** At 12 years, patients with low retinol ( $< 2.08$  micromol/L, median of distribution) had lower breast cancer survival than those with high retinol (log-rank  $P = 0.052$ ); the difference was significant for women  $\geq 55$  years (log-rank  $P = 0.006$ ). The adjusted hazard ratios for low versus high retinol were 2.11 (95% confidence interval, 1.08-4.14) for all women and 3.58 (95% confidence interval, 1.50-8.57) for those  $\geq 55$  years.

**CONCLUSIONS:** Low plasma retinol strongly predicts poorer prognosis in postmenopausal breast cancer patients. Retinol levels should be determined as part of the prognostic workup.

### **Retinolo plasmatico e prognosi del cancro al seno nelle pazienti nel periodo postmenopausale**

**BACKGROUND:** Il ruolo di retinolo (vitamina A) nella prognosi del cancro al seno non è mai stato studiato in donne in postmenopausa. Abbiamo valutato prospetticamente il ruolo a lungo termine prognostico dei livelli plasmatici di retinolo in una coorte di pazienti con carcinoma mammario in post-menopausa.

**METODI:** Abbiamo studiato 208 donne di auto-riportati come in post-menopausa operate per T (1-2) N (0) M (0) cancro al seno che hanno partecipato ad un trial chemioprevenzione di controlli e non ha mai ricevuto una terapia ormonale o chemioterapia. I campioni di plasma sono stati raccolti 3 mesi (mediana) dopo l'intervento chirurgico ed analizzati entro 3 settimane per retinolo. Potenziale minimo e mediano di follow-up sono state 12 e 15 anni, rispettivamente. Le analisi principali erano su tutte le donne e su un sottogruppo di età maggiore o uguale a 55 anni, assunto troppo vecchio per essere in perimenopausa. L'end point principale era la morte del cancro al seno. sopravvivenza cancro al seno è stato stimato con il metodo di Kaplan-Meier. L'hazard ratio di morte per cancro della mammella livello di retinolo sono stati stimati mediante modelli di Cox stratificato per età, se del caso, e periodo di assunzione, e regolate per le dimensioni del tumore e istologia.

**RISULTATI:** A 12 anni, i pazienti con retinolo basso ( $< 2,08$  micromol / L, mediano della distribuzione) erano più bassi di sopravvivenza cancro al seno rispetto a quelli con elevato retinolo (log-rank  $p = 0,052$ ), la differenza era significativa per le donne  $\geq 55$  anni (log-rank  $p = 0,006$ ). L'hazard ratio per il retinolo basso contro elevate sono stati 2,11 (intervallo di confidenza 95%, 1,08-4,14) per tutte le donne e 3.58 (intervallo di confidenza 95%, 1,50-8,57) per quelli  $\geq 55$  anni.

**CONCLUSIONI:** plasma a bassa retinolo predice fortemente prognosi peggiore nei pazienti con carcinoma mammario in post-menopausa. livelli di retinolo devono essere determinati come parte

698: Engedal N, Auberger P, Blomhoff HK.

**Retinoic acid regulates Fas-induced apoptosis in Jurkat T cells: reversal of mitogen-mediated repression of Fas DISC assembly.**

J Leukoc Biol. 2009 Mar;85(3):469-80. Epub 2008 Dec 26. PubMed PMID:19112091.

The effect of the immune regulator vitamin A on T cell death has been poorly characterized. In the present study, we demonstrate that an active metabolite of vitamin A, retinoic acid (RA), promotes cell death in Jurkat leukemic T cells by counteracting mitogen-mediated repression of Fas-induced apoptosis. The effect of RA was dose-dependent, and at the optimal concentration of 1  $\mu$ M, repression of Fas-induced cell death by the mitogens 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA) or Con A was reversed by approximately 50% and 30%, respectively. RA promoted apoptosis rather than necrosis, as judged by analysis of cell morphology, mitochondrial membrane depolarization, and DNA fragmentation. TPA-mediated protection from Fas-induced apoptosis is dependent on ERK and NF- $\kappa$ B. However, analyses of ERK and NF- $\kappa$ B activities and expression of target genes indicated that RA-mediated counteraction of the protective effect of TPA did not involve negative crosstalk with ERK or NF- $\kappa$ B survival pathways. RA-induced cell death was accompanied by enhanced cleavage of procaspase-3, -6, and -8, as well as enhanced cleavage of DNA fragmentation factor 45. Interestingly, RA-mediated cleavage of procaspase-8 occurred very early and before any effect of RA could be detected on procaspase-3 cleavage, suggesting that RA might act at the level of the Fas death-inducing signaling complex (DISC). Indeed, DISC immunoprecipitation studies revealed that RA treatment reversed the inhibitory effect of TPA on CH11-induced recruitment and processing of procaspase-8 at the DISC. In conclusion, we have identified a role of RA in abrogating mitogen-mediated repression of Fas DISC assembly, thus enhancing Fas-induced apoptosis in leukemic T cells.

**L'acido retinoico regola l'apoptosi indotta da Fas nelle cellule T Jurkat: inversione della repressione dell'assemblaggio di Fas DISC mediato dai mitogeni.**

L'effetto della vitamina A immune regolatore sulla morte delle cellule T è stata poco caratterizzati. Nel presente studio, abbiamo dimostrato che un metabolita attivo della vitamina A, acido retinoico (RA), promuove la morte delle cellule in cellule Jurkat T leucemiche contrastando repressione mitogeno-mediata di Fas-indotta. L'effetto di RA è stato dose-dipendente, e alla concentrazione ottimale di 1  $\mu$ M, la repressione di Fas-morte cellulare indotta dai mitogeni 13 12-O-tetradecanoylphorbol-acetato (TPA) o Con A è stato invertito di circa il 50% e del 30 %, rispettivamente. RA promosso apoptosi piuttosto che necrosi, sulla base di analisi della morfologia delle cellule, depolarizzazione della membrana mitocondriale, e la frammentazione del DNA. protezione TPA-mediata da Fas-indotta dipende ERK e NF- $\kappa$ B. Tuttavia, le analisi di ERK e di attività di NF- $\kappa$ B e l'espressione di geni target indicato tale neutralizzazione RA-mediata l'effetto protettivo del TPA non ha comportato interferenze negative con ERK o percorsi di sopravvivenza NF- $\kappa$ B. RA-indotta morte cellulare è stata accompagnata da una maggiore segmentazione della procaspasi-3, -6 e -8, così come una maggiore segmentazione del fattore di frammentazione del DNA 45. È interessante notare che, scissione RA-mediata procaspasi-8 si è verificato molto presto e prima di qualsiasi effetto di RA è stato possibile rilevare il procaspasi-3 scissione, suggerendo che la RA potrebbe agire a livello del Fas morte di induzione di segnalazione complesso (DISC). Infatti, gli studi di immunoprecipitazione DISC è emerso che il trattamento con RA invertito l'effetto inibitorio del TPA sul reclutamento CH11-indotta e l'elaborazione di procaspasi-8 a livello del disco. In conclusione, abbiamo identificato un ruolo di RA in abrogare repressione mitogeno-

mediata di montaggio Fas DISC, rafforzando così la Fas-indotta apoptosi nelle cellule leucemiche T.

700: Hoeke MO, Plass JR, Heegsma J, Geuken M, van Rijsbergen D, Baller JF, Kuipers F, Moshage H, Jansen PL, Faber KN.

**Low retinol levels differentially modulate bile salt-induced expression of human and mouse hepatic bile salt transporters.**

Hepatology. 2009 Jan;49(1):151-9. PubMed PMID: 19111018.

The farnesoid X receptor/retinoid X receptor-alpha (FXR/RXRalpha) complex regulates bile salt homeostasis, in part by modulating transcription of the bile salt export pump (BSEP/ABCB11) and small heterodimer partner (SHP/NR0B2). FXR is activated by bile salts, RXRalpha by the vitamin A derivative 9-cis retinoic acid (9cRA). Cholestasis is associated with vitamin A malabsorption. Therefore, we evaluated the role of vitamin A/9cRA in the expression of human and mouse bile salt export pump (hBSEP/mBsep), small heterodimer partner (hSHP/mShp), and mouse sodium-dependent taurocholate co-transporting polypeptide (mNtcp). HBSEP and hSHP transcription were analyzed in FXR/RXRalpha-transfected HepG2 cells exposed to chenodeoxycholic acid (CDCA) and/or 9cRA. BSEP promoter activity was determined by luciferase reporter assays, DNA-binding of FXR and RXRalpha by pull-down assays. Serum bile salt levels and hepatic expression of Bsep, Shp, and Ntcp were determined in vitamin A-deficient (VAD)/cholic acid (CA)-fed C57BL/6J mice. Results indicated that 9cRA strongly repressed the CDCA-induced BSEP transcription in HepG2 cells, whereas it super-induced SHP transcription; 9cRA reduced DNA-binding of FXR and RXRalpha. The 9cRA repressed the CDCA-induced BSEP promoter activity irrespective of the exact sequence of the FXR-binding site. In vivo, highest Bsep messenger RNA (mRNA), and protein expression was observed in CA-fed VAD mice. Shp transcription was highest in CA-fed vitamin A-sufficient mice. Ntcp protein expression was strongly reduced in CA-fed VAD mice, whereas mRNA levels were normal. CA-fed control and VAD mice had similarly increased serum bile salt levels. Conclusion: We showed that 9cRA has opposite effects on bile salt-activated transcription of FXR/RXRalpha target genes. Vitamin A deficiency in CA-fed mice leads to high BSEP expression. Clearance of serum bile salts may, however, be limited because of post-transcriptional reduction of Ntcp. The molecular effects of vitamin A supplementation during cholestasis need further analysis to predict a therapeutic effect.

**Livelli bassi di retinolo modulano differenzialmente l'espressione dei trasportatori epatici dei sali biliari nell'uomo e nel topo indotta dai sali biliari.**

Il recettore farnesoid X / recettore retinoide X-alfa (FXR / RXRalpha) complesso regola l'omeostasi sali biliari, in parte, modulando la trascrizione della pompa di esportazione dei sali biliari (BSEP/ABCB11) e partner eterodimer piccolo (SHP/NR0B2). FXR è attivato da sali biliari, la vitamina RXRalpha da un derivato dell'acido retinoico 9-cis (9cRA). Colestasi è associato a vitamina A malassorbimento. Pertanto, abbiamo valutato il ruolo della vitamina A/9cRA nell'espressione dei diritti dell'uomo e del mouse pompa di esportazione dei sali biliari (hBSEP / mBsep), partner eterodimero di piccole dimensioni (hSHP / mShp), e co taurocolato mouse sodio-dipendente-trasporto polipeptide (mNtcp) . HBSEP e trascrizione hSHP sono stati analizzati in FXR / RXRalpha cellule transfettate HepG2 esposti ad acido chenodeossicolico (CDCA) e / o 9cRA. BSEP attività del promotore è stato determinato dal test reporter luciferasi, che legano il DNA di FXR e RXRalpha da saggi di pull-down. livelli di sali biliari nel siero e di espressione epatica della BSEP, SHP e Ntcp sono stati determinati in vitamina A-carente (VAD) / acido colico (CA)-topi alimentati C57BL/6J. I risultati indicano che 9cRA fortemente represso i CDCA indotta BSEP trascrizione nelle cellule HepG2, mentre super-indotta trascrizione SHP; 9cRA ridotto legano il

DNA di FXR e RXRalpha. Il 9cRA represso il CDCA indotta BSEP attività del promotore a prescindere dalla sequenza esatta del sito FXR-binding. In vivo, il più alto BSEP RNA messaggero (mRNA), e l'espressione della proteina è stato osservato nei topi nutriti CA-VAD. Shp trascrizione è stata più elevata di vitamina CA-alimentato topi A-sufficienti. l'espressione della proteina NTCP è stata fortemente ridotta in topi alimentati CA-VAD, mentre i livelli di mRNA erano normali. topi di controllo CA-alimentati e VAD aveva similmente un aumento dei livelli sierici di sali biliari. Conclusione: Abbiamo dimostrato che 9cRA ha effetti opposti su bile sale trascrizione attivati di FXR / geni bersaglio RXRalpha. La carenza di vitamina A nei topi nutriti CA-porta ad alta espressione BSEP. Liquidazione dei sali biliari nel siero possono, tuttavia, essere limitato a causa della riduzione della post-trascrizionale di NTCP. Gli effetti molecolari di integratori di vitamina A durante la colestasi bisogno di ulteriori analisi per prevedere un effetto terapeutico.

701: Williams SJ, Cvetkovic D, Hamilton TC.

**Vitamin A metabolism is impaired in human ovarian cancer.**

Gynecol Oncol. 2009 Mar;112(3):637-45. Epub 2008 Dec 25. PubMed PMID: 19110304; PubMed Central PMCID: PMC2737361.

**OBJECTIVES:** We have previously reported that loss in expression of a protein considered critical for vitamin A homeostasis, cellular retinol-binding protein 1 (CRBP1), is an early event in ovarian carcinogenesis. The aim of the present study was to determine if loss of vitamin A metabolism also occurs early in ovarian oncogenesis.

**METHODS:** We assessed CRBP1 expression by immunohistochemistry in ovaries prophylactically removed from women with a genetic risk for ovarian cancer. Furthermore, we investigated the ability of normal, immortalized but nontumorigenic, and tumorigenic human ovarian epithelial cells to synthesize retinoic acid and retinaldehyde when challenged with a physiological dose of retinol, and determined expression levels of the retinoid-related genes, RARalpha, RXRalpha, CRABP1, CRABP2, RALDH1 and RALDH2 in these cells.

**RESULTS:** Immunohistochemistry revealed loss of CRBP1 expression in potentially preneoplastic lesions in prophylactic oophorectomies. HPLC analysis of vitamin A metabolism showed production of retinoic acid in four independent, normal human ovarian surface epithelial (HOSE) cell cultures upon exposure to retinol. However, only one of two SV40-immortalized HOSE cell lines made RA, while none of the ovarian carcinoma cell lines produced detectable RA due to complete loss of RALDH2.

**CONCLUSIONS:** The impaired conversion of retinol to RA in ovarian cancer cells and decreased CRBP1 protein expression in prophylactic oophorectomies support our hypothesis that concomitant losses of vitamin A metabolism and CRBP1 expression contribute to ovarian oncogenesis.

**Nel cancro ovarico umano il metabolismo della vitamina A è compromesso.**

**OBIETTIVI:** Abbiamo precedentemente riportato che la perdita di espressione di una proteina considerata critica per la vitamina A omeostasi cellulare della proteina retinolo-binding 1 (CRBP1), è un evento precoce nella carcinogenesi ovarica. Lo scopo del presente studio era di determinare se la perdita del metabolismo della vitamina A si verifica anche nei primi mesi del oncogenesi ovarica.

**METODI:** Abbiamo valutato l'espressione CRBP1 mediante immunostochimica in ovaie profilattico rimosso da donne con un rischio genetico per il cancro ovarico. Inoltre, abbiamo studiato la capacità dei normali, ma immortalato nontumorigenic, e cellule tumorali ovariche epiteliali di sintetizzare l'acido retinoico e retinaldehyde quando provocati con una dose fisiologica di retinolo, e determinato i livelli di espressione dei geni legati retinoidi, RARalpha, RXRalpha, CRABP1, CRABP2, RALDH1 e RALDH2 in queste cellule.

**RISULTATI:** immunostochimica ha rivelato la perdita di espressione CRBP1 potenzialmente in lesioni preneoplastiche in oophorectomies profilattico. Analisi HPLC di metabolismo della vitamina A ha dimostrato la produzione di acido retinoico in quattro indipendenti, normale epiteliali umane superficie ovarica (tubo) colture di cellule in seguito all'esposizione retinolo. Tuttavia, solo uno dei due SV40-immortalato TUBO linee cellulari fatto RA, mentre nessuna delle linee di cellule di carcinoma ovarico prodotto RA rilevabile a causa della completa perdita di RALDH2.

**CONCLUSIONI:** La conversione di compromissione del retinolo alla RA nelle cellule tumorali ovariche e ridotta espressione della proteina in CRBP1 oophorectomies profilattico sostenere la nostra ipotesi che le perdite concomitante di metabolismo della vitamina A e di espressione CRBP1 contribuire alla oncogenesi ovarica.

703: Safi R, Muramoto GG, Salter AB, Meadows S, Himburg H, Russell L, Daher P, Doan P, Leibowitz MD, Chao NJ, McDonnell DP, Chute JP.

**Pharmacological manipulation of the RAR/RXR signaling pathway maintains the repopulating capacity of hematopoietic stem cells in culture.**

Mol Endocrinol. 2009 Feb;23(2):188-201.Epub 2008 Dec 23. PubMed PMID: 19106195; PubMed Central PMCID: PMC2646618.

**OBJECTIVES:** We have previously reported that loss in expression of a protein considered critical for vitamin A homeostasis, cellular retinol-binding protein 1 (CRBP1), is an early event in ovarian carcinogenesis. The aim of the present study was to determine if loss of vitamin A metabolism also occurs early in ovarian oncogenesis.

**METHODS:** We assessed CRBP1 expression by immunohistochemistry in ovaries prophylactically removed from women with a genetic risk for ovarian cancer. Furthermore, we investigated the ability of normal, immortalized but nontumorigenic, and tumorigenic human ovarian epithelial cells to synthesize retinoic acid and retinaldehyde when challenged with a physiological dose of retinol, and determined expression levels of the retinoid-related genes, RARalpha, RXRalpha, CRABP1, CRABP2, RALDH1 and RALDH2 in these cells.

**RESULTS:** Immunohistochemistry revealed loss of CRBP1 expression in potentially preneoplastic lesions in prophylactic oophorectomies. HPLC analysis of vitamin A metabolism showed production of retinoic acid in four independent, normal human ovarian surface epithelial (HOSE) cell cultures upon exposure to retinol. However, only one of two SV40-immortalized HOSE cell lines made RA, while none of the ovarian carcinoma cell lines produced detectable RA due to complete loss of RALDH2.

**CONCLUSIONS:** The impaired conversion of retinol to RA in ovarian cancer cells and decreased CRBP1 protein expression in prophylactic oophorectomies support our hypothesis that concomitant losses of vitamin A metabolism and CRBP1 expression contribute to ovarian oncogenesis.

**La manipolazione farmacologica della via di segnale RAR/RXR mantiene la capacità di ripopolamento delle cellule staminali in coltura**

**OBIETTIVI:** Abbiamo precedentemente riportato che la perdita di espressione di una proteina considerata critica per la vitamina A omeostasi cellulare della proteina retinolo-binding 1 (CRBP1), è un evento precoce nella carcinogenesi ovarica. Lo scopo del presente studio era di determinare se la perdita del metabolismo della vitamina A si verifica anche nei primi mesi del oncogenesi ovarica.

**METODI:** Abbiamo valutato l'espressione CRBP1 mediante immunostochimica in ovaie profilattico rimosso da donne con un rischio genetico per il cancro ovarico. Inoltre, abbiamo studiato la capacità dei normali, ma immortalato nontumorigenic, e cellule tumorali ovariche epiteliali di sintetizzare l'acido retinoico e retinaldehyde quando provocati con una dose fisiologica di retinolo, e determinato i livelli di espressione dei geni legati retinoidi, RARalpha, RXRalpha, CRABP1, CRABP2, RALDH1 e RALDH2 in queste cellule.

**RISULTATI:** immunostochimica ha rivelato la perdita di espressione CRBP1 potenzialmente in lesioni preneoplastiche in oophorectomies profilattico. Analisi HPLC di metabolismo della vitamina A ha dimostrato la produzione di acido retinoico in quattro indipendenti, normale epiteliali umane superficie ovarica (tubo) colture di cellule in seguito all'esposizione retinolo. Tuttavia, solo uno dei due SV40-immortalato TUBO linee cellulari fatto RA, mentre nessuna delle linee di cellule di carcinoma ovarico prodotto RA rilevabile a causa della completa perdita di RALDH2.

**CONCLUSIONI:** La conversione di compromissione del retinolo alla RA nelle cellule tumorali ovariche e ridotta espressione della proteina in CRBP1 oophorectomies profilattico sostenere la nostra ipotesi che le perdite concomitante di metabolismo della vitamina A e di espressione CRBP1 contribuire alla oncogenesi ovarica.

704: Dorjgochoo T, Gao YT, Chow WH, Shu XO, Li H, Yang G, Cai Q, Rothman N, Cai H, Franke AA, Zheng W, Dai Q.

**Plasma carotenoids, tocopherols, retinol and breast cancer risk: results from the Shanghai Women Health Study (SWHS).**

Breast Cancer Res Treat. 2009 Sep;117(2):381-9. Epub 2008 Dec 20. PubMed PMID: 19096929; PubMedCentral PMCID: PMC2728141.

Evidence from some previous studies suggests that lipophilic antioxidants, particularly carotenoids, may reduce the risk of breast cancer. We prospectively investigated the associations of plasma levels of tocopherols, retinol, carotenoids with the risk of developing breast cancer among Chinese women. We conducted a study of 365 incident breast cancer cases and 726 individually matched controls nested within a large cohort study of women aged 40-70 years at baseline. We observed no associations between breast cancer risk and any of the tocopherols, retinol, and most carotenoids. However, high levels of plasma lycopene other than trans, 5- and 7-cis or trans alpha-cryptoxanthin were inversely associated with the risk of developing breast cancer. Our results do not support an overall protective effect of lipophilic antioxidants on breast cancer risk. The few inverse associations observed for subtype of carotenoids may need to be confirmed in future studies.

**I carotenoidi, i tocoferoli il retinolo nel plasma e il rischio di cancro al seno: risultati dallo studio sulla salute delle donne di Shanghai (SWHS).**

Prove da alcuni studi precedenti suggeriscono che gli antiossidanti lipofili, in particolare i carotenoidi, può ridurre il rischio di cancro al seno. Abbiamo studiato in modo prospettico le associazioni dei livelli plasmatici di tocoferoli, retinolo, carotenoidi, con il rischio di sviluppare cancro al seno tra le donne cinesi. Abbiamo condotto uno studio di 365 casi di incidenti sul cancro al seno e 726 controlli abbinati singolarmente annidato all'interno di un ampio studio di coorte di donne di età 40-70 anni al basale. Non abbiamo osservato le associazioni tra rischio di cancro al seno e uno qualsiasi dei tocoferoli, retinolo e carotenoidi più. Tuttavia, gli alti livelli di licopene nel plasma diversi trans, 5 - e 7-cis o trans alfa-criptoxantina era inversamente associata al rischio di sviluppare il cancro al seno. I nostri risultati non supportano un complessivo effetto protettivo degli antiossidanti lipofili sul rischio di cancro al seno. Le poche associazioni inverse osservato per il sottotipo di carotenoidi devono essere confermati in studi futuri.

706: Zeng Y, Yang Z, Xu JG, Yang MS, Zeng ZX, You C.

**Differentially expressed genes from the glioblastoma cell line SHG-44 treated with all-trans retinoic acid in vitro.**

J Clin Neurosci. 2009 Feb;16(2):285-94. Epub 2008 Dec 16. PubMed PMID: 19091570.

Morphology, immunocytochemistry, growth curve assay, and flow cytometry were used to investigate the effects of all-trans retinoic acid (RA) on cell proliferation, cell cycle progression and differentiation of the astrocytoma cell line SHG-44 from glioblastoma multiforme (World Health Organization grade IV). The differentially expressed genes from RA-treated and normal SHG-44 were identified by cDNA microarray after the cell line SHG-44 was treated with 10µM RA for 3 days. Validation of some differentially expressed genes was performed by Northern Blot analysis. The expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP) was markedly increased in RA-treated SHG-44 cells. Other changes included a short shuttle shape, small nucleus, decreased karyoplasm proportion, the formation of increased thin cytoplasmic processes, reduced cell growth and a 15% increase in G0/G1 phase cell populations. In addition, 42 known genes were identified with altered expression in our cDNA microarray. There was stable down-regulation of MDM2 and UGB as well as overexpression of SOD2, CSTB, and G3BP when RA-treated SHG-44 was compared with normal SHG-44. RA simultaneously suppressed the proliferation of SHG-44 cells significantly as well as induced differentiation and altered gene expression.

**Geni espressi differenzialmente dalla linea cellulare SHG-44 di glioblastoma trattata in vitro con l'acido retinoico tutto-trans.**

Morfologia, immunocitochimica, curva saggio di crescita, e citometria a flusso sono stati utilizzati per studiare gli effetti di acido all-trans retinoico (RA), sulla proliferazione cellulare, la progressione del ciclo cellulare e la differenziazione della linea cellulare astrocitoma SHG-44 da glioblastoma multiforme (Organizzazione Mondiale della Sanità IV grado). I geni differenzialmente espressi da RA-trattati e normale SHG-44 sono stati identificati mediante cDNA microarray dopo la linea di cellule SHG-44 è stata trattata con 10µM RA per 3 giorni. Validazione di alcuni geni espressi in modo differenziale è stata eseguita mediante analisi Northern Blot. L'espressione della proteina acida fibrillare gliale (GFAP) è stata notevolmente aumentata in AR trattati con SHG-44 cellule. Altre modifiche contenute una forma breve navetta, piccolo nucleo, diminuzione della proporzione karyoplasm, la formazione di un aumento dei processi citoplasmatici sottile, la crescita delle cellule ridotta e un aumento del 15% nelle popolazioni di cellule fase G0/G1. Inoltre, 42 sono stati identificati geni noti con l'espressione alterata nel nostro DNA microarray. C'era stabile down-regulation di MDM2 e UGB così come la sovraespressione di SOD2, CSTB, e quando G3BP RA trattati con SHG-44 è stato confrontato con le normali SHG-44. RA contemporaneamente soppresso la proliferazione delle cellule SHG-44 in modo significativo così come la differenziazione indotta e di espressione genica.

**Arsenite and its metabolites, MMA(III) and DMA(III), modify CYP3A4, PXR and RXR alpha expression in the small intestine of CYP3A4 transgenic mice.**

Toxicol Appl Pharmacol. 2009 Sep 1;239(2):162-8. Epub 2008 Nov 24. PubMed PMID:19084030.

Arsenic is an environmental pollutant that has been associated with an increased risk for the development of cancer and several other diseases through alterations of cellular homeostasis and hepatic function. Cytochrome P450 (P450) modification may be one of the factors contributing to these disorders. Several reports have established that exposure to arsenite modifies P450 expression by decreasing or increasing mRNA and protein levels. Cytochrome P450 3A4 (CYP3A4), the predominant P450 expressed in the human liver and intestines, which is regulated mainly by the Pregnane X Receptor-Retinoid X Receptor alpha (PXR-RXR alpha) heterodimer, contributes to the metabolism of approximately half the drugs in clinical use today. The present study investigates the effect of sodium arsenite and its metabolites monomethylarsonous acid (MMA(III)) and dimethylarsinous acid (DMA(III)) on CYP3A4, PXR, and RXR alpha expression in the small intestine of CYP3A4 transgenic mice. Sodium arsenite treatment increases mRNA, protein and CYP3A4 activity in a dose-dependent manner. However, the increase in protein expression was not as marked as compared to the increase in mRNA levels. Arsenite treatment induces the accumulation of Ub-protein conjugates, indicating that the activation of this mechanism may explain the differences observed between the mRNA and protein expression of CYP3A4 induction. Treatment with 0.05 mg/kg of DMA(III) induces CYP3A4 in a similar way, while treatment with 0.05 mg/kg of MMA(III) increases mostly mRNA, and to a lesser degree, CYP3A4 activity. Sodium arsenite and both its metabolites increase PXR mRNA, while only DMA(III) induces RXR alpha expression. Overall, these results suggest that sodium arsenite and its metabolites induce CYP3A4 expression by increasing PXR expression in the small intestine of CYP3A4 transgenic mice.

**L'arsenico e i suoi metaboliti, MMA(III) e DMA(III), modificano l'espressione di CYP3A4, PXR e RXR alfa nel piccolo intestino di topi transgenici CYP3A4**

L'arsenico è un inquinante ambientale che è stato associato ad un aumentato rischio per lo sviluppo del cancro e di diverse altre malattie attraverso alterazioni dell'omeostasi cellulare e della funzione epatica. Citocromo P450 (P450) la modifica può essere uno dei fattori che contribuiscono a questi disturbi. Diversi studi hanno stabilito che l'esposizione a arsenito modifica P450 espressione diminuendo o aumentando i livelli di mRNA e proteine. Citocromo P450 3A4 (CYP3A4), il P450 prevalente espressa nel fegato e l'intestino umano, che è regolata principalmente dal X pregnano recettore alfa-retinoidi X Receptor (PXR-RXR alfa) eterodimero, contribuisce al metabolismo di circa la metà della droga oggi l'uso clinico. Il presente studio indaga l'effetto di arsenito di sodio e dei suoi metaboliti monomethylarsonous acido (MMA (III)) e acido dimethylarsinous (DMA (III)) dal CYP3A4, PXR, e l'espressione RXR alfa nel piccolo intestino del CYP3A4 topi transgenici. Sodio arsenito trattamento aumenta mRNA, proteine e l'attività del CYP3A4, in modo dose-dipendente. Tuttavia, l'aumento di espressione della proteina non era così marcato come rispetto all'aumento dei livelli di mRNA. trattamento Arsenito induce l'accumulo di coniugati Ub-proteina, che indica che l'attivazione di questo meccanismo potrebbe spiegare le differenze osservate tra l'espressione di mRNA e di proteine di induzione del CYP3A4. Il trattamento con 0,05 mg / kg di DMA (III) induce il CYP3A4 in un modo simile, mentre il trattamento con 0,05 mg / kg di MMA (III) aumenta prevalentemente mRNA, e in misura minore, l'attività del CYP3A4. Sodio arsenito ed entrambi i suoi metaboliti aumento PXR mRNA, mentre solo il DMA (III) induce l'espressione RXR alfa. Nel complesso, questi risultati suggeriscono che arsenito di sodio e dei suoi metaboliti

indurre l'espressione di CYP3A4, aumentando l'espressione PXR nel piccolo intestino del CYP3A4 topi transgenici.

710: Papadimitrakopoulou VA, Lee JJ, William WN Jr, Martin JW, Thomas M, Kim ES, Khuri FR, Shin DM, Feng L, Hong WK, Lippman SM.

**Randomized trial of 13-cis retinoic acid compared with retinyl palmitate with or without beta-carotene in oral premalignancy.**

J Clin Oncol. 2009 Feb 1;27(4):599-604. Epub 2008 Dec 15. PubMed PMID: 19075276; PubMed Central PMCID: PMC2645856.

**PURPOSE:** To investigate whether retinyl palmitate (RP) alone or plus beta-carotene (BC) would be as effective and less toxic than low-dose 13-cis retinoic acid (13cRA) in treating oral premalignant lesions (OPLs) and reducing the risk of oral cancer.

**PATIENTS AND METHODS:** Initially, patients were randomly assigned to receive low-dose 13cRA or BC plus RP for 3 years (plus 2 years follow-up). After other randomized trials established an adverse effect of BC on lung cancer incidence/mortality, BC was dropped (patients randomly assigned to 13cRA or RP alone). The primary end point was OPL clinical response at 3 months.

**RESULTS:** We randomly assigned 162 eligible patients. The 3-month clinical response rate of the combined BC plus RP and RP alone arm (32.5%) was not statistically equivalent to that of 13cRA (48.1%). The clinical response rate of RP alone (20.0%) was significantly lower than that of BC plus RP (42.9%;  $P = .03$ ). Similar oral cancer-free survival rates were observed across all arms. There was no significant association between 3-month OPL response and subsequent oral cancer development ( $P = .11$ ). Grades 2 and higher adverse events were more common in the 13cRA than other groups ( $P < .0001$ ).

**CONCLUSION:** This large chemoprevention trial did not establish the equivalence of RP plus BC or RP alone with low-dose 13cRA in reducing the long-term risk of oral cancer. At present, 13cRA, BC plus RP, and RP alone cannot be recommended for chemoprevention, and new, better agents are needed in this setting. Our results did not establish short-term OPL response as a surrogate end point for oral cancer-free survival.

**Trial randomizzato sull'utilizzo dell'acido 13-cis retinoico confrontato al retinolo palmitato senza o con il betacarotene in caso di sviluppo di tumore orale**

**SCOPO:** Per studiare se Retinyl Palmitate (RP) da solo o più beta-carotene (BC) sarebbero altrettanto efficaci e meno tossici di basse dosi di 13-cis retinoico (13cRA) per via orale nel trattamento di lesioni precancerose (OPLs) e ridurre il rischio di cancro orale. **PAZIENTI E METODI:** Inizialmente, i pazienti sono stati randomizzati a ricevere 13cRA a basso dosaggio o BC RP più di 3 anni (+ 2 anni di follow-up). Dopo altri studi randomizzati istituito un effetto negativo di BC sulla incidenza del cancro del polmone / mortalità, BC è stata abbandonata (pazienti randomizzati a 13cRA RP o da soli). L'end point primario era la risposta OPL clinica a 3 mesi.

**RISULTATI:** Abbiamo randomizzato 162 pazienti eleggibili. Il tasso a 3 mesi la risposta clinica del combinato BC più RP e RP solo braccio (32,5%) non è risultato statisticamente equivalente a quella di 13cRA (48,1%). Il tasso di risposta clinica di RP da solo (20,0%) è risultata significativamente inferiore a quello di BC più RP (42,9%,  $P = .03$ ). Simili tassi di sopravvivenza cancro orale-free sono stati osservati in tutti i bracci. Non vi era alcuna associazione significativa tra i 3 mesi di risposta OPL e il successivo sviluppo del cancro orale ( $P = .11$ ). Classi 2 e superiori sono stati eventi avversi più comuni nel 13cRA rispetto agli altri gruppi ( $P < .0001$ ).

**CONCLUSIONE:** Questo studio chemioprevenzione grande non avrebbe dimostrato l'equivalenza di RP più RP aC o solo con 13cRA a basso dosaggio nel ridurre il rischio a lungo termine del

cancro orale. Allo stato attuale, 13cRA, BC più RP e RP da solo non può essere raccomandato per la chemioprevenzione, e nuovi, meglio gli agenti sono necessari in questa impostazione. I nostri risultati non ha dimostrato a breve termine di risposta OPL come end point surrogato per la sopravvivenza del cancro orale-free.

712: Shimizu M, Takai K, Moriwaki H.

**Strategy and mechanism for the prevention of hepatocellular carcinoma: phosphorylated retinoid X receptor alpha is a critical target for hepatocellular carcinoma chemoprevention.** Cancer Sci. 2009Mar;100(3):369-74. Epub 2008 Dec 4. Review. PubMed PMID: 19068086.

Hepatocellular carcinoma (HCC) is a major health care problem worldwide. The prognosis of patients with HCC is poor because even in the early stages when surgical treatment might be expected to be curative, the incidence of recurrence in patients with underlying cirrhosis is very high due to multicentric carcinogenesis. Therefore, strategies to prevent recurrence and second primary HCC are required to improve the prognosis. One of the most practical approaches to prevent the multicentric development of HCC is 'clonal deletion' therapy, which is defined as the removal of latent (i.e. invisible) (pre)malignant clones from the liver in a hypercarcinogenic state. Retinoids, a group of structural and functional analogs of vitamin A, exert their biological function primarily through two distinct nuclear receptors, retinoic acid receptors and retinoid X receptors (RXR), and abnormalities in the expression and function of these receptors are highly associated with the development of various cancers, including HCC. In particular, a malfunction of RXRalpha due to phosphorylation by the Ras-mitogen-activated protein kinase signaling pathway is profoundly associated with the development of HCC and thus may be a critical target for HCC chemoprevention. Acyclic retinoid, which has been clinically shown to reduce the incidence of a post-therapeutic recurrence of HCC, can inhibit Ras activity and phosphorylation of the extracellular signal-regulated kinase and RXRalpha proteins. In conclusion, the inhibition of RXRalpha phosphorylation and the restoration of its physiological function as a master regulator for nuclear receptors may be a potentially effective strategy for HCC chemoprevention and clonal deletion. Acyclic retinoid, which targets phosphorylated RXRalpha, may thus play a critical role in preventing the development of multicentric HCC.

**Strategia e meccanismo per la prevenzione del carcinoma epatocellulare: l'alfarecettore X dei retinoidi è un target critico per la chemioprevenzione del carcinoma epatocellulare**

Il carcinoma epatocellulare (HCC) è un importante problema sanitario in tutto il mondo. La prognosi dei pazienti con carcinoma epatocellulare è povero perché anche nelle prime fasi, quando il trattamento chirurgico si potrebbe aspettare di essere curativa, l'incidenza delle recidive nei pazienti con cirrosi sottostante è molto elevato a causa di carcinogenesi multicentrica. Pertanto, le strategie per prevenire le recidive e la seconda elementare HCC sono necessarie per migliorare la prognosi. Uno degli approcci più pratici per prevenire lo sviluppo policentrico di HCC è la terapia 'delezione clonale', che è definita come l'asportazione di latente (cioè invisibili) (pre) cloni maligni dal fegato in uno stato hypercarcinogenic. I retinoidi, un gruppo di analoghi strutturali e funzionali della vitamina A, esercitano la loro funzione biologica, principalmente attraverso due distinti recettori nucleari, i recettori dell'acido retinoico e recettori dei retinoidi X (RXR) e anomalie nella espressione e la funzione di questi recettori sono altamente associati con la sviluppo di vari tumori, tra cui HCC. In particolare, un malfunzionamento del RXRalpha a causa di fosforilazione della proteina attraverso la via Ras-chinasi mitogeno-attivata segnalazione è profondamente connessi con lo sviluppo di HCC, e quindi può essere un bersaglio critico per la chemioprevenzione del carcinoma epatocellulare. retinoidi aciclici, che è stato clinicamente dimostrato di ridurre l'incidenza di una recidiva post-terapeutico del carcinoma epatocellulare, può inibire l'attività di Ras

e la fosforilazione delle chinasi extracellulare signal-regulated e proteine RXRalpha. In conclusione, l'inibizione della fosforilazione RXRalpha e il ripristino della sua funzione fisiologica come regolatore master per i recettori nucleari possono essere una strategia potenzialmente efficace per la chemioprevenzione del carcinoma epatocellulare e la cancellazione clonale. retinoidi aciclici, che si rivolge fosforilati RXRalpha, può quindi giocare un ruolo cruciale nel prevenire lo sviluppo di HCC multicentrico.

716: Trojanowicz B, Winkler A, Hammje K, Chen Z, Sekulla C, Glanz D, Schmutzler C, Mentrup B, Hombach-Klonisch S, Klonisch T, Finke R, Köhrle J, Dralle H, Hoang-Vu C.

**Retinoic acid-mediated down-regulation of ENO1/MBP-1 gene products caused decreased invasiveness of the follicular thyroid carcinoma cell lines.**

JMol Endocrinol. 2009 Mar;42(3):249-60. Epub 2008 Dec 5. PubMed PMID: 19060179.

Retinoic acid (RA) acts as an anti-proliferative and redifferentiation agent in the therapy of thyroid carcinoma. Our previous studies demonstrated that pretreatment of follicular thyroid carcinoma cell lines FTC-133 and FTC-238 resulted in decreased in vitro proliferation rates and reduced tumor cell growth of xenotransplants. In addition to the previous results, we found that RA led to decreased vitality and invasiveness of FTC-133 and FTC-238 cells as they reacted with reduction of intracellular ATP levels and number of migrated cells respectively. However, the molecular mechanisms by which RA mediates these effects are not well understood. Two-dimensional (2D) screening of the proteins related to ATP metabolism and western blot analysis revealed alpha-enolase (ENO1) to be down-regulated in FTC-133 and FTC-238 cells after RA treatment. 2D gel detection and mass spectrometric analysis revealed that ENO1 existed as three separate protein spots of distinct pIs (ENO1-A1-A3). Comparative 2D difference gel electrophoresis analysis of fluorescently labeled protein samples of RA-treated and untreated FTC-133 demonstrated a selective down-regulation of ENO1-A1 which we identified as a phosphoprotein. RA caused the dephosphorylation of ENO1-A1. Both, RA-mediated and specific knock-down of ENO1/MBP-1 resulted in the reduction of MYC oncoprotein, and simultaneously decreased proliferation rates of FTC-133 and FTC-238 cell lines. In summary, the RA-mediated down-regulation of the ENO1 gene products and MYC oncoprotein provides a novel molecular mechanism facilitating the anti-proliferative effect of RA in human thyroid carcinoma cells and suggests new pathways for supportive RA therapies.

**I prodotti dei geni ENO1/MBP-1 regolati negativamente dall'acido retinoico causano una diminuzione dell'invasività nelle linee cellulari di carcinoma dei follicoli tiroidei**

L'acido retinoico (RA) agisce come un anti-proliferativa e agente ridifferenziazione nella terapia del carcinoma della tiroide. I nostri studi precedenti hanno dimostrato che il pretrattamento delle linee di carcinoma tiroideo follicolare cellule FTC-133 e FTC-238 determinato una riduzione dei tassi di proliferazione in vitro e ha ridotto la crescita delle cellule tumorali di xenotrapianti. Oltre ai risultati precedenti, abbiamo scoperto che RA ha portato alla vitalità ridotta invasività e di FTC-133 e FTC-238 celle come hanno reagito con una riduzione di livelli intracellulari di ATP e numero di cellule migrate rispettivamente. Tuttavia, i meccanismi molecolari attraverso i quali RA mediere questi effetti non sono ben compresi. Bidimensionale (2D) screening delle proteine legate al metabolismo ATP e l'analisi occidentale della macchia ha rivelato l'alfa-enolasi (ENO1) di essere down-regolato nei FTC-133 e FTC-238 cellule dopo trattamento con RA. 2D gel di rilevazione e analisi di spettrometria di massa ha rivelato che ENO1 esistito come tre spot proteici separati di pIs distinti (ENO1-A1-A3). Analisi comparativa 2D gel elettroforesi differenza di campioni della proteina fluorescente in etichetta di RA-trattati e non trattati FTC-133 ha dimostrato una selettiva down-regulation dei ENO1-A1, che abbiamo identificato come una proteina fosforilata. RA ha causato la

defosforilazione di ENO1-A1. Entrambi, RA-mediata e specifici knock-down di ENO1/MBP-1 portato alla riduzione di oncoproteina MYC, e contemporaneamente diminuito i tassi di proliferazione di FTC-133 e FTC-238 linee cellulari. In sintesi, il RA-mediata down-regulation dei prodotti genici ENO1 oncoproteina MYC e fornisce un nuovo meccanismo molecolare facilitare l'effetto anti-proliferativo di RA nelle cellule umane di carcinoma della tiroide e propone nuove strade per terapie di supporto RA.

718: Hao J, Zhang B, Liu B, Lee M, Hao X, Reuhl KR, Chen X, Yang CS.

**Effect of alpha-tocopherol, N-acetylcysteine and omeprazole on esophageal adenocarcinoma formation in a rat surgical model.**

Int J Cancer. 2009 Mar 15;124(6):1270-5. PubMed PMID: 19058177; PubMed Central PMCID: PMC2677378.

We previously demonstrated that oxidative stress subsequent to gastroesophageal reflux is an important driving force of esophageal adenocarcinoma (EAC) formation in the esophagogastrroduodenal anastomosis (EGDA) rat model. This study investigated the possible tumor inhibitory effects of 2 antioxidants, alpha-tocopherol (389 and 778 ppm), N-acetylcysteine (NAC, 500 and 1,000 ppm), and their combination (389 and 500 ppm, respectively), as well as an antacid therapeutic agent, omeprazole (1,400 ppm). The rats were fed experimental diets 2 weeks after EGDA. All the animals were sacrificed 40 weeks after EGDA and the esophagi were harvested for histopathological examination. alpha-Tocopherol dose-dependently decreased the incidence of EAC ( $p = 0.03$ ), with 778 ppm alpha-tocopherol reducing the incidence of EAC to 59% (16/27) in comparison with 84% (26/31) in the control group ( $p = 0.04$ ). Supplementation of alpha-tocopherol also increased the serum concentration of alpha-tocopherol. NAC at 500 and 1,000 ppm did not significantly decrease EAC incidence; however, the combination of alpha-tocopherol 389 ppm and NAC 500 ppm significantly reduced the incidence of EAC to 55% (15/27) ( $p = 0.02$ ). alpha-Tocopherol alone or in combination with NAC significantly reduced the number of infiltrating cells positively stained for 4-hydroxynonenal. Omeprazole showed only a slight nonsignificant inhibitory effect at the dose given. Our results suggest that supplementation with alpha-tocopherol inhibits the development of EAC in the rat EGDA model and similar inhibitory effect can be achieved when a lower dose of alpha-tocopherol is used in combination with NAC.

**Effetto dell'alfa-tocoferolo, dell'N-acetilcisteina e dell'omeprazolo sulla formazione dell'adenocarcinoma esofageo in un modello chirurgico di topo**

Abbiamo precedentemente dimostrato che lo stress ossidativo conseguente a reflusso gastroesofageo è un motore importante di adenocarcinoma esofageo (EAC), la formazione nella anastomosi esophagogastrroduodenal (EGDA) modello di ratto. Questo studio ha esaminato i possibili effetti di inibizione tumorale di 2 antiossidanti, alfa-tocoferolo (389 e 778 ppm), N-Acetilcisteina (NAC, 500 e 1.000 ppm), e la loro combinazione (389 e 500 ppm, rispettivamente), così come un antiacido agente terapeutico, l'omeprazolo (1.400 ppm). I ratti sono stati alimentati con diete sperimentali 2 settimane dopo EGDA. Tutti gli animali sono stati sacrificati 40 settimane dopo EGDA e la esofagi sono state raccolte per l'esame istopatologico. alfa-tocoferolo dose-dipendente l'incidenza di EAC ( $p = 0,03$ ), con 778 ppm di alfa-tocoferolo ridurre l'incidenza di EAC al 59% (16/27) rispetto al 84% (26/31) nel gruppo di controllo ( $p = 0,04$ ). La supplementazione di alfa-tocoferolo anche aumentato la concentrazione sierica di alfa-tocoferolo. NAC a 500 e 1000 ppm non ha una significativa riduzione dell'incidenza EAC, tuttavia, la combinazione di alfa-tocoferolo 389 ppm e 500 ppm NAC ha ridotto significativamente l'incidenza di EAC al 55% (15/27) ( $p = 0,02$ ). alfa-tocoferolo solo o in combinazione con NAC ha ridotto significativamente il numero di infiltrare cellule colorate positivamente per 4-idrossinonenale. Omeprazolo hanno mostrato solo un lieve effetto inibitorio non significativa alla dose somministrata. I nostri risultati suggeriscono che la supplementazione con alfa-tocoferolo inibisce lo sviluppo di EAC nel modello di ratto EGDA e un simile effetto inibitorio può essere raggiunto quando una dose minore di alfa-tocoferolo è utilizzato in combinazione con NAC.

720: Cheung YT, Lau WK, Yu MS, Lai CS, Yeung SC, So KF, Chang RC.

**Effects of all-trans-retinoic acid on human SH-SY5Y neuroblastoma as in vitro model in neurotoxicity research.**

Neurotoxicology. 2009 Jan;30(1):127-35. Epub 2008 Nov 14. PubMed PMID: 19056420.

Human neuroblastoma SH-SY5Y is a dopaminergic neuronal cell line which has been used as an in vitro model for neurotoxicity experiments. Although the neuroblastoma is usually differentiated by all-trans-retinoic acid (RA), both RA-differentiated and undifferentiated SH-SY5Y cells have been used in neuroscience research. However, the changes in neuronal properties triggered by RA as well as the subsequent responsiveness to neurotoxins have not been comprehensively studied. Therefore, we aim to re-evaluate the differentiation property of RA on this cell line. We hypothesize that modulation of signaling pathways and neuronal properties during RA-mediated differentiation in SH-SY5Y cells can affect their susceptibility to neurotoxins. The differentiation property of RA was confirmed by showing an extensive outgrowth of neurites, increased expressions of neuronal nuclei, neuron specific enolase, synaptophysin and synaptic associated protein-97, and decreased expression of inhibitor of differentiation-1. While undifferentiated SH-SY5Y cells were susceptible to 6-OHDA and MPP+, RA-differentiation conferred SH-SY5Y cells higher tolerance, potentially by up-regulating survival signaling, including Akt pathway as inhibition of Akt removed RA-induced neuroprotection against 6-OHDA. As a result, the real toxicity cannot be revealed in RA-differentiated cells. Therefore, undifferentiated SH-SY5Y is more appropriate for studying neurotoxicity or neuroprotection in experimental Parkinson's disease research.

**Effetti dell'acido retinoico tutto-trans sul neuroblastoma umano SH-SY5Y come modello in vitro nella ricerca della neurotossicità**

Neuroblastoma umano SH-SY5Y è una linea di cellule neuronali dopaminergiche che è stato usato come un modello in vitro per gli esperimenti di neurotossicità. Anche se il neuroblastoma è generalmente differenziato per tutto trans retinoico (RA), entrambe le celle RA-differenziati e indifferenziati SH-SY5Y sono stati utilizzati nella ricerca neuroscientifica. Tuttavia, i cambiamenti nelle proprietà neuronali innescati da RA così come la capacità di risposta alle neurotossine successivi non sono stati ampiamente studiati. Pertanto, ci proponiamo di rivalutare la proprietà differenziazione di RA su questa linea cellulare. Ipotizziamo che la modulazione delle vie di segnalazione e le proprietà neuronali durante la differenziazione RA-mediata in cellule SH-SY5Y può incidere sulla loro predisposizione alle neurotossine. La proprietà differenziazione di RA è stata confermata da mostrando una conseguenza estesa di neuriti, aumento espressioni di nuclei neuronali, enolasi neurone specifico, sinaptofisina e sinaptica associata di proteine-97, e la ridotta espressione di inibitori di differenziazione-1. Mentre cellule indifferenziate SH-SY5Y sono state sensibili a 6-OHDA e MPP +, RA-differenziazione conferite le cellule SH-SY5Y maggiore tolleranza, potenzialmente di sopravvivenza up-regolazione di segnalazione, tra cui via Akt come inibizione di Akt rimosso RA-indotta neuroprotezione contro 6-OHDA . Di conseguenza, la tossicità reale non può essere rivelata in celle RA-differenziate. Pertanto, indifferenziato SH-SY5Y è più appropriato per studiare la neurotossicità, ovvero neuroprotezione nella ricerca sperimentale della malattia di Parkinson.

727: Ruiz FX, Gallego O, Ardèvol A, Moro A, Domínguez M, Alvarez S, Alvarez R, de Lera AR, Rovira C, Fita I, Parés X, Farrés J.

**Aldo-keto reductases from the AKR1B subfamily: retinoid specificity and control of cellular retinoic acid levels.**

Chem Biol Interact. 2009 Mar 16;178(1-3):171-7. Epub 2008 Oct 25. PubMed PMID:19014918.

NADP(H)-dependent cytosolic aldo-keto reductases (AKRs) have been added to the group of enzymes which contribute to oxidoreductive conversions of retinoids. Recently, we found that two members from the AKR1B subfamily (AKR1B1 and AKRB10) were active in the reduction of all-trans- and 9-cis-retinaldehyde, with  $K(m)$  values in the micromolar range, but with very different  $k(cat)$  values. With all-trans-retinaldehyde, AKR1B10 shows a much higher  $k(cat)$  value than AKR1B1 (18  $min^{-1}$  vs. 0.37  $min^{-1}$ ) and a catalytic efficiency comparable to that of the best retinaldehyde reductases. Structural, molecular dynamics and site-directed mutagenesis studies on AKR1B1 and AKR1B10 point that subtle differences at the entrance of their retinoid-binding site, especially at position 125, are determinant for the all-trans-retinaldehyde specificity of AKR1B10. Substitutions in the retinoid cyclohexene ring, analyzed here further, also influence such specificity. Overall it is suggested that the rate-limiting step in the reaction mechanism with retinaldehyde differs between AKR1B1 and AKR1B10. In addition, we demonstrate here that enzymatic activity of AKR1B1 and AKR1B10 lowers all-trans- and 9-cis-retinoic acid-dependent trans-activation in living cells, indicating that both enzymes may contribute to pre-receptor regulation of retinoic acid and retinoid X nuclear receptors. This result supports that overexpression of AKR1B10 in cancer (an updated review on this topic is included) may contribute to dedifferentiation and tumor development.

**Aldo-cheto reduttasi della sottofamiglia AKR1B: specificità dei retinoidi e controllo dei livelli cellulari di acido retinoico**

NADP (H)-dipendente citosolica aldo-cheto reduttasi (AKRs) sono stati aggiunti al gruppo di enzimi che contribuiscono alla conversioni oxidoreductive dei retinoidi. Recentemente, abbiamo scoperto che due membri della sottofamiglia AKR1B (AKR1B1 e AKRB10) sono stati attivi nella riduzione di tutte le e-trans-9-cis-retinaldehyde, con  $K(m)$  valori nell'intervallo micromolare, ma con  $k$  molto diversi ( $cat$ ) valori. Con tutto-trans-retinaldehyde, AKR1B10 mostra un  $k$  molto più elevato (gatto) valore di AKR1B1 (18  $min^{-1}$  vs 0,37  $min^{-1}$ ) e una efficienza catalitica comparabile a quello dei migliori retinaldehyde reduttasi. Strutturale, dinamica molecolare e studi di mutagenesi sito-diretta su AKR1B1 e punto AKR1B10 che sottili differenze all'ingresso del loro sito retinoidi vincolante, soprattutto in posizione 125, sono determinanti per la specificità all-trans-retinaldehyde di AKR1B10. Sostituzioni nel ring cicloesene retinoidi, qui analizzate ulteriormente, anche influenzare la specificità del genere. In generale si suggerisce che il passaggio limitante nel meccanismo di reazione con retinaldehyde differisce tra AKR1B1 e AKR1B10. Inoltre, dimostriamo qui che l'attività enzimatica della AKR1B1 e AKR1B10 abbassa tutto trans e 9-cis-retinoico-dipendente trans-attivazione di cellule viventi, che indica che entrambi gli enzimi possono contribuire alla pre-regolazione del recettore dell'acido retinoico e dei retinoidi X recettori nucleari. Questo risultato sostiene che la sovraespressione di AKR1B10 in cancro (una rassegna aggiornata su questo argomento è incluso), possono contribuire allo sviluppo e la de-differenziazione del tumore.

728: Freitas RA, Silva dos Santos GA, Gimenes Teixeira HL, Scheucher PS, Lucena-Araujo AR, Lima AS, Abreu e Lima RS, Garcia AB, Jordão AA Jr, Falcão RP, Vannucchi H, Rego EM.

**Apoptosis induction by (+)alpha-tocopheryl succinate in the absence or presence of all-trans retinoic acid and arsenic trioxide in NB4, NB4-R2 and primary APL cells.**

Leuk Res. 2009 Jul;33(7):958-63. Epub 2008 Nov 14. PubMed PMID: 19013639.

We analyzed the effect of (+)alpha-tocopheryl succinate (alpha-TOS) alone or associated with arsenic trioxide (ATO) or all-trans retinoid acid (ATRA) in acute promyelocytic leukemia (APL). alpha-TOS-induced apoptosis in APL clinical samples and in ATRA-sensitive (NB4) and ATRA-resistant (NB4-R2) APL cell lines. The effective dose 50% (ED-50) was calculated to be 71 and 58muM, for NB4 and NB4-R2, respectively. alpha-TOS neither induced nor modified ATRA-induced differentiation of APL cells, and did not affect the proliferation and differentiation of normal CD34(+) hematopoietic progenitors in methylcellulose assays. alpha-TOS exerted a moderate antagonistic effect to ATO-induced apoptosis when treatment was done simultaneously but when alpha-TOS was added 24h after ATO, an additive effect was observed. Our results support the concept of alpha-TOS as an anti-leukemic compound which spares normal hematopoiesis.

**Induzione dell'apoptosi tramite l' (+)alfa-tocopheril succinato in assenza o in presenza dell'acido retinoico tutto-trans e dell'arsenico triossido nelle cellule NB4, NB4-R2 e APL primarie**

Abbiamo analizzato l'effetto dell' alfa-tocopheril succinato (alpha-TOS) da solo o associato con triossido di arsenico (ATO) o di acido all-trans retinoidi (ATRA) nella leucemia promielocitica acuta (APL). alfa-TOS-apoptosi indotta in campioni clinici e in APL ATRA-sensibili (NB4) e ATRA-resistente (NB4-R2) le linee di cellule APL. La dose efficace 50% (DE-50) è stata calcolata in 71 e 58muM, per NB4 e NB4-R2, rispettivamente. alfa-TOS, né modificato né indotta ATRA indotto la differenziazione delle cellule APL, e non ha influenzato la proliferazione e la differenziazione delle cellule CD34 normale (+) progenitori ematopoietici nei test di metilcellulosa. alfa-TOS esercitato un moderato effetto antagonista ATO apoptosi indotta quando il trattamento è stato fatto contemporaneamente, ma quando l'alfa-TOS è stato aggiunto 24 ore dopo ATO, un effetto additivo è stato osservato. I nostri risultati supportano il concetto di alfa-TOS come un composto anti-leucemica che risparmia emopoiesi normale.

731: Ryningen A, Stapnes C, Lassalle P, Corbascio M, Gjertsen BT, Bruserud O.

**A subset of patients with high-risk acute myelogenous leukemia shows improved peripheral blood cell counts when treated with the combination of valproic acid, theophylline and all-trans retinoic acid.**

Leuk Res. 2009 Jun;33(6):779-87. Epub2008 Nov 12. PubMed PMID: 19007987.

Acute myelogenous leukemia (AML) patients (24 consecutive patients, median age 71 years, 17 high-risk disease) were treated with all-trans retinoic acid, theophylline and valproic acid. Among 22 evaluable patients 9 responded with increased normal peripheral blood cell counts. The responses could be classified as hematological improvement according to response criteria for patients with myelodysplastic syndromes (MDS) for four patients only. The nine patients with increased normal cell counts had a median survival from start of therapy of 147 days compared with 48 days for the other patients. Four patients fulfilling the MDS criteria had a survival ranging from 112 to 644 days. The treatment was associated with decreased in vitro cytokine-dependent AML cell proliferation and increased blood levels of Endocan and angiopoietin-2 both for responders and non-responders. We conclude that the therapy causes disease stabilization for a subset of AML patients.

**Pazienti con alto rischio di leucemia mielogenica acuta se trattati con acido valproico, teofillina e acido retinoico tutto-trans mostrano un numero di cellule del sangue periferiche aumentato**

Leucemia mieloide acuta (AML) pazienti (24 pazienti consecutivi, di età media 71 anni, 17 malattia ad alto rischio) sono stati trattati con all-trans retinoico, teofillina e acido valproico. Tra i 22 pazienti valutabili 9 risposto con aumento della conta delle cellule del sangue periferico normale. Le risposte potrebbero essere classificate come miglioramento ematologico in base a criteri di risposta per i pazienti con sindromi mielodisplastiche (MDS) per quattro pazienti solo. I nove pazienti con aumento della conta delle cellule normali avevano una sopravvivenza mediana dall'inizio della terapia di 147 giorni, rispetto a 48 giorni per gli altri pazienti. Quattro pazienti che soddisfano i criteri di MDS hanno avuto una sopravvivenza che variano dal 112-644 giorni. Il trattamento è stato associato con una diminuzione in vitro di citochine-dipendente la proliferazione delle cellule AML e aumento dei livelli ematici di Endocan e angiopoietina-2 sia per i responders e non-responders. Concludiamo che la terapia cause stabilizzazione della malattia per un sottogruppo di pazienti con LMA.

733: Elizondo G, Medina-Díaz IM, Cruz R, Gonzalez FJ, Vega L.

**Retinoic acid modulates retinaldehyde dehydrogenase 1 gene expression through the induction of GADD153-C/EBPbeta interaction.**

Biochem Pharmacol. 2009 Jan 15;77(2):248-57. Epub 2008 Oct 17. PubMed PMID: 18992716; PubMed Central PMCID: PMC2790144.

Mammalian class I aldehyde dehydrogenase (ALDH) plays an important role in the biosynthesis of the hormone retinoic acid (RA), which modulates gene expression and cell differentiation. RA has been shown to mediate control of human ALDH1 gene expression through modulation of the retinoic acid receptor alpha (RARalpha) and the CCAAT/enhancer binding protein beta (C/EBPbeta). The positive activation of these transcription factors on the ALDH1 promoter is inhibited by RA through a decrease of C/EBPbeta binding to the ALDH1 CCAAT box response element. However, the mechanism of this effect remains unknown. Here we report that the RARalpha/retinoid X receptor beta (RXRbeta) complex binds to the mouse retinaldehyde dehydrogenase 1 (Raldh1) promoter at a non-consensus RA response element (RARE) with similar affinity to that of the consensus RARE. We found that C/EBPbeta binds to a Raldh1 CCAAT box located at -82/-58bp, adjacent to the RARE. Treatment with RA increases GADD153 and GADD153-C/EBPbeta interaction resulting in a decreased cellular availability of C/EBPbeta for binding to the Raldh1 CCAAT box. These data support a model in which high RA levels inhibit Raldh1 gene expression by sequestering C/EBPbeta through its interaction to GADD153.

**L'acido retinoico modula l'espressione del gene della retinaldeide deidrogenasi 1 tramite l'induzione dell'interazione GADD153-C/EBPbeta**

Classe dei mammiferi I aldeide deidrogenasi (ALDH) svolge un ruolo importante nella biosintesi dell'acido ormone retinoico (RA), che modula l'espressione genica e differenziazione cellulare. RA ha dimostrato di mediare il controllo della espressione genica umana ALDH1 attraverso la modulazione del recettore alfa dell'acido retinoico (RARalpha) e la CCAAT / enhancer binding proteina beta (C / EBPbeta). L'attivazione positivo di questi fattori di trascrizione sul promotore ALDH1 è inibita da RA attraverso una diminuzione di C / EBPbeta legame con l'elemento ALDH1 CCAAT risposta box. Tuttavia, il meccanismo di questo effetto rimane sconosciuto. Qui segnaliamo che il RARalpha / retinoide X recettore beta (RXRbeta) lega con l'retinaldehyde mouse deidrogenasi 1 (Raldh1), promotore di un elemento non-consenso risposta RA (RARE) con affinità simile a quella dei rari consenso. Abbiamo trovato che C / EBPbeta si lega a una casella di Raldh1 CCAAT trova a -82/-58bp, adiacente al RARE. Il trattamento con RA aumenta l'interazione GADD153 GADD153-C/EBPbeta e con conseguente minore disponibilità cellulare di C / EBPbeta per il legame alla casella CCAAT Raldh1. Questi dati sostengono un modello in cui livelli elevati di RA inibire l'espressione genica Raldh1 sequestrando C / EBPbeta attraverso la sua interazione a GADD153.

734: Tocchini-Valentini GD, Rochel N, Escriva H, Germain P, Peluso-Iltis C, ParisM, Sanglier-Cianferani S, Van Dorsselaer A, Moras D, Laudet V.

**Structural and functional insights into the ligand-binding domain of a nonduplicated retinoid X nuclear receptor from the invertebrate chordate amphioxus.**

J Biol Chem. 2009 Jan 16;284(3):1938-48. Epub 2008 Nov 4. PubMed PMID: 18986992.

Retinoid X nuclear receptors (RXRs), as well as their insect orthologue, ultraspiracle protein (USP), play an important role in the transcription regulation mediated by the nuclear receptors as the common partner of many other nuclear receptors. Phylogenetic and structural studies have shown that the several evolutionary shifts have modified the ligand binding ability of RXRs. To understand the vertebrate-specific character of RXRs, we have studied the RXR ligand-binding domain of the cephalochordate amphioxus (*Branchiostoma floridae*), an invertebrate chordate that predates the genome duplication that produced the three vertebrates RXRs (alpha, beta, and gamma). Here we report the crystal structure of a novel apotetramer conformation of the AmphiRXR ligand-binding domain, which shows some similarity with the structures of the arthropods RXR/USPs. AmphiRXR adopts an apo antagonist conformation with a peculiar conformation of helix H11 filling the binding pocket. In contrast to the arthropods RXR/USPs, which cannot be activated by any RXR ligands, our functional data show that AmphiRXR, like the vertebrates/mollusk RXRs, is able to bind and be activated by RXR ligands but less efficiently than vertebrate RXRs. Our data suggest that amphioxus RXR is, functionally, an intermediate between arthropods RXR/USPs and vertebrate RXRs.

**Intuizioni strutturali e funzionali nel dominio di legame al ligando del recettore nucleare X dei retinoidi non duplicato dall'anfiosso cordato invertebrato**

Recettori dei retinoidi X nucleare (RXR), così come i loro orthologue insetto, proteine ultraspiracle (USP), svolgono un ruolo importante nella regolazione della trascrizione mediata dai recettori nucleari come partner comune di molti altri recettori nucleari. Filogenetiche e studi strutturali hanno dimostrato che i cambiamenti evolutivi diversi hanno modificato la capacità di legame di RXRs. Per capire il carattere specifico di vertebrati RXRs, abbiamo studiato il dominio RXR ligando vincolante del anfiosso cephalochordate (*floridae Branchiostoma*), un cordato invertebrato che precede la duplicazione del genoma che ha prodotto i tre vertebrati RXRs (alfa, beta e gamma). Riportiamo la struttura cristallina di un romanzo apotetramer conformazione del dominio AmphiRXR ligand-binding, che mostra qualche somiglianza con le strutture del artropodi RXR / fornitori del servizio universale. AmphiRXR adotta una conformazione apo antagonista con una particolare conformazione di elica H11 riempire la tasca vincolanti. In contrasto con la artropodi RXR / fornitori del servizio universale, che non può essere attivata da qualsiasi ligandi RXR, i nostri dati mostrano che AmphiRXR funzionali, come i vertebrati / RXRs mollusco, è in grado di legare e di essere attivato da ligandi RXR, ma meno efficiente rispetto RXRs vertebrati. I nostri dati suggeriscono che RXR anfiosso è, funzionalmente, un intermedio tra artropodi RXR / fornitori del servizio universale e vertebrati RXRs.

750: Nakagawa T, Shimizu M, Shirakami Y, Tatebe H, Yasuda I, Tsurumi H, Moriwaki H.

**Synergistic effects of acyclic retinoid and gemcitabine on growth inhibition in pancreatic cancer cells.**

Cancer Lett. 2009 Jan 18;273(2):250-6. Epub 2008 Sep 11. PubMed PMID: 18789834.

Pancreatic cancer is a serious healthcare problem worldwide because of its high mortality. Gemcitabine, a DNA synthesis inhibitor, is the standard first-line treatment for advanced pancreatic cancer and is also expected as a key drug for the combination therapy of this malignancy. Retinoids, which are derivatives of vitamin A, exert anti-tumor effects in various types of human malignancies, including pancreatic cancer. This study examined whether combination therapy with gemcitabine and acyclic retinoid (ACR), a new synthetic retinoid, had enhanced anti-tumor efficacy in pancreatic cancer. ACR, 9-cis-retinoic acid and gemcitabine preferentially inhibited the growth of human pancreatic cancer cells (Panc-1 and KP-2) in comparison to PE normal human pancreatic epithelial cells. The combination of ACR plus gemcitabine synergistically inhibited the growth of Panc-1 cells. The combined treatment with these two agents also acted synergistically to induce apoptosis and to inhibit Ras activation in these cancer cells. In vivo, the combination therapy augmented tumor growth inhibition through the induction of apoptosis and inhibition of cell proliferation in tumor tissue. These results suggest that the combination of ACR plus gemcitabine may therefore be an effective regimen for the chemotherapy of pancreatic cancer.

**Effetti sinergici dei retinoidi aciclici e della gemcitabina sull'inibizione della crescita nelle cellule cancerose pancreatiche**

Il tumore al pancreas è un problema sanitario serio in tutto il mondo a causa della sua elevata mortalità. Gemcitabina, un inibitore della sintesi del DNA, è il trattamento standard di prima linea per il carcinoma pancreatico avanzato e si aspetta anche come farmaco chiave per la terapia di associazione di questa neoplasia. I retinoidi, che sono derivati della vitamina A, esercitano effetti anti-tumorali in vari tipi di tumori umani, tra cui il cancro al pancreas. Questo studio ha esaminato se la terapia di combinazione con Gemcitabina e retinoidi aciclici (ACR), un nuovo retinoide sintetico, aveva migliorato l'efficacia anti-tumorale nel cancro del pancreas. ACR, l'acido 9-cis-retinoico e gemcitabina preferenzialmente inibito la crescita di cellule umane di cancro del pancreas (Panc-1 e KP-2) rispetto al PE normali cellule epiteliali pancreatiche. La combinazione di gemcitabina ACR più sinergica inibito la crescita di Panc-1 celle. Il trattamento combinato con questi due agenti ha anche agito in sinergia per indurre l'apoptosi e di inibire l'attivazione di Ras in queste cellule tumorali. In vivo, la terapia di combinazione aumentata inibizione della crescita tumorale attraverso l'induzione di apoptosi e inibizione della proliferazione cellulare nel tessuto tumorale. Questi risultati suggeriscono che la combinazione di gemcitabina ACR plus può quindi essere un regime efficace per la chemioterapia del tumore al pancreas.

752: Epping MT, Bernards R.

**Molecular basis of the anti-cancer effects of histone deacetylase inhibitors.**

Int J Biochem Cell Biol. 2009 Jan;41(1):16-20. Epub 2008 Aug 12. Review. PubMed PMID: 18765293.

Histone deacetylase inhibitors comprise a variety of natural and synthetic compounds, which have in common that they inhibit enzymes that mediate the removal of acetyl groups from a range of proteins, including nucleosomal histones. Histone deacetylase inhibitors have anti-cancer activities in vitro and in vivo and are used in the clinic for the treatment of advanced cutaneous T cell lymphoma. The molecular pathways targeted by these compounds are discussed with an emphasis on the effects of these compounds on retinoic acid signaling.

**Basi molecolari degli effetti anti tumorali degli inibitori della deacetilasi degli istoni**

Gli inibitori dell'istone deacetilasi comprende una varietà di composti naturali e sintetici, che hanno in comune il fatto che inibisce gli enzimi che mediano la rimozione dei gruppi acetile da una serie di proteine, tra cui gli istoni nucleosomal. Gli inibitori dell'istone deacetilasi hanno attività antitumorale in vitro e in vivo e sono utilizzati in clinica per il trattamento del linfoma cutaneo avanzato T. I percorsi molecolari mirate da questi composti sono discussi con particolare attenzione per gli effetti di questi composti di acido retinoico segnalazione.

760: Labeur M, Paez-Pereda M, Arzt E, Stalla GK.

**Potential of retinoic acid derivatives for the treatment of corticotroph pituitary adenomas.** Rev EndocrMetab Disord. 2009 Jun;10(2):103-9. Epub 2008 Jul 7. Review. PubMed PMID: 18604646.

Cushing's disease is a severe clinical condition caused by hypersecretion of corticosteroids due to excessive ACTH secretion from a pituitary adenoma. This complex endocrine disorder still represents a major challenge for the physician in terms of efficient treatment. In the last years there was only little progress in elucidating the molecular mechanisms responsible for the constitutive and autonomous ACTH secretion of pituitary corticotrophinomas. As a consequence, no effective drug therapy is currently available, particularly if surgical excision is not successful. In the present article we examine recent studies that have investigated the therapeutic potential of retinoic acid receptors as nuclear receptor targets for the treatment of Cushing's disease. Retinoic acid is an efficient drug used for the treatment of different types of cancers and it proved to act in animal models of Cushing's disease. The efficiency of this treatment in patients with this disorder still needs to be tested in clinical trials.

### **Potenziale dei derivati dell'acido retinoico per il trattamento degli adenomi pituitari corticotropi**

Malattia di Cushing è una grave condizione clinica causata da ipersecrezione di corticosteroidi a causa di eccessiva secrezione di ACTH da un adenoma pituitario. Questo disturbo complesso endocrino rappresenta ancora una sfida importante per il medico in termini di trattamento efficace. Negli ultimi anni c'è stato solo pochi progressi nel chiarire i meccanismi molecolari responsabili della secrezione di ACTH costitutivi e autonomo di corticotrophinomas pituitaria. Di conseguenza, nessuna terapia efficace farmaco è attualmente disponibile, in particolare se l'asportazione chirurgica non è riuscita. Nel presente articolo si esaminano gli studi recenti che hanno studiato il potenziale terapeutico dei recettori dell'acido retinoico come obiettivi recettore nucleare per il trattamento della malattia di Cushing. L'acido retinoico è un farmaco efficace per il trattamento di vari tipi di cancro e si è dimostrato di agire in modelli animali di malattia di Cushing. L'efficacia di questo trattamento in pazienti con questo disturbo deve ancora essere testato in studi clinici.

764: Das A, Banik NL, Ray SK.

**Molecular mechanisms of the combination of retinoid and interferon-gamma for inducing differentiation and increasing apoptosis in human glioblastoma T98G and U87MG cells.** Neurochem Res. 2009 Jan;34(1):87-101.Epub 2008 Mar 27. PubMed PMID: 18368485.

Glioblastoma is the deadliest brain tumor that remains incurable. We examined efficacy of combination of retinoid and interferon-gamma (IFN-gamma) in human glioblastoma T98G and U87MG cells. We conjectured that retinoid could induce differentiation with down regulation of telomerase activity to increase sensitivity to IFN-gamma for apoptosis in glioblastoma cells. Indeed, treatment of cells with 1  $\mu$ M all-trans retinoic acid (ATRA) or 1  $\mu$ M 13-cis retinoic acid (13-CRA) for 7 days induced astrocytic differentiation with upregulation of glial fibrillary acidic protein (GFAP) and down regulation of telomerase activity. Wright staining and ApopTag assay showed, respectively, morphological and biochemical features of apoptosis in glioblastoma cells following exposure to 200 units/ml IFN-gamma for 48 h. Induction of differentiation was associated with decreases in levels of nuclear factor kappa B (NFkappaB), inducible nitric oxide synthase (iNOS), and production of nitric oxide (NO) so as to increase sensitivity to IFN-gamma for apoptosis. Notably, IFN-gamma induced signal transducer and activator of transcription-1 (STAT-1) to bind to gamma-activated sequence (GAS) of the target gene. Also, IFN-gamma activated caspase-8 and cleaved Bid to truncated Bid (tBid) for translocation to mitochondria. Fura-2 assay showed increases in intracellular free  $[Ca^{2+}]$  and activation of calpain in apoptotic cells. Besides, increases in Bax:Bcl-2 ratio and mitochondrial release of cytochrome c and Smac into the cytosol activated caspase-9 and caspase-3 for apoptosis. Taken together, our results showed that retinoid induced astrocytic differentiation with down regulation of telomerase activity and enhanced sensitivity to IFN-gamma for increasing apoptosis in human glioblastoma cells.

**Meccanismi molecolari della combinazione dei retinoidi e dell'interferon-gamma per l'induzione della differenziazione e dell'aumento dell'apoptosi nelle cellule di glioblastoma umano T98G e U87MG**

Glioblastoma è il tumore più mortale del cervello che rimane incurabile. Abbiamo esaminato l'efficacia della combinazione di retinoidi e di interferone-gamma (IFN-gamma) in T98G glioblastoma e cellule umani U87MG. Abbiamo ipotizzato che retinoidi possono indurre la differenziazione con la regolazione verso il basso di attività telomerasica per aumentare la sensibilità di IFN-gamma per l'apoptosi in cellule di glioblastoma. Infatti, il trattamento delle cellule con 1  $\mu$ M acido all-trans retinoico (ATRA) o 1  $\mu$ M acido 13-cis retinoico (13-CRA) per 7 giorni ha indotto la differenziazione astrocitaria con sovraregolazione di proteina acida fibrillare gliale (GFAP) e verso il basso regolazione della telomerasi attività. Wright colorazione e ApopTag test hanno mostrato, rispettivamente, le caratteristiche morfologiche e biochimiche di apoptosi nelle cellule di glioblastoma in seguito all'esposizione a 200 unità / ml di IFN-gamma per 48 h. Induzione di differenziazione è stata associata con una diminuzione dei livelli del fattore nucleare kappa B (NFkappaB), ossido nitrico sintasi inducibile (iNOS), e la produzione di ossido nitrico (NO) in modo da aumentare la sensibilità di IFN-gamma per l'apoptosi. In particolare, IFN-gamma indotta trasduttore di segnale e attivatore della trascrizione-1 (STAT-1) per legare la sequenza gamma-attivata (GAS) del gene bersaglio. Inoltre, IFN-gamma attivato caspasi-8 e spaccati di fare offerte troncato Bid (tBid) per la traslocazione di mitocondri. Fura-2 test ha mostrato incrementi in libero intracellulare  $[Ca^{2+}]$  e l'attivazione della calpaina nelle cellule apoptotiche. Inoltre, gli aumenti dei Bax: Bcl-2 il rapporto e il rilascio del citocromo c mitocondriale e Smac nel citosol attiva caspasi-9 e della caspasi-3 per apoptosi. Nel loro insieme, i nostri risultati hanno dimostrato che retinoidi indotto differenziazione astrocitari con regolazione verso il basso di attività della telomerasi e di estrema sensibilità IFN-gamma per aumentare l'apoptosi in cellule di glioblastoma umano.

Telang N, Katdare M.

**Preclinical in vitro models from genetically engineered mice for breast and colon cancer (Review).**

Oncol Rep. 2011 May;25(5):1195-201. doi: 10.3892/or.2011.1215. Epub 2011 Mar 10.

Cancer Prevention Research Program, Palindrome Liaisons, 10 Rolling Ridge Road, Suite B, Montvale, NJ 07645-1559, USA.

Genetically engineered mice with targeted alterations in clinically relevant oncogenes, tumor suppressor genes or DNA mismatch repair genes provide unique predictive animal models for human carcinogenesis, and cancer prevention/therapy. However, some of the genetically engineered mouse models lack target organ specificity for colon carcinogenesis. We have established, characterized and validated stable epithelial cell lines from 'normal' and 'genetically' predisposed target organs that offer innovative and mechanistic approaches, complementing in vivo studies on existing animal models for clinical breast and colon cancer. Epithelial cell lines with up-regulated Ras or myc oncogene, mutated Apc tumor suppressor gene and Mlh1 DNA mismatch repair gene provide facile experimental systems for organ site carcinogenesis and cancer prevention. Altered expression of cancer specific biomarkers and their modulation by several synthetic pharmacological agents such as retinoids, selective estrogen receptor modulators, non-steroidal anti-inflammatory drugs and specific enzyme inhibitors have been reported from our laboratory. Oncogene expressing MMEC-Ras and MMEC-myc mammary epithelial cells, Apc mutant 850Min COL and 1638N COL, and DNA mismatch repair/Apc mutant Mlh1/1638N COL colon epithelial cells exhibit aberrant cell cycle progression, down-regulated apoptosis and enhanced carcinogenic risk in vitro and tumor formation in vivo. We have reported that relative to the parental 'normal' non-neoplastic cells, genetically 'altered' pre-neoplastic cells exhibit enhanced sensitivity for growth arrest by multiple mechanistically distinct pharmacological agents. Comparative experiments on isogenic 'normal' and genetically 'altered' target cell lines facilitate cancer selective efficacy and identification of susceptible mechanistic pathways. Treatment of these genetically 'altered' pre-neoplastic cells with low dose combination of mechanistically distinct pharmacological agents as well as naturally occurring phytochemicals induce cytostatic growth arrest, alter cell cycle progression and reduce carcinogenic risk. The availability of validated technology for model development, and for mechanism based biomarker assays now establishes a novel platform to rapidly test carcinogenicity and preventive/therapeutic efficacy of novel pharmacological agents as well as naturally occurring phytochemicals. Thus, these data permit rational prioritization of efficacious lead compounds for preclinical testing and future clinical trials for prevention/therapy of breast and colon cancer.

**Modelli preclinici in vitro di topi geneticamente modificati per il cancro seno e del colon.**

Topi geneticamente modificati con modifiche mirate in oncogeni, clinicamente rilevante, geni oncosoppressori o DNA geni di riparazione del disadattamento fornire unici modelli animali predittivi di cancerogenesi umana, e la prevenzione del cancro / terapia. Tuttavia, alcuni dei modelli di topi geneticamente modificati mancanza di specificità d'organo bersaglio della cancerogenesi del colon. Abbiamo stabilito, caratterizzati e convalidati stabile linee cellulari epiteliali 'normale' e 'geneticamente' predisposti gli organi bersaglio in grado di offrire approcci innovativi e meccanicistica, completando gli studi in vivo su modelli animali esistenti per clinico del seno e al colon. Linee di cellule epiteliali con Ras up-regolati o oncogene myc, mutata del gene soppressore del tumore Apc e MLH1 mismatch gene di riparazione del DNA facile prevedere sistemi sperimentali di cancerogenesi organo sito e prevenzione del cancro. Alterata espressione di

biomarkers specifici tumori e la loro modulazione da vari agenti farmacologici come sintetici come retinoidi, modulatori selettivi dei recettori degli estrogeni, farmaci anti-infiammatori non steroidei e specifici inibitori enzimatici si stato segnalato il nostro laboratorio. Oncogene esprimendo MMEC-Ras e cellule mammarie MMEC-myc epiteliali, Apc mutanti 850Min COL e 1638N COL, e di riparazione del disadattamento del DNA / Apc mutanti Mlh1/1638N cellule epiteliali del colon COL mostra aberrante progressione del ciclo cellulare, apoptosi down-regolato e una maggiore rischio cancerogeno vitro e in vivo formazione di tumori. Ci hanno riferito che rispetto al parentale 'normali' le cellule non neoplastiche, geneticamente 'alterato' pre-neoplastiche presentano cellule maggiore sensibilità per l'arresto della crescita da parte di più agenti meccanicamente farmacologici distinti. Esperimenti comparativi sulla isogeniche 'normale' e geneticamente 'alterato' le linee di cellule bersaglio selettivo facilitare efficacia il cancro e l'identificazione di percorsi sensibili meccanicistico. Il trattamento di questi geneticamente 'alterato' le cellule pre-neoplastiche combinazione con basse dosi di agenti farmacologici meccanicisticamente distinti così come naturalmente fitochimici indurre l'arresto della crescita citostatici, alterare la progressione del ciclo cellulare e ridurre il rischio cancerogeno. La disponibilità di tecnologie validate per lo sviluppo del modello, e per le analisi biomarker meccanismo basato stabilisce ora una nuova piattaforma per testare rapidamente cancerogenicità e della prevenzione / efficacia terapeutica di nuovi agenti farmacologici oltre naturalmente fitochimici presenti. Pertanto, questi dati consentono di priorità razionale di composti di piombo efficace alla sperimentazione preclinica e futuri trial clinici per la prevenzione / terapia del cancro al seno e colon.

Ying M, Wang S, Sang Y, Sun P, Lal B, Goodwin CR, Guerrero-Cazares H, Quinones-Hinojosa A, Laterra J, Xia S.

### **Regulation of glioblastoma stem cells by retinoic acid: role for Notch pathway inhibition.**

Oncogene. 2011 Mar 7. [Epub ahead of print]

1] Department of Neuro-Oncology, Hugo W. Moser Research Institute at Kennedy Krieger, Baltimore, MD, USA [2] Department of Neurology, Johns Hopkins School of Medicine, Baltimore, MD, USA.

It is necessary to understand mechanisms by which differentiating agents influence tumor-initiating cancer stem cells. Toward this end, we investigated the cellular and molecular responses of glioblastoma stem-like cells (GBM-SCs) to all-trans retinoic acid (RA). GBM-SCs were grown as non-adherent neurospheres in growth factor supplemented serum-free medium. RA treatment rapidly induced morphology changes, induced growth arrest at G1/G0 to S transition, decreased cyclin D1 expression and increased p27 expression. Immunofluorescence and western blot analysis indicated that RA induced the expression of lineage-specific differentiation markers Tuj1 and GFAP and reduced the expression of neural stem cell markers such as CD133, Msi-1, nestin and Sox-2. RA treatment dramatically decreased neurosphere-forming capacity, inhibited the ability of neurospheres to form colonies in soft agar and inhibited their capacity to propagate subcutaneous and intracranial xenografts. Expression microarray analysis identified ~350 genes that were altered within 48h of RA treatment. Affected pathways included retinoid signaling and metabolism, cell-cycle regulation, lineage determination, cell adhesion, cell-matrix interaction and cytoskeleton remodeling. Notch signaling was the most prominent of these RA-responsive pathways. Notch pathway downregulation was confirmed based on the downregulation of HES and HEY family members. Constitutive activation of Notch signaling with the Notch intracellular domain rescued GBM neurospheres from the RA-induced differentiation and stem cell depletion. Our findings identify mechanisms by which RA targets GBM-derived stem-like tumor-initiating cells and novel targets applicable to differentiation therapies for glioblastoma. *Oncogene* advance online publication, 7 March 2011; doi:10.1038/onc.2011.58.

### **Regolamento delle cellule staminali del glioblastoma attraverso l'acido retinoico: ruolo per l'inibizione via cellulare di Notch.**

E' necessario comprendere i meccanismi con cui agenti differenzianti influenza tumore-iniziando cellule staminali tumorali. A questo fine, abbiamo studiato le risposte cellulari e molecolari delle cellule staminali di glioblastoma-like (GBM-SCS) a tutti i trans retinoico (RA). GBM-SCS sono stati cresciuti come neurosfere non aderente in fattore di sviluppo integrato del siero medio-free. Trattamento con RA rapidamente cambiamenti indotti morfologia, arresto della crescita indotto a G1/G0 di transizione S, ridotta espressione della ciclina D1 e una maggiore espressione di p27. Immunofluorescenza e western blot ha indicato che RA ha indotto l'espressione di marcatori di differenziazione lineage-specifiche Tuj1 e GFAP e ridotto l'espressione di marcatori di cellule staminali neurali come CD133, Msi-1, nestina e Sox-2. Trattamento con RA drasticamente ridotta capacità neurosfere di formazione, ha inibito la capacità di neurosfere di formare colonie in agar soffice e inibito la loro capacità di propagare xenotrapianti sottocutaneo e intracranica. Analisi di microarray Expression individuato ~ 350 geni che sono stati modificati entro 48 h di trattamento con RA. Vie interessate incluso segnalazione dei retinoidi e il metabolismo, la regolazione del ciclo cellulare, la determinazione lignaggio, adesione cellulare, interazione cellula-matrice e il rimodellamento del citoscheletro. Segnalazione di Notch è stato il più importante di queste vie RA-sensibili. Down-regulation via cellulare di Notch è stata confermata in base alla down-regulation di

HES e familiari HEY. Attivazione costitutiva del segnale di Notch con il dominio intracellulare di Notch salvato neurosfere GBM dalla differenziazione RA-indotta e l'esaurimento delle cellule staminali. I nostri risultati identificare meccanismi attraverso i quali RA obiettivi GBM-derived stem-come le cellule tumorali e di avviare nuovi bersagli per terapie applicabili differenziazione per la pubblicazione online glioblastoma.Oncogene anticipo, il 7 marzo 2011; doi: 10.1038/onc.2011.58.

Busby SA, Kumar N, Kuruvilla DS, Istrate MA, Conkright JJ, Wang Y, Kamenecka TM, Cameron MD, Roush WR, Burris TP, Griffin PR.

### **Identification of a Novel Non-retinoid Pan Inverse Agonist of the Retinoic Acid Receptors.**

ACS Chem Biol. 2011 Mar 17. [Epub ahead of print]

Department of Molecular Therapeutics and ‡Department of Chemistry, The Scripps Research Institute, Scripps Florida, Jupiter, Florida 33458, United States.

Retinoids are potent forms of vitamin A and are involved in a broad range of physiological processes and the pharmacological effects of retinoids are primarily mediated by the retinoic acid receptors (RARs) and the retinoid X receptors (RXRs). Several natural and synthetic RAR modulators have proven to be clinically useful for a number of therapeutic indications including cancer, psoriasis, and diabetes. Unfortunately, these agents lead to a number of significant side effects. Most synthetic retinoid ligands are based on the retinoid scaffold and thus have similarities to the natural ligand with all previously disclosed RAR ligands having a carboxylic acid that makes a critical ionic bridge within the ligand binding domain of the receptors. The potential therapeutic value offered from RAR modulation provides the impetus to identify novel ligands based on unique scaffolds that may offer improved toxicity and pharmacokinetic profiles. Here we describe the identification of an atypical RAR inverse agonist that represents the first non-acid, non-retinoid direct modulator of RAR receptor subfamily. SR-0065 functions as a pan-RAR inverse agonist suppressing the basal activity of RAR $\alpha$ , RAR $\beta$ , and RAR $\gamma$ , as well as inhibiting agonist-induced RAR activity. SR-0065 treatment enhanced receptor interaction with a peptide representative of the corepressor SMRT, and in cells SR-0065 enhances recruitment of SMRT to the promoter of the RAR $\gamma$  dependent gene, Cyp26A1. The acid form of SR-0065, SR-1758, was inactive in all assays. Thus, SR-0065 represents a new class of non-acid, non-retinoid RAR modulator that may be used as a point to initiate development of improved RAR-targeted drugs.

### **Identificazione di un agonista non retinoico Pan Inverse dei recettori dell'acido retinoico.**

I retinoidi sono potenti forme di vitamina A e sono coinvolti in una vasta gamma di processi fisiologici e gli effetti farmacologici dei retinoidi sono principalmente mediati dai recettori dell'acido retinoico (RAR) e i recettori dei retinoidi X (RXR). Diversi modulatori RAR naturali e sintetici hanno dimostrato di essere clinicamente utile per una serie di indicazioni terapeutiche tra cui il cancro, la psoriasi e il diabete. Purtroppo, questi agenti portare ad una serie di effetti collaterali significativi. La maggior parte dei leganti sintetici retinoidi sono basati sul patibolo retinoidi e quindi avere analogie con il ligando naturale con tutti RAR comunicato precedentemente ligandi con un acido carbossilico che crea un ponte critico ionico all'interno del dominio di legame dei recettori. Il valore potenziale terapeutico offerto dalla modulazione RAR fornisce la spinta per identificare ligandi romanzo basato su ponteggi unici che possono offrire tossicità migliorato e i profili farmacocinetici. Qui si descrive l'identificazione di un agonista inverso atipico RAR che rappresenta il primo non-acido, non-retinoidi modulatore diretto della sottofamiglia dei recettori RAR. SR-0065 funziona come un agonista inverso pan-RAR sopprimere l'attività basale di RAR $\alpha$ , RAR $\beta$ , e RAR $\gamma$ , così come inibendo l'attività agonista RAR-indotta. SR-0065 recettore trattamento arricchisce di un rappresentante del peptide SMRT corepressor, e in cellule di SR-0065 aumenta l'assunzione di SMRT al promotore del gene RAR $\gamma$  dipendente, Cyp26A1. La forma acida di SR-0065, SR-1758, è stata inattiva per tutti i dosaggi. Così, SR-0065 rappresenta una nuova classe di non-acido, modulatore RAR non retinoidi che possono essere utilizzati come punto di avviare lo sviluppo di migliori farmaci RAR-mirate.

Amann PM, Eichmüller SB, Schmidt J, Bazhin AV.

### **Regulation of gene expression by retinoids.**

Curr Med Chem. 2011;18(9):1405-12.

Skin Cancer Unit, German Cancer Research Center Heidelberg, Heidelberg, Germany.  
alexandr.bazhin@med.uni-heidelberg.de.

Vitamin A serves as substrate for the biosynthesis of several derivatives (retinoids) which are important for cell growth and cell differentiation as well as for vision. Retinoic acid is the major physiologically active form of vitamin A regulating the expression of different genes. At present, hundreds of genes are known to be regulated by retinoic acid. This regulation is very complex and is, in turn, regulated on many levels. To date, two families of retinoid nuclear receptors have been identified: retinoic acid receptors and retinoid X receptors, which are members of the steroid hormone receptor superfamily of ligand-activated transcription factors. In order to regulate gene expression, all-trans retinal needs to be oxidized to retinoic acid. All-trans retinal, in turn, can be produced during oxidation of all-trans retinol or in a retinol-independent metabolic pathway through cleavage of  $\beta$ -carotene with all-trans retinal as an intermediate metabolite. Recently it has been shown that not only retinoic acid is an active form of vitamin A, but also that all-trans retinal can play an important role in gene regulation. In this review we comprehensively summarize recent literature on regulation of gene expression by retinoids, biochemistry of retinoid receptors, and molecular mechanisms of retinoid-mediated effects on gene regulation.

### **Regolazione dell'espressione genica da retinoidi.**

La vitamina A serve come substrato per la biosintesi dei derivati vari (retinoidi) che sono importanti per la crescita cellulare e la differenziazione cellulare, nonché per la visione. L'acido retinoico è la principale forma fisiologicamente attiva della vitamina A che regolano l'espressione di diversi geni. Attualmente, centinaia di geni sono note per essere regolata da acido retinoico. Questo regolamento è molto complesso e, a sua volta, regolata a molti livelli. Ad oggi, due famiglie di recettori nucleari dei retinoidi sono stati identificati: i recettori dell'acido retinoico e recettori dei retinoidi X, che sono membri della superfamiglia del recettore dell'ormone steroide di fattori di trascrizione ligando-attivato. Al fine di regolare l'espressione genica, tutte le esigenze-trans retinico essere ossidato ad acido retinoico. All-trans retinico, a loro volta, possono essere prodotti durante l'ossidazione di all-trans retinolo o retinolo in un percorso indipendente metabolico tramite scissione del  $\beta$ -carotene, con tutto-trans retinico come un metabolita intermedio. Recentemente è stato dimostrato che non solo l'acido retinoico è una forma attiva di vitamina A, ma anche che tutto-trans retinico possono svolgere un ruolo importante nella regolazione dei geni. In questa recensione abbiamo esauriente sintesi della letteratura recente sulla regolazione dell'espressione genica da retinoidi, biochimica dei recettori dei retinoidi, e dei meccanismi molecolari degli effetti dei retinoidi-mediata sulla regolazione genica.

Knappskog S, Myklebust LM, Busch C, Aloysius T, Varhaug JE, Lønning PE, Lillehaug JR, Pendino F.

**RINF (CXXC5) is overexpressed in solid tumors and is an unfavorable prognostic factor in breast cancer.**

Ann Oncol. 2011 Feb 25. [Epub ahead of print]

Department of Molecular Biology.

**BACKGROUND:** We have previously described the essential role of the retinoid-inducible nuclear factor (RINF) during differentiation of hematopoietic cells and suggested its putative involvement in myeloid leukemia and preleukemia. Here, we have investigated whether this gene could have a deregulated expression in malignant tissues compared with their normal tissues of origin and if this potential deregulation could be associated with important clinicopathological parameters.

**PATIENTS AND METHODS:** RINF messenger RNA expression was examined in biopsies from locally advanced breast tumors, metastatic malignant melanomas, and papillary thyroid carcinomas and compared with their paired or nonpaired normal reference samples. Further, the prognostic role of RINF expression was evaluated in locally advanced breast cancer.

**RESULTS:** RINF expression was significantly higher in all tumor forms (primary breast, and thyroid cancers and metastatic melanomas) as compared with normal control tissues ( $P < 0.001$  for each comparison). Importantly, high levels of RINF expression correlated to a poor overall survival in breast cancer ( $P = 0.013$ ). This finding was confirmed in three independent public microarray datasets ( $P = 0.043$ ,  $n = 234$ ;  $P = 0.016$ ,  $n = 69$ ;  $P = 0.001$ ,  $n = 196$ ) and was independent of tamoxifen therapy. Notably, high levels of RINF was strongly associated with TP53 wild-type status ( $P = 0.002$ ) possibly indicating that high levels of RINF could substitute for TP53 mutations as an oncogenic mechanism during the malignant development of some cases of breast cancer.

**CONCLUSIONS:** Our data indicate that (i) RINF overexpression is associated with the malignant phenotype in solid tumors and (ii) RINF overexpression represents an independent molecular marker for poor prognosis in breast tumors.

**RINF (C C5) è iperespresso in tumori solidi ed è un fattore prognostico sfavorevole nel carcinoma mammario.**

**BACKGROUND:** abbiamo descritto in precedenza il ruolo essenziale del fattore di retinoidi-inducibile nucleare (RINF) durante la differenziazione di cellule ematopoietiche e ha suggerito il suo coinvolgimento nella presunta leucemia mieloide e preleukemia. Qui, abbiamo studiato se questo gene potrebbe avere un'espressione deregolamentata nei tessuti maligni rispetto ai loro tessuti normali di origine e se questa deregolamentazione potenziale potrebbe essere associata a importanti parametri clinico-patologici.

**PAZIENTI E METODI:** RNA messaggero RINF espressione è stato esaminato in biopsie di tumori della mammella localmente avanzato, metastatico melanomi maligni e carcinomi papillari della tiroide e confrontati con i loro campioni appaiati o nonpaired riferimento normale. Inoltre, il ruolo prognostico di espressione RINF è stata valutata nel carcinoma mammario localmente avanzato.

**RISULTATI:** espressione RINF era significativamente più alta in tutte le forme di tumore (mammella primario, e tumori della tiroide e melanomi metastatici) rispetto ai tessuti normali di controllo ( $P < 0.001$  per ciascun confronto). È importante sottolineare che gli alti livelli di espressione RINF correlata ad una scarsa sopravvivenza globale nel cancro della mammella ( $P = 0,013$ ). Questo risultato è stato confermato in tre set di dati indipendenti microarray pubblico ( $P =$

0,043, n = 234; P n = 0.016, = 69, P = 0,001, n = 196) ed è risultato indipendente di terapia con tamoxifene. In particolare, elevati livelli di RINF era fortemente associata con TP53 status wild-type (p = 0,002) che potrebbe indicare che i livelli elevati di RINF potrebbe sostituire le mutazioni TP53 come un meccanismo oncogeno durante lo sviluppo maligno di alcuni casi di cancro al seno. CONCLUSIONI: I nostri dati indicano che (i) iperespressione RINF è associato con il fenotipo maligno nei tumori solidi e (ii) l'iperespressione RINF rappresenta un marcatore molecolare indipendente per la cattiva prognosi nei tumori della mammella.

Dawson MI.

**A strong case for personalized, targeted cancer prevention.**

Cancer Prev Res (Phila). 2011 Feb;4(2):173-6.

Cancer Center, Sanford-Burnham Medical Research Institute, La Jolla, CA 92037, USA.  
mdawson@sanfordburnham.org

Comment on:

Cancer Prev Res (Phila). 2011 Feb;4(2):185-93.

The study reported by Lee and colleagues in this issue of the journal (beginning on page 185) incorporated global genetic variation within a new assessment of the outcome of a previously reported phase-III trial of low-dose 13-cis-retinoic acid (13-cRA) for preventing second primary tumors (SPT) or the recurrence of head-and-neck cancer. This analysis identified genotypes of common single-nucleotide polymorphisms (SNP) and cumulative effect and potential gene-gene interactions that were highly associated with increased placebo-arm risk (prognostic) and/or with reduced treatment-arm risk and longer event-free survival (predictive). For example, the wild-type rs3118570 SNP of the retinoid X receptor alpha gene (carried by 71% of the 13-cRA trial population) marked a 3.33-fold increased SPT/recurrence risk in the placebo arm and a 38% reduced risk in the treatment arm. Adding two other informative genotypes strengthened the treatment-arm risk reduction to 76%, although the genotype trio reflected only 13% of the trial population. This report extends the concept of personalized therapy to cancer prevention.

**Un caso di forte personalizzazione, la prevenzione mirata del cancro.**

The study reported by Lee and colleagues in this issue of the journal (beginning on page 185) incorporated global genetic variation within a new assessment of the outcome of a previously reported phase-III trial of low-dose 13-cis-retinoic acid (13-cRA) for preventing second primary tumors (SPT) or the recurrence of head-and-neck cancer. This analysis identified genotypes of common single-nucleotide polymorphisms (SNP) and cumulative effect and potential gene-gene interactions that were highly associated with increased placebo-arm risk (prognostic) and/or with reduced treatment-arm risk and longer event-free survival (predictive). For example, the wild-type rs3118570 SNP of the retinoid X receptor alpha gene (carried by 71% of the 13-cRA trial population) marked a 3.33-fold increased SPT/recurrence risk in the placebo arm and a 38% reduced risk in the treatment arm. Adding two other informative genotypes strengthened the treatment-arm risk reduction to 76%, although the genotype trio reflected only 13% of the trial population. This report extends the concept of personalized therapy to cancer prevention.

Zhang G, Brewster A, Guan B, Fan Z, Brown PH, Xu XC.

### **Tumor-suppressor activity of RRIG1 in breast cancer.**

BMC Cancer. 2011 Jan 25;11:32.

Department of Clinical Cancer Prevention, The University of Texas M D Anderson Cancer Center, Houston, Texas 77030, USA.

**BACKGROUND:** Retinoid receptor-induced gene-1 (RRIG1) is a novel gene that has been lost in several types of human cancers. The aim of this study was to determine whether RRIG1 plays a role in breast cancer, such as in the suppression of breast cancer cell growth and invasion.

**METHODS:** Immunohistochemistry was used to detect RRIG1 expression in breast tissue specimens. Gene transfection was used to restore or knock down RRIG1 expression in breast cancer cell lines for analysis of cell viability, colony formation, and migration/invasion potential. Reverse-transcription polymerase chain reaction and western blot assays were used to detect the changes in gene expression. The RhoA activation assay was used to assess RRIG1-induced inhibition of RhoA activity.

**RESULTS:** The immunohistochemical data showed that RRIG1 expression was reduced in breast cancer tissues compared with normal and atypical hyperplastic breast tissues. RRIG1 expression was inversely correlated with lymph node metastasis of breast cancer but was not associated with the status of hormone receptors, such as estrogen receptor, progesterone receptor, or HER2. Furthermore, restoration of RRIG1 expression inhibited proliferation, colony formation, migration, and invasion of breast cancer cells. Expression of RRIG1 also reduced phosphorylated Erk1/2 and Akt levels; c-Jun, MMP9, and Akt expressions; and RhoA activity. In contrast, knockdown of RRIG1 expression promoted breast cancer cell proliferation, colony formation, migration, and invasion potential.

**CONCLUSION:** The data from the current study indicated that RRIG1 expression was reduced or lost in breast cancer and that restoration of RRIG1 expression suppressed breast cancer cell growth and invasion capacity. Future studies will determine the underlying molecular mechanisms and define RRIG1 as a tumor-suppressor gene in breast cancer.

### **Attività di soppressore del tumore di RG1 nel cancro della mammella.**

**BACKGROUND:** retinoidi recettore indotta gene-1 (RRIG1) è un nuovo gene che è stato perso in diversi tipi di tumori umani. Lo scopo di questo studio era di determinare se RRIG1 svolge un ruolo nel cancro della mammella, come ad esempio nella soppressione della crescita delle cellule di cancro al seno e l'invasione.

**METODI:** immunoistochimica è stata utilizzata per rilevare RRIG1 espressione nei campioni di tessuto mammario. Transfezione del gene è stato utilizzato per ripristinare o abbattere RRIG1 espressione in linee di cellule di cancro al seno per l'analisi di vitalità cellulare, formazione di colonie, e la migrazione / potenziale invasione. Polimerasi d'inversione-trascrizione reazione a catena e analisi occidentale della macchia sono stati utilizzati per rilevare i cambiamenti nell'espressione genica. Il test di attivazione RhoA stato utilizzato per valutare RRIG1 inibizione della attività RhoA.

**RISULTATI:** I dati immunoistochimici hanno dimostrato che RRIG1 espressione è stata ridotta nel tessuto del cancro al seno rispetto alle normali e atipiche tessuti mammari iperplastici. Espressione RRIG1 era inversamente correlata con metastasi linfonodali del cancro del seno, ma non è stato associato con lo stato dei recettori ormonali, come il recettore per gli estrogeni, recettore del progesterone, o HER2. Inoltre, il restauro di espressione RRIG1 hanno inibito la proliferazione,

formazione di colonie, la migrazione e l'invasione delle cellule di cancro al seno. Espressione di RRIG1 anche ridotto fosforilata di ERK1 / 2 e Akt livelli; c-Jun, MMP9, e le espressioni Akt, attività e RhoA. Al contrario, colpo di RRIG1 espressione promosso la proliferazione delle cellule di cancro al seno, formazione di colonie, la migrazione, e il potenziale di invasione.

Uray IP, Brown PH.

### **Chemoprevention of hormone receptor-negative breast cancer: new approaches needed.**

Recent Results Cancer Res. 2011;188:147-62.

Department of Clinical Cancer Prevention, The University of Texas M. D. Anderson Cancer Center, Houston, TX 77230, USA.

Results from clinical trials have demonstrated that it is possible to prevent estrogen-responsive breast cancers by targeting the estrogen receptor with selective estrogen receptor modulators (SERMs) (tamoxifen, raloxifene, or lasofoxifene) or with aromatase inhibitors (AIs) (anastrozole, letrozole, or exemestene). Results from breast cancer treatment trials suggest that aromatase inhibitors may be even more effective in preventing breast cancer than SERMs. However, while SERMs and aromatase inhibitors do prevent the development of many ER-positive breast cancers, these drugs do not prevent ER-negative breast cancer. These results show that new approaches are needed for the prevention of this aggressive form of breast cancer. Our laboratory and clinical efforts have been focused on identifying critical molecular pathways in breast cells that can be targeted for the prevention of ER-negative breast cancer. Our preclinical studies have demonstrated that other nuclear receptors, such as RXR receptors, vitamin D receptors, as well as others are critical for the growth of ER-negative breast cells and for the transformation of these cells into ER-negative cancers. Other studies show that growth factor pathways including those activated by EGFR, Her2, and IGFR, which are activated in many ER-negative breast cancers, can be targeted for the prevention of ER-negative breast cancer in mice. Clinical studies have also shown that PARP inhibitors are effective for the treatment of breast cancers arising in BRCA-1 or -2 mutation carriers, suggesting that targeting PARP may also be useful for the prevention of breast cancers arising in these high-risk individuals. Most recently, we have demonstrated that ER-negative breast cancers can be subdivided into four distinct groups based on the kinases that they express. These groups include ER-negative/Her-2-positive groups (the MAPK and immunomodulatory groups) and ER-negative/Her2-negative groups (the S6K and the cell cycle checkpoint groups). These groups of ER-negative breast cancers can be targeted with kinase inhibitors specific for each subgroup. These preclinical studies have supported the development of several clinical trials testing targeted agents for the prevention of breast cancer. The results of a completed Phase II cancer prevention trial using the RXR ligand bexarotene in women at high risk of breast cancer will be reviewed, and the current status of an ongoing Phase II trial using the EGFR and Her2 kinase inhibitor lapatinib for the treatment of women with DCIS breast cancer will be presented. It is anticipated that in the future these molecularly targeted drugs will be combined with hormonal agents such as SERMs or aromatase inhibitors to prevent all forms of breast cancer.

PMID: 21253797 [PubMed - indexed for MEDLINE]

### **Chemioprevenzione del carcinoma mammario ormone-recettore negativo: nuovi approcci necessari.**

I risultati di studi clinici hanno dimostrato che è possibile prevenire tumori al seno estrogeno-sensibili di mira il recettore degli estrogeni con modulatori selettivi del recettore dell'estrogeno

(SERM) (tamoxifene, raloxifene, o lasofoxifene) o con inibitori dell'aromatasi (AIS) (anastrozolo, letrozolo, o exemestene). I risultati degli studi cancro al seno trattamento suggeriscono che gli inibitori dell'aromatasi potrebbero essere ancora più efficace nella prevenzione del cancro al seno rispetto SERMs. Tuttavia, mentre SERMs e gli inibitori dell'aromatasi impediscono lo sviluppo di molti tumori della mammella ER-positivi, questi farmaci non prevengono il cancro al seno ER-negativi. Questi risultati indicano che sono necessarie nuove strategie per la prevenzione di questa forma aggressiva di cancro della mammella. Il nostro laboratorio e gli sforzi clinici si sono concentrati sull'identificazione critico percorsi molecolari nelle cellule mammarie che possono essere mirati per la prevenzione del cancro della mammella ER-negativi. I nostri studi preclinici hanno dimostrato che altri recettori nucleari, come i recettori RXR, recettori della vitamina D, così come altri sono critici per la crescita delle cellule della mammella ER-negativi e per la trasformazione di queste cellule in tumori ER-negativi. Altri studi mostrano che le vie del fattore di crescita, comprese quelle attivate da EGFR, HER2, e IGFR, che vengono attivati in molti cancri della mammella ER-negativo, può essere mirati per la prevenzione del cancro della mammella ER-negativi nei topi. Studi clinici hanno anche mostrato che gli inibitori di PARP sono efficaci per il trattamento dei tumori al seno derivanti BRCA-1 o -2 portatori di mutazioni, suggerendo che il targeting PARP può anche essere utile per la prevenzione dei tumori al seno sollevate in questi soggetti ad alto rischio. Più di recente, abbiamo dimostrato che i tumori della mammella ER-negativi possono essere suddivisi in quattro gruppi distinti in base alla chinasi che essi esprimono. Questi gruppi includono gruppi ER-negative/Her-2-positive (la MAPK e gruppi immunomodulatorie) e gruppi ER-negative/Her2-negative (il S6K e dei gruppi di checkpoint del ciclo cellulare). Questi gruppi di tumori della mammella ER-negativi possono essere mirata con inibitori delle chinasi specifiche per ogni sottogruppo. Questi studi preclinici hanno sostenuto lo sviluppo di diversi studi clinici test agenti mirati per la prevenzione del tumore al seno. I risultati di uno studio di Fase completato la prevenzione del cancro II con il bexarotene ligando RXR nelle donne ad alto rischio di tumore al seno sarà riesaminata, e lo stato attuale di un trial di Fase II mediante l'EGFR e HER2 lapatinib inibitore della chinasi per il trattamento delle donne con carcinoma mammario DCIS saranno presentati. Si prevede che in futuro questi farmaci molecolari mirati saranno combinati con agenti ormonali come gli inibitori dell'aromatasi SERM o per prevenire tutte le forme di cancro al seno.

Morgan TR.

### **Chemoprevention of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C.**

Recent Results Cancer Res. 2011;188:85-99.

Gastroenterology Section, VA Long Beach Healthcare System, Long Beach, CA 90822, USA.  
timothy.morgan@va.gov

Hepatitis C virus (HCV) infection causes chronic hepatitis, which can progress to cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC). The incidence of hepatocellular carcinoma in the United States tripled between 1975 and 2005, and is expected to increase further, and to remain elevated for more than 20 years. Curing hepatitis C infection in patients with cirrhosis through treatment with peginterferon and ribavirin reduces the risk of developing hepatocellular carcinoma. Several noncurative treatments also appear to reduce the risk of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C. Prospective studies report a reduced incidence of hepatocellular carcinoma among patients treated with a mixture of carotenoids with or without myo-inositol, with vitamin K<sub>2</sub>, or with polyphenolic acid (an acyclic retinoid). Uncontrolled and/or retrospective studies have reported beneficial effects of treatment with Sho-saiko-to, glycyrrhizin and ursodeoxycholic acid on hepatocellular carcinoma incidence. Meta-analyses of epidemiologic studies show a reduced risk of hepatocellular carcinoma among liver disease patients who drink two or more cups of coffee per day. Numerous agents prevent or reduce hepatocarcinogenesis in animal models. An ongoing Phase II clinical trial is evaluating S-adenosylmethionine (SAME) as a potential chemopreventive agent in hepatitis C cirrhosis. Overall, these data suggest that chemoprevention of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C is an achievable objective.

### **Chemioprevenzione del carcinoma epatocellulare in epatite cronica C.**

Il virus dell'epatite C (HCV) causa l'epatite cronica, che può progredire a cirrosi e carcinoma epatocellulare (HCC). L'incidenza di carcinoma epatocellulare negli Stati Uniti è triplicato tra il 1975 e il 2005, e si prevede di aumentare ulteriormente, e rimanere su livelli elevati per più di 20 anni. Polimerizzazione epatite C nei pazienti con cirrosi attraverso il trattamento con peginterferone e ribavirina riduce il rischio di sviluppare carcinoma epatocellulare. Diversi trattamenti noncurative sembrano anche ridurre il rischio di carcinoma epatocellulare nei pazienti con epatite cronica C. Gli studi prospettici segnalare una ridotta incidenza di carcinoma epatocellulare tra i pazienti trattati con una miscela di carotenoidi con o senza il mio-inositolo, con vitamina K<sub>2</sub>, o con polyphenolic acido (un retinoide aciclico). Incontrollate e / o studi retrospettivi hanno riportato effetti benefici del trattamento con Sho-Saiko-to, l'acido ursodesossicolico glicirrizina e sulla incidenza di carcinoma epatocellulare. Meta-analisi di studi epidemiologici mostrano un ridotto rischio di carcinoma epatocellulare tra i pazienti affetti da malattie del fegato che bevono due o più tazze di caffè al giorno. Numerosi agenti di prevenire o ridurre epatocarcinogenesi in modelli animali. Un corso trial clinico di fase II sta valutando la S-adenosilmetionina (SAME) come un potenziale agente chemiopreventivo in cirrosi da epatite C. Nel complesso, questi dati suggeriscono che la chemioprevenzione del carcinoma epatocellulare nei pazienti con epatite cronica C è un obiettivo raggiungibile.

Petta E, Sotiropoulou-Bonikou G, Kourelis K, Melachrinou M, Bonikos DS

**Differential expression and cross-talk of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  and retinoid-X receptor  $\alpha$  in urothelial carcinomas of the bladder.**

J BUON. 2010 Oct-Dec;15(4):740-5.

Department of Pathology, School of Medicine, University of Patras, Patras, Greece.  
perouby@yahoo.co.uk

**PURPOSE:** the peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ), known to play a key role in homeostatic biological pathways, is also implicated in the process of carcinogenesis. Ligands for PPAR $\gamma$  and its heterodimeric partner, retinoid-X receptor (RXR), have exhibited anticancer effects both in vitro and in vivo. Unexpectedly, some studies suggested that PPAR $\gamma$  ligands may stimulate cancer formation. This study aimed to estimate the signaling of PPAR $\gamma$ -RXR $\alpha$  heterodimer in bladder urothelial carcinomas (BUC).

**METHODS:** we studied PPAR $\gamma$  and RXR $\alpha$  expression in specimens obtained from 97 patients with BUC of various grades and stages using immunohistochemistry.

**RESULTS:** PPAR $\gamma$  expression was significantly downregulated with BUC stage and grade progression, and the dynamics of this phenomenon was significantly influenced by RXR $\alpha$ 's level of expression.

**CONCLUSION:** the positive association of PPAR $\gamma$  expression in BUC with more differentiated, non-invasive tumors is strengthened by the presence of RXR $\alpha$ . This knowledge could probably be of use in the development of new chemotherapeutic agents.

**Espressione differenziale e interferenza del recettore  $\gamma$ -proliferatore dei perossisomi attivati (PPAR- $\gamma$ ) e recettori  $\alpha$  di retinoidi-X nei carcinomi uroteliali della vescica.**

SCOPO: il recettore  $\gamma$  peroxisome proliferator-activated (PPAR), nota per svolgere un ruolo chiave nel omeostatico vie biologiche, è anche implicato nel processo di cancerogenesi. Ligandi di PPAR e il suo partner eterodimerica, retinoidi X-recettore (RXR), hanno mostrato effetti antitumorali sia in vitro che in vivo. Inaspettatamente, alcuni studi hanno suggerito che ligandi PPAR può stimolare la formazione del cancro. Questo studio mirava a valutare la segnalazione di eterodimero PPAR-RXR $\alpha$  nei carcinomi uroteliali della vescica (BUC).

METODI: abbiamo studiato PPAR e RXR $\alpha$  espressione in campioni ottenuti da 97 pazienti con BUC di diversi tipi e stadi con immunoistochimica.

RISULTATI: espressione di PPAR era significativamente inibiti con BUC stadio e la progressione di grado, e le dinamiche di questo fenomeno è stato significativamente influenzato dal livello RXR $\alpha$  di espressione.

CONCLUSIONE: l'associazione positiva espressione di PPAR in BUC con più differenziati, tumori non invasivi è rafforzata dalla presenza di RXR $\alpha$ . Queste conoscenze potrebbero probabilmente essere utilizzato per lo sviluppo di nuovi agenti chemioterapici.

Karsy M, Albert L, Tobias ME, Murali R, Jhanwar-Uniyal M.

**All-trans retinoic acid modulates cancer stem cells of glioblastoma multiforme in an MAPK-dependent manner.**

Anticancer Res. 2010 Dec;30(12):4915-20.

Departments of Neurosurgery and Experimental Pathology, New York Medical College, Valhalla, NY 10595, USA.

Glioblastoma multiforme (GBM), a grade IV glioma, appears to harbor therapy-resistant cancer stem cells (CSCs) that are the major cause of recurrence. All-trans retinoic acid (ATRA), a derivative of retinoid, is capable of differentiating a variety of stem cells, as well as normal neural progenitor cells, and down-regulates expression of the stem cell marker nestin. This study investigated the effects of ATRA on differentiation, proliferation, self-renewal, and signaling pathways of CSCs in GBM. CSCs differentiated into glial and neuronal lineages at low concentrations of ATRA (10  $\mu$ M). Proliferation and self renewal of neurospheres were reduced following ATRA, although ATRA induced apoptosis at higher (40  $\mu$ M) concentrations. Analysis of mitogen-activated protein kinase signaling pathways, specifically extracellular signal-regulated kinases (ERK1/2), showed that ATRA-induced alterations in ERK1/2 were associated with regulation of differentiation, proliferation and apoptosis. These results emphasize that low doses of ATRA may have therapeutic potential by differentiating GBM CSCs and rendering them sensitive to targeted therapy.

**Acido all-trans retinoico modula cellule staminali tumorali del glioblastoma multiforme in maniera MAPK-dipendente.**

Il glioblastoma multiforme (GBM), un glioma di grado IV, sembra le cellule tumorali resistenti alla terapia porto staminali (CSC) che sono la causa principale di recidiva. Acido all-trans retinoico (ATRA), un derivato di retinoidi, è in grado di distinguere una varietà di cellule staminali, così come normali cellule progenitrici neuronali, e down-regola l'espressione della nestina marker delle cellule staminali. Questo studio ha esaminato gli effetti di ATRA sulla differenziazione, la proliferazione, il self-renewal, e vie di segnalazione del CSCS nel GBM. CSC differenziato in linee gliali e neuroni a basse concentrazioni di ATRA (10 micron). Proliferazione e il rinnovamento di sé di neurosfere sono stati ridotti a seguito ATRA, anche se ATRA indotto apoptosis a concentrazioni più elevate (40 mM). Analisi di percorsi di proteine chinasi mitogeno-attivata segnalazione, chinasi signal-regulated specificamente extracellulare (ERK1 / 2), ha dimostrato che le alterazioni indotte ATRA in ERK1 / 2 sono stati associati con la regolazione della differenziazione, la proliferazione e l'apoptosi. Questi risultati sottolineano che basse dosi di ATRA possono avere un potenziale terapeutico differenziando CSCs GBM e rendendoli sensibili alla terapia mirata.

Liu X, Nugoli M, Laferrière J, Saleh SM, Rodrigue-Gervais IG, Saleh M, Park M, Hallett MT, Muller WJ, Giguère V.

**Stromal retinoic acid receptor beta promotes mammary gland tumorigenesis.**

Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Jan 11;108(2):774-9. Epub 2010 Dec 27.

Goodman Cancer Research Centre, McGill University, Montreal, QC, Canada H3A 1A3.

Retinoic acid is a potent differentiation and antiproliferative agent of breast cancer cells, and one of its receptors, retinoic acid receptor  $\beta$  (RAR $\beta$ ), has been proposed to act as a tumor suppressor. In contrast, we report herein that inactivation of Rarb in the mouse results in a protective effect against ErbB2-induced mammary gland tumorigenesis. Strikingly, tissue recombination experiments indicate that the presence of Rarb in the stromal compartment is essential for the growth of mammary carcinoma. Ablation of Rarb leads to a remodeling of the stroma during tumor progression that includes a decrease in angiogenesis, in the recruitment of inflammatory cells, and in the number myofibroblasts. In agreement with this finding, we observed that a markedly reduced expression of chemokine (C-X-C motif) ligand 12 (Cxcl12) in the stroma of Rarb-null mice is accompanied by a decrease in the CXCL12/chemokine C-X-C receptor 4 (CXCR4)/ErbB2 signaling axis in the tumors. Relevance to the human disease is underlined by the finding that gene-expression profiling of the Rarb-deficient mammary stromal compartment identified an ortholog RAR $\beta$  signature in human microdissected breast tissues that differentiates tumor from normal stroma. Our study thus implicates RAR $\beta$  in promoting tumorigenesis and suggests that retinoid-based approaches for the prevention and treatment of breast cancer should be redesigned.

Hoang TC, Bui TK, Taguchi T, Watanabe T, Sato Y.

**All-trans retinoic acid inhibits KIT activity and induces apoptosis in gastrointestinal stromal tumor GIST-T1 cell line by affecting on the expression of survivin and Bax protein.**

J Exp Clin Cancer Res. 2010 Dec 16;29:165.

Division of Ultrafine Structure, Department of Pathology, Research Institute, National Center for Global Health and Medicine, Tokyo, Japan.

**BACKGROUND:** Imatinib, a selective tyrosine kinase inhibitor, has been used as a standard first-line therapy for irresectable and metastasized gastrointestinal stromal tumor (GIST) patients. Unfortunately, most patients responding to imatinib will eventually exhibit imatinib-resistance, the cause of which is not fully understood. The serious clinical problem of imatinib-resistance demands alternative therapeutic strategy. This study was conducted to investigate the effect of all-trans retinoic acid (ATRA) on GIST cell lines.

**METHODS:** Cell proliferation was determined by trypan blue dye exclusion test. Western blot analysis was performed to test the expression of activated KIT, its downstream proteins, and apoptosis associated proteins. The cytotoxic interactions of imatinib with ATRA were evaluated using the isobologram of Steel and Peckham.

**RESULTS AND CONCLUSION:** In this work, for the first time we have demonstrated that ATRA affected on cell proliferation of GIST-T1 and GIST-882 cell line through inhibition of cell growth in a dose dependent manner and induced apoptosis. High dose of ATRA induced morphologic change in GIST-T1 cells, rounded-up cells, and activated the caspase-3 protein. In further examination, we found that the ATRA-induced apoptosis in GIST-T1 cells was accompanied by the down-regulated expression of survivin and up-regulated expression of Bax protein. Moreover, ATRA suppressed the activity of KIT protein in GIST-T1 cells and its downstream signal, AKT activity, but not MAPK activity. We also have demonstrated that combination of ATRA with imatinib showed additive effect by isobologram, suggesting that the combination of ATRA and imatinib may be a novel potential therapeutic option for GIST treatment. Furthermore, the scratch assay result suggested that ATRA was a potential reagent to prevent the invasion or metastasis of GIST cells.

**L'acido all-trans retinoico inibisce la KIT attività e induce l'apoptosi nelle cellule stromali del tratto gastro intestinale nella linea di cellule tumorali GIST-T1 influenzando sulla espressione di survivina e di proteine Bax**

**BACKGROUND:** Imatinib, un inibitore selettivo della tirosin-chinasi, è stato usato come terapia standard di prima linea per irresectabile e metastasi del tumore gastrointestinale stromale (GIST) pazienti. Purtroppo, la maggior parte dei pazienti rispondono a imatinib finirà per esporre imatinib-resistenza, la cui causa non è del tutto chiaro. Il grave problema clinico di richieste imatinib-resistenza alternativa strategia terapeutica. Questo studio è stato condotto per studiare l'effetto di tutto-trans retinoico (ATRA) su linee cellulari GIST.

**METODI:** La proliferazione cellulare è stata determinata trypan test di esclusione del colorante blu. Analisi occidentale della macchia è stata effettuata per testare l'espressione di KIT attivato, le sue proteine a valle, e l'apoptosi associata proteine. Le interazioni citotossici di imatinib con ATRA state valutate usando il isobologram di acciaio e Peckham.

**RISULTATI E CONCLUSIONI:** In questo lavoro, per la prima volta abbiamo dimostrato che

l'ATRA colpito sulla proliferazione delle cellule di GIST-T1-882 e GIST linea cellulare attraverso l'inibizione della crescita cellulare in modo dose dipendente e apoptosi indotta. Alte dosi di ATRA indotto cambiamenti morfologici nelle cellule di GIST-T1, le cellule arrotondate-up, e attivato la proteina caspasi-3. In un ulteriore esame, abbiamo riscontrato che il ATRA-apoptosi indotta in cellule di GIST-T1 è stata accompagnata dalla menzione down-regolato e di espressione di survivina up-regulation della proteina Bax. Inoltre, ATRA sopprime l'attività della proteina in cellule di GIST KIT-T1 e il suo segnale a valle, l'attività di AKT, ma non l'attività MAPK. Abbiamo anche dimostrato che la combinazione di ATRA con imatinib hanno mostrato un effetto additivo di isobologram, suggerendo che la combinazione di ATRA e di imatinib può essere un romanzo possibile opzione terapeutica per il trattamento di GIST. Inoltre, il risultato del test scracht ATRA è stato suggerito che un reagente potenziale di impedire l'invasione e metastasi delle cellule di GIST.

Terao M, Fratelli M, Kurosaki M, Zanetti A, Guarnaccia V, Paroni G, Tsykin A, Lupi M, Gianni M, Goodall GJ, Garattini E.

**Induction of miR-21 by retinoic acid in estrogen receptor-positive breast carcinoma cells: biological correlates and molecular targets.**

J Biol Chem. 2011 Feb 4;286(5):4027-42. Epub 2010 Dec 3.

Laboratory of Molecular Biology, Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri, 20156 Milano, Italy.

Retinoids are promising agents for the treatment/prevention of breast carcinoma. We examined the role of microRNAs in mediating the effects of all-trans-retinoic acid (ATRA), which suppresses the proliferation of estrogen receptor-positive (ER $\alpha$ (+)) breast carcinoma cells, such as MCF-7, but not estrogen receptor-negative cells, such as MDA-MB-231. We found that pro-oncogenic miR-21 is selectively induced by ATRA in ER $\alpha$ (+) cells. Induction of miR-21 counteracts the anti-proliferative action of ATRA but has the potentially beneficial effect of reducing cell motility. In ER $\alpha$ (+) cells, retinoid-dependent induction of miR-21 is due to increased transcription of the MIR21 gene via ligand-dependent activation of the nuclear retinoid receptor, RAR $\alpha$ . RAR $\alpha$  is part of the transcription complex present in the 5'-flanking region of the MIR21 gene. The receptor binds to two functional retinoic acid-responsive elements mapping upstream of the transcription initiation site. Silencing of miR-21 enhances ATRA-dependent growth inhibition and senescence while reverting suppression of cell motility afforded by the retinoid. Up-regulation of miR-21 results in retinoid-dependent inhibition of the established target, maspin. Knockdown and overexpression of maspin in MCF-7 cells indicates that the protein is involved in ATRA-induced growth inhibition and contributes to the ATRA-dependent anti-motility responses. Integration between whole genome analysis of genes differentially regulated by ATRA in MCF-7 and MDA-MB-231 cells, prediction of miR-21 regulated genes, and functional studies led to the identification of three novel direct miR-21 targets: the pro-inflammatory cytokine IL1B, the adhesion molecule ICAM-1 and PLAT, the tissue-type plasminogen activator. Evidence for ICAM-1 involvement in retinoid-dependent inhibition of MCF-7 cell motility is provided.

**Induzione di miR-21 attraverso l'acido retinoico in cellule di carcinoma al seno positive per il recettore degli estrogeni: correlate biologici e bersalgi molecolari.**

I retinoidi sono promettenti agenti per il trattamento / prevenzione del carcinoma della mammella. Abbiamo esaminato il ruolo dei microRNA nel mediare gli effetti di tutto-trans retinoico (ATRA), che sopprime la proliferazione di positivo per il recettore dell'estrogeno (ER $\alpha$  (+)) cellule di carcinoma mammario, come MCF-7, ma non recettore per gli estrogeni -cellule negative, come MDA-MB-231. Abbiamo scoperto che pro-oncogeni miR-21 è selettivamente indotto da ATRA in ER $\alpha$  (+) delle cellule. L'induzione di miR-21 contrasta l'azione anti-proliferativa di ATRA, ma ha l'effetto potenzialmente benefico di ridurre la motilità cellulare. In ER $\alpha$  (+) le cellule, l'induzione retinoidi-dipendente di miR-21 è aumentato a causa di trascrizione del gene MIR21 attraverso l'attivazione ligando-dipendente del recettore nucleare retinoidi, RAR $\alpha$ . RAR $\alpha$  è parte del complesso di trascrizione presente nella regione 5'-accompagnamento del gene MIR21. Il recettore si lega a due elementi funzionali retinoico mappatura sensibile a monte del sito di inizio della trascrizione. Silenziamento di miR-21 migliora l'inibizione della crescita ATRA-dipendente e senescenza, mentre tornando soppressione della motilità cellulare offerta dalla retinoidi. Up-regolazione di miR-21 comporta un'inibizione retinoidi-dipendente del target stabilito, maspin.

Colpo e la sovraespressione di maspin in cellule MCF-7 indica che la proteina è coinvolta nella ATRA-indotta inibizione della crescita e contribuisce alle risposte ATRA-dipendente anti-motilità. Integrazione tra tutta l'analisi del genoma di geni differenzialmente regolati da ATRA in MCF-7 e MDA-MB-231 celle, la previsione di miR-21 geni regolati, e studi funzionali hanno portato alla individuazione di tre nuove diretto miR-21 obiettivi: il pro-citochine infiammatorie IL1B, la molecola di adesione ICAM-1 e PLAT, l'attivatore tissutale del plasminogeno di tipo. Evidenza di ICAM-1 coinvolgimento nella inibizione retinoidi-dipendente di MCF-7 motilità cellulare è fornito.

Youn HS, Park UH, Kim EJ, Um SJ.

**PTOV1 antagonizes MED25 in RAR transcriptional activation.**

Biochem Biophys Res Commun. 2011 Jan 7;404(1):239-44. Epub 2010 Nov 24.

Department of Bioscience and Biotechnology, Institute of Bioscience, Sejong University, Seoul 143-747, Republic of Korea.

Retinoic acid (RA) plays a role in cancer therapy. However, its long-term treatment is hindered by the acquired resistance which is not fully understood. Our previous study indicated that the transcriptional activity of RA receptor (RAR) is enhanced by association of MED25 with CREB-binding protein (CBP) through the PTOV domain, which is also present in prostate tumor over-expressed protein 1 (PTOV1). Here, we show that MED25 and PTOV1 reciprocally regulate RAR transcriptional activity through competitive bindings to CBP and opposite regulation of CBP recruitment to the RA-responsive gene promoter. Finally, we demonstrate that MED25 and PTOV1 differentially modulate RA sensitivity in cancer cells depending on their expression levels, suggesting a potential molecular mechanism underlying RA resistance which frequently emerges during cancer treatments.

**POV1 antagonizza MED25 nella attivazione trascrizionale di RAR.**

L'acido retinoico (RA) svolge un ruolo nella terapia del cancro. Tuttavia, il suo trattamento a lungo termine è ostacolata dalla resistenza acquisita, che non è completamente conosciuto. Il nostro precedente studio ha indicato che l'attività trascrizionale del recettore RA (RAR) è arricchito da un'associazione di MED25 con la proteina CREB-binding (CBP), attraverso il dominio PTOV, che è presente anche in proteina tumore alla prostata over-espressa 1 (PTOV1). Qui, indichiamo che MED25 e PTOV1 reciprocamente regolare l'attività trascrizionale RAR attraverso associazioni competitivo al CBP e la regolamentazione di fronte reclutamento di CBP al promotore del gene RA-sensibili. Infine, abbiamo dimostrato che MED25 e PTOV1 differenziale modulare la sensibilità RA nelle cellule tumorali a seconda della loro livelli di espressione, suggerendo un potenziale meccanismo molecolare alla base di resistenza RA che emerge frequentemente durante i trattamenti contro il cancro.

Alvarez S, Bourguet W, Gronemeyer H, de Lera AR

### **Retinoic acid receptor modulators: a perspective on recent advances and promises.**

Expert Opin Ther Pat. 2011 Jan;21(1):55-63. Epub 2010 Nov 20.

Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidade de Vigo, 36310 Vigo, Spain.

**IMPORTANCE OF THE FIELD:** Retinoids are currently used in the clinic for the treatment of skin diseases and acute promyelocytic leukemia and are known to contribute to early development and organogenesis in embryo and throughout life. Most of these activities are primarily due to the binding of the retinoid to the retinoic acid receptors (RARs, subtypes  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ ). Ligand modulates, via allosteric conformational changes, the ability of RARs to interact with different sets of co-regulators. Structure-based insights on the ligand-binding domain of the ligand-bound RARs have clearly linked retinoid function to co-activator (CoA) recruitment for agonists, CoA dissociation for antagonists and corepressor stabilization for inverse agonists.

**AREAS COVERED IN THIS REVIEW:** To help understand ligand-modulated RAR action as a consequence of its interaction with different sets of co-regulators, we present the chemical engineering of subsets of retinoid chemotypes (retinoids, i.e., the ligands of the retinoid X receptors,  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ , with impact in the treatment of cancer and metabolic diseases, are not covered) that display the whole range of ligand functions, including subtype- and isotype-selectivities.

**WHAT THE READER WILL GAIN:** An understanding of the correlation of retinoid ligand structure and function. Structural insights into ligand action and retinoid chemotypes. Potential for clinical application of retinoid receptor modulators.

**TAKE HOME MESSAGE:** Potential pharmacological/therapeutic applications of these chemical tools extend beyond cancer prevention and therapy to the treatment of autoimmune and neurodegenerative diseases.

### **Acido retinoico modulatori dei recettori: un punto di vista sui recenti progressi e le promesse.**

**IMPORTANZA DEL CAMPO:** I retinoidi sono attualmente utilizzati in clinica per il trattamento delle malattie della pelle e di leucemia acuta promielocytic e sono noti per contribuire allo sviluppo precoce e organogenesi in embrione e per tutta la vita. La maggior parte di queste attività sono principalmente dovuti al legame del retinoidi per i recettori dell'acido retinoico (RAR, sottotipi  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ). Ligand modula, attraverso allosterico cambiamenti conformazionali, la capacità di RARs di interagire con i diversi gruppi di co-regolamentazione. Intuizioni struttura-in base al dominio ligand-vincolante del RARs ligando-bound sono chiaramente collegati retinoidi funzione di co-attivatore (CoA) di reclutamento per gli agonisti, dissociazione CoA per gli antagonisti e stabilizzazione corepressor per agonisti inversi.

Aree trattate in questo RECENSIONE: Per aiutare a comprendere l'azione RAR ligando-modulata come conseguenza della sua interazione con diversi gruppi di co-regolamentazione, vi presentiamo l'ingegneria chimica di sottoinsiemi di chemiotipi retinoidi (retinoidi, vale a dire, i ligandi dei recettori dei retinoidi X ,  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ , con un impatto nel trattamento del cancro e delle malattie metaboliche, non sono coperti) che mostrano l'intera gamma di funzioni di legante, compresi sottotipi e isotipo-selettività.

Ciò che il lettore acquisterà: La comprensione della correlazione dei retinoidi ligando struttura e funzione. Intuizioni strutturali in azione ligando e chemiotipi retinoidi. Potenziale per l'applicazione

clinica di modulatori dei recettori retinoidi. TAKE HOME MESSAGGIO: potenziale farmacologico / applicazioni terapeutiche di questi strumenti chimici vanno al di là di prevenzione e terapia dei tumori al trattamento di malattie autoimmuni e neurodegenerative.

Zhang H, Zhou R, Li L, Chen J, Chen L, Li C, Ding H, Yu L, Hu L, Jiang H, Shen X

### **Danthron functions as a retinoic X receptor antagonist by stabilizing tetramers of the receptor.**

J Biol Chem. 2011 Jan 21;286(3):1868-75. Epub 2010 Nov 17.

State Key Laboratory of Drug Research, Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, 555 Zuchongzhi Road, Shanghai 201203, China.

Retinoic X receptor (RXR) is a promising target for drug discovery against cancer and metabolic syndromes. Here, we identified a specific RXR $\alpha$  antagonist, danthron, from the traditional Chinese medicine rhubarb. Danthron repressed all tested RXR $\alpha$ -involved response element transcription, including the RXRE, PPRE, FXRE, and LXRE. Results from native PAGE and isothermal titration calorimetry (ITC)-based assays indicated that danthron bound to the tetrameric RXR $\alpha$ -LBD in a specific stoichiometric ratio, and such a binding could influence the corepressor SMRT affinity to the receptor. Additionally, a unique tetrameric structure of the apo-RXR $\alpha$  ligand-binding domain (LBD) was determined, which exhibited a larger tetramer interface and different ligand-binding pocket size compared with the one previously reported. Together with the biochemical and biophysical results, the determined crystal structure of danthron-soaked RXR $\alpha$ -LBD suggested a new mechanism for danthron antagonism to tetrameric RXR $\alpha$ . Moreover, the in vivo efficient improvement of insulin sensitivity by danthron was observed in diet-induced obese (DIO) mice. Thus, our findings were expected to supply new insights into the structural basis of RXR $\alpha$  antagonist for its further potential therapeutic application.

### **Danthron funziona come un antagonista del recettore dei retinoidi X stabilizzando i tetrameri del recettore.**

Retinoico recettore X (RXR) è un promettente target per la scoperta di farmaci contro il cancro e delle sindromi metaboliche. Qui, abbiamo individuato uno specifico antagonista RXR $\alpha$ , danthron, dal rabarbaro medicina tradizionale cinese. Represso Danthron tutti testati RXR $\alpha$ -trascrizione coinvolto elemento di risposta, compreso il RXRE, PPRE, FXRE e LXRE. Risultati da PAGINA nativo e calorimetria isoterma di titolazione (ITC) a base di test indicano che danthron legati alla tetrameric RXR $\alpha$ -LBD in uno specifico rapporto di stoichiometric, e un tale legame potrebbe influenzare l'affinità SMRT corepressor al recettore. Inoltre, una struttura unica tetrameric del dominio apo-RXR $\alpha$  ligand-binding (LBD) è stata determinata, che espone una interfaccia tetramero più grande e diverso formato tascabile ligand-vincolante rispetto a quello precedentemente segnalato. Insieme con i risultati biochimici e biofisici, determinato la struttura cristallina di danthron intrisi di RXR $\alpha$ -LBD proposto un nuovo meccanismo di antagonismo a danthron RXR $\alpha$  tetrameric. Inoltre, il miglioramento efficace in vivo della sensibilità all'insulina da parte danthron è stato osservato nei dieta-indotta obesi (DIO) topi. Così, i nostri risultati sono attesi per la fornitura di nuove intuizioni la base strutturale di RXR $\alpha$  antagonista per la sua ulteriore potenziale applicazione terapeutica.

Tang XH, Gudas LJ.

Annu Rev Pathol. 2011 Feb 28;6:345-64.

### **Retinoids, retinoic acid receptors, and cancer.**

Department of Pharmacology, Weill Cornell Medical College, New York, New York 10065, USA.

Retinoids (i.e., vitamin A, all-trans retinoic acid, and related signaling molecules) induce the differentiation of various types of stem cells. Nuclear retinoic acid receptors mediate most but not all of the effects of retinoids. Retinoid signaling is often compromised early in carcinogenesis, which suggests that a reduction in retinoid signaling may be required for tumor development. Retinoids interact with other signaling pathways, including estrogen signaling in breast cancer. Retinoids are used to treat cancer, in part because of their ability to induce differentiation and arrest proliferation. Delivery of retinoids to patients is challenging because of the rapid metabolism of some retinoids and because epigenetic changes can render cells retinoid resistant. Successful cancer therapy with retinoids is likely to require combination therapy with drugs that regulate the epigenome, such as DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibitors, as well as classical chemotherapeutic agents. Thus, retinoid research benefits both cancer prevention and cancer treatment.

### **Retinoidi, recettori dell'acido retinoico e cancro.**

Retinoidi (cioè, la vitamina A, all-trans retinoico, e le relative molecole di segnalazione) inducono la differenziazione dei vari tipi di cellule staminali. Recettori dell'acido retinoico nucleare mediano la maggior parte ma non tutti gli effetti dei retinoidi. Segnalazione dei retinoidi è spesso compromessa precoce nella cancerogenesi, il che suggerisce che una riduzione di segnalazione dei retinoidi possono essere necessari per lo sviluppo del tumore. Retinoidi interagire con altre vie di segnalazione, tra cui gli estrogeni segnalazione nel cancro della mammella. I retinoidi sono usati per trattare il cancro, in parte a causa della loro capacità di indurre la differenziazione e la proliferazione arresto. Consegna dei retinoidi per i pazienti è impegnativo a causa del rapido metabolismo di alcuni retinoidi e perché i cambiamenti epigenetici possono rendere le cellule resistenti retinoidi. Terapia del cancro di successo con i retinoidi è probabile che richiedono la terapia di combinazione con farmaci che regolano il epigenoma, come DNA metiltransferasi e inibitori delle istone deacetilasi, oltre a classici chemioterapici. Pertanto, le prestazioni di ricerca retinoidi sia la prevenzione del cancro e il trattamento del cancro.

Kim MK, Ahn SH, Son BH, Sung MK.

**Plasma antioxidant concentration, not superoxide dismutase polymorphism, is associated with breast cancer risk in Korean women.**

Nutr Res. 2010 Oct;30(10):705-13.

Cancer Epidemiology Branch, Division of Cancer Epidemiology and Management, Research Institute, National Cancer Center, Goyang-si Gyeonggi-do, 410-769, Republic of Korea.

Disturbances in redox regulation are suggested to be involved in the development of breast cancer. We conducted a hospital-based case-control study to examine the hypothesis that lower plasma antioxidant concentration is related to higher risk of breast cancer and that genetic polymorphism of manganese superoxide dismutase (SOD2) modifies the relationship between breast cancer risk and plasma antioxidant. Genotyping for SOD2 Val16Ala polymorphism was performed by a 5' exonuclease assay, and plasma concentrations of retinol, carotenoids, and tocopherols were determined by high-performance liquid chromatography. Unconditional logistic regression models were used to estimate crude and multivariate odds ratios with a 95% confidence interval. The variant allele frequencies of SOD2 Val16Ala (TC or CC type) were 26% for the control subjects and 23% for the breast cancer patients, and the variant genotype was not a risk factor for breast cancer. Higher plasma retinol concentration was associated with a lower risk, whereas higher plasma  $\beta$ -carotene,  $\alpha$ -tocopherol, or  $\gamma$ -tocopherol concentrations were associated with a higher risk of breast cancer. SOD2 CT or CC genotype was associated with lower risk (odds ratio, 0.53; 95% confidence interval, 0.30-0.93; P for interaction = .025) in subjects with low plasma  $\gamma$ -tocopherol concentration. Our findings suggest that the SOD2 Val16Ala variant is not related to the risk of breast cancer in Korean women; however, it may affect the association between plasma  $\gamma$ -tocopherol levels and the risk of breast cancer.

**La concentrazione plasmatica antiossidante, non polimorfismo superossido dismutasi, è associata a rischio di cancro al seno nelle donne coreane.**

Disturbi della regolazione redox si suggerisce di essere coinvolti nello sviluppo del cancro al seno. Abbiamo condotto uno studio su base ospedaliera caso-controllo per esaminare l'ipotesi che la minore concentrazione di antiossidanti nel plasma è legato a un rischio maggiore di tumore al seno e che il polimorfismo genetico della superossido dismutasi manganese (SOD2) modifica la relazione tra rischio di cancro al seno e antiossidante del plasma. Genotipizzazione per il polimorfismo SOD2 Val16Ala stato eseguito da un 5 'saggio exonuclease, e le concentrazioni plasmatiche di retinolo, carotenoidi e tocoferoli sono stati determinati da prestazioni elevate cromatografia liquida. Unconditional modelli di regressione logistica sono stati utilizzati per stimare greggio e odds ratio multivariato con un intervallo di confidenza del 95%. Le frequenze alleliche variante di SOD2 Val16Ala (TC o tipo CC) sono stati il 26% per i soggetti di controllo e il 23% per i pazienti affetti da tumore al seno, e il genotipo variante non è stato un fattore di rischio per cancro al seno. Maggiore concentrazione di retinolo nel plasma è stato associato con un rischio inferiore, mentre maggiore plasma  $\beta$ -carotene,  $\alpha$ -tocoferolo, o concentrazioni  $\gamma$ -tocoferolo sono stati associati con un rischio maggiore di cancro al seno. SOD2 TC o genotipo CC era associato a più bassi rischi (odds ratio, 0,53; intervallo di confidenza 95% 0,30-0,93, p per interazione = 0,025) nei soggetti con bassa concentrazione plasmatica  $\gamma$ -tocoferolo. I nostri risultati suggeriscono che la variante

SOD2 Val16Ala non è correlato al rischio di cancro al seno nelle donne coreane, tuttavia, può pregiudicare l'associazione tra livelli plasmatici di  $\gamma$ -tocoferolo e il rischio di cancro al seno.

Bourguet W, de Lera AR, Gronemeyer H.

### **Inverse agonists and antagonists of retinoid receptors.**

Methods Enzymol. 2010;485:161-95.

INSERM U554 and CNRS UMR5048, Centre de Biochimie Structurale, Universités Montpellier 1 & 2, Montpellier, France.

#### **Abstract**

Nuclear receptors (NRs) are ligand-inducible transcription factors that regulate a plethora of cell biological phenomena, thus orchestrating complex events like development, organ homeostasis, immune function, and reproduction. Due to their regulatory potential, NRs are major drug targets for a variety of diseases, including cancer and metabolic diseases, and had a major societal impact following the development of contraceptives and abortifacients. Not surprisingly in view of this medical and societal importance, a large amount of diverse NR ligands have been generated and the corresponding structural and functional analyses have provided a deep insight into the molecular basis of ligand action. What we have learnt is that ligands regulate, via allosteric conformational changes, the ability of NRs to interact with different sets of coregulators which in turn recruit enzymatically active complexes, the workhorses of the ligand-induced epigenetic and transcription-regulatory events. Thus, ligands essentially direct the communication of a given NR with its intracellular environment at the chromatin and extragenomic level to modulate gene programs directly at the chromatin level or via less well-understood extranuclear actions. Here we will review our current structural and mechanistic insight into the functionalities of subsets of retinoid and rexinoid ligands that act generically as antagonists but follow different mechanistic principles, resulting in "classical" or neutral antagonism, or inverse agonism. In addition, we describe the chemical features and guidelines for the synthesis of retinoids/rexinoids that exert specific functions and we provide protocols for a number of experimental approaches that are useful for studies of the agonistic and antagonistic features of NR ligands.

### **Agonisti inversi ed antagonisti dei recettori dei retinoidi.**

Recettori nucleari (NR) sono fattori di trascrizione ligando-inducibili che regolano una pletera di fenomeni biologici delle cellule, così orchestrato eventi complessi come lo sviluppo, l'omeostasi di organi, la funzione immunitaria, e la riproduzione. A causa della loro potenziale di regolamentazione, NR sono importanti bersagli farmacologici per una varietà di malattie, compreso il cancro e le malattie metaboliche, e avuto un forte impatto sociale a seguito dello sviluppo di contraccettivi e abortivi. Non sorprende che in vista di questa rilevanza medica e sociale, una grande quantità di leganti NR diverse sono state generate e le analisi strutturali e funzionali corrispondenti hanno fornito una comprensione in profondità la base molecolare di azione legante. Quello che abbiamo imparato è che ligandi regolano, via allosterico cambiamenti conformazionali, la capacità di NR di interagire con i diversi gruppi di coregulators che a sua volta recluta complessi enzimaticamente attiva, il cavallo di battaglia del-ligando indotta da eventi epigenetici e trascrizione-regolamentazione. Quindi, in sostanza, ligandi diretta la comunicazione di una NR dato con il suo ambiente intracellulare a livello della cromatina e extragenomic di modulare i programmi gene direttamente a livello della cromatina o via meno ben capito azioni extranucleare. Qui ci sarà rivedere la nostra visione attuale strutturali e meccanicistici nelle funzionalità di sottoinsiemi di

ligandi retinoidi e retinoid genericamente che agiscono come antagonisti ma seguono diversi principi meccanicistici, con conseguente "classica" o antagonismo neutro o agonismo inverso. Inoltre, si descrivono le caratteristiche chimiche e le linee guida per la sintesi dei retinoidi / retinoidi che esercitano funzioni specifiche e protocolli per fornire una serie di approcci sperimentali che sono utili per gli studi delle caratteristiche agonisti e antagonisti di ligandi NR.

Schäffer MW, Roy SS, Mukherjee S, Ong DE, Das SK.

### **Uptake of all-trans retinoic acid-containing aerosol by inhalation to lungs in a guinea pig model system--a pilot study.**

Exp Lung Res. 2010 Dec;36(10):593-601.

Department of Biochemistry and Cancer Biology, Meharry Medical College, Nashville, Tennessee 37208, USA.

#### **Abstract**

Systemic therapies with retinoic acid (RA) can result in toxic side effects without yielding biologically effective levels in target tissues such as lung. The authors adapted a PARI LC Star nebulizer to create a tubular system for short-term inhalation treatment of guinea pigs using a water-miscible formulation of all-trans RA (ATRA) or vehicle. Based on the initial average weight, animals received an estimated average ATRA doses of either 0.32 mg·kg<sup>-1</sup> (low dose, 1.4 mM), or 0.62 mg·kg<sup>-1</sup> (medium dose, 2.8 mM), or 1.26 mg·kg<sup>-1</sup> (high dose, 5.6 mM) 20 minutes per day for 6 consecutive days. This system led to a rise of ATRA levels in lung, but not liver or plasma. Cellular lung levels of retinol, retinyl palmitate, and retinyl stearate also appeared to be unaffected (245.6 ± 10.7, 47.4 ± 3.4, and 132.8 ± 7.7 ng·g<sup>-1</sup> wet weight, respectively). The application of this aerosolized ATRA also induced a dose-dependent protein expression of the cellular retinol-binding protein 1 (CRBP-1) in lung, without apparent harmful side effects.

### **Captazione da aerosol contenenti acido all-trans retinoico per inalazione dai polmoni in una cavia - studio pilota.**

Terapie sistemiche con l'acido retinoico (RA) può provocare effetti collaterali tossici, senza cedere biologicamente livelli efficaci nei tessuti bersaglio come polmone. Gli autori hanno adattato un nebulizzatore PARI LC Star di creare un sistema tubolare per cure inalatorie a breve termine delle cavie con una formulazione in acqua miscibile di all-trans RA (ATRA) o di un veicolo. Sulla base del peso medio iniziale, gli animali si calcola dosi medie di ATRA o 0,32 mg · kg<sup>-1</sup> (a basso dosaggio, 1,4 mM), o 0,62 mg · kg<sup>-1</sup> (dose media, 2,8 mM), o 1,26 mg kg<sup>-1</sup> (ad alte dosi, 5,6 mM) 20 minuti al giorno per 6 giorni consecutivi. Questo sistema ha portato a un aumento dei livelli di ATRA in polmonare, ma non al fegato o al plasma. I livelli di retinolo cellulare del polmone, retinil palmitato e stearato retinile sembrava essere influenzata (245,6 ± 10,7, il 47,4 ± 3,4 e 132,8 ± 7,7 ng · g<sup>-1</sup> di peso fresco, rispettivamente). L'applicazione di questo aerosol ATRA anche indotto una espressione della proteina dose-dipendente della proteina cellulare RBP 1 (CRBP-1) nel polmone, senza apparenti effetti collaterali nocivi.

Mizuno CS, Paul S, Suh N, Rimando AM.

**Synthesis and biological evaluation of retinoid-chalcones as inhibitors of colon cancer cell growth.**

Bioorg Med Chem Lett. 2010 Dec 15;20(24):7385-7. Epub 2010 Oct 14.

US Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Natural Products Utilization Research Unit, University, MS 38677, USA. cmizuno@olemiss.edu

Based on the observed anticancer activity of chalcones and retinoids, a novel class of retinoid-chalcone hybrids was designed and synthesized. As part of our ongoing studies to discover natural product based anticancer compounds, the retinoid-chalcone hybrids were tested against the colon cancer cell line HT-29. Retinoid like moiety was introduced through Friedel-Crafts alkylation of toluene. Among the synthesized compounds, the cyano derivative (E)-3-(3-oxo-3-(3,5,5,8,8-pentamethyl-5,6,7,8-tetrahydronaphthalen-2-yl)prop-1-enyl)benzotrile 8 showed submicromolar inhibitory activity with an IC(50) of 0.66  $\mu$ M.

**Sintesi e valutazione biologica di retinoidi calconi come inibitori della crescita delle cellule tumorali del colon.**

Sulla base delle attività antitumorale osservata di calconi e retinoidi, una nuova classe di ibridi retinoidi calcone è stato progettato e sintetizzato. Come parte dei nostri studi in corso per scoprire i composti antitumorali a base di prodotti naturali, gli ibridi retinoidi calcone sono stati testati contro la linea cellulare di cancro del colon HT-29. Frazione retinoidi come è stata introdotta attraverso l'alchilazione di Friedel-Crafts di toluene. Tra i composti sintetizzati, il derivato ciano (E) -3 - (3-oxo-3-(3,5,5,8,8-pentamethyl-5 ,6,7,8-tetrahydronaphthalen-2-ile) prop-1-enil) benzotrile 8 presentavano submicromolar attività inibitoria con un IC (50) di 0,66 micron.

Aktaş S, Zadeoğlulari Z, Erçetin P, Olgun N.

### **The effect of differentiating and apoptotic agents on notch signalling pathway in hepatoblastoma.**

Hepatogastroenterology. 2010 Jul-Aug;57(101):891-8.

Dokuz Eylul University Institute of Oncology, Izmir Turkey. safiyeaktas@yahoo.com

**BACKGROUND/AIMS:** Notch expression is not yet determined in hepatoblastoma. In this study the effect of chemotherapeutics (cisplatin, doxorubicin, cytosin arabinoside); differentiating agent (13 cis-retinoic acid) and apoptotic agents (5-aza-2'-deoxycytidine, arsenic trioxide) on notch expression in hepatoblastoma were evaluated.

**METHODOLOGY:** After HepG2 cell line was cultured and the agents and their combinations were applied for 24 hour in pre-optimized 50% lethal doses, RNA isolation and cDNA converting, expression of 84 custom array genes of notch signaling pathway (SABiosciences, PAT059F-24) was determined by Real Time PCR. The methylation status of 6 genes that showed more than 5 fold changes compared with control group were explored by Methylation qPCR Assay. High expressed genes are HDAC1, NFKB1, CHUK, CDKN1A, and CBL. Low expressed genes are DLL1, CD44, FZD2, GLI1, IL17B, LMO2, NOTCH1, LOR, PAX5, PT-CRA, SH2D1A, and WISP1. The genes searched for methylation (DLL1, HEY1, DTX1, HDAC1, NOTCH2 and JAG1) were not found to be related with methylation.

**RESULTS:** The high expressed genes are related with cell proliferation. The main signaling genes that are closed to notch in signaling pathway are low expressed in hepatoblastoma. The agents do not show prominent effect of gene expression in many genes and methylation is not the reason of expression changes. The use of retinoic acid in the control of minimal residual disease of hepatoblastoma should be discussed. 5 aza "cytidin" the demethylating agent is not advised in treatment according to our results.

**CONCLUSION:** Cisplatin as main chemotherapeutic agent treatment is shown to change gene expression levels in notch signalling pathway in hepatoblastoma.

L'effetto di differenziazione e di agenti apoptotici sulla tacca percorso di segnalazione in epatoblastoma.

### **L'effetto di differenziazione e di agenti apoptotici sul percorso di segnalazione nell'epatoblastoma.**

**BACKGROUND / AIMS:** espressione di Notch non è ancora stato determinato in epatoblastoma. In questo studio l'effetto di chemioterapici (cisplatino, doxorubicina, arabinoside cytosin), differenziando agente (13 acido cis-retinoico) e gli agenti apoptotici (5-aza-2'-deossicitidina, arsenico triossido) sull'espressione tacca in epatoblastoma sono stati valutati.

**METODOLOGIA:** Dopo la linea cellulare HepG2 è stato colto e gli agenti e le loro combinazioni sono state applicate per 24 ore di pre-ottimizzate dosi letali il 50%, l'isolamento di RNA e DNA conversione, espressione di 84 geni gamma personalizzata di tacca via di segnalazione (SABiosciences, PAT059F-24 ) È stata determinata mediante Real Time PCR. Lo stato di metilazione di 6 geni che mostravano più di 5 volte i cambiamenti rispetto al gruppo di controllo sono stati esplorati da metilazione qPCR Assay. Alta espressi i geni sono HDAC1, NFKB1, Chuk, CDKN1A e CBL. Bassa geni sono espressi DLL1, CD44, FZD2, GLI1, IL17B, LMO2, NOTCH1,

LOR, PAX5, PT-CRA, SH2D1A e WISP1. I geni cercato di metilazione (DLL1, HEY1, DTX1 HDAC1, NOTCH2 e JAG1) non sono risultati correlati con la metilazione.

RISULTATI: I geni sono espressi elevato in relazione con la proliferazione cellulare. I principali geni di segnalazione che sono chiuse al tacca in via di segnalazione sono bassi espressi in epatoblastoma. Gli agenti non mostrano effetto importante di espressione genica in molti geni e metilazione non è la ragione di cambiamenti di espressione. L'utilizzo dell'acido retinoico nel controllo della malattia minima residua di epatoblastoma dovrebbe essere discusso. 5 aza "cytidin" l'agente demetilante non è consigliato di trattamento in base ai nostri risultati. CONCLUSIONE: Cisplatino come principale agente di trattamento chemioterapico è indicato per cambiare i livelli di espressione genica in tacca in via di segnalazione epatoblastoma. L'Effetto di differenziazione e di Agenti apoptotici Silla Tacca Percorso Segnalazione di in epatoblastoma.

Such E, Cervera J, Valencia A, Barragán E, Ibañez M, Luna I, Fuster O, Perez-Sirvent ML, Senent L, Sempere A, Martínez J, Martín-Aragónés G, Sanz MA

**A novel NUP98/RARG gene fusion in acute myeloid leukemia resembling acute promyelocytic leukemia.**

Blood. 2011 Jan 6;117(1):242-5. Epub 2010 Oct 8.

Department of Hematology, Hospital Universitario La Fe, Valencia, Spain.

Chromosomal translocations in hematological malignancies often result in novel fusion chimeric genes. We report a case of acute myeloid leukemia with a clonal translocation t(11;12)(p15;q13) displaying morphologic and immunophenotypic features resembling the classical hypergranular subtype of acute promyelocytic leukemia. The gene fused to NUP98 (nucleoporin 98) was detected by comparative genomic hybridization array as the retinoid acid receptor gamma gene (RARG). The involvement of RARG in a chimeric fusion transcript has not been reported previously in human leukemia

**Una nuova fusione genica NUP98/RARG nella leucemia mieloide acuta simile alla leucemia promielocitica acuta**

Traslocazioni cromosomiche nelle neoplasie ematologiche spesso sfociano in nuovi geni di fusione chimerici. Segnaliamo un caso di leucemia mieloide acuta con una traslocazione t clonale (11, 12) (p15, q13) e le caratteristiche morfologiche visualizzazione immunofenotipic simile al classico ipergranulare sottotipo della leucemia promielocitica acuta. Il gene fuso a NUP98 (nucleoporin 98) è stato rilevato dalla matrice ibridazione genomica comparativa come retinoidi gene del recettore dell'acido gamma (RARG). Il coinvolgimento di RARG in una trascrizione di fusione chimerico non è stata segnalata precedentemente nella leucemia umana

Taylor W, Mathias A, Ali A, Ke H, Stoynev N, Shilkaitis A, Green A, Kiyokawa H, Christov K

**p27(Kip1) deficiency promotes prostate carcinogenesis but does not affect the efficacy of retinoids in suppressing the neoplastic process.**

BMC Cancer. 2010 Oct 8;10:541.

University of Illinois at Chicago, Department of Surgery, Division of Surgical Oncology, 840 S Wood St, Chicago, IL 60612, USA.

**Abstract**

**BACKGROUND:** p27 is a cell cycle suppressor gene, whose protein is a negative regulator of cyclin/cdk complexes. p27 is also a potential target of retinoids in cancer prevention studies. In benign prostate hyperplasia (BPH), and in most carcinomas, p27(Kip1) is down-regulated, suggesting its potential resistance to retinoids. To test this hypothesis, we examined the efficacy of 9-cis retinoic acid (9cRA) to suppress prostate cell proliferation (PECP) and carcinogenesis in p27(Kip1) deficient mice.

**METHODS:** p27(Kip1) deficient (-/-), heterozygous (+/-) and homozygous (+/+) mice were treated for 7 days with testosterone, 9cRA, or with both, and cell proliferation in dorsolateral prostate (DLP) was determined by BrdU labeling. Prostate carcinogenesis was induced by N-Methyl-N-Nitrosourea (MNU) and hormone stimulation.

**RESULTS:** PECP in DLP of two-month-old mice of all genotypes was similar but significantly increased in old p27<sup>-/-</sup> mice only. Testosterone treatment increased PECP in all three p27 genotypes with the highest values in p27<sup>-/-</sup> mice. p27(Kip1) deficiency did not affect the response of PEC to 9cRA and to 9cRA+testosterone. The decrease of p27(Kip1) in p27<sup>+/-</sup> and p27<sup>-/-</sup> mice progressively increased the incidence and frequency of PIN and tumors. 9cRA suppressed PIN in all three p27 genotypes and this was associated with decreased PECP and increased cellular senescence.

**CONCLUSIONS:** This data indicates that p27(Kip1) deficiency promotes prostate cell proliferation and carcinogenesis but does not affect 9cRA's potential to suppress prostate carcinogenesis, suggesting that patients with PIN and carcinomas lacking or having a low level of p27(Kip1) expression may also benefit from clinical trials with retinoids.

**La carenza di p27 promuove la carcinogenesi prostatica ma non influenza l'efficacia dei retinoidi nel sopprimere il processo neoplastico**

**BACKGROUND:** p27 è un ciclo gene soppressore delle cellule, la cui proteina è un regolatore negativo della ciclina / CDK complessi. p27 è anche un potenziale bersaglio dei retinoidi in studi sulla prevenzione del cancro. In iperplasia prostatica benigna (BPH), e nella maggior parte dei carcinomi, p27 (Kip1) è down-regolato, suggerendo il suo potenziale resistenza ai retinoidi. Per verificare questa ipotesi, abbiamo esaminato l'efficacia di 9-cis retinoico (9cRA) per sopprimere la proliferazione delle cellule della prostata (PECP) e carcinogenesi in p27 (Kip1) topi carenti. **METODI:** p27 (Kip1) carenti (+/-) (-/-), eterozigoti ed omozigoti (+/+) topi sono stati trattati per 7 giorni con testosterone, 9cRA, o con entrambi, e la proliferazione delle cellule della prostata dorsolaterale (DLP) è stata determinata mediante BrdU etichettatura. Carcinogenesi della prostata è

stata indotta da N-metil-N-nitrosourea (MNU) e la stimolazione ormonale.

**RISULTATI:** PECP in DLP di topi di due mesi, di tutti i genotipi era simile ma significativamente aumentata nel vecchio p27-/- topi solo. Trattamento con testosterone PECP aumentato in tutti e tre i genotipi p27 con i valori più alti in p27-/- topi. p27 (Kip1) deficienza non ha influenzato la risposta di PEC per 9cRA e 9cRA + testosterone. La diminuzione di p27 (Kip1) in p27 +/- e p27-/- topi progressivamente aumentato l'incidenza e la frequenza dei PIN e tumori. 9cRA soppressa PIN in tutti e tre i genotipi p27 e questo è stato associato ad una diminuzione PECP e aumento senescenza cellulare.

**CONCLUSIONI:** Questi dati indicano che p27 (Kip1) carenza favorisce la proliferazione delle cellule della prostata e la carcinogenesi, ma non influisce 9cRA il potenziale per sopprimere la carcinogenesi della prostata, suggerendo che i pazienti con PIN e carcinomi manca o che hanno un basso livello di p27 (Kip1) espressione può anche beneficiare da studi clinici con retinoidi.

Melichar B, Krcmová L, Kalábová H, Holecková P, Kasparová M, Plísek J, Hyspler R, Studentová H, Solichová D.

**Serum retinol, alpha-tocopherol and systemic inflammatory response in metastatic colorectal carcinoma patients treated with combination chemotherapy and cetuximab.**

J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo). 2010;56(4):222-6.

Department of Oncology, Palacký University Medical School and Teaching Hospital, I.P. Pavlova, Olomouc, Czech Republic. bohuslav.melichar@fnol.cz

Cetuximab is a chimeric antibody registered for the therapy of advanced colorectal carcinoma. Cancer and anticancer therapy are associated with oxidative stress, and disorders of antioxidant balance may be involved in the toxicity associated with anticancer treatment. The aim of the present study was to investigate the changes of serum retinol, alpha-tocopherol and C-reactive protein during the first month of treatment with cetuximab and chemotherapy. Twenty-five consecutive patients with metastatic colorectal carcinoma treated with a combination of chemotherapy and cetuximab were included in the present study. Serum retinol and alpha-tocopherol were determined by high-performance liquid chromatography and serum C-reactive protein was determined using commercial kits. Significant correlation was observed between baseline concentrations of retinol and C-reactive protein ( $r(s)=-0.54$ ,  $p<0.01$ ). Median survival of patients who had baseline serum retinol below  $1.25 \mu\text{mol/L}$  was 10 mo compared to 18 mo for patients who had serum retinol equal or above  $1.25 \mu\text{mol/L}$  ( $p<0.05$ ); median survival of patients who had serum C-reactive protein below  $24 \text{ mg/L}$  was significantly longer compared to patients with C-reactive protein levels equal or above  $24 \text{ mg/L}$  (18 vs. 7 mo,  $p<0.05$ ), but no difference in survival was observed based on alpha-tocopherol levels. Twenty-two patients had evaluation of retinol, alpha-tocopherol and C-reactive protein at least once during the follow up. Serum concentration of alpha-tocopherol decreased significantly during the therapy, but retinol and C-reactive protein concentrations remained unchanged. In conclusion, a significant correlation was observed between serum retinol and C-reactive protein. Serum alpha-tocopherol decreased significantly during the first month of combination therapy with cetuximab. Low retinol and high C-reactive protein concentrations were predictive of poor prognosis in this patient population

**Il retinolo sierico, l'alfa-tocoferolo e la risposta del sistema infiammatorio nei pazienti con carcinoma colonrettale trattati con la combinazione di chemioterapia e cetuximab**

Cetuximab è un anticorpo chimerico registrato per la terapia del carcinoma coloretale. Il cancro e la terapia antitumorale sono associati a stress ossidativo, e disturbi di equilibrio antiossidanti possono essere coinvolti nella tossicità associata a trattamento antitumorale. Lo scopo del presente studio era di esaminare i cambiamenti di retinolo nel siero, l'alfa-tocoferolo e proteina C-reattiva nel corso del primo mese di trattamento con cetuximab e chemioterapia. Venticinque pazienti consecutivi con carcinoma coloretale metastatico trattati con una combinazione di chemioterapia e Cetuximab sono stati inclusi nel presente studio. Retinolo nel siero e di alfa-tocoferolo sono stati determinati da prestazioni elevate cromatografia liquida e proteina C-reattiva è stata determinata utilizzando kit commerciali. Correlazione significativa è stata osservata tra le concentrazioni basali di retinolo e di proteina C-reattiva ( $r(s) = -0.54$ ,  $p < 0,01$ ). La sopravvivenza media dei pazienti che avevano al basale retinolo nel siero sotto  $1,25 \text{ micromol / L}$  è stato di 10 mo rispetto al 18 mo per i pazienti che avevano retinolo nel siero pari o superiore a  $1,25 \text{ micromol / L}$  ( $p < 0,05$ ), la sopravvivenza mediana dei pazienti con livelli sierici di C-reattiva di proteine inferiore a  $24 \text{ mg / L}$  è stato

significativamente più lungo rispetto ai pazienti con livelli di proteina C-reattiva uguale o superiore a 24 mg / L (18 contro 7 mo,  $p < 0,05$ ), ma nessuna differenza in termini di sopravvivenza è stata osservata in base ai livelli di alfa-tocoferolo . Ventidue pazienti hanno avuto una valutazione di retinolo, alfa-tocoferolo e proteina C-reattiva, almeno una volta durante il follow up. La concentrazione sierica di alfa-tocoferolo è diminuita significativamente durante la terapia, ma le concentrazioni della proteina retinolo e C-reattiva sono rimasti invariati. In conclusione, una correlazione significativa è stata osservata tra retinolo nel siero e di proteina C-reattiva. Alfa-tocoferolo sierico è diminuito in modo significativo durante il primo mese di terapia combinata con cetuximab. Retinolo bassa e alta concentrazione di proteina C-reattiva sono risultati predittivi di prognosi sfavorevole in questa popolazione di pazienti

Wernicke C, Hellmann J, Finckh U, Rommelspacher H.

### **Chronic ethanol exposure changes dopamine D2 receptor splicing during retinoic acid-induced differentiation of human SH-SY5Y cells.**

Pharmacol Rep. 2010;62(4):659-63.

Charité, Universitätsmedizin Berlin, Campus Charité Mitte, Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie, Dorotheenstr. 94, 10117 Berlin, Germany. catrin.wernicke@charite.de

There is evidence for ethanol-induced impairment of the dopaminergic system in the brain during development. The dopamine D2 receptor (DRD2) and the dopamine transporter (DAT) are decisively involved in dopaminergic signaling. Two splice variants of DRD2 are known, with the short one (DRD2s) representing the autoreceptor and the long one (DRD2l) the postsynaptic receptor. We searched for a model to investigate the impact of chronic ethanol exposure and withdrawal on the expression of these proteins during neuronal differentiation. RA-induced differentiation of human neuroblastoma SH-SY5Y cells seems to represent such a model. Our real-time RT-PCR, Western blot, and immunocytochemistry analyses of undifferentiated and RA-differentiated cells have demonstrated the enhanced expression of both splice variants of DRD2, with the short one being stronger enhanced than the long one under RA-treatment, and the DRD2 distribution on cell bodies and neurites under both conditions. In contrast, DAT was down-regulated by RA. The DAT is functional both in undifferentiated and RA-differentiated cells as demonstrated by [(3)H]dopamine uptake. Chronic ethanol exposure during differentiation for up to 4 weeks resulted in a delayed up-regulation of DRD2s. Ethanol withdrawal caused an increased expression of DRD2l and a normalization of DRD2s. Thus the DRD2s/DRD2l ratio was still disturbed. The dopamine level was increased by RA-differentiation compared to controls and was diminished under RA/ethanol treatment and ethanol withdrawal compared to RA-only treated cells. In conclusion, chronic ethanol exposure impairs differentiation-dependent adaptation of dopaminergic proteins, specifically of DRD2s. RA-differentiating SH-SY5Y cells are suited to study the impact of chronic ethanol exposure and withdrawal on expression of dopaminergic proteins during neuronal differentiation.

### **L'esposizione cronica all'etanolo cambia lo splicing del recettore della dopamine D2 durante la differenziazione indotta dall'acido retinoico delle cellule umane SH-SY5Y**

Ci sono prove per l'etanolo danneggiamento indotto del sistema dopaminergico del cervello durante lo sviluppo. Il recettore D2 della dopamina (DRD2) e del trasportatore della dopamina (DAT) sono decisamente coinvolti nella segnalazione dopaminergica. Due varianti di splicing di DRD2 sono noti, con quello corto (DRD2s) che rappresenta la autorecettori e quello lungo (DRD2l) il recettore postsinaptico. Siamo alla ricerca di un modello per studiare l'impatto dell'esposizione cronica di etanolo e ritiro l'espressione di queste proteine durante la differenziazione neuronale. RA-indotta la differenziazione delle cellule umane di neuroblastoma SH-SY5Y sembra rappresentare un tale modello. La nostra real-time RT-PCR, Western Blot, e le analisi immunocitochimica di cellule indifferenziate e RA-differenziati hanno dimostrato l'espressione di entrambe le varianti di splicing di DRD2, con quello corto, di forte migliorata rispetto a quella a lungo sotto RA-trattamento, e la distribuzione DRD2 sui corpi delle cellule e neuriti in entrambe le condizioni. Al contrario, DAT è down-regolato da RA. Il DAT è funzionale sia in cellule indifferenziate e RA-differenziato come dimostrato da [(3) H] uptake della dopamina. L'esposizione cronica di etanolo durante la differenziazione per fino a 4 settimane ha determinato un ritardo up-regulation dei DRD2s. Ritiro

etanolo ha provocato un aumento dell'espressione di DRD2l e una normalizzazione dei DRD2s. Pertanto il rapporto DRD2s/DRD2l era ancora turbato. Il livello di dopamina è stata aumentata di RA-differenziazione rispetto ai controlli ed è stata diminuita in RA / trattamento di etanolo e il ritiro di etanolo rispetto alle cellule trattate RA-only. In conclusione, l'esposizione cronica di etanolo altera l'adattamento differenziazione-dipendente delle proteine dopaminergici, in particolare di DRD2s. RA-differenziazione delle cellule SH-SY5Y sono adatti a studiare l'impatto dell'esposizione cronica di etanolo e il ritiro sull'espressione delle proteine durante il differenziamento dei neuroni dopaminergici.

Yu AL, Gilman AL, Ozkaynak MF, London WB, Kreissman SG, Chen HX, Smith M, Anderson B, Villablanca JG, Matthay KK, Shimada H, Grupp SA, Seeger R, Reynolds CP, Buxton A, Reisfeld RA, Gillies SD, Cohn SL, Maris JM, Sondel PM; Children's Oncology Group.

### **Anti-GD2 antibody with GM-CSF, interleukin-2, and isotretinoin for neuroblastoma.**

N Engl J Med. 2010 Sep 30;363(14):1324-34.

University of California, San Diego, and Moores Cancer Center, San Diego, CA 92103-8447, USA.  
aliceyu@ucsd.edu

Comment in:

- N Engl J Med. 2011 Jan 20;364(3):289; author reply 289-90.

**BACKGROUND:** Preclinical and preliminary clinical data indicate that ch14.18, a monoclonal antibody against the tumor-associated disialoganglioside GD2, has activity against neuroblastoma and that such activity is enhanced when ch14.18 is combined with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) or interleukin-2. We conducted a study to determine whether adding ch14.18, GM-CSF, and interleukin-2 to standard isotretinoin therapy after intensive multimodal therapy would improve outcomes in high-risk neuroblastoma.

**METHODS:** Patients with high-risk neuroblastoma who had a response to induction therapy and stem-cell transplantation were randomly assigned, in a 1:1 ratio, to receive standard therapy (six cycles of isotretinoin) or immunotherapy (six cycles of isotretinoin and five concomitant cycles of ch14.18 in combination with alternating GM-CSF and interleukin-2). Event-free survival and overall survival were compared between the immunotherapy group and the standard-therapy group, on an intention-to-treat basis.

**RESULTS:** A total of 226 eligible patients were randomly assigned to a treatment group. In the immunotherapy group, a total of 52% of patients had pain of grade 3, 4, or 5, and 23% and 25% of patients had capillary leak syndrome and hypersensitivity reactions, respectively. With 61% of the number of expected events observed, the study met the criteria for early stopping owing to efficacy. The median duration of follow-up was 2.1 years. Immunotherapy was superior to standard therapy with regard to rates of event-free survival (66±5% vs. 46±5% at 2 years, P=0.01) and overall survival (86±4% vs. 75±5% at 2 years, P=0.02 without adjustment for interim analyses).

**CONCLUSIONS:** Immunotherapy with ch14.18, GM-CSF, and interleukin-2 was associated with a significantly improved outcome as compared with standard therapy in patients with high-risk neuroblastoma. (Funded by the National Institutes of Health and the Food and Drug Administration; ClinicalTrials.gov number, NCT00026312.)

### **Anticorpi anti-GD2 con GM-CSF, interleuchina-2, e isotretinoina per neuroblastoma**

**BACKGROUND:** preclinici e clinici dati preliminari indicano che ch14.18, un anticorpo monoclonale contro il GD2 disialoganglioside associata al tumore, ha attività contro il neuroblastoma e che tale attività è favorita quando è combinato con ch14.18 granulociti-macrofagi colony-stimulating factor (GM -CSF) o interleuchina-2. Abbiamo condotto uno studio per determinare se l'aggiunta di ch14.18, GM-CSF, e interleuchina-2 alla terapia con isotretinoina

standard dopo un'intensa terapia multimodale dovrebbe migliorare i risultati nel neuroblastoma ad alto rischio.

**METODI:** I pazienti con neuroblastoma ad alto rischio che hanno avuto una risposta alla terapia di induzione e il trapianto di cellule staminali sono stati assegnati in modo casuale, in un rapporto 1:1, a ricevere la terapia standard (sei cicli di isotretinoina) o immunoterapia (sei cicli di isotretinoina e di cinque cicli concomitante di ch14.18 in combinazione con alternanza di GM-CSF e interleuchina-2). Sopravvivenza libera da eventi e la sopravvivenza generale sono state confrontate tra il gruppo di immunoterapia e il gruppo terapia standard, su un intention-to-treat.

**RISULTATI:** Un totale di 226 pazienti eleggibili sono stati assegnati in modo casuale ad un gruppo di trattamento. Nel gruppo di immunoterapia, per un totale di 52% dei pazienti ha avuto dolore di grado 3, 4 o 5, e il 23% e il 25% dei pazienti ha avuto la sindrome di perdita capillare e reazioni di ipersensibilità, rispettivamente. Con il 61% del numero di eventi attesi osservato, lo studio ha soddisfatto i criteri per l'arresto precoce a causa di efficacia. La durata mediana del follow-up era di 2,1 anni. L'immunoterapia è stata superiore alla terapia standard in materia di tassi di sopravvivenza libera da eventi ( $66 \pm 5\%$  vs  $46 \pm 5\%$  a 2 anni,  $P = 0,01$ ) e la sopravvivenza globale ( $86 \pm 4\%$  vs  $75 \pm 5\%$  a 2 anni,  $p = 0,02$  senza aggiustamento per analisi ad interim).

**CONCLUSIONI:** immunoterapia con ch14.18, GM-CSF, e l'interleuchina-2 è associato ad un significativo risultato migliore rispetto alla terapia standard nei pazienti con neuroblastoma ad alto rischio.

Czerny B, Teister M, Juzyszyn Z, Teister Ł, Pawlik A, Gazda P, Kaminski A, Chałas A.

**The effect of retinoic acid receptor agonist acitretin on the production of bile and concentrations of some serum components in ovariectomized rats.**

Menopause. 2011 Feb;18(2):213-8.

Department of Pharmacoeconomics and Toxicology, Pomeranian Medical University, Szczecin, Poland. ampp11@poczta.interia.pl

**OBJECTIVE:** Acitretin is an oral retinoid that is approved for the treatment of psoriasis and in the chemoprevention of nonmelanoma skin cancer. The metabolism of acitretin occurs in the liver and may affect other metabolic processes in the liver, such as metabolism of bilirubin, bile acids, and lipids. These processes may be also affected by physiologic loss of estrogens in postmenopausal women. Therefore, the aim of this study was to examine the effect of acitretin on the secretion and composition of bile and the turnover of cholesterol in a model of estrogen deficiency in ovariectomized rats.

**METHODS:** The study was carried out on female Wistar rats divided into three groups: sham-operated control, ovariectomized control, and ovariectomized rats receiving acitretin. The studied group was administered acitretin (Neotigason capsules 25 mg, Roche; 7.1 mg/kg body weight per 24 h) for 28 days. Bile fractions and blood were collected for determinations of concentration of bile acids, total cholesterol, calcium ions, chloride ions, and direct bilirubin. In addition, low-density lipoprotein (LDL) cholesterol and high-density lipoprotein (HDL) cholesterol were assayed.

**RESULTS:** It was found that ovariectomy produced alterations in the process of secretion of bile and its principal components: cholesterol, bile acids, chloride ions, and bilirubin. The administration of acitretin decreased the secretion of bile and bile cholesterol, as well as serum levels of total, LDL, and HDL cholesterol, and moreover increased the proportion of bile acids to total cholesterol.

**CONCLUSIONS:** Acitretin may influence the hepatic metabolism of bile, bile acids, and lipids. This action is associated with a decrease in factors influencing the lithogenicity of bile, with reductions in the serum levels of total, LDL, and HDL cholesterol.

**L'effetto dell'agonista del recettore dell'acido retinoico l'acitretina sulla produzione della bile e sulle concentrazioni di alcuni componenti sieriche in ratti ovariectomizzati**

**OBIETTIVO:** Acitretina è un retinoide orale che è approvato per il trattamento della psoriasi e nella chemioprevenzione del cancro non-melanoma della pelle. Il metabolismo di acitretina avviene nel fegato e può influire su altri processi metabolici nel fegato, quali il metabolismo della bilirubina, acidi biliari, e lipidi. Questi processi possono essere influenzato anche dalla perdita fisiologica di estrogeni nelle donne in postmenopausa. Pertanto, l'obiettivo di questo studio era di esaminare l'effetto di acitretina sulla secrezione della bile e la composizione e il fatturato del colesterolo in un modello di carenza di estrogeni a topi ovariectomizzate. **Metodi:** Lo studio è stato condotto su ratti femmine Wistar divisi in tre gruppi: controllo sham-operati, controllo ovariectomizzate e ratti ovariectomizzati ricevere acitretina. Il gruppo studiato è stato somministrato Acitretina (Neotigason capsule da 25 mg, Roche; 7,1 mg / kg di peso corporeo ogni 24 ore) per 28 giorni. Frazioni Bile e sangue sono stati raccolti per la determinazione della concentrazione di acidi biliari, colesterolo totale, gli ioni di calcio, gli ioni cloruro e bilirubina

diretta. Inoltre, la lipoproteina a bassa densità (LDL) e colesterolo delle lipoproteine ad alta densità (HDL) sono stati analizzati.

**RISULTATI:** Si è constatato che ovariectomia prodotto alterazioni nel processo di secrezione della bile e dei suoi componenti principali: colesterolo, acidi biliari, gli ioni cloruro e bilirubina. La somministrazione di Acitretina diminuzione della secrezione di colesterolo biliare e la bile, così come i livelli sierici del totale, LDL e colesterolo HDL, ed inoltre aumentato la proporzione di acidi biliari di colesterolo totale.

**CONCLUSIONI:** Acitretina possono influenzare il metabolismo epatico della bile, acidi biliari, e lipidi. Questa azione è associata a una diminuzione dei fattori che influenzano la lithogenicity della bile, con riduzioni dei livelli sierici del totale, LDL e colesterolo HDL.

Gudas LJ, Wagner JA.

### **Retinoids regulate stem cell differentiation.**

J Cell Physiol. 2011 Feb;226(2):322-30.

Department of Pharmacology, Weill Cornell Medical College of Cornell University, New York, New York 10065, USA. ljgudas@med.cornell.edu

Retinoids are ubiquitous signaling molecules that influence nearly every cell type, exert profound effects on development, and complement cancer chemotherapeutic regimens. All-trans retinoic acid (RA) and other active retinoids are generated from vitamin A (retinol), but key aspects of the signaling pathways required to produce active retinoids remain unclear. Retinoids generated by one cell type can affect nearby cells, so retinoids also function in intercellular communication. RA induces differentiation primarily by binding to RARs, transcription factors that associate with RXRs and bind RAREs in the nucleus. Binding of RA: (1) initiates changes in interactions of RAR/RXRs with co-repressor and co-activator proteins, activating transcription of primary target genes; (2) alters interactions with proteins that induce epigenetic changes; (3) induces transcription of genes encoding transcription factors and signaling proteins that further modify gene expression (e.g., FOXO3A, Hoxa1, Sox9, TRAIL, UBE2D3); and (4) results in alterations in estrogen receptor  $\alpha$  signaling. Proteins that bind at or near RAREs include Sin3a, N-CoR1, PRAME, Trim24, NRIP1, Ajuba, Zfp423, and MN1/TEL. Interactions among retinoids, RARs/RXRs, and these proteins explain in part the powerful effects of retinoids on stem cell differentiation. Studies of this retinol signaling cascade enhance our ability to understand and regulate stem cell differentiation for therapeutic and scientific purposes. In cancer chemotherapeutic regimens retinoids can promote tumor cell differentiation and/or induce proteins that sensitize tumors to drug combinations. Mechanistic studies of retinoid signaling continue to suggest novel drug targets and will improve therapeutic strategies for cancer and other diseases, such as immune-mediated inflammatory diseases.

### **I retinoidi regolano la differenziazione delle cellule staminali**

I retinoidi sono onnipresenti molecole di segnalazione che influenzano quasi ogni tipo di cellula, esercitano profondi effetti sullo sviluppo, e integrano i regimi chemioterapici contro il cancro. Acido all-trans retinoico (RA) e di altri retinoidi attivi sono generati dalla vitamina A (retinolo), ma gli aspetti chiave delle vie di segnalazione necessaria per produrre retinoidi attivi rimangono poco chiari. I retinoidi generati da un tipo di cellula può interessare le cellule vicine, i retinoidi così anche in funzione di comunicazione intercellulare. RA induce la differenziazione soprattutto legandosi al RAR, fattori di trascrizione che associano RXRs e RAREs impegnare nel nucleo. Il legame di RA: (1) cambiamenti iniziati a interazioni di RAR / RXR con il co-repressore e proteine co-attivatore, attivando la trascrizione di geni target primario, (2) altera le interazioni con le proteine che inducono cambiamenti epigenetici, (3) induce la trascrizione di geni che codificano fattori di trascrizione e proteine di segnale che ulteriormente modificare l'espressione genica (ad esempio, FOXO3A, HOXA1, SOX9, TRAIL, UBE2D3) e (4) si traduce in alterazioni nel recettore degli estrogeni  $\alpha$  segnalazione. Le proteine che legano RAREs o in prossimità comprendono Sin3a, N-COR1, PRAME, Trim24, NRIP1, Ajuba, Zfp423 e MN1/TEL. Interazioni tra i retinoidi, RAR / RXR e queste proteine spiegare in parte i potenti effetti dei retinoidi sulla differenziazione delle cellule staminali. Studi di questa cascata retinolo segnalazione migliorare la nostra capacità di comprendere e regolare la differenziazione delle cellule staminali a fini terapeutici e scientifici. In

retinoidi regimi chemioterapici in grado di promuovere la differenziazione delle cellule tumorali e / o di proteine che inducono a sensibilizzare i tumori combinazioni di farmaci. Gli studi meccanicistici di segnalazione dei retinoidi continuano a suggerire nuovi bersagli farmacologici e migliorare le strategie terapeutiche per il cancro e altre malattie, come le malattie infiammatorie immuno-mediate.

Park Y, Spiegelman D, Hunter DJ, Albanes D, Bergkvist L, Buring JE, Freudenheim JL, Giovannucci E, Goldbohm RA, Harnack L, Kato I, Krogh V, Leitzmann MF, Limburg PJ, Marshall JR, McCullough ML, Miller AB, Rohan TE, Schatzkin A, Shore R, Sieri S, Stampfer MJ, Virtamo J, Weijenberg M, Willett WC, Wolk A, Zhang SM, Smith-Warner SA

### **Intakes of vitamins A, C, and E and use of multiple vitamin supplements and risk of colon cancer: a pooled analysis of prospective cohort studies.**

Cancer Causes Control. 2010 Nov;21(11):1745-57. Epub 2010 Sep 5.

Department of Nutrition, Harvard School of Public Health, 665 Huntington Avenue, Boston, MA 02115, USA.

**OBJECTIVE:** To evaluate the associations between intakes of vitamins A, C, and E and risk of colon cancer.

**METHODS:** Using the primary data from 13 cohort studies, we estimated study- and sex-specific relative risks (RR) with Cox proportional hazards models and subsequently pooled RRs using a random effects model.

**RESULTS:** Among 676,141 men and women, 5,454 colon cancer cases were identified (7-20 years of follow-up across studies). Vitamin A, C, and E intakes from food only were not associated with colon cancer risk. For intakes from food and supplements (total), the pooled multivariate RRs (95% CI) were 0.88 (0.76-1.02, >4,000 vs. ≤ 1,000 µg/day) for vitamin A, 0.81 (0.71-0.92, >600 vs. ≤ 100 mg/day) for vitamin C, and 0.78 (0.66-0.92, > 200 vs. ≤ 6 mg/day) for vitamin E. Adjustment for total folate intake attenuated these associations, but the inverse associations with vitamins C and E remained significant. Multivitamin use was significantly inversely associated with colon cancer risk (RR = 0.88, 95% CI: 0.81-0.96).

**CONCLUSIONS:** Modest inverse associations with vitamin C and E intakes may be due to high correlations with folate intake, which had a similar inverse association with colon cancer. An inverse association with multivitamin use, a major source of folate and other vitamins, deserves further study.

### **Assunzioni di vitamina A, C, ed uso di supplementi vitaminici multipli e rischio di cancro al colon: un'analisi di studi di coorte prospettici**

**OBIETTIVO:** Per valutare l'associazione tra assunzione di vitamine A, C ed E e rischio di tumore del colon.

**METODI:** Usando i dati primari da 13 studi di coorte, abbiamo stimato RR di studio e relativi rischi specifici per sesso (RR) con modelli di rischio proporzionale di Cox e successivamente messe in comune con un modello a effetti casuali.

**RISULTATI:** Tra i 676.141 uomini e donne, 5.454 casi di tumore del colon sono state identificate (7-20 anni di follow-up tra gli studi). Assunzione di vitamine A, C ed E dal cibo solo non sono stati associati a rischio di cancro del colon. Per le assunzioni da alimenti e integratori (totale), il RR

multivariato pool (95% CI) sono stati 0,88 (0,76-1,02,> 4.000 vs  $\leq$  1.000 mg / die) per la vitamina A, 0,81 (0,71-0,92,> 600 vs  $\leq$  100 mg / die) per la vitamina C, e 0,78 (0,66-0,92,> 200 vs  $\leq$  6 mg / die) per la vitamina E. Adeguamento per assunzione di folato totale attenuato queste associazioni, ma le associazioni inverse con le vitamine C ed E sono rimasti significativo. Uso Multivitaminico era significativamente inversamente associato al rischio di cancro del colon (RR = 0,88, 95% CI: 0,81-0,96).

CONCLUSIONI: Modest associazioni inverse con vitamina C ed E possono essere prese a causa di elevate correlazioni con assunzione di folato, che aveva una simile associazione inversa con il cancro del colon. Un'associazione inversa con l'utilizzo multivitaminici, una grande fonte di folato e di altre vitamine, merita ulteriori approfondimenti.

Amann PM, Schadendorf D, Owen RW, Korn B, Eichmüller SB, Bazhin AV.

**Retinal and retinol are potential regulators of gene expression in the keratinocyte cell line HaCaT.**

Exp Dermatol. 2011 Apr;20(4):373-5. doi: 10.1111/j.1600-0625.2010.01127.x. Epub 2010 Aug 31.

Skin Cancer Unit, German Cancer Research Center Heidelberg and Department of Dermatology, University of Heidelberg, University Hospital Mannheim, Mannheim, Germany Department of Dermatology, University Hospital Essen, Essen, Germany Division of Preventive Oncology, German Cancer Research Center, Heidelberg, Germany Genomics and Proteomics Core Facility, German Cancer Research Center, Heidelberg, Germany Surgery Department, University Hospital Heidelberg, Heidelberg, Germany.

Please cite this paper as: Retinal and retinol are potential regulators of gene expression in the keratinocyte cell line HaCaT. *Experimental Dermatology* Vitamin A is a pivotal regulator of differentiation and growth 2010. Abstract: of developing and adult skin. Retinoic acid is the major physiologically active form of vitamin A regulating the expression of different genes through retinoic acid nuclear receptors. Here, we present evidence that other vitamin A derivatives - retinol and retinal - are also capable of functioning as regulators of gene expression in the keratinocyte cell line HaCaT. We have shown that all-trans retinol (ATRoI) and all-trans retinal (ATRaI) are capable of modulating gene expression in keratinocytes, which is not because of vitamin A metabolism in the cells, and retinol and retinal modulate gene expression through nuclear receptors: retinoic acid receptors (RARs) and retinoid X receptors (RXRs). Based on the data, we propose that ATRoI and all-trans retinal, in addition to all-trans retinoic acid, can function as important regulators of gene expression manifesting their effect through the nuclear receptors RARs and RXRs

**Il retinale e il retinolo sono potenziali regolatori dell'espressione genica nella linea cellulare dei cheratinociti HaCaT**

Si prega di citare questo documento come: retiniche e retinolo sono regolatori possibilità di espressione genica nel HaCaT cheratinociti linea cellulare. *Experimental Dermatology* La vitamina A è un regolatore fondamentale di differenziazione e di crescita 2010. Abstract: di pelle per adulti e in via di sviluppo. L'acido retinoico è la principale forma fisiologicamente attiva della vitamina A che regolano l'espressione di diversi geni attraverso i recettori dell'acido retinoico nucleare. Qui, vi presentiamo la prova che la vitamina A gli altri derivati - retinolo e della retina - sono anche in grado di funzionare come regolatori dell'espressione genica nel HaCaT cheratinociti linea cellulare. Abbiamo dimostrato che retinolo tutto trans (ATRoI) e all-trans retinico (ATRaI) sono in grado di modulare l'espressione genica nei cheratinociti, che non è a causa del metabolismo della vitamina A nelle cellule, e retinolo e della retina modulare l'espressione genica attraverso i recettori nucleari : recettori dell'acido retinoico (RAR) e recettori dei retinoidi X (RXR). Sulla base dei dati, proponiamo che ATRoI e tutto-trans retinico, oltre a acido all-trans retinoico, in grado di funzionare come regolatori dell'espressione genica importante manifestare il loro effetto attraverso i recettori nucleari RARs e RXRs

Koay DC, Zerillo C, Narayan M, Harris LN, DiGiovanna MP.

**Anti-tumor effects of retinoids combined with trastuzumab or tamoxifen in breast cancer cells: induction of apoptosis by retinoid/trastuzumab combinations.**

Breast Cancer Res. 2010;12(4):R62. Epub 2010 Aug 9.

Department of Internal Medicine (Section of Medical Oncology), Yale Cancer Center and Smilow Cancer Hospital at Yale-New-Haven Hospital, Yale University School of Medicine, 333 Cedar Street, New Haven, CT 06510, USA.

**INTRODUCTION:** HER2 and estrogen receptor (ER) are important in breast cancer and are therapeutic targets of trastuzumab (Herceptin) and tamoxifen, respectively. Retinoids inhibit breast cancer growth, and modulate signaling by HER2 and ER. We hypothesized that treatment with retinoids and simultaneous targeting of HER2 and/or ER may have enhanced anti-tumor effects.

**METHODS:** The effects of retinoids combined with trastuzumab or tamoxifen were examined in two human breast cancer cell lines in culture, BT474 and SKBR3. Assays of proliferation, apoptosis, differentiation, cell cycle distribution, and receptor signaling were performed.

**RESULTS:** In HER2-overexpressing/ER-positive BT474 cells, combining all-trans retinoic acid (atRA) with tamoxifen or trastuzumab synergistically inhibited cell growth, and altered cell differentiation and cell cycle. Only atRA/trastuzumab-containing combinations induced apoptosis. BT474 and HER2-overexpressing/ER-negative SKBR3 cells were treated with a panel of retinoids (atRA, 9-cis-retinoic acid, 13-cis-retinoic acid, or N-(4-hydroxyphenyl) retinamide (fenretinide) (4-HPR)) combined with trastuzumab. In BT474 cells, none of the single agents except 4-HPR induced apoptosis, but again combinations of each retinoid with trastuzumab did induce apoptosis. In contrast, the single retinoid agents did cause apoptosis in SKBR3 cells; this was only modestly enhanced by addition of trastuzumab. The retinoid drug combinations altered signaling by HER2 and ER. Retinoids were inactive in trastuzumab-resistant BT474 cells.

**CONCLUSIONS:** Combining retinoids with trastuzumab maximally inhibits cell growth and induces apoptosis in trastuzumab-sensitive cells. Treatment with such combinations may have benefit for breast cancer patients.

**Effetti antitumorali dei retinoidi combinati con trastuzumab o tamoxifene nelle cellule mammarie cancerose: induzione dell'apoptosi tramite la combinazione retinoidi/trastuzumab**

**INTRODUZIONE:** HER2 e recettore per gli estrogeni (ER) sono importanti nel cancro della mammella e sono bersagli terapeutici di trastuzumab (Herceptin) e Tamoxifene, rispettivamente. I retinoidi inibiscono la crescita del cancro al seno, e modulare di segnalazione da parte HER2 e ER. Abbiamo ipotizzato che il trattamento con retinoidi e simultanea di targeting di HER2 e / o di ER potrebbe avere effetti più anti-tumorale.

**METODI:** Gli effetti dei retinoidi in combinazione con trastuzumab o tamoxifen sono stati esaminati in due linee di cellule umane di cancro al seno nella cultura, BT474 e SKBR3. I saggi di proliferazione, apoptosi, differenziazione, ciclo di distribuzione delle cellule, e recettori di segnalazione sono stati effettuati.

**RISULTATI:** In HER2-overexpressing/ER-positive cellule BT474, combinando acido all-trans retinoico (ATRA) con tamoxifene o trastuzumab sinergica inibito la crescita cellulare e la

differenziazione delle cellule alterate e ciclo cellulare. Combinazioni / trastuzumab-contenente solo atRA indotto apoptosi. BT474 e HER2-overexpressing/ER-negative SKBR3 cellule sono state trattate con un gruppo di retinoidi (ATRA, acido 9-cis-retinoico, acido 13-cis-retinoico, o N-(4-idrossifenil) retinamide (fenretinide) (4 - HPR)) in combinazione con trastuzumab. Nelle cellule BT474, nessuno dei singoli agenti, tranne l'apoptosi indotta da 4-HPR, ma ancora una volta le combinazioni di ogni retinoidi con trastuzumab ha indotto apoptosi. Al contrario, i singoli agenti retinoidi ha fatto causa apoptosi in cellule SKBR3, che è stata solo lievemente migliorata con l'aggiunta di trastuzumab. Le combinazioni di farmaci retinoidi alterato segnalazione da HER2 e ER. I retinoidi sono stati inattivi nelle cellule BT474 trastuzumab-resistente. CONCLUSIONI: La combinazione con trastuzumab retinoidi inibisce al massimo la crescita cellulare e induce apoptosi nelle cellule di trastuzumab-sensibili. Il trattamento con tali associazioni possono avere benefici per i pazienti affetti da cancro al seno.

Beilby J, Ambrosini GL, Rossi E, de Klerk NH, Musk AW.

**Serum levels of folate, lycopene,  $\beta$ -carotene, retinol and vitamin E and prostate cancer risk.**

Eur J Clin Nutr. 2010 Oct;64(10):1235-8. Epub 2010 Aug 4.

Biochemistry Section, PathWest, Queen Elizabeth II Medical Centre, Nedlands, WA, Australia.

Previous studies relating increased serum levels of folate and fat-soluble vitamins to prostate cancer risk have variously shown null associations or to either decrease or increase the risk of developing prostate cancer. Prospective studies of serum folate levels have been reported to show a null association and increased serum levels to either decrease or increase the risk of subsequently developing prostate cancer. Similarly, serum  $\beta$ -carotene and lycopene levels have either been reported to be inversely correlated or not associated with prostate cancer risk. Using a prospective nested case-control study design, which minimized the possibility of disease effects on serum-vitamin concentrations, we report null associations for serum concentrations of folate, lycopene,  $\beta$ -carotene, vitamin A and vitamin E, and subsequent development of prostate cancer

**Livelli sierici di folato, licopene,  $\beta$ -carotene, retinolo e vitamina E e rischio di cancro alla prostata**

Gli studi precedenti in materia aumento dei livelli sierici di folati e di vitamine liposolubili al rischio di cancro alla prostata hanno variamente dimostrato associazioni nulle o per diminuire o aumentare sia il rischio di sviluppare cancro alla prostata. Studi prospettici dei livelli di folati sierici sono stati riportati a mostrare una associazione nulla e livelli sierici aumentati per diminuire o aumentare sia il rischio di sviluppare successivamente il cancro alla prostata. Allo stesso modo, i livelli sierici di  $\beta$ -carotene e licopene sono stati segnalati per essere inversamente correlati o non associati a rischio di cancro alla prostata. Utilizzando una prospettiva nidificato studio caso-controllo della progettazione, che ha minimizzato la possibilità di effetti malattia sulla concentrazione sierica di vitamina A, si segnalano associazioni nulle per le concentrazioni sieriche di acido folico, il licopene,  $\beta$ -carotene, vitamina A e vitamina E, e il successivo sviluppo della prostata cancro

Hyter S, Bajaj G, Liang X, Barbacid M, Ganguli-Indra G, Indra AK.

**Loss of nuclear receptor RXR $\alpha$  in epidermal keratinocytes promotes the formation of Cdk4-activated invasive melanomas.**

Pigment Cell Melanoma Res. 2010 Oct;23(5):635-48. Epub 2010 Jul 9.

Department of Pharmaceutical Sciences, College of Pharmacy, Oregon State University, Corvallis, OR, USA.

Keratinocytes contribute to melanocyte transformation by affecting their microenvironment, in part through the secretion of paracrine factors. Here we report a loss of expression of nuclear receptor RXR $\alpha$  in epidermal keratinocytes during human melanoma progression. In the absence of keratinocytic RXR $\alpha$ , in combination with mutant Cdk4, cutaneous melanoma was generated that metastasized to lymph nodes in a bigenic mouse model. Expression of several keratinocyte-derived mitogenic growth factors (Et-1, Hgf, Scf,  $\alpha$ -MSH and Fgf2) was elevated in skin of bigenic mice, whereas Fas, E-cadherin and Pten, implicated in apoptosis, cellular invasion and melanomagenesis, respectively, were downregulated within the microdissected melanocytic tumors. We demonstrated that RXR $\alpha$  is recruited on the proximal promoter of both Et-1 and Hgf, possibly directly regulating their transcription in keratinocytes. These studies demonstrate the contribution of keratinocytic paracrine signaling during the cellular transformation and malignant conversion of melanocytes.

**La perdita del recettore nucleare RXR $\alpha$  nei cheratinociti dell'epidermide promuove la formazione dei melanomi invasivi attivati da Cdk4**

Cheratinociti contribuire alla trasformazione di melanociti che lede il loro microambiente, in parte attraverso la secrezione di fattori paracrini. Qui segnaliamo una perdita di espressione del recettore nucleare RXR $\alpha$  nei cheratinociti epidermici durante la progressione del melanoma umano. In assenza di RXR $\alpha$  keratinocytic, in combinazione con Cdk4 mutante, melanoma cutaneo, che è stato generato metastasi ai linfonodi in un modello murino bigenic. Espressione di diversi fattori di crescita dei cheratinociti derivati da mitogeni (ET-1, HGF, Scf,  $\alpha$ -MSH e FGF 2) è stato elevato in pelle dei topi bigenic, mentre Fas, E-caderina e PTEN, implicato in apoptosi, l'invasione cellulare e melanomagenesis, rispettivamente, sono stati inibiti ai tumori microdissected melanocitici. Abbiamo dimostrato che RXR $\alpha$  è reclutato sul promotore prossimale di entrambi ET-1 e HGF, forse direttamente disciplinano la loro trascrizione nei cheratinociti. Questi studi dimostrano il contributo di segnalazione paracrina keratinocytic durante la trasformazione cellulare maligna e la conversione dei melanociti.

Dutta A, Sen T, Chatterjee A.

**All-trans retinoic acid (ATRA) downregulates MMP-9 by modulating its regulatory molecules.**

Cell Adh Migr. 2010 Jul-Sep;4(3):409-18.

Department of Receptor Biology & Tumor Metastasis, Chittaranjan National Cancer Institute, Kolkata, India.

The vitamin A derivative all-trans retinoic acid (ATRA) is considered as a potent chemotherapeutic drug for its capability of regulating cell growth and differentiation. We aimed to study the effect of ATRA on MMP-9 in MDA-MB-231, human breast cancer cells and the probable molecular mechanisms through which ATRA exerts its effect. Results: Our experimental findings demonstrate that ATRA enters into the nucleus and regulates various signaling pathways viz. Integrin, FAK, ERK, PI-3K, NF- $\kappa$ B and also EGFR and down regulates pro-MMP-9 activity as well as its expression. As a result MDA-MB-231 cell migration on fibronectin medium gets retarded in presence of ATRA. ATRA up regulates TIMP-1 expression. Our study may help to understand the role of ATRA as a regulator of MMP-9 and the possible signaling pathways which are involved in this ATRA mediated down regulation of MMP-9.

**L'acido retinoico tutto-trans (ATRA) regola negativamente MMP-9 tramite la modulazione delle sue molecole regolatorie**

Il derivato della vitamina A acido all-trans retinoico (ATRA) è considerato come un potente farmaco chemioterapico per la sua capacità di regolazione della crescita cellulare e la differenziazione. Abbiamo voluto studiare l'effetto di ATRA su MMP-9 in MDA-MB-231, cellule tumorali umane del seno e le probabili meccanismi molecolari attraverso i quali ATRA esercita il suo effetto. Risultati: I nostri risultati sperimentali dimostrano che l'ATRA entra nel nucleo e regola vari cioè vie di segnalazione. Integrina, FAK, ERK, PI-3K, NF- $\kappa$ B e anche EGFR e giù regola pro-MMP-9 attività così come la sua espressione. Come risultato MDA-MB-231 la migrazione delle cellule in terreno fibronectina viene ritardata in presenza di ATRA. ATRA regola su TIMP-1 espressione. Il nostro studio possono aiutare a comprendere il ruolo di ATRA come regolatore di MMP-9 e le possibili vie di segnalazione che sono coinvolti in questo regolamento ATRA mediata giù di MMP-9.

Karabulut B, Karaca B, Atmaca H, Kisim A, Uzunoglu S, Sezgin C, Uslu R

**Regulation of apoptosis-related molecules by synergistic combination of all-trans retinoic acid and zoledronic acid in hormone-refractory prostate cancer cell lines.**

Mol Biol Rep. 2011 Jan;38(1):249-59. Epub 2010 Mar 28.

Division of Medical Oncology, Tulay Aktas Oncology Hospital, School of Medicine, Ege University, Bornova, Izmir, Turkey.

We report that all-trans retinoic acid (ATRA) in combination with zoledronic acid has strong synergistic cytotoxic and apoptotic effects against human hormone- and drug-refractory prostate cancer cells, PC-3 and DU-145, in a time- and dose-dependent manner. We further investigated the effect of the combination treatment on the apoptotic process by both oligoarray and protein array analysis in DU-145 cells, in which the drug combination shows much more strong synergistic effects, as compared to PC-3 cells. Moreover, we have also performed real time-PCR array analysis to validate oligoarray results. We demonstrated that the combination of ATRA and zoledronic acid is a strong inducer of apoptotic related cell death in human androgen- and drug refractory prostate cancer cells DU-145, at either transcriptional or translational levels. While expression of proapoptotic genes such as tumor necrosis factor receptor superfamily (TNFRSF), Bad, Bax, Fas, FADD are induced with the exposure of the combination, expression of antiapoptotic genes or proteins such as members of inhibitor apoptosis family (IAPs), MCL-1, LTBR, p53 and bcl-2 are reduced. Because this novel combination treatment has fewer side effects than is generally the case with conventional cytotoxic agents, this regimen may be a good option for treatment of elderly prostate cancer patient

**Regolazione delle molecole legate all'apoptosi tramite la combinazione sinergica dell'acido tutto-trans retinoico e dell'acido zoledronico nelle linee cellulari cancerose prostatiche refrattarie all'ormone**

Segnaliamo che l'acido all-trans retinoico (ATRA) in combinazione con l'acido zoledronico ha forti effetti sinergici citotossici e apoptosi nei confronti dei ormoni e le cellule della prostata refrattario al cancro della droga, PC-3 e DU-145, in un tempo-e dose-maniera dipendente. Abbiamo inoltre studiato l'effetto del trattamento combinato sul processo apoptotico da entrambe le oligoarray e array analisi delle proteine in cellule DU-145, in cui la combinazione di farmaci mostra molto più forti effetti sinergici, rispetto alla PC-3 celle. Inoltre, abbiamo anche eseguito reale analisi array time-PCR per convalidare i risultati oligoarray. Abbiamo dimostrato che la combinazione di ATRA e acido zoledronico è un forte induttore di apoptosi morte cellulare collegato in umano androgeno-e le cellule del cancro della prostata refrattario droga DU-145, sia a livello trascrizionale e traslazionale. Mentre l'espressione dei geni proapoptotici come superfamiglia fattore di necrosi tumorale (TNFRSF), Bad, Bax, Fas, FADD sono indotte con l'esposizione della combinazione, espressione di geni o proteine antiapoptotici come i membri della famiglia di inibitori dell'apoptosi (IAP), MCL -1, LTBR, p53 e Bcl-2 sono ridotti. Perché questo trattamento di combinazione romanzo ha meno effetti collaterali rispetto è generalmente il caso con i convenzionali farmaci citotossici, questo regime può essere una buona opzione per il trattamento del paziente anziano cancro alla prostata

## SOMATOSTATINA

2: Gong W, Qin YY, Li SG, Quan ZW, Li JY, Zhuang PY, Wan ZW.

**[Somatostatin enhanced anti-tumor effect of doxorubicin on gallbladder cancer cells through the regulation of intracellular drug concentration].**

Zhonghua Yi Xue Za Zhi. 2010 Oct 19;90(38):2718-22. Chinese. PubMed PMID: 21162905.

**OBJECTIVE:** To investigate the possible mechanisms by which Somatostatin (SST) enhances the anti-tumor effect of doxorubicin (DOX) on gallbladder cancer cells.

**METHODS:** GBC-SD cells were grouped into 4 groups: SST-treated group, DOX-treated group, SST+DOX co-treated group and control group. The concentrations of SST and DOX were 75 µg/ml and 5 µg/ml based on our previous studies. In control group, cells were cultivated with phosphate buffered saline (PBS). In experimental groups, cells were cultivated with medium and the corresponding drugs. After drug treatment, cell viability was examined by MTT assay at 6, 12, 24 and 36 h respectively. Meanwhile, intracellular concentrations of doxorubicin in each group was determined by microspectrofluorimetry; Real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to determine the expressions of MDR1 mRNA in the cells at different time points and the expressions of P-gp protein, a product of MDR1 mRNA, were determined by Western blot analysis.

**RESULTS:** SST did not exhibit significant inhibitory effect on the proliferation of GBC-SD cells as compared to that of control group ( $P>0.05$ ). SST+DOX co-treatment group and DOX showed significantly inhibitory effect on the growth of GBC-SD cells at Hour 12 post-treatment. However no statistical difference was found between SST+DOX and DOX groups. Interestingly, at Hour 24 post-treatment, SST+DOX group showed more robust inhibitory effect on GBC-SD cells as compared to DOX alone group. Moreover, SST could significantly down-regulate the expressions of MDR1 mRNA and P-gp protein. SST could increase intracellular DOX concentration. And the difference of intracellular DOX concentration between SST+DOX group and DOX group at Hour 24 was statistically significant.

**CONCLUSIONS:** In our experiment, SST decreases the expression of MDR1 mRNA and P-gp protein so as to reduce the efflux of DOX and elevate DOX concentrations in GBC-SD cells. This eventually leads to enhanced cytotoxic effects of DOX on GBC-SD cells.

**[Maggiore effetto antitumorale della somatostatina e doxorubicina su cellule del cancro della colecisti attraverso la regolazione della concentrazione intracellulare di farmaco].**

**OBIETTIVO:** Per studiare i possibili meccanismi con cui somatostatina (SST) aumenta l'effetto antitumorale della doxorubicina (DOX) sulle cellule di cancro della colecisti. **METODI:** cellule GBC-SD sono stati raggruppati in 4 gruppi: gruppo SST-trattati, il gruppo trattato con DOX, il gruppo di SST + DOX co-gruppo trattato e gruppo controllo. Le concentrazioni di SST e DOX erano 75 mg / ml e 5 mg / ml sulla base di nostri studi precedenti. Nel gruppo di controllo, le cellule sono state coltivate con tampone fosfato (PBS). Nei gruppi sperimentali, le cellule sono state coltivate con media e le droghe corrispondente. Dopo il trattamento di droga, la vitalità cellulare è stata esaminata dalla analisi di MTT a 6, 12, 24 e 36 ore rispettivamente. Nel frattempo, le concentrazioni intracellulari di doxorubicina in ogni gruppo è stato determinato da microspectrofluorimetry; Real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) è stato utilizzato per

determinare l'espressione di MDR1 mRNA nelle cellule a tempi diversi e le espressioni della proteina P-gp, un prodotto di mRNA MDR1, sono state determinate mediante analisi Western blot. RISULTATI: SST non ha evidenziato significativi effetti inibitori sulla proliferazione delle cellule GBC-SD rispetto a quello del gruppo controllo ( $p > 0,05$ ). SST + DOX gruppo di co-trattamento e DOX hanno mostrato un effetto inibitorio significativo sulla crescita delle cellule GBC-SD a 12 ore post-trattamento. Tuttavia nessuna differenza statistica è stata trovata tra SST + DOX DOX e dei gruppi. È interessante notare che, a 24 ore post-trattamento, il gruppo di SST + DOX dimostrato più robusto effetto inibitorio sulle cellule GBC-SD rispetto al gruppo DOX solo. Inoltre, SST potrebbe significativamente down-regolare l'espressione di MDR1 mRNA e della proteina P-gp. SST potrebbe aumentare la concentrazione intracellulare DOX. E la differenza di concentrazione intracellulare tra DOX gruppo SST + DOX DOX e di gruppo a 24 ore è risultata statisticamente significativa.

CONCLUSIONI: Nel nostro esperimento, SST diminuisce l'espressione di MDR1 mRNA e della proteina P-gp in modo da ridurre l'efflusso di DOX DOX ed elevare le concentrazioni nelle cellule GBC-SD. Questo conduce infine a una maggiore effetti citotossici di DOX sulle cellule GBC-SD.

3: Mazzucchelli R, Morichetti D, Scarpelli M, Bono AV, Lopez-Beltran A, Cheng L, Kirkali Z, Montironi R.

### **Somatostatin receptor subtypes in hormone-refractory (castration-resistant) prostatic carcinoma.**

Asian J Androl. 2010 Dec 13. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 21151154.

The aim of this study was to examine the tissue expression and localisation of the somatostatin receptors (SSTRs) in hormone-refractory (HR) prostate cancer (PCa). Five SSTRs were evaluated immunohistochemically in 20 radical prostatectomies (RPs) with Gleason score (GS) 3+3=6 PCa, in 20 RPs with GS 4+4=8 and 4+5=9 PCa, and 20 transurethral resection of the prostate specimens with HR PCa. The mean values in the cytoplasm (all five SSTRs were expressed), membrane (only SSTR3 and SSTR4 were expressed) and nuclei (only SSTR4 and SSTR5 were expressed) of the glands in HR PCa were 20-70% lower than in the other two groups, the differences being statistically significant. All five SSTRs were expressed in the smooth muscle and endothelial cells of HR PCa, the mean values being lower than in the other two groups. In conclusion, this study expands our knowledge on the expression and localisation of five SSTRs in the various tissue components in the HR PCa compared with hormone-sensitive PCa.

### **Sottotipi del recettore della somatostatina in carcinoma della prostata ormone-refrattario (castrazione-resistente).**

Lo scopo di questo studio era di esaminare l'espressione del tessuto e la localizzazione dei recettori per la somatostatina (SSTRs) in refrattario agli ormoni (HR), cancro della prostata (PCA). Cinque SSTRs sono stati valutati in 20 immunohistochemically prostatectomie radicali (RPS), con punteggio di Gleason (GS) 3 +3 = 6 APC, in 20 con RP GS 4 +4 = 8 e 4 +5 = 9 PCA, e 20 resezione transuretrale della prostata campioni con HR PCa. I valori medi nel citoplasma (tutti e cinque sono state espresse SSTRs), membrana (solo SSTR3 e SSTR4 sono stati espressi), e nuclei (solo SSTR4 e SSTR5 erano espresse) delle ghiandole in HR PCa erano 20-70% inferiori a quelli degli altri due i gruppi, le differenze sono statisticamente significative. Tutti e cinque SSTRs sono stati espressi nel muscolo liscio e cellule endoteliali di HR PCA, i valori medi sono più bassi rispetto agli altri due gruppi. In conclusione, questo studio si espande la nostra conoscenza sulla espressione e la localizzazione di cinque SSTRs nelle varie componenti del tessuto nel PCA HR rispetto ormone-sensibile PCa.

4: Zhang H, Moroz MA, Serganova I, Ku T, Huang R, Vider J, Maecke HR, Larson SM, Blasberg R, Smith-Jones PM.

### **Imaging expression of the human somatostatin receptor subtype-2 reporter gene with 68Ga-DOTATOC.**

J Nucl Med. 2010 Dec 13.

The human somatostatin receptor subtype 2 (hSSTR2)-68Ga-DOTATOC reporter system has several attractive features for potential translation to human studies. These include a low expression of hSSTR2 in most organs, a rapid internalized accumulation of 68Ga-DOTATOC in the SSTR2-expressing cells, and a rapid excretion of unbound radioligand by the renal system. We performed a series of in vitro and in vivo validation studies of this reporter system.

**METHODS:** A retroviral vector containing a dual reporter, pQCXhSSTR2-IRES-GFP (IRES: internal ribosome entry site; GFP: green fluorescent protein), was constructed and transduced into Jurkat, C6, and U87 cells. Stably transduced reporter cells were characterized in vitro using optical and radiometric methods. Multiple tumor-bearing mice were evaluated with 68Ga-DOTATOC PET studies.

**RESULTS:** The dual-reporter genes were incorporated into all tumor cell lines, and their expression levels were confirmed by fluorescence-activated cell sorting (FACS), GFP visualization, and reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis for hSSTR2. In vitro, hSSTR2 cell membrane expression was 36,000, 280,000, and 1,250,000 copies per cell for the SSTR2-transfected Jurkat, U87, and C6 cell lines. Small-animal PET of 68Ga-DOTATOC in tumor-bearing mice demonstrated that the in vivo uptake of this radioligand was directly proportional to the in vitro expression of hSSTR2. The in vivo uptake of 68Ga-DOTATOC, at 2 h after injection, was low in all organs except the kidneys (7.8 percentage of injected dose per gram [%ID/g]) and as high as 15.2 %ID/g in transduced C6 tumors. The corresponding transduced-to-nontransduced tumor uptake ratio was 64, and the tumor-to-muscle uptake ratio was around 500.

**CONCLUSION:** 68Ga-DOTATOC is an excellent specific ligand for this hSSTR2 reporter system and for hSSTR2 reporter gene PET. Because DOTATOC has undergone extensive clinical testing, this human reporter system has the potential for translation to human studies.

### **Immagine del processo di espressione del gene del recettore umano per la somatostatina (sottotipo-2) con 68Ga-DOTATOC.**

L'uomo sottotipo di recettore della somatostatina 2 (hSSTR2)-68Ga sistema reporter DOTATOC ha diverse caratteristiche interessanti per la traduzione potenziale di studi sull'uomo. Questi includono una bassa espressione di hSSTR2 nella maggior parte degli organi, un rapido accumulo di interiorizzato 68Ga-DOTATOC SSTR2 nelle cellule che esprimono, e una rapida escrezione di radioligandi non legato da parte del sistema renale. Abbiamo eseguito una serie di in vitro e in studi di validazione in vivo di questo sistema di reporter.

**METODI:** un vettore retrovirale contenente un reporter doppio, pQCXhSSTR2-IRES-GFP (IRES: interno del sito entrata ribosoma; GFP: una proteina fluorescente verde), è stato costruito e trasdotte in Jurkat, C6, U87 e cellule. Cellule reporter Pratico trasdotte sono stati caratterizzati in vitro con metodi ottici e radiometriche. Multiple topi portatori di tumore sono stati valutati con 68Ga-DOTATOC studi PET.

**RISULTATI:** I geni dual-reporter sono stati incorporati in linee cellulari di tutti i tumori, e le loro livelli di espressione sono state confermate dalla separazione delle cellule fluorescenza-attivato (FACS), la visualizzazione GFP, e reverse-transcriptase di reazione a catena della polimerasi (RT-

PCR), analisi per hSSTR2. In vitro, hSSTR2 espressione membrana cellulare è stato 36.000, 280.000 e 1.250.000 di copie per cellula per la SSTR2 transfettate Jurkat, U87, e C6 linee cellulari. PET di piccoli animali di <sup>68</sup>Ga-DOTATOC nei topi portatori di tumore dimostrato che l'assorbimento in vivo di questo radioligante era direttamente proporzionale alla espressione in vitro di hSSTR2. L'assorbimento in vivo di <sup>68</sup>Ga-DOTATOC, a 2 ore dopo l'iniezione, è stata bassa in tutti gli organi ad esclusione dei reni (7,8 percentuale della dose iniettata per [ID% / g] grammo) e alto come il 15,2% ID / g in transduced C6 tumori. La corrispondente trasdotte-to-nontransduced rapporto di captazione del tumore era 64, e la captazione del tumore-to-muscolo rapporto era di circa 500. CONCLUSIONE: <sup>68</sup>Ga-DOTATOC è un ottimo legante specifico per questo sistema hSSTR2 reporter e per hSSTR2 PET reporter gene. Perché DOTATOC è stato sottoposto a numerosi test clinici, questo sistema reporter umano ha il potenziale per la traduzione in studi sull'uomo.

5: Xing Z, Zhou Z, Yu R, Li S, Li C, Nilsson S, Liu Z.

### **XAF1 expression and regulatory effects of somatostatin on XAF1 in prostate cancer cells.**

J Exp Clin Cancer Res. 2010 Dec 11;29(1):162.

**BACKGROUND:** Somatostatin prevents cell proliferation by inducing apoptosis. Downregulation of the XAF1 transcript may occur during the development of prostate cancer. It is interesting to evaluate the potential regulatory effects of somatostatin on XAF1 expression during the development of prostate cancer cells.

**METHODS:** XAF1 mRNA and protein expression in human prostate epithelial cells RWPE-1, androgen dependent prostate cancer LNCaP, and androgen independent DU145 and PC3 cells were evaluated using RT-PCR and Western blot. The regulation of XAF1 mRNA and protein expression by somatostatin and its analogue Octreotide was evaluated.

**RESULTS:** Substantial levels of XAF1 mRNA and proteins were detected in RWPE-1 cells, whereas prostate cancer cells LNCaP, DU145 and PC3 exhibited lower XAF1 expression. Somatostatin and Octreotide up-regulated XAF1 mRNA and protein expression in all prostate cancer cell lines.

**CONCLUSIONS:** XAF1 down-regulation may contribute to the prostate cancer development. The enhanced XAF1 expression by somatostatin indicates a promising strategy for prostate cancer therapy.

### **Espressione ed effetti della regolamentazione della somatostatina sul XAF1 nelle cellule di cancro alla prostata.**

**BACKGROUND:** somatostatina impedisce la proliferazione cellulare per apoptosi inducendo. Down-regulation della trascrizione XAF1 possono verificarsi durante lo sviluppo del cancro alla prostata. E' interessante valutare i potenziali effetti di regolamentazione della somatostatina sulla XAF1 espressione durante lo sviluppo di cellule tumorali della prostata. **METODI:** XAF1 mRNA e l'espressione della proteina nelle cellule epiteliali della prostata umana RWPE-1, il tumore della prostata androgeno-dipendente LNCaP, e DU145 androgeno-indipendente e cellule PC3 sono state valutate mediante RT-PCR e Western Blot. Il regolamento di mRNA XAF1 e di espressione della proteina dalla somatostatina e dei suoi octreotide, analogo è stato valutato.

**RISULTATI:** sostanziali livelli di mRNA XAF1 e proteine sono stati individuati in RWPE-1 celle, mentre le cellule di cancro alla prostata LNCaP, PC3 e DU145 esposto inferiore espressione XAF1. Espressione Somatostatina e octreotide mRNA up-regolati XAF1 e proteine in tutte le linee di cellule di cancro alla prostata.

**CONCLUSIONI:** XAF1 down-regulation possono contribuire allo sviluppo del cancro alla prostata. La maggiore espressione XAF1 dalla somatostatina indica una strategia promettente per la terapia del cancro alla prostata.

6: Mao ZG, He DS, Zhou J, Yao B, Xiao WW, Chen CH, Zhu YH, Wang HJ.

### **Differential expression of microRNAs in GH-secreting pituitary adenomas.**

Diagn Pathol. 2010Dec 7;5(1):79.

**BACKGROUND:** The purpose of this study was to (1) identify specific miRNAs in growth hormones (GH)-secreting pituitary adenomas; (2) determine the relationship between the expression of these miRNAs and tumor size, somatostatin analogs treatment, and responsiveness to somatostatin analogs (SSA).

**METHODS:** Fifteen GH-secreting adenomas patients were treated with lanreotide for 4 months before surgery. Patients with 50% reduction of GH secretion by lanreotide were considered as SSA responders, while patients with less than 50% of GH reduction were considered as SSA nonresponders. We analyzed the miRNAs in 21 GH-secreting pituitary adenomas and 6 normal pituitaries by miRCURY™ LNA array and some differentially expressed miRNAs were validated by quantitative real-time PCR.

**RESULTS:** Fifty-two mRNAs were differentially expressed between GH-secreting pituitary adenomas and normal pituitaries. Differential expression of 9 miRNAs was observed between micro- and macro-adenomas. Thirteen miRNAs were differentially expressed between tumor samples from lanreotide-treated patients and those from lanreotide-untreated patients. Seven miRNAs were differentially expressed between SSA responders or GH nonresponders. Several identified miRNAs may be involved in cell proliferation, apoptosis, cancer development and progression.

**CONCLUSIONS:** Our results indicate that altered miRNAs expression is involved in GH-secreting pituitary adenomas transformation, which will shed light on the mechanisms for the treatment of acromegaly by SSA. Identification and characterization of the targets of altered miRNAs genes may elucidate molecular mechanisms involved in the pathogenesis of pituitary adenoma.

### **Espressione differenziale dei microRNA negli adenomi pituitari GH-secerenti.**

**BACKGROUND:** Lo scopo di questo studio era di identificare (1) miRNA specifici ormoni della crescita (GH)-adenomi pituitari secerenti, (2) determinare il rapporto tra l'espressione di queste miRNA e la dimensione del tumore, la somatostatina trattamento analoghi, e la risposta alla somatostatina analoghi (SSA).

**METODI:** Quindici adenomi GH-secerenti pazienti sono stati trattati con lanreotide per 4 mesi prima dell'intervento chirurgico. I pazienti con il 50% di riduzione della secrezione di GH da lanreotide sono stati considerati responders SSA, mentre i pazienti con meno del 50% di riduzione del GH sono stati considerati come non-responder SSA. Abbiamo analizzato il miRNA in 21 adenomi pituitari con secrezione di GH e 6 ipofisi normale array miRCURY™ LNA e alcuni miRNA differenzialmente espressi sono stati convalidati da PCR quantitativa in tempo reale.

**RISULTATI:** Cinquantadue mRNA sono stati espressi in modo differenziale tra adenomi pituitari con secrezione di GH e ipofisi normale. Espressione differenziale di 9 miRNA è stata osservata tra micro-e macro-adenomi. MiRNAs Tredici sono stati espressi in modo differenziale tra i campioni tumorali di pazienti trattati con lanreotide e quelli di pazienti non trattati-lanreotide. Sette miRNA sono stati espressi in modo differenziale tra i responder o non responder SSA GH. Molti miRNA identificati possono essere coinvolte nella proliferazione cellulare, apoptosi, lo sviluppo e la progressione del cancro.

**CONCLUSIONI:** I nostri risultati indicano che l'alterata espressione di microRNA è coinvolto nella secrezione di GH ipofisario trasformazione adenomi, che farà luce sui meccanismi per il trattamento dell'acromegalia da SSA. Identificazione e caratterizzazione degli obiettivi di geni alterati miRNA possono chiarire i meccanismi molecolari coinvolti nella patogenesi di adenoma pituitario.

11: Godlewski J, Kaleczyc J.

**Somatostatin, substance P and calcitonin gene-related peptide-positive intramural nerve structures of the human large intestine affected by carcinoma.**

Folia Histochem Cytobiol. 2010 Sep30;48(3):475-83.

The aim of this study was to investigate the arrangement and chemical coding of enteric nerve structures in the human large intestine affected by cancer. Tissue samples comprising all layers of the intestinal wall were collected during surgery from both morphologically unchanged and pathologically altered segments of the intestine (n=15), and fixed by immersion in buffered paraformaldehyde solution. The cryostat sections were processed for double-labelling immunofluorescence to study the distribution of the intramural nerve structures (visualized with antibodies against protein gene-product 9.5) and their chemical coding using antibodies against somatostatin (SOM), substance P (SP) and calcitonin gene-related peptide (CGRP). The microscopic observations revealed distinct morphological differences in the enteric nerve system structure between the region adjacent to the cancer invaded area and the intact part of the intestine. In general, infiltration of the cancer tissue resulted in the gradual (depending on the grade of invasion) first decomposition and reduction to final partial or complete destruction and absence of the neuronal elements. A comparative analysis of immunohistochemically labeled sections (from the unchanged and pathologically altered areas) revealed a statistically significant decrease in the number of CGRP-positive neurons and nerve fibres in both submucous and myenteric plexuses in the transitional zone between morphologically unchanged and cancer-invaded areas. In this zone, a decrease was also observed in the density of SP-positive nerve fibres in all intramural plexuses. Conversely, the investigations demonstrated statistically insignificant differences in number of SP- and SOM-positive neurons and a similar density of SOM-positive nerve fibres in the plexuses of the intact and pathologically changed areas. The differentiation between the potential adaptive changes in ENS or destruction of its elements by cancer invasion should be a subject of further investigations.

**La somatostatina, la sostanza P , la calcitonina e le strutture peptide-positivi sono correlate al gene del nervo intramurale del grande intestino umano affetto da carcinoma.**

Lo scopo di questo studio era di studiare la disposizione e la chimica di codifica delle strutture nervose enterico nell'intestino umano grande affetto da cancro. I campioni di tessuto che comprenda tutti gli strati della parete intestinale sono stati raccolti durante forma chirurgia entrambi i segmenti morfologicamente immutata e patologicamente alterata del (n = 15) intestino, e fissati per immersione in soluzione di paraformaldeide tamponata. Le sezioni del criostato sono stati trattati per immunofluorescenza doppia etichettatura per studiare la distribuzione delle strutture nervose intramurale (visualizzato con anticorpi contro la proteina del gene-prodotto 9.5) e la loro chimica di codifica utilizzando anticorpi contro la somatostatina (SOM), la sostanza P (SP) e del gene della calcitonina -peptide correlato (CGRP). Le osservazioni al microscopio ha rivelato differenze morfologiche distinte nella struttura del sistema nervoso enterico tra la regione adiacente al cancro invaso zona e la parte intatta dell'intestino. In generale, l'infiltrazione del tessuto del cancro ha portato alla graduale (a seconda del grado di invasione) prima decomposizione e la riduzione finale di distruzione parziale o totale e l'assenza di elementi neuronali. Un'analisi comparativa delle sezioni immunohistochemically marcata (dalle aree invariato e patologicamente alterati) ha evidenziato una diminuzione statisticamente significativa del numero di neuroni CGRP-positivi e

fibre nervose sia in plessi sottomucoso e mienterico nella zona di transizione tra morfologicamente invariato e il cancro ha invaso le aree. In questa zona, una diminuzione è stata osservata anche nella densità delle fibre nervose SP-positivo in tutti i plessi intramurali. Al contrario, le indagini hanno dimostrato differenze statisticamente insignificante numero di neuroni e SP-SOM-positivi e una simile densità di fibre nervose SOM-positive nei plessi delle aree intatte e patologicamente cambiata. La differenziazione tra i potenziali cambiamenti di adattamento nel ENS o la distruzione dei suoi elementi da un'invasione di cancro dovrebbe essere oggetto di ulteriori indagini.

18: Mazzucchelli R, Morichetti D, Santinelli A, Scarpelli M, Bono AV, Lopez-Beltran A, Cheng L, Montironi R.

### **Immunohistochemical expression and localization of somatostatin receptor subtypes in androgen ablated prostate cancer.**

Anal Cell Pathol (Amst). 2010;33(1):27-36. PubMed PMID: 20966542.

**OBJECTIVE:** The aim was to examine the expression and localization of the five somatostatin receptors (termed SSTR1-5) in radical prostatectomies (RPs) from patients with prostatic adenocarcinoma (PCa) under complete androgen ablation (CAA) before operation.

**MATERIAL:** The five SSTRs were evaluated in the epithelial, smooth muscle and endothelial cells of normal-looking epithelium (Nep), high-grade prostatic intraepithelial neoplasia (HGPIN) and PCa in 20 RPs with clinically detected PCa from patients under CAA. 20 RPs with clinically detected PCa from hormonally untreated patients were used as control group.

**RESULTS:** Concerning the secretory cells (i) membrane staining was seen for SSTR3 and SSTR4; the mean percentages of positive cells, higher in SSTR3 than in SSTR4, decreased sharply in HGPIN and PCa compared with Nep; the mean percentages in the androgen ablated group were 30-90% lower than in the untreated; (ii) cytoplasmic staining was seen for all 5 SSTRs; the mean percentages of positive cells in Nep, HGPIN and PCa of the untreated group were similar, and in general as high as 80% or more; in the treated group, the Nep values were similar to those in the untreated, whereas the values in HGPIN and PCa were lower for SSTR1, 3 and 5, with a decrease of 30% for SSTR1; (iii) nuclear staining was seen with SSTR4 and SSTR5, the mean percentages for the former being much lower than for the latter; treatment affected both HGPIN and PCa, whose proportions of stained cells were 30-55% lower than in the untreated group. Cytoplasmic staining in the basal cells was seen for all 5 SSTRs, both in Nep and HGPIN. The values in the treated group were lower than in the other, the difference between the two group being in general comprised between 10 and 40%. Treatment did not affect SSTR staining in the smooth muscle and endothelial cells.

**CONCLUSIONS:** The present study expands our knowledge on the expression and localization of the five SSTRs in the prostate following CAA.

### **Espressione immunoistochimica e localizzazione dei sottotipi del recettore della somatostatina NEL nel carcinoma androgeno ablato della prostata.**

**OBIETTIVO:** Lo scopo era quello di esaminare l'espressione e la localizzazione dei cinque recettori per la somatostatina (chiamato SSTR1-5) in prostatectomie radicali (PRC) di pazienti con adenocarcinoma prostatico (PCa) sotto ablazione degli androgeni completa (CAA) prima operazione.

**MATERIALE:** I cinque SSTRs sono state valutate in epiteliali, muscolari lisce e cellule endoteliali di epitelio normale-looking (NEP), ad alto grado neoplasia prostatica intraepiteliale (HGPIN) e PCA in 20 con RP clinicamente rilevate PCa da pazienti in CAA. 20 RPM con accertate

cl clinicamente PCa da ormonalmente pazienti non trattati sono stati utilizzati come gruppo di controllo.

RISULTATI: Per quanto riguarda le cellule secretorie (i) la marcatura di membrana è stato osservato per SSTR3 e SSTR4; le percentuali medio delle cellule positive, più elevato in SSTR3 che in SSTR4, è diminuito sensibilmente in HGPIN e PCA rispetto Nep, la percentuale media nel gruppo ablazione degli androgeni erano 30-90% in meno rispetto al non trattato, (ii) una colorazione citoplasmatica è stato osservato per tutti i 5 SSTRs; le percentuali medio delle cellule positive in Nep, HGPIN e PCA del gruppo non trattato erano simili, e in generale su quanto 80% o più; nel gruppo trattato, i valori Nep erano simili a quelli del non trattato, mentre i valori in HGPIN e PCA sono stati inferiori per SSTR1, 3 e 5, con un calo del 30% per SSTR1, (iii) la colorazione nucleare è stato visto con SSTR4 e SSTR5, le percentuali significa per il primo è molto inferiore a quello di questi ultimi; trattamento influenzato sia HGPIN e PCA, la cui percentuale di cellule colorate erano 30-55% inferiore rispetto al gruppo non trattato.

Citoplasmatica delle cellule basali è stata osservata per tutti i 5 SSTRs, sia in Nep e HGPIN. I valori nel gruppo trattato sono stati inferiori rispetto agli altri, la differenza tra i due gruppi sono, in generale, compresa tra il 10 e il 40%. Il trattamento non ha influenzato SSTR colorazione della muscolatura liscia e cellule endoteliali.

CONCLUSIONI: Il presente studio amplia le nostre conoscenze sulla espressione e la localizzazione dei cinque SSTRs nella prostata seguito CAA.

22: Kleinberg DL, Ameri P, Singh B.

**Pasireotide, an IGF-I action inhibitor, prevents growth hormone and estradiol-induced mammary hyperplasia.**

Pituitary.2010 Oct 2. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 20890664.

Mammary hyperplasia increases breast cancer risk. Tamoxifen prevents breast cancer in women with atypical hyperplasia, but has serious side effects. As estradiol action requires IGF-I, direct inhibition of IGF-I action theoretically might be an efficacious alternative to tamoxifen. After hypophysectomy and oophorectomy, 21-day-old female rats were treated with GH and E(2.) After 7 days all terminal end buds (TEBs) and 75% of ducts became hyperplastic. Co-treatment with pasireotide, a somatostatin analog that blocks GH secretion and IGF-I action in the mammary gland, prevented hormone-induced hyperplasia. The number and size of TEBs and moderately or floridly hyperplastic ducts was reduced by pasireotide ( $P < 0.01$ ). In contrast, the same concentration of octreotide, which has a more selective somatostatin receptor subtype binding profile, was less effective than pasireotide. Tamoxifen inhibited hyperplasia when used alone with GH + E(2), but did not add to the inhibitory effect of pasireotide when the two treatments were combined. Both pasireotide and tamoxifen acted via the IGF-I receptor signaling pathway and both were found to inhibit mammary cell proliferation and stimulate apoptosis. The number of epithelial cells expressing phosphorylated insulin receptor substrate (IRS)-1 in response to GH and E(2) was reduced by pasireotide, as was staining intensity. These results support the concept that IGF-I inhibition, in this case by pasireotide, inhibits E(2) and GH-induced mammary hyperplasia. As tamoxifen did not further increase the inhibitory effect of pasireotide, the peptide appears to be at least as effective as tamoxifen in preventing GH + E(2)-induced mammary hyperplasia.

**Pasireotide, un fattore di crescita insulino-simile ad azione inibente, previene l'ormone della crescita e iperplasia mammaria estradiolo-indotta.**

L'aumento dell'iperplasia mammaria è un rischio di cancro al seno. Tamoxifen previene il cancro al seno nelle donne con iperplasia atipica, ma ha gravi effetti collaterali. Come azione di estradiolo richiede IGF-I, inibizione diretta di IGF-I azione teoricamente potrebbe essere una efficace alternativa al tamoxifene. Dopo ipofisectomia e ovariectomia, i topi femmina di 21 giorni di età sono stati trattati con GH e E (2.) Dopo 7 giorni tutti i boccioli capolinea (TEBS) e il 75% dei dotti si iperplastici. Co-trattamento con pasireotide, un analogo della somatostatina che blocca la secrezione di GH e di IGF-I azione nella ghiandola mammaria, iperplasia impedito ormone-indotta. Il numero e le dimensioni dei TEBS e moderatamente o florida condotti iperplastica è stato ridotto di pasireotide ( $P < 0,01$ ). Al contrario, la stessa concentrazione di octreotide, che ha un profilo più selettivo del recettore della somatostatina vincolante sottotipo, era meno efficace pasireotide. Tamoxifen inibito iperplasia se usato da solo con GH + E (2), ma non hanno aggiunto l'effetto inibitorio di pasireotide quando i due trattamenti sono stati combinati. Sia pasireotide e tamoxifene ha agito tramite l'IGF-I pathway di segnalazione e di entrambi i recettori sono stati trovati di inibire la proliferazione delle cellule mammarie e di stimolare l'apoptosi. Il numero di cellule epiteliali che esprimono fosforilata substrato recettore dell'insulina (IRS) -1 in risposta al GH ed E (2) è stata ridotta di pasireotide, come intensità di colorazione. Questi risultati supportano il concetto che l'inibizione di IGF-I, in questo caso da pasireotide, inibisce E (2) e GH-indotto iperplasia mammaria. Come tamoxifene non aumentare ulteriormente l'effetto inibitorio del pasireotide, il

peptide sembra essere almeno altrettanto efficace quanto il tamoxifene nella prevenzione GH + E (2)-iperplasia mammaria indotta.

24: Friedlander TW, Weinberg VK, Small EJ, Sharibb S J, Harzstark AL, Lin AM, Fong L, Ryan CJ.

**Effect of the somatostatin analog octreotide acetate on circulating insulin-like growth factor-1 and related peptides in patients with non-metastatic castration-resistant prostate cancer: Results of a phase II study.**

Urol Oncol. 2010 Sep 28. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 20884247.

**BACKGROUND:** Insulin-like growth factor (IGF) mediated signaling has been implicated in the growth of many tumor types including prostate cancer, and it is hypothesized that lowering circulating IGF levels in men with castration resistant prostate cancer (CRPC) will slow tumor growth. In this study, the efficacy of depot octreotide acetate was prospectively evaluated in patients with CRPC.

**METHODS:** Eligible patients had progressive non-metastatic CRPC. Octreotide acetate 30 mg was administered intramuscularly every 28 days. Changes in PSA, IGF-1, IGF-2, IGF binding protein-1 (IGFBP-1), and IGFBP-3 were evaluated over time.

**RESULTS:** Accrual was stopped early after a pre-planned interim analysis showed no prostate specific antigen (PSA) declines after 3 cycles of treatment among the first 13 patients enrolled. Median baseline PSA and IGF-1 measurements were 36.2 ng/ml and 162.6 ng/ml, respectively, and median time on treatment was 13 weeks. Radiographic progression occurred in 7 patients, PSA-only progression occurred in 5 patients, and 1 patient was taken off the study due to a grade 3 drug interaction. After 3 cycles of treatment IGF-1 significantly declined with a median -34.5% (P = 0.01) and IGFBP-1 significantly increased with a median 76.3% (P = 0.046). IGF-2 and IGFBP-3 were not significantly changed from baseline.

**CONCLUSIONS:** Octreotide acetate significantly lowers IGF-1 and raises IGFBP-1 levels in patients with non-metastatic CRPC, but does not result in sustained declines in PSA. While treatment with single-agent octreotide may not be warranted, its inclusion in combination regimens directly targeting the IGF-1 receptor on tumor cells may be of interest.

**Effetto della somatostatina octreotide acetato in circolo con fattore di crescita insulino-simile-1 e peptidi correlati in pazienti con cancro non-metastatico alla prostata (castrazione-resistente): i risultati di uno studio di fase II.**

**BACKGROUND:** fattore di crescita insulino-simile (IGF) mediata segnalazione è stata implicata nella crescita di molti tipi di tumore tra cui il cancro alla prostata, e si ipotizza che la riduzione dei livelli circolanti di IGF negli uomini con cancro alla prostata castrazione resistente (CRPC) rallenta la crescita tumorale. In questo studio, l'efficacia di acetato depot octreotide è stato valutato prospettivamente in pazienti con CRPC.

**METODI:** I pazienti eleggibili erano progressive non metastatico CRPC. Octreotide acetato 30 mg è stato somministrato per via intramuscolare ogni 28 giorni. Modifiche in PSA, IGF-1, IGF-2, proteina legante IGF-1 (IGFBP-1), e IGFBP-3 sono stati valutati nel tempo.

**RISULTATI:** Accrual è stato interrotto precocemente dopo una analisi interim pre-pianificata non ha mostrato alcun antigene prostatico specifico (PSA) diminuisce dopo 3 cicli di trattamento tra i

primi 13 pazienti arruolati. Mediano basale di PSA e IGF-1 misurazioni sono state 36,2 ng / ml e 162,6 ng / ml, rispettivamente, e tempo medio di trattamento è stata di 13 settimane. La progressione radiografica si è verificato in 7 pazienti, la progressione del PSA-è verificato solo in 5 pazienti, ed 1 paziente è stato tolto lo studio a causa di un grado 3 di interazione farmacologica. Dopo 3 cicli di trattamento di IGF-1 è diminuito in maniera significativa con una mediana di -34,5% (P = 0,01) e IGFBP-1 significativamente aumentata con una mediana di 76,3% (P = 0,046). IGF-2 e IGFBP-3 non sono risultati significativamente cambiato rispetto al basale. CONCLUSIONI: acetato di octreotide riduce in modo significativo l'IGF-1 e aumenta i livelli di IGFBP-1 nei pazienti con non-metastatico CRPC, ma non si traduce in cali subiti in PSA. Mentre il trattamento con octreotide come agente singolo non può essere giustificata, la sua inclusione in combinazione regimi di mira direttamente il recettore IGF-1 nelle cellule tumorali possono essere di interesse.

26: Tang X, Takekoshi S, Itoh J, Umemura S, Shoji S, Terachi T, Osamura RY

### **Somatostatin analogue inhibits the mobility of prostate carcinoma cells: a new therapeutic method for advanced prostate carcinoma.**

Int J Oncol. 2010Nov;37(5):1077-83. PubMed PMID: 20878055.

The somatostatin analogue (SA) Octreotide has been used as a therapeutic reagent for somatostatin receptor type 2a (SSTR2a)-positive cancers. The purpose of this study is to detect SSTR2a in human prostate carcinomas and to elucidate the effects of SA on SSTR2a-positive prostate carcinoma cells to determine the potential of this drug as a new therapeutic method for advanced prostate carcinoma. Immunohistochemical study of SSTR2a was performed on 95 prostate carcinoma cases, and the results showed expression of SSTR2a in 14 of the 95 cases (14.74%); the histological grade (Gleason) and capsular invasion of the prostate carcinoma were directly related to SSTR2a expression. Among the ten cases of lymph node metastasis, SSTR2a expression was markedly higher. In vitro studies were performed using SSTR2a-positive prostate cancer cells, DU145 and PC3. Migration and invasion abilities of DU145 and PC3 cells were inhibited by SA in a dose-dependent manner. This inhibition was reversed by Rho-kinase inhibitor Y-27632. Morphological changes of the prostate cancer cells treated with SA and Y27632 corroborate the migration and invasion assays, although SA had no effect on proliferation of DU145 and PC3 cells. In conclusion, the somatostatin analogue may be beneficial for patients with advanced prostate carcinoma or to protect from distal metastasis if they are positive for SSTR2a.

### **Analogo della somatostatina inibisce la mobilità delle cellule di carcinoma della prostata: un nuovo metodo terapeutico per il carcinoma della prostata avanzato.**

L'analogo della somatostatina (SA) Octreotide è stato usato come reagente terapeutico per recettori per la somatostatina di tipo 2 bis (sstr2A) tumori positivi. Lo scopo di questo studio è di rilevare sstr2A nel carcinoma prostatico umano e per chiarire gli effetti di SA sulle cellule della prostata sstr2A-carcinoma positivo per determinare il potenziale di questo farmaco come un nuovo metodo terapeutico per il carcinoma della prostata avanzato. Studio di Immunohistochemical sstr2A è stata effettuata su 95 casi di carcinoma della prostata, ei risultati hanno mostrato l'espressione di sstr2A in 14 dei 95 casi (14,74%), il grado istologico (Gleason) e l'invasione capsulare del carcinoma della prostata sono stati direttamente correlata all'espressione sstr2A. Tra i dieci casi di metastasi di linfonodo, l'espressione sstr2A era nettamente superiore. Gli studi in vitro sono stati eseguiti utilizzando sstr2A-positivi cellule tumorali della prostata, DU145 e PC3. Capacità di migrazione e l'invasione di DU145 e cellule PC3 sono stati inibiti da SA in modo dose-dipendente. Questa

inibizione è stato compensato da inibitore della Rho-chinasi Y-27.632. Cambiamenti morfologici delle cellule del cancro della prostata trattati con SA e Y27632 corroborare i saggi di migrazione e l'invasione, anche se SA non ha avuto effetto sulla proliferazione di DU145 e cellule PC3. In conclusione, l'analogo della somatostatina, può essere di beneficio per i pazienti con carcinoma della prostata avanzato o per proteggere da metastasi distali se sono positivi per sstr2A.

27: Arvigo M, Gatto F, Ruscica M, Ameri P, Dozio E, Albertelli M, Culler MD, Motta M, Minuto F, Magni P, Ferone D.

### **Somatostatin and dopamine receptor interaction in prostate and lung cancer cell lines.**

J Endocrinol. 2010Dec;207(3):309-17. Epub 2010 Sep 27. PubMed PMID: 20876239.

Somatostatin analogues inhibit in vitro cell proliferation via specific membrane receptors (SSTRs). Recent studies on transfected cell lines have shown a ligand-induced formation of receptor dimers. The aim of this study is 1) to evaluate the role of specific ligands in modulating receptor interactions in the androgen-dependent prostate cancer cell line, LNCaP, and in the non-small cell lung cancer line, Calu-6, by co-immunoprecipitation and immunoblot; and 2) to correlate the antiproliferative effect of these compounds with their ability in modulating receptor interactions. In LNCaP, we have demonstrated the constitutive presence of sstr<sub>1</sub>/sstr<sub>2</sub>, sstr<sub>2</sub>/sstr<sub>5</sub>, sstr<sub>5</sub>/dopamine (DA) type 2 receptor (D<sub>2</sub>R), and sstr<sub>2</sub>/D<sub>2</sub>R dimers. BIM-23704 (sstr<sub>1</sub>- and sstr<sub>2</sub>-preferential compound) increased the co-immunoprecipitation of sstr<sub>1</sub>/sstr<sub>2</sub> and significantly inhibited proliferation (-30.98%). BIM-23244 (sstr<sub>2</sub>-sstr<sub>5</sub> selective agonist) significantly increased the co-immunoprecipitation of sstr<sub>2</sub>/sstr<sub>5</sub>, and induced a -41.36% inhibition of proliferation. BIM-23A760, a new somatostatin/DA chimeric agonist with a high affinity for sstr<sub>2</sub> and D<sub>2</sub>R and a moderate affinity for sstr<sub>5</sub>, significantly increased the sstr<sub>5</sub>/D<sub>2</sub>R and sstr<sub>2</sub>/D<sub>2</sub>R complexes and was the most powerful in inhibiting proliferation (-42.30%). The chimeric compound was also the most efficient in modulating receptor interaction in Calu-6, increasing the co-immunoprecipitation of D<sub>2</sub>R/sstr<sub>5</sub> and inhibiting cell proliferation (-30.54%). However, behind BIM-23A760, BIM-53097 (D<sub>2</sub>R-preferential compound) also significantly inhibited Calu-6 proliferation (-17.71%), suggesting a key role for D<sub>2</sub>R in receptor cross talk and in controlling cell growth. Indeed, activation of monomeric receptors did not affect receptor co-immunoprecipitation, whereas cell proliferation was significantly inhibited when the receptors were synergistically activated. In conclusion, our data show a dynamic ligand-induced somatostatin and DA receptor interaction, which may be crucial for the antiproliferative effects of the new analogues.

### **Somatostatina e interazione recettore della dopamina in linee cellulari di carcinoma della prostata e del polmone.**

Analoghi della somatostatina inibisce la proliferazione in vitro delle cellule tramite specifici recettori di membrana (SSTRs). Recenti studi su linee cellulari transfettate hanno mostrato una formazione ligando indotta dimeri di recettori. Lo scopo di questo studio è di 1) valutare il ruolo dei ligandi specifici nel modulare le interazioni recettore androgeno-dipendenti della linea di cellule di cancro alla prostata, LNCaP, e nel non-piccolo cancro polmonare linea cellulare, Calu-6, da co-immunoprecipitazione e immunoblot e 2) di correlare l'effetto antiproliferativo di questi composti

con la loro abilità nel modulare le interazioni recettore. In LNCaP, abbiamo dimostrato la presenza costitutiva di  $\alpha_1$  sstr /  $\alpha_2$  SSTR,  $\alpha_2$  sstr /  $\alpha_5$  SSTR,  $\alpha_5$  sstr / dopamina (DA) del recettore di tipo 2 ( $D_2$  R), e  $\alpha_2$  sstr /  $D_2$  dimeri R. BIM-23.704 ( $\alpha_1$  SSTR - e SSTR composto  $\alpha_2$  preferenziale) ha aumentato la co-immunoprecipitazione di  $\alpha_1$  sstr /  $\alpha_2$  SSTR e significativamente inibito la proliferazione (-30,98%). BIM-23.244 (SSTR  $\alpha_2$ -sstr  $\alpha_5$  agonista selettivo) ha aumentato significativamente la co-immunoprecipitazione di  $\alpha_2$  sstr /  $\alpha_5$  SSTR, e ha indotto una inibizione della proliferazione -41,36%. BIM-23A760, un somatostatina nuovo / agonista DA chimerico con elevata affinità per SSTR  $\alpha_2$  e  $D_2$  R e una moderata affinità per  $\alpha_5$  SSTR, ha aumentato significativamente la sstr  $\alpha_2$  /  $D_2$  R e sstr /  $D_2$  complessi di R ed era il più potente nella proliferazione inibizione (-42,30%) . Il composto chimerico è stata anche la più efficace nel modulare l'interazione recettore in Calu-6, l'aumento della co-immunoprecipitazione di  $D_2$  R /  $\alpha_5$  SSTR e inibendo la proliferazione cellulare (-30,54%). Tuttavia, dietro BIM-23A760, BIM-53.097 (D composto  $\alpha_2$  R-preferenziali) anche inibito significativamente Calu-6 proliferazione (-17,71%), suggerendo un ruolo chiave per l'S  $\alpha_2$  R in croce e parlare recettore nel controllo della crescita cellulare. Infatti, l'attivazione dei recettori monomerici non ha influenzato recettore di co-immunoprecipitazione, mentre la proliferazione cellulare è stata significativamente inibita quando i recettori sono stati attivati in sinergia. In conclusione, i nostri dati mostrano una dinamica ligando-somatostatina indotto e l'interazione dei recettori DA, che può essere cruciale per gli effetti antiproliferativi degli analoghi nuovo.

29: Menda Y, O'Dorisio MS, Kao S, Khanna G, Michael S, Connolly M, Babich J, O'Dorisio T, Bushnell D, Madsen M.

**Phase I trial of  $^{90}\text{Y}$ -DOTATOC therapy in children and young adults with refractory solid tumors that express somatostatin receptors.**

J Nucl Med. 2010 Oct;51(10):1524-31. Epub 2010 Sep 16. PubMed PMID:20847174.

The purpose of this study was to conduct a phase I trial of  $(^{90}\text{Y})$ -DOTATOC to determine the dose-toxicity profile in children and young adults with somatostatin receptor-positive tumors.

**METHODS:** A  $3 \times 3$  design was used to determine the highest tolerable dose of  $(^{90}\text{Y})$ -DOTATOC, with administered activities of 1.11, 1.48, and 1.85 GBq/m<sup>2</sup>/cycle given in 3 cycles at 6-wk intervals. An amino acid infusion was coadministered with the radiopharmaceutical for renal protection. Eligibility criteria included an age of 2-25 y, progressive disease, a positive lesion on  $(^{111}\text{In})$ -diethylenetriaminepentaacetic acid-D-Phe(1)-octreotide scanning, a glomerular filtration rate of 80 mL/min/1.73 m<sup>2</sup> or more, bone marrow cellularity of 40% or more or stored autologous hematopoietic stem cells, 60% or more on the Lansky Play Scale, and informed consent.

**RESULTS:** Seventeen subjects (age, 2-24 y) received at least 1 dose of  $(^{90}\text{Y})$ -DOTATOC; diagnoses included neuroblastoma, embryonal and astrocytic brain tumors, paraganglioma, multiple endocrine neoplasia IIB, and neuroendocrine tumors. No dose-limiting toxicities and no individual dose reductions due to renal or hematologic toxicity were noted. No complete responses were observed; 2 subjects experienced partial response, 5 had minor responses, 6 experienced stable disease, 2 had progressive disease, and 2 withdrew.

**CONCLUSION:** Peptide receptor radionuclide therapy with  $(^{90}\text{Y})$ -DOTATOC is safe in children and young adults and demonstrated a 12% partial response plus 29% minor response rate in patients with somatostatin receptor-positive tumors. No dose-limiting toxicities were observed. The recommended phase II dosing is 3 cycles of 1.85 GBq/m<sup>2</sup>/dose of  $(^{90}\text{Y})$ -DOTATOC coadministered with amino acids.

**Sperimentazione di fase I di terapia con  $^{90}\text{Y}$ -DOTATOC nei bambini e nei giovani adulti con tumori solidi refrattari che esprimono i recettori della somatostatina.**

Lo scopo di questo studio è stato quello di condurre un trial di fase I  $(^{90}\text{Y})$ -DOTATOC per determinare il profilo di tossicità dose-in bambini e giovani adulti con tumori positivi al recettore della somatostatina.

**METODI:** A  $3 \times 3$  design è stato usato per determinare la dose massima tollerabile di  $(^{90}\text{Y})$ -DOTATOC, con attività di somministrazione di 1,11, 1,48, e 1,85 GBq / m<sup>2</sup> / ciclo di cui 3 cicli ad intervalli di 6 sett. Un infuso di aminoacidi è stato somministrato con il radiofarmaco per la protezione renale. Criteri di ammissibilità incluso un'età di 2-25 y, malattia progressiva, una lesione

positivo (111) In-diethylenetriaminepentaacetic acido-D-Phe (1)-octreotide scansione, un tasso di filtrazione glomerulare mL/min/1.73 di 80 m (2) o più, cellularità del midollo osseo di 40% o più o conservate le cellule staminali emopoietiche autologhe, il 60% o più sul gioco Lansky Scala e il consenso informato.

RISULTATI: Diciassette soggetti (età, 2-24 y) ha ricevuto almeno 1 dose di (90) Y-DOTATOC; diagnosi incluso neuroblastoma, tumori del cervello embrionale e astrociti, paraganglioma, neoplasia endocrina multipla IIB, e dei tumori neuroendocrini. Nessuna tossicità dose-limitanti e nessuna riduzione della dose individuale a causa della tossicità renale o ematologica sono stati notati. No le risposte complete sono state osservate, 2 soggetti hanno riportato una risposta parziale, 5 hanno avuto una risposta minore, 6 malattia esperto stabile, 2 aveva una malattia progressiva, e 2 si ritirò.

CONCLUSIONE: recettore del peptide terapia radionuclide con (90) Y-DOTATOC è sicuro nei bambini e nei giovani adulti e ha dimostrato una risposta parziale al 12%, più del 29% il tasso di risposta minore in pazienti con tumori positivi al recettore della somatostatina. Nessuna tossicità dose-limitanti sono state osservate. Il dosaggio raccomandato di fase II è di 3 cicli di 1,85 GBq / m (2) / dose di (90) Y-DOTATOC co-somministrato con aminoacidi.

47: Pozsgai E, Schally AV, Halmos G, Rick F, Bellyei S.

### **The inhibitory effect of a novel cytotoxic somatostatin analogue AN-162 on experimental glioblastoma.**

Metab Res. 2010 Oct;42(11):781-6. Epub 2010 Jul 27. PubMed PMID: 20665426.

Glioblastoma multiforme is the most common and most aggressive type of high grade tumor with a poor prognosis upon discovery. Based on earlier promising results earned with AN-162, a doxorubicin molecule linked to somatostatin (SST) analogue RC-160, it was our aim to determine the effect of AN-162 on DBTRG-05 glioblastoma cell line, and to test its efficacy in experimental brain tumors. We detected the expression of mRNA for somatostatin receptor (SSTR) subtypes 2 and 3 in DBTRG-05 cells with RT-PCR. Using ligand competition assay, specific high affinity receptors for somatostatin were found. The MTT assay showed that both AN-162 and doxorubicin (DOX) significantly inhibited cell proliferation and that there was no significant difference between the effects in vitro. Nude mice were xenografted with DBTRG-05 glioblastoma tumors. AN-162 showed a significant inhibition of tumor growth compared with the control group and the groups treated with equimolar doses of doxorubicin, somatostatin analogue RC-160, or the unconjugated mixture of doxorubicin plus RC-160. The tumor doubling time in the group of animals treated with AN-162 was extended and was significantly different from doubling times in the control group and in the other treatment groups. Our study clearly demonstrates a potent inhibitory effect of AN-162 in experimental glioblastoma, thus suggesting the possibility of its utilization in patients suffering from malignant brain cancer.

### **L'effetto inibitorio di un analogo della somatostatina citotossico AN-162 sul glioblastoma sperimentale.**

Il glioblastoma multiforme è il tipo più comune e più aggressiva di tumore di grado elevato, con una cattiva prognosi al momento della scoperta. Sulla base di precedenti risultati promettenti guadagnati con l'AN-162, una molecola legata alla doxorubicina somatostatina (SST) analogici RC-160, è stato il nostro obiettivo di determinare l'effetto di AN-162-05 su DBTRG linea di cellule di glioblastoma e per testare la sua efficacia nei tumori cerebrali sperimentali. Abbiamo rilevato l'espressione di mRNA del recettore della somatostatina (SSTR) sottotipi 2 e 3 in DBTRG-05 celle con RT-PCR. Usando l'analisi della concorrenza ligando, specifici recettori ad alta affinità per la somatostatina

sono stati trovati. Il saggio MTT è emerso che sia AN-162 e doxorubicina (DOX) ha inibito significativamente la proliferazione cellulare e che non vi era alcuna differenza significativa tra gli effetti in vitro. Topi nudi sono stati trapiantati con tumori DBTRG-05 glioblastoma. AN-162 ha mostrato una inibizione significativa della crescita tumorale rispetto al gruppo di controllo e nei gruppi trattati con dosi equimolare di doxorubicina, analogo della somatostatina RC-160, o la miscela non coniugato della doxorubicina più RC-160. Il tempo di raddoppiamento del tumore nel gruppo di animali trattati con AN-162 è stato esteso ed è stato significativamente diverso dal raddoppio volte nel gruppo di controllo e nei gruppi di trattamento. Il nostro studio dimostra chiaramente un potente effetto inibitorio di AN-162 nel glioblastoma sperimentale, suggerendo così la possibilità della sua utilizzazione nei pazienti affetti da tumore maligno al cervello.

77: De Martino MC, Hofland LJ, Lamberts SW.

### **Somatostatin and somatostatin receptors: from basic concepts to clinical applications.**

Prog Brain Res.2010;182:255-80. PubMed PMID: 20541669.

Somatostatin (SS) and SS receptors (sst) are broadly expressed in the human body where they exert many physiological actions. Moreover, they can be expressed in many pathological tissues. Particularly, a high density of ssts has been described in human neuroendocrine tumors (NETs). SS and ssts have a therapeutic and diagnostic value in several clinical conditions. For this reason stable SS-analogues have been developed. Among SS-analogues, octreotide, octreotide long-acting-release (LAR), lanreotide-sustained-release (SR) and lanreotide autogel (ATG) are approved for clinical use and pasireotide is in a late phase of clinical development. Presently, the SS-analogues are the standard treatment option for acromegalic patients and play a prominent role in the symptomatic control of patients with gastroenteropancreatic-neuroendocrine tumors (GEP-NETs). SS-analogues are able to control hormonal hypersecretion and reduce tumoral growth in the majority of cases. However, some patients are resistant to SS-analogue treatment and other patients (often GEP-NETs), after a variable period of treatment, develop tachyphylaxis to these compounds. The mechanisms behind this treatment resistance or tachyphylaxis are presently under investigation. The understanding of these mechanisms might help to develop new treatment modalities for patients not responding to the currently available SS-analogues. The high tumoral expression level of ssts, characteristic of many NETs, has been the rationale to develop radiolabelled SS-analogues to visualize sst-expressing tumors and to treat unresectable tumors. Indeed, SS-analogues coupled with  $(^{111}\text{In})$  are used to perform sst-scintigraphy, which is a very useful first-line imaging technique in the diagnosis and follow-up of GEP-NETs. Moreover, SS-analogues conjugated to  $(^{111}\text{In})$  or to other radioisotopes, such as  $(^{177}\text{Lu})$  or  $(^{90}\text{Y})$ , have promising effects in the treatment of advanced NETs. ssts are expressed in some non-neuroendocrine tumors as well and in some non-tumoral diseases, suggesting that SS-analogues might have a role in the diagnosis and treatment of these pathological conditions as well. The development of novel SS-analogues with new pharmacokinetic and pharmacodynamic characteristics may further improve the clinical applications of such compounds.

### **Recettori della somatostatina e somatostatina: dai concetti di base alle applicazioni cliniche.**

Recettori della somatostatina (SS) e SS (SST) sono ampiamente espresse nel corpo umano dove si esercitano molte azioni fisiologiche. Inoltre, può essere espresso in molti tessuti patologici. In particolare, un'alta densità di SST è stata descritta in umana tumori neuroendocrini (NET). SS e ssts hanno un valore terapeutico e diagnostico in diverse condizioni cliniche. Per questo motivo stabile SS-analoghi sono stati sviluppati. Tra gli SS-analoghi, octreotide, octreotide a lunga azione a rilascio (LAR),-lanreotide a rilascio prolungato (SR) e autogel lanreotide (ATG) sono approvati per uso clinico e pasireotide è in una fase avanzata di sviluppo clinico. Attualmente, l'SS-analoghi sono

l'opzione di trattamento standard per pazienti acromegalici e svolgere un ruolo di primo piano nel controllo sintomatico di pazienti con tumori neuroendocrini gastroenteropancreatici-(GEP-NET). SS-analoghi sono in grado di controllare l'ipersecrezione ormonale e ridurre la crescita tumorale nella maggior parte dei casi. Tuttavia, alcuni pazienti sono resistenti al trattamento SS-analogico e altri pazienti (spesso GEP-NET), dopo un periodo variabile di trattamento, di sviluppare tachifilassi a questi composti.

I meccanismi alla base di questa resistenza al trattamento o tachifilassi sono attualmente sotto inchiesta. La comprensione di questi meccanismi potrebbe aiutare a sviluppare nuove modalità di trattamento per i pazienti che non rispondono al momento disponibile SS-analoghi. L'alto livello di espressione tumorale di ssts, caratteristica di molti NET, è stato il razionale per sviluppare radiomarcato SS-analoghi, per visualizzare SST-tumori che esprimono e per trattare i tumori non operabili. Infatti, SS-accoppiato con analoghi ( $^{111}\text{A}$ ) vengono utilizzate per eseguire SST-scintigrafia, che è molto utile imaging di prima linea tecnica nella diagnosi e nel follow-up di GEP-NET. Inoltre, SS-analoghi coniugato ( $^{111}\text{A}$ ) o ad altri radioisotopi, come ( $^{177}\text{Lu}$ ) o ( $^{90}\text{Y}$ ), hanno effetti promettenti nel trattamento dei NET avanzato. SST sono espressi in alcuni tumori neuroendocrini non come bene e in alcune malattie non tumorali, suggerendo che l'SS-analoghi potrebbe avere un ruolo nella diagnosi e nel trattamento di queste condizioni patologiche come bene. Lo sviluppo di nuovi SS-analoghi con nuove caratteristiche farmacocinetiche e farmacodinamiche possono migliorare ulteriormente le applicazioni cliniche di tali composti.

84: Zhang J, Jin W, Wang X, Wang J, Zhang X, Zhang Q.

**A novel octreotide modified lipid vesicle improved the anticancer efficacy of doxorubicin in somatostatin receptor 2 positive tumor models.**

Mol Pharm. 2010 Aug 2;7(4):1159-68. PubMedPMID: 20524673.

Octreotide (Oct) is a potential ligand due to its high affinity to somatostatin receptors (SSTRs), especially subtype 2 (SSTR2), as many tumor cells specifically overexpress SSTR2. In this study, we conjugated Oct to the PEG end of DSPE-PEG and prepared a novel doxorubicin (DOX)-loaded and Oct-modified sterically stabilized liposomes (Oct-SSL-DOX), in order to facilitate intracellular delivery of chemotherapeutic agent to the related tumor cells through active targeting and finally improve its antitumor activity. Three cells were proved to be different in expression level of SSTR2 and were used as model or control. It was demonstrated by fluorescence spectrophotometry, confocal laser scanning microscopy and flow cytometry that active sterically stabilized liposomes (SSL) increased intracellular delivery of DOX in SSTR2-positive cells, through a mechanism of receptor-mediated endocytosis. Compared to SSL, Oct modification on SSL exhibited little effect on the physicochemical properties of SSL. However, it reduced the circulation time of loaded-DOX to some extent in rats, increased cytotoxicity in SSTR2-positive tumor cells, enhanced drug accumulation in tumor tissue and improved anticancer efficacy in SSTR2-overexpressing tumor model. The correlation was found among intracellular uptake, cytotoxicity, drug distribution in tumor and pharmacodynamics of Oct-SSL-DOX, but not the pharmacokinetics based on plasma drug concentration. In summary, octreotide-modified SSL might be a promising system for the treatment of SSTR2-overexpressing cancers.

**Un studio sull'octreotide modificata in vescicole lipidiche ha migliorato l'efficacia antitumorale della doxorubicina nel recettore della somatostatina: 2 modelli tumorali positivi.**

Octreotide (OCT) è un ligando potenziale a causa della sua alta affinità per i recettori della somatostatina (SSTRs), in particolare sottotipo 2 (SSTR2), come le cellule tumorali molti specificamente overexpress SSTR2. In questo studio, abbiamo coniugato ottobre fino alla fine della PEG DSPE-PEG e preparato un romanzo doxorubicina (DOX)-Ott-caricati e modificati liposomi stabilizzati stericamente (SSL-Ott-DOX), al fine di facilitare la consegna intracellulare di agente chemioterapico a le cellule tumorali correlate per il tramite di targeting attivo e, infine, migliorare la sua attività antitumorale. Tre le cellule sono state dimostrato di essere diversi in livello di espressione di SSTR2 e sono stati utilizzati come modello o di controllo. E 'stato dimostrato con spettrofotometria di fluorescenza, la microscopia confocale a scansione laser e citometria a flusso

che attiva liposomi stabilizzati stericamente (SSL) è aumentato di consegna intracellulare di DOX in cellule SSTR2-positive, attraverso un meccanismo di endocitosi mediata da recettori. Rispetto a SSL, la modifica ottobre su SSL esposto poco effetto sulle proprietà fisico-chimiche della SSL. Tuttavia, ha ridotto il tempo di circolazione di carico-DOX in una certa misura nel ratto, l'aumento citotossicità nelle cellule tumorali SSTR2-positivo, una maggiore accumulo del farmaco nel tessuto tumorale e l'efficacia antitumorale migliorata in SSTR2-overexpressing modello di tumore. La correlazione è stata trovata tra captazione intracellulare, la citotossicità, la distribuzione della droga nel tumore e la farmacodinamica di Oct-SSL-DOX, ma non la farmacocinetica basati sulla concentrazione plasmatica di droga. In sintesi, octreotide-modificato SSL potrebbe essere un sistema promettente per il trattamento di SSTR2-overexpressing tumori.

97: Pisarek H, Pawlikowski M, Kunert-Radek J, Winczyk K.

### **Does the response of GH-secreting pituitary adenomas to octreotide depend on the cellular localization of the somatostatin receptor subtypes SSTR2 and SSTR5?**

Endokrynol Pol. 2010Mar-Apr;61(2):178-81. PubMed PMID: 20464704.

**INTRODUCTION:** The immunohistochemical examination of somatostatin receptor (SSTR) subtypes expression in different endocrine tumours, including pituitary adenomas, revealed membranous or cytoplasmic distribution of SSTR1-5. Currently used long-acting somatostatin analogue octreotide prefers SSTR2 and SSTR5 subtypes. In an earlier study a positive correlation between the summarized score of SSTR2A + SSTR2B expressions and growth hormone (GH) response to octreotide administration was found, independently of receptor distribution within the cell. In this study we searched for the relationship between the GH inhibitory response to acute octreotide administration and SSTR2A, SSTR2B, and SSTR5 cellular localization.

**MATERIAL AND METHODS:** Thirteen acromegalic patients underwent a test of acute administration of octreotide before surgery. The drop in GH was defined as the percentage of the basal value. The pituitary adenomas from these patients were immunostained to determine the hormonal phenotype and expression of SSTR subtypes. The subcellular distribution pattern of SSTR subtypes - membranous or cytoplasmic - was determined.

**RESULTS:** In the majority of specimens, cytoplasmic localization of receptor subtypes was observed, although membrane or mixed cytoplasmicmembranous localized immunopositivity also occurred. The drop in GH after octreotide administration varied between 57.1-96.7% (mean 82.1%). Among the patients with the cytoplasmic localization of SSTR5, the decrease in GH was significantly higher (92.0 +/- 7.0%). A tendency towards the higher response in patients with cytoplasmic localization of SSTR2A and 2B was also observed (86.8% and 87.0%, respectively).

**CONCLUSIONS:** It seems that cytoplasmic localization of SSTR5, SSTR2A, and SSTR2B is connected with enhanced GH inhibition after octreotide administration. It is possible that this somatostatin analogue alters the localization of subtypes SSTR2A and SSTR2B through the receptor internalization. As a consequence, the SSTR-immunopositivity in cell cytoplasm is increased. The cytoplasmic but not the membranous localization is connected with the higher responsiveness to the octreotide in somatotropinomas.

### **La risposta di adenomi ipofisari GH-secernenti all'octreotide dipende dalla localizzazione cellulare dei sottotipi del recettore della somatostatina SSTR2 e SSTR5?**

**INTRODUZIONE:** L'analisi immunoistochimica del recettore di somatostatina (SSTR) sottotipi espressione in diversi tumori endocrini, inclusi adenomi pituitari, ha rivelato la distribuzione membranosa o citoplasmatica di SSTR1-5. Attualmente utilizzato lunga durata d'azione octreotide,

analogo della somatostatina preferisce sottotipi SSTR2 e SSTR5. In uno studio precedente di una correlazione positiva tra il punteggio di sintesi sstr2A + espressioni SSTR2B e ormone della crescita (GH) in risposta octreotide amministrazione è stato trovato, indipendentemente dalla distribuzione del recettore all'interno della cellula. In questo studio abbiamo cercato la relazione tra la risposta del GH inibitorio della somministrazione acuta octreotide e localizzazione sstr2A, SSTR2B e SSTR5 cellulare.

**MATERIALI E METODI:** Tredici pazienti acromegalici sottoposti a una prova di somministrazione acuta di octreotide prima dell'intervento chirurgico. Il calo di GH è stato definito come la percentuale del valore basale. Gli adenomi pituitari da questi pazienti sono stati immunostained per determinare il fenotipo ormonale e l'espressione dei sottotipi SSTR. Il modello di distribuzione subcellulare dei sottotipi SSTR - membranosa o citoplasmatica - è stata determinata.

**RISULTATI:** Nella maggior parte dei campioni, la localizzazione citoplasmatica dei sottotipi del recettore è stata osservata, anche se membrana o misto immunopositività cytoplasmicmembranous localizzato anche verificato. Il calo del GH dopo la somministrazione di octreotide variava tra il 57,1-96,7% (media 82,1%). Tra i pazienti con la localizzazione citoplasmatica di SSTR5, la diminuzione del GH era significativamente più alta (92,0 +/- 7,0%). Una tendenza verso la risposta più alta nei pazienti con localizzazione citoplasmatica di sstr2A e 2B è stata anche osservata (86,8% e 87,0%, rispettivamente).

**CONCLUSIONI:** Sembra che la localizzazione citoplasmatica di SSTR5, sstr2A, e SSTR2B è collegato con una maggiore inibizione del GH dopo la somministrazione di octreotide. E' possibile che questo analogo della somatostatina, altera la localizzazione dei sottotipi sstr2A e SSTR2B attraverso l'internalizzazione recettoriale. Di conseguenza, il immunopositività SSTR nel citoplasma delle cellule è aumentato. Il citoplasma, ma non la localizzazione membranosa è collegato con la capacità di risposta superiore per l'octreotide in somatotropinomas.

105: Sancak S, Hardt A, Singer J, Klöppel G, Eren FT, Güllüoglu BM, Sen LS, Sever Z, Akalin NS, Eszlinger M, Paschke R.

**Somatostatin receptor 2 expression determined by immunohistochemistry in cold thyroid nodules exceeds that of hot thyroid nodules, papillary thyroid carcinoma, and Graves' disease.**

Thyroid. 2010 May;20(5):505-11. PubMed PMID: 20450431.

**BACKGROUND:** There is a plethora of partly contradictory reports on somatostatin receptor (SSTR) expression in thyroid tumors. Therefore, our goal was to systematically determine SSTR2 expression in benign cold thyroid nodules (CNs), hot thyroid nodules (HNs), papillary carcinomas (PCs), and Graves' disease (GD) in comparison with intraindividual control tissues by means of immunohistochemistry.

**METHODS:** Tissue sections from 19 HNs, 10 CNs, 17 PCs and their surrounding tissues, and 8 GD thyroids were immunostained for SSTR2. Membranous SSTR2 staining was quantitated by evaluating 10 high-power fields (HPFs) systematically distributed along the largest diameter of the tissue section.

**RESULTS:** The area covered by thyroid epithelial cells in 10 HPFs expressed as median (in mm<sup>2</sup>) was 0.53 for CNs, 0.44 for HNs, 1.5 for PCs, 1.3 for GD, and 0.3 for the surrounding tissues. The SSTR2 staining density determined by dividing the area of SSTR2 positively stained thyroid epithelial cells (in mm<sup>2</sup>) by the area of all thyroid epithelial cells (in mm<sup>2</sup>) in 10 HPFs was 0.1662 for CNs, 0.0204 for HNs, 0.0369 for PCs, and 0.0386 for GD.

**CONCLUSIONS:** SSTR2 expression is inhomogeneous in thyroid disease, with the highest density detected in CNs. It remains to be determined whether this finding could be of pathophysiologic or therapeutic relevance. The high SSTR2 density in CNs should be considered in the interpretation of SSTR scintigraphy-positive findings.

**L' espressione del recettore 2 della somatostatina determinata mediante immunoistochimica in noduli tiroidei freddi è superiore a quella di caldi noduli tiroidei in carcinoma papillare della tiroide, e la malattia di Graves'.**

**BACKGROUND:** C'è una plethora di rapporti in parte contraddittorie su recettori per la somatostatina (SSTR) espressione nei tumori della tiroide. Pertanto, il nostro obiettivo era quello di determinare sistematicamente espressione SSTR2 in noduli benigni tiroidei freddo (CNS), a caldo noduli tiroidei (HNS), carcinomi papillari (PC), e la malattia di Graves' (GD) in confronto con tessuti di controllo intraindividuale mediante immunoistochimica.

**METODI:** Le sezioni di tessuto da 19 HNS, 10 CN, 17 PC e le loro tessuti circostanti, e 8 tiroide GD sono stati immunostained per SSTR2. SSTR2 membranosa colorazione è stata quantificata mediante la valutazione di 10 campi ad alta potenza (HPFS) sistematicamente distribuite lungo il diametro maggiore della sezione di tessuto.

**RISULTATI:** L'area coperta da cellule epiteliali della tiroide in 10 HPFS espressi come mediana (in

mm (2)) è stato 0,53 per la CNS, 0,44 per HNS, 1,5 per PC, 1,3 per GD, e 0,3 per i tessuti circostanti. La densità SSTR2 colorazione determinato dividendo l'area di SSTR2 colorate positivamente cellule tiroidee epiteliali (in mm (2)) per la superficie di tutte le cellule epiteliali della tiroide (in mm (2)) in 10 HPFS è stato 0,1,662 mila per il sistema nervoso centrale, 0,0,204 mila per HNS, 0,0,369 mila per PC, e 0,0,386 mila per la GD. CONCLUSIONI: espressione SSTR2 è disomogeneo nelle malattie della tiroide, con la più alta densità rilevata nel sistema nervoso centrale. Resta da stabilire se questo risultato potrebbe essere di fisiopatologiche o rilevanza terapeutica. La densità SSTR2 alto nel sistema nervoso centrale devono essere considerati nell'interpretazione dei risultati SSTR scintigrafia-positivi.

113: Reubi JC, Erchegyi J, Cescato R, Waser B, Rivier JE.

**Switch from antagonist to agonist after addition of a DOTA chelator to a somatostatin analog.** Eur J NuclMed Mol Imaging. 2010 Aug;37(8):1551-8. Epub 2010 Apr 16. PubMed PMID: 20396884.

**PURPOSE:** Peptide receptor targeting has become an increasingly attractive method to target tumors diagnostically and radiotherapeutically. Peptides linked to a variety of chelators have been developed for this purpose. They have, however, rarely been tested for their agonistic or antagonistic properties. We report here on a somatostatin antagonist that switched to an agonist upon coupling to a DOTA chelator.

**METHODS:** Two novel somatostatin analogs, 406-040-15 and its DOTA-coupled counterpart 406-051-20, with and without cold Indium labeling, were tested for their somatostatin receptor subtypes 1-5 (sst(1)-sst(5)) binding affinity using receptor autoradiography. Moreover, they were tested functionally for their ability to affect sst(2) and sst(3) internalization in vitro in HEK293 cells stably expressing the human sst(2) or sst(3) receptor, using an immunofluorescence microscopy-based internalization assay.

**RESULTS:** All three compounds were characterized as pan-somatostatin analogs having a high affinity for all five sst. In the sst(2) internalization assay, all three compounds showed an identical behavior, namely, a weak agonistic effect complemented by a weak antagonistic effect, compatible with the behavior of a partial agonist. Conversely, in the sst(3) internalization assay, 406-040-15 was a full antagonist whereas its DOTA-coupled counterpart, 406-051-20, with and without Indium labeling, switched to a full agonist.

**CONCLUSION:** Adding the DOTA chelator to the somatostatin analog 406-040-15 triggers a switch at sst(3) receptor from an antagonist to an agonist. This indicates that potential radioligands for tumor targeting should always be tested functionally before further development, in particular if a chelator is added.

### **Scambio da antagonista ad agonista dopo l'aggiunta di un chelatore DOTA a un analogo della somatostatina**

SCOPO: recettore del peptide targeting è diventato un metodo sempre più interessante per colpire i tumori diagnostico e radiotherapeutically. Peptidi legati a una varietà di agenti chelanti sono stati sviluppati per questo scopo. Essi hanno, tuttavia, raramente sono stati testati per le loro proprietà agonistico o antagonisti. Segnaliamo qui su un antagonista della somatostatina che sono passate ad un agonista su abbinamento ad un chelante DOTA. METODI: Due nuovi analoghi della somatostatina, 406-040-15 e il suo omologo DOTA-accoppiato 406-051-20, con e senza freddo indio di etichettatura, sono stati testati per la loro recettori per la somatostatina sottotipi 1-5 (sst (1)-sst (5 )) affinità di legame con autoradiografia del recettore. Inoltre, essi sono stati testati funzionalmente per la loro capacità di influenzare sst (2) e SST (3) internalizzazione in vitro in cellule HEK293 che esprimono stabilmente la sst umano (2) o sst (3)

recettore, utilizzando un microscopio basato su test di interiorizzazione di immunofluorescenza. **RISULTATI:** Tutti e tre i composti sono stati caratterizzati come analoghi pan-somatostatina con un'alta affinità per tutti sst cinque. Nel sst (2) saggio di internalizzazione, tutti e tre i composti hanno mostrato un comportamento identico, vale a dire, un debole effetto agonistico accompagnato da un debole effetto antagonista, compatibile con il comportamento di un agonista parziale. Al contrario, nel sst (3) test di internalizzazione, 406-040-15 era un antagonista pieno mentre la sua controparte DOTA-accoppiati, 406-051-20, con e senza etichettatura indio, passato a un agonista completo.

**CONCLUSIONE:** L'aggiunta del chelante DOTA alla somatostatina 406-040-15 scattare un interruttore a sst (3) da un antagonista del recettore per un agonista. Ciò indica che radioleganti potenziale di tumore targeting devono essere sempre testati prima funzionalmente ulteriore sviluppo, in particolare se un chelante è aggiunto.

116: Villaume K, Blanc M, Gouysse G, Walter T, Couderc C, Nejari M, Vercherat C, Cordier-Bussat M, Roche C, Scoazec JY.

### **VEGF secretion by neuroendocrine tumor cells is inhibited by octreotide and by inhibitors of the PI3K/AKT/mTOR pathway.**

Neuroendocrinology. 2010;91(3):268-78. Epub 2010 Apr 13. PubMed PMID: 20389030.

Gastroenteropancreatic (GEP) endocrine tumors are hypervascular tumors able to synthesize and secrete high amounts of VEGF. We aimed to study the regulation of VEGF production in GEP endocrine tumors and to test whether some of the drugs currently used in their treatment, such as somatostatin analogues and mTOR inhibitors, may interfere with VEGF secretion. We therefore analyzed the effects of the somatostatin analogue octreotide, the mTOR inhibitor rapamycin, the PI3K inhibitor LY294002, the MEK1 inhibitor PD98059 and the p38 inhibitor SB203850 on VEGF secretion, assessed by ELISA and Western blotting, in three murine endocrine cell lines, STC-1, INS-r3 and INS-r9. Octreotide and rapamycin induced a significant decrease in VEGF production by all three cell lines; LY294002 significantly inhibited VEGF production by STC-1 and INS-r3 only. We detected no effect of PD98059 whereas SB203850 significantly inhibited VEGF secretion in INS-r3 and INS-r9 cells only. By Western blotting analysis, we observed decreased intracellular levels of VEGF and HIF-1 $\alpha$  under octreotide, rapamycin and LY294002. For rapamycin and LY294002, this effect was likely mediated by the inhibition of the mTOR/HIF-1/VEGF pathway. In addition to its well-known anti-secretory effects, octreotide may also act through the inhibition of the PI3K/Akt pathway, as suggested by the decrease in Akt phosphorylation detected in all three cell lines. In conclusion, our study points out to the complex regulation of VEGF synthesis and secretion in neoplastic GEP endocrine cells and suggests that the inhibition of VEGF production by octreotide and rapamycin may contribute to their therapeutic effects.

### **La secrezione da parte delle cellule tumorali neuroendocrine è inibita dall'octreotide e dagli inibitori della via PI3K/AKT/mTOR**

Gastroenteropancreatici (GEP), tumori endocrini sono tumori ipervascolari in grado di sintetizzare e secernere grandi quantità di VEGF. Abbiamo l'obiettivo di studiare la regolazione della produzione di VEGF nei tumori endocrini GEP e per verificare se alcuni dei farmaci attualmente utilizzati nel loro trattamento, come analoghi della somatostatina e inibitori di mTOR, può interferire con la secrezione di VEGF. Abbiamo quindi analizzato gli effetti del octreotide, analogo della somatostatina, l'inibitore di mTOR rapamicina, il LY294002 inibitore della PI3K, il PD98059 inibitore MEK1 e la p38 SB203850 inibitore sulla secrezione di VEGF, valutata mediante test ELISA e Western blotting, in tre linee di cellule murine endocrino, STC- 1, INS-R3 e INS-R9. Octreotide e la rapamicina ha indotto una diminuzione significativa della produzione di VEGF da tutte e tre le linee cellulari; LY294002 inibita significativamente la produzione di VEGF da STC-1

e INS-r3 solo. Abbiamo rilevato alcun effetto del PD98059 SB203850 mentre ha inibito significativamente la secrezione di VEGF in INS-R3 e R9 cellule INS-solo. Analisi di Western blotting, abbiamo osservato una diminuzione dei livelli intracellulari di VEGF e HIF-1alfa sotto octreotide, rapamicina e LY294002. Per la rapamicina e LY294002, questo effetto è stato probabilmente mediato dalla inibizione del pathway mTOR/HIF-1/VEGF. Oltre ai suoi ben noti effetti anti-secretoria, octreotide può anche agire attraverso l'inibizione del pathway PI3K/AKT, come suggerisce la diminuzione della fosforilazione di Akt rilevato in tutte e tre le linee cellulari. In conclusione, il nostro studio indica alla complessa regolazione della sintesi e la secrezione di VEGF in cellule neoplastiche endocrine GEP e suggerisce che l'inibizione della produzione di VEGF da parte octreotide e rapamicina può contribuire al loro effetti terapeutici.

122: Djekidel M, Gordon M, Shah RB, Gross MD, Avram A.

### **Renal metastasis from Hurthle cell thyroid carcinoma and its evaluation with hybrid imaging.**

Thyroid.2010 Apr;20(4):429-33. PubMed PMID: 20373987.

**BACKGROUND:** In general, thyroid carcinomas, when they behave aggressively, metastasize to lungs and occasionally to bone and brain. Metastases to other organs are distinctly unusual. Renal metastases have been reported in only 10 patients. Here we report, to the best of our knowledge, the first patient with Hurthle cell thyroid cancer and renal metastasis. The evaluation of this patient was enhanced by utilizing a variety of imaging techniques.

**SUMMARY:** The patient was a 75-year-old man who had a history of a total thyroidectomy 9 years previously for a right thyroid lobe Hurthle cell carcinoma. He postoperatively received 150 mCi (5550 MBq) of 131-I therapy and was maintained on thyrotropin suppressive therapy with levothyroxine. He presented to us with a recent history of a progressively enlarging left neck mass. The serum thyroglobulin was elevated to 1183 ng/mL. Multimodality imaging with fluorodeoxyglucose positron emission tomography-computed tomography, magnetic resonance imaging, and Somatostatin receptor scintigraphy with single photon emission computed tomography (SPECT)-computed tomography revealed numerous foci in the skeleton and right kidney. Anatomic imaging characteristics favored a primary renal cell cancer with the additional evidence of renal vein invasion and thrombosis. Histology later revealed a metastatic renal Hurthle cell cancer with positive thyroglobulin stains. Several of the skeletal foci responded partially to cryoablative therapy. The patient refused noncurative Somatostatin analog therapy. He is alive and doing well clinically.

**CONCLUSION:** The management of thyroid cancers in high-risk groups, such as our patient, frequently requires expert management by the use of novel multimodality imaging and therapeutic techniques.

### **Metastasi renali delle cellule Hurthle del carcinoma alla tiroide e sua valutazione con immagini ibride**

**BACKGROUND:** In generale, i carcinomi della tiroide, quando si comportano in modo aggressivo, metastasi ai polmoni e, occasionalmente, di ossa e cervello. Metastasi in altri organi sono nettamente insoliti. metastasi renale sono stati riportati in 10 pazienti. Riportiamo, al meglio delle nostre conoscenze, il primo paziente con tumore a cellule Hurthle tiroide e le metastasi renali. La valutazione di questo paziente è stata migliorata utilizzando una varietà di tecniche di imaging.

**SOMMARIO:** Il paziente era un uomo di 75 anni che aveva una storia di una tiroidectomia totale 9 anni prima di un diritto della tiroide carcinoma a cellule Hurthle lobo. Ha postoperatorio ricevuto 150 mCi (5.550 MBq) di 131-I e la terapia è stata mantenuta in tireotropina terapia soppressiva con levotiroxina. Ha presentato a noi con una storia recente di una massa progressivamente allargando il collo a sinistra. La tireoglobulina sierica è stata elevata a 1183 ng / mL. imaging multimodale con la tomografia ad emissione di positroni fluorodeoxyglucose tomografia computerizzata-, la risonanza magnetica, scintigrafia del recettore della somatostatina e con la tomografia a emissione di singolo

fotone (SPECT), tomografia computerizzata, ha rivelato numerosi focolai nello scheletro e rene destro. caratteristiche di imaging anatomico a favore di un tumore primario a cellule renali delle prove supplementari di invasione della vena renale e trombosi. Istologia poi rivelato un carcinoma a cellule renali metastatico Hurthle con macchie di tireoglobulina positivi. Molti dei focolai scheletrico risposto parzialmente alla terapia cryoablative. Il paziente ha rifiutato la terapia noncurative analogo della somatostatina. Egli è vivo e sta bene clinicamente. CONCLUSIONE: La gestione dei casi di cancro alla tiroide nei gruppi ad alto rischio, come il nostro paziente, richiede spesso la gestione di esperti con l'uso di imaging multimodale e nuove tecniche terapeutiche.

124: Przhialkovskaia EG, Abrosimov AIu, Grigor'ev AIu, Marova EI, RozhinskaiaLIa.

**[Prognostic value of of the expression Ki-67, CD31, and VEGF in somatotropinomas].**

Arkh Patol. 2010 Jan-Feb;72(1):35-8. Russian. PubMed PMID:20369584.

Pituitary adenomas are benign, but 30-50% of patients do not achieve remission after treatment. The purpose of the study was to analyze the prognostic value of immunoexpression of the proliferation marker Ki-67 and the angiogenetic factors CD31 and VEGF in somatotropinomas. Ki-67, CD31, and VEGF were immunohistochemically studied in the samples of 52 somatotropin-removed samples; medical records were used to analyze the outcome of treatment in the early and late postoperative periods. Ki-67 immunoexpression proved to be significantly higher in the patients who had not achieve remission both in the early ( $p = 0.042$ ) and late ( $p = 0.012$ ) postoperative period than in those who had achieved remission and in patients who were resistant to postoperative treatment with somatostatin analogues ( $p = 0.040$ ) than in those who were sensitive to therapy. The immunoexpression of CD31 and VEGF was not associated with the outcome of treatment. Thus, high Ki-67 levels may be regarded as a poor postoperative prognostic factor in acromegaly.

**Valore prognostico dell'espressione di Ki-67, CD31, e VEGF nei somatotropi nomi**

Gli adenomi pituitari sono benigni, ma il 30-50% dei pazienti che non raggiungono la remissione dopo il trattamento. Lo scopo dello studio era di analizzare il valore prognostico della immunoexpression del marcatore di proliferazione Ki-67 e dei fattori angiogenetici VEGF e CD31 in somatotropinomas. Ki-67, CD31, e VEGF sono state immunohistochemically studiati nei campioni di 52 somatotropina-campioni prelevati; cartelle cliniche sono stati utilizzati per analizzare l'esito del trattamento nei periodi precoce e tardiva post-operatorio. Ki-67 immunoexpression risultato significativamente più elevato nei pazienti che non avevano raggiunto la remissione, sia nei primi anni ( $p = 0,042$ ) e ( $p = 0,012$ ) tardo periodo post-operatorio rispetto a quelli che avevano raggiunto la remissione e in pazienti che erano resistenti alla post-operatorio trattamento con analoghi della somatostatina ( $p = 0.040$ ) rispetto a quelli che erano sensibili alla terapia. Il immunoexpression di CD31 e VEGF non è stata associata con l'esito del trattamento. Così, ad alta Ki-67 livelli può essere considerato come un povero fattore prognostico nel post-operatorio acromegalia.

125: Raïkhlin NT, Smirnova EA, Delektroskaia VV.

**[Somatostatin receptors and its analogs in diagnosis and treatment of human tumors].**  
Vopr Onkol. 2010;56(1):7-13.Review. Russian. PubMed PMID: 20361608.

130: Yuan M, Wang J, Deng J, Wang Z, Yang W, Li G, Ren B.

#### **Combination therapy in A549 cells.**

Nucl Med Biol. 2010 Apr;37(3):317-26. Epub 2010 Jan 15. PubMed PMID: 20346871.

**BACKGROUND AND AIM:** We investigated the anti-tumor effect induced by the combination of the radiotherapeutic agent (131)I-RC-160 and the prodrug 5-FC in human non-small cell lung cancer (NSCLC) A549 cells that were co-expressing the human somatostatin receptor 2 gene (hSSTR2) and E. coli cytosine deaminase gene (CD).

**METHODS:** We cloned both hSSTR2 and CD into a bicistronic mammalian expression plasmid and stably transfected it into A549 cells (pCIS-A549 cells). After antibiotic selection, SSTR expression in stable clones was determined by reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR), Western blot, flow cytometry and immunofluorescence analyses. To assess the in vivo targeting efficiency of the "engineered" A549 cells, the cells were subcutaneously injected into nude mice and the biodistribution of (99m)Tc-RC-160 was assessed at different time points. The tumor inhibitory effects of (131)I-RC-160 and/or 5-FC were evaluated by measurement of tumor growth and immunohistochemical analysis.

**RESULTS:** Multiple analyses demonstrated the successful expression of hSSTR2 in A549 cells. In vivo radioimaging revealed specific targeting of RC-160 to the tumors derived from pCIS-A549 cells when compared to those from control A549 cells. The tumor inhibitory rate of pCIS-A549 tumors in the (131)I-RC-160 plus 5-FC-treated group was significantly higher than that in the single agent-treated group, control group and control tumors.

**CONCLUSION:** Co-expression of the hSSTR2 and CD genes in tumor cells can selectively sensitize these cells to the infra-additive effects of radioisotope-labeled RC-160 and 5-FC in vivo. This approach offers a potential therapeutic strategy for the treatment of lung cancer.

#### **Terapia combinata nelle cellule A549**

**PRIORITÀ BASSA E SCOPO:** Abbiamo studiato l'effetto anti-tumorale indotta dalla combinazione di un agente radioterapica (131) I-RC-160 e il profarmaco 5-FC in cellule umane di cancro polmonare non a piccole cellule (NSCLC), le cellule A549 che sono stati co- che esprime il recettore umano della somatostatina due geni (hSSTR2) e E. coli del gene della citosina deaminasi (CD).

**METODI:** Abbiamo clonato sia hSSTR2 e CD in un plasmide bicistronico mammifero di espressione e lo trasfettate stabilmente in cellule A549 (cellule PIC-A549). Dopo la scelta degli antibiotici, espressione SSTR nei cloni stabili è stata determinata mediante trascrizione inversa e reazione a catena della polimerasi (RT-PCR), Western blot, citometria a flusso e analisi di

immunofluorescenza. Per valutare l'efficienza di targeting in vivo del "ingegnerizzati" cellule A549, le cellule sono state iniettate sottocute in topi nudi e la biodistribuzione di (99m) Tc-RC-160 è stata valutata a tempi diversi. Il tumore effetti inibitori di (131) I-RC-160 e / o 5-FC, sono stati valutati mediante la misurazione della crescita tumorale e di analisi immunohistochimica. Risultati: le analisi hanno dimostrato l'espressione più riuscita di hSSTR2 nelle cellule A549. In radioimaging vivo rivelato targeting specifico di RC-160 per i tumori derivati da cellule PIC-A549, rispetto a quelli provenienti da cellule A549 di controllo. Il tasso di tumore inibitorio dei tumori PIC-A549 nella (131) I-RC-160 plus gruppo 5-FC-trattamento era significativamente più alta rispetto a quella nel gruppo trattato con agente singolo, gruppo di controllo e di tumori di controllo. CONCLUSIONE: La co-espressione dei geni hSSTR2 e CD in modo selettivo le cellule tumorali possono sensibilizzare queste cellule agli effetti infra-additivo del radioisotopo-marcato RC-160 e 5-FC in vivo. Questo approccio offre una potenziale strategia terapeutica per il trattamento del cancro del polmone.

132: Oberg K.

**Cancer: antitumor effects of octreotide LAR, a somatostatin analog.**

Nat Rev Endocrinol. 2010 Apr;6(4):188-9. PubMed PMID: 20336162.

Treatment of nonfunctioning neuroendocrine tumors with somatostatin analogs has been controversial, given the low antitumor effects of these drugs. The ProMid study group now reports that octreotide lar (long-acting release) has a substantial antitumor effect, with longer progression-free survival compared with placebo in patients with well-differentiated neuroendocrine tumors and low tumor burden.

**Cancro: effetti antitumorali dell'octreotide LAR, un analogo della somatostatina**

Trattamento dei tumori neuroendocrini non funzionanti con analoghi della somatostatina è stata controversa, dato il basso effetti antitumorali di questi farmaci. Il gruppo di studio ProMid ora riferisce che octreotide LAR (versione lunga durata d'azione) ha un sostanziale effetto antitumorale, con più lunga sopravvivenza libera da progressione rispetto al placebo nei pazienti con tumori neuroendocrini ben differenziati e la massa tumorale bassa.

133: Fougner SL, Lekva T, Borota OC, Hald JK, Bollerslev J, Berg JP.

**The expression of E-cadherin in somatotroph pituitary adenomas is related to tumor size, invasiveness, and somatostatin analog response.**

J Clin Endocrinol Metab.2010 May;95(5):2334-42. Epub 2010 Mar 24. PubMed PMID: 20335450.

**CONTEXT:** Appropriate cell-to-cell adhesion is fundamental for the epithelial phenotype of pituitary cells. Loss of the adhesion protein E-cadherin has been associated with invasiveness, metastasis, and poor prognosis in cancers of epithelial origin. In somatotroph adenomas, a variable and reduced expression of E-cadherin has been demonstrated. In addition, nuclear translocation of E-cadherin was found to correlate with pituitary tumor invasion.

**OBJECTIVE:** The objective was to examine the protein expression of E-cadherin in somatotroph pituitary adenomas in relation to adenoma size, invasiveness, and somatostatin analog (SMS) efficacy.

**PATIENTS AND METHODS:** Eighty-three patients were included, and 29 were treated preoperatively with SMS. Adenoma E-cadherin protein expression was analyzed by Western blot (61 patients) and immunohistochemistry (IHC) (80 patients) with antibodies directed against both extracellular and intracellular domains (IHC). The acute (direct surgery group) and long-term (preoperatively treated group) SMS responses were evaluated. Baseline tumor volume and invasiveness were measured on magnetic resonance imaging scans.

**RESULTS:** Membranous E-cadherin was lost in several adenomas. Nine of these were nuclear E-cadherin positive. The E-cadherin protein expression correlated negatively to tumor size and positively to acute SMS response. Low E-cadherin levels (preoperatively treated group only) and loss of membranous E-cadherin correlated to tumor invasiveness. The E-cadherin level correlated positively to tumor reduction after SMS treatment, and adenomas with nuclear E-cadherin staining had lower IGF-I reduction and tumor shrinkage. Preoperatively treated adenomas had reduced E-cadherin protein levels, but the IHC expression was unaltered.

**CONCLUSION:** Reduced E-cadherin expression may correlate to a dedifferentiated phenotype in the somatotroph pituitary adenomas.

**L'espressione della E-caderina negli adenoma somatotropi pituitary è collegata alla grandezza del tumore, all'invasività e alla risposta all'analogo della somatostatina**

CONTESTO: appropriate cellule di adesione delle cellule è fondamentale per il fenotipo delle cellule epiteliali pituitaria. La perdita della proteina di adesione E-caderina è stata associata con invasività, metastasi e prognosi infausta nei tumori di origine epiteliale. In adenomi somatotropi, un'espressione variabile e ridotto di E-caderina è stata dimostrata. Inoltre, la traslocazione nucleare di E-caderina è stato trovato in correlazione con l'invasione del tumore pituitario.

OBIETTIVO: L'obiettivo era quello di esaminare l'espressione della proteina di E-caderina in somatotropi adenomi pituitari in relazione alle dimensioni adenoma, invasività, e analogo della somatostatina (SMS) efficacia.

**PAZIENTI E METODI:** Eighty-tre pazienti sono stati inclusi, e 29 sono stati trattati in fase preoperatoria con SMS. espressione della proteina Adenoma E-caderina è stata analizzata mediante Western Blot (61 pazienti) e immunoistochimica (IHC) (80 pazienti) con anticorpi diretti contro entrambi i domini extracellulari e intracellulari (IHC). L'acuta (gruppo chirurgico diretto) e lungo termine (fase pre-operatoria gruppo trattato) risposte di SMS sono stati valutati. volume del tumore e l'invasività di base sono stati misurati su scansioni di risonanza magnetica. **RISULTATI:** E-caderina membranosa è stato perso negli adenomi diversi. Nove di questi sono stati nucleare E-caderina positiva. La proteina di E-caderina espressione correlata negativamente a dimensioni del tumore e positivamente alla risposta acuta SMS. Bassi livelli E-caderina (preoperatively gruppo trattato solo) e la perdita di membranose E-caderina correlata alla invasività del tumore. Il livello di E-caderina correlata positivamente alla riduzione del tumore dopo il trattamento SMS, e con adenomi nucleare E-caderina macchie erano più bassi di IGF-I riduzione e riduzione del tumore. adenomi Preoperatively trattati avevano ridotto i livelli di proteina E-caderina, ma l'espressione IHC è rimasta inalterata. **CONCLUSIONE:** Ridotta espressione E-caderina è necessariamente correlato ad un fenotipo dedifferentiated in adenomi ipofisari somatotropi.

144: Morichetti D, Mazzucchelli R, Stramazotti D, Santinelli A, Lopez-Beltran A, Scarpelli M, Bono AV, Cheng L, Montironi R.

#### **Immunohistochemical expression of somatostatin receptor subtypes in prostate tissue from cystoprostatectomies with incidental prostate cancer.**

BJU Int. 2010 Oct;106(7):1072-80. doi:10.1111/j.1464-410X.2010.09238.x. Epub 2010 Mar 1. PubMed PMID: 20201837.

**OBJECTIVE:** To examine immunohistochemically the expression of the five somatostatin receptors (SSTRs) in cystoprostatectomies (CyPs) with incidental prostate cancer.

**MATERIALS AND METHODS:** The five SSTRs (SSTR1-5) were evaluated in 'normal-looking' epithelium (NEp), high-grade prostatic intraepithelial neoplasia (HGPIN) and pT2a Gleason score 6 adenocarcinoma in 20 CyP specimens with incidental prostate cancer and 20 radical prostatectomy (RP) specimens with clinically detected prostate cancer.

**RESULTS:** For cytoplasm expression, the mean percentage of positive secretory cells with strong cytoplasmic staining increased from NEp to HGPIN and prostate cancer, being slightly lower in the CyP than in the RP specimens. Both in the CyP and RP specimens SSTR4 was found in the highest percentage of cells. There was membrane staining in the secretory cells for SSTR3 and SSTR4. There was nuclear staining in the secretory cells for SSTR4 and SSTR5. For SSTR1 and SSTR3 the mean proportions of positive basal cells were higher than for the other three subtypes, and greater in NEp than in HGPIN. There were positive smooth muscle and endothelial cells for all five SSTR subtypes, the highest proportions being SSTR1 and the lowest SSTR5.

**CONCLUSIONS:** This immunohistochemical study expands our knowledge of the expression and localization of SSTRs in the various tissue components in the prostate with incidental cancer, compared with clinically detected cancer. Such information might be useful in developing further non-invasive strategies for the prevention and treatment of pre-neoplastic and neoplastic lesions of the prostate.

#### **Espressione immunoistochimica dei sottotipi del recettore della somatostatina nel tessuto prostatico da cistoprostatectomie con carcinoma prostatico incidentale**

**OBIETTIVO:** Per esaminare immunoistochimica l'espressione dei cinque recettori per la somatostatina (SSTRs) in cistoprostatectomie (CyPs) con carcinoma della prostata incidentale.

**MATERIALI E METODI:** I cinque SSTRs (SSTR1-5) sono stati valutati in 'aspetto di una normale' epitelio (NEP), ad alto grado neoplasia prostatica intraepiteliale (HGPIN) e punteggio Gleason pT2a 6 adenocarcinoma in 20 esemplari CYP con carcinoma prostatico incidentale e 20

prostatectomia radicale (RP) campioni con cancro prostatico clinicamente rilevate. **RISULTATI:** Per l'espressione citoplasma, la percentuale media di cellule secretorie positivo con una forte colorazione citoplasmatica è aumentato da NEP a HGPIN e il cancro alla prostata, essendo leggermente più bassa nel CYP che in campioni di RP. Sia nel CYP e RP SSTR4 campioni è stato trovato nella più alta percentuale di cellule. C'era marcatura di membrana nelle cellule secretorie per SSTR3 e SSTR4. C'era una colorazione nucleare nelle cellule secretorie per SSTR4 e SSTR5. Per SSTR1 e SSTR3 le proporzioni media di positivo cellule basali erano superiori a quelli per le altre tre sottotipi, e maggiore in NEP che in HGPIN. Ci sono stati positivi muscolari lisce e cellule endoteliali per tutti i cinque sottotipi di SSTR, le percentuali più elevate si SSTR1 e il più basso SSTR5.

**CONCLUSIONI:** Questo studio immunohistochemical espande la nostra conoscenza di espressione e la localizzazione di SSTRs in varie componenti del tessuto della prostata con tumore incidentale, contro il cancro clinicamente rilevate. Tali informazioni potrebbero essere utili nello sviluppo di ulteriori strategie non invasive per la prevenzione e il trattamento delle lesioni pre-neoplastiche e neoplastiche della prostata.

148: Caroli A, Antiga L, Cafaro M, Fasolini G, Remuzzi A, Remuzzi G, Ruggenti P.

### **Reducing polycystic liver volume in ADPKD: effects of somatostatin analogue octreotide.**

Clin J Am Soc Nephrol. 2010 May;5(5):783-9. Epub 2010 Feb 25. PubMed PMID: 20185596; PubMed Central PMCID: PMC2863977.

**BACKGROUND AND OBJECTIVES:** No medical treatment is available for polycystic liver disease, a frequent manifestation of autosomal-dominant polycystic kidney disease (ADPKD). In a prospective, randomized, double-blind, crossover study, 6 months of octreotide (40 mg every 28 days) therapy limited kidney volume growth more effectively than placebo in 12 patients with ADPKD.

**DESIGN, SETTING, PARTICIPANTS, & MEASUREMENTS:** In this secondary, post hoc analysis of the above study, octreotide-induced changes in liver volumes compared with placebo and the relationship between concomitant changes in liver and kidney volumes were evaluated. Those analyzing liver and kidney volumes were blinded to treatment.

**RESULTS:** Liver volumes significantly decreased from 1595 +/- 478 ml to 1524 +/- 453 ml with octreotide whereas they did not appreciably change with placebo. Changes in liver volumes were significantly different between the two treatment periods (-71 +/- 57 ml versus +14 +/- 85 ml). Octreotide-induced liver volume reduction was fully explained by a reduction in parenchyma volume from 1506 +/- 431 ml to 1432 +/- 403 ml. Changes in liver volumes were significantly correlated with concomitant changes in kidney volumes ( $r = 0.67$ ) during octreotide but not during placebo treatment. Liver and kidney volume changes significantly differed with both treatments (octreotide: -71 +/- 57 ml versus +71 +/- 107; placebo: +14 +/- 85 ml versus +162 +/- 114), but net reductions in liver (-85 +/- 103 ml) and kidney (-91 +/- 125 ml) volume growth on octreotide versus placebo were similar.

**CONCLUSIONS:** Octreotide therapy reduces liver volumes in patients with ADPKD and is safe.

### **Riduzione del volume del polmone policistico in ADPKD: effetti dell'octreotide, analogo della somatostatina**

**CONTESTO E OBIETTIVI:** Nessun trattamento medico è disponibile per la malattia del fegato policistico, una manifestazione frequente di malattia autosomica dominante del rene policistico (ADPKD). In uno studio prospettico, randomizzato, crossover in doppio cieco,, 6 mesi di octreotide (40 mg ogni 28 giorni) la terapia limitata crescita del volume del rene in modo più efficace rispetto al placebo in 12 pazienti con ADPKD. **PROGETTAZIONE, INSTALLAZIONE, PARTECIPANTI, & MISURE:** In questo secondaria,

post hoc analisi dello studio di cui sopra, octreotide cambiamenti indotti nei volumi del fegato rispetto al placebo e il rapporto tra le variazioni concomitanti nei volumi del fegato e reni sono stati valutati. Tali analisi del fegato e dei volumi del rene sono stati accecati al trattamento. RISULTATI: i volumi di fegato notevolmente diminuito dal 1595 +/- 478 ml a 1524 +/- 453 ml con octreotide mentre non cambia in maniera apprezzabile con il placebo. Cambiamenti nei volumi del fegato sono risultati significativamente differenti tra i due periodi di trattamento (-71 +/- 57 ml versus 14 +/- 85 ml). Octreotide-indotta riduzione di volume del fegato è stato interamente dovuto alla riduzione del volume del parenchima dal 1506 +/- 431 ml al 1432 +/- 403 ml. Cambiamenti nei volumi di fegato erano significativamente correlati con i cambiamenti concomitante dei volumi del rene ( $r = 0,67$ ) durante l'octreotide, ma non durante il trattamento con placebo. Fegato e cambiamenti di volume del rene differivano in modo significativo con entrambi i trattamenti (octreotide: -71 +/- 57 ml versus 71 +/- 107; placebo: +14 +/- 85 ml versus 162 +/- 114), ma riduzioni nette fegato (-85 +/- 103 ml) e renali (-91 +/- 125 ml) la crescita del volume sul octreotide rispetto al placebo sono state simili. CONCLUSIONI: La terapia con octreotide riduce i volumi di fegato nei pazienti con ADPKD ed è sicuro.

161: Heston TF, Wahl RL.

### **Molecular imaging in thyroid cancer.**

Cancer Imaging.2010 Jan 20;10(1):1-7. Review. PubMed PMID: 20159663.

Molecular imaging plays an important role in the evaluation and management of thyroid cancer. The routine use of thyroid scanning in all thyroid nodules is no longer recommended by many authorities. In the initial work-up of a thyroid nodule, radioiodine imaging can be particularly helpful when the thyroid stimulating hormone level is low and an autonomously functioning nodule is suspected. Radioiodine imaging can also be helpful in the 10-15% of cases for which fine-needle aspiration biopsy is indeterminate. Therapy of confirmed thyroid cancer frequently involves administration of iodine-131 after surgery to ablate remnant tissue. In the follow-up of thyroid cancer patients, increased thyroglobulin levels will often prompt the empiric administration of 131I followed by whole body radioiodine imaging in the search for recurrent or metastatic disease. 131I imaging of the whole body and blood pharmacokinetics can be used to determine if higher doses of 131I can be given in thyroid cancer. The utility of [18F]fluorodeoxyglucose (FDG) positron emission tomography (PET) is steadily increasing. FDG is primarily taken up by dedifferentiated thyroid cancer cells, which are poorly iodine avid. Thus, it is particularly helpful in the patient with an increased thyroglobulin but negative radioiodine scan. FDG PET is also useful in the patient with a neck mass but unknown primary, in patients with aggressive (dedifferentiated) thyroid cancer, and in patients with differentiated cancer where histologic transformation to dedifferentiation is suspected. In rarer types of thyroid cancer, such as medullary thyroid cancer, FDG and other tracers such as 99mTc sestamibi, [11C]methionine, [111In]octreotide, and [68Ga]somatostatin receptor binding reagents have been utilized. 124I is not widely available, but has been used for PET imaging of thyroid cancer and will likely see broader applicability due to the advantages of PET methodology.

### **Immagini molecolari nel cancro alla tiroide**

L'imaging molecolare svolge un ruolo importante nella valutazione e gestione del cancro della tiroide. L'uso di routine di scansione della tiroide in tutti i noduli della tiroide non è più consigliato da molte autorità. Nel primo work-up di un nodulo tiroideo, imaging con iodio radioattivo può essere particolarmente utile quando il livello di ormone stimolante la tiroide è basso e un nodulo autonomo funzionamento è sospetta. imaging con iodio radioattivo può anche essere utile nel 10-15% dei casi per i quali l'agoaspirato è biopsia indeterminato. Terapia del cancro alla tiroide

confermato comporta spesso la somministrazione di iodio-131 dopo l'intervento chirurgico per l'ablazione del tessuto residuo. Nel follow-up dei pazienti con cancro della tiroide, aumento dei livelli di tireoglobulina spesso richiede la somministrazione empirica di 131I seguito da tutta l'imaging con iodio radioattivo corpo nella ricerca di malattia recidivante o metastatico. 131I imaging di tutto il corpo e la farmacocinetica del sangue può essere utilizzato per determinare se alte dosi di 131I può essere dato nel cancro della tiroide. L'utilità di [18F] (FDG) tomografia a emissione di positroni (PET) è in costante aumento. FDG è principalmente occupato da dedifferentiated cellule di cancro alla tiroide, che sono scarsamente iodio Avid. Pertanto, è particolarmente utile nel paziente con un aumento della tireoglobulina ma radioiodio negativa scansione. FDG-PET è anche utile nel paziente con una massa del collo, ma primario sconosciuto, in pazienti con aggressivi (dedifferentiated) cancro della tiroide, e in pazienti con carcinoma differenziato in cui si sospetta la trasformazione di de-differenziazione istologica. In più rari tipi di cancro della tiroide, come il cancro midollare della tiroide, FDG e di altri traccianti, come 99mTc sestamibi, [11C] metionina, [111In] octreotide, e reagenti [68Ga] legame al recettore della somatostatina sono stati utilizzati. 124i non è ampiamente disponibile, ma è stato usato per l'imaging PET di cancro alla tiroide ed è probabile che si veda più ampia applicabilità per i vantaggi della metodologia PET.

167: Heute D, Kostron H, von Guggenberg E, Ingorokva S, Gabriel M, Dobrozemsky G, Stockhammer G, Virgolini IJ.

#### **Response of recurrent high-grade glioma to treatment with (90)Y-DOTATOC.**

J Nucl Med. 2010 Mar;51(3):397-400. Epub 2010 Feb 11. PubMed PMID: 20150267.

The treatment of patients with high-grade malignant glioma still represents an unsolved clinical problem. We report the treatment of 3 patients who had World Health Organization grade IV recurrent glioblastoma: a 23-y-old woman and 2 men aged 61 and 62 y.

**METHODS:** All 3 patients were treated with the somatostatin receptor radiopharmaceutical (90)Y-labeled [1,4,7,10-tetraazacyclododecane-N,N',N'',N'''-tetraacetic acid(0)-d-Phe(1),Tyr(3)]octreotide (DOTATOC). A cumulated dose of 1.7-2.2 GBq given in 3 or 4 cycles was locally injected into a previously implanted catheter system.

**RESULTS:** Treatment was successful in all 3 patients, with only minor side effects reported. After treatment, MRI and PET showed complete remission in one patient and partial remission in the other patients. These findings correlated well with clinical improvement and improved quality of life.

**CONCLUSION:** Receptor-mediated radionuclide therapy by locally injected (90)Y-DOTATOC is feasible and well tolerated. This approach represents an attractive strategy for the treatment of locally recurring or progressing glioblastoma.

#### **Risposta di glioma ricorrente ad alto grado al trattamento con (90)Y-DOTATOC.**

Il trattamento dei pazienti con glioma di alto grado maligno rappresenta ancora un problema irrisolto clinica. Segnaliamo il trattamento di 3 pazienti che avevano Organizzazione Mondiale della Sanità glioblastoma di IV grado ricorrente: una donna di 23-y-vecchio e 2 uomini di età compresa tra 61 e 62 y.

**METODI:** Tutti e 3 i pazienti sono stati trattati con il recettore della somatostatina radiofarmaco (90) Y-etichetta [1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N, N', N'', acido N'''-tetraacetico (0)-d -Phe (1), Tyr (3) octreotide] (DOTATOC). Una dose cumulativa di 1,7-2,2 GBq dato in 3 o 4 cicli a livello locale è stato iniettato in un sistema di catetere impiantato precedentemente.

**RISULTATI:** Il trattamento ha avuto successo in tutti e 3 i pazienti, solo con minori effetti

collaterali segnalati. Dopo il trattamento, la risonanza magnetica e PET hanno mostrato la remissione completa in un paziente e remissione parziale negli altri pazienti. Questi risultati correlato bene con miglioramento clinico e miglioramento della qualità della vita. **CONCLUSIONE:** la terapia radionuclide mediata dal recettore a livello locale da iniettare (90) Y-DOTATOC è fattibile e ben tollerato. Questo approccio rappresenta una strategia interessante per il trattamento di ricorrenti o localmente progressione glioblastoma.

172: Martinez-Alonso M, Llecha N, Mayorga ME, Sorolla A, Dolcet X, Sanmartin V, Abal L, Casanova JM, Baradad M, Yeramian A, Egado R, Puig S, Vilella R, Matias-Guiu X, Marti RM.

**Expression of somatostatin receptors in human melanoma cell lines: effect of two different somatostatin analogues, octreotide and SOM230, on cell proliferation.**

J Int Med Res. 2009 Nov-Dec;37(6):1813-22. PubMed PMID: 20146879.

Somatostatin analogues (SAs) are potential anticancer agents. This study was designed to investigate the expression of somatostatin receptors (SSTRs) in melanoma cells and the effect of two SAs on cell proliferation and viability. Eighteen primary and metastatic human cutaneous melanoma cell lines were treated with octreotide and SOM230. Expression of SSTR1, SSTR2, SSTR3 and SSTR5 was assessed by real-time polymerase chain reaction. Proliferation, viability and cell death were assessed using standard assays. Inhibition was modelled by mixed-effect regression. Melanoma cells expressed one or more SSTR. Both SAs inhibited proliferation of most melanoma cell lines, but inhibition was < 50%. Neither SA affected cell viability or induced cell death. The results suggest that melanoma cell lines express SSTRs. The SAs investigated, under the conditions used in this study, did not, however, significantly inhibit melanoma growth or induce cell death. Novel SAs, combination therapy with SAs and their anti-angiogenic properties should be further investigated.

**Espressione dei recettori della somatostatina nelle linee cellulari umane di melanoma: effetti di due differenti analoghi della somatostatina, l'octreotide e SOM230, sulla proliferazione cellulare**

Analoghi della somatostatina (SAS) sono potenti agenti antitumorali. Questo studio è stato disegnato per investigare l'espressione dei recettori per la somatostatina (SSTRs) in cellule di melanoma e l'effetto di due società di sorveglianza sulla proliferazione cellulare e la vitalità. Diciotto primari e metastatici umani linee cellulari di melanoma cutaneo sono stati trattati con octreotide e SOM230. Espressione di SSTR1, SSTR2, SSTR3 e SSTR5 è stata valutata mediante reazione di polimerizzazione a catena in tempo reale. Proliferazione, vitalità e morte cellulare sono stati valutati utilizzando dosaggi standard. L'inibizione è stata modellata con una regressione misto-effetto. Le cellule del melanoma espresso una o più SSTR. Sia SAS che hanno inibito la proliferazione delle linee più melanoma delle cellule, ma l'inibizione è stata inferiore al 50%. Né colpite SA vitalità cellulare o morte cellulare indotta. I risultati suggeriscono che le linee di cellule di melanoma esprimono SSTRs. Le società di sorveglianza indagato, secondo le condizioni utilizzate in questo studio, non ha, però, inibisce significativamente la crescita del melanoma o indurre la morte delle cellule. Romano di SCS, la terapia di combinazione con SAS e le loro proprietà anti-angiogenici dovrebbe essere ulteriormente indagato.

182: Klagge A, Krause K, Schierle K, Steinert F, Dralle H, Fuhrer D.

### **Somatostatin receptor subtype expression in human thyroid tumours.**

Horm Metab Res. 2010Apr;42(4):237-40. Epub 2010 Jan 21. PubMed PMID: 20094970.

Somatostatin receptors (SSTR) are expressed in various endocrine tumours. The expression of SSTR at the tumour cell surface confers the possibility for diagnostic imaging and therapy of tumours using radiolabeled somatostatin analogues. The majority of currently available somatostatin analogues show a higher binding affinity for the SSTR2 subtype. To date, the precise expression pattern of the SSTR subtypes 1-5 in thyroid epithelial tumours remains to be determined. We investigated the mRNA expression of SSTR1-5 in benign and malignant epithelial thyroid tumours [20 cold thyroid nodules (CTNs), 20 toxic thyroid nodules (TTNs), 20 papillary, 20 follicular, and 5 anaplastic carcinomas (PTCs, FTCs, ATCs, respectively)] and compared them to normal surrounding thyroid tissues. Four out of five SSTR subtypes were detected in malignant thyroid tumours, benign neoplasia, and normal surrounding tissue with a predominant expression of SSTR2 and SSTR5, and a weak expression of SSTR1 and SSTR3. Weak SSTR4 mRNA expression was detected in some PTCs. Compared to normal thyroid tissue, SSTR2 was significantly upregulated in PTC and ATC. In addition significant upregulation of SSTR3 was found in PTC. SSTR5 mRNA expression was increased in PTC and FTC and significantly decreased in CTN and TTN compared to normal thyroid tissue. SSTR2 is the predominant subtype in thyroid epithelial tumours with a high expression pattern, in particular, in PTC. Perspectively, the expression of distinct SSTR in thyroid epithelial tumours might represent a promising avenue for diagnostics and therapy of advanced thyroid cancer with somatostatin analogues.

### **Espressione del sottotipo del recettore della somatostatina nei tumori tiroidei umani.**

I recettori della somatostatina (SSTR) sono espressi in vari tumori endocrini. L'espressione del SSTR alla superficie delle cellule tumorali conferisce la possibilità di diagnostica per immagini e terapia dei tumori con analoghi della somatostatina radiomarcata. La maggior parte degli analoghi della somatostatina attualmente disponibili mostrano una maggiore affinità vincolante per il sottotipo SSTR2. Ad oggi, il pattern di espressione precisa del SSTR sottotipi 1-5 in tiroide tumori epiteliali, rimane da stabilire. Abbiamo studiato l'espressione di mRNA di SSTR1-5 nei tumori epiteliali benigni e maligni della tiroide [20 noduli freddi della tiroide (ctns), 20 noduli tossici della tiroide (TTNs), 20 papillare, follicolare 20, e 5 carcinoma anaplastico (CTP, FTCS, ATC, rispettivamente)], confrontandole con i tessuti normali circostanti tiroide. Quattro dei cinque sottotipi SSTR sono stati rilevati in tumori maligni della tiroide, neoplasia benigna, e normale tessuto circostante con un'espressione predominante di SSTR2 e SSTR5, e una debole espressione di SSTR1 e SSTR3. Debole SSTR4 espressione di mRNA è stato rilevato in alcune PTC. Rispetto al normale tessuto tiroideo, SSTR2 era significativamente upregulated in PTC e ATC. Inoltre upregulation significativo di SSTR3 è stato trovato in PTC. SSTR5 espressione di mRNA è stato

aumentato nel PTC e FTC e significativamente diminuita nel CTN e TTN rispetto al normale tessuto tiroideo. SSTR2 è il sottotipo predominante nella tiroide tumori epiteliali con un modello di alta espressione, in particolare, in PTC. Prospettivamente, l'espressione di SSTR distinti in tumori epiteliali della tiroide potrebbe rappresentare una strada promettente per la diagnostica e la terapia del tumore avanzato della tiroide con analoghi della somatostatina.

190: Córdoba-Chacón J, Gahete MD, Duran-Prado M, Pozo-Salas AI, Malagón MM, Gracia-Navarro F, Kineman RD, Luque RM, Castaño JP.

**Identification and characterization of new functional truncated variants of somatostatin receptor subtype 5 in rodents.**

Cell Mol Life Sci. 2010 Apr;67(7):1147-63. PubMed PMID:20063038.

Somatostatin and cortistatin exert multiple biological actions through five receptors (sst1-5); however, not all their effects can be explained by activation of sst1-5. Indeed, we recently identified novel truncated but functional human sst5-variants, present in normal and tumoral tissues. In this study, we identified and characterized three novel truncated sst5 variants in mice and one in rats displaying different numbers of transmembrane-domains [TMD; sst5TMD4, sst5TMD2, sst5TMD1 (mouse-variants) and sst5TMD1 (rat-variant)]. These sst5 variants: (1) are functional to mediate ligand-selective-induced variations in  $[Ca^{2+}]_i$  and cAMP despite being truncated; (2) display preferential intracellular distribution; (3) mostly share full-length sst5 tissue distribution, but exhibit unique differences; (4) are differentially regulated by changes in hormonal/metabolic environment in a tissue- (e.g., central vs. systemic) and ligand-dependent manner. Altogether, our results demonstrate the existence of new truncated sst5-variants with unique ligand-selective signaling properties, which could contribute to further understanding the complex, distinct pathophysiological roles of somatostatin and cortistatin.

**Identificazione e caratterizzazione di nuove varianti funzionali troncate del sottotipo del recettore della somatostatina in 5 topi**

Somatostatina e cortistatin esercitare più azioni biologiche attraverso cinque recettori (sst1-5), tuttavia, non tutti i loro effetti possono essere spiegati con l'attivazione di sst1-5. Infatti, abbiamo recentemente identificato romanzo troncato ma funzionale umano sst5-varianti, presenti nei tessuti normali e tumorali. In questo studio, abbiamo identificato e caratterizzato tre romanzo troncato sst5 varianti nei topi e ratti che mostrano uno in un diverso numero di transmembrana-domini [TMD; sst5TMD4, sst5TMD2, sst5TMD1 (mouse-varianti) e sst5TMD1 (ratto-variante)]. Queste sst5 varianti: (1) sono funzionali a mediare le variazioni ligando selettivo indotta in  $[Ca^{2+}]_i$  i cAMP e nonostante siano troncati, (2) display distribuzione intracellulare preferenziale, (3) per lo più parti full-length sst5 tessuto distribuzione, ma le differenze unica mostra, (4) sono differenzialmente regolati dai cambiamenti ormonali / ambiente metabolico in un tessuto (per esempio, centrale vs sistemica) e il modo ligando-dipendente. Complessivamente, i nostri risultati dimostrano l'esistenza di un nuovo tronco di sst5-varianti con proprietà uniche ligando selettivo di segnalazione, che potrebbero contribuire a promuovere la comprensione del complesso, distinti ruoli fisiopatologici della somatostatina e cortistatin.

195: Ohtsuki Y, Watanabe R, Kimura M, Okamoto T, Murakami S, Mizukami Y, Takeji M, Okada Y, Hayashi Y, Lee GH, Furihata M.

**Immunohistochemical and electron microscopic studies of a case of duodenal gangliocytic paraganglioma.**

Med Mol Morphol. 2009 Dec;42(4):245-9. Epub 2009 Dec 24. PubMed PMID: 20033372.

Gangliocytic paraganglioma (GPG) is a rare tumor, occurring almost exclusively in the duodenum. In the present case, a submucosal tumor 2.5 x 2 x 1.5 cm in size was located on the anal side of the papilla of Vater, with clear margins and without capsule on cut-surface examination. Tumor cells included three types of cells: ganglion-like cells (GCs), endocrine cells (ECs), and Schwann cells (SCs). The GCs were large with eccentric nuclei with large nucleoli and clear abundant cytoplasm. ECs were detected in small nests, surrounded by bundles of SCs. Immunohistochemically, GCs were positive for synaptophysin, neuron-specific enolase (NSE), and CD56. ECs were positive for chromogranin A, NSE, somatostatin, pancreatic polypeptide, and CD56, and were associated with S100 protein-positive SCs. On fine structural examination, ECs contained numerous membrane-bounded secretory granules, 250-450 nm in diameter, in their cytoplasm, surrounded by a branched, complex basal lamina. SCs possessed basal lamina along their long interlacing cytoplasmic processes. The histogenesis of GPG most likely involves proliferation and differentiation of pluripotent stem cells in the duodenal crypts in the duodenum as a true tumor, although it is also possible that the retroperitoneal components of both GCs and SCs proliferate, together with ECs, from ventral primordial tissue of the pancreas in the duodenum. The immunohistochemical and ultrastructural findings of a case of GPG are reported, focusing on three major cellular components: GCs, ECs, and SCs.

**Studi di immunoistochimica e microscopia elettronica in un caso di paraganglioma gangliocitico duodenale**

Il paraganglioma Gangliocytic (GPG) è un tumore raro, che si verifica quasi esclusivamente nel duodeno. Nel caso di specie, un tumore sottomucoso 2,5 x 2 x 1,5 cm è stata posta sul lato anale della papilla di Vater, con margini chiari e senza capsula all'esame cut-superficie. Le cellule tumorali comprendeva tre tipi di cellule: le cellule gangliari-like (GCS), le cellule endocrine (ECS), e le cellule di Schwann (CS). I GC sono stati grandi con nuclei con nucleoli eccentrici grandi e chiari citoplasma abbondante. I CE sono stati rilevati in piccoli nidi, circondato da fasci di SCS. Immunohistochemically, GC erano positivi per sinaptofisina, enolasi neurone-specific (NSE) e CD56. ECS erano positive per la cromogranina A, NSE, somatostatina, polipeptide pancreatico, e CD56, e sono stati associati con SCS-S100 proteina positivo. Il fine esame strutturale, ECS conteneva numerosi granuli di membrana-limitato secretoria, 250-450 nm di diametro, nel loro citoplasma, circondato da un ramificato, complesso lamina basale. SCs posseduto lamina basale

lungo il loro lunghi processi citoplasmatici interlacciamento. L'istogenesi di più probabile GPG coinvolge la proliferazione e differenziazione delle cellule staminali pluripotenti nelle cripte duodenali nel duodeno, come un tumore vero, ma è anche possibile che i componenti di entrambe le retroperitoneale GC e SCS proliferano, insieme con ECS, dal tessuto ventrale primordiale del pancreas nel duodeno. I risultati ultrastrutturali e immunohistochemical di un caso di GPG sono segnalati, concentrandosi su tre principali componenti cellulari: GC, ECS, e SCS.

198: Kuan CT, Wikstrand CJ, McLendon RE, Zalutsky MR, Kumar U, Bigner DD.

**Detection of amino-terminal extracellular domain of somatostatin receptor 2 by specific monoclonal antibodies and quantification of receptor density in medulloblastoma.**

Hybridoma (Larchmt). 2009 Dec;28(6):389-403. PubMed PMID:20025498; PubMed Central PMCID: PMC2854495.

Somatostatin receptor 2 (SSTR2) is expressed by most medulloblastomas (MEDs). We isolated monoclonal antibodies (MAbs) to the 12-mer (33)QTEPYDYDLTSNA(44), which resides in the extracellular domain of the SSTR2 amino terminus, screened the peptide-bound MAbs by fluorescence microassay on D341 and D283 MED cells, and demonstrated homogeneous cell-surface binding, indicating that all cells expressed cell surface-detectable epitopes. Five radiolabeled MAbs were tested for immunoreactive fraction (IRF), affinity (KA) (Scatchard analysis vs. D341 MED cells), and internalization by MED cells. One IgG(3) MAb exhibited a 50-100% IRF, but low KA. Four IgG(2a) MAbs had 46-94% IRFs and modest KAs versus intact cells ( $0.21-1.2 \times 10^8$  M<sup>-1</sup>). Following binding of radiolabeled MAbs to D341 MED at 4 degrees C, no significant internalization was observed, which is consistent with results obtained in the absence of ligand. However, all MAbs exhibited long-term association with the cells; binding at 37 degrees C after 2 h was 65-66%, and after 24 h, 52-64%. In tests with MAbs C10 and H5, the number of cell surface receptors per cell, estimated by Scatchard and quantitative FACS analyses, was  $3.9 \times 10^4$  for the "glial" phenotype DAOY MED cell line and  $0.6-8.8 \times 10^5$  for four neuronal phenotype MED cell lines. Our results indicate a potential immunotherapeutic application for these MAbs.

**Rivelazione del dominio extracellulare ammino-terminale del recettore 2 della somatostatina da parte di un anticorpo monoclonale specifico e quantificazione della densità del recettore nel medulloblastoma**

Recettore della somatostatina 2 (SSTR2) è espresso dalla maggior parte dei medulloblastomi (MEDS). Abbiamo isolato anticorpi monoclonali (MAbs) al mer-12 (33) QTEPYDYDLTSNA (44), che risiede nel dominio extracellulare del capolinea SSTR2 amminoacidi, proiettato il MAbs peptide legato da microanalisi a fluorescenza su cellule MED D341 e D283, e dimostrato omogenea sulla superficie cellulare vincolante, indicando che tutte le cellule espresso epitopi di superficie rilevabile. Cinque MAbs radiomarcato sono stati testati per la frazione di immunoreattive (IRF), l'affinità (KA) (analisi Scatchard vs D341 cellule MED), e l'interiorizzazione da parte delle cellule MED. Un IgG (3) MAb esibito un 50-100% IRF, ma basso KA. Quattro IgG (2 bis) MAbs aveva IRFS 46-94% e KAS modesto rispetto a cellule intatte ( $0,21-1,2 \times 10^8$  M<sup>-1</sup>). Conseguente al legame MAbs radiomarcato D341 MED a 4 gradi C, senza internalizzazione significativo è stato osservato, che è coerente con i risultati ottenuti in assenza di ligando. Tuttavia, tutti i MAbs esposto

associazione a lungo termine con le cellule, è obbligatoria a 37 ° C dopo 2 ore è stato 65-66%, e dopo 24 h, 52-64%. Nei test con anticorpi monoclonali C10 e H5, il numero di recettori sulla superficie cellulare per cellula, stimato da Scatchard e quantitative di analisi FACS, è stata di  $3.9 \times 10^4$  (4) per il "gliali" cellule fenotipo linea DAOY MED e  $0,6-8,8 \times 10^5$  (5) Per quattro fenotipo neuronale MED linee cellulari. I nostri risultati indicano una potenziale applicazione immunoterapeutico per questi MAbs.

216: Songgang L, Jiyu L, Gongwei, Yingbin L, Yiyu Q, Zhiwei Q.

**Somatostatin enhances the chemosensitivity of GBC-SD cell line to doxorubicin through arresting the cell cycle to S phase rather than through the P53/Bax-depended apoptosis way in vitro.**

Hepatogastroenterology. 2009 Sep-Oct;56(94-95):1253-60.PubMed PMID: 19950772.

**BACKGROUND/AIMS:** As one of the mostly aggressive and fatal malignancy, gallbladder carcinoma has been known to be resistant to many anticancer drugs. Although it is under active investigation, it is still difficult to achieve satisfactory effect for most chemo-drugs on this tumor. It has previously reported that somatostatin could increase the chemosensitivity of gallbladder carcinoma cells (GBC-SD) and reduce the therapeutic dose of Doxorubicin in killing GBC-SD cells. SST could enhance the chemosensitivity of gallbladder carcinoma to Doxorubicin (DOX) by transient arresting cell cycle to S phase. We tried to clarify the mechanism by which SST utilized to enhance the chemosensitivity of GBC-SD cells to DOX. We further investigated whether the enhanced chemosensitivity of GBC-SD cells to DOX in the presence of SST is via apoptosis or cell cycle regulation. In addition, we also looked into related factors involved in cell cycle regulation and apoptosis.

**METHODOLOGY:** Twenty-four hours after somatostatin treatment, doxorubicin was gradually added and the growth curve of GBC-SD cells was determined according to MTT test. Cell apoptosis was measured by flow cytometry (FCM) using Annexin V/ Propidium Iodide Binding. Cell cycle was also examined by FCM. The somatostatin receptor (SSTR) subtypes in GBC-SD cells were identified using immunocytochemistry and RT-PCR assay. The expressions of p53, Bax and phosphorylated RB (pRB) protein were examined using western blotting assay.

**RESULTS:** When GBC-SD cells were treated with SST alone, no significant cell growth inhibition and cell apoptosis were observed. SST could induce a transient S phase arrest in GBC-SD cells. The mRNA expression of SSTR1, 2, 3, 4, 5 were all detected in GBC-SD cells, whereas only SSTR1, 2, 3 were detected in GBC-SD cells using immunocytochemistry assay. After GBC-SD cells were treated with SST for 24h, the expression level of p53 and Bax protein in GBC-SD cells was similar to that of the control group, however up-regulated pRB protein expression was observed ( $p < 0.05$ ).

**CONCLUSIONS:** Our results suggested that the synergistic inhibitory effect of somatostatin and doxorubicin co-treatment on GBC-SD cells was not due to SST induced apoptosis concerning the expression of p53 and Bax protein. Our data clearly showed all 5 SST receptor subtypes expressed in GBC-SD cells by RT-PCR and 3 SST receptors by immunocytochemistry. Accumulated evidence has been proved the relationship between cell cycle regulation and RB protein phosphorylation. In the chemosensitized GBC-SD cell line treated with SST, phosphorylated RB and cell cycle arrest were simultaneously manifested. We reasoned that somatostatin might enhance

the chemosensitivity of GBC-SD cells to doxorubin through arresting the cell cycle at S phase, but not P53 and Bax protein induced cell apoptosis.

**La somatostatina aumenta la chemiosensibilità delle cellule della linea GBC-SD alla doxorubicina attraverso l'arresto del ciclo cellulare alla fase S, piuttosto che attraverso l'intervento di P53/Bax-dependent apoptosi in vitro.**

**BACKGROUND / AIMS:** Come una delle neoplasie più aggressive e fatali, carcinoma della cistifellea è stato conosciuto per essere resistenti a molti farmaci antitumorali. Anche se è sotto inchiesta attivo, è ancora difficile da ottenere un effetto soddisfacente, per la maggior parte chemio-droga su questo tumore. Si è in precedenza riferito che somatostatina potrebbe aumentare la chemiosensibilità delle cellule di carcinoma della colecisti (GBC-SD) e di ridurre la dose terapeutica di doxorubicina nell'uccidere le cellule GBC-SD. SST potrebbe migliorare la chemiosensibilità del carcinoma della cistifellea a Doxorubicin (DOX) da transitori di arresto del ciclo cellulare alla fase S. Abbiamo cercato di chiarire il meccanismo attraverso il quale SST utilizzate per rafforzare la chemiosensibilità delle cellule GBC-SD da DOX. Abbiamo esaminato se il maggiore chemiosensibilità delle cellule GBC-SD per DOX in presenza di SST è tramite la regolazione del ciclo cellulare o apoptosi. Inoltre, abbiamo anche esaminato i fattori legati coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare e apoptosi.

**METODOLOGIA:** Ventiquattro ore dopo il trattamento della somatostatina, la doxorubicina è stato aggiunto a poco a poco e la curva di crescita delle cellule GBC-SD è stato determinato in base ai test MTT. Apoptosi delle cellule è stata misurata mediante citometria a flusso (FCM) utilizzando annessina V / propidio ioduro Binding. Ciclo cellulare è stata anche esaminata dal FCM. Il recettore della somatostatina (SSTR) sottotipi di cellule GBC-SD sono stati identificati mediante immunocitochimica e test RT-PCR. Le espressioni di p53, Bax e fosforilato RB (pRB) della proteina sono stati esaminati con analisi western blotting.

**RISULTATI:** Quando le cellule GBC-SD sono stati trattati con SST da solo, non significativa inibizione della crescita cellulare e apoptosi delle cellule sono stati osservati. SST potrebbe indurre un transitorio arresto fase S nelle cellule GBC-SD. L'espressione di mRNA SSTR1, 2, 3, 4, 5 sono stati tutti rilevati nelle cellule GBC-SD, mentre solo SSTR1, 2, 3 sono stati rilevati nelle cellule GBC-SD utilizzando analisi immunocitochimica. Dopo le cellule GBC-SD sono stati trattati con SST per 24 ore, il livello di espressione di p53 e di proteine in cellule Bax GBC-SD era simile a quella del gruppo di controllo, tuttavia up-regolata l'espressione della proteina pRB è stato osservato ( $p < 0,05$ ).

**CONCLUSIONI:** I nostri risultati suggeriscono che l'effetto sinergico inibitorio della somatostatina e doxorubicina co-terapia su cellule GBC-SD non era dovuta ad apoptosi indotta SST riguardanti l'espressione di p53 e di proteine Bax. I nostri dati hanno mostrato chiaramente tutti e 5 i sottotipi del recettore SST espresso in cellule di GBC-SD mediante RT-PCR e 3 recettori della SST mediante immunocitochimica. Dati raccolti è stato dimostrato il rapporto tra regolazione del ciclo cellulare e la fosforilazione della proteina RB. Nel chemosensitized linea cellulare GBC-SD trattati con SST, fosforilato RB e arresto del ciclo cellulare sono stati contemporaneamente manifesta. Abbiamo pensato che somatostatina potrebbe aumentare la chemiosensibilità delle cellule GBC-SD per doxorubin attraverso arrestare il ciclo cellulare in fase S, ma non P53 e Bax proteina induce apoptosi delle cellule.

219: Beck-Peccoz P, Persani L, Mannavola D, Campi I.

**Pituitary tumours: TSH-secreting adenomas.**

Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2009 Oct;23(5):597-606.

Thyrotropin-secreting pituitary adenomas (TSHomas) are a rare cause of hyperthyroidism and account for less than 2% of all pituitary adenomas. In the last years, the diagnosis has been facilitated by the routine use of ultra-sensitive TSH immunometric assays. Failure to recognise the presence of a TSHoma may result in dramatic consequences, such as improper thyroid ablation that may cause the pituitary tumour volume to further expand. The diagnosis mainly rests on dynamic testing, such as T3 suppression tests and TRH, which are useful in differentiating TSHomas from the syndromes of thyroid hormone resistance. The first therapeutical approach to TSHomas is the pituitary neurosurgery. The medical treatment of TSHomas mainly rests on the administration of somatostatin analogues, such as octreotide and lanreotide, which are effective in reducing TSH secretion in more than 90% of patients with consequent normalisation of FT4 and FT3 levels and restoration of the euthyroid state.

**Tumori pituitary: adenoma TSH secernenti**

Adenomi pituitari con secrezione di tireotropina (TSHomas) sono una rara causa di ipertiroidismo e rappresentano meno del 2% di tutti gli adenomi pituitari. Negli ultimi anni, la diagnosi è stata facilitata dall'uso abituale di test TSH ultrasensibile immunometrico. Il mancato riconoscimento della presenza di un TSHoma può portare a conseguenze drammatiche, come improprio ablazione della tiroide, che può causare il volume del tumore ipofisario di espandersi ulteriormente. La diagnosi si fonda principalmente su test dinamici, come il test di soppressione con T3 e TRH, che sono utili nel differenziare TSHomas dalle sindromi di resistenza dell'ormone tiroideo. Il primo approccio terapeutico per TSHomas è la neurochirurgia pituitaria. Il trattamento medico del TSHomas basa principalmente sulla somministrazione di analoghi della somatostatina, come l'octreotide e lanreotide, che sono efficaci nel ridurre la secrezione di TSH in più del 90% di pazienti con normalizzazione conseguente di FT4 e livelli di FT3 e ripristino dello stato di eutiroidismo.

224: Kimura N, Tateno H, Saijo S, Horii A.

**Familial cervical paragangliomas with lymph node metastasis expressing somatostatin receptor type 2A.**

Endocr Pathol.2010 Jun;21(2):139-43.

We report a case of familial, bilateral cervical paragangliomas (PGs) with lymph node metastasis. Patient I-1 is a 56-year-old man with a right carotid body tumor and a left vagal PG. Patient II-1 is a 29-year-old woman and the daughter of Patient I-1; she had a left carotid body tumor with regional lymph node metastasis. Histology of all the tumors showed the typical pattern of PGs, i.e., a zellballen pattern composed of chief cells positive for chromogranin A, and sustentacular cells positive for S100 protein. The Ki-67 labeling index was 1% to 3% in these PGs in both the primary and the metastatic tumors. Immunohistochemical analysis showed expression of somatostatin receptor (sstr) type 2A, but was negative for sstr type 5. Genomic mutation in succinate dehydrogenase type D was confirmed in both patients. Here, we present a case of familial PGs, and discuss the cases with special reference to pathologic diagnosis, genetics, and treatment.

**I paragangliomi familiari e cervicali con metastasi linfonodali esprimere il recettore di tipo 2A recettore per la somatostatina.**

Segnaliamo un caso di familiare, paragangliomi bilaterale del collo dell'utero (PG) con metastasi linfonodali. I-1 paziente è un uomo di 56 anni con un tumore del corpo carotideo destro e un sinistro PG vagale. Paziente II-1 è una donna di 29 anni e la figlia del paziente I-1, aveva un tumore di sinistra del corpo carotideo con metastasi nei linfonodi regionali. Istologia di tutti i tumori hanno mostrato il modello tipico di PG, cioè, un modello zellballen composto di cellule positive per il capo A cromogranina, e le cellule sustentacular positivo per proteina S100. L'indice-67 etichettatura Ki era di 1% al 3% in questi PG in entrambi i primari ed i tumori metastatici. L'analisi immunoistochimica ha mostrato l'espressione di recettori per la somatostatina (SSTR) di tipo 2A, ma è stato negativo per il tipo di sstr 5. Mutazione genomica in D succinato deidrogenasi tipo è stata confermata in entrambi i pazienti. Qui, presentiamo un caso di PG familiare, e discutere i casi con particolare riferimento alla diagnosi patologica, genetica, e di trattamento.

226: Ruscica M, Arvigo M, Gatto F, Dozio E, Feltrin D, Culler MD, Minuto F, Motta M, Ferone D, Magni P.

### **Regulation of prostate cancer cell proliferation by somatostatin receptor activation.**

Mol Cell Endocrinol. 2010 Feb;315(1-2):254-62. Epub 2009 Nov 20. PubMed PMID: 19932151.

Although some evidence supports the antitumoral effects of somatostatin (SRIF) and related agonists, the available data in prostate cancer (PCa) model systems and clinical studies are few, conflicting and not conclusive. This study investigated the effects of lanreotide and new mono- and bi-specific SRIF agonists on proliferation, ligand-driven SRIF receptor (sst) dimerization and secretory pattern of the IGF system in LNCaP cells, a model of androgen-dependent PCa. LNCaP expressed all sst(s), but sst(4). Among them, sst(1) and sst(3) were inversely regulated by serum concentration. sst(1)/sst(2) and sst(2)/sst(5) dimers were constitutively present and further stabilized by treatment with BIM-23704 (sst(1)/sst(2)) and BIM-23244 (sst(2)/sst(5)), respectively. Dose-response studies showed that lanreotide and BIM-23244 were significantly more potent in inhibiting LNCaP cell proliferation than BIM-23120 (sst(2)) and BIM-23206 (sst(5)) alone or in combination. Treatment with BIM-23296 (sst(1)) markedly reduced cell proliferation, whereas exposure to BIM-23704 resulted in a lower cell growth inhibition. The antiproliferative effects of BIM-23244, lanreotide and BIM-23704 were unchanged, reduced and abolished by the sst(2) antagonist BIM-23627, respectively. All SRIF analogs caused a significant induction in p27(Kip1) and p21 and down-regulation of protein expression of cyclin E, as well as reduced IGF-I and IGF-II secretion. In particular, the administration of exogenous IGF-I, at variance to IGF-II, counteracted the inhibitory effect on cell proliferation of these compounds. Moreover, SRIF agonists reduced endogenous IGF-BP-3 proteolysis. These results show that, in LNCaP cells, activation of sst(1) and sst(2)/sst(5) results in relevant antiproliferative/antisecretive actions.

### **Regolazione della proliferazione cellulare del cancro alla prostata attraverso l'attivazione del recettore della somatostatina.**

Anche se alcune evidenze supporta gli effetti antitumorali della somatostatina (SRIF) e agonisti collegate, i dati disponibili nel cancro della prostata (PCa) sistemi modello e gli studi clinici sono pochi, contrastanti e non conclusivi. Questo studio ha studiato gli effetti di lanreotide e mono-e bi nuove specifiche per agonisti SRIF sulla proliferazione, ligando del recettore-driven SRIF (SST) dimerizzazione e pattern secretorio del sistema IGF nelle cellule LNCaP, un modello di androgeno-dipendenti PCa. LNCaP espresso sst tutti (s), ma sst (4). Tra questi, sst (1) e SST (3) erano inversamente regolato dalla concentrazione sierica. sst (1) / sst (2) e SST (2) / sst (5) dimeri sono stati costitutivamente presenti e ulteriormente stabilizzata mediante trattamento con BIM-23.704 (SST (1) / sst (2)) e BIM-23.244 (SST (2) / sst (5)), rispettivamente.

Studi di dose-risposta è emerso che lanreotide e BIM-23.244 sono risultati significativamente più potente nell'inibire la proliferazione delle cellule LNCaP di BIM-23.120 (SST (2)) e BIM-23.206 (SST (5)) da solo o in combinazione. Il trattamento con BIM-23.296 (SST (1)) ha ridotto marcatamente la proliferazione cellulare, mentre l'esposizione al BIM-23.704 determinato una inibizione delle cellule crescita inferiore. Gli effetti antiproliferativi della BIM-23.244, lanreotide e BIM-23.704 sono rimasti invariati, ridotto e abolito dalla SST (2) antagonista BIM-23.627, rispettivamente. Tutti gli analoghi della SRIF causato una significativa induzione in p27 (Kipi) e p21 e down-regolazione dell'espressione della proteina ciclina di E, così come ridotti di IGF-I e la secrezione di IGF-II. In particolare, la somministrazione esogena di IGF-I, a differenza di IGF-II, contrastato l'effetto inibitorio sulla proliferazione cellulare di questi composti. Inoltre, agonisti SRIF ridotto endogeno IGFBP-3 proteolisi. Questi risultati mostrano che, nelle cellule LNCaP, l'attivazione di SST (1) e SST (2) / sst (5) si traduce in rilevanti azioni antiproliferativo / antisecretive.

228: Georgieva I, Koychev D, Wang Y, Holstein J, Hopfenmüller W, Zeitz M, Grabowski P.

**ZM447439, a novel promising aurora kinase inhibitor, provokes antiproliferative and proapoptotic effects alone and in combination with bio- and chemotherapeutic agents in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumor cell lines.**

Neuroendocrinology. 2010;91(2):121-30. Epub 2009 Nov 14. PubMed PMID:19923785.

Background: Therapeutic approaches to gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors (GEP-NETs) are still not satisfactory. A new direction in treatment options could be the novel aurora kinase inhibitor ZM447439, which was previously reported to interfere with the mitotic spindle integrity checkpoint and chromosome segregation, but does not interfere with other kinases when used up to 5 µM. Methods: We evaluated the antineoplastic effects of ZM447439 on growth and apoptosis of the GEP-NET cell lines BON, QGP-1 and MIP-101, representing the different malignant tumor types, using standard cell biological tests as crystal violet assays, caspase activation, DNA fragmentation and cell cycle analysis. Results: ZM447439 dose-dependently inhibited proliferation of all three cell lines with IC(50) values in the nanomolar to low micromolar range. Moreover, aurora kinase inhibition by ZM447439 potently induced apoptosis, which was accompanied by DNA fragmentation and caspase 3 and 7 activation. Furthermore, we observed cell cycle arrest at G(0)/G(1) phase as well as a block in G(2)/M transition. In addition, combined treatment with the chemotherapeutic agents streptozocin and cisplatin augmented significantly the antiproliferative effects of those agents. Conclusion: Aurora kinase inhibition by ZM447439 seems to be a promising new therapeutic approach in GEP-NETs, which should be evaluated in further clinical trials.

**ZM447439, un promettente nuovo inibitore delle chinasi Aurora, provoca effetti antiproliferativi e proapoptotici da solo e in combinazione con agenti biologici e chemioterapici in linee cellulari di tumore neuroendocrino gastroenteropancreatico.**

Background: approcci terapeutici per i tumori neuroendocrini gastroenteropancreatici (GEP-NET) non sono ancora soddisfacenti. Una nuova direzione nelle opzioni di trattamento potrebbe essere il romanzo aurora ZM447439 inibitore della chinasi, che è stato precedentemente segnalato per interferire con il checkpoint mitotico integrità del mandrino e la segregazione dei cromosomi, ma non interferisce con altre chinasi quando viene utilizzato fino a 5 mamma. Metodi: Abbiamo valutato l'effetto antineoplastico del ZM447439 sulla crescita e l'apoptosi di linee cellulari del GEP-NET BON, QGP-1 e MIP-101, che rappresentano i diversi tipi tumore maligno, mediante prove standard di cellule biologiche come test violetto cristallo, l'attivazione delle caspasi,

Frammentazione del DNA e l'analisi del ciclo cellulare. Risultati: ZM447439 dose-dipendente hanno inibito la proliferazione di tutte e tre le linee cellulari con IC (50) valori nella nanomolari di bassa gamma micromolare. Inoltre, l'inibizione della chinasi Aurora da ZM447439 potentemente indotto apoptosi, che è stata accompagnata da frammentazione del DNA e caspasi 3 e 7 di attivazione. Inoltre, abbiamo osservato arresto del ciclo cellulare in G (0) / G (1) fase così come un blocco in G (2) / M transizione. Inoltre, il trattamento combinato con la streptozocina agenti chemioterapici e cisplatino aumentata in modo significativo gli effetti antiproliferativi di tali agenti. Conclusione: l'inibizione della chinasi Aurora da ZM447439 sembra essere un promettente nuovo approccio terapeutico in GEP-NET, che dovrebbe essere ulteriormente valutato in studi clinici.

238: Liu Z, Marquez M, Nilsson S, Holmberg AR.

### **Comparison of protein expression in two prostate cancer cell-lines, LNCaP and DU145, after treatment with somatostatin.**

J Neurooncol.2010 May;98(1):151-2. Epub 2009 Nov 6. PubMed PMID: 19894022.

The mechanisms underlying prostate cancer progression are poorly understood. Proteins responsive to androgens may be involved in the development and progression of prostate cancer and the ultimate failure of androgen-ablation therapy. Therapy with somatostatin (sms) analogues could be a possible therapeutic alternative to chemotherapy in hormone refractory prostate cancer patients. We used two prostate cancer cell-lines, LNCaP (androgen-dependent) and DU145 (androgen-independent), to compare the protein expressions. Both cell lines were treated with sms and its derivative smsdx. Smsdx is a glycosylated poly sms with high stability suitable for clinical use. A comparison study of protein expression was analyzed by means of two-dimensional gel electrophoresis (2DE) followed by mass spectrometric analysis. Marked quantitative differences were observed in the protein expression profiles in sms/smsdx treated LNCaP and DU145 cells compared to the control cells. One third of the detected proteins were differentially expressed (PRDXs, hnRNPs, HSPs, RKIP). Concordance in protein expression patterns was observed between smsdx and sms treated cells with strong agreement between the up- and down-regulation of proteins. Fifty-eight (isoforms of 49 proteins) protein spots were identified and found differentially expressed at 2-fold change between LNCaP and DU145 cells. Thirty-one proteins in LNCaP have higher expressions than in DU145. Twenty-seven proteins in DU145 have higher expressions than in LNCaP. Most of the differentially expressed proteins (2-fold) between LNCaP and DU145 cells were affected by sms/smsdx treatment (1.2- to 2.6-fold change). Sms/smsdx affects the mitochondria of prostate cancer cells in a way that eventually triggers mitochondrial-mediated apoptosis. Regulation of certain proteins (e.g., RKIP, VDACs) by sms/smsdx suggests that sms/smsdx exerts its effects on prostate cancer cells via MAPK pathway and by regulating the activities of phosphotyrosine phosphatases.

### **Confronto di espressione della proteina in due linee cellulari di cancro della prostata, LNCaP e DU145, dopo il trattamento con la somatostatina.**

I meccanismi sottostanti la progressione del cancro alla prostata sono poco conosciute. Proteine sensibile agli androgeni possono essere coinvolte nello sviluppo e nella progressione del cancro alla prostata e il definitivo fallimento della terapia androgeno-ablazione. La terapia con somatostatina (SMS) analoghi potrebbe essere una possibile alternativa terapeutica alla chemioterapia nei pazienti con tumore della prostata refrattario agli ormoni. Abbiamo utilizzato due carcinoma prostatico linee cellulari, LNCaP (androgeno-dipendente) e DU145 (androgeno-indipendente), per confrontare le espressioni proteiche. Entrambe le linee cellulari sono state trattate con sms e smsdx suoi derivati. Smsdx è un sms glicosilata poli con l'alta stabilità adatti per l'uso clinico. Uno studio di confronto di

espressione proteica è stata analizzata mediante gel elettroforesi bidimensionale (2DE), seguita da analisi di spettrometria di massa. Marcate differenze quantitative sono state osservate in profili di espressione della proteina in sms / smsdx trattato cellule LNCaP e DU145 rispetto alle cellule di controllo. Un terzo delle proteine individuate sono differenzialmente espressi (PRDXs, hnRNPs, HSP, RKIP). Concordanza nei modelli di espressione della proteina è stata osservata tra smsdx e sms cellule trattate con l'accordo forte tra la up-e down-regolazione delle proteine.

Cinquantotto (isoforme di 49 proteine) punti della proteina sono stati identificati e trovati differenzialmente espressi a cambiare due volte tra le cellule LNCaP e DU145. Trentuno le proteine in LNCaP hanno una maggiore espressioni che in DU145. Ventisette le proteine in DU145 hanno una maggiore espressioni che in LNCaP. La maggior parte delle proteine differenzialmente espresse (2 volte) tra le cellule LNCaP e DU145 sono stati colpiti da sms / trattamento smsdx (1.2-a cambiare 2,6 volte). Sms / smsdx colpisce i mitocondri delle cellule del cancro alla prostata in un modo che innesca alla fine apoptosi mitocondriale-mediata. Il regolamento di alcune proteine (ad esempio, RKIP, VDACs) per SMS / smsdx suggerisce che sms / smsdx esercita i suoi effetti sulle cellule di cancro alla prostata attraverso via MAPK e regolando l'attività di fosfatasi fosfotirosina.

241: Sui C, Ma Q, Nan K, Xiao J, Suo A, Sha H, Zhao L.

### **hSSTR2 expression and octreotide treatment reverses multidrug resistance of BxPC-3 human pancreatic cancer cells.**

Oncol Rep. 2009 Dec;22(6):1391-6. PubMed PMID: 19885591.

Pancreatic cancer is generally refractory to most chemotherapeutic agents. We investigated whether hSSTR2 expression and octreotide treatment reverse multidrug resistance of human pancreatic cancer cells. We used pancreatic cancer cells that were transfected by using a lentivirus expression system, which allowed stable expression of the hSSTR2 gene in the pancreatic cancer cells. BxPC-3 cells were transfected with hSSTR2 through a lentivirus vector pWP XL-MOD-SSTR2 in order to enable the expression of hSSTR2. The transfected cells were treated with different concentrations of octreotide and with the chemotherapeutic agents cisplatin, epirubicin, fluorouracil and gemcitabine. The changes in IC50 following treatment with chemotherapeutic agents were determined, and the expression of different MDR indicating marker genes, multidrug resistance gene-1 (MDR1), multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2), and lung resistance-related protein (LRP), were evaluated. Octreotide treatment of the transfected cells significantly decreased the IC50 of chemotherapeutic agents in a dose-dependent manner. hSSTR2 gene transfection decreased MDR1, MRP2 and LRP expression by 57, 47 and 56%, respectively ( $P < 0.01$ ), and octreotide treatment (1.6 microg/ml) for 48 h, decreased it further by 88, 73 and 87%, respectively ( $P < 0.01$ ). These data suggested that the down-regulation of MDR genes is responsible for the improvement in the chemotherapeutic sensitivity of hSSTR2-expressing pancreatic cancer cells, when these cells are subjected to octreotide treatment.

### **L'espressione di SSTR2 e il trattamento con octreotide inverte multi-resistenza ai farmaci di cellule BxPC-3 umane di cancro del pancreas.**

Il tumore al pancreas è generalmente refrattaria alla maggior parte degli agenti chemioterapici. Abbiamo studiato se hSSTR2 espressione e il trattamento con octreotide invertire multifarmaco resistenza delle cellule umane di cancro del pancreas. Abbiamo utilizzato cellule del tumore pancreatico che sono state transfettate con un sistema di lentivirus espressione, che ha permesso l'espressione stabile del gene hSSTR2 nelle cellule tumorali del pancreas. BxPC-3 cellule sono state transfettate con hSSTR2 attraverso un lentivirus vettore PWP XL-MOD-SSTR2 al fine di consentire l'espressione di hSSTR2. Le cellule transfettate sono state trattate con differenti concentrazioni di octreotide e con il chemioterapico cisplatino agenti, epirubicina, fluorouracile e gemcitabina.

I cambiamenti nella IC50 in seguito a trattamento con agenti chemioterapici sono stati determinati, e l'espressione di MDR diversi geni marcatori che indicano, multidrug resistance gene-1 (MDR1), multidrug proteine associate alla resistenza 2 (MRP2), del polmone e della proteina di resistenza-correlate (LRP), sono stati valutati. Trattamento con octreotide delle cellule transfettate ridotto significativamente i valori di IC50 di agenti chemioterapici in modo dose-dipendente. hSSTR2 transfezione del gene MDR1 è diminuito, espressione MRP2 e LRP del 57, 47 e 56%, rispettivamente ( $P < 0,01$ ), e il trattamento con octreotide (1,6 microg / ml) per 48 ore, è diminuito ulteriormente da 88, 73 e 87 %, rispettivamente ( $P < 0,01$ ). Questi dati suggeriscono che la down-regolazione dei geni MDR è responsabile per il miglioramento della sensibilità di chemioterapici hSSTR2 cellule che esprimono il cancro al pancreas, queste cellule quando sono sottoposte a trattamento con octreotide.

247: Borbath I, Leclercq IA, Sempoux C, Abarca-Quinones J, Desaegeer C, Horsmans Y.

### **Efficacy of lanreotide in preventing the occurrence of chemically induced hepatocellular carcinoma in rats.**

Chem Biol Interact. 2010 Jan 5;183(1):238-48.Epub . PubMed PMID: 19874807.

Hepatocellular carcinoma (HCC) is increasing worldwide and is the third cause of cancer-related death. HCC develops in a pre-neoplastic organ, the cirrhotic liver. Therefore, chemoprevention could play a role in the management of HCC. We have previously shown that lanreotide, a somatostatin analogue, inhibits the development of "foci of altered hepatocytes", which represent very early neoplastic changes in rat liver. Here we induced bona fide HCC by means of a different chemically induced model that is known to lead to significant fibrosis before HCC appearance. Lanreotide was given from the beginning of the experiment in one group and from the time when significant fibrosis was present in the second group. Lanreotide decreased the frequency of occurrence of HCC in both groups. In both groups, significant decreases in hepatocyte proliferation and inhibition of fibrosis were demonstrated. When given at the start of the experiment, lanreotide dramatically decreased levels of angiogenic factors and enhanced apoptosis. Further work on the anti-tumoral effect of lanreotide is called for to assess the mechanistic relationships of its anti-proliferative and anti-angiogenic actions on liver neoplastic cells.

### **Efficacia di lanreotide nel prevenire l'insorgenza di carcinoma epatocellulare indotto chimicamente in topi.**

Il carcinoma epatocellulare (HCC) è in aumento in tutto il mondo ed è la terza causa di morte per cancro. HCC si sviluppa in un organo pre-neoplastiche del fegato cirrotico. Pertanto, chemioprevenzione potrebbe giocare un ruolo nella gestione del carcinoma epatocellulare. Abbiamo precedentemente dimostrato che lanreotide, un analogo della somatostatina, inibisce lo sviluppo di "focolai di epatociti alterati", che rappresentano alterazioni neoplastiche molto presto nel fegato di ratto. Qui abbiamo indotto in buona fede HCC per mezzo di un modello diverso indotta chimicamente che è noto per portare a fibrosi significativa prima della comparsa di HCC. Lanreotide è stata data fin dall'inizio di questo esperimento in un gruppo e dal momento in cui la fibrosi significativa è stata presente nel secondo gruppo. Lanreotide ha diminuito la frequenza di comparsa di HCC in entrambi i gruppi. In entrambi i gruppi, una significativa diminuzione nella proliferazione degli epatociti e l'inibizione della fibrosi sono state dimostrate. Quando somministrato all'inizio dell'esperimento, lanreotide drasticamente ridotti livelli di fattori angiogenetici e l'apoptosi aumentata. Ulteriori lavori sugli effetti anti-tumoral di lanreotide è necessaria al fine di valutare le relazioni meccanicistica della sua azione anti-proliferativa e anti-angiogenica sulle cellule neoplastiche del fegato.

255: Anthony L, Freda PU.

**From somatostatin to octreotide LAR: evolution of a somatostatin analogue.**

Curr Med Res Opin. 2009 Dec;25(12):2989-99.

**BACKGROUND:** Acromegaly is characterized by overproduction of growth hormone (GH) by the pituitary gland. GH stimulates the synthesis of insulin-like growth factor-I (IGF-I), and the somatic growth and metabolic dysfunction that characterize acromegaly are a consequence of elevated GH and IGF-I levels. Gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors (GEP-NETs) are rare, slow-growing neoplasms that have usually metastasized by the time of diagnosis. The majority of GEP-NETs are carcinoid tumors whose syndrome is caused by the hypersecretion of biogenic amines, peptides and polypeptides responsible for the principal symptoms of diarrhea and flushing.

**METHODS:** The MEDLINE and EMBASE databases were searched for preclinical and clinical studies of octreotide (Sandostatin\* ), a potent synthetic somatostatin analogue, in patients with acromegaly or GEP-NETs.

**OBJECTIVE:** This article reviews the 20 years of clinical experience with octreotide and the impact it has made in patients with acromegaly or GEP-NETs.

**RESULTS:** Octreotide has proven to be an essential component in the management strategy of acromegaly and GEP-NETs over the past 20 years. The multiple beneficial effects of octreotide throughout the body, combined with its established safety profile (the most common adverse effects are injection-site pain and gastrointestinal events), have made it an appealing option for clinicians. The advent of the long-acting release (LAR) formulation of octreotide provided additional benefits to patients through monthly administration, while maintaining the efficacy and tolerability profile of the daily subcutaneous formulation.

**CONCLUSIONS:** Octreotide is a potent synthetic somatostatin analogue that has become the mainstay of medical therapy for tumor control in neuroendocrine disorders such as acromegaly and GEP-NETs. The development of octreotide LAR offered a further advancement; less frequent dosing provided valuable benefits in quality of life to patients, with equivalent efficacy and tolerability. Moreover, recent results from the PROMID study have confirmed the antiproliferative effect of octreotide LAR in patients with well-differentiated metastatic GEP-NETs of the midgut. New therapeutic uses of octreotide are currently under investigation in a variety of clinical settings.

**Dalla somatostatina all'octreotide LAR: evoluzione di un analogo della somatostatina.**

**BACKGROUND:** L'acromegalia è caratterizzata da una sovrapproduzione dell'ormone della crescita (GH) da parte della ghiandola pituitaria. GH stimola la sintesi del fattore di crescita insulino-simile I (IGF-I), e la crescita somatica e disfunzioni metaboliche che caratterizzano

acromegalia sono una conseguenza di elevati di GH e di IGF-I. I tumori neuroendocrini gastroenteropancreatici (GEP-NET) sono rare, neoplasie a lenta crescita che hanno di solito metastasi al momento della diagnosi. La maggior parte delle GEP-NET sono i tumori carcinoidi cui la sindrome è causata dalla ipersecrezione di amine biogene, peptidi e polipeptidi responsabile per i principali sintomi di diarrea e vampate di calore. METODI: Le banche dati MEDLINE ed EMBASE sono stati perquisiti per gli studi preclinici e clinici di octreotide (Sandostatina \*), un analogo sintetico della somatostatina potente, in pazienti con acromegalia o GEP-NET.

OBIETTIVO: Questo articolo esamina i 20 anni di esperienza clinica con octreotide e dell'impatto che esso ha fatto in pazienti con acromegalia o GEP-NET.

RISULTATI: octreotide ha dimostrato di essere una componente essenziale nella strategia di gestione di acromegalia e GEP-NET negli ultimi 20 anni. Le molteplici effetti benefici del octreotide in tutto il corpo, insieme con il suo profilo di sicurezza stabiliti (gli effetti avversi più comuni sono dolore al sito di iniezione e gli eventi gastrointestinali), ne hanno fatto una scelta appetibile per i clinici. L'avvento della release a lunga azione (LAR) formulazione di octreotide fornito ulteriori benefici ai pazienti attraverso la somministrazione mensile, mantenendo il profilo di efficacia e tollerabilità della formulazione quotidianamente per via sottocutanea.

CONCLUSIONI: Octreotide è un analogo sintetico della somatostatina potente che è diventato il cardine della terapia medica per il controllo del tumore nei disturbi neuroendocrini, come l'acromegalia e GEP-NET. Lo sviluppo di octreotide LAR ha offerto un ulteriore avanzamento; dosaggio meno frequente fornito preziosi benefici nella qualità della vita ai pazienti, con pari efficacia e tollerabilità. Inoltre, i recenti risultati dello studio PROMID hanno confermato l'effetto antiproliferativo di octreotide LAR in pazienti con ben differenziati GEP-NET metastatico del midgut. Nuovi usi terapeutici di octreotide sono attualmente sotto inchiesta in una varietà di contesti clinici.

266: Laklai H, Laval S, Dumartin L, Rochaix P, Hagedorn M, Bikfalvi A, Le Guellec S, Delisle MB, Schally AV, Susini C, Pyronnet S, Bousquet C.

**Thrombospondin-1 is a critical effector of oncosuppressive activity of sst2 somatostatin receptor on pancreatic cancer.**

Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Oct 20;106(42):17769-74.

The somatostatin receptor subtype 2 (sst2) behaves as a tumor suppressor when expressed and stimulated by its ligand somatostatin in pancreatic cancer. We reveal a mechanism underlying oncosuppressive action of sst2, whereby this inhibitory receptor upregulates the expression of the secreted angioinhibitory factor thrombospondin-1 (TSP-1), as demonstrated in exocrine BxPC-3 and endocrine BON pancreatic cancer cells. The sst2-dependent upregulation of TSP-1 occurs through the inhibition of the PI3K pathway. It depends on transcriptional and translational events, involving a previously undescribed IRES in the 5'-UTR of TSP-1 mRNA. Chick chorioallantoic membrane was used as an in vivo model to demonstrate that TSP-1 is a critical effector of the inhibitory role of sst2 on the neoangiogenesis and oncogenesis induced by pancreatic cancer cells. TSP-1 reduced in vitro tubulogenesis of endothelial cells when grown in conditioned medium from pancreatic cancer cells expressing sst2, as compared to those expressing the control vector. TSP-1 inhibited tumor cell-induced neoangiogenesis by directly sequestering the proangiogenic factor VEGF, and inactivating the angiogenesis initiated by VEGFR2 phosphorylation in endothelial cells. Using human pancreatic tissue-microarrays, the expression of both sst2 and TSP-1 was shown to be correlated during the pancreatic neoplastic program. Both proteins are nearly undetectable in normal exocrine pancreas and in most invasive cancer lesions, but their expression is strikingly upregulated in most preinvasive cancer-adjacent lesions. The upregulation of both sst2 and TSP-1 tumor suppressors may function as an early negative feedback to restrain pancreatic carcinogenesis.

**La trombospondina-1 è un effetto di critica attività immunosoppressiva dei recettori sst2 per la somatostatina sul cancro del pancreas.**

Il sottotipo di recettore della somatostatina 2 (sst2) si comporta come un soppressore del tumore se espresso e stimolato dal suo ligando somatostatina nel cancro del pancreas. Vi sveliamo un meccanismo alla base dell'azione di oncosoppressive sst2, per cui questo recettore inibitorio fa aumentare la espressione del fattore secreto angioinhibitory trombospondina-1 (TSP-1), come dimostrato in BxPC esocrino ed endocrino-3 cellule di cancro pancreatico BON. Il upregulation sst2-dipendente di TSP-1 avviene attraverso l'inibizione del pathway PI3K. Dipende da eventi trascrizionale e traslazionale, che comportano un IRES precedentemente non descritta nel 5'-UTR di TSP-1 mRNA. membrana Chick corionallantoidea è stato utilizzato come un modello in vivo di dimostrare che TSP-1 è un effetto critica del ruolo inibitorio di sst2 sulla neoangiogenesi e oncogenesi indotto da cellule del tumore pancreatico. TSP-1 e ridotto tubulogenesis in vitro di cellule endoteliali, se coltivate in terreno condizionato dalle cellule del tumore pancreatico che

esprimono sst2, rispetto a quelli che esprimono il controllo vettoriale. TSP-1 inibito cellule tumorali-neoangiogenesi indotta da direttamente sequestrando il fattore proangiogenico VEGF, e inattivando le angiogenesi avviato dalla fosforilazione VEGFR2 nelle cellule endoteliali. Utilizzo di tessuto pancreatico umano-microarrays, l'espressione di entrambi sst2 e TSP-1 ha dimostrato di essere correlato durante il programma pancreatico neoplastica. Entrambe le proteine sono quasi impercettibili in condizioni normali pancreas esocrino e nella maggior parte delle lesioni tumorali invasive, ma la loro espressione è sorprendentemente sovraregolati nella maggior parte delle lesioni preinvasivo cancro adiacenti. La sovraregolazione di entrambi sst2 e TSP-1 soppressori tumorali possono funzionare come un feedback negativo presto per frenare carcinogenesi pancreatico.

272: Zatelli MC, degli Uberti E.

### **The significance of new somatostatin analogs as therapeutic agents.**

Curr Opin Investig Drugs. 2009 Oct;10(10):1025-31. Review. PubMed PMID: 19777390.

The effects of somatostatin, or somatotropin release-inhibiting factor (SRIF), and SRIF analogs in human diseases have been widely investigated to potentially expand the therapeutic applications of commercially available and newly designed compounds belonging to this class of agents. Several preclinical studies and clinical trials have demonstrated the antiproliferative and antisecretory effects of SRIF and its analogs. This review discusses results from studies investigating the secretory activity and cell viability of SRIF analogs, and the potential of new therapeutic applications of these drugs in endocrine diseases and, in particular, as a treatment for endocrine neoplasia.

### **Il significato di nuovi analoghi della somatostatina come agenti terapeutici**

Gli effetti della somatostatina, o fattore di inibizione della liberazione somatotropina (SRIF), e gli analoghi della SRIF in malattie umane sono stati ampiamente studiati per espandere potenzialmente le applicazioni terapeutiche delle commercialmente disponibili e di nuova progettazione composti appartenenti a questa classe di agenti. Diversi studi preclinici e sperimentazioni cliniche hanno dimostrato gli effetti antiproliferativi e antisecretori di SRIF e dei suoi analoghi. Questa revisione discute i risultati di studi che hanno analizzato l'attività secretoria e la vitalità cellulare di analoghi SRIF, e il potenziale delle nuove applicazioni terapeutiche di questi farmaci nelle malattie endocrine e, in particolare, come trattamento per neoplasia endocrina.

296: Msaouel P, Galanis E, Koutsilieris M.

**Somatostatin and somatostatin receptors: implications for neoplastic growth and cancer biology.**

Expert Opin Investig Drugs. 2009 Sep;18(9):1297-316. Review. PubMed PMID: 19678799.

Somatostatin agonists (SM-As) are capable of achieving durable symptomatic relief and significant clinical responses in certain tumours. Herein, we review the diverse direct and indirect mechanisms of antineoplastic activity elicited by SM-As as well as the hurdles that complicate their use as monotherapies in a broader range of malignancies. Emphasis is placed on recent clinical attempts to neutralise the IGF-mediated survival factor effects in the bone metastasis microenvironment in advanced prostate cancer. The first clinical trials of this 'anti-survival factor manipulation' strategy utilised the ability of SM-As to suppress the growth hormone-dependent liver-derived IGF-I bioavailability in combination with other drugs, such as dexamethasone, zoledronate and oestrogens, acting systemically and at the bone metastasis microenvironment. These regimens restored androgen ablation responsiveness in stage D3 prostate cancer patients and successfully produced objective clinical responses while only mild toxicities were observed. Furthermore, we focus on the preclinical experimental data of a targeted SM-A coupled to the super-potent doxorubicin derivative AN-201. The resulting conjugate (AN-238) has shown increased antitumour potency with a favourable toxicity profile. The potential use of novel SM-As as anticancer drugs is discussed in relation to data suggesting other direct and indirect treatment approaches pertaining to the somatostatin system.

**Somatostatina e recettori: ruolo nella crescita neoplastica e nella biologia del tumore**

Agonisti della somatostatina (SM-As) sono in grado di raggiungere durevole sollievo sintomatico e significativo risposte cliniche in alcuni tumori. Qui, passiamo in rassegna i diversi meccanismi diretti e indiretti delle attività antineoplastica suscitato da SM-As, nonché gli ostacoli che complicano il loro uso come monoterapia in una più ampia gamma di neoplasie. L'accento è posto sui recenti tentativi clinici di neutralizzare l'IGF-mediata effetti fattore di sopravvivenza nel microambiente osseo metastasi nel carcinoma della prostata avanzato. Le prime sperimentazioni cliniche di questa strategia 'anti-manipolazione del fattore di sopravvivenza' utilizzata la capacità di SM-As per sopprimere l'ormone-dipendente la crescita del fegato derivate biodisponibilità di IGF-I in combinazione con altri farmaci, come il desametasone, zoledronate ed estrogeni, in qualità di sistemica e al microambiente metastasi ossee. Questi regimi restaurati ablazione degli androgeni di risposta nei pazienti con cancro della prostata D3 palco e prodotto con successo risposte cliniche obiettive, mentre solo il lieve tossicità sono stati osservati. Inoltre, ci si concentra sui dati preclinici sperimentale di un mirato SM-A accoppiato alla doxorubicina super-potente derivato AN-201. Il coniugato risultante (AN-238) ha mostrato una maggiore efficacia antitumorale con un profilo di tossicità favorevole. L'uso potenziale del romanzo di SM-As come farmaci antitumorali è discusso

in relazione ai dati che suggeriscono altri trattamenti diretti e indiretti approcci relativi al sistema di somatostatina.

300: Zhang Z, Huang Y, Newman K, Gu J, Zhang X, Wu H, Zhao M, Xianyu Z, Liu X.

**Reexpression of human somatostatin receptor gene 2 gene mediated by oncolytic adenovirus increases antitumor activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand against pancreatic cancer.**

Clin Cancer Res. 2009 Aug 15;15(16):5154-60. Epub 2009 Aug 11. PubMed PMID: 19671855.

**PURPOSE:** Pancreatic cancer continues to pose an enormous challenge to clinicians and cancer scientists. Clinical studies show that tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) exerts a potent and tumor-specific proapoptotic activity. However, most pancreatic cancer cells are resistant to TRAIL therapy. Human somatostatin receptor gene 2 (hSSTr2) is lost in 90% of pancreatic carcinoma. Oncolytic viruses are able to selectively lyse cancer cells and represent a promising novel anticancer therapy. Here, we investigated whether oncolytic adenovirus-mediated reexpression of hSSTr2 would enhance TRAIL-induced antitumor efficacy against pancreatic cancer.

**EXPERIMENTAL DESIGN:** The antitumor efficacies of combined or single treatment of hSSTr2 and TRAIL mediated by oncolytic adenovirus were compared in pancreatic cancer cell culture and xenografts. The mechanisms involved in hSSTr2-induced sensitization to TRAIL were studied.

**RESULTS:** Oncolytic adenovirus-mediated reexpression of hSSTr2 potentiated TRAIL-induced tumor growth inhibition in vitro and in vivo. Reexpression of hSSTr2 augmented TRAIL-induced apoptosis against pancreatic cancer cells via up-regulation of death receptor 4 and down-regulation of Bcl-2.

**CONCLUSIONS:** hSSTr2 restoration mediated by oncolytic adenovirus enhances TRAIL-induced antitumor efficacy against pancreatic cancer. Combined treatment with oncolytic adenovirus-mediated hSSTr2 and TRAIL gene provides the rationale for a clinical trial in pancreatic cancer.

**La riespressione del gene 2 del recettore umano della somatostatina mediata dall'adenovirus oncolitico aumenta l'attività antitumorale del fattore di necrosi tumorale legato all'apoptosi indotta dal ligando contro il cancro pancreatico**

**SCOPO:** Il tumore del pancreas continua a rappresentare una sfida enorme per i medici e gli scienziati del cancro. Studi clinici dimostrano che il fattore di necrosi tumorale-correlati che inducono apoptosi ligand (TRAIL) esercita una potente attività e tumore-specifici proapoptotici. Tuttavia, le cellule del cancro del pancreas sono più resistenti alla terapia TRAIL. Gene del recettore umano della somatostatina 2 (hSSTr2) si perde nel 90% dei carcinoma pancreatico. Oncolitici virus sono in grado di lisare selettivamente le cellule tumorali e rappresentano una promettente terapia antitumorale romanzo. Qui, abbiamo studiato se oncolitici reexpression adenovirus-mediata di hSSTr2 aumenterebbe TRAIL-indotta efficacia antitumorale contro il cancro al pancreas.

**DISEGNO SPERIMENTALE:** Il efficacies antitumorale di trattamento combinato o singolo di

hSSTR2 e mediata da adenovirus oncolitici TRAIL sono stati confrontati in coltura delle cellule di cancro pancreatico e xenotrapianti. I meccanismi coinvolti nella sensibilizzazione hSSTR2 indotta a TRAIL sono stati studiati. RISULTATI: oncolitici reexpression adenovirus-mediata di hSSTR2 potenziato TRAIL-inibizione della crescita tumorale indotta in vitro e in vivo. Reexpression di hSSTR2 aumentata apoptosi TRAIL-indotta contro le cellule tumorali del pancreas attraverso up-regulation dei recettori di morte 4 e down-regolazione di Bcl-2. CONCLUSIONI: hSSTR2 restauro mediata da adenovirus oncolitici migliora TRAIL-indotta efficacia antitumorale contro il cancro al pancreas. Il trattamento combinato con oncolitici gene adenovirus-mediata hSSTR2 e TRAIL spiega le ragioni per una sperimentazione clinica nel cancro del pancreas.

304: van Keimpema L, Nevens F, Vanslambrouck R, van Oijen MG, Hoffmann AL, Dekker HM, de Man RA, Drenth JP.

### **Lanreotide reduces the volume of polycystic liver: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial.**

Gastroenterology. 2009Nov;137(5):1661-8.e1-2. Epub 2009 Jul 29. PubMed PMID: 19646443.

**BACKGROUND & AIMS:** Therapy for polycystic liver is invasive, expensive, and has disappointing long-term results. Treatment with somatostatin analogues slowed kidney growth in patients with polycystic kidney disease (PKD) and reduced liver and kidney volume in a PKD rodent model. We evaluated the effects of lanreotide, a somatostatin analogue, in patients with polycystic liver because of autosomal-dominant (AD) PKD or autosomal-dominant polycystic liver disease (PCLD).

**METHODS:** We performed a randomized, double-blind, placebo-controlled trial in 2 tertiary referral centers. Patients with polycystic liver (n = 54) were randomly assigned to groups given lanreotide (120 mg) or placebo, administered every 28 days for 24 weeks. The primary end point was the difference in total liver volume, measured by computerized tomography at weeks 0 and 24. Analyses were performed on an intention-to-treat basis.

**RESULTS:** Baseline characteristics were comparable for both groups, except that more patients with ADPKD were assigned to the placebo group (P = .03). The mean liver volume decreased 2.9%, from 4606 mL (95% confidence interval (CI): 547-8665) to 4471 mL (95% CI: 542-8401 mL), in patients given lanreotide. In the placebo group, the mean liver volume increased 1.6%, from 4689 mL (95% CI: 613-8765 mL) to 4895 mL (95% CI: 739-9053 mL) (P < .01). Post hoc stratification for patients with ADPKD or PCLD revealed similar changes in liver volume, with statistically significant differences in patients given lanreotide (P < .01 for both diseases).

**CONCLUSIONS:** In patients with polycystic liver, 6 months of treatment with lanreotide reduces liver volume.

### **Lanreotide riduce il volume del polmone policistico: un trial controllato randomizzato a doppio cieco con placebo**

CONTESTO ED OBIETTIVI: la terapia per il fegato policistico è invasiva, costosa, e ha deludenti risultati a lungo termine. Il trattamento con analoghi della somatostatina ha rallentato la crescita del rene nei pazienti con malattia del rene policistico (PKD) e fegato ridotto e il volume del rene in un modello di roditore PKD. Abbiamo valutato gli effetti di lanreotide, un analogo della somatostatina, in pazienti con fegato policistico causa di autosomica dominante (AD) o PKD autosomica dominante, malattia del fegato policistico (PCLD). METODI: Abbiamo condotto uno studio randomizzato, in doppio cieco, controllato con placebo, in

2 centri di riferimento terziario. I pazienti con fegato policistico (n = 54) sono stati assegnati a un determinato gruppo lanreotide (120 mg) o placebo, somministrati ogni 28 giorni per 24 settimane. L'end point primario era la differenza di volume del fegato totale, misurato mediante tomografia computerizzata alle settimane 0 e 24. Le analisi sono state eseguite su un intention-to-treat. **RISULTATI:** Le caratteristiche basali erano simili per entrambi i gruppi, tranne che i pazienti più con ADPKD sono stati assegnati al gruppo placebo (P = .03). Il volume del fegato medio è diminuito del 2,9%, da 4.606 ml (intervallo di confidenza al 95% (CI): 547-8.665) a 4.471 ml (95% CI: 542-8.401 ml), in pazienti trattati con lanreotide. Nel gruppo placebo, il volume medio fegato aumentato 1,6%, da 4.689 ml (IC 95%: 613-8.765 mL) a 4.895 ml (95% CI: 739-9.053 mL) (P <.01). Post stratificazione hoc per i pazienti con ADPKD o PCLD rivelato simili cambiamenti di volume del fegato, con differenze statisticamente significative nei pazienti trattati con lanreotide (P <0,01 per entrambe le malattie). In conclusione, nei pazienti con fegato policistico, 6 mesi di trattamento con lanreotide riduce il volume del fegato.

316: Peverelli E, Olgiati L, Locatelli M, Magni P, Fustini MF, Frank G, Mantovani G, Beck-Peccoz P, Spada A, Lania A.

**The dopamine-somatostatin chimeric compound BIM-23A760 exerts antiproliferative and cytotoxic effects in human non-functioning pituitary tumors by activating ERK1/2 and p38 pathways.**

CancerLett. 2010 Feb 28;288(2):170-6. Epub 2009 Jul 19. PubMed PMID: 19619936.

The study investigated the effects of the dopamine-somatostatin chimeric compound BIM-23A760 on cell proliferation and apoptosis in cultured cells from human non-functioning pituitary tumors (NFPTs). Both BIM-23A760 and the dopaminergic agonist BIM-53097 induced a significant inhibition of cell proliferation associated with increased p27 expression, together with a significant increase in caspase-3 activity. Conversely, null or marginal effects were elicited by somatostatin analogs. Moreover, BIM-23A760 and BIM-53097 induced ERK1/2 and p38 phosphorylation and the blockade of these pathways prevented both the antiproliferative and the pro-apoptotic effects of these drugs. In conclusions the chimeric compound BIM-23A760 is able to exert cytostatic and cytotoxic effects in NFPTs, these phenomena being mainly mediated by DR2D and involving ERK1/2 and p38 pathways activation.

**Il composto chimerico dopamina-somatostatina BIM-23A760 esercita effetti antiproliferativi e citotossici nei tumori pituitary umani non funzionali tramite l'attivazione della via ERK1/2 e p38**

Lo studio ha valutato gli effetti dei composti chimerici somatostatina-dopamina il BIM-23A760 sulla proliferazione cellulare e l'apoptosi in cellule in coltura da umano non funzionante tumori ipofisari (NFPTs). Sia-BIM 23A760 e l'agonista dopaminergico BIM-53.097 indotto una significativa inibizione della proliferazione cellulare associata ad un aumento di espressione di p27, insieme ad un significativo aumento della caspasi-3 attività. Al contrario, gli effetti nulli o marginali sono stati indotti da analoghi della somatostatina. Inoltre, BIM-23A760 e BIM-indotta ERK1 / 2 e p38 fosforilazione e il blocco di queste vie sia impedito il antiproliferativa e gli effetti pro-apoptotici di questi farmaci 53.097. Nelle conclusioni del chimerico composto BIM-23A760 è in grado di esercitare effetti citotossici e citostatici in NFPTs, questi fenomeni è mediato principalmente da DR2D e coinvolgendo ERK1 / 2 e p38 attivazione di percorsi.

320: Kang JU, Koo SH, Kwon KC, Park JW, Kim JM.

**Identification of novel candidate target genes, including EPHB3, MASP1 and SST at 3q26.2-q29 in squamous cell carcinoma of the lung.**

BMC Cancer. 2009 Jul 16;9:237. PubMed PMID: 19607727;PubMed Central PMCID: PMC2716371.

**BACKGROUND:** The underlying genetic alterations for squamous cell carcinoma (SCC) and adenocarcinoma (AC) carcinogenesis are largely unknown.

**METHODS:** High-resolution array-CGH was performed to identify the differences in the patterns of genomic imbalances between SCC and AC of non-small cell lung cancer (NSCLC).

**RESULTS:** On a genome-wide profile, SCCs showed higher frequency of gains than ACs ( $p = 0.067$ ). More specifically, statistically significant differences were observed across the histologic subtypes for gains at 2q14.2, 3q26.2-q29, 12p13.2-p13.33, and 19p13.3, as well as losses at 3p26.2-p26.3, 16p13.11, and 17p11.2 in SCC, and gains at 7q22.1 and losses at 15q22.2-q25.2 occurred in AC ( $P < 0.05$ ). The most striking difference between SCC and AC was gains at the 3q26.2-q29, occurring in 86% (19/22) of SCCs, but in only 21% (3/14) of ACs. Many significant genes at the 3q26.2-q29 regions previously linked to a specific histology, such as EVI1, MDS1, PIK3CA and TP73L, were observed in SCC ( $P < 0.05$ ). In addition, we identified the following possible target genes ( $> 30\%$  of patients) at 3q26.2-q29: LOC389174 (3q26.2), KCNMB3 (3q26.32), EPHB3 (3q27.1), MASP1 and SST (3q27.3), LPP and FGF12 (3q28), and OPA1, KIAA022, LOC220729, LOC440996, LOC440997, and LOC440998 (3q29), all of which were significantly targeted in SCC ( $P < 0.05$ ). Among these same genes, high-level amplifications were detected for the gene, EPHB3, at 3q27.1, and MASP1 and SST, at 3q27.3 (18, 18, and 14%, respectively). Quantitative real time PCR demonstrated array CGH detected potential candidate genes that were over expressed in SCCs.

**CONCLUSION:** Using whole-genome array CGH, we have successfully identified significant differences and unique information of chromosomal signatures prevalent between the SCC and AC subtypes of NSCLC. The newly identified candidate target genes may prove to be highly attractive candidate molecular markers for the classification of NSCLC histologic subtypes, and could potentially contribute to the pathogenesis of the squamous cell carcinoma of the lung.

**Identificazione di nuovi geni target, che includono EPHB3, MASP1 e SST a 3q26.2-q29 nel carcinoma cellulare squamoso del polmone**

**BACKGROUND:** Le alterazioni genetiche alla base per il carcinoma a cellule squamose (SCC) e l'adenocarcinoma (AC) cancerogenesi sono in gran parte sconosciuti.

**METODI:** alta risoluzione array-CGH è stata effettuata per individuare le differenze nei modelli di squilibri genomic tra SCC e AC di tumore non a piccole cellule (NSCLC).

**RISULTATI:** Su un profilo di genome-wide, SCC ha mostrato maggiore frequenza dei guadagni di

ACS ( $p = 0,067$ ). Più in particolare, le differenze statisticamente significative sono stati osservati tra i sottotipi istologici di guadagni a 2q14.2, 3q26.2-D29, 12p13.2-p13.33, e 19p13.3, così come le perdite a 3p26.2-p26.3, 16p13.11 e 17p11.2 in SCC, e guadagni e le perdite a 7q22.1 a 15q22.2-q25.2 verificato in AC ( $P < 0,05$ ). La differenza più evidente tra il SCC e AC è stata guadagni a 3q26.2-D29, che si verificano nel 86% (19/22) di SCC, ma solo il 21% (3 / 14) di ACS. Molti geni significativi a 3q26.2-D29 regioni precedentemente legata ad una istologia specifici, come EVI1, MDS1, PIK3CA e TP73L, sono stati osservati in SCC ( $P < 0,05$ ). Inoltre, abbiamo individuato i geni seguente obiettivo possibile ( $> 30\%$  dei pazienti) a 3q26.2-D29: LOC389174 (3q26.2), KCNMB3 (3q26.32), EphB3 (3q27.1), MASP1 e SST (3q27.3), LPP e FGF12 (3q28), e OPA1, KIAA022, LOC220729, LOC440996, LOC440997 e LOC440998 (3q29), che sono stati tutti mirati a SCC in modo significativo ( $P < 0,05$ ). Tra questi stessi geni, amplificazioni di alto livello sono stati rilevati per il gene, EphB3, a 3q27.1, e MASP1 e SST, a 3q27.3 (18, 18 e 14%, rispettivamente). PCR quantitativa in tempo reale dimostrato array CGH individuati geni candidati potenziali che sono state espresse in più di SCC.

CONCLUSIONE: L'uso CGH array intero genoma, siamo riusciti a identificare differenze significative e le informazioni univoche di firme cromosomiche prevalente tra i sottotipi di SCC e AC di NSCLC. Il recentemente identificati geni bersaglio candidato può rivelarsi altamente candidato attraente marcatori molecolari per la classificazione dei sottotipi istologici NSCLC, e potrebbe contribuire alla patogenesi del carcinoma a cellule squamose del polmone.

323: Agool A, Slart RH, Dierckx RA, Kluin PM, Visser L, Jager PL, Vellenga E.

**Somatostatin receptor scintigraphy might be useful for detecting skeleton abnormalities in patients with multiple myeloma and plasmacytoma.**

Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2010 Jan;37(1):124-30.

**PURPOSE:** Somatostatin receptor expression has been demonstrated on a number of plasma cell lines. Therefore, we questioned whether somatostatin receptor scintigraphy (SRS) can be used to demonstrate in vivo multiple myeloma (MM) activity.

**METHODS:** SRS was performed in newly diagnosed (n = 9) or relapsing (n = 18) MM patients or in patients with localized plasmacytoma (n = 2). The results were compared with radiographic findings.

**RESULTS:** A positive SRS was demonstrated in 44% of the newly diagnosed patients, in 83% of the relapsed patients and in both patients with plasmacytoma. The SRS findings corresponded with radiographic abnormalities in 40% of the patients. However, in relapsed patients 60% demonstrated increased SRS uptake in areas without new radiographic abnormalities. The positive SRS corresponded with histologically proven disease activity and responded upon treatment. Moreover, immunohistochemical staining of MM material demonstrated concordant somatostatin receptor sst3 staining in five of six patients.

**CONCLUSION:** These results demonstrate that SRS is a valuable tool to detect disease activity, especially in relapsing MM patients.

**La scintigrafia del recettore della somatostatina potrebbe essere usata per rilevare anomalie scheletriche nei pazienti con mieloma multiplo e plasmacitoma**

**SCOPO:** espressione del recettore della somatostatina è stata dimostrata su un numero di linee di cellule del plasma. Pertanto, abbiamo chiesto se la scintigrafia del recettore della somatostatina (SRS) può essere utilizzato per dimostrare in vivo mieloma multiplo (MM) di attività.

**METODI:** SRS è stata effettuata in nuova diagnosi (n = 9) o recidivante (n = 18) pazienti affetti da MM o nei pazienti con plasmocitoma localizzate (n = 2). I risultati sono stati confrontati con i risultati radiografici.

**RISULTATI:** Un SRS positiva è stata dimostrata nel 44% dei pazienti di nuova diagnosi, nel 83% dei pazienti recidiva e in entrambi i pazienti con plasmocitoma. I risultati SRS corrispondenza con anomalie radiografiche nel 40% dei pazienti. Tuttavia, nei pazienti con recidiva del 60% dimostrato un aumentato assorbimento SRS in zone prive di nuove anomalie radiografiche. L'SRS positivo in corrispondenza con l'attività di malattia istologicamente provata e ha risposto in seguito al trattamento. Inoltre, immunoistochimica del materiale MM dimostrato recettori per la somatostatina concorde sst3 colorazione in cinque dei sei pazienti.

**CONCLUSIONE:** Questi risultati dimostrano che SRS è uno strumento prezioso per rilevare l'attività di malattia, soprattutto nei pazienti con sclerosi multipla recidivante MM.

326: Hua YP, Yin XY, Peng BG, Li SQ, Lai JM, Liang HZ, Liang LJ.

**Mechanisms and influence of octreotide-induced regulation of somatostatin receptor 2 on hepatocellular carcinoma.**

Chemotherapy. 2009;55(5):312-20. Epub 2009 Jul 6. PubMed PMID: 19590186.

**BACKGROUND:** Somatostatin receptors (SSTRs) belong to the family of G protein-coupled receptors. Exposure of G protein-coupled receptors to their agonists induces a rapid decrease in their initial response. The goal of this study is to investigate alteration in SSTR2 by the treatment of SSTR agonist octreotide (OCT) in hepatocellular carcinoma (HCC) and the resulting consequence.

**METHODS:** Morphology, proliferation and cell cycle of the human HCC cell line (Bel7402) were evaluated. Effect of OCT on HCC growth and development was assessed in vivo. SSTR2 expression was measured by RT-PCR and detected by immunohistochemistry.

**RESULTS:** Short-term OCT treatment on Bel7402 cells barely changed cell proliferation and morphology, and no apoptosis was induced. The SSTR2 protein level was markedly decreased on Bel7402 cells after exposure to OCT. However, the weight of the HCC xenograft was significantly lower in the OCT treatment group as compared with the control group. In the rat hepatocarcinogenesis model, the mortality and incidence of HCC in the OCT treatment group were remarkably less than those in the control group. Long-term OCT treatment led to increased levels of both SSTR2 mRNA and protein in hepatocytes and HCC cells.

**CONCLUSION:** Short-term OCT treatment could lead to SSTR2 desensitization, resulting in a reduced inhibitory effect on HCC by OCT. However, long-term OCT treatment effectively inhibited the development and growth of HCC probably via resensitization and upregulation of SSTR2.

**Meccanismi e influenza della regolazione del recettore 2 della somatostatina indotto dall'octreotide nei carcinomi epatocellulari**

**BACKGROUND:** recettori della somatostatina (SSTRs) appartengono alla famiglia delle proteine G-recettori accoppiati. Esposizione di proteine G recettori accoppiati ai loro agonisti induce una rapida diminuzione della loro risposta iniziale. L'obiettivo di questo studio è quello di indagare alterazione SSTR2 dal trattamento di octreotide agonista SSTR (OCT) nel carcinoma epatocellulare (HCC) e le conseguenze che ne derivano.

**METODI:** morfologia, ciclo cellulare e la proliferazione della linea cellulare umana HCC (Bel7402) sono stati valutati. Effetto di ottobre sulla crescita e lo sviluppo di HCC è stata valutata in vivo. Espressione SSTR2 è stata misurata mediante RT-PCR e rilevati da immunoistochimica.

**RISULTATI:** il trattamento ottobre a breve termine sulle cellule Bel7402 appena cambiato la proliferazione cellulare e la morfologia, e non è stato indotto apoptosi. Il livello di proteina SSTR2 era notevolmente diminuita sulle cellule Bel7402 dopo l'esposizione a ottobre Tuttavia, il peso del xenotrapianto HCC è risultata significativamente inferiore nel gruppo in trattamento ottobre rispetto

al gruppo di controllo. Nel modello epatocarcinogenesi ratto, la mortalità e l'incidenza di HCC nel gruppo di trattamento ottobre sono stati notevolmente inferiori a quelli del gruppo di controllo. Trattamento ottobre a lungo termine ha portato a un aumento dei livelli di mRNA sia SSTR2 e proteine negli epatociti e cellule di carcinoma epatocellulare. **CONCLUSIONE:** il trattamento ottobre a breve termine potrebbe portare alla desensibilizzazione SSTR2, determinando un ridotto effetto inibitorio sulla HCC da ottobre Tuttavia, il trattamento ottobre a lungo termine efficacemente inibito lo sviluppo e la crescita del carcinoma epatocellulare probabilmente attraverso resensitization e sovraregolazione di SSTR2.

333: He Y, Yuan XM, Lei P, Wu S, Xing W, Lan XL, Zhu HF, Huang T, Wang GB, An R, Zhang YX, Shen GX.

### **The antiproliferative effects of somatostatin receptor subtype 2 in breast cancer cells.**

Acta Pharmacol Sin. 2009 Jul;30(7):1053-9. PubMed PMID:19575008.

**AIM:** Somatostatin receptor subtype 2 (SSTR2) is the principal mediator of somatostatin's (SST) antiproliferative effects on normal and cancer cells. Therefore, we investigated whether the enhanced expression of SSTR2 could inhibit the proliferation of tumor cells, and, if so, the mechanisms that might be involved.

**METHODS:** SSTR2 expression levels were determined by qRT-PCR in several tumor cell lines. Then, a plasmid pIRES2-EGFP-SSTR2 (pSIG) was constructed and stably transfected into MCF-7 cells (MCF-7/pSIG). After SSTR2 overexpression was identified by qRT-PCR, immunofluorescence staining and a receptor binding assay, the MCF-7/pSIG cells were analyzed by PI staining for apoptosis and cell cycle arrest was tested by flow cytometry for epidermal growth factor receptor (EGFR) expression. The EGF-stimulated proliferation of MCF-7 cells was assayed by MTT.

**RESULTS:** The human breast cancer cell line MCF-7 expresses a lower level of SSTR2, thereby partly accounting for the decreased response to SST. The overexpression of SSTR2 in MCF-7 cells resulted in apoptosis, cytostasis and G(1)/S cell cycle arrest. Furthermore, the expression of EGFR, together with EGF-stimulated proliferation, was markedly decreased in the MCF-7/pSIG cells.

**CONCLUSION:** Enhanced SSTR2 expression played an antiproliferative role in MCF-7 cells through inducing apoptosis and G(1)/S cell cycle arrest, and also by decreasing EGFR expression, thereby counteracting the growth-stimulating effect of EGF. Our data seem to indicate that developing a new therapeutic agent capable of upregulating SSTR expression could potentially be a way to block tumor progression. Acta Pharmacologica Sinica (2009) 30: 1053-1059; doi: 10.1038/aps.2009.59.

### **Effetti antiproliferativi del sottotipo 2 del recettore della somatostatina nelle cellule mammarie cancerose**

**SCOPO:** recettore della somatostatina sottotipo 2 (SSTR2) è il principale mediatore della somatostatina's (SST) effetti antiproliferativi sulle cellule normali e tumorali. Quindi, abbiamo studiato se l'espressione di SSTR2 potrebbe inibire la proliferazione delle cellule tumorali, e, in tal caso, i meccanismi che potrebbero essere coinvolti.

**METODI:** I livelli di espressione SSTR2 sono stati determinati mediante QRT-PCR in diverse linee cellulari tumorali. Poi, un plasmide pIRES2-EGFP-SSTR2 (psig) è stato costruito e trasfettate stabilmente in cellule MCF-7 (MCF-7/pSIG). Dopo la sovraespressione SSTR2 è stato identificato mediante QRT-PCR, immunofluorescenza e un saggio di legame al recettore, le cellule MCF-

7/pSIG sono stati analizzati da PI che macchia per apoptosi e arresto del ciclo cellulare è stata testata mediante citometria di flusso per il recettore del fattore di crescita epidermico (EGFR) espressione. La proliferazione EGF-stimolata di cellule MCF-7 è stata determinata con MTT. **RISULTATI:** Il cancro umano della mammella linea cellulare MCF-7 esprime un livello inferiore di SSTR2, così parzialmente contabili per la diminuzione della risposta al SST. La sovraespressione di SSTR2 in cellule MCF-7 ha portato in apoptosi, cytostasis e G (1) / arresto del ciclo cellulare S. Inoltre, l'espressione di EGFR, insieme con EGF-proliferazione stimolata, è nettamente diminuita nelle cellule MCF-7/pSIG.

**CONCLUSIONE:** espressione SSTR2 Enhanced svolto un ruolo antiproliferativo in cellule MCF-7 attraverso inducendo l'apoptosi e G (1) / arresto del ciclo cellulare S, e anche riducendo l'espressione di EGFR, controbilanciando gli effetti stimolatori della crescita del FEG. I nostri dati sembrano indicare che lo sviluppo di un nuovo agente terapeutico capace di upregulating espressione SSTR potrebbe essere un modo per bloccare tumore progression. *Acta Pharmacologica Sinica* (2009) 30: 1053-1059, doi: 10.1038/aps.2009.59.

345: Ito J, Sekiya M, Miura K, Yoshimi K, Suzuki T, Seyama K, Izumi H, Uekusa T, Takahashi K.

**Refractory recurrent thymoma successfully treated with long-acting somatostatin analogue and prednisolone.**

*Intern Med.* 2009;48(12):1061-4. Epub 2009 Jun 15. PubMed PMID: 19525599.

The patient was 54-year-old woman diagnosed as recurrent invasive thymoma (type B3; WHO classification). Although partial response was obtained by systemic chemotherapy (PAC: cisplatin, doxorubicin, cyclophosphamide), the tumor started to become enlarged after cessation of chemotherapy. Combined treatment of octreotide and prednisolone was administrated because various chemotherapies, including PAC, were not effective. After seven months, the tumor size was markedly decreased. The combination of octreotide and prednisolone should be considered as one of the choices of treatment in patients with recurrent thymoma.

**Timoma ricorrente refrattario trattato con successo con un analogo della somatostatina a lunga azione e il prednisolone**

Il paziente era donna di 54 anni diagnosticata come ricorrente timoma invasivo (tipo B3; classificazione WHO). Sebbene risposta parziale è stata ottenuta con la chemioterapia sistemica (PAC: cisplatino, doxorubicina, ciclofosfamida), il tumore ha iniziato a diventare allargata dopo la cessazione della chemioterapia. Il trattamento combinato di octreotide e prednisolone è stato amministrato a causa chemioterapie varie, compresi i PAC, non sono stati efficaci. Dopo sette mesi, la dimensione del tumore era notevolmente diminuito. La combinazione di octreotide e prednisolone dovrebbe essere considerata come una delle scelte di trattamento in pazienti con timoma ricorrenti.

346: Treszl A, Schally AV, Seitz S, Szalontay L, Rick FG, Szepeshazi K, Halmos G.

**Inhibition of human non-small cell lung cancers with a targeted cytotoxic somatostatin analog, AN-162.**

Peptides. 2009 Sep;30(9):1643-50. Epub 2009 Jun 12. PubMed PMID: 19524629.

Human non-small cell lung cancers (NSCLCs) express receptors for somatostatin. The cytotoxic analog of somatostatin AN-162 (AEZS-124), consisting of doxorubicin linked to a somatostatin analog RC-121 binds to receptors for somatostatin and is targeted to tumors expressing these receptors. The aim of this study was to investigate the effect of targeted cytotoxic somatostatin analog AN-162 on a panel of human NSCLC cell lines (A549, H460, H838, H1299) in vitro (at 0.5-100 microM concentrations) and in vivo on H460 and H1299 NSCLCs xenografted into nude mice (at the dose of 2.5 micromol/kg, i.v., once a week). The expression of mRNA for somatostatin receptor subtypes was investigated by RT-PCR in cell lines and tumor tissues. Somatostatin receptor proteins were also characterized by ligand competition assay and Western blotting. AN-162 significantly decreased cell proliferation in vitro and tumor growth ( $p < 0.05$  vs. all groups) of H460 and H1299 NSCLCs in vivo. Based on real-time PCR array data, AN-162 induced several apoptosis-related genes in vivo in both models. Our results suggest that cytotoxic somatostatin analog AN-162 (AEZS-124) should be considered for the further development of a therapy of patients with NSCLC.

**Inibizione dei tumori del polmone non a piccolo cellule con un analogo della somatostatina citotossico, AN-162**

I tumori ai polmoni non a piccole cellule cancro (NSCLCs) esprimono i recettori per la somatostatina. L'analogo citotossico della somatostatina AN-162 (AEZS-124), comprendente doxorubicina legato ad un analogo della somatostatina RC-121 si lega ai recettori per la somatostatina e si rivolge a tumori che esprimono questi recettori. Lo scopo di questo studio era di studiare l'effetto di mirate analogo della somatostatina citotossico AN-162 su un pannello di linee cellulari umane di NSCLC (A549, H460, H838, H1299) in vitro (a concentrazioni di 0,5-100 microM) e in vivo su H460 e NSCLCs H1299 trapiantati in topi nudi (alla dose di 2,5 micromol / kg, iv, una volta a settimana). L'espressione di mRNA per i sottotipi del recettore per la somatostatina è stata valutata mediante RT-PCR nelle linee di cellule e tessuti tumorali. Le proteine del recettore della somatostatina sono stati anche caratterizzati da saggio concorrenza ligando e Western blotting. AN-162 è diminuito in modo significativo la proliferazione cellulare in vitro e la crescita del tumore ( $p < 0.05$  vs tutti i gruppi) di NSCLCs H460 e H1299 in vivo. Sulla base dei dati real-time PCR array, AN-162 ha indotto apoptosi diversi geni correlati in vivo in entrambi i modelli. I nostri risultati suggeriscono che analogico citotossico della somatostatina AN-162

(AEZS-124) dovrebbe essere considerata per l'ulteriore sviluppo di una terapia di pazienti con NSCLC.

347: Kilian M, Gregor JI, Heukamp I, Helmecke K, Hanel M, Wassersleben B, Walz MK, Schimke I, Kristiansen G, Wenger FA.

**Impact of Octreotide and SOM-230 on liver metastasis and hepatic lipidperoxidation in ductal pancreatic adenocarcinoma in Syrian Hamster.**

Clin Exp Metastasis. 2009;26(7):719-27. Epub2009 Jun 12. PubMed PMID: 19521786.

Octreotide is a somatostatin analogue binding on two receptor subtypes. In previous trials Octreotide showed inhibitory effects on tumour growth and liver metastasis in experimental pancreatic cancer. Thus we evaluated whether the new somatostatin analogue SOM-230 binding on 4 receptor subtypes has superior effects on carcinogenesis in pancreatic carcinoma. About 120 Syrian hamsters were randomised into six groups (n = 20): Gr.1: Aqua/Aqua, Gr.2: BOP/Aqua, Gr.3: Aqua/Octreotide, Gr.4: BOP/Octreotide, Gr.5: Aqua/SOM-230, Gr.6: BOP/SOM-230. Tumour groups 2,4,6 subcutaneously received 10 mg/kg body weight N-nitrosobis-2-oxopropylamin (BOP) weekly for 10 weeks, healthy control Gr.1,3,5 were given aqua. In the 17th week therapy started with Octreotide and SOM-230 for 16 weeks, after 32 weeks animals were sacrificed. Pancreas and liver were histopathologically analysed. Hepatic lipidperoxidation was determined by activities of antioxidative enzymes glutathion-peroxidase (GSH-Px) and superoxididismutase (SOD) as well as concentration of thiobarbituric-acid reactive substances (TBARS). Incidence of liver metastases was 88.2% in Gr.2 (BOP/Aqua), it was decreased in Gr.4 (BOP/Octreo: 40%) and Gr.6 (BOP/SOM-230: 50%) (P < 0.05). Mean number/animal and mean-2-dimensional size of liver metastases did not differ between tumour groups. Comparing GSH-Px-activity in intrametastatic and extrametastatic hepatic tissue revealed a significant increase extrametastatically in Gr.2 (BOP/Aqua) and Gr.6 (BOP/SOM-230). SOD-activity in liver metastases was decreased in Gr.2 (1,801) (P < 0.05) versus Gr.4 (8,304) and Gr.6 (7,038). Intrametastatic TBARS concentration was increased in Gr.2 compared to Gr.4 (BOP/Octreotid) and Gr.6 (BOP/SOM-230) (P < 0.05). Octreotide and SOM-230 equally reduced liver metastasis in ductal pancreatic adenocarcinoma probably by a reduction of lipidperoxidation.

**Impatto dell' Octreotide e di SOM-230 sulle metastasi polmonari e sulla perossidazione lipidica epatica nei criceti Syrian con adenocarcinoma pancreatico duttale**

Octreotide è un analogo della somatostatina vincolante su due sottotipi di recettori. In studi precedenti hanno dimostrato Octreotide effetti inibitori sulla crescita del tumore e delle metastasi del fegato nel cancro pancreatico sperimentale. Così abbiamo valutato se l'analogo della somatostatina nuovo SOM-230 vincolante il 4 sottotipi di recettori ha effetti superiori sulla carcinogenesi nel carcinoma pancreatico. Circa 120 criceti siriani sono stati randomizzati in sei gruppi (n = 20): Gr.1: Aqua / Aqua, Gr.2: BOP / Aqua, Gr.3: Aqua / octreotide, Gr.4: BOP /

octreotide, Gr.5 : Aqua/SOM-230, Gr.6: BOP/SOM-230. Tumore gruppi 2,4,6 via sottocutanea hanno ricevuto 10 mg / kg di peso corporeo di N-nitrosobis-2-oxopropylamin (BOP) alla settimana per 10 settimane, di controllo sani Gr.1, 3,5 sono stati dati acqua. Nella terapia 17a settimana è iniziato con Octreotide e SOM-230 per 16 settimane, dopo 32 settimane gli animali sono stati sacrificati. Pancreas e fegato sono stati histopathologically analizzati. lipidperoxidation epatica è stato determinato dalle attività degli enzimi antiossidanti glutathion-perossidasi (GSH-Px) e superossidismutase (SOD), nonché sostanze concentrazione di acido tiobarbiturico-reattiva (TBARS). Incidenza di metastasi epatiche è stata 88,2% nel Gr.2 (BOP / Aqua), era diminuita in Gr.4 (BOP / Octreo: 40%) e Gr.6 (BOP/SOM-230: 50%) (P <0,05 ). Il numero medio / animale e la dimensione media-2-dimensionale delle metastasi epatiche non differivano tra i gruppi di tumore. Confrontando GSH-Px-attività in intrametastatic e extrametastatic tessuto epatico ha rivelato un aumento significativo extrametastatically in Gr.2 (BOP / Aqua) e Gr.6 (BOP/SOM-230). SOD-attività in metastasi epatiche è risultata diminuita in Gr.2 (1.801) (P <0,05) rispetto Gr.4 (8.304) e Gr.6 (7.038). Intrametastatic TBARS concentrazione è aumentata in Gr.2 rispetto al Gr.4 (BOP / Octreotid) e Gr.6 (BOP/SOM-230) (P <0,05). Octreotide e SOM-230 ugualmente ridotto le metastasi al fegato in adenocarcinoma pancreatico duttale probabilmente da una riduzione di lipidperoxidation.

349: Valencak J, Trautinger F, Raderer M, Chott A, Der-Petrossian M, Ivancic-Brandenberger E, Knobler R, Kurtaran A, Hoffmann M.

### **Somatostatin receptor scintigraphy in primary cutaneous T- and B-cell lymphomas.**

J Eur Acad Dermatol Venereol. 2010 Jan;24(1):13-7. Epub 2009 Jun 8. PubMed PMID: 19515078.

**BACKGROUND:** Monitoring and repeated staging is of substantial importance in many patients with primary cutaneous T-cell lymphomas (CTCL). For primary cutaneous B-cell lymphomas (CBCL), extensive initial staging is the mainstay for correct diagnosis.

**AIM:** To evaluate the value of somatostatin receptor scintigraphy using the radiolabeled somatostatin analog (111)In-pentetreotide in comparison to conventional imaging methods for the staging of patients with primary CTCL and primary CBCL.

**METHODS:** Twenty-two patients (15 patients with histologically verified CTCL and 7 patients with histologically verified CBCL) were included. Stage of disease was established by physical examination, laboratory screening, skin inspection, palpation of superficial lymph nodes, sonography and computed tomography (CT) in patients with advanced clinical stage. Focally elevated tracer uptake of (111)In-pentetreotide was compared to common imaging modalities, physical aspect and digital photographs of the respective skin lesions.

**RESULTS:** Of the 15 patients with CTCL, only 4 (27%) showed positive scintigraphic results, but not in all sites of lymphomatous involvement. None of the five patients with mycosis fungoides in stage I, nor any of the four patients with Sézary syndrome, had a positive (111)In-pentetreotide scan. Of the seven patients with CBCL three positive scintigraphic results (43%) could be obtained: in two patients with a follicular center lymphoma and one patient with a diffuse large B-cell lymphoma - leg type, but again not in all apparent sites of lymphoma.

**CONCLUSIONS:** Based on our results, we do not recommend the use of somatostatin receptor scintigraphy for routine staging of patients with CTCL and CBCL. As our series includes only 22 patients, and the number of patients with rarer variants of CTCL was rather small, it might be too premature to abandon SST-R in the staging of patients with cutaneous lymphomas.

### **Scintigrafia del recettore della somatostatina nei linfomi primary cutanei a cellule T e B**

**BACKGROUND:** messa in scena di monitoraggio e ripetuta è di sostanziale importanza in molti pazienti con linfoma primario cutaneo a cellule T (CTCL). Per primario linfomi cutanei a cellule B

(CBCL), ampia messa in scena iniziale è il punto di riferimento per una corretta diagnosi.

**OBIETTIVO:** Per valutare il valore della scintigrafia del recettore della somatostatina con l'analogo della somatostatina radiomarcato (111) In-pentetreotide rispetto ai metodi convenzionali di imaging per la stadiazione dei pazienti affetti da CTCL primarie e CBCL primaria.

**METODI:** Ventidue pazienti (15 pazienti con conferma istologica CTCL e 7 pazienti con conferma istologica CBCL) sono stati inclusi. Stadio di malattia è stato istituito con l'esame fisico, lo screening di laboratorio, controllo della pelle, palpazione dei linfonodi superficiali, ecografia e la tomografia computerizzata (TC) nei pazienti con stadio clinico. Focale elevata di accumulo del tracciante (111) In-pentetreotide è stato confrontato con modalità di imaging comune, aspetto fisico e fotografie digitali delle lesioni cutanee rispettivi.

**RISULTATI:** Dei 15 pazienti con linfoma cutaneo, solo 4 (27%) hanno mostrato risultati positivi scintigrafia, ma non in tutti i siti di coinvolgimento linfomatoso. Nessuno dei cinque pazienti con micosi fungoide in stadio I, né alcuno dei quattro pazienti con la sindrome di Sézary, ha avuto un positivo (111) In-pentetreotide scansione. Dei sette pazienti con CBCL tre risultati positivi scintigrafia (43%) potrebbe essere ottenuto: in due pazienti con linfoma follicolare centro e un paziente con un linfoma a grandi cellule B diffuse - tipo di gamba, ma non ancora in tutti i siti apparente di linfoma.

**CONCLUSIONI:** Sulla base dei nostri risultati, non si consiglia l'uso della scintigrafia del recettore della somatostatina per la stadiazione di routine dei pazienti affetti da CTCL e CBCL. Come la nostra serie comprende solo 22 pazienti, e il numero di pazienti con varianti più rare di CTCL era piuttosto piccolo, potrebbe essere troppo prematuro abbandono SST-R nella stadiazione dei pazienti con linfomi cutanei.

352: Hanaoka H, Tominaga H, Yamada K, Paudyal P, Iida Y, Watanabe S, Paudyal B, Higuchi T, Oriuchi N, Endo K.

**Evaluation of (64)Cu-labeled DOTA-D-Phe(1)-Tyr (3)-octreotide ((64)Cu-DOTA-TOC) for imaging somatostatin receptor-expressing tumors.**

Ann Nucl Med. 2009 Aug;23(6):559-67. Epub 2009 Jun 6. PubMed PMID:19504168.

**OBJECTIVE:** In-111 ((111)In)-labeled octreotide has been clinically used for imaging somatostatin receptor-positive tumors, and radiolabeled octreotide analogs for positron emission tomography (PET) have been developed. Cu-64 ((64)Cu; half-life, 12.7 h) is an attractive radionuclide for PET imaging and is produced with high specific activity using a small biomedical cyclotron. The aim of this study is to produce and fundamentally examine a (64)Cu-labeled octreotide analog, (64)Cu-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid-D: -Phe(1)-Tyr(3)-octreotide ((64)Cu-DOTA-TOC).

**METHODS:** (64)Cu produced using a biomedical cyclotron was reacted with DOTA-TOC for 30 min at 45 degrees C. The stability of (64)Cu-DOTA-TOC was evaluated in vitro (incubated with serum) and in vivo (blood collected after administration) by HPLC analysis. Biodistribution studies were performed in normal mice by administration of mixed solution of (64)Cu-DOTA-TOC and (111)In-DOTA-TOC and somatostatin receptor-positive U87MG tumor-bearing mice by administration of (64)Cu-DOTA-TOC or (64)Cu-1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane-1,4,8,11-tetraacetic acid-octreotide ((64)Cu-TETA-OC). The tumor was imaged using (64)Cu-DOTA-TOC, (64)Cu-TETA-OC, and FDG with an animal PET scanner.

**RESULTS:** (64)Cu-DOTA-TOC can be produced in amounts sufficient for clinical study with high radiochemical yield. (64)Cu-DOTA-TOC was stable in vitro, but time-dependent transchelation to protein was observed after injection into mice. In biodistribution studies, the radioactivity of (64)Cu was higher than that of (111)In in all organs except kidney. In tumor-bearing mice, (64)Cu-DOTA-TOC showed a high accumulation in the tumor, and the tumor-to-blood ratio reached as high as 8.81 +/- 1.17 at 6 h after administration. (64)Cu-DOTA-TOC showed significantly higher accumulation in the tumor than (64)Cu-TETA-OC. (64)Cu-DOTA-TOC PET showed a very clear image of the tumor, which was comparable to that of (18)F-FDG PET and very similar to that of (64)Cu-TETA-OC.

**CONCLUSIONS:** (64)Cu-DOTA-TOC clearly imaged a somatostatin receptor-positive tumor and seemed to be a potential PET tracer in the clinical phase.

**Valutazione di (64)Cu-etichettato DOTA-D-Phe(1)-Tyr (3)-octreotide ((64)Cu-DOTA-TOC) per le immagini dei tumori che esprimono il recettore della somatostatina**

**OBIETTIVO:** In-111 ((111) In)-octreotide marcato è stato utilizzato clinicamente per i tumori della somatostatina imaging recettore-positivo, e radioattivo analoghi octreotide per la tomografia ad

emissione di positroni (PET) sono stati sviluppati. Cu-64 (<sup>64</sup>Cu; emivita, 12.7 h) è un radionuclide attraente per l'imaging PET ed è prodotto con alta attività specifica con un piccolo ciclotrone biomedico. Lo scopo di questo studio è quello di produrre e fondamentalmente esaminare un <sup>64</sup>Cu-octreotide marcato analogico (<sup>64</sup>Cu-1-,4,7,10 tetraazaciclododecano-1-,4,7,10 tetracetico acido-D: - Phe (1)-Tyr (3)-octreotide (<sup>64</sup>Cu-DOTA-TOC). METODI: <sup>64</sup>Cu prodotte utilizzando un ciclotrone biomedico è stato fatto reagire con DOTA-TOC per 30 minuti a 45 ° C. La stabilità di <sup>64</sup>Cu-DOTA-TOC è stata valutata in vitro (incubati con siero) e in vivo (sangue raccolti dopo la somministrazione) mediante analisi HPLC. Gli studi di biodistribuzione sono stati effettuati in topi normali con la somministrazione di soluzione mista di <sup>64</sup>Cu-DOTA-TOC e (<sup>111</sup>In-DOTA-TOC e somatostatina topi recettore-positivo U87MG di tumore con la somministrazione di <sup>64</sup>Cu-DOTA- o TOC (<sup>64</sup>Cu-1-,4,8,11 tetraazacyclotetradecane-1-,4,8,11 tetracetico acido-octreotide (<sup>64</sup>Cu-TETA-OC). Il tumore è stato ripreso con <sup>64</sup>Cu-DOTA-TOC (<sup>64</sup>Cu), Cu-TETA-OC, FDG e con uno scanner PET animale. RISULTATI: <sup>64</sup>Cu-DOTA-TOC può essere prodotto in quantità sufficienti per lo studio clinico con alta resa radiochimica. <sup>64</sup>Cu-DOTA-TOC è rimasto stabile in vitro, ma transchelation dipendenti dal tempo di proteine è stata osservata dopo somministrazione in topi. Negli studi di biodistribuzione, la radioattività di <sup>64</sup>Cu è stata superiore a quella di (<sup>111</sup>In) in tutti gli organi ad eccezione del rene. Nei topi portatori di tumore (<sup>64</sup>Cu), Cu-DOTA-TOC ha mostrato un elevato accumulo nel tumore, e il tumore al rapporto tra il sangue ha raggiunto il più in alto 8,81 +/- 1.17 a 6 ore dopo la somministrazione. <sup>64</sup>Cu-DOTA-TOC ha mostrato l'accumulazione significativamente più alti nel tumore, rispetto <sup>64</sup>Cu-TETA-OC. <sup>64</sup>Cu-DOTA-TOC PET ha mostrato un'immagine molto chiara del tumore, che era paragonabile a quella di (<sup>18</sup>F)-FDG PET e molto simile a quella di (<sup>64</sup>Cu) Cu-TETA-OC. CONCLUSIONI: <sup>64</sup>Cu-DOTA-TOC chiaramente ripreso un tumore al recettore della somatostatina positivi e sembrava essere un tracciante PET potenziale in fase clinica.

353: Saeed P, Tanck MW, Freling N, Baldeschi L, Mourits MP, Bennink RJ.

**Somatostatin receptor scintigraphy for optic nerve sheath meningiomas.**

Ophthalmology. 2009 Aug;116(8):1581-6. Epub 2009 Jun 4. PubMed PMID: 19500849.

**OBJECTIVE:** To investigate the value of somatostatin receptor scintigraphy (SSRS) in the diagnosis of optic nerve sheath meningiomas (ONSMs).

**DESIGN:** Prospective, comparative case series.

**PARTICIPANTS:** SSRS was used to investigate 68 orbits in 61 patients diagnosed with an orbital tumor.

**METHODS:** Patients were injected intravenously with 200 MBq of indium-111 ((111)In)-octreotide. SSRS with single photon emission computed tomography (SPECT) was performed 24 hours after injection.

**MAIN OUTCOME MEASURES:** The (111)In-octreotide uptake in orbital lesions was determined by semiquantitative uptake-ratio analysis (lesion/brain) on attenuation-corrected transverse SPECT slices.

**RESULTS:** All orbital meningiomas, including 14 ONSMs and 12 spheno-orbital meningiomas, showed high median (111)In-octreotide uptake ratios of 7.2 (range, 4.6-15.4) and 16.3 (range, 4.6-15.4), respectively. In 7 patients with a diagnosis of ONSM, the SSRS uptake ratio was significantly decreased 2.7 (1-6.8) after treatment with 54 Gy of radiotherapy. Median uptake ratios of other tumors were vascular anomalies/vascular tumors, 1.2 (range, 0.5-3.3); non-Hodgkin lymphomas, 2.9 (range, 0.9-4.2); optic nerve gliomas, 1.5 (range, 0.2-3.3); and idiopathic orbital inflammation, 1.6 (range, 1.4-1.9). By using a threshold uptake ratio of 5.9, the sensitivity of SSRS with (111)In-octreotide for ONSM was 100%, with a specificity of 97.2%.

**CONCLUSIONS:** SSRS is a useful additional tool in diagnosing ONSM and has 100% sensitivity and 97% specificity at a threshold uptake ratio of 5.9.

**Scintigrafia del recettore della somatostatina eseguita nella guaina del nervo ottico nei meningiomi**

**OBIETTIVO:** Per studiare il valore della scintigrafia del recettore della somatostatina (SSRS) nella diagnosi della guaina del nervo ottico meningiomi (ONSMs).

**DESIGN:** prospettico, serie di casi comparativa.

**PARTECIPANTI:** SSRS è stato utilizzato per indagare 68 orbite in 61 pazienti con diagnosi di un tumore orbitale.

**METODI:** I pazienti sono stati iniettati per via endovenosa con 200 MBq di indio-111 ((111) In)-octreotide. SSRS con tomografia ad emissione di singolo fotone (SPECT) è stata eseguita 24 ore dopo l'iniezione.

**MISURE PRINCIPALI DI RISULTATO:** L'(111) In-octreotide captazione nelle lesioni orbitali è

stata determinata mediante analisi semiquantitativa captazione-ratio (lesione / cervello) in attenuazione con correzione fette trasversali SPECT. **RISULTATI:** Tutti i meningiomi orbitale, di cui 14 ONSMs e 12 meningiomi sfeno-orbitale, ha mostrato medio alta (111) rapporti di captazione In-octreotide di 7,2 (range 4,6-15,4) e 16.3 (range 4,6-15,4), rispettivamente. In 7 pazienti con una diagnosi di ONSM, il rapporto di captazione SSRS era significativamente diminuito 2,7 (1-6,8) dopo trattamento con 54 Gy di radioterapia. Rapporti di assorbimento medio di altri tumori sono anomalie vascolari / tumori vascolari, 1.2 (range 0,5-3,3), linfomi non-Hodgkin, 2.9 (range: 0,9-4,2), gliomi del nervo ottico, 1.5 (range: 0,2-3,3), e idiopatica infiammazione orbitale, 1.6 (range: 1,4-1,9). Utilizzando un rapporto di assorbimento soglia di 5,9, la sensibilità di SSRS con (111) In-octreotide per ONSM è stata del 100%, con una specificità del 97,2%.

**CONCLUSIONI:** SSRS è un utile strumento aggiuntivo in ONSM diagnosi e dispone di 100% di sensibilità e specificità del 97% con un rapporto di soglia di assorbimento di 5,9.

354: Kerros C, Cavey T, Sola B, Jauzac P, Allouche S.

### **Somatostatin and opioid receptors do not regulate proliferation or apoptosis of the human multiple myeloma U266 cells.**

J Exp Clin Cancer Res. 2009 Jun 7;28:77.

**BACKGROUND:** opioid and somatostatin receptors (SSTRs) that can assemble as heterodimer were individually reported to modulate malignant cell proliferation and to favour apoptosis.

**MATERIALS AND METHODS:** SSTRs and opioid receptors expression were examined by RT-PCR, western-blot and binding assays, cell proliferation was studied by XTT assay and propidium iodide (PI) staining and apoptosis by annexin V-PI labelling.

**RESULTS:** almost all human malignant haematological cell lines studied here expressed the five SSTRs. Further experiments were conducted on the human U266 multiple myeloma cells, which express also micro-opioid receptors (MOP-R). XTT assays and cell cycle studies provide no evidence for a significant effect upon opioid or somatostatin receptors stimulation. Furthermore, neither direct effect nor potentiation of the Fas-receptor pathway was detected on apoptosis after these treatments.

**CONCLUSION:** these data suggest that SSTRs or opioid receptors expression is not a guaranty for an anti-tumoral action in U266 cell line.

### **Somatostatina e recettori oppioidi non regolano la proliferazione o l'apoptosi delle cellule U266 di mieloma multiplo umano**

**BACKGROUND:** recettori degli oppioidi e la somatostatina (SSTRs) che può montare come eterodimero erano individualmente riferito di modulare la proliferazione di cellule maligne e per favorire l'apoptosi.

**MATERIALI E METODI:** SSTRs e oppiacei espressione recettori sono stati esaminati mediante RT-PCR, western-blot e saggi di binding, la proliferazione cellulare è stata studiata mediante test XTT e ioduro di propidio (PI), la colorazione e l'apoptosi, mediante etichettatura annessina V-PI.

**RISULTATI:** quasi tutte le linee umane di cellule maligne ematologiche studiato qui espresso le cinque SSTRs. Ulteriori esperimenti sono stati condotti sulle cellule umane di mieloma multiplo U266, che esprimono anche i recettori micro-oppioidi (MOP-R). Saggi e studi XTT ciclo cellulare non forniscono alcuna prova di un effetto significativo sulla stimolazione degli oppioidi o recettori della somatostatina. Inoltre, né effetto diretto, né un potenziamento del percorso-recettore Fas è stata rilevata in apoptosi dopo questi trattamenti.

**CONCLUSIONE:** Questi dati suggeriscono che SSTRs o recettori oppioidi espressione non è una garanzia per un'azione anti-tumorale nella linea cellulare U266.

355: Seitz S, Schally AV, Treszl A, Papadia A, Rick F, Szalontay L, Szepeshazi K, Ortmann O, Halmos G, Hohla F, Buchholz S.

**Preclinical evaluation of properties of a new targeted cytotoxic somatostatin analog, AN-162 (AEZS-124), and its effects on tumor growth inhibition.**

Anticancer Drugs. 2009 Aug;20(7):553-8. PubMed PMID: 19491659.

In view of findings that various tumors express receptors for somatostatin, a new targeted cytotoxic analog of somatostatin, AN-162 (AEZS-124), consisting of doxorubicin linked through glutaric acid to the somatostatin octapeptide RC-121 was developed in our laboratory. We studied the toxicity in vivo and the effect of AN-162 on growth of the MDA-MB-231 estrogen-independent human breast cancer cell line xenografted into nude mice. AN-162 induced significant tumor growth inhibition compared with the control and the group treated with doxorubicin in equimolar doses. We also evaluated the stability of AN-162 in various sera in vitro, as this conjugate is susceptible to hydrolysis by serum carboxylesterase enzymes in the circulation. This study shows for the first time that AN-162 is a safe and effective compound for the treatment of experimental breast cancer. Our findings support the concept of targeted chemotherapy based on cytotoxic peptide analog AN-162 for the treatment of breast cancers and other cancers expressing somatostatin receptors.

**Valutazione preclinica delle proprietà di un nuovo target citotossico analogo della somatostatina , AN-162 (AEZS-124), e suoi effetti sulla inibizione della crescita tumorale**

Alla luce dei risultati che vari tumori esprimono i recettori per la somatostatina, un nuovo analogo citotossico mirato della somatostatina, AN-162 (AEZS-124), comprendente doxorubicina collegati tramite acido glutarico al octapeptide somatostatina RC-121 è stato sviluppato nel nostro laboratorio. Abbiamo studiato la tossicità in vivo e l'effetto di AN-162 sulla crescita della MDA-MB-231 estrogeno-indipendente umano linea di cellule di cancro al seno trapiantati in topi nudi. AN-162 ha indotto significativo inibizione della crescita tumorale rispetto al controllo e il gruppo trattato con doxorubicina in dosi equimolari. Abbiamo anche valutato la stabilità di AN-162 nel siero diversi in vitro, in quanto coniugato è suscettibile di idrolisi da parte degli enzimi sierici carbossilesterasi in circolo. Questo studio mostra per la prima volta che AN-162 è un composto sicuro ed efficace per il trattamento del cancro al seno sperimentale. I nostri risultati supportano il concetto di chemioterapia mirata basata sulle analogico peptide citotossico AN-162 per il trattamento dei tumori al seno e altri tumori che esprimono recettori per la somatostatina.

361: Jia WD, Xu GL, Wang W, Wang ZH, Li JS, Ma JL, Ren WH, Ge YS, Yu JH, Liu WB.

**A somatostatin analogue, octreotide, inhibits the occurrence of second primary tumors and lung metastasis after resection of hepatocellular carcinoma in mice.**

Tohoku J Exp Med. 2009;218(2):155-60. PubMed PMID: 19478472.

Occurrence of second primary tumors and metastasis remains the major obstacles to prolonged survival of patients with primary hepatocellular carcinoma (HCC). A somatostatin analogue, octreotide, has been previously reported to inhibit the growth of human HCC xenografts in nude mice through its anti-angiogenic activity. It is therefore important to investigate whether octreotide could prevent second primary hepatomas or distant metastasis following resection of primary HCC. In this study, nude mice, bearing the human HCC xenografts with highly metastatic potential (LCI-D20) in the left liver lobe, underwent tumor resection, and received intraperitoneal administration of octreotide or saline as a control for 35 consecutive days. Compared with the control group, octreotide at the doses of 100 and 200 microg/kg/day significantly inhibited the growth ( $P < 0.001$  and  $P < 0.001$ , respectively) and incidence of second primary tumors ( $P = 0.016$  and  $P = 0.001$ , respectively), decreased lung metastasis ( $P < 0.001$  and  $P < 0.001$ , respectively), and prolonged the life span ( $P = 0.029$  and  $P = 0.006$ , respectively). Moreover, intratumoral angiogenesis quantified by microvessel density as well as serum and tissue vascular endothelial growth factor (VEGF) levels were considerably decreased in octreotide-treated animals compared to the control animals. These findings suggest that octreotide may prevent the occurrence of second primary hepatomas and lung metastasis after resection of primary HCC, which may be partially attributed to down-regulation of VEGF and subsequent reduction in tumor angiogenesis. Octreotide administration may be useful as an adjuvant therapy to improve survival of patients with HCC.

**Un analogo della somatostatina, l'octreotide, inibisce lo sviluppo di tumori primari secondari e metastasi polmonari nei topi dopo la resezione di carcinoma epatocellulare**

Presenza di secondi tumori primari e le metastasi rimane principali ostacoli alla prolungata sopravvivenza di pazienti con carcinoma epatocellulare primario (HCC). Un analogo della somatostatina, octreotide, è stato precedentemente segnalato per inibire la crescita delle risorse umane eterotrapianti HCC in topi nudi attraverso le sue attività anti-angiogenica. È quindi importante per verificare se l'octreotide potrebbe impedire seconda epatomi primario o metastasi a distanza dopo resezione di primaria HCC. In questo studio, topi nudi, recante il eterotrapianti HCC con molto potenziale metastatico (LCI-D20) nel lobo epatico sinistro, ha subito la resezione del tumore, e ha ricevuto la somministrazione intraperitoneale di octreotide o di soluzione fisiologica come controllo per 35 giorni consecutivi. Rispetto al gruppo di controllo, octreotide alle dosi di 100 e 200 microg / kg / die ha inibito significativamente la crescita ( $P < 0,001$  e  $P < 0,001$ ,

rispettivamente) e l'incidenza di secondi tumori primari ( $p = 0,016$  ep  $= 0,001$ , rispettivamente), diminuzione della metastasi polmonare ( $p < 0,001$  ep  $< 0,001$ , rispettivamente), ed ha prolungato la durata della vita ( $p = 0,029$  ep  $= 0,006$ , rispettivamente). Inoltre, l'angiogenesi intratumorale quantificato dalla densità dei microvasi così come siero e nel tessuto fattore di crescita vascolare endoteliale (VEGF) erano notevolmente diminuiti negli animali trattati con octreotide rispetto agli animali di controllo. Questi risultati suggeriscono che l'octreotide può prevenire il verificarsi di secondo epatomi primario e delle metastasi polmonari dopo resezione di epatocarcinoma primario, che può essere parzialmente attribuito a down-regulation di VEGF e conseguente riduzione nell'angiogenesi tumorale. Somministrazione di octreotide può essere utile come terapia adiuvante per migliorare la sopravvivenza dei pazienti con HCC.

362: Teunissen JJ, Krenning EP, de Jong FH, de Rijke YB, Feelders RA, van Aken MO, de Herder WW, Kwekkeboom DJ.

### **Effects of therapy with [177Lu-DOTA 0,Tyr 3]octreotate on endocrine function.**

Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2009 Nov;36(11):1758-66.

**PURPOSE:** Peptide receptor radionuclide therapy (PRRT) with radiolabelled somatostatin analogues is a novel therapy for patients with somatostatin receptor-positive tumours. We determined the effects of PRRT with [(177)Lu-DOTA(0),Tyr(3)]octreotate ((177)Lu-octreotate) on glucose homeostasis and the pituitary-gonadal, pituitary-thyroid and pituitary-adrenal axes.

**METHODS:** Hormone levels were measured and adrenal function assessed at baseline and up to 24 months of follow-up.

**RESULTS:** In 35 men, mean serum inhibin B levels were decreased at 3 months post-therapy ( $205 \pm 16$  to  $25 \pm 4$  ng/l,  $p < 0.05$ ) and follicle-stimulating hormone (FSH) levels increased ( $5.9 \pm 0.5$  to  $22.7 \pm 1.4$  IU/l,  $p < 0.05$ ). These levels returned to near baseline levels. Total testosterone and sex hormone binding globulin (SHBG) levels decreased ( $15.0 \pm 0.9$  to  $10.6 \pm 1.0$  nmol/l,  $p < 0.05$  and  $61.8 \pm 8.7$  to  $33.2 \pm 3.7$  nmol,  $p < 0.05$ ), respectively, whereas non-SHBG-bound T did not change. An increase ( $5.2 \pm 0.6$  to  $7.7 \pm 0.7$  IU/l,  $p < 0.05$ ) of luteinizing hormone (LH) levels was found at 3 months of follow-up returning to baseline levels thereafter. In 21 postmenopausal women, a decrease in levels of FSH ( $74.4 \pm 5.6$  to  $62.4 \pm 7.7$  IU/l,  $p < 0.05$ ) and LH ( $26.8 \pm 2.1$  to  $21.1 \pm 3.0$  IU/l,  $p < 0.05$ ) was found. Of 66 patients, 2 developed persistent primary hypothyroidism. Free thyroxine (FT(4)) levels decreased ( $17.7 \pm 0.4$  to  $15.6 \pm 0.6$  pmol/l,  $p < 0.05$ ), whereas thyroid-stimulating hormone (TSH) and triiodothyronine (T(3)) levels did not change. Reverse triiodothyronine (rT(3)) levels decreased ( $0.38 \pm 0.03$  to  $0.30 \pm 0.01$  nmol/l,  $p < 0.05$ ). Before and after therapy adrenocorticotrophic hormone (ACTH) stimulation tests showed an adequate response of serum cortisol ( $> 550$  nmol/l,  $n = 18$ ). Five patients developed elevated HbA(1c) levels ( $> 6.5\%$ ).

**CONCLUSION:** In men (177)Lu-octreotate therapy induced transient inhibitory effects on spermatogenesis, but non-SHBG-bound T levels remained unaffected. In the long term, gonadotropin levels decreased significantly in postmenopausal women. Only a few patients developed hypothyroidism or elevated levels of HbA(1c). Therefore, PRRT with (177)Lu-octreotate can be regarded as a safe treatment modality with respect to short- and long-term endocrine function.

### **Effetti della terapia con [177Lu-DOTA 0,Tyr 3]octreotato sulla funzione endocrina**

SCOPO: recettore del peptide terapia radionuclide (PRRT) con analoghi della somatostatina marcata è una nuova terapia per i pazienti con tumori positivi al recettore della somatostatina. Abbiamo determinato gli effetti di PRRT con [(177) Lu-DOTA (0), Tyr (3)] octreotate ((177) Lu-

octreotate) sull'omeostasi del glucosio e l'ipofisi-gonadi, gli assi ipofisi-tiroide e ipofisi-surrene. METODI: sono stati misurati i livelli ormonali e la funzione surrenale valutati al basale e fino a 24 mesi di follow-up.

RISULTATI: In 35 uomini, plasmatica media livelli di inibina B sono stati diminuiti a 3 mesi post-terapia ( $205 \pm 16$  e  $25 \pm 4$  ng / l,  $p < 0,05$ ) e ormone follicolo-stimolante (FSH), aumentati livelli ( $5,9 \pm 0,5$ - $22,7 \pm 1,4$  UI / l,  $p < 0,05$ ). Questi livelli sono tornati ai livelli basali vicino. testosterone totale e globulina legante gli ormoni sessuali (SHBG), diminuzione dei livelli ( $15,0 \pm 0,9$ - $10,6 \pm 1,0$  nmol / l,  $p < 0,05$  e  $61,8 \pm 8,7$ - $33,2 \pm 3,7$  nmol,  $p < 0,05$ ), rispettivamente, mentre T non-SHBG-bound non è cambiato. Un aumento ( $5,2 \pm 0,6$ - $7,7 \pm 0,7$  UI / l,  $p < 0,05$ ) di ormone luteinizzante (LH) livelli è stato trovato a 3 mesi di follow-up ritornando ai livelli basali dopo. In 21 donne in postmenopausa, una diminuzione dei livelli di FSH ( $74,4 \pm 5,6$ - $62,4 \pm 7,7$  UI / l,  $p < 0,05$ ) e LH ( $26,8 \pm 2,1$ - $21,1 \pm 3,0$  UI / L,  $P < 0,05$ ) è stato trovato. Dei 66 pazienti, 2 sviluppato persistente ipotiroidismo primario. tiroxina libera (FT (4)) diminuzione dei livelli ( $17,7 \pm 0,4$ - $15,6 \pm 0,6$  pmol / l,  $p < 0,05$ ), mentre ormone stimolante la tiroide (TSH) e la triiodotironina (T (3)) i livelli di non cambiamento. Triiodotironina inversa (RT (3)) diminuzione dei livelli ( $0,38 \pm 0,03$ - $0,30 \pm 0,01$  nmol / l,  $p < 0,05$ ). Prima e dopo la terapia con ormone adrenocorticotropo (ACTH), test di stimolazione ha dimostrato una adeguata risposta di cortisolo nel siero ( $> 550$  nmol / l,  $n = 18$ ). Cinque pazienti hanno sviluppato elevata HbA (1c) i livelli ( $> 6,5\%$ ).

CONCLUSIONE: In uomini (177) terapia Lu-octreotate indotto transitori effetti inibitori sulla spermatogenesi, ma i livelli di SHBG-T non legato rimase inalterato. A lungo termine, i livelli di gonadotropina è diminuita significativamente nelle donne in postmenopausa. Solo pochi pazienti ha sviluppato ipotiroidismo o elevati livelli di HbA (1c). Pertanto, con PRRT (177) Lu-octreotate può essere considerato come una modalità di trattamento sicura rispetto a breve e lungo termine funzione endocrina.

367: Li X, Du X, Huo T, Liu X, Zhang S, Yuan F.

**Specific targeting of breast tumor by octreotide-conjugated ultrasmall superparamagnetic iron oxide particles using a clinical 3.0-Tesla magnetic resonance scanner.**

Acta Radiol. 2009Jul;50(6):583-94. PubMed PMID: 19449236.

**BACKGROUND:** Targeted magnetic resonance contrast agents have enabled the imaging of biological processes in vivo, and current insights have opened up new perspectives for the monitoring and diagnosis of many diseases.

**PURPOSE:** To develop a contrast agent for targeting somatostatin receptors (SSTRs) expressed on breast cancer cells, and to evaluate the detection capabilities of a molecular probe using magnetic resonance (MR) imaging in an in vivo mouse model of breast carcinoma.

**MATERIAL AND METHODS:** Octreotide (OCT) was conjugated with polyethylene glycol-coated ultrasmall superparamagnetic iron oxide (USPIO) nanoparticles by an ethyl-3-(dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC)-mediated reaction. Prussian blue staining for intracellular iron, 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay and cellular MR imaging in vitro were performed on labeled MCF-7 breast cancer cells. Twenty-four mice bearing tumors were divided into two groups: 1) study group with injection of OCT-USPIOs (n=12); 2) control group with injection of USPIOs (n=12). Tumors were monitored in vivo using a 3.0-Tesla MR scanner before and after injection of contrast agents, and the findings were correlated with the histopathological findings.

**RESULTS:** OCT-USPIOs were shown to specifically bind to MCF-7 cells and did not affect proliferation and viability of the cells labeled. T(2) value of the cells labeled with OCT-USPIOs in vitro was 56.465±13.147 ms, while those of the cells cultured with USPIOs and gelatin/phosphate-buffered saline (PBS) gel alone were 75.435±16.171 ms and 85.950±22.352 ms, respectively (P<0.05). Signal intensity of the tumor gradually decreased, and its T(2) value reached a minimum of approximately 24.49% 6 hours after injection of OCT-USPIOs in vivo, compared to a minimum of 21.89% after 2 hours in the control group. Iron depositions were visualized as blue particles in tumor 6 hours after injection of OCT-USPIOs, while no blue particles were observed in the control group.

**CONCLUSION:** SSTR expression in vitro and in vivo can be selectively and directly imaged with an MR molecular probe. OCT-conjugated PEG-coated USPIO is potentially suitable to be used as a magnetic resonance contrast agent for MR imaging in vivo and increases the sensitivity for the early detection of breast carcinoma.

**Obiettivi specifici del tumore al seno tramite particelle di ossido di ferro superparamagnetiche ultrapiccole coniugate con octreotide usando risonanza magnetica 3.0-Tesla**

**BACKGROUND:** Targeted risonanza magnetica agenti di contrasto hanno consentito l'imaging dei processi biologici in vivo, e le intuizioni attuali hanno aperto nuove prospettive per il monitoraggio e la diagnosi di molte malattie.

**SCOPO:** Per sviluppare un agente di contrasto per il targeting recettori per la somatostatina (SSTRs) espresso sulle cellule del cancro al seno, e di valutare la capacità di individuazione di una sonda molecolare mediante risonanza magnetica (RM) in un modello murino in vivo del carcinoma della mammella.

**MATERIALI E METODI:** Octreotide (OCT) è stato coniugato con polietilene glicole rivestita di ossido di ferro ultrasmall superparamagnetico (USPIO) nanoparticelle con un 3-etil-(dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) Reazione-mediata. Colorazione blu di Prussia per il ferro intracellulare, 3 - (4, 5-dimethylthiazol-2-ile) -2, 5-diphenyltetrazolium bromuro (MTT), test e RM cellulari in vitro sono stati eseguiti su etichetta cellule del seno MCF-7 il cancro. Ventiquattro topi portatori di tumori sono stati divisi in due gruppi: 1) gruppo di studio con iniezione di ottobre-USPIOs (n = 12), 2) gruppo di controllo con iniezione di USPIOs (n = 12). I tumori sono stati monitorati in vivo, utilizzando uno scanner da 3,0 Tesla, prima e dopo l'iniezione di mezzi di contrasto, ed i risultati sono stati correlati con i risultati istopatologici.

**RISULTATI:** OTT-USPIOs hanno dimostrato di legarsi a particolari cellule MCF-7 e non ha influenzato la proliferazione e la vitalità delle cellule marcate. T (2) il valore delle cellule marcate con OTT-USPIOs in vitro è  $56,465 \pm 13,147$  ms, mentre quelle delle cellule coltivate con USPIOs e gelatina / tampone fosfato salino (PBS) gel solo, sono state  $75,435 \pm 16,171$  ms e  $85,950 \pm 22,352$  ms, rispettivamente (P <0,05). intensità di segnale del tumore gradualmente diminuiti, e la sua T (2) ha raggiunto il valore minimo di circa il 24,49% 6 ore dopo l'iniezione di ottobre-USPIOs in vivo, rispetto ad un minimo del 21,89% dopo 2 ore nel gruppo di controllo. depositi di ferro sono stati visualizzati come particelle blu nel tumore 6 ore dopo l'iniezione di ottobre-USPIOs, mentre non particelle blu sono state osservate nel gruppo di controllo.

**CONCLUSIONE:** SSTR espressione in vitro e in vivo possono essere selettivamente e direttamente ripreso con una sonda molecolare MR. OTT-coniugati USPIO PEG-rivestito è potenzialmente adatto ad essere usato come agente di contrasto risonanza magnetica per imaging RM in vivo e aumenta la sensibilità per la diagnosi precoce del carcinoma della mammella.

368: Oberg K.

**Somatostatin analog octreotide LAR in gastro-entero-pancreatic tumors.**

Expert Rev Anticancer Ther. 2009 May;9(5):557-66. Review. PubMed PMID:19445573.

Neuroendocrine tumors (NETs) are considered to be rare but, during the last two decades, their incidence and prevalence has considerably increased in gastro-entero-pancreatic (GEP) NETs. Most GEP-NETs express somatostatin receptors, which could be targets for treatment. The development of somatostatin analogs for treatment of functioning NETs was a revolution in the treatment of these patients and is still a cornerstone for managing hormone-related clinical symptoms. Furthermore, somatostatin analogs have also demonstrated an anti-tumor effect, with stabilization of tumor growth over long periods of time. The development of a long-acting formulation of octreotide long-acting release (LAR) significantly improved the quality of life for patients with functioning NETs in terms of necessitating only monthly injections. The side effects are few and easily manageable. In the future, somatostatin analogs will continue to be a major treatment option for functioning NETs, but will be combined with other biologicals, such as  $\alpha$ -interferons, mTOR inhibitors and VEGF inhibitors. A new multireceptor somatostatin analog, SOM230 (pasireotide), as well as chimeric molecules, such as dopastatin (a combination of a somatostatin analogue plus a dopamine agonist), will come into the clinical management of GEP-NETs.

**Analogo della somatostatina octreotide LAR nei tumori gastro-entero-pancreatici**

I tumori neuroendocrini (NET) sono considerate rare ma, negli ultimi due decenni, la loro incidenza e la prevalenza è aumentato notevolmente in gastro-entero-pancreatico (GEP) le reti. La maggior parte dei recettori della somatostatina GEP-NET express, che potrebbero essere gli obiettivi per il trattamento. Lo sviluppo di analoghi della somatostatina per il trattamento di TNE funzionamento fu una rivoluzione nel trattamento di questi pazienti ed è ancora una pietra miliare per la gestione dei sintomi clinici ormono-correlati. Inoltre, gli analoghi della somatostatina hanno anche dimostrato un effetto anti-tumorale, con stabilizzazione della crescita del tumore per lunghi periodi di tempo. Lo sviluppo di una formulazione long-acting di octreotide a lunga azione di rilascio (LAR) migliorato significativamente la qualità di vita dei pazienti con il funzionamento delle reti in termini di necessita solo di iniezioni mensili. Gli effetti collaterali sono pochi e facilmente gestibili. In futuro, analoghi della somatostatina continuerà ad essere un'importante alternativa per il funzionamento NET, ma saranno combinati con altri prodotti biologici, come gli interferoni, inibitori di mTOR e inibitori VEGF. Un nuovo analogo della somatostatina multireceptor, SOM230 (pasireotide), così come le molecole chimeriche, come dopastatin (una combinazione di un analogo della somatostatina, più un agonista della dopamina), entrerà nella gestione clinica del GEP-NET.

373: Tamayo Alonso P, Ruano Pérez R, Muñoz Herrera A.

**[Diagnosis and follow-up of head and neck paragangliomas. Contributions of nuclear medicine].**

ActaOtorrinolaringol Esp. 2009 Feb;60 Suppl 1:68-75. Spanish. PubMed PMID: 19245777.

Head and neck paragangliomas are neuroendocrine tumors that express somatostatin type 2 receptors and can consequently be visualized through nuclear imaging techniques, using radionuclide-labelled somatostatin analogs, specifically <sup>111</sup>In-pentetreotide. <sup>111</sup>In-pentetreotide scintigraphy is a safe and non-invasive technique that can be used to explore the entire body; thus, multifocal paragangliomas as well as malignant paragangliomas with local and distant metastasis can be detected. Because this technique is functional, it is highly useful to confirm recurrence or residual tumors, as well as to follow-up patients undergoing surgery. Paragangliomas can be familial and consequently this technique can be used for screening of familial cases. Recently, other nuclear imaging techniques, based on positron emission tomography (PET) technology, have been developed for the diagnosis of these tumors. Appropriately radiolabeled somatostatin analogs could potentially be used for the treatment of paragangliomas.

**[Diagnosi e dei paragangliomi della testa e del collo. Contributo della medicina nucleare].**

I paragangliomi della testa e del collo sono tumori neuroendocrini che esprimono recettori per la somatostatina di tipo 2 e di conseguenza, possono essere visualizzati attraverso tecniche di imaging nucleare, con analoghi della somatostatina radionuclide-marcato, in particolare <sup>111</sup>In-pentetreotide. Scintigrafia <sup>111</sup>In-pentetreotide è una tecnica sicura e non invasiva che può essere utilizzato per esplorare tutto il corpo: così, paragangliomi multifocale così come paragangliomi maligne con metastasi locali ea distanza può essere rilevato. Poiché questa tecnica è funzionale, è molto utile per confermare i tumori recidiva o residui, nonché di follow-up dei pazienti sottoposti a intervento chirurgico. Paragangliomi può essere familiare e, di conseguenza questa tecnica può essere utilizzata per lo screening dei casi familiari. Recentemente, altre tecniche di imaging nucleare, basata sulla tomografia ad emissione di positroni (PET), la tecnologia, sono stati sviluppati per la diagnosi di tali tumori. Analoghi della somatostatina opportunamente radioattivo potrebbe essere utilizzata per il trattamento di paragangliomas.

376: Johansson M, McKay JD, Wiklund F, Rinaldi S, Hallmans G, Bälter K, Adami HO, Grönberg H, Stattin P, Kaaks R.

**Genetic variation in the SST gene and its receptors in relation to circulating levels of insulin-like growth factor-I, IGFBP3, and prostate cancer risk.**

Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2009May;18(5):1644-50. PubMed PMID: 19423539.

**BACKGROUND:** Somatostatin (SST) and its receptors (SSTR1-5) may have a role in prostate cancer by influencing the IGF1 hormone axis or through direct effects on prostate epithelia. We have investigated if genetic variation in the SST and SSTR1-5 genes influences prostate cancer risk and/or circulating IGF1 and IGFBP3 hormone levels.

**MATERIALS AND METHODS:** We analyzed 28 haplotype tagging single nucleotide polymorphisms in the SST and SSTR1-5 genes in a case-control/genetic association study to investigate the association between genetic variation and prostate cancer risk. The study included 2863 cases and 1737 controls from the Cancer Prostate in Sweden (CAPS) study. To investigate the genetic influence on circulating hormone levels, plasma concentrations of IGF1 and IGFBP3 were analyzed in 874 controls of the CAPS study and 550 male subjects from the Northern Sweden Health and Disease Cohort (NSHDC).

**RESULTS:** No clear association between prostate cancer risk and genetic variation of the SST and SSTR1-5 genes was identified. The SSTR5 missense single nucleotide polymorphism rs4988483 was associated with circulating IGF1 ( $P = 0.002$ ) and IGFBP3 ( $P = 0.0003$ ) hormone levels in CAPS controls, with a per allele decrease of approximately 11%. This decrease was replicated in NSHDC for circulating IGFBP3 ( $P = 0.01$ ) but not for IGF1 ( $P = 0.09$ ). Combining CAPS and NSHDC subjects indicated evidence of association between rs4988483 and both IGFBP3 ( $P = 2 \times 10^{-5}$ ) and IGF1 ( $P = 0.0004$ ) hormone levels.

**CONCLUSIONS:** Our results suggest that genetic variation in the SSTR5 gene and, particularly, the rs4988483 single nucleotide polymorphism influence circulating IGF1 and IGFBP3 hormone levels with no measurable effect on prostate cancer risk.

**Variazione genetica nel gene SST e suoi recettori in relazione ai livelli circolanti del fattore I di crescita simil insulina, IGFBP3, e rischio di cancro prostatico**

**BACKGROUND:** La somatostatina (SST) e dei suoi recettori (SSTR1-5) può avere un ruolo nel cancro alla prostata, influenzando l'asse ormonale IGF1 o attraverso effetti diretti sul epiteli prostata. Abbiamo studiato se la variazione genetica nella SST e SSTR1-5 geni che influenza il rischio di cancro alla prostata e / o circolanti IGF1 e livelli di ormone IGFBP3.  
**MATERIALI E METODI:** Abbiamo analizzato 28 aplotipo tagging polimorfismi a singolo

nucleotide nel SST e SSTR1-5 geni in uno studio di associazione case-control/genetic per indagare l'associazione tra variazione genetica e il rischio di cancro alla prostata. Lo studio ha incluso 2.863 casi e 1.737 controlli dal cancro alla prostata in Svezia (CAPS) di studio. Per studiare l'influenza genetica sui livelli di ormone circolante, le concentrazioni plasmatiche di IGFI e IGFBP3 sono stati analizzati in 874 controlli dello studio CAPS e 550 soggetti di sesso maschile dalla Svezia settentrionale Salute e delle Malattie coorte (NSHDC).  
**RISULTATI:** Nessuna chiara associazione tra rischio di cancro alla prostata e la variazione genetica della SST e SSTR1-5 geni è stato identificato. Il polimorfismo missense singolo nucleotide rs4988483 SSTR5 è stato associato con circolanti IGFI (P = 0,002) e IGFBP3 (P = 0,0003) i livelli di ormone nei controlli CAPS, con un allele per diminuire di circa l'11%. Questa riduzione è stata replicata in NSHDC per la circolazione IGFBP3 (P = 0,01) ma non per IGFI (P = 0,09). Combinando CAPS e soggetti indicati NSHDC evidenza di associazione tra rs4988483 e sia IGFBP3 (P =  $2 \times 10^{-5}$ ) e IGFI (P = 0,0004) i livelli di ormone.  
**CONCLUSIONI:** I nostri risultati suggeriscono che la variazione genetica nel gene SSTR5 e, in particolare, il rs4988483 singolo polimorfismo del nucleotide influenza circolanti IGFI e livelli di ormone IGFBP3 senza alcun effetto misurabile sul rischio di cancro alla prostata.

377: Luboldt W, Zöphel K, Wunderlich G, Abramyuk A, Luboldt HJ, Kotzerke J.

#### **Visualization of somatostatin receptors in prostate cancer and its bone metastases with Ga-68-DOTATOC PET/CT.**

Mol Imaging Biol. 2010 Jan-Feb;12(1):78-84.Epub 2009 May 7. PubMed PMID: 19421819.

**PURPOSE:** To assess DOTATOC-affine somatostatin receptor expression in advanced prostate cancer and its bone metastases with regard to DOTATOC-mediated receptor therapies, using a Ga-68-DOTATOC PET/CT.

**PROCEDURES:** Twenty consecutive patients with advanced prostate cancer underwent bone scintigraphy, followed by Ga-68-DOTATOC PET/CT within 3 weeks. Through side-by-side comparison with bone scintigraphy, the number of visible bone metastases on PET was determined. In addition, in cases of visible metastases, the maximum standard uptake value (SUV(max)) of Ga-68-DOTATOC was measured in the metastases and in normal bone. In patients who did not undergo a prostatectomy (n = 12), the SUV(max) was additionally measured in the prostate and in adjacent tissue. For focal lesions, the difference in SUV(max) (Delta SUV(max)) between the metastases and normal bone was calculated. For patients still having their prostate, a Delta SUV(max) between the prostate and its adjacent tissue was calculated.

**RESULTS:** Sixty four of 216 metastases (30%) were visible in 13 patients with focal metastases. Of six patients with diffuse metastases (superscan), one showed diffuse metastases, three showed a total of ten focal metastases, and two showed no correlate on PET. One patient with a neuroendocrine prostate cancer showed no correlate on PET. The maximum Delta SUV(max) between metastases and normal bone was 4.9 (mean = 1.6 +/- 0.9) and between the prostate and adjacent tissue 5.9 (mean = 2.8 +/- 1.6).

**CONCLUSIONS:** In prostate cancer and its bone metastases, DOTATOC-affine somatostatin receptors (subtype 2 and 5) can be visualized with Ga-68-DOTATOC PET/CT. But their expression is so weak that other conjugates should be tested for receptor-mediated therapies which are better at addressing the prostate cancer-specific somatostatin receptor subtypes 1 and 4-or even other receptors.

#### **Visualizzazione dei recettori della somatostatina con Ga-68-DOTATOC PET/CT nel cancro prostatico e nelle metastasi ossee**

SCOPO: Per valutare DOTATOC-affine espressione del recettore della somatostatina nel cancro avanzato della prostata e le sue metastasi ossee per quanto riguarda le terapie DOTATOC recettore-mediata, con un Ga-68-DOTATOC PET / CT.

PROCEDURE: Venti pazienti consecutivi con cancro avanzato della prostata sottoposti a scintigrafia ossea, seguita da Ga-68-DOTATOC PET / CT entro 3 settimane. Attraverso il confronto side-by-side con la scintigrafia ossea, il numero delle metastasi ossee visibili sul PET è stata determinata. Inoltre, nei casi di metastasi visibile, il valore massimo assorbimento standard (SUV (max)) di Ga-68-DOTATOC è stata misurata in metastasi e in osso normale. Nei pazienti che non hanno subito una prostatectomia (n = 12), il SUV (max) è stato inoltre misurato nella prostata e nei tessuti adiacenti. Per le lesioni focali, la differenza di SUV (max) (Delta SUV (max)) tra le metastasi e l'osso normale è stato calcolato. Per i pazienti che hanno ancora il loro prostata, una SUV Delta (max) tra la prostata e il suo tessuto adiacente è stato calcolato.

RISULTATI: Sixty Four di 216 metastasi (30%) erano visibili in 13 pazienti con metastasi focale. Dei sei pazienti con metastasi diffuse (SuperScan), uno ha mostrato metastasi diffuse, tre hanno mostrato un totale di dieci metastasi focale, e due non ha mostrato alcuna correlazione in PET. Un paziente con un cancro alla prostata neuroendocrino non ha mostrato alcuna correlazione in PET. Il massimo Delta SUV (max) tra metastasi e osso normale è di 4,9 (media = 1,6 + / - 0,9) e tra il tessuto prostatico e adiacente 5,9 (media = 2,8 + / - 1,6).

CONCLUSIONI: Nel cancro della prostata e le sue metastasi ossee, i recettori della somatostatina DOTATOC-affine (sottotipo 2 e 5) può essere visualizzato con Ga-68-DOTATOC PET / CT. Ma la loro espressività è così debole che coniuga le altre dovrebbero essere testati per le terapie mediata da recettori, che sono maggiormente ad affrontare il cancro-specifica del recettore della somatostatina prostata sottotipi 1 e 4, o anche altri recettori.

386: Liu Q, Bee MS, Schonbrunn A.

**Site specificity of agonist and second messenger-activated kinases for somatostatin receptor subtype 2A (Sst2A) phosphorylation.**

Mol Pharmacol. 2009 Jul;76(1):68-80.

Somatostatin receptor subtype 2A (sst2A) mediates many of the endocrine and neuronal actions of somatostatin and is the target of somatostatin analogs in cancer therapy. As with many G-protein-coupled receptors, agonist stimulation causes sst2A receptor desensitization and internalization, events that require receptor phosphorylation. Furthermore, heterologous receptor activation of protein kinase C (PKC) also increases sst2A receptor phosphorylation and internalization. Here we analyzed a series of sst2A receptor mutants biochemically to identify residues in the receptor carboxyl terminus that were phosphorylated upon agonist stimulation, and we then generated four phosphorylation-sensitive antibodies to those residues. Once the selectivity of each antibody for its phosphorylated and nonphosphorylated target sequence was determined, the phospho-site-specific antibodies were used to demonstrate that somatostatin treatment of Chinese hamster ovary (CHO) cells expressing the wild type sst2A receptor increased phosphorylation on five residues in the receptor C terminus: Ser341, Ser343, Ser348, Thr353, and Thr354. Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) increased receptor phosphorylation only on Ser343. Inhibition of PKC blocked PMA but not somatostatin stimulation, showing that different kinases catalyzed Ser343 phosphorylation. In contrast, somatostatin-stimulated sst2A receptor phosphorylation was inhibited by knockdown of G-protein coupled receptor kinase-2 with siRNA. Somatostatin increased sst2A receptor phosphorylation on the same five residues in GH4C1 pituitary cells as in CHO cells. However, PMA stimulated sst2A receptor phosphorylation on both Ser343 and Ser348 in GH4C1 cells. These results characterize the complex pattern of sst2A receptor phosphorylation by agonist and second messenger-activated kinases for the first time and indicate that cell type-specific regulation of sst2A receptor phosphorylation occurs.

**Sito specificità dell'agonista e delle chinasi attivate dal secondo messaggero per la fosforilazione del sottotipo 2A del recettore della somatostatina**

Il sottotipo 2A di recettore della somatostatina (sst2A) media molte delle azioni endocrine e neuronale di somatostatina, ed è il bersaglio di analoghi della somatostatina nella terapia del cancro. Come per molti recettori proteina G accoppiata, la stimolazione agonista cause sst2A desensibilizzazione dei recettori e di interiorizzazione, eventi che richiedono la fosforilazione del recettore. Inoltre, eterologa attivazione dei recettori della proteina chinasi C (PKC) aumenta la fosforilazione sst2A recettore e interiorizzazione. Qui abbiamo analizzato una serie di mutanti del

recettore sst2A biochimicamente identificare i residui nel carbossile terminale del recettore che sono stati fosforilati dopo stimolazione con agonisti, e abbiamo quindi generato quattro anticorpi fosforilazione sensibili a questi residui. Una volta che la selettività di ciascun anticorpo per la sua sequenza bersaglio fosforilato e nonphosphorylated è stato determinato, gli anticorpi fosfo-sito-specifici sono stati utilizzati per dimostrare che il trattamento della somatostatina di cellule ovariche di criceto cinese (CHO) le cellule che esprimono il recettore wild sst2A tipo aumentata fosforilazione su cinque residui in il capolinea del recettore C: Ser341, Ser343, Ser348, Thr353 e Thr354. Phorbol myristate 12-13-acetato (PMA) ha aumentato la fosforilazione del recettore solo su Ser343. L'inibizione della PKC bloccato somatostatina PMA ma non stimolazione, mostrando che la fosforilazione delle chinasi diverse catalizzata Ser343. Al contrario, la somatostatina-stimolato la fosforilazione del recettore sst2A è stata inibita da colpo di G-recettori accoppiati alla proteina chinasi-2 con siRNA. Somatostatina aumentata fosforilazione sst2A recettore per gli stessi cinque residui in GH4C1 cellule ipofisarie come in cellule CHO. Tuttavia, PMA stimolato la fosforilazione sst2A recettore su entrambi Ser343 e Ser348 in GH4C1 cellule. Questi risultati caratterizzano la complessa trama di fosforilazione recettoriale sst2A da agonista e il secondo messaggero-chinasi attivata per la prima volta e indica che la regolamentazione delle cellule specifiche del tipo di fosforilazione del recettore sst2A si verifica.

394: Cariaga-Martinez AE, Lorenzati MA, Riera MA, Cubilla MA, De La Rossa A, Giorgio EM, Tiscornia MM, Gimenez EM, Rojas ME, Chaneton BJ, Rodríguez DI, Zapata PD.

#### **Tumoral prostate shows different expression pattern of somatostatin receptor 2 (SSTR2) and phosphotyrosine phosphatase SHP-1 (PTPN6) according to tumor progression.**

Adv Urol. 2009:723831. Epub 2009 Apr 12.

Prostate proliferation is dependent of androgens and many peptide hormones. Recent reports suggest that SSTR2 and SHP-1 were two fundamental components on antiproliferative effect of somatostatin. Many studies on SHP-1 revealed that the expression of this protein was diminished or abolished in several of the cancer cell lines and tissues examined. However, it is necessary to confront the cell lines data with real situation in cancer cases. Our studies have shown that epithelial expressions of both proteins, SHP-1 and SSTR2, in normal and benign hyperplasia are localized in the luminal side of duct and acinar cells. Also, SSTR2 is expressed in stromal cells. In malignant prostate tissue, SHP-1 was diminished in 28/45 cases or absent in 12/45 cases, whereas SSTR2 epithelial was diminished in 38/45 cases or lost in only 2/45 cases. The intensity of immunostained was highly negative correlated with Gleason grade for two proteins.

#### **Il tumore alla prostata mostra il differente pattern di espressione del recettore 2 della somatostatina(SSTR2) e della fosfotirosina fosfatasi SHP-1 (PTPN6) in accordo alla progressione tumorale**

La proliferazione della prostata è dipendente di androgeni e ormoni peptidici molti. Rapporti recenti suggeriscono che SSTR2 e SHP-1 sono stati due componenti fondamentali per effetto antiproliferativo della somatostatina. Molti studi su SHP-1 ha rivelato che l'espressione di questa proteina risulta ridotta o abolita in molti di linee cellulari del cancro e tessuti esaminati. Tuttavia, è necessario confrontare i dati di linee cellulari con la situazione reale dei casi di cancro. I nostri studi hanno dimostrato che le espressioni di entrambe le proteine epiteliali, SHP-1 e SSTR2, in iperplasia benigna normale e sono localizzati nel lato luminale delle cellule del dotto e acinose. Inoltre, SSTR2 è espresso in cellule stromali. Nel tessuto prostatico maligno, SHP-1 è stato diminuito a 28/45 casi o assenti in 12/45 casi, mentre epiteliali SSTR2 era diminuito in 38/45 casi o perso in soli 2 / 45 casi. L'intensità della immunostained era altamente negativo correlato con Gleason grado per due proteine.

401: Norden AD, Drappatz J, Wen PY.

**Advances in meningioma therapy.**

Curr NeurolNeurosci Rep. 2009 May;9(3):231-40. Review. PubMed PMID: 19348712.

Meningiomas are the most common primary brain tumors in adults. Most of them are benign (World Health Organization grade I), slow-growing lesions, but some are classified as atypical (WHO grade II) or malignant (WHO grade III). Surgical resection is curative when complete removal of a benign meningioma is possible. Incompletely resected tumors and high-grade lesions are frequently treated with fractionated radiotherapy or stereotactic radiosurgery. Radiotherapy effectively reduces recurrence rates with limited toxicity. High-grade meningiomas tend to recur following maximal treatment with surgery and radiation. Chemotherapeutic agents, including hydroxyurea, have been used for recurrent disease with marginal efficacy. As the molecular pathogenesis of meningiomas is elucidated, targeted drug therapies may prove useful. Angiogenesis inhibitors, agents that target fundamental cell signaling pathways, somatostatin analogues, and a variety of other molecular treatments appear promising.

**Progressi nella terapia del meningioma**

I meningiomi sono i più comuni tumori primari del cervello negli adulti. La maggior parte di essi sono benigni (World Health Organization I grado), lesioni a lenta crescita, ma alcuni sono classificati come atipici (grado II) o maligni (grado III). La resezione chirurgica è curativa quando la rimozione completa di un meningioma benigno è possibile. Non completamente asportato i tumori e le lesioni di alto grado sono spesso trattati con radioterapia o la radiochirurgia stereotassica frazionata. Radioterapia riduce efficacemente tassi di recidiva con limitata tossicità. Meningiomi di alta qualità tendono a ripetersi dopo il trattamento massimo con la chirurgia e radiazioni. Gli agenti chemioterapici, tra cui idrossiurea, sono stati utilizzati per recidiva di malattia con efficacia marginale. Poiché la patogenesi molecolare dei meningiomi è chiarito, terapie farmacologiche mirate può rivelarsi utile. Inibitori dell'angiogenesi, farmaci che agiscono sul cellula fondamentale vie di segnalazione, analoghi della somatostatina, e una varietà di altri trattamenti molecolari sembrano promettenti.

409: Chen JS, Liang QM, Li HS, Yang J, Wang S, Long JW.

**Octreotide inhibits growth of colonic cancer SW480 cells by modulating the Wnt/P-catenin pathway.**

Pharmazie. 2009 Feb;64(2):126-31. PubMed PMID: 19320286.

Somatostatin can suppress the growth of various tumor cells including colonic cancer. Activated Wnt/ beta-catenin signaling pathway plays a critical role in tumorigenesis and development of colorectal cancer. However, the effect of somatostatin on Wnt/beta-catenin signaling pathway remains unknown. Thus, we investigated the effect of octreotide on Wnt/beta-catenin signaling pathway in human colonic cancer cell SW480. The results of 3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) and flow cytometric assays showed that octreotide inhibited growth, induced apoptosis and arrested the G1 cell cycle of SW480 cells in a dose-dependent manner. We demonstrated that octreotide significantly up-regulated and down-regulated 13 genes and 17 genes in Wnt/beta-catenin signaling using microarray, respectively. Furthermore, as evidenced by western blot, beta-catenin protein level decreased, whereas phosphorylated beta-catenin protein level increased under octreotide. The present study reveals that octreotide can inhibit human colonic cancer cell growth through inhibition of Wnt/beta-catenin signaling pathway.

**Octreotide inibisce la crescita di cellule tumorali SW480 modulando la via di segnale Wnt/P-catenina**

La somatostatina può sopprimere la crescita di cellule tumorali tra cui il cancro del colon. Attivato Wnt / beta-catenina via di segnalazione gioca un ruolo critico nel tumorigenesis e lo sviluppo del cancro coloretale. Tuttavia, l'effetto della somatostatina sulla Wnt / beta-catenina pathway di segnalazione rimane sconosciuto. Quindi, abbiamo studiato l'effetto di octreotide sui Wnt / beta-catenina percorso di segnalazione in colon umano SW480 cellula tumorale. I risultati di 3 - (4,5-dimethyl thiazol-2-ile) -2, il bromuro di 5-difenil tetrazolio (MTT) e il flusso di saggi cytometric ha dimostrato che l'octreotide ha inibito la crescita, ha indotto apoptosi e arrestato il ciclo cellulare G1 delle cellule SW480 in modo dose-dipendente. Abbiamo dimostrato che l'octreotide significantly up-regolati e down-regolato 13 geni e 17 geni Wnt / beta-catenina segnalazione utilizzando microarray, rispettivamente. Inoltre, come evidenziato dal Western Blot, proteina beta-catenina livello diminuiti, mentre fosforilata della proteina beta-catenina livello aumentati con octreotide. Il presente studio rivela che l'octreotide può inibire la crescita delle cellule umane tumorali del colon tramite l'inibizione del Wnt / beta-catenina pathway di segnalazione.

411: Tateno T, Kato M, Tani Y, Oyama K, Yamada S, Hirata Y.

**Differential expression of somatostatin and dopamine receptor subtype genes in adrenocorticotropin (ACTH)-secreting pituitary tumors and silent corticotroph adenomas.**

Endocr J. 2009 Aug;56(4):579-84. Epub 2009 Mar 24. PubMed PMID:19318729.

Somatostatin analogs and dopamine agonists are clinically used for medical therapy of functioning pituitary tumors, such as growth hormone- and prolactin-secreting tumors, however, their effects on ACTH-secreting tumors are controversial. This study was aimed to determine whether somatostatin receptor (SSTR) subtype (1-5) and dopamine receptor type 2 (D2R) are differentially expressed in pituitary tumors causing Cushing's disease (CD), silent corticotroph adenoma (SCA), and non-functioning pituitary tumor (NFT). Tissue specimens were obtained from 35 pituitary tumors during transsphenoidal surgery. The steady-state mRNA levels of SSTR1-5 and D2R genes were determined by real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. Both SSTR1 and 2 mRNA levels in SCA were greater than CD, while SSTR1 mRNA levels, but not SSTR2, in SCA were also greater than NFT. SSTR5 mRNA levels in CD were greater than SCA, but did not differ between NFT and SCA. SSTR4 mRNA expression was undetectable. D2R mRNA levels were markedly lower in CD and SCA than in NFT. The present study suggests that somatostatin analogs more selective for SSTR5 and for SSTR1 and/or 2 may have the therapeutic potential for medical treatment of CD and SCA, respectively, whereas clinical application of dopamine agonists selective for D2R is very limited in either CD or SCA.

**Espressione differenziale di somatostatina e dei geni del sottotipo della dopamina nei tumori pituitari secernenti l'adrenocorticotropina (ACTH) e negli adenomi corticotropi silenti**

Analoghi della somatostatina e dopamino-agonisti sono clinicamente usati per la terapia medica dei tumori ipofisari funzionanti, come l'ormone della crescita e tumori prolattina-secernenti, tuttavia, i loro effetti sui tumori ACTH-secernenti sono controverse. Questo studio è stato finalizzato a determinare se recettori per la somatostatina (SSTR) sottotipo (1-5) e del recettore della dopamina di tipo 2 (D2R) sono differenzialmente espressi nei tumori ipofisari che causano la malattia di Cushing (CD), adenoma corticotroph silenzioso (SCA), e non funzionanti tumore ipofisario (NFT). Campioni di tessuto sono stati ottenuti da 35 tumori ipofisari durante l'intervento transfenoidale. I livelli di mRNA di steady-state dei geni SSTR1-5 e D2R sono stati determinati in tempo reale reazione a catena della polimerasi d'inversione-trascrizione. Entrambi i livelli SSTR1 e 2 mRNA in SCA sono stati maggiori di CD, mentre SSTR1 livelli di mRNA, ma non SSTR2, in SCA sono stati anche maggiori di NFT. SSTR5 livelli di mRNA nel CD sono stati maggiori di SCA, ma non differiva tra i NFT e SCA. SSTR4 espressione di mRNA non era rilevabile. D2R livelli di mRNA

sono stati nettamente inferiori in CD e SCA che in NFT. Il presente studio suggerisce che gli analoghi della somatostatina più selettivo per SSTR5 e per SSTR1 e / o 2may hanno il potenziale terapeutico per il trattamento medico di CD e SCA, rispettivamente, mentre l'applicazione clinica dei dopamino agonisti selettivi per D2R è molto limitato sia in CD o SCA.

414: Srirajaskanthan R, Watkins J, Marelli L, Khan K, Caplin ME.

**Expression of somatostatin and dopamine 2 receptors in neuroendocrine tumours and the potential role for new biotherapies.**

Neuroendocrinology. 2009;89(3):308-14. Epub 2009 Mar23. PubMed PMID: 19307732.

**INTRODUCTION:** Somatostatin and dopamine receptors are both G-protein-coupled receptors. Somatostatin receptor (SSTR) expression in neuroendocrine tumours has been well characterised, and there is evidence of dopamine receptor expression in neuroendocrine tumours. In this study, we examined expression of D2R, SSTR-2 and SSTR-5 using immunohistochemistry in patients with neuroendocrine tumours.

**METHODS:** Consecutive samples of formalin-fixed paraffin-embedded tumour tissue were available from 56 patients with a histologically confirmed diagnosis of neuroendocrine tumour (NET). The study population was divided into low-grade (n = 29), intermediate-grade (n = 18) and high-grade NET (n = 9). Immunohistochemical evaluation was performed for the expression of SSTR-2a, SSTR-5 and D2 receptors (D2R).

**RESULTS:** Both SSTR-2 and SSTR-5 were expressed in 100% of low-grade, 94.4% of intermediate-grade and 66.7% of high-grade NET. D2R was expressed in 93.1% of low-grade, 77.8% of intermediate-grade and 44.4% of high-grade tumours. Co-expression of all 3 receptors was present in 93.1% of low-grade tumours. There was an inverse correlation of SSTR-2 ( $r = -0.380$ ,  $p < 0.005$ ) and SSTR-5 ( $r = -0.472$ ,  $p < 0.0001$ ) with tumour grade. D2R was positively correlated with SSTR-2 ( $r = 0.269$ ,  $p = 0.041$ ) and SSTR-5 ( $r = 0.267$ ,  $p = 0.045$ ). Also, D2R expression was inversely correlated with grade of tumour ( $r = 0.395$ ,  $p = 0.006$ ). Octreoscan correlated with SSTR-2, SSTR-5 and D2R expression.

**CONCLUSION:** D2R is expressed in the majority of low and intermediate grade tumours. It is co-expressed with SSTR-2 and SSTR-5 in the majority of cases. The advent of new chimeric molecules that bind both somatostatin and dopamine receptors may provide a new therapeutic option in the management of neuroendocrine patients.

**Espressione della somatostatina e dei recettori 2 della dopamina nei tumori neuroendocrini e potenziale ruolo di nuove bioterapie**

**INTRODUZIONE:** recettori della somatostatina e dopamina sono entrambi i recettori G-protein-coupled. Recettore della somatostatina (SSTR) espressione nei tumori neuroendocrini è stata ben caratterizzata, e non vi è evidenza di espressione dei recettori della dopamina nei tumori neuroendocrini. In questo studio, abbiamo esaminato l'espressione di D2R, SSTR-2 e SSTR-5 con immunostochimica in pazienti con tumori neuroendocrini. **METODI:** campioni consecutivi di paraffina fissati in formalina-tessuto tumorale embedded erano

disponibili a partire da 56 pazienti con diagnosi istologica di tumore neuroendocrino (NET). La popolazione in studio è stato suddiviso in basso grado (n = 29), intermedio-grado (n = 18) e ad alto grado NET (n = 9). valutazione immunoistochimica è stata effettuata per l'espressione di SSTR-2a, SSTR-5 e recettori D2 (D2R).  
**RISULTATI:** Entrambi SSTR-2 e SSTR-5 sono stati espressi in 100% di basso grado, 94,4% di grado intermedio e 66,7% del patrimonio netto di alta qualità. D2R è stata espressa nel 93,1% di basso grado, il 77,8% di grado intermedio e il 44,4% dei tumori ad alto grado. Co-espressione di tutti e 3 i recettori era presente nel 93,1% dei tumori a basso grado. C'era una correlazione inversa di SSTR-2 ( $r = -0,380$ ,  $p < 0,005$ ) e SSTR-5 ( $r = -0,472$ ,  $p < 0,0001$ ) con il grado del tumore. D2R era correlata positivamente con SSTR-2 ( $r = 0,269$ ,  $p = 0,041$ ) e SSTR-5 ( $r = 0,267$ ,  $p = 0,045$ ). Inoltre, l'espressione D2R era inversamente correlata con il grado del tumore ( $r = 0,395$ ,  $p = 0,006$ ). correlata con SSTR-2 Octreoscan, SSTR-5 e di espressione D2R.  
**CONCLUSIONE:** D2R è espressa nella maggior parte dei tumori di grado basso e intermedio. E 'co-espresso con SSTR-2 e SSTR-5 nella maggior parte dei casi. L'avvento di nuove molecole chimeriche che legano sia somatostatina e dei recettori della dopamina può fornire una nuova opzione terapeutica nel trattamento di pazienti neuroendocrini.

418: Neto LV, Machado Ede O, Luque RM, Taboada GF, Marcondes JB, Chimelli LM, Quintella LP, Niemeyer P Jr, de Carvalho DP, Kineman RD, Gadelha MR.

**Expression analysis of dopamine receptor subtypes in normal human pituitaries, nonfunctioning pituitary adenomas and somatotropinomas, and the association between dopamine and somatostatin receptors with clinical response to octreotide-LAR in acromegaly.** J Clin Endocrinol Metab. 2009 Jun;94(6):1931-7. Epub 2009 Mar 17.

**CONTEXT:** Dopamine receptor (DR) and somatostatin receptor subtype expression in pituitary adenomas may predict the response to postsurgical therapies.

**OBJECTIVES:** Our objectives were to assess and compare the mRNA levels of DR1-5 and somatostatin receptors 1-5 in normal pituitaries (NPs), nonfunctioning pituitary adenomas (NFPAs), and somatotropinomas. In addition, we determined whether the level of DR expression correlates with the in vivo response to octreotide-LAR in acromegalic patients.

**DESIGN AND PATIENTS:** Eight NPs, 30 NFPAs, and 39 somatotropinomas were analyzed for receptor mRNA levels by real-time RT-PCR. The DR2 short variant was estimated as the DR2 long/DR2 total (DR2T). The relationship between DR expression and the postsurgical response to octreotide-LAR was assessed in 19 of the acromegalic patients.

**RESULTS:** DR3 was not detected. The relationship between expression levels of DR subtypes in NPs and somatotropinomas was DR2T>>>DR4>>DR5>DR1, whereas in NFPAs, DR2T>>>DR4>>DR1>DR5. The DR2 short variant was the predominant DR2 variant in the majority of samples. In acromegalics treated with octreotide-LAR, DR1 was negatively correlated with percent GH reduction (3 months:  $r = -0.67$ ,  $P = 0.002$ ; and 6 months:  $r = -0.58$ ,  $P = 0.009$ ), and DR5 was positively correlated with percent IGF-I reduction (3 months:  $r = 0.55$ ,  $P = 0.01$ ; and 6 months:  $r = 0.47$ ,  $P = 0.04$ ).

**CONCLUSIONS:** DR2 is the predominant DR subtype in NPs, NFPAs, and somatotropinomas. The fact that DR1, DR4, and DR5 are also expressed in many adenomas tested suggests that these receptors might also play a role in the therapeutic impact of postsurgical medical therapies in patients with NFPA and acromegaly. This was supported by the finding that the in vivo response to octreotide-LAR was negatively associated with DR1 and positively associated with DR5.

**Analisi dell'espressione dei sottotipi del recettore della dopamina nelle pituitarie umane normali, negli adenoma con la pituitaria non funzionale e nei somatotropinomi, e**

## **l'associazione tra la dopamina e i recettori della somatostatina e la risposta clinica all'octreotide LAR nell'acromegalia**

**CONTESTO:** recettore della dopamina (DR) e l'espressione del recettore della somatostatina sottotipo in adenomi pituitari possono predire la risposta alle terapie post-chirurgica.

**OBIETTIVI:** I nostri obiettivi erano di valutare e confrontare i livelli di mRNA dei recettori DR1-5 e la somatostatina 1-5 in ipofisi normale (NP), adenomi ipofisari non funzionanti (NFPAs), e somatotropinomas. Inoltre, abbiamo determinato se il livello di espressione DR correlato con la risposta in vivo per octreotide-LAR nei pazienti acromegalici.

**DESIGN E PAZIENTI:** Otto NP, 30 NFPAs, e 39 somatotropinomas sono stati analizzati per i livelli di mRNA del recettore di real-time RT-PCR. La variante DR2 corto è stato stimato come il DR2 long/DR2 totale (DR2T). Il rapporto tra l'espressione DR e la risposta post-chirurgica di octreotide-LAR è stata valutata in 19 pazienti acromegalici.

**RISULTATI:** DR3 non è stato rilevato. La relazione tra i livelli di espressione dei sottotipi di DR in NPS e somatotropinomas era DR2T>>>> DR4>> DR5> DR1, mentre in NFPAs, DR2T>>>> DR4>> DR1> DR5. La variante DR2 breve è stata la variante DR2 predominante nella maggior parte dei campioni. In acromegalici trattati con octreotide-LAR, DR1 era negativamente correlata con la riduzione per cento GH (3 mesi:  $r = -0,67$ ,  $P = 0,002$ ; mesi e 6:  $r = -0,58$ ,  $P = 0,009$ ), e DR5 era correlata positivamente con cento Riduzione di IGF-I ( $r = 0,55$ ,  $P = 0,01$ ; mesi e 6: 3 mesi  $r = 0,47$ ,  $P = 0,04$ ).

**CONCLUSIONI:** DR2 è il sottotipo predominante DR in NPS, NFPAs e somatotropinomas. Il fatto che la DR1, DR4, DR5 e sono anche espressi in adenomi molte testate suggerisce che questi recettori potrebbe anche svolgere un ruolo nella impatto terapeutico di terapie mediche post-chirurgica nei pazienti con acromegalia e NFPA. Questo è stato sostenuto dalla constatazione che la risposta in vivo per octreotide-LAR è stata associata negativamente con DR1 e positivamente associati a DR5.

421: Ferone D, Montella L, De Chiara A, Hofland LJ, Lamberts SW, Palmieri G.

### **Somatostatin receptor expression in thymic tumors.**

Front Biosci. 2009 Jan1;14:3304-9. PubMed PMID: 19273275.

Detection of thymic tumors by (111In-DTPA0)octreotide scintigraphy and the antitumor effect exerted by somatostatin (SS) analogs suggest significant expression of SS receptors (SSRs) in these tumors. We measured SSR subtype (sst)2A and sst3 expression by immunohistochemistry (IHC) in 14 thymic tumors previously studied by SSR scintigraphy (SRS). Scintigraphy showed significant (111In-DTPA0)octreotide uptake in 13/14 tumors (tumor-to-background ratios: 1.4- to 6-fold). By IHC, 4 tumors were positive for sst2A and sst3; two for sst2A and five tumors for sst3. Three tumors were completely negative. Overall, 11/14 (approximately 78% of cases) expressed at least one SSR subtype. Staining was highly heterogeneous: sst2A was confined to malignant epithelial cells or within stromal structures, and sst3 was predominantly associated with thymocytes. SRS provides immediate visualization of primary and metastatic lesions, while IHC reveals SSR subtype expression. This joined approach could help to select SS analogs beneficial for therapy.

### **Espressione del recettore della somatostatina nei tumori del timo**

Rilevazione di tumori timici da (111In-DTPA0) scintigrafia con octreotide e l'effetto antitumorale esercitata dalla somatostatina (SS) analoghi suggeriscono significativa espressione di recettori ss (SSR) in questi tumori. Abbiamo misurato SSR sottotipo (SST) 2A e sst3 espressione di immunoistochimica (IHC) in 14 tumori timici precedentemente studiato da scintigrafia SSR (SRS). Scintigrafia ha mostrato significative (111In-DTPA0) captazione octreotide in 13/14 tumori (rapporti tra il tumore-a-sfondo: 1,4 a 6 volte). Da IHC, 4 tumori erano positivi per sst2A e sst3, due per sst2A e cinque i tumori per sst3. Tre tumori sono stati completamente negativi. Nel complesso, 11/14 (circa il 78% dei casi) espresso almeno un sottotipo di SSR. La colorazione è molto eterogeneo: sst2A era limitata a cellule epiteliali maligne o all'interno di strutture stromali, e sst3 era prevalentemente associata a timociti. SRS fornisce una visualizzazione immediata delle lesioni primari e metastatici, mentre IHC rivela espressione sottotipo SSR. Questo approccio si è iscritto potrebbe aiutare a selezionare analoghi della SS benefico per la terapia.

426: Dammers R, Hsu SP, Krisht AF.

**Radioguided improved resection of a cranial base meningioma.**

Neurosurgery. 2009 Mar;64(3 Suppl):84-5; discussion 85. PubMedPMID: 19240580.

**OBJECTIVE:** In meningioma surgery, the completeness of resection is of great importance with regard to prognosis and recurrence. This is more difficult in meningiomas en plaque and cranial base meningiomas, which often involve the bone of the cranial base. We present a case in which radioguided resection of a meningioma using indium-labeled somatostatin receptors enhanced the extent of the resection and describe how this could be of potential use in maximizing resection of meningiomas involving the cranial base region.

**METHODS:** A 45-year-old woman presented with a history of headache and no neurological deficits. Magnetic resonance imaging of the brain revealed a large enhancing extra-axial mass involving the left sphenoid wing region, suggestive of a meningioma. A somatostatin analog scintigram using In-labeled pentetate was obtained 24 hours preoperatively. This showed abnormal uptake in the left frontal region, consistent with a meningioma, because of the abundance and high affinity of somatostatin receptors in meningiomas. Intraoperatively, a radiation detection probe guided the resection until no gamma radiation could be discerned.

**RESULTS:** A postoperative magnetic resonance imaging scan and scintigram showed complete resection of the meningioma.

**CONCLUSION:** Radioguided surgery of meningiomas by labeling them with In is an innovative and feasible approach to help guide and maximize meningioma resection, especially those involving the cranial base region. This technique should be used further and studied to achieve better resection of meningiomas in general and of those involving the cranial base in particular.

**La radioguida migliora l'asportazione di un meningioma della base del cranio**

**OBIETTIVO:** In chirurgia meningioma, la completezza della resezione è di grande importanza per quanto riguarda la prognosi e le recidive. Questo è più difficile nei meningiomi en placca e meningioma della base cranica, che spesso coinvolgono l'osso della base cranica. Presentiamo un caso in cui radioguidata resezione di un meningioma con indio-etichettati recettori per la somatostatina migliorato l'estensione della resezione e indicare come ciò possa essere di potenziale impiego per massimizzare la resezione del meningioma che coinvolgono la regione craniale base.

**METODI:** Una donna di 45 anni ha presentato con una storia di mal di testa e senza deficit neurologici. La risonanza magnetica del cervello ha rivelato una grande massa di migliorare extra-assiali che coinvolgono la regione sfenoidale dell'ala sinistra, indicativo di un meningioma. Una scintigrafia analogo della somatostatina utilizzando In-pentetate marcato è stato ottenuto 24 ore

prima dell'intervento. Questo ha dimostrato l'assorbimento anormale nella regione frontale sinistra, coerente con un meningioma, a causa della abbondanza e di alta affinità dei recettori della somatostatina nei meningiomi. Intraoperativamente, una sonda di rilevazione delle radiazioni guidò la resezione fino a quando non la radiazione gamma potesse scorgere. **RISULTATI:** La formazione dell'immagine postoperatoria a risonanza magnetica e la scintigrafia ha mostrato la resezione completa del meningioma. **CONCLUSIONE:** la chirurgia radioguidata dei meningiomi identificandoli con In è un approccio innovativo e fattibile per aiutare a guidare e ottimizzare la resezione del meningioma, specialmente quelli che coinvolgono la regione cranica base. Questa tecnica deve essere ulteriormente utilizzata e studiata per ottenere una migliore resezione dei meningiomi in generale e di quelli che coinvolgono la base cranica, in particolare.

439: Erten C, Karaca B, Kucukzeybek Y, Gorumlu G, Cengiz E, Gul MK, Atmaca H, Uzunoglu S, Karabulut B, Sanli UA, Uslu R.

#### **Regulation of growth factors in hormone- and drug-resistant prostate cancer cells by synergistic combination of docetaxel and octreotide.**

BJU Int. 2009 Jul;104(1):107-14. Epub 2009 Feb 3. PubMed PMID: 19191785.

**OBJECTIVE** To evaluate the effects of combined treatment with docetaxel and octreotide, a somatostatin analogue, on human hormone- and drug-refractory prostate cancer cell lines, PC-3 and DU-145, and on some growth factors related to tumour growth and angiogenesis in prostate cancer. **MATERIALS AND METHODS** A cell proliferation assay was used to assess the cytotoxicity of the drugs. To verify apoptosis, both DNA fragmentation (by enzyme-linked immunosorbent assay) and caspase 3/7 activity were measured. We also investigated the effect of combined docetaxel and octreotide on growth factors secreted from prostate cancer cells using a human growth factor antibody array. **RESULTS** The combination of docetaxel and octreotide resulted in significant synergistic cytotoxic activity and apoptosis, which was dose- and time-dependent. The combined treatment also resulted in significantly less secretion of stem cell factor and platelet-derived growth factor-AB in PC-3 cells, and transforming growth factor-beta and basic fibroblast growth factor in DU-145 cells, than in untreated controls. **CONCLUSION** Octreotide, a somatostatin analogue, combined with docetaxel might provide a rationale treatment option for hormone-refractory prostate cancer cells, not only by direct inhibition of cell proliferation but also by inhibiting the secretion of growth factors.

#### **Regolazione dei fattori di crescita nelle cellule cancerose prostatiche resistenti ai farmaci e agli ormoni tramite la combinazione sinergica di docetaxelo e octreotide**

Obiettivo di valutare gli effetti del trattamento combinato con docetaxel e octreotide, un analogo della somatostatina, su linee di cancro umano ormono-refrattario e farmaco-cellula della prostata, PC-3 e DU-145, e su alcuni fattori di crescita legati alla crescita tumorale e dell'angiogenesi in cancro alla prostata. **MATERIALI E METODI** Un test di proliferazione cellulare è stato utilizzato per valutare la citotossicità dei farmaci. Per verificare l'apoptosi, sia frammentazione del DNA (da analisi enzimica collegata dell'immunosorbente) e caspasi 3 / 7 attività sono stati misurati. Abbiamo anche studiato l'effetto combinato di docetaxel e octreotide sui fattori di crescita secreti dalle cellule tumorali della prostata usando un fattore umano array di crescita di anticorpi. **RISULTATI** La combinazione di docetaxel e octreotide portò a una significativa attività citotossica sinergica e

apoptosi, che è stata dose-e tempo-dipendente. Il trattamento combinato ha portato anche nella secrezione molto meno del fattore delle cellule staminali e derivato dalle piastrine fattore di crescita-AB in PC-3 celle e fattore di crescita trasformante-beta e di base del fattore di crescita dei fibroblasti in cellule DU-145, rispetto ai controlli non trattati. CONCLUSIONE L'octreotide, un analogo della somatostatina, in combinazione con docetaxel potrebbe offrire una opzione di trattamento razionale per le cellule della prostata ormone-refrattario cancro, non solo attraverso l'inibizione diretta della proliferazione cellulare, ma anche inibendo la secrezione di fattori di crescita.

440: Mitsogiannis IC, Skolarikos A, Deliveliotis C.

**Somatostatin analog lanreotide in the treatment of castration-resistant prostate cancer (CRPC).**

Expert Opin Pharmacother. 2009 Feb;10(3):493-501. Review. PubMed PMID: 19191684.

Prostate cancer is a common disease affecting males. Despite initial sensitivity to hormone treatment, prostate cancer eventually progresses to a castration-resistant stage (CRPC), which carries an ominous prognosis. Lanreotide is a long-acting somatostatin analog with the same properties with the native peptide. It has been shown to be highly efficacious in treating various hypersecretory disorders and tumors. Lanreotide has been administered to patients with CRPC within a novel treatment concept, with the aim of targeting not only cancer cells but also various factors secreted in the tumor cell milieu that confer protection from apoptosis. Within this concept, lanreotide has been administered as part of the "antisurvival factor therapy" in combination with dexamethasone and a gonadotropin releasing hormone (GnRH) analog. It has also been given combined with oestrogens in patients with CRPC. The so far published series have documented a clinical response in many patients treated along with significant improvement in parameters related to quality of life. In view of these promising results, large-scale, randomized, controlled trials are warranted to clearly define the exact role of lanreotide and other somatostatin analogs in the treatment of patients with CRPC.

**Lanreotide, analogo della somatostatina, nel trattamento del tumore alla prostata non operato (CRPC).**

Il cancro della prostata è una patologia comune che colpisce i maschi. Nonostante la sensibilità iniziale di trattamento ormonale, il cancro alla prostata progredisce alla fine di una fase di castrazione-resistente (CRPC), che trasporta una prognosi minacciosa. Lanreotide è un analogo della somatostatina a lunga azione con le stesse proprietà con il peptide nativo. È stato dimostrato essere altamente efficace nel trattamento dei disturbi ipersecretory vari tumori. Lanreotide è stato somministrato a pazienti con CRPC all'interno di un concetto nuovo trattamento, con l'obiettivo di colpire non solo le cellule tumorali, ma anche diversi fattori secreti nell'ambiente delle cellule tumorali che conferiscono protezione da apoptosi. All'interno di questo concetto, lanreotide è stato somministrato come parte della "terapia fattore antisurvival" in combinazione con desametasone e un ormone gonadotropina (GnRH) analogici. Inoltre è stato dato in combinazione con estrogeni in pazienti con CRPC. La serie finora pubblicati hanno documentato una risposta clinica in molti pazienti trattati con miglioramento significativo dei parametri relativi alla qualità della vita. Alla

luce di questi risultati promettenti, su larga scala, randomizzati, controllati sono garantiti per ben definire il ruolo esatto di lanreotide e altri analoghi della somatostatina nel trattamento di pazienti con CRPC.

443: Pucci S, Mazzarelli P, Sesti F, Boothman DA, Spagnoli LG.

**Interleukin-6 affects cell death escaping mechanisms acting on Bax-Ku70-Clusterin interactions in human colon cancer progression.**

Cell Cycle. 2009 Feb 1;8(3):473-81. Epub 2009 Feb 18. Erratum in: Cell Cycle. 2009 Jul 15;8(14):2305. Paola, Mazzarelli[corrected to Mazzarelli, Paola]; Fabiola, Sesti [corrected to Sesti, Fabiola]; David, Boothman A [corrected to Boothman, David A]; Luigi, Spagnoli G [corrected to Spagnoli, Luigi G]. PubMed PMID: 19177010; PubMed Central PMCID: PMC2853871.

Activation of pro-survival pathways and apoptotic cell death escape are considered hallmarks of oncogenic cell transformation. Tissue microenvironment strongly influences tumorigenesis, redirecting some pathways versus a persisting pro-survival state. Here, we report evidence on the role of interleukin 6 (IL-6) in affecting pro-survival pathways in colon cancer progression, modulating the expression and the molecular interactions among the pro-apoptotic factor Bax, the DNA repair proteins Ku70/86 and Clusterin isoforms. In human colorectal carcinomas (n = 50) at different stages of disease, we found an increased IL-6 production, the loss of Ku86 and Clusterin 50-55 kDa pro-apoptotic isoform. Conversely, we observed the overexpression of Bax and the 40 kDa prosurvival sClusterin (sCLU) isoform. Bax co-localized with Ku70 that was found atypically expressed in the cytoplasm of advanced stage colon cancers (Dukes'C-D; n = 22). IL-6 treatment of a colon cancer cell line, Caco-2, modulated the expression of genes involved in tumor invasion and apoptosis, as observed by microarrays. In particular, IL-6 downmodulated Bax expression at mRNA level. Concomitantly, IL-6 exposure influenced Bax also at protein level acting on the Bax-Ku70-sCLU physical interactions in the cytoplasm, by affecting the Ku70 acetylation and phosphorylation state, thus leading to the inhibition of Bax pro-apoptotic activity. In addition, we found that IL-6 treatment induced a significant downregulation of Ku86 and a strong increase of sCLU, confirming tumor biopsies data. In contrast Somatostatin treatment of Caco-2 cells was able to restore apoptosis, demonstrating that Ku70-Bax-CLU interactions could be dynamically modulated. Hence, IL-6 could favor tumor expansion, promoting cell survival and apoptosis escape throughout the different stages of tumor evolution. Uncovering the molecular mechanisms of action of these factors may offer strategies for selectively manipulate the cancer cells sensitivity to therapy.

**L' interleuchina-6 influenza la morte cellulare evitando il meccanismo che agisce sulle interazioni di Bax-Ku70-Clusterin nella progressione del cancro al colon umano**

L'attivazione di pro-sopravvivenza vie di fuga e la morte cellulare apoptotica sono considerati segni distintivi di trasformazione cellulare oncogeni. microambiente tissutale influenza fortemente la tumorigenesi, riorientare alcuni percorsi a fronte di un persistente stato di pro-sopravvivenza. Qui,

segnaliamo le prove sul ruolo di interleuchina 6 (IL-6) che incidono in percorsi di sopravvivenza nella progressione del tumore del colon, modulando l'espressione e le interazioni molecolari tra il fattore pro-apoptotico Bax, la riparazione del DNA e le proteine Ku70/86 clusterina isoforme. Nei carcinomi umani del colon-retto (n = 50) in diverse fasi della malattia, abbiamo riscontrato un aumento della produzione di IL-6, la perdita di Ku86 e clusterina 50-55 kDa isoforma pro-apoptotico. Al contrario, abbiamo osservato la sovraespressione di Bax e l'sClusterin 40 kDa prosurvival (sCLU) isoforma. Bax co-localizzati con Ku70 che è stato trovato atipica espressa nel citoplasma dei tumori del colon stadio avanzato (Dukes'CD; n = 22). IL-6 trattamento di una linea di cellule di cancro del colon, Caco-2, modulata l'espressione di geni coinvolti nella invasione tumorale e apoptosi, come osservato da microarrays. In particolare, IL-6 espressione downmodulated Bax a livello di mRNA. Contemporaneamente, IL-6 esposizione Bax influenzato anche a livello di proteine che agiscono sulle interazioni Bax-Ku70 sCLU-fisico nel citoplasma, incidendo sulle acetilazione Ku70 e stato di fosforilazione, determinando così l'inibizione di Bax attività pro-apoptotico. Inoltre, abbiamo scoperto che IL-6 trattamento ha indotto una sottoregolazione significativa di Ku86 e un forte aumento della sCLU, confermando biopsie di tumori di dati. Nel trattamento di contrasto somatostatina di cellule Caco-2 è stato in grado di ripristinare l'apoptosi, a dimostrazione che le interazioni Ku70-Bax-CLU potrebbe essere modulata in modo dinamico. Quindi, IL-6 potrebbe favorire l'espansione del tumore, promuovendo la sopravvivenza delle cellule e la fuga apoptosi nelle varie fasi di evoluzione del tumore. Scoprire i meccanismi molecolari di azione di questi fattori possono offrire strategie per manipolare selettivamente la sensibilità delle cellule tumorali alla terapia.

447: Zou Y, Xiao X, Li Y, Zhou T.

**Somatostatin analogues inhibit cancer cell proliferation in an SSTR2-dependent manner via both cytostatic and cytotoxic pathways.**

Oncol Rep. 2009 Feb;21(2):379-86. PubMed PMID: 19148511.

Somatostatin receptors (SSTRs) are inhibitory G-protein coupled receptors that are ubiquitously expressed in normal and cancer cells. Somatostatins (SST) are the natural ligands for SSTRs and act as inhibitory regulators of hormone secretion and proliferation. Octreotide and RC-160 (vapeotide) are two well tolerated SSTR2/SSTR5 selective somatostatin analogues (SSA) that have been used in the treatment of cancers with mixed outcomes. Loss-of-expression of SSTR2 in tumor tissues has been suggested to correlate to tumor progressions and to the poor outcomes of somatostatin analogue treatment in certain clinical trials. In this study, exogenous human SSTR2 was overexpressed in two cancer cell lines, capan-2 cells and A549 cells, which had different profiles of endogenous SSTR expression. It was shown that overexpression of SSTR2 dramatically inhibited the proliferation of SSTR2-positive and SSTR2-negative cancer cells. Further growth inhibition of these cancer cells overexpressing SSTR2 was observed by application of octreotide/RC-160 in a dose-dependent fashion. In addition, immunoassay demonstrated that SSA/SSTR2 inhibited proliferation via both cell cycle arresting and promoting apoptosis. The results suggested that SSTR2 could be a promising candidate for gene therapy for SSTR2-positive and SSTR2-negative tumors. The cellular level of SSTR2 might be a critical factor that could affect both tumor progression and the outcomes of somatostatin analogue treatment.

**Analoghi della somatostatina inibiscono la proliferazione cellulare cancerosa tramite vie di seganle citotossiche e citostatiche dipendenti da SSTR2**

Recettori della somatostatina (SSTRs) sono inibitori G accoppiati a proteine recettori che sono ubiquitariamente espressi in cellule normali e tumorali. Somatostatins (SST) sono i ligandi naturali per SSTRs e agiscono come regolatori di inibizione della secrezione dell'ormone e la proliferazione. Octreotide e RC-160 (vapeotide) sono analoghi della somatostatina due SSTR2/SSTR5 ben tollerato selettiva (SSA), che sono stati utilizzati nel trattamento dei tumori con risultati misti. Con perdita di espressione di SSTR2 nei tessuti tumorali è stato suggerito di correlare progressioni di tumore e ai scarsi risultati del trattamento analogo della somatostatina in alcuni studi clinici. In questo studio, esogena SSTR2 umana era sovra-espresso in linee di cancro due cellule, le cellule Capan-2 e cellule A549, che aveva diversi profili di espressione SSTR endogeno. E 'stato

dimostrato che la sovraespressione di SSTR2 drasticamente inibito la proliferazione delle cellule tumorali SSTR2 SSTR2-positivi e negativi. Ulteriori inibizione della crescita di queste cellule tumorali iperespressione SSTR2 è stato osservato mediante l'applicazione di octreotide/RC-160 in modo dose-dipendente. Inoltre, immunodosaggio dimostrato che SSA/SSTR2 inibito la proliferazione sia tramite l'arresto del ciclo cellulare e la promozione di apoptosi. I risultati suggeriscono che SSTR2 potrebbe essere un candidato promettente per la terapia genica per i tumori SSTR2 SSTR2-positivi e negativi. Il livello cellulare di SSTR2 potrebbe essere un fattore critico che potrebbero influenzare sia la progressione del tumore e gli esiti del trattamento della somatostatina analogica.

448: Ferone D, Gatto F, Arvigo M, Resmini E, Boschetti M, Teti C, Esposito D, Minuto F.

**The clinical-molecular interface of somatostatin, dopamine and their receptors in pituitary pathophysiology.**

J Mol Endocrinol. 2009 May;42(5):361-70. Epub 2009 Jan 13. Review. PubMed PMID: 19141603.

The role of somatostatin and dopamine receptors as molecular targets for the treatment of patients with pituitary adenomas is well established. Indeed, dopamine and somatostatin receptor agonists are considered milestones for the medical therapy of these tumours. However, in recent years, the knowledge of the expression of subtypes of somatostatin and dopamine receptors in pituitary adenomas, as well as of the coexpression of both types of receptors in tumour cells, has increased considerably. Moreover, recent insights suggest a functional interface of dopamine and somatostatin receptors, when coexpressed in the same cells. This interaction has been suggested to occur via dimerisation of these G-protein-coupled receptors. In addition, there was renewed interest around the concept of cell specificity in response to ligand-induced receptor activation. New experimental drugs, including novel somatostatin analogues, binding to multiple somatostatin receptor subtypes, as well as hybrid somatostatin-dopamine compounds have been generated, and recently a completely novel class of molecules has been developed. These advances have opened new perspectives for the medical treatment of patients with pituitary tumours poorly responsive to the present clinically available drugs, and perhaps also for the treatment of other categories of neuroendocrine tumours. The aim of the present review is to summarise the novel insights in somatostatin and dopamine receptor pathophysiology, and to bring these new insights into perspective for the future strategies in the medical treatment of patients with pituitary adenomas.

**L'interfaccia clinica – molecolare della somatostatina, della dopamina e dei loro recettori nella patofisiologia pituitaria**

Il ruolo dei recettori per la somatostatina e della dopamina come bersagli molecolari per il trattamento di pazienti con adenomi pituitari è ben stabilita. Infatti, agonisti del recettore della dopamina e la somatostatina sono considerati pietre miliari per la terapia medica di questi tumori. Tuttavia, negli ultimi anni, la conoscenza della espressione dei sottotipi di recettori della somatostatina e dopamina in adenomi ipofisari, così come della coespressione di entrambi i tipi di recettori nelle cellule tumorali, è aumentato considerevolmente. Inoltre, approfondimenti recenti suggeriscono una interfaccia funzionale dei recettori della dopamina e la somatostatina, quando coespressi nelle stesse cellule. Questa interazione è stato suggerito di verificare via dimerizzazione di questi recettori G-protein-coupled. Inoltre, c'è stato un rinnovato interesse intorno al concetto di

specificità delle cellule in risposta al ligando indotta da attivazione del recettore. Nuovi farmaci sperimentali, inclusi gli analoghi della somatostatina romanzo, il legame alle più sottotipi del recettore della somatostatina, così come ibridi composti somatostatina-dopamina sono stati generati, e di recente una classe completamente nuova di molecole è stato sviluppato. Questi progressi hanno aperto nuove prospettive per le cure mediche dei pazienti con tumori ipofisari scarsamente sensibili ai farmaci attualmente disponibili clinicamente, e forse anche per il trattamento di altre categorie di tumori neuroendocrini. Lo scopo del presente riesame è quello di riassumere le intuizioni romanzo in fisiopatologia dei recettori della somatostatina e dopamina, e di portare questi nuovi elementi in prospettiva per le future strategie nel trattamento medico dei pazienti con adenomi pituitari.

449: de Bruin C, Pereira AM, Feelders RA, Romijn JA, Roelfsema F, Sprij-Mooij DM, van Aken MO, van der Lelij AJ, de Herder WW, Lamberts SW, Hofland LJ.

#### **Coexpression of dopamine and somatostatin receptor subtypes in corticotroph adenomas.**

J Clin Endocrinol Metab. 2009 Apr;94(4):1118-24. Epub 2009 Jan 13. PubMed PMID: 19141584.

**CONTEXT:** Previous studies have demonstrated the expression of somatostatin receptor subtypes (mainly sst(5)) and dopamine (DA) receptor subtypes (mainly D(2)) in smaller series of human corticotroph adenomas. In line with these findings, sst(5) and D(2)-targeting agents have already been used clinically in patients with Cushing's disease (CD) and have shown promising results in subsets of patients. To what extent these receptor subtypes are coexpressed within individual adenomas, is not known however.

**OBJECTIVE:** The aim of the study was to investigate the (co-)expression of both sst and DA receptors in a large series of human corticotroph adenomas.

**DESIGN:** We performed in vitro analysis of corticotroph adenoma tissue obtained via transsphenoidal adenomectomy.

**SETTING:** The study was conducted at two university medical centers.

**PATIENTS:** Adenoma tissue from 30 patients with CD was analyzed in this study.

**RESULTS:** Analyzed by quantitative RT-PCR, D(2) and sst(5) were significantly (co-) expressed in the majority (60%) of adenomas, whereas 23% of adenomas only expressed D(2), but not sst(5). The remaining 17% of adenomas did not significantly express either sst(5) or D(2). Overall, expression of sst(1-4) and D(4) was low to nondetectable. Corticotroph adenomas with invasive growth invariably showed loss of sst(5) and D(2) expression. Autoradiography revealed clear D(2) and/or SS-14 binding in a subset of cases, which correlated well with their respective mRNA data.

**CONCLUSIONS:** Sst(5) and especially D(2) are highly expressed in the majority of human corticotroph adenomas, with coexpression of sst(5) and D(2) being a common phenomenon. These findings support the current studies with sst(5) and D(2)-targeting agents in patients with CD and highlight the rationale behind sst(5)-D(2) combination therapy.

#### **Coespressione di dopamina e del sottotipo del recettore della somatostatina negli adenomi corticotropi**

**CONTESTO:** Precedenti studi hanno dimostrato l'espressione dei sottotipi del recettore della somatostatina (soprattutto sst (5)) e la dopamina (DA) sottotipi del recettore (principalmente D (2)) in piccole serie di adenomi corticotroph umana. In linea con questi risultati, sst (5) e D (2)-targeting agenti sono già stati utilizzati in clinica in pazienti con malattia di Cushing (CD) e hanno mostrato

risultati promettenti in sottogruppi di pazienti. In quale misura questi sottotipi di recettori sono coespressi entro adenomi singoli, non è noto però.

**OBIETTIVO:** Lo scopo dello studio era di esaminare il (co) espressione di entrambi i recettori sst e DA in un'ampia serie di adenomi corticotroph umana.

**DESIGN:** Abbiamo effettuato analisi in vitro dei tessuti adenoma corticotroph ottenuta tramite adenomectomia transfenoidale.

**Setting:** Lo studio è stato condotto in due centri universitari medici.

**PAZIENTI:** tessuto Adenoma da 30 pazienti con il CD è stato analizzato in questo studio.

**RISULTATI:** Analizzata da RT-PCR quantitativa, D (2) e SST (5) erano significativamente (co-), espresso in maggioranza (60%) degli adenomi, mentre il 23% degli adenomi solo espresso D (2), ma non sst (5). Il restante 17% degli adenomi non ha espresso in modo significativo sia sst (5) o D (2). Nel complesso, espressione di SST (1-4) e D (4) è stato basso per non rilevabile. adenomi Corticotroph con la crescita invasiva sempre mostrato la perdita di sst (5) e D (2) espressione. Autoradiografia rivela chiara D (2) e / o SS-binding in un sottoinsieme di casi, che una buona correlazione con i loro rispettivi dati mRNA 14.

**CONCLUSIONI:** SST (5) e soprattutto D (2) sono altamente espressi nella maggior parte degli adenomi corticotroph umana, con coespressione di sst (5) e D (2) essendo un fenomeno comune. Questi risultati confermano studi in corso con sst (5) e D (2)-targeting agenti nei pazienti con CD ed evidenziare la logica alla base sst (5)-D (2) terapia di combinazione.

454: Weber C, Zulian GB.

**Malignant irreversible intestinal obstruction: the powerful association of octreotide to corticosteroids, antiemetics, and analgesics.**

Am J Hosp Palliat Care. 2009 Apr-May;26(2):84-8. Epub 2008 Dec 16. PubMed PMID: 19088264.

In the case of malignant intestinal obstruction, surgery often carries important mortality and morbidity risks, and feasibility is neither realistic nor reasonable. A total of 4 clinical cases of intestinal obstruction caused by advanced gastrointestinal cancers in their terminal phase are described. The association of analgesics, corticosteroids, antiemetics, and octreotide was effective to relieve symptoms of intestinal obstruction for the remaining lifetime. The insertion of a nasogastric tube was avoided in 3 of 4 cases. Death occurred 51, 56, and 64 days after clinical and radiological diagnosis of irreversible intestinal obstruction. This combination of drugs appears very powerful and well tolerated. The relatively long survival that was observed should encourage future studies of longer half-life somatostatin analogues with no need of continuous infusion or multiple daily injections.

**Ostruzione intestinale maligna irreversibile: l'associazione potente di octreotide corticosteroidi, antiemetici, e analgesici**

Nel caso di ostruzione intestinale maligna, l'intervento chirurgico comporta spesso dei rischi di mortalità e morbilità importante, e la fattibilità non è né realistico né ragionevole. Un totale di 4 casi clinici di ostruzione intestinale causata da tumori gastrointestinali avanzati nella loro fase terminale sono descritti. L'associazione di analgesici, corticosteroidi, antiemetici, e octreotide era efficace per alleviare i sintomi di ostruzione intestinale per la durata residua. L'inserimento di un sondino nasogastrico è stato evitato in 3 dei 4 casi. Morte è avvenuta 51, 56, e 64 giorni dopo la diagnosi clinica e radiologica di ostruzione intestinale irreversibile. Questa combinazione di farmaci sembra molto potente e ben tollerato. La sopravvivenza relativamente lunga, che è stata osservata dovrebbe incoraggiare gli studi futuri di più analoghi della somatostatina emivita senza necessità di infusione continua o più iniezioni giornaliere.

458: Watt HL, Kharmate GD, Kumar U.

**Somatostatin receptors 1 and 5 heterodimerize with epidermal growth factor receptor: agonist-dependent modulation of the downstream MAPK signalling pathway in breast cancer cells.**

Cell Signal. 2009Mar;21(3):428-39. Epub 2008 Dec 3. PubMed PMID: 19070659.

The role of somatostatin (SST) and epidermal growth factor (EGF) in breast cancer is undisputed; however, the molecular mechanisms underlying their antiproliferative or proliferative effects are not well understood. We initially confirmed that breast tumour tissues express all five somatostatin receptors (SSTR1-5) and four epidermal growth factor receptors (ErbB1-4). Subsequently, to gain insight into the function of SSTRs and ErbBs in oestrogen receptor (ER)-positive (MCF-7) or ERalpha-negative (MDA-MB-231) breast cancer cells, we defined SSTR1, SSTR5 and ErbB1 mRNA and protein expression in these two tumour cell lines. Consistent with previous studies showing SSTR1/SSTR5 heterodimerization and having seen cell-specific and ligand-selective alterations in receptor expression, we next elucidated whether SSTR1 and SSTR5 functionally interact with ErbB1 using pbFRET analysis. We subsequently determined the effects of SST and EGF either alone, or in combination, on selected downstream signalling molecules such as erk1/2, p38 and JNK. Here, we showed that both SST and EGF influenced erk1/2 phosphorylation and that SST modulated the effects of EGF in a cell-specific manner. We also demonstrated agonist-, time and cell-dependent regulation of p38 phosphorylation. We further investigated modulation of Grb2, SOS, Shc, SH-PTP1 and SH-PTP2. ErbB1 adaptor proteins known to play a role in MAPK activation, Shc, Grb2 and SOS, changed in an agonist- and cell-specific manner whereas, SH-PTP1 and SH-PTP2, adaptor proteins reported to interact with SSTRs, translocated from the cytosol to membrane in a cell-specific manner following SST and/or EGF treatment. Although several previous studies have shown crosstalk between RTKs and GPCRs, there are no reports describing SSTR (GPCR) modulation of ErbBs (RTK) in breast cancer. To the best of our knowledge, this is the first report describing crosstalk/interactions between SSTRs and ErbBs.

**I recettori della somatostatina 1 e 5 eterodimerizzano con il recettore di crescita epidermico: modulazione della via di segnale MAPK dipendente dall'agonista nelle cellule mammarie cancerose**

Il ruolo della somatostatina (SST) e del fattore di crescita epidermico (EGF) nel carcinoma della mammella è indiscussa, tuttavia, i meccanismi molecolari alla base dei loro effetti antiproliferativi o proliferativi non sono ben compresi. Inizialmente abbiamo confermato che i tessuti del tumore al seno esprimono tutti e cinque i recettori della somatostatina (SSTR1-5) e di quattro recettori del fattore di crescita epidermico (ErbB1-4). Successivamente, al fine di conoscere la funzione di SSTRs e ErbBs nel recettore per gli estrogeni (ER)-positive (MCF-7) o ERalfa-negative (MDA-MB

-231) le cellule di cancro al seno, abbiamo definito SSTR1, SSTR5 e ErbB1 mRNA e la proteina espressione in queste linee cellulari tumorali due. Coerentemente con gli studi precedenti che mostrano eterodimerizzazione SSTR1/SSTR5 e avendo visto le alterazioni delle cellule-specifici e ligando selettivo dell'espressione del recettore, abbiamo chiarito se la prossima SSTR1 e SSTR5 funzionalmente interagire con ErbB1 utilizzando pbFRET analisi. Abbiamo successivamente determinato gli effetti della SST e EGF da solo o in combinazione, a valle su una selezione di molecole di segnalazione quali ERK1 / 2, p38 e JNK. Qui, abbiamo dimostrato che entrambe le SST e FEG influenzato ERK1 / 2 e la fosforilazione che SST modulati gli effetti di EGF in un modo cellula-specific. Abbiamo anche dimostrato-agonista, ora e regolazione cellulare-dipendente di p38 fosforilazione. Abbiamo inoltre studiato la modulazione di Grb2, SOS, Shc, SH-PTP1 e SH-PTP2. Proteine adattatrici ErbB1 conosciuto per giocare un ruolo nella attivazione di MAPK, Shc, Grb2 e SOS, ha cambiato in maniera agonista e cellule specifiche che, SH-PTP1 e SH-PTP2, proteine adattatore riferito di interagire con SSTRs, traslocata dal citosol alla membrana cellulare in modo specifico i seguenti SST e / o trattamento FEG. Anche se alcuni studi precedenti hanno dimostrato crosstalk tra RTK e GPCR, non ci sono rapporti che descrivono SSTR (GPCR) modulazione di ErbBs (RTK) nel cancro della mammella. Al meglio della nostra conoscenza, questo è il primo rapporto che descrive crosstalk / interazioni tra SSTRs e ErbBs.

467: Faggiano A, Grimaldi F, Pezzullo L, Chiofalo MG, Caracò C, Mozzillo N, Angeletti G, Santeusano F, Lombardi G, Colao A, Avenia N, Ferolla P.

**Secretive and proliferative tumor profile helps to select the best imaging technique to identify postoperative persistent or relapsing medullary thyroid cancer.**

EndocrRelat Cancer. 2009 Mar;16(1):225-31. Epub 2008 Nov 12. PubMed PMID: 19004986.

In patients with postoperative persistent medullary thyroid cancer (MTC), the tumor detection rate is generally low for most of the imaging techniques now available. The aim of this study was to investigate if the clinico-biological profile of the tumor may indicate which imaging technique to perform in order to identify postoperative persistent or relapsing MTC foci. Thirty-five consecutive MTC patients with detectable and progressively increasing postoperative serum concentrations of calcitonin were enrolled in the study. The detection rates of 18F-deoxy-d-glucose (FDG)-positron emission tomography (PET), somatostatin receptor scintigraphy (SRS), and 131I-metaiodobenzylguanidine scintigraphy (MIBG) were compared in relation with calcitonin and carcinoembryonic antigen serum concentrations, Ki-67 score and results of conventional imaging techniques (CIT). FDG-PET positivity was significantly associated with calcitonin serum concentrations >400 pg/ml and Ki-67 score >2.0% (P<0.05), while SRS positivity was associated with calcitonin serum concentrations >800 pg/ml (P<0.05). SRS positivity significantly correlated with tumor appearance at CIT (P<0.01), while FDG-PET was positive in nine CIT-negative patients. The secretive and proliferative tumor profile may guide the choice of the imaging technique to use in the follow-up of patients with MTC. A Ki-67 score >2.0% suggests to perform a FDG-PET in addition to conventional imaging. Calcitonin secretion predicts both FDG-PET and SRS uptake but SRS positivity is generally found only in patients with well defined MTC lesions that are also detectable at the conventional imaging examination. MIBG outcome is not predicted by any clinico-biological factors here investigated.

**Il profilo di tumori secretivi e proliferativi aiuta a selezionare la migliore tecnica di imaging per identificare la persistenza postoperatoria o ricadute nel cancro midollare alla tiroide**

Nei pazienti con persistente post-operatorio del cancro midollare della tiroide (MTC), il tasso di rilevamento di tumore è generalmente bassa per la maggior parte delle tecniche di imaging attualmente disponibili. Lo scopo di questo studio era di studiare se il profilo clinico-biologica del tumore può indicare che la tecnica di imaging a svolgere al fine di individuare focolai postoperatorio persistente o recidivante MTC. Trentacinque pazienti consecutivi con presenza di MTC e in progressivo aumento delle concentrazioni sieriche di calcitonina postoperatorio sono stati arruolati nello studio. Il tasso di rilevamento di 18F-desossi-D-glucosio (FDG) emissione-positrone positroni (PET), scintigrafia del recettore della somatostatina (SRS), e la scintigrafia con 131I-

metaiodobenzilguanidina (MIBG) sono stati confrontati in relazione con le concentrazioni dell'antigene calcitonina e carcinoembryonic siero, Ki-67 punteggio e dei risultati delle tecniche di imaging convenzionali (CIT). positività FDG-PET è risultato significativamente associato con le concentrazioni sieriche di calcitonina > 400 pg / ml e Ki-67 score > 2,0% (P <0,05), mentre la positività SRS è stata associata con le concentrazioni sieriche di calcitonina > 800 pg / ml (P <0,05). positività SRS significativamente correlati con l'apparenza del tumore al CIT (P <0,01), mentre la FDG-PET è stata positiva in nove pazienti CIT-negativi. Il profilo di tumore secreto e proliferativo possono guidare la scelta della tecnica di imaging da utilizzare nel follow-up dei pazienti con MTC. A-67 Ki punteggio > 2,0% suggerisce di eseguire un FDG-PET in aggiunta alle immagini convenzionali. secrezione di calcitonina prevede sia FDG-PET e SRS, ma la positività SRS si trova di solito solo in pazienti con lesioni ben definite MTC che sono rilevabili anche all'esame di imaging convenzionali. MIBG risultato non è previsto da alcuna fattori clinico-biologici qui indagato.

474: Marepaily R, Micheals D, Sloan A, Hatfield J, Adsay V, Joyrich R, Ullah N, Tobi M.

**Octreotide uptake in intracranial metastasis of pancreatic ductal adenocarcinoma origin in a patient with a prolonged clinical course.**

Dig Dis Sci.2009 Jan;54(1):188-90. Epub 2008 Nov 5. PubMed PMID: 18985450.

We describe a case with prolonged survival of 2 years in a female patient with pancreatic ductal adenocarcinoma who, at diagnosis, already had liver spread and eventually succumbed to brain metastases which scanned positive with [(111)In-DTPA] octreotide scintiscan (OctreoScan). Subsequently, the patient underwent a craniotomy for resection of the metastases, but her condition deteriorated. A chromogranin A stain was negative, showing that there was no neuroendocrinal component to the cerebral secondaries. In contrast, tumor labeling with a monoclonal antibody associated with a favorable prognosis in pancreatic neoplasms was positive. There is mounting evidence that somatostatin receptor status confers a relatively favorable prognosis in pancreatic adenocarcinoma, although OctreoScan-positive brain metastases have not been previously reported.

**Assunzione di octreotide nelle metastasi intracraniche di origine da adenocarcinoma pancreatico duttale in un paziente con un decorso clinico prolungato.**

Descriviamo un caso con una sopravvivenza prolungata di 2 anni in una paziente con adenocarcinoma pancreatico duttale che, al momento della diagnosi, già si era diffuso al fegato e alla fine ceduto alle metastasi cerebrali scansionate che positivo con [(111) In-DTPA] scintigrafia octreotide (OctreoScan). Successivamente, il paziente ha subito una craniotomia per la resezione delle metastasi, ma le sue condizioni sono peggiorate. Un cromogranina Una macchia è stato negativo, dimostrando che non vi era alcuna componente neuroendocrina per i secondari cerebrale. Al contrario, il tumore di etichettatura con un anticorpo monoclonale associata ad una prognosi favorevole in neoplasie del pancreas è stata positiva. Ci sono prove di montaggio che stato dei recettori della somatostatina conferisce una prognosi relativamente favorevole in adenocarcinoma del pancreas, anche se le metastasi cerebrali OctreoScan-positivi non sono stati riportati in precedenza.

478: de Bruin C, Feelders RA, Waaijers AM, van Koetsveld PM, Sprij-Mooij DM, Lamberts SW, Hofland LJ.

**Differential regulation of human dopamine D2 and somatostatin receptor subtype expression by glucocorticoids in vitro.**

J MolEndocrinol. 2009 Jan;42(1):47-56. Epub 2008 Oct 13. PubMed PMID: 18852217.

Dopamine agonists (DA) and somatostatin (SS) analogues have been proposed in the treatment of ACTH-producing neuro-endocrine tumours that cause Cushing's syndrome. Inversely, glucocorticoids (GCs) can differentially influence DA receptor D(2) or SS receptor subtype (sst) expression in rodent models. If this also occurs in human neuro-endocrine cells, then cortisol-lowering therapy could directly affect the expression of these target receptors. In this study, we investigated the effects of the GC dexamethasone (DEX) on D(2) and sst expression in three human neuro-endocrine cell lines: BON (carcinoid) and TT (medullary thyroid carcinoma) versus DMS (small cell lung cancer), which is severely GC resistant. In BON and TT, sst(2) mRNA was strongly down-regulated in a dose-dependent manner (IC<sub>50</sub> 0.84 nM and 0.16 nM), whereas sst(5) and especially D(2) were much more resistant to DEX treatment. Sst(2) down-regulation was abrogated by a GC receptor antagonist and reversible in time upon GC withdrawal. At the protein level, DEX also induced a decrease in the total number of SS (-52%) and sst(2)-specific (-42%) binding sites. Pretreatment with DEX abrogated calcitonin inhibition by sst(2)-preferring analogue octreotide in TT. In DMS, DEX did not cause significant changes in the expression of these receptor subtypes. In conclusion, we show that GCs selectively down-regulate sst(2), but not D(2) and only to a minor degree sst(5) in human neuro-endocrine BON and TT cells. This mechanism may also be responsible for the low expression of sst(2) in corticotroph adenomas and underwrite the current interest in sst(5) and D(2) as possible therapeutic targets for a medical treatment of Cushing's disease.

**Regolazione differenziale in vitro dell'espressione del sottotipo del recettore umano della dopamina D2 e della somatostatina tramite i glucocorticoidi**

Gli agonisti della dopamina (DA) e la somatostatina (SS) analoghi sono stati proposti per il trattamento dei tumori neuro-endocrino-produzione di ACTH che causano la sindrome di Cushing. Al contrario, i glucocorticoidi (GC) può influenzare differenzialmente DA recettore D (2) o sottotipo di recettore SS (SST) espressione in modelli di roditori. Se questo si verifica anche in cellule umane di neuro-endocrino, la terapia per abbassare il cortisolo quindi potrebbe influenzare direttamente l'espressione di questi recettori target. In questo studio, abbiamo studiato gli effetti del desametasone GC (DEX) su D (2) e di espressione sst in tre linee di cellule umane di neuro-

endocrino: BON (carcinoide) e TT (carcinoma midollare della tiroide) rispetto DMS (carcinoma polmonare a piccole cellule), che è fortemente resistente GC. In BON e TT, sst (2) mRNA era fortemente down-regolato in modo dose-dipendente (IC (50) nM 0,84 e 0,16 nM), mentre sst (5) e soprattutto D (2) erano molto più resistenti alla DEX trattamento. Sst (2) down-regulation è stata abrogata da un antagonista del recettore GC e reversibili nel tempo al momento della revoca GC. A livello di proteine, DEX anche indotto una diminuzione del numero totale delle SS (-52%) e SST (2)-specifico (-42%), siti di legame. Il pretrattamento con DEX abrogata inibizione calcitonina da SST (2)-preferendo octreotide, analogo a TT. In DMS, DEX non ha causato variazioni significative nell'espressione di questi sottotipi di recettori. In conclusione, indichiamo che GC selettivamente down-regolare sst (2), ma non D (2) e solo in misura minore sst (5) nel umana BON neuro-endocrine e cellule TT. Questo meccanismo può essere responsabile anche per la bassa espressione di sst (2) negli adenomi corticotroph e sottoscrivere l'interesse attuale per sst (5) e D (2) come possibili bersagli terapeutici per un trattamento medico di malattia di Cushing.

480: Miederer M, Seidl S, Buck A, Scheidhauer K, Wester HJ, Schwaiger M, PerrenA.

### **Correlation of immunohistopathological expression of somatostatin receptor 2 with standardised uptake values in 68Ga-DOTATOC PET/CT.**

Eur J Nucl Med Moll Imaging. 2009 Jan;36(1):48-52. Epub 2008 Sep 20. PubMed PMID: 18807033.

**PURPOSE:** In clinical routine somatostatin analogue positron emission tomography/computed tomography (PET/CT) such as (68)Ga-DOTA-Tyr-octreotide (DOTATOC)-PET/CT could substitute conventional (111)In-Octreotide scintigraphy. Immunohistochemistry (IHC) for somatostatin receptor 2 (SSTR2) might be a tool to predict positivity of (68)Ga-DOTATOC in patients where initial staging was not performed, e.g., in incidental findings. We therefore compared a score of SSTR2-IHC with the in vivo standard uptake value (SUV) of preoperative or prebiopsy (68)Ga-DOTATOC PET/CT.

**MATERIALS AND METHODS:** In 18 patients, (68)Ga-DOTATOC PET/CT scans were quantified with SUV calculations and correlated to a cell membrane-based SSTR2-IHC score (ranging from 0 to 3).

**RESULTS:** Negative IHC scores were consistent with SUV values below 10. Furthermore, all score 2 and 3 specimens corresponded with high SUV values (above 15).

**CONCLUSION:** SSTR2-IHC scores correlated well with SUV values and we propose to use SSTR2 immunohistochemistry in patients missing a preoperative PET scan to indicate (68)Ga-DOTATOC-PET/CT as method for restaging and follow-up in individual patients.

### **Correlazione dell'espressione immunopatologica del recettore 2 della somatostatina con valori di assunzione standardizzati in 68Ga-DOTATOC PET/CT**

**SCOPO:** Negli studi clinici di routine tomografia a emissione di analogo della somatostatina positroni / tomografia computerizzata (PET / CT), come (68) Ga-DOTA-Tyr-octreotide (DOTATOC) -PET/CT potrebbe sostituire il convenzionale (111) scintigrafia con In-octreotide. Immunoistochimica (IHC) per il recettore della somatostatina 2 (SSTR2) potrebbe essere uno strumento per predire la positività di (68) Ga-DOTATOC in pazienti in cui stadiazione iniziale non è stata eseguita, ad esempio, in reperti incidentali. Abbiamo quindi confrontato il punteggio di SSTR2-IHC in vivo con il valore di assorbimento standard (SUV) di preoperatoria o prebiopsy (68) Ga-DOTATOC PET / CT.

**MATERIALI E METODI:** In 18 pazienti (68), Ga-DOTATOC PET / TC sono stati quantificati con calcoli SUV e correlato ad un punteggio di celle a membrana a base di SSTR2-IHC (da 0 a 3). Risultati: negativo IHC punteggi erano coerenti con i valori di SUV di sotto dei 10. Inoltre, tutti i 2

e 3 esemplari punteggio corrispondente ad alti valori di SUV (sopra 15).  
CONCLUSIONE: i punteggi SSTR2-IHC una buona correlazione con i valori di SUV e noi proponiamo di utilizzare immunistochemica SSTR2 in pazienti manca una scansione PET preoperatoria per indicare (68) Ga-DOTATOC-PET/CT come metodo per la ristadiatione e follow-up nei singoli pazienti.

483: Zhou T, Xiao X, Xu B, Li H, Zou Y.

**Overexpression of SSTR2 inhibited the growth of SSTR2-positive tumors via multiple signaling pathways.**

Acta Oncol.2009;48(3):401-10. PubMed PMID: 18759148.

**BACKGROUND:** Somatostatin receptors (SSTR1-5) are inhibitory G-protein coupled receptors that are ubiquitously expressed in both normal and cancer cells. Activation of SSTRs results in inhibition of hormone secretion and cell proliferation. Loss-of-expression of SSTR2 in tumor tissues has been suggested to correlate with tumor progression and to the relatively poorer outcomes of somatostatin analog treatment in some clinical trials. Therefore, gene transfer of SSTR2 has been studied extensively in those SSTR2-negative tumors.

**MATERIAL AND METHODS:** In this research, the anti-proliferation effects of overexpressed SSTR2 were studied in our experimental cancer xenografts with different profiles of endogenous SSTRs expression. An adenoviral vector was used to express full length human SSTR2 in capan-2 and A549 xenografts. The potential pathways involved in SSTR2 signaling were then studied using immunoassays.

**RESULTS:** Our results showed that overexpression of SSTR2 inhibited the growth of both SSTR2-positive and SSTR2-negative cancer xenografts. The SSTR2-mediated anti-proliferation involved both cytostatic (growth arrest) and cytotoxic (apoptotic) actions by affecting the cellular levels of signaling molecules in apoptotic pathway, MAPK pathway and angiogenesis.

**CONCLUSION:** SSTR2 inhibits cancer growth via multiple pathways and is a potential candidate for gene therapy for both SSTR2-positive and SSTR2-negative tumors.

**Sovraespressione di SSTR2 inibisce la crescita dei tumori positivi a SSTR2 tramite le vie di segnale multiple**

**BACKGROUND:** i recettori della somatostatina (SSTR1-5) sono inibitori G accoppiati a proteine recettori che sono ubiquitariamente espresso sia in cellule normali e tumorali. Attivazione di SSTRs risultati in inibizione della secrezione dell'ormone e la proliferazione cellulare. Con perdita di espressione di SSTR2 nei tessuti tumorali è stato suggerito di correlare con la progressione del tumore e per i risultati relativamente povere di un trattamento analogo della somatostatina in alcuni studi clinici. Pertanto, il trasferimento genico di SSTR2 è stata ampiamente studiata in quei tumori SSTR2-negativi.

**MATERIALI E METODI:** In questa ricerca, gli effetti anti-proliferazione delle SSTR2 overexpressed sono stati studiati nel nostro xenotrapianti tumorali sperimentali con diversi profili di espressione endogena SSTRs. Un vettore adenovirale è stato utilizzato per esprimere SSTR2 lunghezza totale dell'uomo in Capan-2 xenotrapianti e A549. Le possibili vie di segnalazione

coinvolte nella SSTR2 sono poi stati studiati utilizzando i dosaggi. **RISULTATI:** I nostri risultati hanno mostrato che la sovraespressione di SSTR2 inibito la crescita di xenotrapianti tumorali sia SSTR2-positivi e SSTR2-negativi. Il SSTR2-mediata anti-proliferazione coinvolto sia citostatici (arresto della crescita) e citotossici (apoptosi) le azioni che alterano i livelli cellulari di molecole di segnalazione in via apoptotica, MAPK e l'angiogenesi. **CONCLUSIONE:** SSTR2 inibisce la crescita del tumore attraverso diverse vie ed è un potenziale candidato per la terapia genica per i tumori, sia SSTR2-positivi e SSTR2-negativi.

487: Saveanu A, Jaquet P.

### **Somatostatin-dopamine ligands in the treatment of pituitary adenomas.**

Rev Endocr Metab Disord. 2009 Jun;10(2):83-90. Epub 2008 Jul 24. Review. PubMed PMID: 18651224.

Somatostatin receptors (sst1-5) and dopamine receptor 2 (D2DR) are well expressed and co-localized in several human pituitary adenomas, suggesting possible functional interactions in the control of hormonal hypersecretion and tumor cell growth. The present review describes the expression and functionality of these receptors in the different classes of human pituitary adenomas. The sst2 agonists, octreotide and lanreotide, control GH hypersecretion and tumor growth in about 65% of somatotropinomas. The D2DR agonists, bromocriptine and cabergoline, control about 90% of prolactinomas. Such drugs are much less effective in the control of the others pituitary adenomas also expressing ssts and D2DR receptors. The second part summarizes the current knowledge on new chimeric compounds with sst2, sst5, and D2DR affinity. Such ligands bearing distinct ssts and DRD2 pharmacophores may synergistically produce an increased control of secretion and/or of proliferation in the different types of pituitary adenomas. The mechanisms of action of such chimeric molecules through increased binding affinities, prolonged bioavailability, ligand-induced modulation of receptors heterodimerization, are discussed.

### **Ligandi dopamine-somatostatina nel trattamento degli adenoma pituitari**

Recettori della somatostatina (sst1-5) e del recettore della dopamina 2 (D2DR) sono ben espressi e co-localizzati in diversi adenomi ipofisari umani, suggerendo possibili interazioni funzionali nel controllo di ipersecrezione ormonale e la crescita delle cellule tumorali. La revisione attuale descrive l'espressione e la funzionalità di questi recettori in diverse classi di umano adenomi pituitari. Il sst2 agonisti, octreotide e lanreotide, GH ipersecrezione di controllo e la crescita del tumore in circa il 65% di somatotropinomas. Il D2DR agonisti, bromocriptina e cabergolina, controllano circa il 90% dei prolattinomi. Tali farmaci sono molto meno efficaci nel controllo degli altri adenomi pituitari esprimendo anche SST e recettori D2DR. La seconda parte riassume le attuali conoscenze in nuovi composti chimerici con sst2, sst5, e l'affinità D2DR. Tali leganti cuscinetto ssts distinti e farmacofori DRD2 possono sinergicamente produrre un maggiore controllo della secrezione e / o di proliferazione in diversi tipi di adenomi pituitari. I meccanismi di azione di tali molecole chimeriche attraverso una maggiore affinità di legame, la biodisponibilità prolungato, ligando-modulazione indotta eterodimerizzazione di recettori, sono discussi.

488: de Bruin C, Feelders RA, Lamberts SW, Hofland LJ.

### **Somatostatin and dopamine receptors as targets for medical treatment of Cushing's Syndrome.**

Rev EndocrMetab Disord. 2009 Jun;10(2):91-102. Epub 2008 Jul 19. Review. PubMed PMID: 18642088.

Somatostatin (SS) and dopamine (DA) receptors are widely expressed in neuroendocrine tumours that cause Cushing's Syndrome (CS). Increasing knowledge of specific subtype expression within these tumours and the ability to target these receptor subtypes with high-affinity compounds, has driven the search for new SS- or DA-based medical therapies for the various forms of CS. In Cushing's disease, corticotroph adenomas mainly express dopamine receptor subtype 2 (D(2)) and somatostatin receptor subtype 5 (sst(5)), whereas sst(2) is expressed at lower levels. Activation of these receptors can inhibit ACTH-release in primary cultured corticotroph adenomas and compounds that target either sst(5) (pasireotide, or SOM230) or D(2) (cabergoline) have shown significant efficacy in subsets of patients in recent clinical studies. Combination therapy, either by administration of both types of compounds separately or by treatment with novel somatostatin-dopamine chimeric molecules (e.g. BIM-23A760), appears to be a promising approach in this respect. In selected cases of Ectopic ACTH-producing Syndrome (EAS), the sst(2)-preferring compound octreotide is able to reduce cortisol levels effectively. A recent study showed that D(2) receptors are also significantly expressed in the majority of EAS and that cabergoline may decrease cortisol levels in subsets of these patients. In both normal adrenal tissue as well as in adrenal adenomas and carcinomas that cause CS, sst and DA receptor expression has been demonstrated. Although selected cases of adrenal CS may benefit from sst or DA-targeted treatment, its total contribution to the treatment of these patients is likely to be low as surgery is effective in most cases.

### **Recettori della somatostatina e della dopamina come target nel trattamento della sindrome di Cushing**

La somatostatina (SS) e dopamina (DA) recettori sono ampiamente espresse in tumori neuroendocrini che causano la sindrome di Cushing (CS). Aumentare la conoscenza di espressione sottotipo specifico all'interno di questi tumori e la capacità di indirizzare questi sottotipi di recettori con composti ad alta affinità, ha guidato la ricerca di nuove terapie o SS-DA-based medici per le varie forme di CS. Nella malattia di Cushing, adenomi corticotroph soprattutto esprimere recettori dopaminergici sottotipo 2 (D (2)) e del recettore della somatostatina sottotipo 5 (sst (5)), mentre sst (2) è espressa a livelli inferiori. L'attivazione di questi recettori in grado di inibire ACTH-release in primaria adenomi corticotroph colti e composti che target sia sst (5) (pasireotide, o SOM230) o D

(2) (cabergolina) hanno dimostrato un'efficacia significativa nei sottogruppi di pazienti in recenti studi clinici. La terapia di combinazione, o per la somministrazione di entrambi i tipi di composti separatamente o di trattamento con molecole nuove chimerici somatostatina-dopamina (ad esempio, BIM-23A760), sembra essere un approccio promettente in questo senso. In casi selezionati di ectopica ACTH-produzione Syndrome (EAS), il sst (2)-octreotide preferendo composto è in grado di ridurre efficacemente i livelli di cortisolo. Uno studio recente ha mostrato che D (2) recettori sono anche significativamente espressi nella maggior parte delle EAS e che la cabergolina può ridurre i livelli di cortisolo in sottoinsiemi di questi pazienti. In entrambi i tessuti normali surrenale così come in adenomi surrenalici e carcinomi che causano CS, SST e l'espressione dei recettori DA è stata dimostrata. Anche se casi selezionati di surrenale CS possono beneficiare di un trattamento o SST DA-mirato, il suo contributo totale per il trattamento di questi pazienti è probabilmente bassa come la chirurgia è efficace in molti casi.

## **SOMATOSTATINA O OCTREOTIDE**

1: Córdoba-Chacón J, Gahete MD, Durán-Prado M, Luque RM, Castaño JP.

### **Truncated somatostatin receptors as new players in somatostatin-cortistatin pathophysiology.**

Ann N Y Acad Sci. 2011 Mar;1220(1):6-15

Department of Cell Biology, Physiology, and Immunology, University of Córdoba, Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC), and CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBERObn), Córdoba, Spain.

Somatostatin (SST) and cortistatin (CORT) act through a family of seven transmembrane domain (TMD) receptors (sst1-5) to govern multiple functions, from growth hormone (GH) secretion to neurotransmission, metabolic homeostasis, gastrointestinal and immune function, and tumor cell growth. Thus, SST analogs are used to treat endocrine/tumoral pathologies. Yet, some SST/CORT actions cannot be explained by their interaction with known ssts. We recently identified novel sst5 variants in human, pig, mouse, and rat that lack one or more TMDs and display unique molecular/functional features: they exhibit distinct tissue distribution, divergent responses to SST/CORT, and intracellular localization as opposed to the typical plasma-membrane distribution of full-length ssts. When coexpressed in the same cell, truncated sst5 variants colocalize and physically interact with full-length ssts, providing a molecular basis to disrupt normal sst2/sst5 functioning. This may explain the inverse correlation between hsst5TMD4 expression in pituitary tumors and octreotide responsiveness in acromegaly. Discovery of these new truncated sst5 variants provides novel insights on SST/CORT/sst pathophysiology and suggests new research avenues for the therapeutic potential of this system.

### **Troncati i recettori per la somatostatina come nuovi protagonisti nella in fisiopatologia della somatostatina-cortistatina.**

La somatostatina (SST) e cortistatin (CORT) agiscono attraverso una famiglia di sette domini transmembrana (TMD) recettori (sst1-5) a disciplinare molteplici funzioni, da ormone della crescita (GH) secrezione di neurotrasmissione, omeostasi metabolica, la funzione gastrointestinale ed immunitario, e crescita di cellule tumorali. Così, analoghi SST sono usati per trattare le patologie endocrine / tumorale. Eppure, alcuni SST / azioni CORT non può essere spiegato dalla loro interazione con ssts noti. Recentemente abbiamo identificato romanzo sst5 varianti umane, maiale, topo, ratto e che la mancanza TMDs uno o più display e unico molecolare / funzionali: esse mostrano la distribuzione dei tessuti distinti, le risposte divergenti alla SST / CORT, e la localizzazione intracellulare in contrasto con il tipico la distribuzione del plasma-membrana di ssts full-length. Quando coespressi nella stessa cella, troncato sst5 varianti colocalizza e interagire

fisicamente con ssts full-length, che fornisce una base molecolare a perturbare sst2/sst5 normale funzionamento. Questo potrebbe spiegare la correlazione inversa tra hsst5TMD4 espressione nei tumori ipofisari e reattività octreotide in acromegalia. La scoperta di queste nuove varianti troncato sst5 fornisce spunti nuovi su SST / CORT / fisiopatologia SST e propone nuovi percorsi di ricerca per il potenziale terapeutico di questo sistema

2: Ertlav M, Hur E, Bozkurt D, Sipahi S, Timur O, Sarsik B, Akcicek F, Duman S.

### **Octreotide Lessens Peritoneal Injury in Experimental Encapsulated Peritoneal Sclerosis Model.**

Nephrology (Carlton). 2011 Mar 8.

Ege University Nephrology Department drmuhi@yahoo.com Ege University Nephrology Department hurender@hotmail.com Ege University Nephrology Department devrim\_bozkurt@yahoo.com Ege University Nephrology Department savassipahi@yahoo.com Ege University Internal Medicine ozge.timur@ege.edu.tr Ege University Pathology Department banu.sarsik@ege.edu.tr Ege University Nephrology Department fehmi.akcicek@gmail.com Ege University Internal Medicine soner.duman@ege.edu.tr.

Encapsulated peritoneal sclerosis is characterized by Background: neoangiogenesis and fibrosis.. Octreotide, a somatostatin analogue is a well-known anti fibrotic, anti proliferative and anti-angiogenetic agent. The aim of the study is to evaluate the effects of octreotide in encapsulated peritoneal sclerosis induced neoangiogenesis and fibrosis and compare the Non-uremic Wistar-Albino male rats results with resting. Materials and Methods: (n = 35) divided into four groups. GroupI, control rats, received 2ml isotonic saline intraperitoneally daily, 3weeks. GroupII, received daily intraperitoneally 2ml/200g injection of chlorhexidine gluconate(0.1%) and ethanol(%15) dissolved in saline, 3weeks. GroupIII, chlorhexidine gluconate 3weeks plus additional 3weeks without any treatment (rest), totally 6weeks. GroupIV, chlorhexidine gluconate 3weeks plus additional 3weeks octreotide, Octreotide 50mcg/kg body weight subcutaneously, totally 6weeks. Results: significantly reversed ultrafiltration capacity of peritoneum with decreasing inflammation, neoangiogenesis and fibrosis compared to resting group. Octreotide also caused inhibition of dialysate TGF-β1, VEGF and MCP-1 activity and improved mesothelial cell cytokeratin expression. Peritoneal resting has no beneficial In conclusion, octreotide may have a effects on peritoneum. Conclusion: therapeutic value in peritoneal dialysis patients who suffer from encapsulated peritoneal sclerosis.

### **La diminuzione di octreotide negli infortuni peritoneale in un modello sperimentale incapsulato di sclerosi peritoneale.**

Encapsulated sclerosi peritoneale è caratterizzato da sfondo: neoangiogenesi e la fibrosi .. L'octreotide, un analogo della somatostatina è un anti noto fibrotica, anti proliferativa ed agente anti-angiogenetici. Lo scopo dello studio è di valutare gli effetti di octreotide in incapsulato sclerosi peritoneale neoangiogenesi indotta e la fibrosi e confrontare i non-uremica Wistar-Albino maschio risultati ratti con il riposo. Materiali e metodi: (n = 35) divisi in quattro gruppi. GroupI, ratti di controllo, ha ricevuto 2 ml di soluzione fisiologica per via intraperitoneale al giorno, tre settimane.

GroupII, ha ricevuto ogni giorno per via intraperitoneale 2ml/200g iniezione di gluconato di clorexidina (0,1%) ed etanolo (15%) disciolto in soluzione salina, tre settimane. GroupIII, clorexidina gluconato di tre settimane, più ulteriori tre settimane senza alcun trattamento (riposo), in tutto sei settimane. GroupIV, clorexidina gluconato di tre settimane più ulteriori 3 settimane octreotide, Octreotide 50mcg/kg peso corporeo per via sottocutanea, in tutto sei settimane. Risultati: invertito in modo significativo la capacità di ultrafiltrazione del peritoneo con il diminuire l'infiammazione, neoangiogenesi e fibrosi rispetto al gruppo di riposo. L'octreotide ha anche causato l'inibizione del TGF- $\beta$ 1 dialisato, VEGF e MCP-1 l'attività e il miglioramento mesoteliali espressione cytokeatina cella. Riposo peritoneale non ha benefici In conclusione, l'octreotide può avere un effetto sul peritoneo. Conclusione: il valore terapeutico nei pazienti sottoposti a dialisi peritoneale che soffrono di sclerosi incapsulato peritoneale.

3: Boy C, Heusner TA, Poeppel TD, Redmann-Bischofs A, Unger N, Jentzen W, Brandau W, Mann K, Antoch G, Bockisch A, Petersenn S

**(68)Ga-DOTATOC PET/CT and somatostatin receptor (sst1-sst5) expression in normal human tissue: correlation of sst2 mRNA and SUV(max).**

Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2011 Mar 3.

Department of Nuclear Medicine, University Hospital Essen, University of Duisburg-Essen, Hufelandstraße 55, 45122, Essen, Germany, christian.boy@uk-essen.de.

**PURPOSE:** By targeting somatostatin receptors (sst) radiopeptides have been established for both diagnosis and therapy. For physiologically normal human tissues the study provides a normative database of maximum standardized uptake value (SUV(max)) and sst mRNA.

**METHODS:** A total of 120 patients were subjected to diagnostic (68)Ga-DOTATOC positron emission tomography (PET)/CT (age range 19-83 years). SUV(max) values were measured in physiologically normal tissues defined by normal morphology, absence of surgical intervention and absence of metastatic spread during clinical follow-up. Expression of sst subtypes (sst1-sst5) was measured independently in pooled adult normal human tissue by real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR).

**RESULTS:** SUV(max) revealed a region-specific pattern (e.g., mean $\pm$ SD, spleen 31.1 $\pm$ 10.9, kidney 16.9 $\pm$ 5.3, liver 12.8 $\pm$ 3.6, stomach 7.0 $\pm$ 3.1, head of pancreas 6.2 $\pm$ 2.3, small bowel 4.8 $\pm$ 1.8, thyroid 4.7 $\pm$ 2.2, bone 3.9 $\pm$ 1.3, large bowel 2.9 $\pm$ 0.8, muscle 2.1 $\pm$ 0.5, parotid gland 1.9 $\pm$ 0.6, axillary lymph node 0.8 $\pm$ 0.3 and lung 0.7 $\pm$ 0.3). SUV(max) was age independent. Gender differences were evident within the thyroid (female/male: 3.7 $\pm$ 1.6/5.5 $\pm$ 2.4,  $p < 0.001$ ; Mann-Whitney U test) and the pancreatic head (5.5 $\pm$ 1.9/6.9 $\pm$ 2.2,  $p < 0.001$ ). The sst mRNA was widely expressed and heterogeneous, showing sst1 to be most abundant. SUV(max) values exclusively correlated with sst2 expression ( $r = 0.846$ ,  $p < 0.001$ ; Spearman rank correlation analysis), whereas there was no correlation of SUV(max) with the expression of the other four subtypes.

**CONCLUSION:** In normal human tissues (68)Ga-DOTATOC imaging has been related to the expression of sst2 at the level of mRNA. The novel normative database may improve diagnostics, monitoring and therapy of sst-expressing tumours or inflammation on a molecular basis.

**(68Ga-DOTATOC PET / CT e il recettore della somatostatina (sst1-sst5) espressione nel normale tessuto umano: correlazione l'mRNA di sst2 e SUV (max).**

**SCOPO:** Prendendo di mira i recettori della somatostatina (SST) radiopeptidi sono stati stabiliti sia per la diagnosi e la terapia. Per i tessuti umani fisiologicamente normale lo studio fornisce un database normativo di massimo valore captazione standardizzato (SUV (max)) e mRNA SST. **METODI:** Un totale di 120 pazienti sono stati sottoposti a diagnostica (68) tomografia ad emissione di positroni Ga-DOTATOC (PET) / CT (fascia di età 19-83 anni). SUV (max) i valori sono stati misurati nei tessuti fisiologicamente normale definita dalla morfologia normale, assenza di intervento chirurgico e l'assenza di diffusione metastatica durante il follow-up clinico. Espressione dei sottotipi sst (sst1-sst5) è stata misurata in modo indipendente in pool tessuto adulto normale umano in tempo reale reazione di trascrittasi inversa a catena della polimerasi (RT-PCR).

**RISULTATI:** SUV (max) ha rivelato un pattern specifici per la regione (per esempio, media  $\pm$  SD, milza  $31,1 \pm 10,9$ , rene  $16,9 \pm 5,3$ , fegato  $12,8 \pm 3,6$ , stomaco  $7,0 \pm 3,1$ , testa del pancreas  $6,2 \pm 2,3$ , intestino tenue  $4,8 \pm 1,8$ , tiroide  $4,7 \pm 2,2$ , osso  $3,9 \pm 1,3$ , del grosso intestino  $2,9 \pm 0,8$ ,  $2,1 \pm 0,5$  muscolo, ghiandola parotide  $1,9 \pm 0,6$ , linfonodi ascellari nodo di  $0,8 \pm 0,3$  e del polmone,  $0,7 \pm 0,3$ ). SUV (max) era l'età indipendenti. Le differenze di genere erano evidenti all'interno della tiroide (femmina / maschio:  $3,7 \pm 1,6/5,5 \pm 2,4$ ,  $p < 0,001$ ; Mann-Whitney U test) e la testa del pancreas ( $5,5 \pm 1,9/6,9 \pm 2,2$   $p < 0,001$ ). Lo SST mRNA è stato ampiamente espresso ed eterogeneo, mostrando sst1 per essere più abbondante. SUV (max) valori esclusivamente correlata con sst2 ( $r = 0,846$ ,  $p < 0,001$ ; Spearman analisi di correlazione di rango), mentre non vi era alcuna correlazione di SUV (max) con l'espressione degli altri quattro sottotipi.

**CONCLUSIONE:** In normali tessuti umani (68) imaging Ga-DOTATOC è stata correlata con l'espressione di sst2 a livello di mRNA. Il database romanzo normativo può migliorare la diagnostica, il monitoraggio e la terapia delle SST-tumori che esprimono o infiammazione su base molecolare.

4: Uchino R, Kusano S, Hanada N, Ohara C, Okino T, Yamaguchi K.

**[Clinical efficacy of octreotide acetate in cancer patients with malignant bowel symptoms depend on terminal stage].**

[Article in Japanese]

Gan To Kagaku Ryoho. 2011 Feb;38(2):255-7.

Dept. of Surgery, National Hospital Organization, Kumamoto Saishunsou Hospital.

There are many reports that octreotide acetate(SMS)is effective for terminally ill cancer patients with malignant bowel obstructions such as nausea, vomiting and abdominal distension. We retrospectively found that the clinical efficacy of SMS in 23 patients with these symptoms depended on the early terminal stage(about six months until death)or middle terminal stage(within one month until death). SMS was more effective to relieve abdominal distension( $p=0.01$ )and these bowel symptoms occurred among cancer patients in the early terminal stage rather than in the middle terminal stage( $p<0.001$ ).

**[Efficacia clinica di acetato di octreotide in pazienti affetti da tumore maligno intestinale con sintomi che dipendono dalla fase terminale].**

Ci sono molte relazioni che acetato di octreotide (SMS) è efficace per pazienti terminali malati di cancro ostruzioni intestinali maligne quali nausea, vomito e distensione addominale. Retrospectivamente accertato che l'efficacia clinica di SMS in 23 pazienti con questi sintomi dipendeva dalla fase terminale precoce (circa sei mesi fino alla morte) o la fase terminale centrale (entro un mese, fino alla morte). SMS è stato più efficace per alleviare la distensione addominale ( $p = 0.01$ ) e questi sintomi intestinali si è verificato tra i pazienti affetti da cancro in fase terminale precoce piuttosto che nella fase terminale centrale ( $p < 0.001$ ).

6: Coiro V, Volpi R, Cataldo S, Araldi A, Stella A, Saccani-Jotti G, Maffei ML, Volta E, Chiodera P

### **Somatostatin Reduces Neuropeptide Y Rise Induced by Physical Exercise.**

Horm Metab Res. 2011 Mar 1.

Department of Internal Medicine and Biomedical Sciences, University of Parma, Parma, Italy.

The effect of an i. v. infusion of somatostatin (SRIH) 4.1  $\mu\text{g}/\text{min} \times 90$  min on the basal secretion of NPY and on the NPY response to physical exercise was studied in normal men. Basal NPY secretion was not modified by SRIH infusion, whereas the NPY response to physical exercise was significantly lower in the presence of SRIH. These data suggest the involvement of a somatostatinergic mechanism in the regulation of NPY response to physical exercise.

### **La somatostatina riduce l'aumento del Neuropeptide Y indotto dall'esercizio fisico**

L'effetto di un i. v. infusione di somatostatina (SRIH) 4.1 mg / min  $\times$  90 min sulla secrezione basale di NPY e sulla risposta NPY all'esercizio fisico è stato studiato in uomini normali. Secrezione basale NPY non è stato modificato da infusione SRIH, considerando che la risposta NPY all'esercizio fisico era significativamente più bassa in presenza di SRIH. Questi dati suggeriscono il coinvolgimento di un meccanismo somatostatinergico nella regolazione della risposta NPY all'esercizio fisico.

7: Ling J, Wei L, Zhang Y, Liang G, Wang D, Liu Y, Li Y.

**[Effect of method of soothing liver and regulating qi on expression of gastrin and somatostatin in hypothalamus, castric antrum of functional dyspepsia rats].**

[Article in Chinese]

Zhongguo Zhong Yao Za Zhi. 2010 Nov;35(22):3069-73.

First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China.  
ling\_jianghong@sina.com

**OBJECTIVE:** To explore the effects of the method of soothing the liver and regulating qi on expression of gastrin and somatostatin in hypothalamus and gastric antrum of functional dyspepsia model rats.

**METHOD:** The 32 rats were randomly divided into normal group, model group, Chaihu Shugansan group and domperidone group (n = 8). The functional dyspepsia model was established by constantly squeezing their tails and mean while saline, Chaihu Shugansan decoction and domperidone suspension were administered respectively to 4 groups by gavage. The expression of gastrin and somatostatin in hypothalamus and gastric antrum of rats by immunohistochemical were detected 3 weeks later.

**RESULT:** The expression of GAS in the hypothalamus and gastric antrum of model group were less than those of normal group ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), while the expression of SS in the hypothalamus and gastric antrum in Model group were significantly increased than those of normal group ( $P < 0.01$ ). The expression of GAS and SS in gastric antrum of Chaihu Shugansan group and domperidone group were increased and decreased respectively, and the differences were significant ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). There were no obvious difference about expression of GAS, SS in the hypothalamus between domperidone group and model group. GAS expression in hypothalamus of Chaihu Shugansan group were increased than those of normal group but there was no obvious difference in SS expression in hypothalamus between Chaihu Shugansan group and model group.

**CONCLUSION:** The method of soothing the liver and regulating qi can increase GAS expression in central and peripheral and decrease SS expression in peripheral gastric antrum, which may be one of its therapeutic mechanisms on functional dyspepsia.

**[Effetto del metodo lenitivo sul fegato e della regolazione dell'espressione della gastrina e della somatostatina nell'ipotalamo].**

**OBIETTIVO:** Per per esplorare gli effetti del metodo di calmante del fegato e disciplina qi sull'espressione di gastrina e la somatostatina nell'ipotalamo e dell'antro gastrico funzionale modello

di ratti dispepsia.

METODO: Le 32 ratti sono stati divisi casualmente in gruppo normale, gruppo di modelli, Chaihu Shugansan gruppo e gruppo domperidone (n = 8). Il modello di dispepsia funzionale è stato istituito dalla spremitura costantemente la coda e intanto saline, Chaihu decotto Shugansan domperidone e la sospensione sono stati somministrati rispettivamente a 4 gruppi con sonda gastrica. L'espressione di gastrina e somatostatina nell'ipotalamo e gastrico di ratti da immunoistochimici sono stati rilevati 3 settimane dopo.

RISULTATO: L'espressione di gas nel dell'antro gastrico dell'ipotalamo e del gruppo di modelli sono stati inferiori a quelli del gruppo dei normali ( $P < 0.05$ ,  $P < 0,01$ ), mentre l'espressione della SS nel dell'antro gastrico nell'ipotalamo e nel gruppo di modello sono aumentate significativamente rispetto quelli del gruppo dei normali ( $P < 0,01$ ). L'espressione di GAS e SS in gastrico del gruppo Chaihu Shugansan e gruppo domperidone sono stati aumentati e diminuiti, rispettivamente, e le differenze sono risultate significative ( $P < 0.05$ ,  $P < 0,01$ ). Non c'erano differenze evidenti circa espressione di GAS, SS nell'ipotalamo tra gruppo e gruppo domperidone modello. Espressione GAS nell'ipotalamo del gruppo Chaihu Shugansan sono aumentati rispetto a quelli del gruppo normale, ma non vi era alcuna differenza evidente nell'espressione SS nell'ipotalamo tra gruppo e gruppo Chaihu Shugansan modello.

CONCLUSIONE: Il metodo di lenire il qi del fegato e la regolazione può aumentare espressione GAS in centrale e periferica e diminuzione espressione SS nel periferico gastrico, che può essere uno dei suoi meccanismi di terapeutico su dispepsia funzionale.

8) Ghosh M, Schonbrunn A.

**Differential temporal and spatial regulation of somatostatin receptor phosphorylation and dephosphorylation.**

J Biol Chem. 2011 Feb 22.

University of Texas Health Science Center - Houston, United States.

The Gi-coupled somatostatin 2A receptor (sst2A) mediates many of the neuromodulatory and neuroendocrine actions of somatostatin (SS) and is targeted by the SS analogs used to treat neuroendocrine tumors. As for other G protein coupled receptors, agonists stimulate sst2A receptor phosphorylation on multiple residues and phosphorylation at different sites has distinct effects on receptor internalization and uncoupling. To elucidate the spatial and temporal regulation of sst2A receptor phosphorylation, we examined agonist-stimulated phosphorylation of multiple receptor GRK sites using phospho-site specific antibodies. SS increased receptor phosphorylation sequentially, first on S341/343 and then on T353/354, followed by receptor internalization. Reversal of receptor phosphorylation was determined by the duration of prior agonist exposure. In acutely stimulated cells, in which most receptors remained on the cell surface, dephosphorylation occurred only on T353/354. In contrast, both S341/343 and T353/354 were rapidly dephosphorylated when cells were stimulated long enough to allow receptor internalization before agonist removal. Consistent with these observations, dephosphorylation of T353/354 was not affected by either hypertonic sucrose or dynasore, which prevent receptor internalization, whereas dephosphorylation of S341/343 was completely blocked. An okadaic acid and fostriecin sensitive phosphatase catalyzed the dephosphorylation of T353/354 both intracellularly and at the cell surface. In contrast dephosphorylation of S341/343 was insensitive to these inhibitors. Our results show that the phosphorylation and dephosphorylation of neighboring GRK sites in the sst2A receptor are subject to differential spatial and temporal regulation. Thus the pattern of receptor phosphorylation is determined by the duration of agonist stimulation and compartment-specific enzymatic activity.

**Regolazione temporale e spaziale differenziale della fosforilazione e desfosforilazione del recettore della somatostatina.**

Il Gi-recettore accoppiato 2A (sst2A) media molte delle azioni neuromodulatori e neuroendocrini della somatostatina (SS) ed è rivolto dai analoghi della SS usato per trattare i tumori neuroendocrini. Come per altri recettori accoppiati a proteina G, stimolano la fosforilazione sst2A agonisti dei recettori per i residui multipli e fosforilazione in siti diversi ha effetti distinti su internalizzazione recettoriale e disaccoppiamento. Per chiarire la regolazione spaziale e temporale

della fosforilazione del recettore sst2A, abbiamo esaminato agonista-stimolato la fosforilazione del recettore GRK più siti utilizzando anticorpi specifici fosfo-site. SS aumentato fosfo-recettore rylation in sequenza, prima su e poi su S341/343 T353/354, seguito da internalizzazione recettoriale. Rovescio della fosforilazione del recettore è stato determinato dalla durata dell'esposizione agonista precedente. Nelle cellule acutamente stimolata, in cui la maggior parte è rimasta recettori sulla superficie cellulare, si è verificato solo su defosforilazione T353/354. Al contrario, sia S341/343 e T353/354 furono rapidamente defosforilata quando le cellule sono state stimolate abbastanza a lungo per consentire l'internalizzazione del recettore agonista prima della rimozione. Coerentemente con queste osservazioni, la defosforilazione di T353/354 non è stata influenzata da una saccarosio ipertonico o dynasore, che impediscono l'interiorizzazione del recettore, mentre la defosforilazione di S341/343 era completamente bloccato. Un acido okadaico e fostriecin fosfatasi sensibile catalizzato l'defosforilazione di T353/354 sia nelle cellule ed alla superficie delle cellule. In defosforilazione di contrasto di S341/343 era insensibile a questi inibitori. I nostri risultati mostrano che la fosforilazione e defosforilazione dei vicini siti GRK nel recettore sst2A sono soggette a differenziale di regolazione spaziale e temporale. Così il modello di fosforilazione recettoriale è determinato dalla durata della stimolazione agonista e vano specifico per l'attività enzimatica.

9) Saveanu A, Muresan M, De Micco C, Taieb D, Germanetti AL, Sebag F, Henry JF, Brunaud L, Enjalbert A, Weryha G, Barlier A.

**Expression of somatostatin receptors, dopamine D2 receptors, noradrenaline transporters, and vesicular monoamine transporters in 52 pheochromocytomas and paragangliomas.**

Endocr Relat Cancer. 2011 Mar 21;18(2):287-300.

Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology, Centre Hospitalo-Universitaire Conception, 147 Boulevard Baille, 13385 Marseille, France Center of Neurophysiology and Neurobiology of Marseille (CRN2M), CNRS-UMR6231, Institut Fédératif Jean-Roche, Faculté de Médecine Nord, Université de la Méditerranée, 13015 Marseille, France Department of Endocrinology, Centre Hospitalo-Universitaire of Nancy, 54500 Nancy, France Anatomical Pathology Department, Centre Hospitalo-Universitaire, 13385 Marseille, France, Departments of Nuclear Medicine Endocrine Surgery, Centre Hospitalo-Universitaire, 13385 Marseille, France Department of Endocrine Surgery, Centre Hospitalo-Universitaire, 54500 Nancy, France.

While somatostatin receptors (sst), through somatostatin-radiolabeled analogs, are used, mainly in second line, in the diagnosis and treatment of pheochromocytomas (PCC) and paragangliomas (PGL), the clinical significance of dopamine receptor subtype 2 (D(2)) in PCC/PGL is unknown. Indeed, radiolabeled dopamine (DA) analogs such as fluorine 18 ((<sup>18</sup>F)-DA, used for positron emission tomography in PCC localization, are mainly correlated to the presence of noradrenaline transporter (NAT) and vesicular monoamine transporters (VMAT) but not to D(2). The aim of this study was to quantitate D(2) and sst expression in 52 PCC/PGL and to compare it with that of 35 gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors (GEP-NETs). Quantitative RT-PCR of sst(1-3) and sst(5), D(2), NAT, VMAT1/2 was performed in all tumors, while immunohistochemistry analysis of sst(2) and D(2) was performed in seven tumors. D(2) mRNA was expressed in all PCC/PGL. Mean expression was significantly higher in PCC/PGL than in GEP-NETs (4.8 vs 0.5 copy/copy  $\beta$ -glucuronidase (Gus)). sst(2) and sst(1) were expressed in most PCC/PGL, with sst(2)-dominant expression (mean mRNA: 1.6 vs 0.4 copy/copy  $\beta$ -Gus). sst(2) expression level was similar to that of GEP-NETs, whereas sst(5) expression level was significantly lower (0.12 vs 0.78 copy/copy  $\beta$ -Gus). Our study evidenced strong D(2) mRNA expression in PCC and for the first time in PGL. PCC/PGL express sst(2) mRNA at levels similar to those of GEP-NETs. New drugs can target ssts and D(2) more efficiently than current somatostatin analogs. Moreover, transporters like NAT and VMAT1/2, could be co-targeted with sst, as a basis of new radionuclide compounds in the imaging and treatment of these tumors.

**Espressione dei recettori della somatostatina, dei recettori della dopamina D2, dei trasportatori della noradrenalina, e dei trasportatori monoamminici vescicolari in 52 feocromocitomi e paragangliomi**

Mentre i recettori della somatostatina (SST), attraverso analoghi della somatostatina radiomarcato, sono utilizzati, soprattutto in seconda linea, nella diagnosi e nel trattamento dei feocromocitomi (PCC) e paragangliomi (PGL), il significato clinico di sottotipo di recettore della dopamina 2 (D (2) ) in PCC / PGL è sconosciuto. Infatti, radiomarcati della dopamina (DA) analoghi come fluoro 18 ((18) F)-DA, usato per la tomografia ad emissione di positroni nella localizzazione PCC, sono principalmente correlati alla presenza del trasportatore della noradrenalina (NAT) e i trasportatori vescicolari delle monoamine (VMAT), ma non a D (2). Lo scopo di questo studio è stato quello di quantificare D (2) e di espressione sst in 52 PCC / PGL e di confrontarla con quella di 35 tumori neuroendocrini gastroenteropancreatici (GEP-NET). RT-PCR quantitativa di SST (1-3) e SST (5), D (2), NAT, VMAT1 / 2 è stata effettuata in tutti i tumori, mentre l'analisi immunohistochimica della sst (2) e D (2) è stata effettuata in sette tumori. D (2) mRNA è stato espresso in tutti / PCC PGL. Espressione media era significativamente più alta nei PCC / PGL che in GEP-NET (4,8 vs 0,5 copia / copia  $\beta$ -glucuronidasi (GUS)). sst (2) e SST (1) sono state espresse in più PCC / PGL, con sst (2) espressione di una posizione dominante (mRNA media: 1,6 vs 0,4 copia / copia  $\beta$ -Gus). sst (2) livello di espressione è stata simile a quella del GEP-NET, mentre sst (5) livello di espressione è stata significativamente inferiore (0,12 vs 0,78 copia / copia  $\beta$ -Gus). Il nostro studio ha evidenziato una forte D (2) espressione di mRNA in PCC e per la prima volta in PGL. PCC / PGL esprimere sst (2) mRNA a livelli simili a quelli di GEP-NET. Nuovi farmaci può avere come bersaglio ssts e D (2) più efficiente di analoghi della somatostatina in corso. Inoltre, i trasportatori come NAT e VMAT1 / 2, potrebbe essere co-mirati con SST, come base di composti radionuclide nuove immagini e nel trattamento di questi tumori.

10) Longo F, De Filippis L, Zivi A, Vitolo D, Del Signore E, Gori B, Diso D, Anile M, Venuta F, De Giacomo T, Coloni CF.

### **Efficacy and Tolerability of long-acting Octreotide in the Treatment of Thymic Tumors: Results of a Pilot Trial.**

Am J Clin Oncol. 2011 Feb 15. [Epub ahead of print]

Departments of \*Clinical Oncology †Pathology ‡Thoracic Surgery, University "La Sapienza", Rome, Italy.

**OBJECTIVES:** Octreotide is a somatostatin analog, long-acting formulations of which have been used experimentally for the treatment of patients with invasive tumors and/or residual disease after conventional therapies. The objective of this retrospective study was to evaluate the efficacy of long-acting octreotide (Sandostatin LAR) for the treatment of thymic tumors, with a primary efficacy end point of progression-free survival.

**METHODS:** Between 1994 and 2010, 44 patients with thymic malignancies were evaluated. Twenty-seven patients underwent an OctreoScan, and 12 OctreoScan-positive patients were treated with long-acting octreotide at a dose of 20 mg, given as an intramuscular injection, every 2 weeks.

**RESULTS:** Treatment with long-acting octreotide gave the following results: 3 cases of partial response (25%), 5 cases of stable disease (42%), and 4 cases of progressive disease (33%), with an average progression-free survival of 8 months (range, 3 to 21). Treatment compliance and tolerability were good for all evaluated patients.

**CONCLUSIONS:** The results of this study confirm the somatostatin receptor as a valid target for the treatment of thymic malignancies. Overall, therapy with long-acting somatostatin analogs seems to be safe and effective.

### **Efficacia e tollerabilità del trattamento con Octreotide a lunga azione nei tumori del timo: risultati di uno studio sperimentale**

**OBIETTIVI:** Octreotide è un analogo della somatostatina, formulazioni a lunga durata d'azione dei quali sono stati utilizzati in via sperimentale per il trattamento dei pazienti con tumori invasivi e / o di malattia residua dopo terapie convenzionali. L'obiettivo di questo studio retrospettivo è stato quello di valutare l'efficacia di octreotide a lunga azione (Sandostatina LAR) per il trattamento dei tumori timici, con un endpoint primario di efficacia di sopravvivenza libera da progressione.

**METODI:** Tra il 1994 e il 2010, 44 pazienti con tumori maligni del timo sono stati valutati. Ventisette pazienti sono stati sottoposti ad OctreoScan, e 12 pazienti OctreoScan-positivi sono stati trattati con octreotide a lunga azione alla dose di 20 mg, somministrato per iniezione intramuscolare, ogni 2 settimane.

**RISULTATI:** Il trattamento con octreotide a lunga azione ha dato i seguenti risultati: 3 casi di risposta parziale (25%), 5 casi di malattia stabile (42%), e 4 casi di progressione di malattia (33%), con una media libera da progressione sopravvivenza di 8 mesi (range da 3 a 21). Compliance al trattamento e la tollerabilità sono state buone per tutti i pazienti valutati. **CONCLUSIONI:** I risultati di questo studio confermano i recettori per la somatostatina come un obiettivo valido per il trattamento di tumori maligni del timo. Nel complesso, la terapia con analoghi della somatostatina a lunga azione sembra essere sicuro ed efficace.

11: Yosten GL, Pate AT, Samson WK.

**Neuronostatin acts in brain to biphasically increase mean arterial pressure through sympatho-activation followed by vasopressin secretion: role of melanocortins.**

Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2011 Feb 16.

1Saint Louis University.

Neuronostatin is a recently described neuropeptide that is derived from the somatostatin prohormone. We have shown previously that neuronostatin led to a biphasic, dose-related increase in mean arterial pressure when injected into the lateral cerebroventricle of adult, male rats. Because neuronostatin depolarized both magnocellular and parvocellular, paraventricular nucleus neurons in hypothalamic slice preparations, we hypothesized that neuronostatin elevated mean arterial pressure first by stimulating sympathetic nervous system activity followed by the release of a pressor hormone, specifically vasopressin. We found that the first phase of neuronostatin-induced increase in mean arterial pressure was reversed by pretreatment with phentolamine, indicating that Phase 1 was indeed due to an increase in sympathetic activity. We also found that centrally-injected neuronostatin led to a dose-related increase in vasopressin secretion in a time course consistent with the peak of the second phase. Furthermore, the second phase of arterial pressure elevation was reversed by pretreatment with a vasopressin 1 receptor antagonist, indicating that Phase 2 was likely due to an increase in vasopressin secretion. We previously have shown that the anorexigenic and antidiuretic effects of neuronostatin were reversed by pretreatment with the melanocortin 3/4 receptor antagonist, SHU9119, so we evaluated the ability of SHU9119 to reverse the effects of neuronostatin on MAP and vasopressin secretion. We found that SHU9119 abrogated the second phase of neuronostatin-induced increase in MAP and neuronostatin-induced vasopressin secretion, indicating that neuronostatin acts through the central melanocortin system to increase vasopressin release, ultimately leading to an elevation in MAP.

**La neuronostatina agisce nel cervello aumentando la pressione delle arterie tramite l'attivazione del simpatico a cui segue la secrezione di vasopressina: ruolo delle melanocortine**

Neuronostatin è un neuropeptide recentemente descritta che è derivato dal pre-pro-somatostatina. Abbiamo dimostrato in precedenza che neuronostatin ha portato ad un bifasico, aumento dose-correlato della pressione arteriosa media quando iniettato nel cerebroventricolo laterale di adulti, i ratti maschi. Perché neuronostatin depolarizza sia magnocellulare e parvocellulare, i neuroni nucleo paraventricolare in preparati fetta ipotalamico, abbiamo ipotizzato che neuronostatin elevata pressione arteriosa media, prima di tutto stimolare attività del sistema nervoso simpatico seguita dal rilascio di un ormone compressore, in particolare vasopressina. Abbiamo scoperto che la prima fase

di neuronostatin aumento indotto della pressione arteriosa media si è invertita dal pretrattamento con fentolamina, ad indicare che la fase 1 in realtà era dovuto ad un aumento dell'attività simpatica. Abbiamo anche trovato che neuronostatin centralmente iniettato ha portato ad un aumento dose-dipendente della secrezione di vasopressina in un corso a tempo coerente con il picco della seconda fase. Inoltre, la seconda fase di elevazione della pressione arteriosa si è invertita dal pretrattamento con un antagonista del recettore della vasopressina 1, che indica che la fase 2 è stata probabilmente dovuta ad un aumento della secrezione di vasopressina. Abbiamo in precedenza hanno dimostrato che gli effetti anorexigenic e antidipsogenic di neuronostatin fossero invertite dal pretrattamento con la melanocortina 3 / 4 antagonista del recettore, SHU9119, quindi abbiamo valutato la capacità di SHU9119 per invertire gli effetti di neuronostatin sulla mappa e la secrezione di vasopressina. Abbiamo scoperto che SHU9119 abrogato la seconda fase del neuronostatin aumento indotto in MAP e neuronostatin indotto la secrezione di vasopressina, che indica che gli atti neuronostatin attraverso il sistema della melanocortina centrale per aumentare la liberazione di vasopressina, portando in definitiva ad un aumento della MAP.

12 : Sandret L, Maison P, Chanson P.

### **Place of Cabergoline in Acromegaly: A Meta-Analysis.**

J Clin Endocrinol Metab. 2011 Feb 16.

Université Paris-Sud (P.C.), Faculté de Médecine Paris-Sud, Unité Mixte de Recherche-S693, F-94276 Le Kremlin Bicêtre, France; Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (P.C., L.S.), Hôpital de Bicêtre, Service d'Endocrinologie et des Maladies de la Reproduction, F-94275 Le Kremlin Bicêtre, France; Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U693 (P.C.), F-94276 Le Kremlin Bicêtre, France; Université Paris Est Créteil (P.M.), Faculté de Médecine Créteil, F-94010 Créteil, France; Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (P.M.), Hôpital Henri Mondor, Service de Pharmacologie Clinique and Unité de Recherche Clinique, F-94010 Créteil, France; and INSERM U955 (P.M.), F-94004 Créteil, France.

Context: Cabergoline is widely considered to be poorly effective in acromegaly. Objective: The aim of this study was to obtain a more accurate picture of the efficacy of cabergoline in acromegaly, both alone and in combination with somatostatin analogs. Design: We systematically reviewed all trials of cabergoline therapy for acromegaly published up to 2009 in four databases (PubMed, Pascal, Embase, and Google Scholar). We identified 15 studies (11 prospective) with a total of 237 patients; none were randomized or placebo-controlled. A meta-analysis was conducted on individual data (n = 227). Results: Cabergoline was used alone in nine studies. Fifty-one (34%) of the 149 patients achieved normal IGF-I levels. In multivariate analysis, the decline in IGF-I was related to the baseline IGF-I concentration ( $\beta = 1.16$ ;  $P < 0.001$ ), treatment duration ( $\beta = 0.28$ ;  $P < 0.001$ ), and baseline prolactin concentration ( $\beta = -0.18$ ;  $P = 0.01$ ), and with a trend toward a relation with the cabergoline dose ( $\beta = 0.38$ ;  $P = 0.07$ ). In five studies, cabergoline was added to ongoing somatostatin analog treatment that had failed to normalize IGF-I. Forty patients (52%) achieved normal IGF-I levels. The change in IGF-I was significantly related to the baseline IGF-I level ( $\beta = 0.74$ ;  $P < 0.001$ ) but not to the dose of cabergoline, the duration of treatment, or the baseline prolactin concentration. Conclusion: This meta-analysis suggests that cabergoline single-agent therapy normalizes IGF-I levels in one third of patients with acromegaly. When a somatostatin analog fails to control acromegaly, cabergoline adjunction normalizes IGF-I in about 50% of cases. This effect may occur even in patients with normoprolactinemia.

### **Ruolo della cabergolina nell'acromegalia : uno studio di meta analisi**

Contesto: Cabergolina è ampiamente considerato come scarsamente efficace in acromegalia. Obiettivo: L'obiettivo di questo studio era di ottenere un quadro più preciso l'efficacia della cabergolina in acromegalia, sia da solo che in combinazione con analoghi della somatostatina.

Design: Noi sistematicamente esaminato tutti gli studi clinici di terapia con cabergolina per acromegalia pubblicati fino al 2009 in quattro banche dati (PubMed, Pascal, Embase, e Google Scholar). Abbiamo identificato 15 studi (11 prospettici) con un totale di 237 pazienti, nessuno o sono stati randomizzati controllati con placebo. Una meta-analisi è stata condotta su dati individuali (n = 227). Risultati: Cabergolina è stato utilizzato solo in nove studi. Cinquantuno (34%) dei 149 pazienti ha raggiunto normali di IGF-I. All'analisi multivariata, il calo di IGF-I era collegato alla linea di base concentrazione di IGF-I ( $\beta = 1,16$ ,  $p < 0,001$ ), la durata del trattamento ( $\beta = 0,28$ ,  $p < 0,001$ ), e prolattina concentrazione di base ( $\beta = -0,18$ ,  $P = 0,01$ ), e con un trend verso una relazione con la dose di cabergolina ( $\beta = 0,38$ ,  $p = 0,07$ ). In cinque studi, cabergolina è stato aggiunto al trattamento in corso analogo della somatostatina, che non era riuscita a normalizzare IGF-I. Quaranta pazienti (52%) hanno raggiunto normali di IGF-I. Il cambiamento di IGF-I era significativamente correlata alla linea di base di IGF-I livello ( $\beta = 0,74$ ,  $p < 0,001$ ) ma non alla dose di cabergolina, la durata del trattamento, o la concentrazione di prolattina basale. Conclusione: Questa meta-analisi suggerisce che la terapia con cabergolina agente singolo normalizza i livelli di IGF-I in un terzo dei pazienti con acromegalia. Quando un analogo della somatostatina non riesce a controllare l'acromegalia, aggiunta cabergolina normalizza IGF-I in circa il 50% dei casi. Questo effetto può verificarsi anche in pazienti con normoprolattinemia.

13: Stengel A, Coskun T, Goebel-Stengel M, Craft LS, Alsina-Fernandez J, Wang L, Rivier J, Taché Y.

**Chronic injection of pansomatostatin agonist ODT8-SST differentially modulates food intake and decreases body weight gain in lean and diet-induced obese rats.**

Regul Pept. 2011 Feb 17.

Department of Medicine, CURE Digestive Diseases Research Center, Center for Neurobiology of Stress, Digestive Diseases Division UCLA, and VA Greater Los Angeles Healthcare System, Los Angeles, CA, USA.

The aim of this study was to investigate the central actions of the stable pansomatostatin peptide agonist, ODT8-SST on body weight. ODT8-SST or vehicle was acutely (1µg/rat) injected or chronically infused (5µg/rat/d, 14d) intracerebroventricularly and daily food intake, body weight and composition were monitored. In lean rats, neither acute nor chronic ODT8-SST influenced daily food intake while body weight was reduced by 2.2% after acute injection and there was a 14g reduction of body weight gain after 14d compared to vehicle (p<0.01). In diet-induced obese (DIO) rats, chronic ODT8-SST increased cumulative 2-week food intake compared to vehicle (+14%, p<0.05) and also blunted body weight change (-11g, p<0.05). ODT8-SST for 14d reduced lean mass (-22g and -25g respectively, p<0.001) and total water (-19g and -22g respectively, p<0.001) in lean and DIO rats and increased fat mass in DIO (+16g, p<0.001) but not lean rats (+1g, p>0.05) compared to vehicle. In DIO rats, ODT8-SST reduced ambulatory (-27%/24h, p<0.05) and fine movements (-38%, p<0.01) which was associated with an increased positive energy balance compared to vehicle (+50g, p<0.01). Chronic central somatostatin receptor activation in lean rats reduces body weight gain and lean mass independently of food intake which is likely related to growth hormone inhibition. In DIO rats, ODT8-SST reduces lean mass but promotes food intake and fat mass, indicating differential responsiveness to somatostatin under obese conditions.

**Iniezioni croniche di pansomatostatina, un agonista ODT8-SST, modulano differenzialmente assunzioni di cibo e diminuisce l'aumento di peso corporeo in ratti magri indotti all'obesità tramite la dieta**

Lo scopo di questo studio era di studiare le azioni centrali del peptide agonista stabile pansomatostatin, ODT8-SST sul peso corporeo. ODT8-SST o veicolo è stato acutamente (1µg/rat) iniettati o cronicamente infuso (5µg/rat/d, 14d) intracerebroventricularly e l'assunzione di cibo quotidiano, il peso corporeo e la composizione sono stati monitorati. Nei ratti magri, né acuta né cronica ODT8-SST influenzato l'alimentazione quotidiana, mentre il peso corporeo è stato ridotto del 2,2% dopo l'iniezione acuta e c'è stata una riduzione 14g di peso corporeo dopo 14 quinquies,

rispetto al veicolo ( $p < 0,01$ ). Nella dieta-indotta obesi (DIO) ratti, cronica ODT8-SST aumento cumulativo alimentare di 2 settimane di aspirazione rispetto al veicolo (+14%,  $p < 0,05$ ) e anche smussati variazione del peso corporeo (-11g,  $p < 0,05$ ). ODT8-SST per 14 quinquies ridotta massa magra (-22g e 25g, rispettivamente,  $p < 0,001$ ) e di acqua totale (-19g e 22g, rispettivamente,  $p < 0,001$ ) nei ratti magri e DIO e l'aumento della massa grassa in DIO (16 g,  $p < 0,001$ ) ma non magra (1 g,  $p > p < 0,05$ ) rispetto al veicolo. Nei ratti DIO, ODT8-SST ridotto ambulatoriale (-27% / 24,  $p < 0,05$ ) e movimenti fini (-38%,  $p < 0,01$ ) che è stata associata con un equilibrio maggiore energia positiva rispetto al veicolo (50 g,  $p < 0,01$ ). Cronica centrale l'attivazione del recettore della somatostatina nei ratti magri riduce il peso corporeo e la massa magra indipendentemente dall'assunzione di cibo, che è probabilmente correlato alla inibizione dell'ormone della crescita. Nei ratti DIO, ODT8-SST riduce la massa magra ma promuove l'assunzione di cibo e di massa grassa, che indica la risposta differenziale di somatostatina in condizioni di obesi.

14: Ferone D.

### **Somatostatin and dopamine receptors.**

Tumori. 2010 Sep-Oct;96(5):802-5.

Department of Endocrinology & Medical Sciences (DiSEM), University of Genoa, Genoa, Italy.

The discovery of the new properties of SSRs and DRs has led to a renewed interest in agents targeting these receptors and has opened new perspectives for medical treatment of patients with pituitary and neuroendocrine tumors resistant to the "classical", currently available analogs. Moreover, SSRs and DRs crosstalk at membrane level may trigger alternative intracellular pathways or enhance the signalling for the control of cell growth. New somatostatin analogs and hybrid molecules, which display a broader and different spectrum of activities compared to conventional analogs, seem to be a promising therapeutic alternative for the control of hormone secretion and, hopefully, to reduce tumor burden. Receptor profile characterization is crucial for the accurate selection of patients potentially responsive to a given therapy.

### **Somatostatina e recettori della dopamina**

La scoperta di nuove proprietà del SSR e DRS ha portato ad un rinnovato interesse per gli agenti destinate a questi recettori e ha aperto nuove prospettive per il trattamento medico dei pazienti con tumori ipofisari e neuroendocrini resistente alla "classica", analoghi attualmente disponibili. Inoltre, crosstalk SSR e DRS a livello della membrana possono attivare percorsi alternativi intracellulari o migliorare la segnalazione per il controllo della crescita cellulare. Nuovi analoghi della somatostatina e molecole ibride, che presentano uno spettro più ampio e diverso di attività rispetto agli analoghi convenzionali, sembrano essere una promettente alternativa terapeutica per il controllo della secrezione ormonale e, si spera, per ridurre il carico tumorale. Caratterizzazione profilo del recettore è cruciale per l'accurata selezione dei pazienti potenzialmente sensibile ad una determinata terapia.

15) Georgantzi K, Tsolakis AV, Stridsberg M, Jakobson A, Christofferson R, Janson ET.

**Differentiated expression of somatostatin receptor subtypes in experimental models and clinical neuroblastoma.**

Pediatr Blood Cancer. 2011 Apr;56(4):584-9.

Department of Women's and Children's Health, Uppsala University, Uppsala, Sweden.  
clary.georgantzi@kbh.uu.se

**BACKGROUND:** Neuroblastoma (NB) is a solid tumor of childhood originating from the adrenal medulla or sympathetic nervous system. Somatostatin (SS) is an important regulator of neural and neuroendocrine function, its actions being mediated through five specific membrane receptors. The aim of this study was to investigate the expression of the different somatostatin receptors (SSTRs) in NB tumor cells that may form targets for future therapeutic development.

**PROCEDURE:** Tumor specimens from 11 children with stage II-IV disease were collected before and/or after chemotherapy. Experimental tumors derived from five human NB cell lines were grown subcutaneously in nude mice. Expression of SSTRs, the neuroendocrine marker chromogranin A (CgA) and SS was detected by immunohistochemistry using specific antibodies.

**RESULTS:** SSTR2 was detected in 90%, SSTR5 in 79%, SSTR1 in 74%, SSTR3 in 68% whereas SSTR4 was expressed in 21% of the clinical tumors. The experimental tumors expressed SSTRs in a high but variable frequency. All clinical tumors showed immunoreactivity for CgA but not for SS.

**CONCLUSION:** The frequent expression of SSTRs indicates that treatment with unlabeled or radiolabeled SS analogs should be further explored in NB.

**Espressione differenziata dei sottotipi dei recettori della somatostatina in modelli sperimentali e clinici di neuroblastoma**

**BACKGROUND:** Il neuroblastoma (NB) è un tumore solido dell'infanzia provenienti dalla midollare del surrene e del sistema nervoso simpatico. La somatostatina (SS) è un importante regolatore della funzione neurale e neuroendocrino, le sue azioni sono mediate attraverso cinque specifici recettori di membrana. Lo scopo di questo studio era di studiare l'espressione dei recettori per la somatostatina diversi (SSTRs) in cellule tumorali NB che possono costituire obiettivi per il futuro sviluppo terapeutico.

**PROCEDURA:** campioni di tumore da 11 bambini con malattia in stadio II-IV sono stati raccolti prima e / o dopo la chemioterapia. Tumori sperimentali derivate da cinque linee cellulari umane di NB sono state coltivate per via sottocutanea in topi nudi. Espressione di SSTRs, il marcatore

neuroendocrino cromogranina A (CgA) e la SS è stata rilevata mediante immunistochemica utilizzando anticorpi specifici.  
RISULTATI: SSTR2 è stata rilevata nel 90%, SSTR5 nel 79%, SSTR1 nel 74%, SSTR3 nel 68%, mentre SSTR4 è stato espresso nel 21% dei tumori clinici. I tumori sperimentali espressi SSTRs in una frequenza elevata, ma variabile. Tutti i tumori clinici hanno mostrato immunoreattività per CgA ma non per la SS.  
CONCLUSIONE: L'espressione frequente di SSTRs indica che il trattamento con analoghi radiomarcanti senza etichetta o SS deve essere ulteriormente studiata nel NB.

16: Nakahara K, Takata S, Ishii A, Nagao K, Bannai M, Takahashi M, Murakami N

### **Somatostatin is involved in anorexia in mice fed a valine-deficient diet.**

Amino Acids. 2011 Feb 4.

Department of Veterinary Physiology, Faculty of Agriculture, University of Miyazaki, Miyazaki, 889-2192, Japan.

The ingestion of a valine (Val)-deficient diet results in a significant reduction of food intake and body weight within 24 h, and this phenomenon continues throughout the period over which such a diet is supplied. Both microarray and real-time PCR analyses revealed that the expression of somatostatin mRNA was increased in the hypothalamus in anorectic mice that received a Val-deficient diet. On the other hand, when somatostatin was administered intracerebroventricularly to intact animals that were fed a control diet, their 24-h food intake decreased significantly. In addition, Val-deficient but not pair-fed mice or those fasted for 24 h showed a less than 0.5-fold decrease in the hypothalamic mRNA expression levels of Crym, Foxg1, Itpka and two unknown EST clone genes and a more than twofold increase in those of Slc6a3, Bdh1, Ptgr2 and one unknown EST clone gene. These results suggest that hypothalamic somatostatin and genes responsive to Val deficiency may be involved in the central mechanism of anorexia induced by a Val-deficient diet.

### **Somatostatina è coinvolta nell'anoressia in topi che eseguono una dieta carente di valina**

L'ingestione di una valina (Val) i risultati dieta carente in una significativa riduzione dell'assunzione di cibo e del peso corporeo entro 24 ore, e questo fenomeno continua per tutto il periodo durante il quale viene fornita una dieta. Sia in tempo reale, analisi di PCR e microarray hanno rivelato che l'espressione di mRNA della somatostatina è stata aumentata nell'ipotalamo in topi anoressizzanti che hanno ricevuto una dieta Val-carenti. D'altra parte, quando la somatostatina è stato somministrato ad animali intracerebroventricularly intatto che sono stati alimentati con una dieta di controllo, la loro assunzione di cibo nelle 24 ore è notevolmente diminuito. Inoltre, la Val-deficiente, ma non i topi pair-fed o quelli a digiuno per 24 ore hanno mostrato un minore di 0.5 volte diminuzione dei livelli ipotalamici di espressione di mRNA di Crym, Foxg1, Itpka e due sconosciuti geni clone EST e un aumento più che raddoppiato in quelle di Slc6a3, Bdh1, Ptgr2 e uno sconosciuto gene clone EST. Questi risultati suggeriscono che somatostatina ipotalamica e geni

sensibili al deficit di Val possono essere coinvolte nel meccanismo centrale di anoressia indotta da una dieta carente di Val.

17) Diakatou E, Kaltsas G, Tzivras M, Kanakis G, Papaliodi E, Kontogeorgos G.

**Somatostatin and dopamine receptor profile of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors: an immunohistochemical study.**

Endocr Pathol. 2011 Mar;22(1):24-30.

Department of Pathology, G. Gennimatas Athens General Hospital, 154 Mesogeion Avenue, 115 27, Athens, Greece, diakva@yahoo.gr.

Somatostatin and its synthetic analogs act through five specific somatostatin receptors (sstr1-5), found on the cell membrane of various tumors, including endocrine ones. Dopamine-a known neurotransmitter-acts through five membranous dopamine receptors (D1R-D5R) which have recently been found to be expressed in endocrine tumors. We evaluated the immunohistochemical expression of the sstrs and D2R in a large series of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors (GEP-NETs). A total of 22 (28.94%) well-differentiated NETs (WDNETs), 6 (7.89%) WDNETs of uncertain biology, 26 (34.21%) well-differentiated neuroendocrine carcinomas, and 22 (28.94%) poorly differentiated neuroendocrine carcinomas were studied. Overall, 76.31% of the tumors were positive for different types of sstrs with variable intensity of the membranous staining whereas 36.95% were positive for D2R alone. The sstr2A was the most frequently expressed, followed by sstr2B, sstr1, and sstr5. Co-expression of sstrs and D2R was seen in 88.23% of positive tumors. The high rates of sstr2A and sstr2B and in a lower extent of sstr5 expression are of great importance for more accurate imaging, staging and targeted therapy of the disease. The co-expression of sstrs and D2R in a significant number of the studied cases offers a potential therapeutic alternative for GEP-NETs.

**Somatostatina e profilo del recettore della dopamina nei tumori gastroenteropancreatici neuroendocrini: uno studio di immunoistochimica**

La somatostatina ei suoi analoghi sintetici atto attraverso cinque specifici recettori per la somatostatina (SSTR1-5), che si trova sulla membrana delle cellule di vari tumori, tra cui quelle endocrine. Dopamina, un neurotrasmettitore noto, agisce attraverso cinque recettori della dopamina membranosa (D1R-D5R), che recentemente sono state trovate per essere espressi in tumori endocrini. Abbiamo valutato l'espressione immunoistochimica della SSTRs e D2R in un'ampia serie

di tumori neuroendocrini gastroenteropancreatici (GEP-NET). Un totale di 22 (28,94%) le reti ben differenziato (WDNETs), 6 (7,89%) WDNETs di biologia incerto, 26 (34,21%) carcinomi neuroendocrini ben differenziati, e 22 (28,94%) carcinomi neuroendocrini scarsamente differenziati sono stati studiati. Complessivamente, 76,31% dei tumori erano positivi per i diversi tipi di SSTRs con intensità variabile del membranosa colorazione mentre 36,95% era positivo per D2R solo. Il sstr2A è stato il più frequentemente espresse, seguiti da sstr2B, sstr1, e SSTR5. Co-espressione di SSTRs e D2R è stato visto nel 88,23% dei tumori positivi. Gli elevati tassi di sstr2A e sstr2B e in una misura minore di SSTR5 espressione sono di grande importanza per l'imaging più accurata, stadiazione e terapia mirata della malattia. La co-espressione di SSTRs e D2R in un numero significativo di casi studiati offre una potenziale alternativa terapeutica per GEP-NET.

18: Stanley EM, Fadel JR, Mott DD.

### **Interneuron loss reduces dendritic inhibition and GABA release in hippocampus of aged rats.**

Neurobiol Aging. 2011 Jan 28.

Department of Pharmacology, Physiology and Neuroscience, School of Medicine, University of South Carolina, Columbia, SC, USA.

Aging is associated with impairments in learning and memory and a greater incidence of limbic seizures. These changes in the aged brain have been associated with increased excitability of hippocampal pyramidal cells caused by a reduced number of gamma-aminobutyric acid-ergic (GABAergic) interneurons. To better understand these issues, we performed cell counts of GABAergic interneurons and examined GABA efflux and GABAergic inhibition in area CA1 of the hippocampus of young (3-5 months) and aged (26-30 months) rats. Aging significantly reduced high K(+)/Ca(2+)-evoked GABA, but not glutamate efflux in area CA1. Immunostaining revealed a significant loss of GABAergic interneurons, but not inhibitory boutons in stratum oriens and stratum lacunosum moleculare. Somatostatin-immunoreactive oriens-lacunosum moleculare (O-LM) cells, but not parvalbumin-containing interneurons were selectively lost. Oriens-lacunosum moleculare cells project to distal dendrites of CA1 pyramidal cells, providing dendritic inhibition. Accordingly, inhibition of dendritic input to CA1 from entorhinal cortex was selectively reduced. These findings suggest that the age-dependent loss of interneurons impairs dendritic inhibition and dysregulates entorhinal cortical input to CA1, potentially contributing to cognitive impairment and seizures.

### **La perdita di interneuroni reduce l'inibizione dendritica e il rilascio di GABA nell'ippocampo di ratti in età avanzata**

L'invecchiamento è associato a disturbi nell'apprendimento e nella memoria e una maggiore incidenza di convulsioni limbico. Questi cambiamenti nel cervello di età sono stati associati con un aumento di eccitabilità delle cellule piramidali dell'ippocampo causato da un numero ridotto di acido gamma-aminobutirrico-Ergic (GABAergici) interneuroni. Per capire meglio questi problemi, abbiamo effettuato la conta delle cellule di interneuroni GABAergici ed esaminati efflusso GABA e inibizione GABAergica in zona CA1 dell'ippocampo di giovani (3-5 mesi) e di età (26-30 mesi),

ratti. Invecchiamento notevolmente ridotta K alto (+) / Ca (2 +)-evocato GABA, ma non glutammato efflusso nella zona CA1. Immunostaining ha rivelato una significativa perdita di interneuroni GABAergici, ma non boutons inibitorio in Oriens strato e strato lacunosum moleculare. Somatostatina-immunoreattive moleculare Oriens-lacunosum (O-LM) cellule, ma non parvalbumin contenenti interneuroni sono stati selettivamente persa. Cellule moleculare Oriens-lacunosum progetto di dendriti distali di cellule piramidali CA1, fornendo inibizione dendritiche. Di conseguenza, l'inibizione di input dendritiche CA1 dalla corteccia entorinale è selettivamente ridotta. Questi risultati suggeriscono che la perdita età-dipendente di interneuroni danneggia inibizione dendritiche e dysregulates entorinale input corticali CA1, potenzialmente contribuendo alla compromissione cognitiva e convulsioni.

19: Ramón R, Martín-Gago P, Verdaguer X, Macias MJ, Martín-Malpartida P, Fernández-Carneado J, Gomez-Caminals M, Ponsati B, López-Ruiz P, Cortés MA, Colás B, Riera A.

### **SSTR1- and SSTR3-Selective Somatostatin Analogues.**

Chembiochem. 2011 Jan 21.

Institute for Research in Biomedicine (IRB Barcelona), Baldiri Reixac, 10, 08028 Barcelona (Spain), Fax: (+34)3094395; Departament de Química Orgànica, Universitat de Barcelona, Baldiri Reixac, 10, 08028 Barcelona (Spain).

We prepared the two enantiomers of 3-(3'-quinolyl)-alanine (Qla, 1) in multigram scale by asymmetric hydrogenation. These amino acids, protected as Fmoc derivatives, were then used in the solid-phase synthesis of two new somatostatin 14 (SRIF-14) analogues 8a and 8b, tetradecapeptides in which the tryptophan residue (Trp8) is replaced by one of the two enantiomers of 3-(3'-quinolyl)-alanine (Qla8) and therefore lack the N-H bond in residue 8. The selectivity of these new analogues for the somatostatin receptors, SSTR1-5, was measured. Substitution with L-Qla8 yielded peptide 8a, which was highly selective for SSTR1 and SSTR3, with an affinity similar to that of SRIF-14. Substitution by D-Qla gave the relatively selective analogue 8b, which showed high affinity for SSTR3 and significant affinity for SSTR1, SSTR2 and SSTR5. The biological results demonstrate that bulky and electronically poor aromatic amino acids at position 8 are compatible with strong activity with SSTR1 and SSTR3. Remarkably, these high affinity levels were achieved with peptides in which the conformational mobility was increased with respect to that of SRIF-14. This observation suggests that conformational rigidity is not required, and might be detrimental to the interaction with receptors SSTR1 and SSTR3. The absence of an indole N proton in Qla8 might also contribute to the increased flexibility observed in these analogues.

### **Analoghi selettivi della somatostatina SSTR1- e SSTR3**

Abbiamo preparato due enantiomeri del 3 - (3'-chinolil)-amino transferasi (QLA, 1) in scala multigram per idrogenazione asimmetrica. Questi aminoacidi, protetti come i derivati Fmoc, sono stati poi utilizzati per la sintesi in fase solida di due nuovi 14 somatostatina (SRIF-14) analoghi 8

bis e 8 b, tetradecapeptides in cui viene sostituito il residuo di triptofano (Trp8) da uno dei due enantiomeri di 3 - (3'-chinolil)-amino transferasi (Qla8) e quindi manca la N  $\square$  legame H in residuo 8. La selettività di questi nuovi analoghi per i recettori della somatostatina, SSTR1-5, è stata misurata. Sostituzione con L-Qla8 ha prodotto 8 un peptide, che è stato altamente selettivo per SSTR1 e SSTR3, con un'affinità simile a quella di SRIF-14. La sostituzione con il D-QLA ha dato l'analogo relativamente selettivo 8 b, che ha dimostrato alta affinità per affinità SSTR3 e significativo per SSTR1, SSTR2 e SSTR5. I risultati biologici dimostrano che gli acidi aromatici ingombranti e elettronica povera amino alla posizione 8 sono compatibili con forte attività con SSTR1 e SSTR3. Sorprendentemente, questi livelli sono stati raggiunti ad alta affinità con i peptidi in cui è stata aumentata la mobilità conformazionale rispetto a quella di SRIF-14. Questa osservazione suggerisce che la rigidità conformazionale non è necessaria, e potrebbe essere dannoso per l'interazione con i recettori SSTR1 e SSTR3. L'assenza di un protone indolo N in Qla8 potrebbe anche contribuire alla maggiore flessibilità osservata in questi analoghi.

20: Vaidyanathan G, Affleck DJ, Zhao XG, Keir ST, Zalutsky MR.

### **[Lu]-DOTA-Tyr-octreotate: A Potential Targeted Radiotherapeutic for the Treatment of Medulloblastoma.**

Curr Radiopharm. 2010;3(1):29-36.

Department of Radiology Duke University Medical Center, Durham, North Carolina, USA 27710.

Medulloblastoma, the most common pediatric brain tumor, is difficult to treat because conventional therapeutic approaches result in significant toxicity to normal central nervous system tissues, compromising quality of life. Given the fact that medulloblastomas express the somatostatin subtype 2 receptor, [(177)Lu-DOTA(0),Tyr(3)]octreotate ([177Lu]DOTA-TATE) could be a potentially useful targeted radiotherapeutic for the treatment of this malignancy. The current study was undertaken to evaluate this possibility in preclinical models of D341 MED human medulloblastoma by comparing the properties of [(177)Lu]DOTA-TATE to those of glucose-[(125)I-Tyr(3)]-octreotate ([125I]Gluc-TOCA), a radiopeptide previously shown to target this cell line. In vitro assays indicated that both labeled peptides exhibited similar cell-associated and internalized radioactivity after a 30-min incubation at 37°C; however, at the end of the 4 h incubation period, the internalized radioactivity for [(177)Lu]DOTA-TATE (6.22  $\pm$  0.75%) was nearly twice that for [(125)I]Gluc-TOCA (3.16  $\pm$  0.27%), with similar differences seen in total cell-associated radioactivity levels. Consistent with the results from the internalization assays, results from paired-label tissue distribution studies in athymic mice with subcutaneous D341 MED medulloblastoma xenografts showed a similar degree of tumor accumulation for [(177)Lu]DOTA-TATE and [(125)I]Gluc-TOCA at early time points but by 24 h, a more than 5-fold advantage was observed for the (177)Lu-labeled peptide. Tumor-to-normal tissue ratios generally were more favorable for [(177)Lu]DOTA-TATE at all time points, due in part to its lower accumulation in normal tissues except kidneys. Taken together, these results suggest that [(177)Lu]DOTA-TATE warrants further investigation as a targeted radiotherapeutic for medulloblastoma treatment.

## **[Lu]-DOTA-Tyr-octreotate: un potenziale target radioterapeutico per il trattamento del medulloblastoma**

Medulloblastoma, il più frequente tumore cerebrale pediatrico, è difficile da trattare perché convenzionale risultato terapeutico si avvicina una tossicità significativa alla normalità tessuti del sistema nervoso centrale, compromettendo la qualità della vita. Considerato il fatto che medulloblastomi esprimere il sottotipo 2 del recettore della somatostatina, [(177) Lu-DOTA (0), Tyr (3)] octreotate ([177) Lu] DOTA-TATE) potrebbe essere un potenzialmente utile radioterapici mirati per il trattamento di questa neoplasia. Il presente studio è stato intrapreso per valutare questa possibilità in modelli preclinici di D341 medulloblastoma MED umano confrontando le proprietà di [(177) Lu] DOTA-TATE a quelli di glucosio-[(125) I-Tyr (3)]-octreotate ([125) I] Gluc-TOCA), un radiopeptide precedentemente dimostrato che questa linea di cellule bersaglio. Saggi in vitro hanno indicato che entrambi i peptidi etichettati esposti simili radioattività associati alle cellule e interiorizzata dopo una incubazione di 30 min a 37 ° C, tuttavia, alla fine del periodo di 4 h di incubazione, la radioattività internalizzati per [(177) Lu] DOTA -Tate (6,22 %, 0,75%) è circa due volte che per [(125) I] Gluc-TOCA (3,16%, 0,27%), con differenze simili osservati in totale i livelli di radioattività associati alle cellule. Coerentemente con i risultati del test di internazionalizzazione, i risultati di studi di distribuzione tissutale abbinato ecologica in topi atimici con sottocutaneo eterotrapianti D341 medulloblastoma MED ha dimostrato un grado simile di accumulazione del tumore di [(177) Lu] DOTA-TATE e [(125) I] Gluc-TOCA a tempi precoce, ma da 24 h, un vantaggio di oltre cinque volte è stato osservato per la (177) Lu-peptide marcato. Rapporti di tessuto tumorale-a-normale in genere sono stati più favorevoli per [(177) Lu] DOTA-TATE a tutti i tempi, dovuto in parte al suo accumulo minore nei tessuti normali ad eccezione di reni. Presi insieme, questi risultati suggeriscono che [(177) Lu] warrant DOTA-TATE ulteriori indagini in modo mirato per il trattamento radioterapico medulloblastoma.

21) Yonezawa T, Mogi K, Li JY, Sako R, Manabe N, Yamanouchi K, Nishihara M.

**Effects of Estrogen on Growth Hormone Pulsatility in Peripheral Blood and Neuropeptide Profiles in the Cerebrospinal Fluid of Goats.**

J Reprod Dev. 2011 Jan 14.

Department of Veterinary Physiology, Veterinary Medical Science, The University of Tokyo.

We previously reported that growth hormone (GH) pulses were negatively associated with neuropeptide Y (NPY) profiles in cerebrospinal fluid (CSF) of the third ventricle of Shiba goats. In addition, while most GH pulses were coincident with GH-releasing hormone (GHRH) pulses, there was no correlation between GH and somatostatin (SRIF) levels. The present study was performed to elucidate the relationship between GH pulses and these neuropeptide levels in CSF when estradiol (1.0 mg/head) was subcutaneously administered to ovariectomized goats. CSF and plasma samples were collected every 15 min for 18 h (from 6 h before to 12 h after injection). GH levels in peripheral blood and GHRH, SRIF and NPY levels in CSF were measured by radioimmunoassay. Pulse/trough characteristics and correlations were assessed by the ULTRA algorithm and cross-correlation analysis. Before estradiol was injected, significant coincidence was found between GHRH pulses and GH pulses, and negative coincidence was found between NPY troughs and GH pulses. Six to 12 h after estradiol injection, the amplitude and area under the curve (AUC) of the GH pulses were markedly increased. The duration and AUC of the GHRH pulses in the CSF were also increased, and stronger synchrony of GHRH with GH was observed. In contrast, the baseline of NPY was significantly decreased, and the negative correlation between the GH pulses and NPY troughs disappeared. The parameters of SRIF troughs were not clearly changed. These observations suggest that estrogen enhances the pattern of secretion of GH in the goat via enhancement of GHRH pulses and decrease of NPY levels.

**Effetti degli estrogeni sulla pulsabilità dell'ormone della crescita nel sangue periferico e sui profile dei neuropeptidi nel liquido cerebrospinale delle capre**

Abbiamo precedentemente riportato che l'ormone della crescita (GH) sono stati gli impulsi associata negativamente con neuropeptide Y (NPY), profili in liquido cerebrospinale (CSF) del terzo ventricolo di capre Shiba. Inoltre, mentre la maggior parte legumi erano coincidenti con GH GH-releasing hormone (GHRH) legumi, non vi era alcuna correlazione tra GH e la somatostatina (SRIF) i livelli. Il presente studio è stato eseguito per chiarire il rapporto tra gli impulsi di GH e questi livelli di neuropeptide nel liquido cerebrospinale quando estradiolo (1,0 mg / capo) è stata somministrata per via sottocutanea a capre ovariectomizzate. QCS e sono stati raccolti campioni di plasma ogni 15 min per 18 h (da 6 h prima di 12 ore dopo l'iniezione). livelli di GH nel sangue periferico e GHRH, SRIF e dei livelli di NPY nel liquido cerebrospinale sono stati misurati con metodo radioimmunologico. Pulse / caratteristiche di valle e le correlazioni sono state valutate mediante l'algoritmo di ULTRA e l'analisi cross-correlazione. Prima di estradiolo è stato iniettato, una coincidenza significativa è stata trovata tra gli impulsi GHRH e legumi GH, e la coincidenza negativa è stata trovata tra depressioni NPY e legumi GH. Da sei a 12 ore dopo l'iniezione di estradiolo, l'ampiezza e l'area sotto la curva (AUC) degli impulsi GH sono state sensibilmente incrementate. La durata e l'AUC degli impulsi GHRH nel QCS sono state anche aumentate, e più forte di GHRH sincronia con GH è stato osservato. Al contrario, la linea di base di NPY era significativamente diminuito, e la correlazione negativa tra gli impulsi di GH e bassi NPY scomparso. I parametri delle depressioni SRIF non erano chiaramente cambiato. Queste osservazioni suggeriscono che gli estrogeni aumenta il pattern di secrezione del GH nella capra attraverso la valorizzazione di legumi GHRH e la diminuzione dei livelli di NPY

22: Somvanshi RK, War SA, Chaudhari N, Qiu X, Kumar U.

### **Receptor specific crosstalk and modulation of signaling upon heterodimerization between $\beta(1)$ -adrenergic receptor and somatostatin receptor-5.**

Cell Signal. 2011 May;23(5):794-811.

In the present study we describe heterodimerization, trafficking, coupling to adenylyl cyclase and signaling in HEK-293 cells cotransfected with human-somatostatin receptor 5 (hSSTR5) and  $\beta(1)$ -adrenergic receptor ( $\beta(1)$ AR). hSSTR5/ $\beta(1)$ AR exists as heterodimers in basal conditions which was further enhanced upon synergistic activation of both receptors. Activation of either  $\beta(1)$ AR or hSSTR5 displayed dissociation of heterodimerization. In cotransfectants,  $\beta(1)$ AR effect on cAMP was predominant; however, blocking  $\beta(1)$ AR with antagonist resulted in 60% inhibition of forskolin-stimulated cAMP in the presence of hSSTR5 agonists. cAMP/PKA pathway in cotransfected cells was regulated in receptor-specific manner, in contrast, the status of pERK1/2 and pPI3K/AKT was predominantly regulated by hSSTR5. The expression levels of phosphorylated NFAT remained unchanged indicating blockade of calcineurin-mediated dephosphorylation and nuclear translocation of NFAT, the process predominantly regulated by pJNK in SSTR5 dependent manner. Taken together, the functional consequences of results described here might have relevance in the cardiovascular system where SSTR and AR subtypes play important roles.

### **Interferenza specifica del recettore e modulazione del segnale sulla eterodimerizzazione tra il recettore $\beta(1)$ -adrenergico e il recettore 5 della somatostatina**

Nel presente lavoro si descrive eterodimerizzazione, il traffico, giunto a cicli cicli e di segnalazione in cellule HEK-293 cotransfected con il recettore umano della somatostatina-5 (hSSTR5) e  $\beta(1)$  recettore-adrenergico ( $\beta(1)$  AR). hSSTR5 /  $\beta(1)$  AR esiste come eterodimeri in condizioni basali che è stato ulteriormente potenziato in seguito ad attivazione sinergica di entrambi i recettori. Attivazione di una (1)  $\beta$  AR o hSSTR5 dissociazione visualizzati di eterodimerizzazione.

In cotransfectants,  $\beta$  (1) effetto AR al campo era predominante, tuttavia, il blocco  $\beta$  (1) AR con antagonista è tradotto in 60% di inibizione della forskolina-cAMP stimolata in presenza di hSSTR5 agonisti. cAMP / PKA percorso nelle cellule cotransfected è stato regolamentato in modo specifico recettore, al contrario, lo status di pERK1 / 2 e pPI3K/AKT era regolato prevalentemente hSSTR5. I livelli di espressione di NFAT fosforilata è rimasta inalterata dimostrando blocco di defosforilazione calcineurina-mediata e traslocazione nucleare di NFAT, il processo regolato prevalentemente pJNK in modo SSTR5 dipendente. Nel loro insieme, le conseguenze funzionali di risultati qui descritti potrebbe avere rilevanza nel sistema cardiovascolare, dove sottotipi SSTR e AR giocano ruoli importanti.

23) Tripp A, Kota RS, Lewis DA, Sibille E

### **Reduced somatostatin in subgenual anterior cingulate cortex in major depression.**

Neurobiol Dis. 2011 Apr;42(1):116-24.

Department of Psychiatry, University of Pittsburgh, PA 15312, USA.

Converging evidence suggests a central role for dysfunction of the subgenual anterior cingulate cortex (sgACC) in the pathophysiology of major depressive disorder (MDD). Underlying mechanisms may include altered GABAergic function. Expression of somatostatin (SST), an inhibitory neuropeptide localized to a subset of GABA neurons, has been shown to be lower in the dorsolateral prefrontal cortex of male MDD subjects. Here, to investigate whether alterations in SST may contribute to sgACC dysfunction in MDD, and whether the alterations display sex-specificity, we measured sgACC SST at the mRNA and precursor peptide levels in a large cohort of subjects with MDD. SST mRNA levels were analyzed by quantitative PCR (qPCR) in the postmortem sgACC from male (n=26) and female (n=25) subjects with MDD and sex-matched subjects with no psychiatric diagnosis (n=51). Prepro-SST protein levels were assessed in a subset of subjects (n=42 pairs) by semi-quantitative Western blot. The mRNA expression of SST was significantly reduced by 38% in female subjects and by 27% in male subjects with MDD. The characteristic age-related decline in SST expression was observed in control (Pearson  $R=-0.357$ ,  $p=0.005$ ) but not MDD ( $R=-0.104$ ,  $p=0.234$ ) subjects, as low expression was detected across ages in MDD subjects. Protein expression was similarly reduced by 19% in both MDD groups, and findings were more robust in female ( $p=0.0056$ ) than in males ( $p=0.0373$ ) compared to respective controls. In conclusion, low SST represents a robust pathological finding in MDD. Specifically, alterations in SST signaling and/or SST-bearing GABA neurons may represent a critical pathophysiological entity that contributes to sgACC dysfunction and that matches to the high female vulnerability to develop MDD.

### **Somatostatina ridotta nella corteccia cingolata anteriore nella patologia depressiva**

Elementi di prova convergenti suggeriscono un ruolo centrale per la disfunzione della corteccia cingolata anteriore subgenual (sgACC) nella patofisiologia del disturbo depressivo maggiore (MDD). Meccanismi che possono includere alterata funzione GABAergica. Espressione della somatostatina (SST), un neuropeptide inibitorio localizzato a un sottoinsieme di neuroni GABA, ha dimostrato di essere più basso nella corteccia prefrontale dorsolaterale di soggetti maschi MDD. Qui, per verificare se le alterazioni in SST può contribuire alla disfunzione sgACC in MDD, e se le alterazioni display sesso-specificità, abbiamo misurato sgACC SST presso l'mRNA e livelli di peptide precursore in un'ampia coorte di soggetti con disturbo depressivo maggiore. SST livelli di mRNA sono stati analizzati mediante PCR quantitativa (qPCR) nel post-mortem sgACC da maschi (n = 26) e femminile (n = 25) soggetti con disturbo depressivo maggiore e sesso soggetti senza diagnosi psichiatrica (n = 51). Livelli di proteina prepro-SST sono state valutate in un sottogruppo di soggetti (n = 42 coppie) da semi-quantitativa Western Blot. L'espressione di mRNA di SST è stata significativamente ridotta del 38% nei soggetti di sesso femminile e del 27% nei soggetti di sesso maschile con MDD. Il declino caratteristico legato all'età espressione SST è stata osservata nel controllo (Pearson R = -0,357, p = 0,005) ma non MDD (r = -0,104, p = 0,234) dei soggetti, come espressione basso è stato rilevato attraverso le età in soggetti MDD. Espressione della proteina è stata analogamente ridotto del 19% in entrambi i gruppi MDD, ed i risultati sono stati più robusti di sesso femminile (p = 0,0056 mila) rispetto ai maschi (p = 0,0373 mila) rispetto ai rispettivi controlli. In conclusione, SST bassa rappresenta un reperto patologico in robusto MDD. In particolare, le alterazioni in SST segnalazione e / o SST-cuscinetto neuroni GABA può rappresentare un soggetto critico fisiopatologico che contribuisce alla disfunzione sgACC e che corrisponde alla elevata vulnerabilità femminile per lo sviluppo MDD.

24: Tepper JM, Tecuapetla F, Koós T, Ibáñez-Sandoval O.

### **Heterogeneity and diversity of striatal GABAergic interneurons.**

Front Neuroanat. 2010 Dec 29;4:150.

Center for Molecular and Behavioral Neuroscience, Rutgers University Newark, NJ, USA.

The canonical view of striatal GABAergic interneurons has evolved over several decades of neuroanatomical/neurochemical and electrophysiological studies. From the anatomical studies, three distinct GABAergic interneuronal subtypes are generally recognized. The best-studied subtype expresses the calcium-binding protein, parvalbumin. The second best known interneuron type expresses a number of neuropeptides and enzymes, including neuropeptide Y, somatostatin, and nitric oxide synthase. The last GABAergic interneuron subtype expresses the calcium binding protein, calretinin. There is no overlap or co-localization of these three different sets of markers. The parvalbumin-immunoreactive GABAergic interneurons have been recorded in vitro and shown to exhibit a fast-spiking phenotype characterized by short duration action potentials with large and rapid spike AHPs. They often fire in a stuttering pattern of high frequency firing interrupted by periods of silence. They are capable of sustained firing rates of over 200Hz. The NPY/SOM/NOS interneurons have been identified as PLTS cells, exhibiting very high input resistances, low threshold spike and prolonged plateau potentials in response to intracellular depolarization or excitatory synaptic stimulation. Thus far, no recordings from identified CR interneurons have been obtained. Recent advances in technological approaches, most notably the generation of several BAC transgenic mouse strains which express a fluorescent marker, enhanced green fluorescent protein, specifically and selectively only in neurons of a certain genetic makeup (e.g., parvalbumin-, neuropeptide Y-, or tyrosine hydroxylase-expressing neurons etc.) have led to the ability of electrophysiologists to visualize and patch specific neuron types in brain slices with epifluorescence illumination. This has led to a rapid expansion of the number of neurochemically and/or

electrophysiologically identified interneuronal cell types in the striatum and elsewhere. This article will review the anatomy, neurochemistry, electrophysiology, synaptic connections, and function of the three "classic" striatal GABAergic interneurons as well as more recent data derived from in vitro recordings from BAC transgenic mice as well as recent in vivo data.

### **Eterogeneità e diversità degli interneuroni GABAergici striatali**

Il punto di vista canonico di interneuroni GABAergici striatali è evoluto nel corso di vari decenni neuroanatomici / neurochimici e studi elettrofisiologici. Dai primi studi anatomici, tre distinti sottotipi GABAergici interneuronali sono generalmente riconosciuti. Il sottotipo più studiato esprime la proteina legante il calcio, parvalbumina. Il tipo di interneurone secondo posto esprime una serie di neuropeptidi e degli enzimi, tra cui neuropeptide Y, la somatostatina, e ossido nitrico sintetasi. L'ultimo sottotipo interneurone GABAergici esprime la proteina legante il calcio, calretinina. Non vi è alcuna sovrapposizione o co-localizzazione di queste tre diverse serie di marcatori. Il interneuroni parvalbumin-immunoreactive GABAergici sono stati registrati in vitro e dimostrato che mostra un fenotipo fast-spike caratterizzato da potenziali d'azione a breve durata con AHP Spike ampie e rapide. Spesso il fuoco in un modello di balbuzie di cottura ad alta frequenza interrotta da periodi di silenzio. Sono capaci di sparare sostenuti tassi di oltre 200 Hz. L'NPY / SOM / interneuroni NOS sono stati identificati come cellule PLTS, esibendo resistenze di ingresso molto alta, punta a bassa soglia e le potenzialità plateau prolungato in risposta alla depolarizzazione intracellulari o stimolazione sinaptica eccitatoria. Finora, nessun registrazioni da interneuroni CR identificati sono stati ottenuti. I recenti progressi nel approcci tecnologici, in particolare la generazione di diversi ceppi di topi transgenici che esprimono BAC un marcatore fluorescente, rafforzata proteina fluorescente verde, specificamente e selettivamente solo nei neuroni di un trucco certo genetica (ad esempio, parvalbumina-, neuropeptide Y, o tirosina idrossilasi-neuroni che esprimono ecc) hanno portato alla capacità di elettrofisiologi di visualizzare e patch specifici tipi di neuroni in fettine di cervello con illuminazione epifluorescenza. Questo ha portato ad una rapida espansione del numero di neurochimico e / o elettrofisiologicamente identificato interneuronali tipi di cellule nel corpo striato e altrove. Questo articolo esaminerà l'anatomia, la neurochimica, elettrofisiologia, connessioni sinaptiche, e la funzione delle tre "classiche" interneuroni GABAergici striatali, nonché i dati più recenti provenienti da registrazioni in vitro da topi transgenici BAC sia le recenti dati in vivo.

25) Sibille E, Morris HM, Kota RS, Lewis DA.

**GABA-related transcripts in the dorsolateral prefrontal cortex in mood disorders.**

Int J Neuropsychopharmacol. 2011 Jan 13:1-14. [Epub ahead of print]

Department of Psychiatry, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA, USA.

Reduced cortical  $\hat{\Gamma}$ -aminobutyric acid (GABA) levels and altered markers for subpopulations of GABA interneurons have been reported in major depressive disorder (MDD) by in-vivo brain imaging and post-mortem histological studies. Subgroups of GABA interneurons exert differential inhibitory control on principal pyramidal neurons and can be identified based on the non-overlapping expression of the calcium-binding proteins parvalbumin (PV) or calretinin (CR) or the neuropeptide somatostatin (SST). As altered markers of GABAergic functions may also be present in bipolar disorder (BPD), the specificity of particular GABA-related molecular deficits in mood disorders is not known. We used real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) to assess expression levels of two GABA synthesizing enzymes (glutamate decarboxylase; GAD65 and GAD67) and of three markers of GABA neuron subpopulations (PV, CR, SST) in the dorsolateral prefrontal cortex (DLPFC; Brodmann area 9) in triads (n=19) of control subjects and matched subjects with BPD or MDD. BPD subjects demonstrated significantly reduced PV mRNA, trend level reduction in SST mRNA and no alterations in GAD67, GAD65, or CR mRNA levels; MDD subjects demonstrated reduced SST mRNA expression without alterations in the other transcripts. The characteristic age-related decline in SST expression was not observed in MDD, as low expression was detected across age in MDD subjects. After controlling for age, MDD subjects demonstrated significantly reduced SST mRNA expression. Decreased SST levels in MDD were confirmed at the protein precursor level. Results were not explained by other clinical, demographic or technical parameters. In summary, MDD was characterized by low DLPFC SST, whereas decreased PV mRNA appears to distinguish BPD from MDD.

**Trascritti legati al GABA nella corteccia prefrontale dorsolaterale nei disordini comportamentali**

Ridotta corticale  $\hat{I}^3$  acido-aminobutirrico (GABA) e livelli di marcatori alterati per le sottopopolazioni di interneuroni GABA sono stati riportati nel disturbo depressivo maggiore (MDD) di imaging cerebrale in vivo e studi istologici post-mortem. Sottogruppi di interneuroni GABA esercitare un controllo inibitorio differenziale sui principali neuroni piramidali e possono essere identificate in base all'espressione di non sovrapposizione tra il parvalbumina proteine leganti il calcio (PV) o calretinina (CR) o il neuropeptide somatostatina (SST). Come marcatori delle funzioni alterate GABAergici possono essere presenti anche nel disturbo bipolare (BPD), la specificità di particolari deficit di GABA-molecolari legati a disturbi dell'umore non è noto. Abbiamo usato in tempo reale quantitativo di reazione a catena della polimerasi (qPCR) per valutare i livelli di espressione dei due enzimi GABA sintetizzare (glutammato decarbossilasi, GAD65 e GAD67) e di tre marcatori delle sottopopolazioni di neuroni GABA (PV, CR, SST) nella corteccia prefrontale dorsolaterale (DLPFC; area di Brodmann 9) in triadi (n = 19) dei soggetti di controllo e abbinati soggetti con disturbo borderline o MDD. Soggetti BPD dimostrato significativamente ridotto PV mRNA, riduzione del livello di trend in SST mRNA e senza alterazioni di GAD67, GAD65, o CR livelli di mRNA; soggetti MDD dimostrato SST ridotta espressione di mRNA senza alterazioni nelle trascrizioni altri. Il declino caratteristico legato all'età espressione SST non è stato osservato in MDD, come espressione basso è stato rilevato attraverso l'età in soggetti MDD. Dopo aggiustamento per età, i soggetti MDD dimostrato significativamente ridotto SST espressione di mRNA. Diminuzione dei livelli SST in MDD sono stati confermati a livello di proteina precursore. I risultati non sono stati spiegati da altri parametri clinici, demografici e tecnici. In sintesi, MDD è stata caratterizzata da una bassa DLPFC SST, mentre è diminuita PV mRNA sembra distinguere BPD da MDD.

26) Li D, Tanaka M, Brunicardi FC, Fisher WE, Gibbs RA, Gingras MC.

**Association between somatostatin receptor 5 gene polymorphisms and pancreatic cancer risk and survival.**

Cancer. 2011 Jan 10. [Epub ahead of print]

Department of Gastrointestinal Medical Oncology, The University of Texas MD Anderson Cancer Center, Houston, Texas.

**BACKGROUND:** Somatostatin (SST) inhibited cell proliferation and negatively regulated the release of growth hormones by means of specific receptors (SSTR). Genetic variation in SSTR had been associated with risk of human cancers but had never been investigated in pancreatic cancer.

**METHODS:** In this retrospective study the SSTR5 gene in paired tumor and blood samples from 33 pancreatic adenocarcinoma patients using the Sanger method were sequenced. Three single nucleotide polymorphisms (SNPs) in samples from 863 patients with pancreatic ductal adenocarcinoma and 876 healthy controls using the TaqMan method were analyzed. The associations between gene polymorphisms and pancreatic cancer risk and survival were analyzed by multivariate logistic regression and Cox proportional hazard models, respectively.

**RESULTS:** No somatic mutations were identified, but 3 nonsynonymous SSTR5 SNPs (P109S, L48M, and P335L) in pancreatic tumors were identified. The SSTR5 P109S variant allele was associated with a 1.62-fold increased risk of pancreatic cancer (95% confidence interval [CI]: 1.08-2.43, P = 0.019). Furthermore, the SSTR5 L48M AC variant and smoking had a joint effect on pancreatic cancer risk (p(interaction) = 0.035). The odds ratios (95% confidence intervals) were 0.58 (0.34-0.97), 1.49 (1.18-1.89), and 2.27 (1.35-3.83) for the variant genotype alone, smoking alone, and both factors, respectively, compared with no factors. Finally, SSTR5 P335L CC and P109S CC combined were associated with lower overall survival durations in patients with resectable disease.

**CONCLUSIONS:** These data suggest that SSTR5 genetic variants play a role in pancreatic cancer development and progression. Cancer 2011. © 2011 American Cancer Society.

## **Associazione tra i polimorfismi del gene del recettore 5 della somatostatina e il rischio di sviluppo di cancro pancreatico e sopravvivenza**

**BACKGROUND:** La somatostatina (SST) ha inibito la proliferazione cellulare e regolato negativamente il rilascio di ormoni della crescita per mezzo di recettori specifici (SSTR). Variazione genetica in SSTR era stato associato al rischio di tumori umani ma non era mai stato indagato nel cancro del pancreas.

**METODI:** In questo studio retrospettivo il gene SSTR5 nel tumore associati e campioni di sangue di 33 pazienti con adenocarcinoma pancreatico con il metodo Sanger sono stati sequenziati. Tre polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) nei campioni di 863 pazienti con adenocarcinoma pancreatico duttale e 876 controlli sani con il metodo TaqMan sono stati analizzati. Le associazioni tra polimorfismi genici e rischio di cancro pancreatico e la sopravvivenza sono stati analizzati mediante regressione logistica multivariata e modelli di rischio proporzionale di Cox, rispettivamente.

**RISULTATI:** No mutazioni somatiche sono state identificate, ma 3 nonsynonymous SSTR5 SNPs (P109S, L48M, e P335L) nei tumori del pancreas sono stati identicati. La variante SSTR5 P109S allele è stato associato con un rischio 1,62 volte maggiore di cancro al pancreas (95% intervallo di confidenza [CI]: 1,08-2,43,  $p = 0,019$ ). Inoltre, l'AC SSTR5 L48M variante e il fumo avevano un effetto congiunto sul rischio di cancro del pancreas ( $p$  (interazione) = 0,035). L'odds ratio (95% intervallo di confidenza) sono stati pari a 0,58 (0,34-0,97), 1,49 (1,18-1,89) e 2,27 (1,35-3,83) per il genotipo variante solo, fumando solo, e entrambi i fattori, rispettivamente, rispetto all'assenza di fattori. Infine, SSTR5 P335L CC e CC P109S combinati sono stati associati ad una minore durata della sopravvivenza globale nei pazienti con malattia resecabile.

**CONCLUSIONI:** Questi dati suggeriscono che varianti genetiche SSTR5 svolgere un ruolo nello sviluppo del cancro pancreatico e la progressione

27) Kukwa W, Andrysiak R, Kukwa A, Hubalewska-Dydejczyk A, Gronkiewicz Z, Wojtowicz P, Krolicki L, Wierzchowski W, Grochowski T, Czarnecka AM.

**(99m)TC-octreotide scintigraphy and somatostatin receptor subtype expression in juvenile nasopharyngeal angiofibromas.**

Head Neck. 2011 Jan 10. [Epub ahead of print]

Department of Otolaryngology, Czerniakowski Hospital, Medical University of Warsaw, Warsaw, Poland.

**BACKGROUND:** The main goal of the study was the analysis of somatostatin receptor (SSTR) expression on juvenile nasopharyngeal angiofibroma (JNA) cells and a subsequent analysis of the utility of SST analog-based scintigraphy in JNA diagnostics.

**METHODS:** Nine JNA cases were analyzed. All tissue samples were analyzed for the expression of SSTRs. In 2 cases, scintigraphy was performed after the intravenous (IV) administration of an SST analog. MRI of the craniofacial region was subsequently performed.

**RESULTS:** The SST analogues were accumulated in areas matching pathologic tissue in the nasopharynx. Immunohistochemical evaluation of the tissue samples proved the overexpression of SSTRs.

**CONCLUSIONS:** SSTRs are overexpressed on JNA cells. The SST analog (99m)TC-octreotide is effectively bound to JNA cells. SST analogues might be used in the diagnostics and treatment of primary, recurrent, or residual JNA. © 2011 Wiley Periodicals, Inc. Head Neck, 2011.

**Scintigrafia con (99m)TC-octreotide ed espressione dei sottotipi del recettore della somatostatina negli angiofibromi nasofaringei giovanili**

**BACKGROUND:** L'obiettivo principale dello studio era l'analisi dei recettori per la somatostatina (SSTR) espressione giovanile angiofibroma nasofaringeo (JNA), le cellule e di una successiva analisi del programma di utilità della scintigrafia SST analogica basata sulla diagnostica JNA. **METODI:** JNA Nove casi sono stati analizzati. Tutti i campioni di tessuto sono stati analizzati per

l'espressione di SSTRs. In 2 casi, la scintigrafia è stata eseguita dopo la somministrazione endovenosa (IV) la somministrazione di un analogo SST. RM della regione cranio-facciale è stato effettuato poi.

**RISULTATI:** Gli analoghi SST sono stati accumulati in aree corrispondenti tessuto patologico nel nasofaringe. Valutazione immunistoichimica di campioni di tessuto dimostrato la sovraespressione di SSTRs.

**CONCLUSIONI:** SSTRs sono sovraespressi sulle cellule JNA. L'analogo SST (99m) TC-octreotide è effettivamente legato alle cellule JNA. SST analoghi potrebbero essere utilizzate nella diagnostica e nel trattamento di JNA primario, ricorrenti o residui.

28) Neggers SJ, de Herder WW, Feelders RA, van der Lely AJ.

**Conversion of daily pegvisomant to weekly pegvisomant combined with long-acting somatostatin analogs, in controlled acromegaly patients.**

Pituitary. 2011 Jan 8.

Department of Medicine, Erasmus University Medical Center Rotterdam, PO box 2040, 3000 CA, Rotterdam, The Netherlands, s.neggers@erasmusmc.nl.

The efficacy of combined treatment in active acromegaly with both long-acting somatostatin analogs (SRIF) and pegvisomant (PEG-V) has been well established. The aim was to describe the PEG-V dose reductions after the conversion from daily PEG-V to combination treatment. To clarify the individual beneficial and adverse effects, in two acromegaly patients, who only normalized their insulin like growth factor (IGF-I) levels with high-dose pegvisomant therapy. We present two cases of a 31 and 44 years old male with gigantism and acromegaly that were controlled subsequently by surgery, radiotherapy, SRIF analogs and daily PEG-V treatment. They were converted to combined treatment of monthly SSA and (twice) weekly PEG-V. High dose SSA treatment was added while the PEG-V dose was decreased during careful monitoring of the IGF-I. After switching from PEG-V monotherapy to SRIF analogs plus pegvisomant combination therapy IGF-I remained normal. However, the necessary PEG-V dose, to normalize IGF-I differed significantly between these two patients. One patient needed twice weekly 100 mg, the second needed 60 mg once weekly on top of their monthly lanreotide Autosolution injections of 120 mg. The weekly dose reduction was 80 and 150 mg. After the introducing of lanreotide, fasting glucose and glycosylated haemoglobin concentrations increased. Diabetic medication had to be introduced or increased. No changes in liver tests or in pituitary adenoma size were observed. In these two patients, PEG-V in combination with long-acting SRIF analogs was as effective as PEG-V monotherapy in normalizing IGF-I levels, although significant dose-reductions in PEG-V could be achieved. However, there seems to be a wide variation in the reduction of PEG-V dose, which can be obtained after conversion to combined treatment.

## **Conversione dall'assunzione di pegvisomant giornaliera a settimanale combinata agli analoghi della somatostatina alunga azione in pazienti con acromegalia**

L'efficacia del trattamento combinato in acromegalia attiva sia con analoghi della somatostatina long-acting (SRIF) e pegvisomant (PEG-V) è stata ben stabilita. L'obiettivo era quello di descrivere le riduzioni di dose PEG-V, dopo la conversione dal quotidiano PEG-V al trattamento di associazione. Per chiarire i singoli effetti positivi e negativi, in due pazienti con acromegalia, che solo normalizzato l'insulina come fattore di crescita (IGF-I) livelli con pegvisomant terapia ad alte dosi. Presentiamo due casi di 31 anni, un maschio e 44 al gigantismo e acromegalia che sono stati controllati successivamente dalla chirurgia, radioterapia, analoghi della SRIF e trattamento quotidiano PEG-V. Essi sono stati convertiti in trattamento combinato di SSA e mensile (due volte) con cadenza settimanale PEG-V. Alte dosi di SSA trattamento è stato aggiunto mentre la dose di PEG-V è stata ridotta durante il monitoraggio carful del IGF-I. Dopo il passaggio dalla monoterapia con PEG-V per analoghi SRIF più pegvisomant terapia di combinazione di IGF-I sono rimasti normali. Tuttavia, la dose necessaria PEG-V, per normalizzare l'IGF-I differiva significativamente tra i due pazienti. Un paziente ha bisogno di due volte a settimana 100 mg, la seconda necessari 60 mg una volta alla settimana in cima alla loro iniezioni mensili Autosolution lanreotide di 120 mg. La riduzione della dose settimanale era di 80 e 150 mg. Dopo l'introduzione di lanreotide, glicemia a digiuno e le concentrazioni di emoglobina glicosilata aumentato. Farmaci per diabetici dovevano essere introdotti o aumentati. Nessun cambiamento nelle prove di fegato o di dimensioni adenoma pituitario sono state osservate. In questi due pazienti, PEG-V, in combinazione con gli analoghi a lunga azione della SRIF è risultato efficace in monoterapia con PEG-V nel normalizzare i livelli di IGF-I, anche se significativa riduzione della dose di PEG-V potrebbe essere realizzato. Tuttavia, sembra che ci sia una grande variabilità nella riduzione della dose di PEG-V, che può essere ottenuto dopo la conversione al trattamento combinato.

29: Kubota Y, Shigematsu N, Karube F, Sekigawa A, Kato S, Yamaguchi N, Hirai Y, Morishima M, Kawaguchi Y.

**Selective Coexpression of Multiple Chemical Markers Defines Discrete Populations of Neocortical GABAergic Neurons.**

Cereb Cortex. 2011 Jan 10. [Epub ahead of print]

Division of Cerebral Circuitry, National Institute for Physiological Sciences, Okazaki 444-8787, Japan.

Whether neocortical  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) cells are composed of a limited number of distinct classes of neuron, or whether they are continuously differentiated with much higher diversity, remains a contentious issue for the field. Most GABA cells of rat frontal cortex have at least 1 of 6 chemical markers (parvalbumin, calretinin, alpha-actinin-2, somatostatin, vasoactive intestinal polypeptide, and cholecystokinin), with each chemical class comprising several distinct neuronal subtypes having specific physiological and morphological characteristics. To better clarify GABAergic neuron diversity, we assessed the colocalization of these 6 chemical markers with corticotropin-releasing factor (CRF), neuropeptide Y (NPY), the substance P receptor (SPR), and nitric oxide synthase (NOS); these 4 additional chemical markers suggested to be expressed diversely or specifically among cortical GABA cells. We further correlated morphological and physiological characteristics of identified some chemical subclasses of inhibitory neurons. Our results reveal expression specificity of CRF, NPY, SPR, and NOS in morphologically and physiologically distinct interneuron classes. These observations support the existence of a limited number of functionally distinct subtypes of GABA cells in the neocortex.

**Coespressione selettiva di marker chimici multipli che determinano discrete popolazioni di neuroni neocorticali GABAergici**

Sia neocorticale acido  $\gamma$ -aminobutirrico (GABA), le cellule sono composte da un numero limitato di classi distinte di neuroni, o se sono continuamente differenziati con la diversità molto più elevati, rimane una questione controversa per il campo. La maggior parte delle cellule del GABA cortecchia

frontale di ratto hanno almeno 1 di 6 marcatori chimici (parvalbumina, calretinina, alfa-actinina-2, la somatostatina, polipeptide intestinale vasoattivo e colecistochinina), con ogni classe chimica che comprende diversi sottotipi neuronali distinti aventi specifiche fisiologici e morfologici caratteristiche. Per meglio chiarire la diversità dei neuroni GABAergici, abbiamo valutato la colocalizzazione di questi 6 marcatori chimici con fattore di rilascio della corticotropina (CRF), neuropeptide Y (NPY), la sostanza P recettore (SPR), e di ossido nitrico sintasi (NOS); questi 4 supplementari marcatori chimici suggerito di essere espressa diversamente o specificatamente tra cellule corticali GABA. Abbiamo altre caratteristiche morfologiche e fisiologiche correlate individuato alcune sottoclassi di chimica dei neuroni inibitori. I nostri risultati rivelano specificità espressione di CRF, NPY, SPR, e NOS in morfologicamente e fisiologicamente interneurone classi distinte. Queste osservazioni supportano l'esistenza di un numero limitato di funzionalmente distinti sottotipi di cellule GABA nella neocorteccia.

30) Feng WM, Bao Y, Fei MY, Tang CW, Wang Y, Chai ZZ, Qin LJ, Huang SX.

**[Dual regulation effect of somatostatin on immunity in patients with severe sepsis caused by abdominal diseases].**

[Article in Chinese]

Zhonghua Wai Ke Za Zhi. 2010 Nov 15;48(22):1743-6.

Department of Hepatobiliary Surgery, First Affiliated Hospital of Huzhou Normal School, Huzhou 313000, China. d\_fengwm@sina.com

**OBJECTIVE:** to investigate the effect of somatostatin on inflammatory immune disorders and prognosis in patients with severe sepsis caused by abdominal diseases.

**METHODS:** fifty-three patients with severe abdominal sepsis (age > 18 years, APACHE-II score > 15) from June 2005 to June 2009 were randomly divided into Somatostatin group (n = 23) and SSC Group (n = 30). Fifteen healthy volunteers of the same age range were chosen as Control group. The SSC group was treated with classical SSC therapy, and the Somatostatin Group was treated with the same regime plus 14-peptide somatostatin continuous infusion at the dose of 6 mg/24 h for 7 days. The serum levels of interleukin-10 (IL-10), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) were determined by using ELISA. CD(4)(+), CD(8)(+) T cell subsets were determined by fluorescence activated cell sorter(FACS) and CD(4)(+)/CD(8)(+) was calculated. APACHE-II score was observed on admission (d1) and day 3, 7 and 14 after treatment. Morality rates in 28 days in two groups were recorded.

**RESULTS:** compared with Control group, IL-10 and TNF- $\alpha$  levels were significantly elevated in patients with severe abdominal sepsis ( $P < 0.05$ ), while CD(4)(+), CD(8)(+) T cell and CD(4)(+)/CD(8)(+) decreased significantly ( $P < 0.05$ ). Compared with the Somatostatin group CD(4)(+), CD(8)(+) T cell and CD(4)(+)/CD(8)(+) on d7 and d14 in SSC Group were significantly increased ( $P < 0.05$ ), while IL-10 and TNF- $\alpha$  decreased significantly( $P < 0.05$ ). APACHE-II scores on d3, d7, d14 of Somatostatin group were significantly lower than those of SSC group, and 28 d mortality rate also declined.

**CONCLUSIONS:** in patients with severe abdominal sepsis, systemic inflammatory response and immune suppression exist simultaneously. Somatostatin has a dual immunomodulatory activity in these patients.

**[Effetto regolatorio duplice della somatostatina sull'immunità in pazienti con sepsi severa causata da patologie addominali]**

**OBIETTIVO:** indagare l'effetto della somatostatina sulle malattie infiammatorie immunitario e la prognosi in pazienti con sepsi grave causata da malattie addominali. **METODI:** cinquantatré pazienti con grave sepsi addominale (età > 18 anni, punteggio APACHE II > 15) dal giugno 2005 al giugno 2009 sono stati divisi a caso in gruppo somatostatina (n = 23) e SSC gruppo (n = 30). Quindici volontari sani della stessa fascia di età sono stati scelti come gruppo di controllo. Il gruppo SSC è stato trattato con la terapia classica SSC, e il Gruppo Somatostatina è stato trattato con lo stesso regime di infusione più somatostatina 14-peptide continua alla dose di 6 mg/24 h per 7 giorni. I livelli sierici di interleuchina-10 (IL-10), fattore di necrosi tumorale- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) sono stati determinati tramite ELISA. CD (4 CD )(+), (8) (+) sottopopolazioni di cellule T sono stati determinati da cell sorter fluorescenza attivato (FACS) e CD (4 CD )(+)/(8) (+) è stata calcolata (+). Punteggio APACHE II è stato osservato al momento del ricovero (D1) e il giorno 3, 7 e 14 dopo il trattamento. Tassi di mortalità in 28 giorni in due gruppi sono stati registrati. **RISULTATI:** rispetto al gruppo di controllo, IL-10 e dei livelli di TNF- $\alpha$  sono risultati significativamente elevati nei pazienti con grave sepsi addominale (P <0,05), mentre il CD (4 )(+), CD (8) (+) delle cellule T e CD (4 CD )(+)/(8) (+) è diminuita significativamente (P <0,05). Rispetto al CD del gruppo Somatostatina (4 CD )(+), (8) (+) delle cellule T e CD (4 CD )(+)/(8) (+) su D7 e D14 in SSC gruppo sono aumentate significativamente (P <0,05), mentre IL-10 e TNF- $\alpha$  è diminuita significativamente (P <0,05). Punteggio APACHE-II sulla D3, D7, D14 del gruppo somatostatina erano notevolmente inferiori a quelli del gruppo SSC, e 28 d tasso di mortalità sono diminuiti.

In conclusione, nei pazienti con grave sepsi addominale, da risposta infiammatoria sistemica e soppressione immunitaria esistere simultaneamente. La somatostatina ha una duplice attività immunomodulante in questi pazienti.

## VITAMINA C

11: Grimm S, Mvondo D, Grune T, Breusing N.

**The outcome of 5-ALA-mediated photodynamic treatment in melanoma cells is influenced by vitamin C and heme oxygenase-1.**

Biofactors. 2010 Nov 11. [Epub ahead of print] PubMed PMID:21072787.

Photodynamic therapy (PDT) is an important clinical approach for cancer treatment. It involves the administration of a photosensitizer, followed by its activation with light and induction of cell death. The underlying mechanism is an increased production of reactive oxygen species (ROS) leading to oxidative stress, which is followed by cell death. However, effectiveness of PDT is limited due to an initiation of endogenous rescue response systems like heme oxygenase-1 (HO-1) in tumor cells. In recent years, consuming of antioxidant supplements has become widespread, but the effect of exogenously applied antioxidants on cancer therapy outcome remains unclear. Thus, this study was aimed to investigate if exogenous antioxidants might decrease ROS-induced cytotoxicity in photodynamic treatment. Lycopene,  $\beta$ -carotene, vitamin C, N-acetylcysteine, trolox, and N-tert-butyl- $\alpha$ -phenylnitron in different doses were administered to human melanoma cells prior exposure to photodynamic treatment. Supplementation with vitamin C resulted in a significant decrease of the cell death rate, whereas the other tested antioxidants had no effect on cell viability and oxidative stress markers. The simultaneous application of vitamin C with the HO-1 activity inhibitor zinc protoporphyrine IX (ZnPPIX) caused a considerable decrease of photodynamic treatment-induced cytotoxicity compared to ZnPPIX alone. It can be summarized that exogenously applied antioxidants do not have a leading role in the protective response against photodynamic treatment. However, further studies are necessary to investigate more antioxidants and other substances, which might affect the outcome of photodynamic treatment in cancer therapy.

**Il risultato di 5-ALA-mediata trattamento fotodinamico in cellule di melanoma è influenzato dalla vitamina C e da eme ossigenasi-1.**

La terapia fotodinamica (PDT) è un importante approccio clinico per il trattamento del cancro. Essa prevede la somministrazione di un fotosensibilizzante, seguito dalla sua attivazione con la luce e l'induzione di morte cellulare. Il meccanismo sottostante è un aumento della produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) che conduce a stress ossidativo, che è seguito da morte cellulare. Tuttavia, l'efficacia della PDT è limitata a causa di un avvio di sistemi endogeni di risposta salvare come eme ossigenasi-1 (HO-1) in cellule tumorali. Negli ultimi anni, consumando di integratori antiossidanti si è diffusa, ma l'effetto di antiossidanti esogenamente applicata sul risultato di terapia del cancro rimane poco chiaro. Pertanto, questo studio è stato finalizzato ad indagare se gli antiossidanti esogeni potrebbero diminuire ROS-indotta citotossicità in trattamento fotodinamica. Il licopene,  $\beta$ -carotene, vitamina C, N-acetilcisteina, Trolox, e N-ter-butyl- $\alpha$ -phenylnitronone in diverse dosi sono state somministrate a cellule di melanoma umano precedente esposizione a terapia fotodinamica. La supplementazione con vitamina C ha determinato una riduzione significativa del tasso di morte cellulare, mentre gli altri antiossidanti testati ha avuto effetto sulla vitalità cellulare e marcatori di stress ossidativo. L'applicazione simultanea di vitamina C con l'attività di HO-1 protoporphyrine IX inibitore di zinco (ZnPPIX) ha provocato una significativa diminuzione di terapia fotodinamica citotossicità indotta rispetto alla ZnPPIX solo. Esso può essere riassunto che gli antiossidanti esogeni applicate non hanno un ruolo di primo piano nella risposta protettiva contro il trattamento fotodinamica. Tuttavia, ulteriori studi sono necessari per indagare più antiossidanti e altre sostanze, che potrebbero influenzare l'esito della terapia fotodinamica nella terapia del cancro.

13: Lee SA, Lee KM, Lee SJ, Yoo KY, Park SK, Noh DY, Ahn SH, Kang D.

#### **Antioxidant vitamins intake, ataxia telangiectasia mutated (ATM) genetic polymorphisms, and breast cancer risk.**

Nutr Cancer. 2010 Nov;62(8):1087-94. PubMed PMID: 21058196.

Ataxia telangiectasia mutated (ATM) cells exist under a constant state of oxidative stress with high levels of reactive oxygen species, which are removed by cellular antioxidant vitamins. We investigated the independent and combined effect of antioxidant vitamins intake and the ATM genotype or diplotype on the breast cancer risk. Analyses included 323 cases and age-matched controls who participated in the Korean Breast Cancer Study during 2001-2003 with complete dietary information. The vitamin A ( $P < 0.01$ ) and  $\alpha$ -tocopherol ( $P < 0.01$ ) were associated with lower breast cancer risk as well as some water-soluble vitamins including vitamin B(2) ( $P = 0.01$ ), vitamin C ( $P < 0.01$ ), and folic acid ( $P = 0.02$ ) intake. No five single nucleotide polymorphisms (ATM-5144A > T (rs228589), IVS21 + 1049T > C (rs664677), IVS33-55T > C (rs664982), IVS34+60G > A (rs664143), and 3393T > G (rs4585)) studied showed significant differences in their allele frequencies between the cases and controls. On the other hand, compared with the diploid of ATTGT/ATTGT, as the number of ATTGT haplotype decreased, the risk of breast cancer increased ( $P = 0.04$ ). The association between ATM diplotype and the breast cancer risk was predominantly among women with low intake of antioxidant vitamins including vitamin A, vitamin C, and folic acid. This study suggested that some antioxidant vitamins intake may modify the effect of ATM diplotype on the breast cancer risk among Korean women.

#### **Assunzione di vitamine antiossidanti, polimorfismi genetici, sindrome ataxiatelangiectasia (ATM) e rischio di cancro al seno.**

L'ataxia telangiectasia mutata (ATM), le cellule esistono sotto un costante stato di stress ossidativo con alti livelli di specie reattive dell'ossigeno, che vengono rimossi con vitamine antiossidanti cellulari. Abbiamo studiato l'effetto indipendente e combinato di assunzione di vitamine antiossidanti e il genotipo ATM o diplotype sul rischio di cancro al seno. Analisi inclusi 323 casi e controlli di pari età che hanno partecipato alla coreana Breast Cancer Study durante il periodo 2001-2003 mediante complete informazioni dietetiche. La vitamina A ( $P < 0,01$ ) e  $\alpha$ -tocoferolo ( $P < 0,01$ ) sono stati associati al rischio di cancro al seno inferiore così come alcune vitamine idrosolubili tra cui la vitamina B (2) ( $P = 0,01$ ), la vitamina C ( $P < 0,01$ ), e acido folico ( $P = 0,02$ ) di aspirazione. N. cinque polimorfismi a singolo nucleotide (ATM-5144A> T (rs228589), IVS21 + 1049T> C (rs664677), IVS33-55T> C (rs664982), IVS34 60 G> A (rs664143), e 3393T> G (rs4585)) studiati hanno mostrato differenze significative nelle loro frequenze alleliche tra i casi ed i controlli. D'altra parte, rispetto al diplotype di ATTGT / ATTGT, come il numero di aplotipo ATTGT diminuito, il rischio di cancro al seno aumentato ( $p = 0,04$ ). L'associazione tra diplotype ATM e il rischio di cancro al seno era prevalentemente tra le donne con bassa assunzione di vitamine antiossidanti tra cui la vitamina A, vitamina C e acido folico. Questo studio ha suggerito che alcuni assunzione di vitamine antiossidanti può modificare l'effetto di diplotype ATM sul rischio del cancro della mammella tra le donne coreane.

15: Hutchinson J, Burley VJ, Greenwood DC, Thomas JD, Cade JE.

**High-dose vitamin C supplement use is associated with self-reported histories of breast cancer and other illnesses in the UK Women's Cohort Study.**

Public Health Nutr. 2010 Oct

29:1-10. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 21029507.

**OBJECTIVE:** To determine whether frequent vitamin C supplement use is associated with healthier behaviours, and a history of cancer and other illnesses in UK women.

**DESIGN:** The present cross-sectional analysis examines the odds of taking supplements containing vitamin C as recorded in 4 d food diaries, based on lifestyle characteristics and morbidity history self-reported by questionnaire.

**SETTING:** A large national UK cohort study.

**SUBJECTS:** A total of 12 453 women aged between 37 and 79 years.

**RESULTS:** Women frequently taking supplements containing vitamin C, compared to those who did not, had healthier behaviours, including higher consumption of fruit and vegetables. Frequent high-dose vitamin C users ( $\geq 1000$  mg) had a higher socio-economic status, visited alternative practitioners more often than family or private doctors, and were more likely to be ex-smokers and to drink little or no alcohol. Women who self-reported having had cancer (OR = 1.33, 95 % CI 1.00, 1.76) or specifically breast cancer (OR = 1.70, 95 % CI 1.14, 2.55), or reported a family history of cancer (OR = 1.16, 95 % CI 0.95, 1.41) or breast cancer (OR = 1.26, 95 % CI 1.01, 1.58) had increased odds of being frequent high-dose users after adjusting for sociodemographic and health behaviours. Women with personal or family histories of some cardiovascular or intestinal disorders were more likely to take supplements containing vitamin C, though not necessarily at high doses.

**CONCLUSIONS:** High-dose vitamin C intake by UK women was associated with healthier behaviours and a history of breast cancer, total cancer and other illnesses. Consequences of high-dose vitamin C supplement intake are not clear at the population level.

**Alte dosi di vitamina C e l'uso di integratori è associato a casi auto-segnalati di cancro al seno e altre malattie nel Cohort Study delle donne del Regno Unito.**

**OBIETTIVO:** Per determinare se l'uso frequente di vitamina C supplemento è associato a comportamenti più sani, e una storia di cancro e altre malattie nelle donne in Gran Bretagna.

**DESIGN:** La presente analisi cross-sezionale esamina la probabilità di assumere integratori contenenti vitamina C come registrato in 4 diari alimentari d, in base alle caratteristiche dello stile di vita e di storia morbilità auto-riportati da questionario.

**REGOLAZIONE:** Un ampio studio di coorte nazionale del Regno Unito.

**SOGGETTI:** Un totale di 12 453 donne di età compresa tra i 37 ei 79 anni.

**RISULTATI:** Le donne spesso l'assunzione di integratori contenenti vitamina C, rispetto a chi non ha avuto comportamenti sani, tra cui un maggior consumo di frutta e verdura. Frequenti alte dosi di vitamina C utenti ( $\geq 1000$  mg) avevano uno status socio-economico più elevato, ha visitato gli operatori alternativi più spesso di medici di famiglia o privati, e avevano una maggiore probabilità di essere ex-fumatori e di bere alcolici poco o niente. Le donne che auto-riferito di aver avuto un tumore (OR = 1 • 33, 95% CI 1 • 00, 1 • 76) o in modo specifico il tumore al seno (OR = 1 • 70, 95% CI 1 • 14, 2 • 55), o ha riportato una storia familiare di tumore (OR = 1 • 16, 95% CI 0 • 95, 1 • 41) o il cancro al seno (OR = 1 • 26, 95% CI 1 • 01, 1 • 58) era aumentata probabilità di essere spesso gli utenti ad alte dosi dopo aggiustamento per i comportamenti socio-demografici e la salute. Le donne con storia personale o familiare di alcuni disturbi intestinali o cardiovascolari avevano più probabilità di assumere integratori contenenti vitamina C, anche se non necessariamente ad alte dosi.

**CONCLUSIONI:** alte dosi di vitamina C, l'assunzione da parte delle donne del Regno Unito è stato associato con comportamenti sani e una storia di cancro della mammella, cancro del totale e altre malattie. Conseguenze di assunzione di vitamina supplemento C ad alte dosi non sono chiari a livello di popolazione.

24: González CA, Travier N, Luján-Barroso L, Castellsagué X, Bosch FX, Roura E, Bueno-de-Mesquita HB, Palli D, Boeing H, Pala V, Sacerdote C, Tumino R, Panico S, Manjer J, Dillner J, Hallmans G, Kjellberg L, Sanchez MJ, Altzibar JM, Barricarte A, Navarro C, Rodriguez L, Allen N, Key TJ, Kaaks R, Rohrmann S, Overvad K, Olsen A, Tjønneland A, Munk C, Kjaer SK, Peeters PH, van Duijnhoven FJ, Clavel-Chapelon F, Boutron-Ruault MC, Trichopoulou A, Benetou V, Naska A, Lund E, Engeset D, Skeie G, Franceschi S, Slimani N, Rinaldi S, Riboli E.

### **Dietary factors and in situ and invasive cervical cancer risk in the European prospective investigation into cancer and nutrition study.**

Int J Cancer. 2010 Sep 17. [Epub ahead of print]PubMed PMID: 20853322.

Some dietary factors could be involved as cofactors in cervical carcinogenesis, but evidence is inconclusive. There are no data about the effect of fruits and vegetables intake (F&V) on cervical cancer from cohort studies. We examined the association between the intake of F&V and selected nutrients and the incidence of carcinoma in situ (CIS) and invasive squamous cervical cancer (ISC) in a prospective study of 299,649 women, participating in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition study. Cox proportional hazard models were used to estimate adjusted hazard ratios (HRs) and 95% confidence intervals (95% CI). A calibration study was used to control measurement errors in the dietary questionnaire. After a mean of 9 years of follow-up, 253 ISC and 817 CIS cases were diagnosed. In the calibrated model, we observed a statistically significant inverse association of ISC with a daily increase in intake of 100 g of total fruits (HR 0.83; 95% CI 0.72-0.98) and a statistically nonsignificant inverse association with a daily increase in intake of 100 g of total vegetables (HR 0.85; 95% CI 0.65-1.10). Statistically nonsignificant inverse associations were also observed for leafy vegetables, root vegetables, garlic and onions, citrus fruits, vitamin C, vitamin E and retinol for ISC. No association was found regarding beta-carotene, vitamin D and folic acid for ISC. None of the dietary factors examined was associated with CIS.

Our study suggests a possible protective role of fruit intake and other dietary factors on ISC that need to be confirmed on a larger number of ISC cases.

### **Fattori dietetici e in situ e rischio invasivo di cancro del collo dell'utero in uno Studio prospettico europeo sul cancro e la nutrizione.**

Alcuni fattori dietetici possano essere coinvolti come cofattori nella carcinogenesi della cervice uterina, ma l'evidenza non è conclusiva. Non vi sono dati circa l'effetto di frutta e verdura di aspirazione (F & V) sul tumore del collo dell'utero da studi di coorte. Abbiamo esaminato l'associazione tra l'assunzione di frutta e verdura e nutrienti selezionati e l'incidenza di carcinoma in situ (CIS) e invasivo carcinoma squamoso della cervice uterina (ISC) in uno studio prospettico di 299.649 donne, partecipanti al Studio prospettico europeo sul cancro e di studio Nutrizione. modelli di rischio proporzionale di Cox sono stati utilizzati per stimare hazard ratio (HR) e gli intervalli di confidenza al 95% (95% CI). Uno studio di taratura è stata utilizzata per controllare gli errori di misura nel questionario dietetico. Dopo una media di 9 anni di follow-up, 253 CDI e 817 sono stati diagnosticati casi di CSI. Nel modello calibrato, abbiamo osservato una associazione statisticamente significativa inversa di ISC con un incremento giornaliero di assunzione di 100 g di frutta totale (HR 0,83, IC 95% 0,72-0,98) e di una associazione statisticamente non significativa inversa con un incremento giornaliero di assunzione di 100 g di verdure totale (HR 0,85 95% CI 0,65-1,10). associazioni inverse statisticamente non significative sono state osservate anche per le verdure a foglia verde, ortaggi a radice, aglio e cipolle, agrumi, vitamina C, vitamina E e retinolo per ISC. Nessuna associazione è stata trovata per quanto riguarda il beta-carotene, vitamina D e acido folico per ISC. Nessuno dei fattori dietetici esaminati è stato associato con CIS. Il nostro studio suggerisce un possibile ruolo protettivo del consumo di frutta e di altri fattori dietetici su ISC, che devono essere confermati su un maggior numero di casi di ISC.

25: Gonzalez CA, Riboli E.

### **Diet and cancer prevention: Contributions from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study.**

Eur J Cancer. 2010 Sep;46(14):2555-62. PubMed PMID: 20843485.

We present the main findings observed to date from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) on dietary factors associated with the most frequent cancer sites. METHODS: EPIC is a multicentre prospective study carried out in 23 centres in 10 European countries: Denmark, France, Germany, Greece, Italy, the Netherlands, Norway, Spain, Sweden and the United Kingdom, including 519,978 participants (366,521 women and 153,457 men), most aged 35-70 years. RESULTS: We observed the following significant associations: gastric cancer risk was inversely associated with high plasma vitamin C, some carotenoids, retinol and  $\alpha$ -tocopherol, high intake of cereal fibre and high adherence to Mediterranean diet, while red and processed meat were associated with increased risk. High intake of dietary fibre, fish, calcium, and plasma vitamin D were associated with a decreased risk of colorectal cancer, while red and processed meat intake, alcohol intake, body mass index (BMI) and abdominal obesity were associated with an increased risk. High intake of fruit and vegetables in current smokers were associated with a decreased risk of lung cancer. An increased risk of breast cancer was associated with high saturated fat intake and alcohol intake. In postmenopausal women, BMI was positively and physical activity negatively associated with breast cancer risk. High intake of dairy protein and calcium from dairy products and high serum concentration of IGF-I were associated with an increased risk of prostate cancer. These results contribute to scientific evidence for appropriate public health strategies and prevention activities aimed at reducing the global cancer burden.

## **Dieta e prevenzione del cancro: Contributi Studio prospettico europeo sul cancro e nutrizione (EPIC) di studio.**

Vi presentiamo i principali risultati osservati finora da Studio prospettico europeo sul cancro e nutrizione (EPIC) sui fattori dietetici associati sedi tumorali più frequenti. **METODI:** EPIC è uno studio multicentrico prospettico effettuato in 23 centri in 10 paesi europei: Danimarca, Francia, Germania, Grecia, Italia, Paesi Bassi, Norvegia, Spagna, Svezia e Regno Unito, tra cui 519.978 partecipanti (366.521 donne e 153.457 uomini), la maggior parte di età compresa tra 35-70 anni. **RISULTATI:** Abbiamo osservato le seguenti associazioni significative: il rischio di cancro gastrico è risultato inversamente associato al plasma ad alta vitamina C, alcuni carotenoidi, retinolo e  $\alpha$ -tocoferolo, elevato apporto di fibre di cereali e l'alta adesione alla dieta mediterranea, mentre le carni rosse e lavorate sono state associate con aumento del rischio. elevato apporto di fibre, pesce, calcio, vitamina D e di plasma sono stati associati con una diminuzione del rischio di cancro coloretale, mentre l'assunzione di carne rossa e lavorata, assunzione di alcol, indice di massa corporea (BMI) e l'obesità addominale erano associati ad un aumentato rischio. elevato consumo di frutta e verdura nei fumatori attuali erano associati ad un ridotto rischio di cancro al polmone. Un aumentato rischio di cancro al seno era associata ad elevata assunzione di grassi saturi e l'assunzione di alcol. Nelle donne in post-menopausa, il BMI è stato positivamente e negativamente l'attività fisica associata a rischio di cancro al seno. elevato apporto di proteine da latte e di calcio dai latticini e la concentrazione sierica di IGF-I sono risultati associati ad un aumentato rischio di cancro alla prostata. Questi risultati contribuiscono a prove scientifiche per le opportune strategie di sanità pubblica e le attività di prevenzione volte a ridurre il peso globale del cancro.

26: Park Y, Spiegelman D, Hunter DJ, Albanes D, Bergkvist L, Buring JE, Freudenheim JL, Giovannucci E, Goldbohm RA, Harnack L, Kato I, Krogh V, Leitzmann MF, Limburg PJ, Marshall JR, McCullough ML, Miller AB, Rohan TE, Schatzkin A, Shore R, Sieri S, Stampfer MJ, Virtamo J, Weijenberg M, Willett WC, Wolk A, Zhang SM, Smith-Warner SA.

## **Intakes of vitamins A, C, and E and use of multiple vitamin supplements and risk of colon cancer: a pooled analysis of prospective cohort studies.**

Cancer Causes Control. 2010 Nov;21(11):1745-57.

**OBJECTIVE:** To evaluate the associations between intakes of vitamins A, C, and E and risk of colon cancer.

**METHODS:** Using the primary data from 13 cohort studies, we estimated study- and sex-specific relative risks (RR) with Cox proportional hazards models and subsequently pooled RRs using a random effects model.

**RESULTS:** Among 676,141 men and women, 5,454 colon cancer cases were identified (7-20 years of follow-up across studies). Vitamin A, C, and E intakes from food only were not associated with colon cancer risk. For intakes from food and supplements (total), the pooled multivariate RRs (95% CI) were 0.88 (0.76-1.02, >4,000 vs.  $\leq$  1,000  $\mu\text{g}/\text{day}$ ) for vitamin A, 0.81 (0.71-0.92, >600 vs.  $\leq$  100 mg/day) for vitamin C, and 0.78 (0.66-0.92, > 200 vs.  $\leq$  6 mg/day) for vitamin E. Adjustment for total folate intake attenuated these associations, but the inverse associations with vitamins C and E remained significant. Multivitamin use was significantly inversely associated with colon cancer risk (RR = 0.88, 95% CI: 0.81-0.96).

**CONCLUSIONS:** Modest inverse associations with vitamin C and E intakes may be due to high correlations with folate intake, which had a similar inverse association with colon cancer. An inverse association with multivitamin use, a major source of folate and other vitamins, deserves further study.

## **L'apporto di vitamine A, C ed E e l'uso di integratori vitaminici e il rischio di tumore del colon: una analisi di studi prospettici di coorte.**

**OBIETTIVO:** Per valutare l'associazione tra assunzione di vitamine A, C ed E e rischio di tumore del colon.

**METODI:** Usando i dati primari da 13 studi di coorte, abbiamo stimato RR di studio e relativi rischi specifici per sesso (RR) con modelli di rischio proporzionale di Cox e successivamente messe in comune con un modello a effetti casuali.

**RISULTATI:** Tra i 676.141 uomini e donne, 5.454 casi di tumore del colon sono state identificate (7-20 anni di follow-up tra gli studi). Assunzione di vitamine A, C ed E dal cibo solo non sono stati associati a rischio di cancro del colon. Per le assunzioni da alimenti e integratori (totale), il RR multivariato pool (95% CI) sono stati 0,88 (0,76-1,02, > 4.000 vs ≤ 1.000 mg / die) per la vitamina A, 0,81 (0,71-0,92, > 600 vs ≤ 100 mg / die) per la vitamina C, e 0,78 (0,66-0,92, > 200 vs ≤ 6 mg / die) per la vitamina E. Adeguamento per assunzione di folato totale attenuato queste associazioni, ma le associazioni inverse con le vitamine C ed E sono rimasti significativo. Uso Multivitaminico era significativamente inversamente associato al rischio di cancro del colon (RR = 0,88, 95% CI: 0,81-0,96).

**CONCLUSIONI:** Modest associazioni inverse con vitamina C ed E possono essere prese a causa di elevate correlazioni con assunzione di folato, che aveva una simile associazione inversa con il cancro del colon. Un'associazione inversa con l'utilizzo multivitaminici, una grande fonte di folato e di altre vitamine, merita ulteriori approfondimenti.

27: Bates CJ, Hamer M, Mishra GD.

## **Redox-modulatory vitamins and minerals that prospectively predict mortality in older British people: the National Diet and Nutrition Survey of people aged 65 years and over.**

Br J Nutr. 2010 Sep 1:1-9.

The predictive power, for total, vascular, cancer and respiratory mortality, of selected redox-modulatory (vitamin and mineral nutrient) indices measured at baseline, was studied in the British National Diet and Nutrition Survey (community-living subset) of people aged 65 years and over. Mortality status and its primary and underlying causes were recorded for 1054 (mean age 76.6 (sd 7.4) years and 49.0 % female) participants, from the baseline survey in 1994-5 until September 2008. During this interval, 74 % of the male and 62 % of the female participants died. Total mortality was significantly predicted by baseline plasma concentrations (per sd) of vitamin C (hazard ratio (HR) 0.81; 95 % CI 0.74, 0.88),  $\alpha$ -carotene (HR 0.90; 95 % CI 0.81, 0.99), Se (HR 0.76; 95 % CI 0.69, 0.84), Zn (HR 0.79; 95 % CI 0.72, 0.87), Cu (HR 1.27; 95 % CI 1.14, 1.42) and Fe (HR 0.81; 95 % CI 0.74, 0.89). Total mortality was also significantly predicted by baseline dietary intakes (per sd) of food energy (HR 0.86; 95 % CI 0.79, 0.94), vitamin C (HR 0.88; 95 % CI 0.80, 0.94), carotenoids (HR 0.89; 95 % CI 0.83, 0.96), Zn (HR 0.89; 95 % CI 0.82, 0.96) and Cu (HR 0.91; 95 % CI 0.84, 1.00). Prediction patterns and significance for primary vascular, cancer and respiratory mortality differed in certain respects, but not fundamentally. Model adjustment for known disease or mortality risk predictors resulted in loss of significance for some of the indices; however, plasma Se and Zn, and food energy remained significant predictors. We conclude that total and primary vascular, cancer and respiratory mortality in older British people of both sexes is predicted by several biochemical indices of redox-modulatory nutrients, some of which may reflect the respondents' acute-phase status at baseline, whereas others may reflect the healthiness of their lifestyle.

## **Minerali e vitamine redox modulatorie che predicono prospettivamente la mortalità nelle persone anziane britanniche. La dieta nazionale e la sopravvivenza nazionale di persone oltre i 65 anni.**

Il potere predittivo, per il totale, vascolari, il cancro e la mortalità delle vie respiratorie, di selezionati redox-modulatori (vitamine e nutrienti minerali) gli indici misurati al basale, è stato studiato in British National Diet and Nutrition Survey (sottoinsieme comunità di vita) di persone dai 65 anni e oltre. stato di mortalità e le sue cause primarie e alla base sono state registrate per 1054 (età media 76 • 6 (sd 7 • 4) anni e 49 • 0% femminile) partecipanti, da un'indagine di riferimento in 1.994-5 fino a settembre 2008. Durante questo intervallo, il 74% dei maschi e il 62% dei partecipanti femmina morta. La mortalità totale era significativamente predetto da concentrazioni plasmatiche basali (per SD) di vitamina C (hazard ratio (HR) 0 • 81, 95% CI 0 • 74, 0 • 88),  $\alpha$ -carotene (HR 0 • 90, 95% CI 0 • 81, 0 • 99), Se (HR 0 • 76, 95% CI 0 • 69, 0 • 84), Zn (HR 0 • 79, 95% CI 0 • 72, 0 • 87), Cu (HR 1 • 27, 95% CI 1 • 14, 1 • 42) e Fe (HR 0 • 81, 95% CI 0 • 74, 0 • 89). La mortalità totale è risultata significativamente predetto da apporti alimentari di base (per SD) di energia alimentare (HR 0 • 86, 95% CI 0 • 79, 0 • 94), la vitamina C (HR 0 • 88, 95% CI 0 • 80, 0 • 94), carotenoidi (HR = 0 • 89, 95% CI 0 • 83, 0 • 96), Zn (HR 0 • 89, 95% CI 0 • 82, 0 • 96) e Cu (HR 0 • 91; 95% CI 0 • 84, 1 • 00). modelli di previsione e di primaria importanza vascolari, il cancro e la mortalità respiratoria differiva per alcuni aspetti, ma non radicalmente. adeguamento del modello per la malattia nota o indicatori del rischio di mortalità causato la perdita di significato per alcuni degli indici, tuttavia, l'energia del plasma Se e Zn, e cibo rimasti predittori significativi. Concludiamo che la totale e primario vascolari, cancro e la mortalità delle vie respiratorie nelle persone anziane britannici di entrambi i sessi è previsto da alcuni indici biochimici di sostanze nutritive redox-modulazione, alcune delle quali può riflettere lo stato della fase acuta degli intervistati 'al basale, mentre altri possono riflettere la salubrità del loro stile di vita.

30: Cabanillas F.

### **Vitamin C and cancer: what can we conclude--1,609 patients and 33 years later?**

P R Health Sci J. 2010 Sep;29(3):215-7.

In 1976 an article co-authored by Linus Pauling described that 100 terminal cancer patients treated with intravenous vitamin C, followed by oral maintenance, lived four times longer than a control group of 1,000 patients who did not receive vitamin C. The study was strongly criticized because the control group was very different from the group treated with vitamin C. The latter were declared terminally ill much sooner than the control group thus resulting in an artificially longer survival for the vitamin C group. Three double blind placebo controlled randomized trials performed at Mayo Clinic using oral vitamin C for cancer patients were negative. In a phase I-II trial performed by Riordan et al, none of 24 cancer patients treated with i.v. vitamin C responded. At this point we don't have information as to which is the actual plasma level of vitamin C that can produce tumor shrinkage. We don't have consistent information either regarding what is the clinical dose necessary to yield therapeutic plasma levels. In view of this lack of data after trials which have included at least 1,591 patients over 33 years, we have to conclude that we still do not know whether Vitamin C has any clinically significant antitumor activity. Nor do we know which histological types of cancers, if any, are susceptible to this agent. Finally, we don't know what the recommended dose of Vitamin C is, if there is indeed such a dose, that can produce an anti-tumor response.

### **Vitamina C e cancro: 1, 609 pazienti, 33 anni dopo: cosa possiamo concludere?**

Nel 1976 un articolo di co-scritto da Linus Pauling descritto che il 100 malati terminali di cancro trattati con vitamina C per via endovenosa, seguita da mantenimento per via orale, ha vissuto quattro volte più lungo di un gruppo di controllo di 1.000 pazienti che non avevano ricevuto vitamina C. Lo studio è stato fortemente criticato perché il gruppo di controllo era molto diverso rispetto al gruppo trattato con vitamina C. Questi ultimi sono stati dichiarati malati terminali molto prima di quanto il gruppo di controllo con il risultato di una sopravvivenza artificiale più lungo per il gruppo di vitamina C. Tre placebo in doppio cieco controllati randomizzati eseguito presso la Mayo Clinic con vitamina C per via orale per i pazienti oncologici sono stati negativi. In una fase I-II prova effettuata da al Riordan e altri, nessuno dei 24 pazienti con tumore trattati con iv vitamina C risposto. A questo punto non abbiamo informazioni su quale sia il livello plasmatico effettivo di vitamina C che possono produrre riduzione della massa tumorale. Non disponiamo di informazioni coerenti sia per quanto riguarda ciò che è la dose clinici necessari per produrre livelli plasmatici terapeutici. In vista di questa mancanza di dati dopo le analisi che hanno incluso almeno 1.591 pazienti con più di 33 anni, dobbiamo concludere che ancora non sappiamo se la vitamina C ha alcuna attività antitumorale clinicamente significativi. Non sappiamo neppure quali tipi istologici di tumori, se del caso, sono esposti a questo agente. Infine, non sappiamo cosa la dose raccomandata di vitamina C è, se vi è effettivamente una tale dose, che può produrre una risposta anti-tumorale.

32: Tian J, Peehl DM, Knox SJ.

Cancer Biother Radiopharm.2010 Aug;25(4):439-48.

### **Metalloporphyrin synergizes with ascorbic acid to inhibit cancer cell growth through fenton chemistry.**

Ascorbic acid (AA) has been reported to inhibit tumor cell growth through the generation of extracellular hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ). However, the clinical utility of AA has been limited by relatively low potency and in vivo efficacy. This study reports that the metalloporphyrin, Mn(III) tetrakis(N-methylpyridinium-2-yl)porphyrin(5+) (MnTMPyP), has a potent synergistic cytotoxic effect when combined with AA in a variety of cancer cell lines. In the presence of MnTMPyP, the concentration of AA required to inhibit cancer cell growth was markedly reduced. In vitro (cell-free) experiments demonstrated that AA alone enhanced the Fenton reaction that produces cytotoxic hydroxyl radical ( $HO^*$ ); however, this reaction was limited by the low rate by which AA generates  $H_2O_2$  (Fenton reaction substrate) from  $O_2$ . MnTMPyP catalyzed  $H_2O_2$  generation through the AA-facilitated Mn(II  $\leftrightarrow$  III)TMPyP redox cycle and thereby markedly potentiated the Fenton reaction. Accordingly, MnTMPyP and AA resulted in increased cellular levels of  $H_2O_2$  and  $HO^*$  in cancer cells, which mediate the synergistic cytotoxicity of this combined treatment. This effect was inhibited by cellular enzymes that metabolize  $H_2O_2$ , such as catalase and glutathione peroxidase, suggesting that selective killing of cancer cells deficient in such enzymes can be achieved in vivo.

### **Metalloporfirina e sinergia con l'acido ascorbico per inibire la crescita delle cellule tumorali attraverso la chimica Fenton.**

L'acido ascorbico (AA) è stato segnalato per inibire la crescita delle cellule tumorali attraverso la generazione di perossido di idrogeno extracellulare (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Tuttavia, l'utilità clinica di AA è stato limitato da una potenza relativamente bassa e l'efficacia in vivo. Questo studio riporta che il metalloporfirina, Mn (III) tetrakis (N-metilpyridinium-2-ile) porfirina (5+) (MnTMPyP), ha un potente effetto sinergico citotossico quando combinato con AA in una varietà di linee cellulari tumorali. In presenza di MnTMPyP, la concentrazione di AA per inibire la crescita delle cellule tumorali è stata notevolmente ridotta. In vitro (cell-free), esperimenti hanno dimostrato che AA solo migliorato la reazione di Fenton che produce citotossico radicale idrossile (HO<sup>\*</sup>); tuttavia, questa reazione è stata limitata dal basso tasso di AA che genera H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (substrato di reazione di Fenton) da O<sub>2</sub>. MnTMPyP catalizzata H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generazione attraverso l'AA-attivata Mn (II <-> III) TMPyP ciclo redox e, quindi, notevolmente potenziato la reazione di Fenton. Di conseguenza, MnTMPyP e AA comportato un aumento dei livelli cellulari di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e HO<sup>\*</sup> nelle cellule tumorali, che mediano la citotossicità sinergico di questo trattamento combinato. Tale effetto è inibito dagli enzimi cellulari che metabolizzano H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, come la catalasi e glutatione perossidasi, suggerendo che l'uccisione selettiva delle cellule tumorali carenti di enzimi come può essere realizzato in vivo.

34: Niedzwiecki A, Roomi MW, Kalinovsky T, Rath M.

**Micronutrient synergy--a new tool in effective control of metastasis and other key mechanisms of cancer.**

Cancer Metastasis Rev. 2010 Sep;29(3):529-42.

Consumption of a plant-based diet has been associated with prevention of the development and progression of cancer. We have developed strategies to inhibit cancer development and its spread by targeting common mechanisms used by all types of cancer cells that decrease stability and integrity of connective tissue. Strengthening of collagen and connective tissue can be achieved naturally through the synergistic effects of selected nutrients, such as lysine, proline, ascorbic acid and green tea extract (NM). This micronutrient mixture has exhibited a potent anticancer activity in vivo and in vitro in a few dozen cancer cell lines. Its anti-cancer effects include inhibition of metastasis, tumor growth, matrix metalloproteinase (MMP) secretion, invasion, angiogenesis, and cell growth as well as induction of apoptosis. Many cancers are often diagnosed at later stages, when metastasis has occurred, which standard treatment has been unable to control. Our studies on NM effects on hepatic and pulmonary metastasis demonstrated profound, significant suppression of metastasis in a murine model. Evaluation of effects of NM on xenografts in murine models demonstrated significant reduction in tumor size and tumor burden in all human cancer cell lines tested. In vitro studies demonstrated that NM was very effective in inhibition of cell proliferation (by MTT assay), MMP secretion (by gelatinase zymography), cell invasion (through Matrigel), cell migration (by scratch test), induction of apoptosis (by live green caspase) and induction of pro-apoptotic genes in many diverse cancer cell lines. Furthermore, in vivo and in vitro studies of

effects of individual micronutrients compared to their specific combination demonstrated synergistic effects resulting in improved anticancer potency.

### **La sinergia dei Micronutrienti - un nuovo strumento di controllo efficace della metastasi e di altri meccanismi chiave del cancro.**

Il consumo di una dieta a base di vegetali è stato associato con la prevenzione dello sviluppo e progressione del cancro. Abbiamo sviluppato delle strategie per inibire lo sviluppo del cancro e la sua diffusione da parte di targeting meccanismi comuni utilizzati da tutti i tipi di cellule tumorali che la stabilità e l'integrità diminuzione del tessuto connettivo. Rafforzamento del collagene e tessuto connettivo può essere ottenuto naturalmente attraverso gli effetti sinergici delle sostanze nutrienti selezionati, come la lisina, prolina, acido ascorbico e estratto di tè verde (NM). Questa miscela di micronutrienti ha mostrato una potente attività antitumorale in vivo e in vitro in poche righe dozzina di cellule cancerogene. I suoi effetti anti-cancro includono l'inibizione di metastasi, la crescita del tumore, metalloproteinasi della matrice (MMP) secrezione, invasione, angiogenesi e la crescita cellulare, nonché di induzione di apoptosi. Molti tumori sono spesso diagnosticate in fasi successive, quando la metastasi si è verificato, che il trattamento standard è stato in grado di controllare. I nostri studi sugli effetti NM su metastasi epatiche e polmonari hanno dimostrato una profonda, significativa soppressione di metastasi in un modello murino. Valutazione degli effetti di NM su xenotrapianti in modelli murini hanno dimostrato una significativa riduzione delle dimensioni del tumore e la massa tumorale in tutte le linee di cellule umane di cancro testati. Studi in vitro hanno dimostrato che NM è stato molto efficace nella inibizione della proliferazione cellulare (mediante test MTT), la secrezione di MMP (da zimografia gelatinasi), l'invasione delle cellule (attraverso Matrigel), la migrazione cellulare (da scratch test), l'induzione di apoptosi (dal vivo verde caspasi) e induzione di geni pro-apoptotici in linee cellulari tumorali tanti e così diversi. Inoltre, in vivo e in vitro degli effetti di micronutrienti individuale rispetto alla propria specifica combinazione dimostrato effetti sinergici con conseguente potenza antitumorale migliorata.

37: Murphy SJ, Anderson LA, Ferguson HR, Johnston BT, Watson PR, McGuigan J, Comber H, Reynolds JV, Murray LJ, Cantwell MM.

### **Dietary antioxidant and mineral intake in humans is associated with reduced risk of esophageal adenocarcinoma but not reflux esophagitis or Barrett's esophagus.**

J Nutr. 2010 Oct;140(10):1757-63.

The role of antioxidants in the pathogenesis of reflux esophagitis (RE), Barrett's esophagus (BE), and esophageal adenocarcinoma (EAC) remains unknown. We evaluated the associations among dietary antioxidant intake and these diseases. We performed an assessment of dietary antioxidant intake in a case control study of RE (n = 219), BE (n = 220), EAC (n = 224), and matched population controls (n = 256) (the Factors Influencing the Barrett's Adenocarcinoma Relationship study) using a modification of a validated FFQ. We found that overall antioxidant index, a measure of the combined intake of vitamin C, vitamin E, total carotenoids, and selenium, was associated with a reduced risk of EAC [odds ratio (OR) = 0.57; 95% CI = 0.33-0.98], but not BE (OR = 0.95; 95% CI = 0.53-1.71) or RE (OR = 1.60; 95% CI = 0.86-2.98), for those in the highest compared with lowest category of intake. Those in the highest category of vitamin C intake had a lower risk of EAC (OR = 0.37; 95% CI = 0.21-0.66; P-trend = 0.001) and RE (OR = 0.46; 95% CI = 0.24-0.90; P-trend = 0.03) compared with those in the lowest category. Vitamin C intake was not associated with BE, and intake of vitamin E, total carotenoids, zinc, copper, or selenium was not associated with EAC, BE, or RE. In conclusion, the overall antioxidant index was associated with a reduced risk of EAC. Higher dietary intake of vitamin C was associated with a reduced risk of EAC and RE.

These results suggest that antioxidants may play a role in the pathogenesis of RE and EAC and may be more important in terms of progression rather than initiation of the disease process.

**L'assunzione di minerali e gli antiossidanti alimentari negli esseri umani è associata ad un minor rischio di adenocarcinoma esofageo, ma non l'esofagite da reflusso o esofago di Barrett.**

Il ruolo degli antiossidanti nella patogenesi della esofagite da reflusso (RE), l'esofago di Barrett (BE), e l'adenocarcinoma esofageo (EAC) rimane sconosciuto. Abbiamo valutato le associazioni tra apporto di antiossidanti nella dieta e di queste malattie. Abbiamo effettuato una valutazione di assunzione di antiossidanti nella dieta in uno studio caso controllo di RE (n = 219), BE (n = 220), EAC (n = 224), e controlli appaiati popolazione (n = 256) (fattori che influenzano la Barrett Adenocarcinoma studio Relazioni) con una modifica di una convalidato FFQ. Abbiamo scoperto che l'indice complessivo antiossidante, una misura della assunzione combinata di vitamina C, vitamina E, carotenoidi totali, e il selenio, è stato associato ad un ridotto rischio di rapporto EAC [probabilità (OR) = 0.57, IC 95% = 0,33-0,98 ], ma non BE (OR = 0,95, IC 95% = 0,53-1,71) o RE (OR = 1.60, IC 95% = 0,86-2,98), per quelli nel più alto rispetto a più bassa categoria di assunzione. Quelli appartenenti alla più alta categoria di assunzione di vitamina C avevano un rischio inferiore di EAC (OR = 0,37, IC 95% = 0,21-0,66, p-trend = 0,001) e RE (OR = 0,46, IC 95% = 0,24-0,90, p-trend = 0.03) rispetto a quelle di categoria più bassa. Assunzione di vitamina C non è stata associata con BE, e l'assunzione di vitamina E, carotenoidi totali, zinco, rame, selenio o non è stata associata con EAC, BE, o RE. In conclusione, l'indice complessivo antiossidante è stata associata ad un ridotto rischio di EAC. Più elevato apporto dietetico di vitamina C era associata ad un ridotto rischio di EAC e RE. Questi risultati suggeriscono che gli antiossidanti possono avere un ruolo nella patogenesi della RE e EAC e possono essere più importanti in termini di progressione, piuttosto che l'inizio del processo della malattia.

40: Frömberg A, Gutsch D, Schulze D, Vollbracht C, Weiss G, Czubyko F, Aigner A.

**Ascorbate exerts anti-proliferative effects through cell cycle inhibition and sensitizes tumor cells towards cytostatic drugs.**

Cancer Chemother Pharmacol. 2010Aug 8. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 20694726.

**PURPOSE:** While the benefits of ascorbic acid (vitamin C, ascorbate) as an essential nutrient are well established, its effects on tumor cells and in tumor treatment are controversial. In particular, conflicting data exist whether ascorbate may increase the cytotoxic effects of antineoplastic drugs or may rather exert adverse effects on drug sensitivity during cancer treatment. Findings are further obscured regarding the distinction between ascorbate and dehydroascorbate (DHA). Thus, the purpose of this study was to evaluate and directly compare the cytotoxic efficacy of ascorbate compared to DHA, and to analyse if ascorbate at pharmacological concentrations affects the efficacy of antineoplastic agents in prostate carcinoma cells.

**METHODS:** We directly compare the effects of ascorbate (supplied as 'Pascorbin((R)) solution for injection') and DHA on tumor cell viability, and determine IC(50) values for various cell lines. At concentrations well below the IC(50), ascorbate effects on cell proliferation and cell cycle are analysed. We furthermore determine changes in cellular sensitivity towards various cytostatic drugs upon pre-treatment of cells with ascorbate.

**RESULTS:** We demonstrate higher therapeutic efficacy of ascorbate over DHA in various cell lines, independent of cell line-specific differences in ascorbate sensitivity, and identify the

extracellular generation of  $H_2O_2$  as critical mechanism of ascorbate action. We furthermore show that, in addition to pro-apoptotic effects described previously, ascorbate treatment already at concentrations well below the  $IC_{50}$  exerts anti-proliferative effects on tumor cells. Those are based on interference with the cell cycle, namely by inducing a G(0)/G(1) arrest. Pre-treatment of tumor cells with ascorbate leads to increased cellular sensitivity towards Docetaxel, Epirubicin, Irinotecan and 5-FU, but not towards Oxaliplatin and Vinorelbin. For Docetaxel and 5-FU, a linear correlation between this sensitizing effect and the ascorbate dosage is observed.

**CONCLUSIONS:** The redox-active form of vitamin C, ascorbate, shows therapeutic efficacy in tumor cells. These antitumor effects of ascorbate are mainly based on its extracellular action and, in addition to the induction of apoptosis, also include an anti-proliferative effect by inducing cell cycle arrest. Furthermore, ascorbate treatment specifically enhances the cytostatic potency of certain chemotherapeutics, which implicates therapeutic benefit during tumor treatment.

### **L'ascorbato esercita effetti anti-proliferativi tramite l'inibizione del ciclo cellulare e sensibilizza le cellule tumorali ai farmaci citostatici**

**SCOPO:** Mentre i benefici di acido ascorbico (vitamina C, acido ascorbico) come un nutriente essenziale sono ben consolidate, i suoi effetti sulle cellule tumorali e nel trattamento del tumore sono controverse. In particolare, se esiste un conflitto di dati ascorbato può aumentare gli effetti citotossici di farmaci antineoplastici o possono invece esercitare effetti negativi sulla sensibilità ai farmaci durante il trattamento del cancro. I risultati sono ulteriormente oscurato per quanto riguarda la distinzione tra ascorbato e deidroascorbato (DHA). Pertanto, lo scopo di questo studio era di valutare e confrontare direttamente l'efficacia citotossica di ascorbato rispetto al DHA, e di analizzare se ascorbato a concentrazioni farmacologiche influenza l'efficacia di agenti antineoplastici in cellule di carcinoma della prostata.

**METODI:** Abbiamo confrontare direttamente gli effetti di acido ascorbico (fornito come 'Pascorbin ((R)) soluzione iniettabile') e DHA sulla vitalità delle cellule tumorali, e determinare  $IC_{50}$  i valori per varie linee cellulari. A concentrazioni ben al di sotto della  $IC_{50}$ , gli effetti ascorbato sulla proliferazione cellulare e ciclo cellulare sono analizzati. Abbiamo, inoltre, determinare le variazioni di sensibilità verso cellulari diversi farmaci citostatici momento della pre-trattamento delle cellule con l'ascorbato.

**RISULTATI:** Abbiamo dimostrato maggiore efficacia terapeutica di ascorbato oltre DHA in varie linee cellulari, indipendente da differenze di cellule specifiche della linea di sensibilità ascorbato, e identificare la generazione extracellulare di  $H_2O_2$  come meccanismo fondamentale di azione ascorbato. Abbiamo, inoltre, mostrano che, in aggiunta agli effetti pro-apoptotici descritto in precedenza, il trattamento ascorbato già a concentrazioni molto al di sotto del  $IC_{50}$  esercita effetti anti-proliferativo su cellule tumorali. Questi sono basati su interferenza con il ciclo cellulare, cioè inducendo una G (0) / G (1) arresto. Pre-trattamento di cellule tumorali con ascorbato porta ad un aumento della sensibilità cellulare verso docetaxel, epirubicina, irinotecan e 5-FU, ma non verso oxaliplatino e Vinorelbin. Per docetaxel e 5-FU, una correlazione lineare tra questo effetto di sensibilizzazione e il dosaggio ascorbato è osservato.

**CONCLUSIONI:** La forma redox-attiva della vitamina C, acido ascorbico, dimostra l'efficacia terapeutica delle cellule tumorali. Questi effetti antitumorali di ascorbato sono basati principalmente sulla sua azione extracellulare e, in aggiunta alla induzione di apoptosi, comprendono anche un effetto anti-proliferativo da indurre arresto del ciclo cellulare. Inoltre, il trattamento specifico ascorbato aumenta la potenza di chemioterapici citostatici certo, che implica un beneficio terapeutico durante il trattamento del tumore.

41: Roomi MW, Roomi NW, Kalinovsky T, Niedzwiecki A, Rath M.

**In vivo and In vitro effect of a nutrient mixture on human hepatocarcinoma cell line SK-HEP 1.**

ExpOncol. 2010 Jul;32(2):84-91. PubMed PMID: 20693968.

Long-term survival of patients with hepatocellular carcinoma (HCC), a common cancer worldwide, remains poor, due to metastasis and recurrence.

**AIM:** To investigate the effect of a novel nutrient mixture (NM) containing ascorbic acid, lysine, proline, and green tea extract on human HCC cell line Sk-Hep-1 In vivo and In vitro.

**METHODS:** After one week of isolation, 5-6 week old male athymic nude mice were inoculated with  $3 \times 10^6$  SK-Hep-1 cells subcutaneously and randomly divided into two groups; group A was fed a regular diet and group B a regular diet supplemented with 0.5% NM. Four weeks later, the mice were sacrificed and their tumors were excised, weighed and processed for histology. We also tested the effect of NM In vitro on SK-Hep-1 cells, measuring cell proliferation by MTT assay, invasion through Matrigel, apoptosis by green caspase detection kit, MMP secretion by zymography, and morphology by H&E staining.

**RESULTS:** NM inhibited tumor weight and burden of SK-Hep-1 xenografts by 42% and 33% respectively. In vitro , NM exhibited 33% toxicity over the control at 500 and 1,000 microg/ml concentration. Zymography demonstrated MMP-2 and MMP-9 secretion which was inhibited by NM in a dose dependent fashion, with virtual total inhibition at 1000 microg/ml. Invasion through Matrigel was inhibited at 100, 500 and 1,000 microg/ml by 53%, 83% and 100% respectively. NM

induced slight apoptosis at 100 microg/ml, and profound apoptosis at 500 microg/ml and 1000 microg/ml concentration.

**CONCLUSIONS:** These results suggest that NM has therapeutic potential in treatment of HCC.

### **Effetto in vitro e in vivo di una miscela di nutrienti sulla linea cellulare umana di epatocarcinoma SK-HEP 1**

**OBIETTIVO:** Per studiare l'effetto di una miscela di nutrienti romanzo (NM), contenenti acido ascorbico, lisina, prolina, ed estratto di tè verde su cellule umane di carcinoma epatocellulare linea Sk-Hep-1 in vivo e in vitro.

**METODI:** Dopo una settimana di isolamento, 5-6 settimane di età maschile atimici topi nudi sono state inoculate con  $3 \times 10^6$  SK-Hep-1 le cellule per via sottocutanea e divisi casualmente in due gruppi: un gruppo è stato nutrito con una dieta regolare e di gruppo B una regolare dieta integrata con lo 0,5% NM. Quattro settimane dopo, i topi sono stati sacrificati e loro tumori sono stati asportati, pesati e trattati per istologia. Abbiamo anche testato l'effetto di NM in vitro su SK-Hep-1 celle, misura la proliferazione cellulare mediante saggio MTT, l'invasione attraverso Matrigel, l'apoptosi da kit verde rilevazione caspasi, la secrezione di MMP da zimografia, e morfologia da H & E colorazione.

**RISULTATI:** NM inibito peso del tumore e l'onere di SK-Hep-1 eterotrapianti del 42% e 33% rispettivamente. In vitro, NM esposto tossicità 33% nel corso del controllo a 500 e 1.000 microg / ml di concentrazione. Zimografia dimostrato MMP-2 e MMP-9 che è stata inibita la secrezione da NM in modo dose dipendente, con virtuale inibizione totale a 1000 microg / ml. Invasione attraverso Matrigel è stato inibito a 100, 500 e 1.000 microg / ml per il 53%, 83% e 100% rispettivamente. NM apoptosi indotta da lieve a 100 microg / ml, e l'apoptosi profondo a 500 microg / ml e 1000 microg / ml di concentrazione.

**CONCLUSIONI:** Questi risultati suggeriscono che NM ha un potenziale terapeutico nel trattamento del carcinoma epatocellulare.

42: Chaves Neto AH, Yano CL, Paredes-Gamero EJ, Machado D, Justo GZ, Peppelenbosch MP, Ferreira CV.

### **Riboflavin and photoproducts in MC3T3-E1 differentiation.**

Toxicol In Vitro. 2010 Oct;24(7):1911-9. Epub 2010 Aug 3. PubMedPMID: 20688149.

Photoderivatives of riboflavin can modulate the proliferation and survival of cancer cells. In this work, we examined the influence of riboflavin and photoderivatives on osteoblast differentiation induced by ascorbic acid and  $\beta$ -glycerophosphate. These compounds decreased the osteoblast proliferation, increased the alkaline phosphatase activity, promoted a reduction in matrix metalloproteinase-2 activity and the decreased in the OPG/RANKL ratio. The effects of flavins on osteoblasts were unrelated to the antioxidant activity of these compounds. The biological activity of osteogenic medium containing riboflavin and its photoderivatives involved the activation of different signaling pathways (AKT, FAK, CaMKII), caspases-3, -8 and -9, and up-regulation of the expression and/or stabilization of osteoblastic transcription factors (Runx2 and  $\beta$ -catenin). These findings suggest a potential use of flavins as adjuvants to improve bone metabolism.

### **Riboflavina e fotoprodotti nella differenziazione di MC3T3-E1**

I fotoderivatives di riboflavina in grado di modulare la proliferazione e la sopravvivenza delle cellule tumorali. In questo lavoro, abbiamo esaminato l'influenza della riboflavina e photoderivatives sulla differenziazione degli osteoblasti indotta da acido ascorbico e  $\beta$ -

glicerofosfato. Questi composti ridotto la proliferazione degli osteoblasti, aumentato l'attività di fosfatasi alcalina, ha promosso una riduzione della matrice metalloproteinasi-2 e la diminuita nel rapporto OPG RANKL. Gli effetti di flavine sugli osteoblasti non sono collegati alla attività antiossidante di questi composti. L'attività biologica di riboflavina medium osteogenico che contengono e la sua photoderivatives coinvolto l'attivazione di diverse vie di segnalazione (AKT, FAK, CaMKII), caspasi-3, -8 e -9, e up-regolazione dell'espressione e / o stabilizzazione di trascrizione osteoblastica fattori (Runx2 e  $\beta$ -catenina). Questi risultati suggeriscono un potenziale uso di flavine come coadiuvanti per migliorare il metabolismo osseo.

53: Vita MF, Nagachar N, Avramidis D, Delwar ZM, Cruz MH, Siden A, Paulsson KM, Yakisich JS.

**Pankiller effect of prolonged exposure to menadione on glioma cells: potentiation by vitamin C.**

Invest New Drugs. 2010 Jul 13. [Epub ahead of print]PubMed PMID: 20625795.

Menadione (Vitamin K3) has anti-tumoral effects against a wide range of cancer cells. Its potential toxicity to normal cells and narrow therapeutic range limit its use as single agent but in combination with radiation or other anti-neoplastic agents can be of therapeutic use. In this paper, we first evaluated the early (within 3 h) effect of menadione on ongoing DNA replication. In normal rat cerebral cortex mini-units menadione showed an age dependent anti-proliferative effect. In tissue mini-units prepared from newborn rats, menadione inhibited ongoing DNA replication with an IC (50) of approximately 10  $\mu$ M but 50  $\mu$ M had no effect on mini-units from prepared adult rat tissue. The effect of short (72 h) and prolonged exposure (1-2 weeks) to menadione alone in the DBTRG.05MG human glioma cells line and in combination with vitamin C was studied. After short period of exposure data show that menadione alone or in combination with vitamin C provided similar concentration-response curves (and IC(50) values). Prolonged exposure to these drugs was evaluated by their ability to kill 100% of glioma cells and prevent regrowth when cells are re-incubated in drug-free media. In this long-term assay, menadione: vitamin C at a ratio 1:100 showed higher anti-proliferative activity when compared to each drug alone and allowed to reduce each drug concentration between 2.5 to 5-fold. Similar anti-proliferative effect was demonstrated in 8

patient derived glioblastoma cell cultures. Our data should be able to encourage further advanced studies on animal models to evaluate the potential use of this combination therapy for glioma treatment.

### **Effetto antidolorifico di una esposizione prolungata al menadione nelle cellule di glioma: potenziamento della vitamina C**

Il menadione (vitamina K3) ha effetti anti-tumorali contro una vasta gamma di cellule tumorali. La sua potenziale tossicità per le cellule normali e stretto range terapeutico limitare il suo uso come agente singolo, ma in combinazione con radiazioni o di altri agenti anti-neoplastici può essere di uso terapeutico. In questo lavoro, abbiamo prima valutato la precoce (entro 3 ore) di menadione effetto sulla replicazione del DNA in corso. Nel ratto normale corteccia cerebrale menadione mini-unità ha mostrato un effetto a carico di età anti-proliferativa. Nel tessuto mini-unità preparata dai ratti appena nati, menadione inibito la replicazione del DNA in corso con un IC (50) di circa 10 ma il 50 mamma mamma ha avuto alcun effetto sul mini-unità di tessuto preparate ratto adulto. L'effetto di breve durata (72 h) e l'esposizione prolungata (1-2 settimane) per menadione solo nella linea di glioma umano DBTRG.05MG cellule e in combinazione con la vitamina C è stato studiato. Dopo breve periodo di esposizione di dati mostrano che menadione solo o in combinazione con la vitamina C a condizione simile curve concentrazione-risposta (e IC (50) valori). L'esposizione prolungata a questi farmaci è stata valutata la loro capacità di uccidere il 100% delle cellule di glioma e di prevenire la ricrescita quando le cellule sono incubate di nuovo in media libera dalla droga. In questo test a lungo termine, menadione: vitamina C con un rapporto 1:100 dimostrato una maggiore attività anti-proliferativa rispetto a ciascun farmaco da solo e ha permesso di ridurre ogni concentrazione di droga tra 2,5 a 5 volte. Simile effetto anti-proliferativo è stata dimostrata in 8 culture glioblastoma paziente derivato cellule. I nostri dati dovrebbero essere in grado di incoraggiare ulteriori studi avanzati su modelli animali per valutare l'uso potenziale di questa terapia di combinazione per il trattamento del glioma.

56: Ezzedine K, Latreille J, Kesse-Guyot E, Galan P, Hercberg S, Guinot C, Malvy D.

### **Incidence of skin cancers during 5-year follow-up after stopping antioxidant vitamins and mineral supplementation.**

Eur J Cancer. 2010 Dec;46(18):3316-22. Epub2010 Jul 6. PubMed PMID: 20605091.

**CONTEXT:** In the SU.VI.MAX study, antioxidant supplementation for 7.5 years was found to increase skin cancer risk in women but not in men.

**OBJECTIVE:** To investigate the potential residual or delayed effect of antioxidant supplementation on skin cancer incidence after a 5-year post-intervention follow-up.

**DESIGN, SETTING AND PARTICIPANTS:** Assessment of skin cancer including melanoma and non-melanoma during the post-intervention follow-up (September 2002-August 2007). The SU.VI.MAX study was a double-blind, placebo-controlled, randomised trial, in which 12,741 French adults (7713 women aged 35-60 years and 5028 men aged 45-60 years) received daily a placebo or a combination of ascorbic acid (120 mg), vitamin E (30 mg),  $\beta$ -carotene (6 mg), selenium (100  $\mu$ g) and zinc (20mg), from inclusion in 1994 to September 2002.

**MAIN OUTCOME MEASURES:** Total skin cancer incidence, including melanoma, squamous cell carcinoma and basal cell carcinoma.

**RESULTS:** During the post-intervention period, 10 melanomas appeared in women and 9 in men (26 and 18, respectively, for the total period of supplementation+post-supplementation). Six squamous cell carcinomas were found in women and 15 in men (10 and 25, respectively, for the

total period). Finally, 40 basal cell carcinomas appeared in women and 36 in men (98 and 94, respectively, for the total period). Regarding potential residual or delayed effects of supplementation in women, no increased risk of melanoma was observed during the post-intervention follow-up period. No delayed effects, either on melanoma or non-melanoma skin cancers, were observed for either gender.

**CONCLUSIONS:** The risk of skin cancers associated with antioxidant intake declines following interruption of supplementation. This supports a causative role for antioxidants in the evolution of skin cancers.

### **Incidenza di cancro alla pelle durante un follow up di 5 anni dopo la sospensione di vitamine antiossidanti e integratori alimentari**

**CONTESTO:** Nello studio SU.VI.MAX, la supplementazione di antiossidanti per 7,5 anni è stata trovata per aumentare il rischio di cancro della pelle in donne ma non negli uomini.

**OBIETTIVO:** Per studiare l'effetto potenziale residuo o ritardato della supplementazione di antiossidanti sull'incidenza del cancro della pelle dopo 5 anni post-intervento di follow-up.

**DISEGNO, REGOLAZIONE E PARTECIPANTI:** Valutazione di cancro della pelle tra cui il melanoma e non-melanoma nel corso del-intervento follow-up post (settembre 2002-agosto 2007).

Lo studio SU.VI.MAX è stato un double-blind, placebo-controllato, randomizzato, in cui 12.741 adulti francesi (7.713 donne di età 35-60 anni e 5.028 uomini di età 45-60 anni) hanno ricevuto un placebo al giorno o una combinazione di acido ascorbico (120 mg), vitamina E (30 mg),  $\beta$ -carotene (6 mg), selenio (100 mg) e zinco (20mg), dall'inclusione nel 1994 a settembre 2002.

**MISURE PRINCIPALI DI RISULTATO:** In totale l'incidenza del cancro della pelle, tra cui melanoma, carcinoma a cellule squamose e di carcinoma basocellulare.

**RISULTATI:** Durante il periodo post-intervento, 10 melanomi apparso nelle donne e 9 uomini (26 e 18, rispettivamente, per il periodo complessivo di integrazione + post-integrazione). Sei carcinomi a cellule squamose sono stati trovati nelle donne e 15 negli uomini (10 e 25, rispettivamente, per il periodo totale). Infine, il 40 carcinomi a cellule basali è apparso nelle donne e 36 negli uomini (98 e 94, rispettivamente, per il periodo totale).

Per quanto riguarda i potenziali effetti residuali o ritardata integrazione delle donne, nessun aumento del rischio di melanoma è stato osservato durante il follow post-intervento-up. Nessun effetto ritardato, su tumori della pelle o melanoma non-melanoma, sono stati osservati per entrambi i sessi.

**CONCLUSIONI:** Il rischio di tumori cutanei associati con apporto di antiossidanti diminuisce in seguito ad interruzione della supplementazione. Questo sostiene un ruolo causale per gli antiossidanti per l'evoluzione dei tumori della pelle.

57: Maruyama K, Iso H, Ito Y, Watanabe Y, Inaba Y, Tajima K, Nakachi K, Tamakoshi A

**Associations of food and nutrient intakes with serum IGF-I, IGF-II, IGFBP-3, TGF- $\beta$ 1, total SOD activity and sFas levels among middle-aged Japanese: the Japan Collaborative Cohort study.**

JACC Study Group. Asian Pac J Cancer Prev. 2009Dec;10 Suppl:7-22. PubMed PMID: 20553076.

No observational study has examined whether cancer-related biomarkers are associated with diet in Japanese. We therefore assessed sex-specific food and nutrient intakes according to serum IGF-I, IGF-II, IGFBP-3, TGF- $\beta$ 1, total SOD activity and sFas levels, under a cross-sectional study of 10,350 control subjects who answered the food frequency questionnaire in the first-wave nested case-control study within the Japan Collaborative Cohort Study. For both men and women, IGF-I levels were associated with higher intakes of milk, fruits, green tea, calcium and vitamin C. IGF-II levels were associated with higher intakes of milk, yogurt, fruits and miso soup, and lower intakes of rice, coffee and carbohydrate. IGFBP-3 levels were associated with higher intakes of milk, yogurt, fruits and vitamin C, and lower intakes of rice, energy, protein, carbohydrate, sodium and polyunsaturated fatty acids. TGF- $\beta$ 1 levels were associated with lower intakes of coffee intakes, and higher intakes of miso soup and sodium. Total SOD activity levels were associated with lower intakes of most nutrients other than energy, carbohydrate, iron, copper, manganese, retinol equivalents, vitamin A, B2, B12, niacin, folic acid, vitamin C and fish fat. sFas levels were associated with higher intakes of manganese and folic acids. The results of the present study should

help to account for findings on those biomarkers regarding risks of cancer and other lifestyle-related diseases in terms of dietary confounding as causality.

### **Associazioni di assunzioni di cibo e nutrienti con I livelli nel siero di IGF-I, IGF-II, IGFBP-3, TGF-b1, attività totale di SOD e sFas tra i giapponesi di mezza età: uno studio di coorte giapponese**

Nessuno studio osservazionale ha valutato se i biomarcatori correlati al cancro sono associati a una dieta in giapponese. Abbiamo quindi valutato gli alimenti specifici per sesso ed assunzione di nutrienti secondo la concentrazione sierica di IGF-I, IGF-II, IGFBP-3, TGF-b1, l'attività SOD totale e livelli di acidi grassi saturi, in uno studio cross-sezionale di 10.350 soggetti di controllo che hanno risposto al cibo questionario di frequenza nella prima ondata nested studio caso-controllo all'interno del Collaborative Cohort Study Giappone. Per entrambi gli uomini e le donne, i livelli di IGF-I sono stati associati con una maggiore assunzione di latte, frutta, tè verde, calcio e vitamina C. I livelli di IGF-II sono stati associati con una maggiore assunzione di latte, yogurt, frutta e zuppa di miso, e più bassi introiti di riso, caffè e carboidrati. IGFBP-3 sono stati associati con livelli più elevati introiti di latte, yogurt, frutta e vitamina C, e più bassi introiti di riso, l'energia, proteine, carboidrati, sodio e acidi grassi polinsaturi. TGF-b1 livelli sono stati associati a più bassi introiti di assunzione di caffè, e più elevati introiti di zuppa di miso e sodio. Totale dei livelli di attività SOD erano associati a più bassi introiti di più sostanze nutritive diverse da energia, carboidrati, ferro, rame, manganese, equivalenti di retinolo, la vitamina A, B2, B12, niacina, acido folico, vitamina C e di pesce grasso. SFAS livelli sono stati associati con una maggiore assunzione di acidi manganese e folico. I risultati del presente studio dovrebbero aiutare a spiegare conclusioni su tali biomarcatori quanto riguarda i rischi di cancro e di altre malattie legate allo stile di vita in termini di confondere la dieta come la causalità.

58: Cooper K, Squires H, Carroll C, Papaioannou D, Booth A, Logan RF, Maguire C, Hind D, Tappenden P.

### **Chemoprevention of colorectal cancer: systematic review and economic evaluation.**

Health Technol Assess. 2010 Jun;14(32):1-206. Review. PubMedPMID: 20594533.

**BACKGROUND:** Colorectal cancer (CRC) is the third most common cancer in the UK: incidence increases with age, median age at diagnosis being over 70 years. Approximately 25% of cases occur in individuals with a family history of CRC, including 5% caused by familial adenomatous polyposis (FAP) or hereditary non-polyposis CRC (HNPCC). Most develop from adenomatous polyps arising from the intestine lining. Individuals with these polyps undergo polypectomy and are invited for endoscopic surveillance. Screening via faecal occult blood testing has been rolled out across the UK.

**OBJECTIVES:** To evaluate the clinical effectiveness and cost-effectiveness of drug and micronutrient interventions for the prevention of CRC and/or adenomatous polyps. Interventions considered include: non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), including aspirin and cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors; folic acid; calcium; vitamin D and antioxidants (including vitamin A, vitamin C, vitamin E, selenium and beta-carotene). Chemoprevention was assessed in the general population, in individuals at increased risk of CRC, and in individuals with FAP or HNPCC.

**DATA SOURCES:** A systematic review identified randomised controlled trials (RCTs) assessing drug and nutritional agents for the prevention of CRC or adenomatous polyps. A separate search identified qualitative studies relating to individuals' views, attitudes and beliefs about chemoprevention. MEDLINE, MEDLINE In-Process & Other Non-Indexed Citations, EMBASE, CINAHL, the Cochrane Database of Systematic Reviews, Cochrane CENTRAL Register of Controlled Trials, DARE, NHS-EED (NHS Economic Evaluation Database), HTA database, Science Citation Index, BIOSIS previews and the Current Controlled Trials research register were searched in June 2008. Data were extracted by one reviewer and checked by a second.

**REVIEW METHODS:** The synthesis methods used were systematic review and meta-analysis for RCTs and qualitative framework synthesis for qualitative studies. A health economic model was developed to assess the cost-effectiveness of chemoprevention for two populations with different levels of risk of developing CRC: the general population and an intermediate-risk population.

**RESULTS:** The search identified 44 relevant RCTs and six ongoing studies. A small study of aspirin in FAP patients produced no statistically significant reduction in polyp number but a possible reduction in polyp size. There was a statistically significant 21% reduction in risk of adenoma recurrence [relative risk (RR) 0.79, 95% confidence interval (CI) 0.68 to 0.92] in an analysis of aspirin versus no aspirin in individuals with a history of adenomas or CRC. In the general population, a significant 26% reduction in CRC incidence was demonstrated in studies with a 23-year follow-up (RR 0.74, 95% CI 0.57 to 0.97). Non-aspirin NSAID use in FAP individuals produced a non-statistically significant reduction in adenoma incidence after 4 years of treatment and follow-up and reductions in polyp number and size. In individuals with a history of adenomas there was a statistically significant 34% reduction in adenoma recurrence risk (RR 0.66, 95% CI 0.60 to 0.72) and a statistically significant 55% reduction in advanced adenoma incidence (RR 0.45, 95% CI 0.35 to 0.58). No studies assessed the effect of non-aspirin NSAIDs in the general population. There were no studies of folic acid in individuals with FAP or HNPCC. There was no significant effect of folic acid versus placebo on adenoma recurrence (RR 1.16, 95% CI 0.97 to 1.39) or advanced adenoma incidence in individuals with a history of adenomas. In the general population there was no significant effect of folic acid on risk of CRC (RR 1.13, 95% CI 0.77 to 1.64), although studies were of relatively short duration. Calcium use by FAP patients produced no significant reduction in polyp number or disease progression. In individuals with a history of adenomas there was a statistically significant 18% reduction in risk of adenoma recurrence (RR 0.82, 95% CI 0.69 to 0.98) and a non-significant reduction in risk of advanced adenomas (RR 0.77, 95% CI 0.50 to 1.17). In the general population there was no significant effect of calcium on risk of CRC (RR 1.08, 95% CI 0.87 to 1.34), although studies were of relatively short duration. There were no studies of antioxidant use in individuals with FAP or HNPCC, and in individuals with a history of adenomas no statistically significant differences in relative risk of adenoma recurrence were found. In the general population there was no difference in incidence of CRC (RR 1.00, 95% CI 0.88 to 1.13) with antioxidant use compared with no antioxidant use. Twenty studies reported qualitative findings concerning chemoprevention. People are more likely to use NSAIDs if there is a strong perceived need. Perceptions of risk and benefit also influence decision-making and use. People have fewer concerns about using antioxidants or other supplements, but their perception of the benefits of these agents is less well-defined. The model analysis suggested that the most cost-effective age-range policy in the general population would be to provide chemoprevention to all individuals within the general population from age 50 to 60 years. The use of aspirin in addition to screening within the general population is likely to result in a discounted cost per life-year gained of around 10,000 pounds and a discounted cost per quality-adjusted life-year (QALY) gained of around 23,000 pounds compared with screening alone. In the intermediate-risk group the most economically viable age-range policy would be to provide chemoprevention to individuals following polypectomy aged 61 to 70 years. Calcium is likely to have a discounted cost per QALY gained of around 8000 pounds compared with screening alone. Although aspirin in addition to screening should be more effective and less costly than screening alone, under the current

assumptions of benefits to harms of aspirin and calcium, aspirin is expected to be extendedly dominated by calcium.

**LIMITATIONS:** Whilst a number of studies were included in the review, the duration of follow-up was generally insufficient to detect an effect on cancer incidence. Given the uncertainties and ambiguities in the evidence base, the results of the health economic analysis should be interpreted with caution.

**CONCLUSIONS:** Aspirin and celecoxib may reduce recurrence of adenomas and incidence of advanced adenomas in individuals with an increased risk of CRC and calcium may reduce recurrence of adenomas in this group. COX-2 inhibitors may decrease polyp number in patients with FAP. There is some evidence for aspirin reducing the incidence of CRC in the general population. Both aspirin and NSAIDs are associated with adverse effects so it will be important to consider the risk-benefit ratio before recommending these agents for chemoprevention. The economic analysis suggests that chemoprevention has the potential to represent a cost-effective intervention, particularly when targeted at intermediate-risk populations following polypectomy.

### **Chemioprevenzione nel cancro colonrettale: revisione sistematica e valutazione economica**

**BACKGROUND:** il cancro del colon-retto (CRC) è il terzo tumore più comune nel Regno Unito: l'incidenza aumenta con l'età, l'età mediana alla diagnosi è di oltre 70 anni. Circa il 25% dei casi si verifica in soggetti con una storia familiare di CRC, di cui 5% causato da poliposi adenomatosa familiare (FAP) o ereditario non-poliposi CRC (HNPCC). La maggior parte si sviluppano da polipi adenomatosi derivanti dal rivestimento dell'intestino. Gli individui con questi polipi e sottoposti a polipectomia sono invitati per la sorveglianza endoscopica. Lo screening tramite test del sangue occulto fecale è stato esteso a tutto il Regno Unito.

**OBIETTIVI:** Valutare l'efficacia clinica e di costo-efficacia del farmaco e dei micronutrienti interventi per la prevenzione del CRC e / o di polipi adenomatosi. Gli interventi presi in considerazione comprendono: farmaci anti-infiammatori non steroidei (FANS), tra cui l'aspirina e la ciclo-ossigenasi-2 (COX-2 inibitori), acido folico, calcio, vitamina D e di antiossidanti (tra cui la vitamina A, vitamina C, vitamina E, selenio e beta-carotene). Chemioprevenzione è stata valutata nella popolazione generale, in soggetti ad aumentato rischio di CRC, ed in individui con FAP o HNPCC.

**FONTE DEI DATI:** Una revisione sistematica ha individuato studi randomizzati e controllati (RCT) la valutazione della droga e gli agenti nutrizionali per la prevenzione del CRC o di polipi adenomatosi. Una ricerca separata individuato gli studi qualitativi relativi al punto di vista gli individui, atteggiamenti e credenze sulla chemioprevenzione. MEDLINE, MEDLINE In-Process & Altro Citazioni non indicizzati, EMBASE, CINAHL, il Cochrane Database of Systematic Recensioni, CENTRALE Cochrane Controlled Trials Register of, DARE, NHS-EED (NHS Economic Evaluation Database), database HTA, Science Citation Index, antepime BIOSIS e la corrente Controlled Trials registro di ricerca sono stati perquisiti nel giugno 2008. I dati sono stati estratti da un critico e controllato da un secondo.

**RASSEGNA METODI:** La sintesi dei metodi utilizzati sono stati revisione sistematica ed una meta-analisi di RCT e di sintesi quadro qualitativo per studi qualitativi. Un modello di salute economica è stato sviluppato per valutare il rapporto costo-efficacia della chemioprevenzione per due popolazioni con differenti livelli di rischio di sviluppare CRC: la popolazione e con una popolazione a rischio intermedio.

**RISULTATI:** La ricerca ha identificato 44 studi randomizzati rilevanti e sei studi in corso. Un piccolo studio di aspirina in pazienti FAP non ha prodotto una riduzione statisticamente significativa nel numero di polipi, ma una possibile riduzione delle dimensioni dei polipi. C'è stata una riduzione statisticamente significativa del 21% nel rischio di recidiva adenoma [rischio relativo (RR) 0,79, intervallo di confidenza al 95% (CI) 0,68-,92] in una analisi di aspirina versus aspirina non in individui con una storia di adenomi o CRC. Nella popolazione generale, una riduzione

significativa del 26% dell'incidenza di CRC è stata dimostrata in studi con un 23-year follow-up (RR 0,74, IC 95% 0,57-0,97). FANS non-Aspirina uso in soggetti FAP prodotto una riduzione statisticamente non significativa nell'incidenza di adenoma dopo 4 anni di trattamento e follow-up e la riduzione in numero e dimensioni dei polipi. Negli individui con una storia di adenomi c'è stata una riduzione statisticamente significativa del 34% nel rischio di adenoma recidive (RR 0,66, IC 95% 0,60-0,72) e una riduzione statisticamente significativa del 55% nell'incidenza di adenoma avanzato (RR 0,45, IC 95% da 0,35 a 0,58). Nessuno studio ha valutato l'effetto dei FANS non-Aspirina nella popolazione generale. Non ci sono stati studi di acido folico in individui con FAP o HNPCC. Non c'era alcun effetto significativo di acido folico rispetto al placebo sulla reiterazione adenoma (RR 1,16, IC 95% 0,97-1,39) o di adenoma avanzato incidenza nei soggetti con storia di adenomi. Nella popolazione generale, non vi è stato alcun effetto significativo di acido folico sul rischio di CRC (RR 1,13, 95% CI 0,77-1,64), anche se studi sono stati di durata relativamente breve. utilizzo di calcio da parte dei pazienti FAP non ha prodotto una significativa riduzione nel numero polipo o la progressione della malattia. Negli individui con una storia di adenomi c'è stata una riduzione statisticamente significativa del 18% nel rischio di recidiva adenoma (RR 0,82, IC 95% da 0,69-0,98) e una riduzione non significativa del rischio di adenomi avanzati (RR 0,77, IC 95%: 0,50 al 1,17). Nella popolazione generale non vi era alcun effetto significativo di calcio sul rischio di CRC (RR 1,08, 95% CI 0,87-1,34), anche se studi sono stati di durata relativamente breve. Non ci sono state le ricerche sull'uso dei antiossidanti in soggetti con FAP o HNPCC, e in individui con una storia di adenomi differenze statisticamente significative nel rischio relativo di recidiva adenoma sono stati trovati. Nella popolazione generale non vi era alcuna differenza nell'incidenza di CRC (RR 1,00, IC 95% 0,88-1,13), con utilizzo antiossidanti rispetto al non uso antiossidante. Venti studi hanno riportato risultati qualitativi in materia di chemioprevenzione. Le persone sono più propensi a usare i FANS se vi è un forte bisogno percepito. Percezione del rischio e beneficio anche influenzare i processi decisionali e l'uso. Le persone hanno meno preoccupazioni antiossidanti utilizzando o altri integratori, ma la loro percezione dei benefici di questi farmaci è meno ben definita. Il modello di analisi suggerisce che la politica più conveniente età compresa nella popolazione generale sarebbe quello di fornire chemioprevenzione a tutti gli individui all'interno della popolazione generale dai 50 anni ai 60 anni. L'uso di aspirina in aggiunta a screening nella popolazione generale è suscettibile di provocare un costo scontato per anno di vita guadagnato di circa 10.000 sterline e un costo scontato per adeguamento della qualità, anno di vita (QALY) acquisita di circa 23.000 sterline a confronto con screening da solo. Nel gruppo a rischio intermedio la politica più economicamente sostenibile età compresa sarebbe quello di fornire ai singoli chemioprevenzione seguente polipectomia 61 anni a 70 anni. Il calcio può avere un costo scontato per QALY guadagnato di circa 8000 sterline a confronto con lo screening solo. Anche se l'aspirina in aggiunta a screening dovrebbe essere più efficace e meno costoso di screening da solo, sotto le ipotesi attuali di benefici per danni di aspirina e calcio, l'aspirina dovrebbe essere extendedly dominato dal calcio.

LIMITAZIONI: mentre un certo numero di studi sono stati inclusi nella revisione, la durata del follow-up era generalmente insufficiente per rilevare un effetto sull'incidenza del cancro. Date le incertezze e le ambiguità della base dati, i risultati delle analisi di salute economica devono essere interpretati con cautela.

CONCLUSIONI: Aspirina e celecoxib possono ridurre le recidive di adenomi e l'incidenza di adenomi avanzati nei soggetti con un aumentato rischio di CRC e di calcio possono ridurre le recidive di adenomi in questo gruppo. COX-2 inibitori possono diminuire il numero dei polipi in pazienti con FAP. Ci sono alcune prove per l'aspirina ridurre l'incidenza di CRC nella popolazione generale. Sia l'aspirina e i FANS sono associati ad effetti avversi, quindi sarà importante considerare il rapporto rischio-beneficio prima di consigliare questi agenti per la chemioprevenzione. L'analisi economica suggerisce che la chemioprevenzione ha le potenzialità per rappresentare un intervento costo-efficace, soprattutto se destinato alle popolazioni a rischio intermedio dopo polipectomia.

62: Nath RG, Wu MY, Emami A, Chung FL.

**Effects of epigallocatechin gallate, L-ascorbic acid, alpha-tocopherol, and dihydrolipoic acid on the formation of deoxyguanosine adducts derived from lipid peroxidation.**

Nutr Cancer. 2010Jul;62(5):622-9. PubMed PMID: 20574923.

Oxidation of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) releases alpha,beta-unsaturated aldehydes that modify deoxyguanosine (dG) to form cyclic 1,N(2)-propanodeoxyguanosine adducts. One of the major adducts detected in vivo is acrolein (Acr)-derived 1,N(2)-propanodeoxyguanosine (Acr-dG). We used a chemical model system to examine the effects of 4 antioxidants known to inhibit fatty acid oxidation on the formation of Acr-dG and 8-oxodeoxyguanosine (8-oxodG) from the PUFA docosahexaenoic acid (DHA) under oxidative conditions. We found that epigallocatechin gallate (EGCG) and dihydrolipoic acid (DHLA) inhibit both Acr-dG and 8-oxodG formation. In contrast, ascorbic acid and alpha-tocopherol actually increase Acr-dG at high concentrations and do not show a concentration-dependant inhibition of 8-oxodG. We also studied their effects on blocking Acr-dG formation directly from Acr. EGCG and DHLA can both effectively block Acr-dG formation, but ascorbic acid and alpha-tocopherol show weak or little effect. These results highlight the complexity of antioxidant mechanisms and also reveal that EGCG and DHLA are effective at

suppressing lipid peroxidation-induced Acr-dG and 8-oxodG formation as well as blocking the reaction of dG with Acr.

### **Effetti di epigallocatechina gallato, L-acido ascorbico, alfa-tocoferolo, e acido diidrolipoico sulla formazione degli addotti di deossiguanosina derivati dalla perossidazione dei lipidi**

Ossidazione degli acidi grassi polinsaturi (PUFA) versioni alfa, beta-insature che modificano deossiguanosina (dG) a forma ciclica 1, N addotti (2)-propanodeoxyguanosine. Uno dei principali addotti rilevato in vivo è acroleina (ACR) di derivazione 1, N (2)-propanodeoxyguanosine (ACR-dG). Abbiamo usato un sistema chimico modello per esaminare gli effetti dei 4 antiossidanti che inibiscono l'ossidazione degli acidi grassi sulla formazione di Acr-DG e 8-oxodeoxyguanosine (8-oxodG) dal PUFA acido docosaesaenoico (DHA) in condizioni di ossidazione. Abbiamo scoperto che epigallocatechina gallato (EGCG) e l'acido diidrolipoico (DHHLA) inibiscono sia Acr-dG e la formazione di 8-oxodG. Al contrario, l'acido ascorbico e alfa-tocoferolo effettivamente aumentano Acr-dG a concentrazioni elevate e non mostrano una inibizione concentrazione-dipendente di 8-oxodG. Abbiamo anche studiato i loro effetti sulla formazione di blocco Acr-dG direttamente da ACR. EGCG e DHHLA può bloccare in modo efficace sia la formazione Acr-dG, ma l'effetto spettacolo acido ascorbico e alfa-tocoferolo deboli o poco. Questi risultati evidenziano la complessità dei meccanismi antiossidanti e rivelano anche che l'EGCG e DHHLA sono efficaci nel sopprimere la perossidazione lipidica indotta Acr-dG e la formazione di 8-oxodG così come il blocco della reazione della DG con Acr.

63: Yang YJ, Hwang SH, Kim HJ, Nam SJ, Kong G, Kim MK.

### **Dietary intake of nitrate relative to antioxidant vitamin in relation to breast cancer risk: a case-control study.**

Nutr Cancer. 2010 Jul;62(5):555-66. PubMed PMID: 20574916.

Nitrate is a precursor in the endogenous formation of N-nitroso compounds, which are potent animal carcinogens, whereas antioxidant vitamins have been suggested to protect against carcinogenesis. Interestingly, nitrate and antioxidant vitamins stem from the same dietary sources. We investigated whether the intake of nitrate relative to antioxidant vitamins is associated with the risk of breast cancer. A total of 362 breast cancer cases were matched to the 362 controls by age and menopausal status. Dietary intake was assessed using a quantitative food frequency questionnaire with 121 food items by trained interviewers. The nitrate to antioxidant vitamin consumption ratio was then calculated. Conditional logistic regression analysis was used to obtain odds ratios (ORs) and corresponding 95% confidence intervals (CI). Mean intakes of nitrate for cases and controls were 421 mg/day and 424 mg/day, respectively. Intakes of nitrate, nitrate/beta-carotene, nitrate/vitamin C, and nitrate/vitamin E were not associated with breast cancer risk. However, higher breast cancer risk was observed with higher intake of nitrate/folate (OR = 2.03, 95% CI =

1.16-3.54, P for trend = 0.052). Our results suggest that lowering the ratio of nitrate to folate intake may be effective in reducing breast cancer risk.

### **Assunzione di nitrato rispetto alle vitamine antiossidanti in relazione al rischio di cancro al seno: uno studio caso-controllo**

Il nitrato è un precursore nella formazione endogena di N-nitroso composti, che sono potenti cancerogeni di origine animale, mentre le vitamine antiossidanti sono state proposte per la protezione contro la carcinogenesi. È interessante notare che, vitamine e antiossidanti nitrati derivano dalle stesse fonti alimentari. Abbiamo studiato se l'assunzione di nitrati rispetto alle vitamine antiossidanti è associata con il rischio di cancro al seno. Un totale di casi di cancro al seno 362 sono stati abbinati ai 362 controlli per età e stato menopausale. Assunzione alimentare è stata valutata utilizzando un questionario di frequenza alimentare quantitativa con 121 prodotti alimentari da intervistatori addestrati. Il nitrato di rapporto tra consumo di vitamine antiossidanti è stato quindi calcolato. Analisi di regressione logistica condizionale è stato utilizzato per ottenere odds ratio (OR) e corrispondenti intervalli di confidenza al 95% (CI). L'assunzione media di nitrati in casi e controlli sono stati 421 mg / die e 424 mg / die, rispettivamente. L'assunzione di nitrati, nitrato / beta-carotene, nitrati e vitamina C, e nitrati e vitamina E non sono stati associati al rischio di cancro al seno. Tuttavia, la maggiore rischio di carcinoma mammario è stata osservata con una maggiore assunzione di nitrato / folato (OR = 2.03, 95% CI = 1,16-3,54, p per trend = 0.052). I nostri risultati suggeriscono che la riduzione del rapporto tra assunzione di nitrati di folato può essere efficace nel ridurre il rischio di cancro al seno.

65: Kuiper C, Molenaar IG, Dachs GU, Currie MJ, Sykes PH, Vissers MC.

### **Low ascorbate levels are associated with increased hypoxia-inducible factor-1 activity and an aggressive tumor phenotype in endometrial cancer.**

Cancer Res.2010 Jul 15;70(14):5749-58.

Activation of the transcription factor hypoxia-inducible factor (HIF)-1 allows solid tumors to thrive under conditions of metabolic stress. Because HIF-1 is switched off by hydroxylation reactions that require ascorbate, inadequate intracellular ascorbate levels could contribute to HIF-1 overactivation. In this study, we investigated whether the ascorbate content of human endometrial tumors [known to be driven by HIF-1 and vascular endothelial growth factor (VEGF)] influenced HIF-1 activity and tumor pathology. We measured protein levels of HIF-1alpha and three downstream gene products [glucose transporter 1 (GLUT-1), Bcl-2/adenovirus E1B 19 kDa interacting protein 3 (BNIP3), and VEGF], as well as the ascorbate content of tumor and patient-matched normal endometrial tissue samples. HIF-1alpha and its downstream gene products were upregulated in tumor tissue, with the highest levels being present in high-grade tumors. High-grade tumors also had reduced capacity to accumulate ascorbate compared with normal tissue; however, all grades contained tumors with low ascorbate content. Tumors with the highest HIF-1alpha protein content

were ascorbate deficient. Low ascorbate levels were also associated with elevated VEGF, GLUT-1, and BNIP3 protein levels and with increased tumor size, and there was a significant association between low tissue ascorbate levels and increased activation of the HIF-1 pathway ( $P = 0.007$ ). In contrast, tumors with high ascorbate levels had lesser levels of HIF-1 activation. This study shows for the first time a likely in vivo relationship between ascorbate and HIF-1, with low tumor tissue ascorbate levels being associated with high HIF-1 activation and tumor growth.

### **Nel tumore all'endometrio livelli bassi di ascorbato sono associati all'attività del fattore 1 che induce aumento di ipossia e al fenotipo che corrisponde allo sviluppo di un tumore aggressivo**

L'attivazione del fattore di trascrizione fattore ipossia-inducibile (HIF) -1 tumori solidi permette di prosperare in condizioni di stress metabolico. Perché HIF-1 è spento da reazioni di idrossilazione che richiedono l'ascorbato, inadeguati livelli di ascorbato intracellulare potrebbe contribuire a HIF-1 iperattivazione. In questo studio, abbiamo studiato se il contenuto di acido ascorbico umano tumori dell'endometrio [nota per essere guidato da HIF-1 e fattore di crescita vascolare endoteliale (VEGF)] influenzato l'attività di HIF-1 e la patologia tumorale. Abbiamo misurato i livelli proteici di HIF-1alfa e tre prodotti del gene a valle [1 trasportatore del glucosio (GLUT-1), Bcl-2/adenovirus E1B 19 kDa interazione della proteina 3 (BNIP3) e VEGF], così come il contenuto di acido ascorbico di tumore e paziente-abbinato normali campioni di tessuto endometriale. -HIF 1alfa e dei suoi prodotti genici valle sono stati sovraregolati del tessuto tumorale, con il più alto livello di essere presenti in tumori ad alto grado. tumori ad alto grado ha avuto anche una ridotta capacità di accumulare acido ascorbico rispetto al tessuto normale, tuttavia, tutti i gradi conteneva i tumori a basso contenuto di acido ascorbico. I tumori con la più alta HIF-1alfa contenuto proteico sono stati ascorbato carente. i livelli di acido ascorbico sono stati bassi anche associata a elevati VEGF, GLUT-1, e livelli di proteina BNIP3 e con una maggiore dimensione del tumore, e c'era una significativa associazione tra bassi livelli di ascorbato di tessuti e una maggiore attivazione della via HIF-1 ( $P = 0,007$ ). Al contrario, i tumori con elevati livelli di acido ascorbico era minore, i livelli di HIF-1 di attivazione. Questo studio mostra per la prima volta un probabile nel rapporto vivo tra ascorbato e HIF-1, con bassi livelli di ascorbato di tessuto tumorale è associata ad alta attivazione di HIF-1 e la crescita tumorale.

66: Silberstein JL, Parsons JK.

### **Prostate cancer prevention: concepts and clinical recommendations.**

Prostate Cancer Prostatic Dis. 2010 Dec;13(4):300-6.

Prevention is an important strategy for limiting prostate cancer morbidity and mortality. Two major types of prevention are primary (reduction of incident cases) and tertiary (inhibition of disease progression and recurrence). Pharmacological and dietary interventions have potential functions in both the primary and tertiary prevention of prostate cancer. Five- $\alpha$  reductase inhibitors (5-ARIs) reduce the incidence of prostate cancer in both general and higher-risk populations and are currently under study for tertiary prevention in active surveillance and biochemical recurrence patients. Selenium, vitamin E, and vitamin C do not prevent incident prostate cancer in the general population; however, other promising diet-based interventions are currently under study for tertiary prevention. We recommend consideration of 5-ARIs for prostate cancer prevention in (1) asymptomatic men with a PSA  $\leq 3.0$  ng ml<sup>-1</sup> who are undergoing or anticipate undergoing PSA screening for early detection of prostate cancer and (2) asymptomatic men with PSA  $\geq 2.5$  and  $\leq 10$  ng ml<sup>-1</sup> and an earlier prostate biopsy negative for cancer. Men should be informed of the potential risks of 5-ARI therapy.

Currently, there is neither clinical evidence to support the use of 5-ARIs for tertiary prevention in active surveillance or biochemical recurrence populations, nor micronutrients for prostate cancer prevention of any type.

### **Prevenzione del cancro prostatico: concetti e raccomandazioni cliniche**

La prevenzione è una strategia importante per limitare il cancro alla prostata morbilità e mortalità. Due tipi principali di prevenzione sono il primario (riduzione dei casi incidenti) e terziaria (inibizione della progressione della malattia e di recidive). Farmacologiche e gli interventi dietetici hanno funzioni potenziale sia nella prevenzione primaria e terziaria di cancro alla prostata. Inibitori della Cinque- $\alpha$  (5-ARI) ridurre l'incidenza del tumore della prostata sia nella popolazione generale e ad alto rischio e sono attualmente in fase di studio per la prevenzione terziaria in sorveglianza attiva e pazienti recidiva biochimica. Selenio, vitamina E e vitamina C non impediscono il cancro alla prostata incidente nella popolazione generale, tuttavia, altri interventi promettenti dieta a base sono attualmente allo studio per la prevenzione terziaria. Si consiglia di esame di 5-ARI per la prevenzione del cancro alla prostata in (1) uomini asintomatici con PSA  $\leq 3,0$  ml ng (-1) che siano in corso di anticipare o sottoposti a screening con PSA per la diagnosi precoce del tumore alla prostata e (2) uomini asintomatici con PSA  $\geq 2,5$  e  $\leq 10$  ml ng (-1) e una precedente biopsia negativa della prostata per tumore. Gli uomini devono essere informati dei rischi potenziali della terapia con 5-ARI. Attualmente, non ci sono né prove cliniche a supporto dell'uso di 5-ARI per la prevenzione terziaria in sorveglianza attiva o popolazioni recidiva biochimica, né micronutrienti per la prevenzione del cancro della prostata di qualsiasi tipo.

70: Pollard HB, Levine MA, Eidelman O, Pollard M.

### **Pharmacological ascorbic acid suppresses syngeneic tumor growth and metastases in hormone-refractory prostate cancer.**

In Vivo. 2010 May-Jun;24(3):249-55. PubMed PMID: 20554995.

**AIM:** The aim of this study was to test for the influence of ascorbic acid on tumorigenicity and metastases of implanted PAIII prostate cancer adenocarcinoma cells in syngeneic LW rats.

**MATERIALS AND METHODS:** Hormone-refractory prostate cancer PAIII cells were implanted subcutaneously into immunologically intact, Lobund-Wistar (LW) rats. Intraperitoneal pharmacological doses of ascorbic acid were administered each day for the ensuing 30 days. On the 40th day, animals were sacrificed. Local tumor weights were measured, and metastases were counted.

**RESULTS:** At the end of the 40 day experimental period, the primary tumors were found to be significantly reduced in weight ( $p=0.026$ ). In addition, sub-pleural lung metastases

were even more profoundly reduced in number and size ( $p=0.009$ ). Grossly enlarged ipsilateral lymph node metastases declined from 7 of 15 rats to 1 of 15 rats.

**CONCLUSION:** Pharmacological doses of ascorbic acid suppress tumor growth and metastases in hormone-refractory prostate cancer.

**L'acido ascorbico farmacologico sopprime la crescita tumorale singenica e lo sviluppo di metastasi nel tumore alla prostata refrattario all'ormone.**

Scopo: Lo scopo di questo studio era di verificare per l'influenza di acido ascorbico in tumorigenicità e le metastasi di impiantate cellule tumorali della prostata adenocarcinoma PAIII in singenici ratti LW.

MATERIALI E METODI: ormone-refrattario cancro alla prostata PAIII cellule sono state impiantate per via sottocutanea nella immunologico intatto, Lobund-Wistar (LW) ratti. Intraperitoneale di dosi farmacologiche di acido ascorbico sono stati somministrati ogni giorno per i successivi 30 giorni. Al 40 ° giorno, gli animali sono stati sacrificati. Pesi locale del tumore sono stati misurati, e le metastasi sono stati contati.

RISULTATI: Al termine del periodo di 40 giorni di sperimentazione, i tumori primari sono risultati significativamente ridotti nel peso ( $p = 0,026$ ). Inoltre, metastasi polmonari sub-pleurica erano ancora più profondamente ridotti di numero e dimensione ( $p = 0,009$ ). Grossolanamente allargata omolaterale metastasi linfonodali è scesa dal 7 di 15 ratto a 1 di 15 ratti.

CONCLUSIONE: dosi farmacologiche di acido ascorbico sopprimere la crescita tumorale e metastasi nel carcinoma della prostata refrattario agli ormoni

72: Wilhelm Filho D, Avila S Jr, Possamai FP, Parisotto EB, Moratelli AM, Garlet TR, Inácio DB, Torres MA, Colepicolo P, Dal-Pizzol F.

**Antioxidant therapy attenuates oxidative stress in the blood of subjects exposed to occupational airborne contamination from coal mining extraction and incineration of hospital residues.**

Ecotoxicology. 2010 Oct;19(7):1193-200. Epub 2010 Jun 10. PubMed PMID: 20535553.

Coal mining and incineration of solid residues of health services (SRHS) generate several contaminants that are delivered into the environment, such as heavy metals and dioxins. These xenobiotics can lead to oxidative stress overgeneration in organisms and cause different kinds of pathologies, including cancer. In the present study the concentrations of heavy metals such as lead, copper, iron, manganese and zinc in the urine, as well as several enzymatic and non-enzymatic biomarkers of oxidative stress in the blood (contents of lipoperoxidation = TBARS, protein carbonyls = PC, protein thiols = PT,  $\alpha$ -tocopherol = AT, reduced glutathione = GSH, and the activities of glutathione S-transferase = GST, glutathione reductase = GR, glutathione peroxidase = GPx, catalase = CAT and superoxide dismutase = SOD), in the blood of six

different groups (n = 20 each) of subjects exposed to airborne contamination related to coal mining as well as incineration of solid residues of health services (SRHS) after vitamin E (800 mg/day) and vitamin C (500 mg/day) supplementation during 6 months, which were compared to the situation before the antioxidant intervention (Ávila et al., *Ecotoxicology* 18:1150-1157, 2009; Possamai et al., *Ecotoxicology* 18:1158-1164, 2009). Except for the decreased manganese contents, heavy metal concentrations were elevated in all groups exposed to both sources of airborne contamination when compared to controls. TBARS and PC concentrations, which were elevated before the antioxidant intervention decreased after the antioxidant supplementation. Similarly, the contents of PC, AT and GSH, which were decreased before the antioxidant intervention, reached values near those found in controls, GPx activity was reestablished in underground miners, and SOD, CAT and GST activities were reestablished in all groups. The results showed that the oxidative stress condition detected previously to the antioxidant supplementation in both directly and indirectly subjects exposed to the airborne contamination from coal dusts and SRHS incineration, was attenuated after the antioxidant intervention.

### **La terapia antiossidante attenua lo stress ossidativo nel sangue dei pazienti esposti per lavoro a contaminazione aerea a causa dell' estrazione mineraria del carbone e all'incenerimento di residui ospedalieri**

Estrazione del carbone e l'incenerimento di residui solidi dei servizi sanitari (SRHS) generano diversi contaminanti che vengono consegnati nell'ambiente, come i metalli pesanti e diossine. Queste xenobiotici possono portare a overgeneration stress ossidativo in organismi e causa diversi tipi di patologie, tra cui il cancro. Nel presente studio le concentrazioni di metalli pesanti come piombo, rame, ferro, manganese e zinco nelle urine, così come diversi biomarcatori enzimatici e non enzimatici di stress ossidativo nel sangue (contenuto di lipoperossidazione = TBARS, carbonili proteici = PC, tioli delle proteine = PT,  $\alpha$ -tocoferolo = AT, glutatione ridotto = GSH, e le attività della glutatione S-transferasi = GST, GR = glutatione reductasi, glutatione perossidasi = GPx, CAT = catalasi e superossido dismutasi = SOD), in il sangue di sei diversi gruppi (n = 20 ciascuna) di soggetti esposti alla contaminazione aerea relativi al settore del carbone così come l'incenerimento dei residui solidi dei servizi sanitari (SRHS) dopo la vitamina E (800 mg / die) e vitamina C (500 mg / giorno) durante la supplementazione di 6 mesi, che sono stati confrontati con la situazione prima dell'intervento antiossidante (Avila et al, *ecotossicologia* 18:1150-1157, 2009;. Possamai et, *Ecotossicologia* 18:1158-1164, 2009).. Fatta eccezione per il contenuto di manganese è diminuito, le concentrazioni di metalli pesanti sono stati elevati in tutti i gruppi esposti a entrambe le fonti di contaminazione aerea rispetto ai controlli. TBARS e le concentrazioni di PC, che sono stati elevati prima dell'intervento antiossidanti sono diminuite dopo l'integrazione di antiossidanti. Allo stesso modo, il contenuto del PC, AT e GSH, che sono diminuiti prima dell'intervento antiossidanti, hanno raggiunto valori vicino a quelli trovati nei controlli, l'attività GPx è stata ristabilita nel minatori della metropolitana, e le attività di SOD, CAT e GST sono stati ristabiliti in tutti i gruppi. I risultati hanno dimostrato che la condizione di stress ossidativo rilevato in precedenza per la supplementazione di antiossidanti in modo diretto e indiretto soggetti esposti alla contaminazione da polveri di carbone e incenerimento SRHS, è stata attenuata dopo l'intervento antiossidante.

74: Bravi F, Polesel J, Bosetti C, Talamini R, Negri E, Dal Maso L, Serraino D, La Vecchia C.

**Dietary intake of selected micronutrients and the risk of pancreatic cancer: an Italian case-control study.**

Ann Oncol. 2011 Jan;22(1):202-6. Epub 2010 Jun 7. PubMed PMID: 20530201.

**OBJECTIVE:** several studies have shown an inverse relation between vegetable and fruit intake and pancreatic cancer, but no specific beneficial component of such foods has been consistently identified. We considered the role of 15 selected vitamins and carotenoids and 6 minerals on pancreatic cancer risk in an Italian case-control study.

**METHODS:** subjects were 326 patients with incident pancreatic cancer and 652 controls, admitted to the same hospitals as cases for acute conditions. Micronutrient computation was based on a validated and reproducible food-frequency questionnaire. We estimated the odds ratios (OR) and confidence intervals (CI) using conditional logistic regression models, adjusted for various confounding factors and for energy intake, according to the residual model.

**RESULTS:** comparing the highest to the lowest quintile of intake, the OR were 0.60 (95% CI 0.36-0.98) for vitamin E, 0.44 (95% CI 0.27-0.73) for vitamin C, 0.56 (95% CI 0.34-0.93) for

folate, and 0.57 (95% CI 0.35-0.92) for potassium. No significant inverse associations were observed for  $\alpha$ -carotene (OR = 0.69, 95% CI 0.43-1.12),  $\beta$ -carotene (OR = 0.64, 95% CI 0.39-1.06), and  $\beta$ -cryptoxanthin (OR = 0.66, 95% CI 0.39-1.09). No relation was found for other micronutrients considered.

**CONCLUSION:** our findings support a favorable role of vitamins E and C, selected carotenoids, and folate on pancreatic carcinogenesis.

### **Assunzioni di micronutrienti selezionati e il rischio di sviluppo di tumore al polmone: uno studio caso-controllo italiano**

**OBIETTIVO:** diversi studi hanno mostrato una relazione inversa tra assunzione di verdura e frutta e tumore al pancreas, ma nessun elemento specifico benefici di tali alimenti, è stata sempre identificata. Abbiamo preso in considerazione il ruolo di 15 vitamine e carotenoidi selezionati e 6 minerali sul rischio di cancro pancreatico in uno studio italiano caso-controllo. **METODI:** i soggetti sono stati 326 pazienti con cancro del pancreas incidente e 652 controlli, ha ammesso agli ospedali stessi casi per patologie acute. Micronutrienti calcolo è basato su un questionario validato e riproducibile food-frequency. Abbiamo stimato l'odds ratio (OR) e intervalli di confidenza (CI), utilizzando modelli di regressione logistica condizionale, corretto per i fattori confondenti vari e per l'assunzione di energia, a seconda del modello residuale. **RISULTATI:** confrontando il più alto al più basso quintile di assunzione, l'OR era 0.60 (95% CI 0,36-0,98) per la vitamina E, 0,44 (IC 95%,27-0,73) per la vitamina C, 0,56 (95% CI 0,34-0,93) per il folato, e 0,57 (95% CI 0,35-0,92) per il potassio. Nessuna associazione significativa è stata osservata inverso per  $\alpha$ -carotene (OR = 0,69, 95% CI 0,43-1,12),  $\beta$ -carotene (OR = 0.64, 95% CI 0,39-1,06), e  $\beta$ -criptoxantina (OR = 0,66%, 95 CI 0,39-1,09). Nessuna relazione è stata trovata per altri micronutrienti considerati. **CONCLUSIONE:** I nostri risultati supportano un ruolo favorevole delle vitamine E e C, i carotenoidi selezionato e folati sulla carcinogenesi pancreatico.

75: Black HS.

**Interaction of ascorbic acid and tocopherol on beta-carotene modulated carcinogenesis.** Hemoglobin. 2010 Jun;34(3):284-90. Review. PubMed PMID:20524818.

Epidemiological studies suggested that above average intake of beta-carotene (betaC) might reduce cancer risks. However, clinical trials found that betaC supplementation did not reduce the occurrence of non-melanoma skin cancer and that smokers suffered a significant increase in lung cancer incidence. Further, supplementing semi-defined diets with betaC failed to provide photoprotection as reported earlier for closed-formula rations, but actually exacerbated carcinogenesis. A redox mechanism, based upon one-electron transfer rate constants, proposed interactions between tocopherol, betaC and ascorbic acid in which the carotenoid radical cation, a strongly oxidizing radical, would be repaired by ascorbic acid. If the carotenoid radical cation remained unrepaired, this strongly oxidizing species could account for the pro-carcinogenic activity of betaC. Data from nutritional studies supported an interaction of tocopherol and betaC

but not with ascorbic acid. The repair of the betaC radical cation must be dependent on factors other than ascorbic acid, e.g., other carotenoids or unidentified phytochemical(s).

### **Interazione tra l'acido ascorbico e il tocoferolo sulla carcinogenesi modulate dal beta carotene**

Gli studi epidemiologici ha suggerito che l'assunzione media di sopra di beta-carotene (betaC) possa ridurre i rischi di cancro. Tuttavia, le prove cliniche ha constatato che betaC supplementazione non ha ridotto l'insorgenza di tumore cutaneo non-melanoma e che i fumatori ha subito un significativo aumento dell'incidenza di cancro polmonare. Inoltre, integrare le diete semi-definita con betaC omesso di fornire fotoprotezione come riportato in precedenza per le razioni chiuso formula, ma hanno addirittura peggiorato la carcinogenesi. Un meccanismo redox, sulla base di costanti di trasferimento di un elettrone tasso, le interazioni tra le proposte tocoferolo, acido ascorbico e betaC in cui il catione carotenoidi radicale, un radicale fortemente ossidanti, sarebbe riparato da acido ascorbico. Se il catione radicale carotenoide rimasto riparato, questa specie fortemente ossidanti potrebbe spiegare l'attività di pro-cancerogeni di betaC. Dati provenienti da studi nutrizionali sostenuto una interazione di tocoferolo e betaC ma non con l'acido ascorbico. La riparazione del catione betaC radicale deve dipendere da altri fattori, oltre l'acido ascorbico, ad esempio, altri carotenoidi non identificati o fitochimici (s).

76: Rossi M, Rosato V, Bosetti C, Laggiou P, Parpinel M, Bertuccio P, Negri E, La Vecchia C.

### **Flavonoids, proanthocyanidins, and the risk of stomach cancer.**

Cancer Causes Control. 2010 Oct;21(10):1597-604. Epub 2010 Jun 3. PubMed PMID: 20521092.

Flavonoids have been suggested to be responsible for the potential beneficial properties of fruit and vegetables on stomach cancer risk. To provide further information on flavonoids, proanthocyanidins, and gastric cancer risk, we analyzed data from a case-control study conducted in Italy. Subjects were 230 cases with incident, histologically confirmed gastric cancer and 547 frequency-matched controls, admitted to the same hospitals of cases for acute, non-neoplastic conditions. Subjects were interviewed using a reproducible and valid food frequency questionnaire. We estimated the odds ratios (ORs) of gastric cancer and their corresponding 95% confidence intervals (CIs) using unconditional logistic regression models including terms for major recognized gastric cancer risk factors. The ORs of the highest quintile of intake compared to the lowest were below unity for all classes of flavonoids, in the absence, however, of

significant associations. Strong inverse relations were found for proanthocyanidins. The OR was 0.44 (95% CI, 0.25-0.76) for monomers and dimers combined and 0.36 (95% CI, 0.21-0.63) for polymers with three or more mers. Further adjustment for fruit and vegetables, or vitamin C, did not materially change these associations. This is the first epidemiological study to suggest that dietary proanthocyanidins have a favorable role on gastric cancer risk.

### **Flavonoidi, proantocianidine, e il rischio di cancro allo stomaco**

I flavonoidi sono state suggerite per essere responsabili per le potenziali proprietà benefiche di frutta e verdura sul rischio di cancro dello stomaco. Per fornire ulteriori informazioni sul flavonoidi, proantocianidine, e rischio di cancro gastrico, abbiamo analizzato i dati di uno studio caso-controllo condotto in Italia. I soggetti sono stati 230 casi di incidenti, istologicamente confermati cancro gastrico e 547 controlli appaiati frequenza, ammesso negli stessi ospedali dei casi per acuti, le condizioni non neoplastiche. I soggetti sono stati intervistati utilizzando un riproducibile e valido questionario di frequenza alimentare. Abbiamo stimato l'odds ratio (OR) di cancro gastrico e dei loro corrispondenti intervalli di confidenza al 95% (IC) utilizzando modelli di regressione logistica incondizionato compresi i termini per i principali fattori di rischio di cancro gastrico riconosciuto. Il RUP del più alto quintile di assunzione rispetto al più basso sono stati sotto l'unità per tutte le classi di flavonoidi, in mancanza, tuttavia, di associazioni significative. Forti relazioni inverse sono stati trovati proantocianidine. L'OR era 0,44 (95% CI, 0,25-0,76) per i monomeri e dimeri unito e 0,36 (95% CI, 0,21-0,63) per i polimeri con tre o più programmatori. Un'ulteriore regolazione per frutta e verdura, o vitamina C, non ha materialmente cambiare queste associazioni. Questo è il primo studio epidemiologico a suggerire che proantocianidine alimentari hanno un ruolo favorevole sul rischio di cancro gastrico.

77: Glauert HP, Calfee-Mason K, Stemm DN, Tharappel JC, Spear BT.

### **Dietary antioxidants in the prevention of hepatocarcinogenesis: a review.**

Mol Nutr FoodRes. 2010 Jul;54(7):875-96. Review. PubMed PMID: 20512789.

In this review, the role of dietary antioxidants in the prevention of hepatocarcinogenesis is examined. Both human and animal models are discussed. Vitamin C, vitamin E, and selenium are antioxidants that are essential in the human diet. A number of non-essential chemicals also contain antioxidant activity and are consumed in the human diet, mainly as plants or as supplements, including beta-carotene, ellagic acid, curcumin, lycopene, coenzyme Q(10), epigallocatechin gallate, N-acetyl cysteine, and resveratrol. Although some human and animal studies show protection against carcinogenesis with the consumption of higher amounts of antioxidants, many studies show no effect or an enhancement of carcinogenesis. Because of the conflicting results from these studies, it is difficult to make dietary recommendations as to whether consuming higher amounts of specific antioxidants will decrease the risk of developing hepatocellular carcinoma.

## **Antiossidanti nella dieta nella prevenzione dell'epatocarcinogenesi: una review.**

In questa revisione, il ruolo degli antiossidanti alimentari nella prevenzione di epatocarcinogenesi viene esaminato. Entrambi i modelli umani e animali sono discussi. La vitamina C, vitamina E e selenio sono antiossidanti che sono essenziali nella dieta umana. Un certo numero di sostanze chimiche non essenziali contengono anche l'attività antiossidante e sono consumati nella dieta umana, soprattutto come piante o come supplementi, tra cui beta-carotene, l'acido ellagico, la curcumina, il licopene, il coenzima Q (10), gallato di epigallocatechina, N-acetil cisteina, e il resveratrolo. Anche se alcuni studi umani e animali indicano la protezione contro la carcinogenesi con il consumo di una maggiore quantità di antiossidanti, molti studi dimostrano alcun effetto o un aumento della cancerogenesi. A causa dei risultati contrastanti di questi studi, è difficile fare raccomandazioni dietetiche se consumano maggiori quantità di antiossidanti specifici diminuisce il rischio di sviluppare carcinoma epatocellulare.

78: Deubzer B, Mayer F, Kuçi Z, Niewisch M, Merkel G, Handgretinger R, BrucheltG.

### **H(2)O(2)-mediated cytotoxicity of pharmacologic ascorbate concentrations to neuroblastoma cells: potential role of lactate and ferritin.**

Cell PhysiolBiochem. 2010;25(6):767-74. Epub 2010 May 18. PubMed PMID: 20511723.

By intravenous (but not oral) application of ascorbate, millimolar serum concentrations can be reached, which are preferentially cytotoxic to cancer cells. Cytotoxicity is mediated by transition metal-dependent generation of H(2)O(2) in the interstitial space. In this study, the sensitivity of neuroblastoma cells (Kelly, SK-N-SH) to ascorbate and H(2)O(2) and their defense mechanisms against H(2)O(2) were investigated. Since aerobic glycolysis (the Warburg effect) is a feature of many tumour cells, their glucose consumption and lactate production were monitored. Furthermore, synthesis and release of ferritin by neuroblastoma cells were analysed in order to examine whether ferritin is possibly an iron source for H(2)O(2) generation. Ascorbate (0.6-5.0 mM) and H(2)O(2) (25-100  $\mu$ M) were found to be similarly cytotoxic to Kelly and SK-N-SH cells. In each case,

cytotoxicity increased if cell concentrations decreased, in accordance with low cell concentrations having lower capacities to detoxify H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Kelly and SK-N-SH cells produced and released remarkable amounts of lactate and ferritin. We propose the selective cytotoxicity of high dose ascorbate to tumour cells to be due to the preferential generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the acidic and ferritin-rich tumour microenvironment, combined with reduced defense systems against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as a consequence of aerobic glycolysis.

### **La citotossicità mediata da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> delle concentrazioni farmacologiche dell'ascorbato nelle cellule di neuroblastoma: un potenziale ruolo del lattato e della ferritina**

Per via endovenosa (ma non orale) applicazione di acido ascorbico, le concentrazioni sieriche millimolare possono essere raggiunti, che sono preferenzialmente citotossiche per le cellule tumorali. Citotossicità è mediata dalla generazione di transizione metallo-dipendente di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nello spazio interstiziale. In questo studio, la sensibilità delle cellule di neuroblastoma (Kelly, SK-N-SH) di ascorbato e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e dei loro meccanismi di difesa contro H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sono stati studiati. Dal glicolisi aerobica (l'effetto Warburg) è una caratteristica di molte cellule tumorali, il loro consumo di glucosio e produzione di lattato sono stati monitorati. Inoltre, la sintesi e il rilascio di ferritina da parte delle cellule di neuroblastoma sono stati analizzati al fine di esaminare se la ferritina è forse una fonte di ferro per H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generazione. L'ascorbato (0,6-5,0 mM) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (25-100  $\mu$ M) sono risultati essere analogamente citotossica a Kelly e le cellule SK-N-SH. In ogni caso, la citotossicità aumentata se le concentrazioni di cellule diminuito, in conformità con concentrazioni di cellulari a basso con minore capacità di disintossicare H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Kelly e cellule SK-N-SH prodotto e liberato notevoli quantità di lattato e la ferritina. Proponiamo la citotossicità selettiva di alte dosi di acido ascorbico a cellule tumorali sia dovuto alla generazione preferenziale di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nel microambiente tumorale acido e ricco di ferritina, in combinazione con i sistemi di difesa contro le ridotte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> come conseguenza della glicolisi aerobica.

79: Li W, Wu JX, Tu YY.

### **Synergistic effects of tea polyphenols and ascorbic acid on human lung adenocarcinoma SPC-A-1 cells.**

J Zhejiang Univ Sci B. 2010Jun;11(6):458-64.

Tea polyphenols have been shown to have anticancer activity in many studies. In the present study, we investigated effects of theaflavin-3-3'-digallate (TF(3)), one of the major theaflavin monomers in black tea, in combination with ascorbic acid (AA), a reducing agent, and (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG), the main polyphenol presented in green tea, in combination with AA on cellular viability and cell cycles of the human lung adenocarcinoma SPC-A-1 cells. The 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay showed that the 50% inhibition concentrations (IC<sub>50</sub>) of TF(3), EGCG, and AA on SPC-A-1 cells were 4.78, 4.90, and 30.62  $\mu$ M, respectively. The inhibitory rates of TF(3) combined with AA (TF(3)+AA) and EGCG combined with AA (EGCG+AA) at a molar ratio of 1:6 on SPC-A-1 cells were 54.4% and 45.5%, respectively. Flow cytometry analysis showed that TF(3)+AA and EGCG+AA obviously

increased the cell population in the G(0)/G(1) phase of the SPC-A-1 cell cycle from 53.9% to 62.8% and 60.0%, respectively. TF(3)-treated cells exhibited 65.3% of the G(0)/G(1) phase at the concentration of its IC(50). Therefore, TF(3)+AA and EGCG+AA had synergistic inhibition effects on the proliferation of SPC-A-1 cells, and significantly held SPC-A-1 cells in G(0)/G(1) phase. The results suggest that the combination of TF(3) with AA or EGCG with AA enhances their anticancer activity.

### **Effetti sinergici dei polifenoli del tè e dell'acido scorvico sulle cellule SPC-A-1 di adenocarcinoma polmonare umano**

Polifenoli del tè hanno dimostrato di avere attività antitumorale in molti studi. Nel presente studio, abbiamo studiato gli effetti di theaflavin-3-3'-digallate (TF (3)), uno dei monomeri theaflavin maggiori nel tè nero, in combinazione con l'acido ascorvico (AA), un agente riducente, e (-)-epigallocatechina-3-gallato (EGCG), il polifenolo principale presentata nel tè verde, in combinazione con AA sulla vitalità cellulare e cicli cellulari di adenocarcinoma del polmone umano SPC-A-1 cellule. Il 3-bromo (4,5-dimetilthiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolio (MTT), test hanno dimostrato che le concentrazioni di inibizione del 50% (IC (50)) di TF (3), EGCG, e AA su SPC-A-1 le cellule sono state 4,78, 4,90 e 30,62 micromol / L, rispettivamente. I tassi di inibitoria di TF (3) in combinazione con AA (TF (3) + AA) e EGCG combinato con AA (EGCG + AA) in un rapporto molare di 1:6 su SPC-A-1 le cellule sono state il 54,4% e 45,5% , Rispettivamente. Analisi di citometria a flusso ha dimostrato che TF (3) + AA e AA + EGCG naturalmente aumentato la popolazione di cellule in G (0) / G (1) fase del ciclo-A-1 delle cellule SPC dal 53,9% al 62,8% e 60,0% , Rispettivamente. Cellule TF (3)-trattati esposti 65,3% del G (0) / G (1) di fase alla concentrazione dei suoi IC (50). Pertanto, TF (3) + AA e AA + EGCG avuto effetti sinergici di inibizione sulla proliferazione delle SPC-A-1 le cellule, e significativamente ha SPC-A-1 le cellule in G (0) / G (1) di fase. I risultati suggeriscono che la combinazione di TF (3) con AA o EGCG con AA aumenta la loro attività antitumorale.

80: Corti A, Casini AF, Pompella A.

### **Cellular pathways for transport and efflux of ascorbate and dehydroascorbate.**

Arch Biochem Biophys. 2010 Aug 15;500(2):107-15.

The mechanisms allowing the cellular transport of ascorbic acid represent a primary aspect for the understanding of the roles played by this vitamin in pathophysiology. Considerable research effort has been spent in the field, on several animal models and different cell types. Several mechanisms have been described to date, mediating the movements of different redox forms of ascorbic acid across cell membranes. Vitamin C can enter cells both in its reduced and oxidized form, ascorbic acid (AA) and dehydroascorbate (DHA), utilizing respectively sodium-dependent transporters (SVCT) or glucose transporters (GLUT). Modulation of SVCT expression and function has been described by cytokines, steroids and post-translational protein modification. Cellular uptake of DHA is followed by its intracellular reduction to AA by several enzymatic and non-enzymatic systems. Efflux of vitamin C has been also described in a number of cell types and different

pathophysiological functions were proposed for this phenomenon, in dependence of the cell model studied. Cellular efflux of AA is mediated through volume-sensitive (VSOAC) and Ca(2+)-dependent anion channels, gap-junction hemichannels, exocytosis of secretory vesicles and possibly through homo- and hetero-exchange systems at the plasma membrane level. Altogether, available data suggest that cellular efflux of ascorbic acid - besides its uptake - should be taken into account when evaluating the cellular homeostasis and functions of this important vitamin.

### **Vie cellulari di trasporto ed efflusso dell'ascorbato e del deidroascorbato**

I meccanismi che consentono il trasporto di acido ascorbico cellulari rappresentano un aspetto primario per la comprensione del ruolo svolto da questa vitamina in fisiopatologia. sforzo di ricerca considerevoli sono stati spesi nel settore, su diversi modelli animali e diversi tipi di cellule. Diversi meccanismi sono stati descritti fino ad oggi, mediando i movimenti di forme diverse di redox acido ascorbico attraverso le membrane cellulari. La vitamina C può entrare nelle cellule, sia nella sua forma ridotta e ossidata, l'acido ascorbico (AA) e deidroascorbato (DHA), utilizzando rispettivamente i trasportatori sodio-dipendente (SVCT) o trasportatori del glucosio (GLUT). Modulazione dell'espressione e della funzione SVCT è stata descritta da citochine, steroidi e modifiche post-traduzionali delle proteine. assorbimento cellulare di DHA è seguita da sua riduzione intracellulare di AA da diversi sistemi enzimatici e non enzimatici. Efflusso di vitamina C è stato descritto anche in un certo numero di tipi di cellule e diverse funzioni fisiopatologiche sono state proposte per questo fenomeno, in dipendenza del modello cellulare studiato. efflusso cellulare di AA è mediato attraverso il volume sensibile (VSOAC) e Ca (2 +) canali di anione-dipendente, emicanali gap-junction, esocitosi delle vescicole secretorie e, eventualmente, attraverso sistemi omo-ed etero-scambio a livello della membrana plasmatica. Complessivamente, i dati disponibili suggeriscono che l'efflusso cellulare di acido ascorbico - oltre che la sua assunzione - dovrebbero essere prese in considerazione nel valutare l'omeostasi cellulare e le funzioni di questa importante vitamina.

83: Gilloteaux J, Jamison JM, Neal DR, Loukas M, Doberzstyn T, Summers JL.

### **Cell damage and death by autoschizis in human bladder (RT4) carcinoma cells resulting from treatment with ascorbate and menadione.**

Ultrastruct Pathol. 2010May;34(3):140-60. PubMed PMID: 20455663.

A human bladder carcinoma cell line RT4 was sham-treated with buffer or treated with ascorbate (VC) alone, menadione alone (VK(3)), or a combination of ascorbate:menadione (VC+VK(3)) for 1, 2, and 4 h. Cytotoxic damage was found to be treatment-dependent in this sequence: VC+VK(3)>VC>VK(3)>sham. The combined treatment induced the greatest oxidative stress, with early tumor cell injury affecting the cytoskeletal architecture and contributing to the self-excisions of pieces of cytoplasm freed from organelles. Additional damage, including a reduction in cell size, organelle alterations, nuclear damage, and nucleic acid degradation as well as compromised lysosome integrity, is caused by reactivation of DNases and the redox cycling of VC or VC+VK(3). In addition, cell death caused by VC+VK(3) treatment as well as by prolonged VC treatment is

consistent with cell demise by autschizis, not apoptosis. This report confirms and complements previous observations about this new mode of tumor cell death. It supports the contention that a combination of VC+VK(3), also named Apatone, could be co-administered as a nontoxic adjuvant with radiation and/or chemotherapies to kill bladder tumor cells and other cancer cells without any supplementary risk or side effects for patients.

#### **Danno cellulare e morte nelle cellule di carcinoma alla vescica (RT4) come effetto al trattamento con ascorbato e menadione**

La linea cellulare umana RT4 di carcinoma alla vescica è stata finto-trattata con buffer o trattati con ascorbato (VC) da solo, menadione solo (VK (3)), o una combinazione di acido ascorbico: menadione (VC + VK (3)) per 1, 2 , e 4 h. Danno citotossico è risultato essere un trattamento-dipendente in questa sequenza: VC + VK (3) > VC > VK (3) sham >. Il trattamento combinato ha indotto la maggior stress ossidativo, con lesione precoce delle cellule tumorali che interessano l'architettura del citoscheletro e contribuendo al self-escissioni di pezzi di citoplasma liberato da organelli. Danni supplementari, tra cui una riduzione delle dimensioni delle cellule, alterazioni organello, danno nucleare, e la degradazione degli acidi nucleici, nonché compromessa l'integrità lisosomi, è causata dalla riattivazione di DNasi e il ciclismo redox di CV o VC + VK (3). Inoltre, la morte cellulare causata da VC + VK (3) trattamento, nonché da una prolungata terapia VC è coerente con scomparsa delle cellule da autschizis non, l'apoptosi. La relazione conferma e integra le precedenti osservazioni su questa nuova modalità di morte delle cellule tumorali. Essa sostiene la tesi che una combinazione di VC + VK (3), anche chiamato Apatone, potrebbe essere co-somministrato come coadiuvante tossico con radiazioni e / o chemioterapia per uccidere le cellule tumorali e di cellule di cancro della vescica altri senza alcun rischio supplementare o effetti collaterali per i pazienti.

88: Cullen JJ.

#### **Ascorbate induces autophagy in pancreatic cancer.**

Autophagy. 2010 Apr;6(3):421-2.

Ascorbate (ascorbic acid, vitamin C) is one of the early, unorthodox treatments for cancer. The evidence upon which people base the use of ascorbate in cancer treatment falls into two categories: clinical data on dose concentration relationships, and laboratory data describing potential cell toxicity with high concentrations of ascorbate in vitro. Clinical data show that when ascorbate is given orally, fasting plasma concentrations are tightly controlled by decreased absorption, increased urine excretion, and reduced ascorbate bioavailability. In contrast, when ascorbate is administered intravenously, concentrations in the millimolar level are achieved. Thus, it is clear that intravenous administration of ascorbate can yield very high plasma levels, while oral treatment does not.

## **Nel cancro al pancreas l'ascorbato induce l'autofagia**

L'ascorbato (acido ascorbico, la vitamina C) è uno dei primi, i trattamenti per il cancro non ortodosse. Le prove su cui le persone di base l'uso di acido ascorbico nel trattamento del cancro rientrano in due categorie: i dati clinici relativi a rapporti di concentrazione di dose, e dati di laboratorio che descrivono la potenziale tossicità delle cellule con alte concentrazioni di acido ascorbico in vitro. I dati clinici mostrano che, quando l'ascorbato è somministrato per via orale, le concentrazioni plasmatiche a digiuno sono strettamente controllati da un diminuito assorbimento, aumentata escrezione urinaria, e ridotta biodisponibilità ascorbato. Al contrario, quando l'ascorbato è somministrato per via endovenosa, le concentrazioni nel livello millimolare sono realizzati. Quindi, è chiaro che la somministrazione endovenosa di acido ascorbico può produrre livelli plasmatici molto elevati, mentre il trattamento per via orale non è così.

96: Gupta A, Bhatt ML, Misra MK.

**Lipid peroxidation and antioxidant status in head and neck squamous cell carcinoma patients.**  
Oxid Med Cell Longev. 2009 Apr-Jun;2(2):68-72.

Oxidative stress, a consequence of an imbalance between the formation and inactivation of reactive oxygen species, may be involved in the pathogenesis of many diseases including cancer. To evaluate the magnitude of oxidative stress, a study on the plasma levels of superoxide dismutase, total thiols, ascorbic acid and malondialdehyde (MDA) has been done in head and neck squamous cell carcinoma patients before the start of any oncological treatment and compared with healthy controls. The specific activity of superoxide dismutase in cancer patients is decreased significantly when compared to the control ( $p < 0.05$ ). The total thiol and ascorbic acid levels are significantly reduced ( $p < 0.005$ ) whereas MDA levels are significantly increased in the patients ( $p < 0.00005$ ).

Our findings show that the oxidative stress is elevated in cancer patients as evidenced by elevated levels of lipid peroxidation products and depletion of enzymatic and non-enzymatic antioxidants.

### **Perossidazione lipidica e stato antiossidante nei pazienti con carcinoma cellulare squamoso della testa e del collo**

Lo stress ossidativo, conseguenza di uno squilibrio tra la formazione e l'inattivazione di specie reattive dell'ossigeno, possono essere coinvolti nella patogenesi di molte malattie tra cui il cancro. Per valutare l'entità dello stress ossidativo, uno studio sui livelli plasmatici di superossido dismutasi, tioli totale, acido ascorbico e di malondialdeide (MDA) è stato fatto in pazienti carcinoma a cellule squamose della testa e del collo prima di iniziare qualsiasi trattamento oncologico e confrontato con un sano controlli. L'attività specifica di superossido dismutasi nei pazienti oncologici è notevolmente diminuito rispetto al controllo ( $p < 0,05$ ). I livelli totali di acido ascorbico e tioli sono ridotti significativamente ( $p < 0,005$ ) mentre i livelli di MDA sono significativamente aumentati nei pazienti ( $p < 0,00$  mila cinque). I nostri risultati dimostrano che lo stress ossidativo è elevata nei pazienti con tumore, come evidenziato da elevati livelli di prodotti di perossidazione lipidica e la deplezione di antiossidanti enzimatici e non enzimatici.

98: Donkena KV, Karnes RJ, Young CY.

### **Vitamins and prostate cancer risk.**

Molecules. 2010 Mar 12;15(3):1762-83. Review. PubMed PMID: 20336012.

Prostate cancer (PC) is the second most common cancer in men worldwide. Its prevention and treatment remain a challenge to clinicians. Here we review the relationship of vitamins to PC risk. Many vitamins and related chemicals, including vitamin A, retinoids, several B vitamins, vitamin C, vitamin D and vitamin E have shown their anti-cancer activities as anti-oxidants, activators of transcription factors or factors influencing epigenetic events. Although laboratory tests including the use of animal models showed these vitamins may have anti-PC properties, whether they can effectively prevent the development and/or progression of PC in humans remains to be intensively studied subjects. This review will provide up-to-date information regarding the recent outcomes of laboratory, epidemiology and/or clinical trials on the effects of vitamins on PC prevention and/or treatment.

## Vitamine e rischio di cancro alla prostata

Il cancro della prostata (PC) è il secondo tumore più comune negli uomini di tutto il mondo. La sua prevenzione e il trattamento rimangono una sfida per i clinici. Qui passiamo in rassegna il rapporto di vitamine al rischio di PC. Molte vitamine e prodotti chimici correlati, tra cui la vitamina A, retinoidi, diverse vitamine del gruppo B, vitamina C, vitamina D e vitamina E hanno dimostrato la loro attività anti-cancro, anti-ossidanti, attivatori dei fattori di trascrizione o di fattori che influenzano gli eventi epigenetici. Anche se i test di laboratorio tra cui l'uso di modelli animali ha mostrato queste vitamine possono avere proprietà anti-PC, sia che si può impedire efficace lo sviluppo e / o la progressione di PC negli esseri umani deve essere ancora studiata soggetti. L'analisi offrirà a informazioni aggiornate per quanto riguarda i risultati recenti di laboratorio, epidemiologia e / o studi clinici sugli effetti delle vitamine in materia di prevenzione PC e / o trattamento.

100: Tomasetti M, Strafella E, Staffolani S, Santarelli L, Neuzil J, Guerrieri R.

### **alpha-Tocopheryl succinate promotes selective cell death induced by vitamin K3 in combination with ascorbate.**

Br J Cancer. 2010 Apr 13;102(8):1224-34.

**BACKGROUND:** A strategy to reduce the secondary effects of anti-cancer agents is to potentiate the therapeutic effect by their combination. A combination of vitamin K3 (VK3) and ascorbic acid (AA) exhibited an anti-cancer synergistic effect, associated with extracellular production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> that promoted cell death.

**METHODS:** The redox-silent vitamin E analogue alpha-tocopheryl succinate (alpha-TOS) was used in combination with VK3 and AA to evaluate their effect on prostate cancer cells.

**RESULTS:** Prostate cancer cells were sensitive to alpha-TOS and VK3 treatment, but resistant to AA upto 3.2 mM. When combined, a synergistic effect was found for VK3-AA, whereas alpha-TOS-VK3 and alpha-TOS-AA combination showed an antagonist and additive effect, respectively.

However, sub-lethal doses of AA-VK3 combination combined with a sub-toxic dose of alpha-TOS showed to induce efficient cell death that resembles autophagy. Associated with this cell demise, lipid peroxidation, DNA damage, cytoskeleton alteration, lysosomal-mitochondrial perturbation, and release of cytochrome c without caspase activation were observed. Inhibition of lysosomal proteases did not attenuate cell death induced by the combined agents. Furthermore, cell deaths by apoptosis and autophagy were detected.

**CONCLUSION:** These findings support the emerging idea that synergistic combinations of some agents can overcome toxicity and other side-effects associated with high doses of single drugs creating the opportunity for therapeutically relevant selectivity.

### **L' alfa-tocoferil succinato promuove la morte cellulare selettiva indotta dalla vitamina K3 in associazione all'ascorbato**

**BACKGROUND:** Una strategia per ridurre gli effetti secondari di farmaci anti-cancro è di potenziare l'effetto terapeutico per la loro combinazione. Una combinazione di vitamina K3 (VK3) e acido ascorbico (AA) ha esibito un anti-cancro effetto sinergico, associati alla produzione extracellulare di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> che la morte cellulare promosso.

**METODI:** Il redox-silent vitamina E succinato analogico alfa-tocoferolo (alfa-TOS) è stato utilizzato in combinazione con VK3 e AA per valutare il loro effetto sulle cellule di cancro alla prostata.

**RISULTATI:** le cellule tumorali della prostata sono stati sensibili alle alfa-TOS e di trattamento VK3, ma resistente agli AA fino a 3,2 mM. Quando combinati, un effetto sinergico è stato trovato per VK3-AA, mentre l'alfa-TOS-VK3 e la combinazione di alfa-TOS-AA ha mostrato un effetto additivo e antagonista, rispettivamente. Tuttavia, le dosi sub-letali di combinazione AA-VK3 combinato con una dose sub-tossica di alfa-TOS ha dimostrato di indurre la morte cellulare efficiente che somiglia autophagy. Associata a questa morte cellulare, perossidazione lipidica, danni al DNA, alterazioni del citoscheletro, perturbazione lisosomiale-mitochondriale, e il rilascio di citocromo c, senza l'attivazione delle caspasi sono stati osservati. L'inibizione della proteasi lisosomiali non attenuare la morte cellulare indotta da agenti combinati. Inoltre, le morti cellulari per apoptosi e autophagy sono stati rilevati.

**CONCLUSIONE:** Queste scoperte supportano l'idea emergente che combinazioni sinergiche di alcuni agenti in grado di superare la tossicità e altri effetti collaterali associati con alte dosi di farmaci solo creando le opportunità per la selettività terapeuticamente rilevanti.

101: Liu B, Kuang A, Huang R, Zhao Z, Zeng Y, Wang J, Tian R.

### **Influence of vitamin C on salivary absorbed dose of <sup>131</sup>I in thyroid cancer patients: a prospective, randomized, single-blind, controlled trial.**

J Nucl Med. 2010Apr;51(4):618-23.

**METHODS:** Patients with differentiated thyroid cancer who had been prepared for thyroid remnant ablation after total thyroidectomy were prospectively recruited and, using a random-number table, were divided into 4 groups. In the hypothyroid condition, the patients in groups A, B, C, and D began sucking vitamin C (100 mg every 4 h in the daytime over 6 d) at 1, 5, 13, and 25 h, respectively, after receiving 3.7 GBq of (<sup>131</sup>I). Scintigraphic images of the head and neck were serially acquired after (<sup>131</sup>I) administration to assess biokinetics in the salivary glands. Calculation of salivary absorbed dose was based on the MIRD schema of the Society of Nuclear Medicine.

**RESULTS:** Seventy-two patients (18, 18, 19, and 17 patients from groups A, B, C, and D, respectively) were eligible for the analysis of salivary dosimetry. Differences in absorbed doses to

the parotid salivary gland (0.18 +/- 0.11, 0.16 +/- 0.07, 0.16 +/- 0.09, and 0.16 +/- 0.12 mGy/MBq in groups A, B, C, and D, respectively; P = 0.37) and submandibular salivary gland (0.19 +/- 0.05, 0.17 +/- 0.05, 0.18 +/- 0.07, and 0.17 +/- 0.06 mGy/MBq, respectively; P = 0.28) were not statistically significant among groups. Salivary cumulated activities arising from the first 24 h after (131)I administration accounted for 86.08% +/- 7.89% (range, 75%-98%) of total cumulated activities. Differences in salivary absorbed dose during the first 24 h were not statistically significant among the 4 groups either (P = 0.32 and 0.24, respectively, for the parotid and submandibular salivary glands).

**CONCLUSION:** Salivary stimulation with vitamin C at any time after (131)I administration has only a limited effect on salivary absorbed dose in thyroid cancer patients.

### **Influenza della vitamina C sulla dose salivare assorbita di 131I nei pazienti con tumore della tiroide: uno studio prospettico, randomizzato, controllato.**

**METODI:** I pazienti con cancro differenziato della tiroide, che era stato preparato per ablazione del residuo tiroideo dopo tiroidectomia totale sono stati reclutati in modo prospettico e, utilizzando una tabella di numeri casuali, sono stati divisi in 4 gruppi. Nella condizione di ipotiroidismo, i pazienti nei gruppi A, B, C e D ha cominciato succhiare vitamina C (100 mg ogni 4 ore durante il giorno oltre 6 d) a 1, 5, 13, e 25 ore, rispettivamente, dopo aver ricevuto 3,7 GBq di (131) I. immagini scintigrafiche della testa e del collo sono stati acquisiti dopo in serie (131) I all'amministrazione di valutare biocinetica nelle ghiandole salivari. Calcolo della dose assorbita salivari si è basata sullo schema MIRD della Society of Nuclear Medicine.

**RISULTATI:** Settantadue pazienti (18, 18, 19, e 17 pazienti da parte di gruppi A, B, C e D, rispettivamente) sono idonei per l'analisi della dosimetria salivare. Le differenze nelle dosi assorbite alla ghiandola salivare parotide (0,18 + / - 0,11, 0,16 + / - 0,07, 0,16 + / - 0,09, e 0,16 + / - 0,12 mGy / MBq nei gruppi A, B, C e D, rispettivamente; P = 0,37) e la ghiandola salivare sottomandibolare (0.19 + / - 0,05, 0,17 + / - 0,05, 0,18 + / - 0,07, e 0,17 + / - 0,06 mGy / MBq, rispettivamente, p = 0.28) non sono risultate statisticamente significative tra i gruppi. attività salivari complessiva derivante dal prime 24 ore dopo (131) I amministrazione rappresentavano 86,08% + / - 7,89% (range 75% -98%) del totale delle attività cumulata. Le differenze di salivari dose assorbita durante le prime 24 ore non sono risultate statisticamente significative tra i 4 gruppi o (rispettivamente P = 0,32 e 0,24, per le ghiandole salivari parotide e sottomandibolare). **CONCLUSIONE:** stimolazione salivare con la vitamina C in qualsiasi momento dopo (131) I amministrazione ha solo un effetto limitato sulla salivari dose assorbita in pazienti affetti da cancro alla tiroide.

106: Ullah MF, Khan HY, Zubair H, Shamim U, Hadi SM.

### **The antioxidant ascorbic acid mobilizes nuclear copper leading to a prooxidant breakage of cellular DNA: implications for chemotherapeutic action against cancer.**

Cancer ChemotherPharmacol. 2010 Mar 6.

**PURPOSE:** Ascorbic acid is an essential micronutrient and is considered to have an antioxidant function in living systems. For the past several decades, ascorbic acid has been the subject of considerable interest as an anticancer agent. Several studies have shown that ascorbic acid is cytotoxic to a variety of cancer cells, whereas normal cells are relatively resistant to such cytotoxic action. In this study, we propose a putative molecular mechanism that accounts for the preferential cytotoxicity of ascorbic acid against cancer cells.

**METHODS:** Standard and lysed version of alkaline single-cell gel electrophoresis (Comet assay); ferrous oxidation-xylene orange (FOX) assay.

**RESULTS:** We show that ascorbic acid acts as a prooxidant and leads to oxidative DNA breakage in lymphocytes and lymphocyte nuclei. Scavengers of reactive oxygen species were able to inhibit ascorbic acid-induced DNA breakage, suggesting the involvement of reactive oxygen species in this reaction. We further show that such DNA breakage is inhibited by both iron and copper chelators in cells, whereas in nuclei, similar inhibition was achieved only by copper chelators, indicating an important role of chromatin-bound copper in the prooxidant cellular DNA breakage by ascorbic acid.

**CONCLUSION:** We propose that the copper-dependent cellular redox status is an important element in the cytotoxic action of ascorbic acid against cancer cells. It is well established that cellular copper levels are considerably elevated in various malignancies. Therefore, cancer cells may be more subject to electron transfer between copper and ascorbate to generate reactive oxygen species. In light of these observations and those in literature, in this paper we explain that the preferential cytotoxicity of ascorbic acid against cancer cells is the result of elevated copper levels in such cells. Further, this study identifies nuclear copper as a novel molecular target for cytotoxic action of ascorbic acid, which has implications for its chemotherapeutic properties against cancer.

### **L'acido ascorbico antiossidante mobilita rame nucleare che porta ad una rottura del DNA cellulare proossidante: implicazioni dell'azione dei chemioterapici contro il cancro.**

**SCOPO:** L'acido ascorbico è un micronutriente essenziale ed è considerato di avere una funzione antiossidante nei sistemi viventi. Per gli ultimi decenni, l'acido ascorbico è stato oggetto di notevole interesse come agente antitumorale. Diversi studi hanno dimostrato che l'acido ascorbico è citotossico per una varietà di cellule tumorali, mentre le cellule normali sono relativamente resistenti a tale azione citotossica. In questo studio, proponiamo un meccanismo molecolare che potrebbe contare per la citotossicità preferenziale di acido ascorbico contro le cellule tumorali.

**METODI:** Standard e la versione di lisato alcalina elettroforesi su gel a singola cella (Comet assay); ferrosi arancio-ossidazione xilenolo (FOX) dosaggio.

**RISULTATI:** Si dimostra che agisce come un acido ascorbico proossidante e porta alla rottura ossidativa al DNA dei linfociti e dei nuclei di linfociti. Scavengers di specie reattive dell'ossigeno sono stati in grado di inibire l'acido ascorbico rottura del DNA, inoltre, suggerendo il coinvolgimento di specie reattive dell'ossigeno in questa reazione. Ci mostrano inoltre che tale rottura del DNA, è inibita da entrambi i chelanti del ferro e del rame nelle cellule, mentre in nuclei, inibizione simile è stato raggiunto solo da chelanti del rame, indicando un ruolo importante di rame cromatina-bound la rottura proossidante DNA cellulare di acido ascorbico.

**CONCLUSIONE:** Proponiamo che lo status di rame-dipendente redox cellulare è un elemento importante per l'azione citotossica di acido ascorbico contro le cellule tumorali. È ben noto che i livelli di rame cellulare sono notevolmente elevati nei vari tumori maligni. Pertanto, le cellule tumorali possono essere più soggetti a trasferimento elettronico tra rame e ascorbato di generare specie reattive dell'ossigeno. Alla luce di queste osservazioni e di quelle in letteratura, in questo articolo si spiega che la citotossicità preferenziale di acido ascorbico contro le cellule tumorali è il frutto di elevati livelli di rame in tali cellule. Inoltre, questo studio identifica rame nucleare come un nuovo bersaglio molecolare per l'azione citotossica di acido ascorbico, che ha implicazioni per le sue proprietà chemioterapici contro il cancro.

107: Hopkins MH, Fedirko V, Jones DP, Terry PD, Bostick RM.

**Antioxidant micronutrients and biomarkers of oxidative stress and inflammation in colorectal adenoma patients: results from a randomized, controlled clinical trial.**

Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2010 Mar;19(3):850-8.

Previous epidemiologic observational and experimental studies investigated the potential of antioxidant micronutrients to modulate cancer risk, but these studies produced inconsistent results. In this pilot, randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial (n = 47), we assessed the effects of an antioxidant micronutrient combination (800 mg dl-alpha-tocopherol acetate, 24 mg beta-carotene, 1.0 g vitamin C, 200 microg l-selenomethionine, 7.2 mg riboflavin, 80 mg niacin, 60 mg zinc, 5 mg manganese) given daily over 4 months on oxidative and inflammatory biomarkers in patients with a history of sporadic colorectal adenoma. Plasma tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha), interleukin-6, and F2-isoprostane concentrations were measured using ELISAs, and cystine

(CySS) was measured using high-performance liquid chromatography. Plasma TNF-alpha concentration decreased in the active treatment group by 37% relative to the placebo group ( $P = 0.002$ ), and CySS decreased by 19% ( $P = 0.03$ ); however, interleukin-6 and F2-isoprostane concentrations decreased in antioxidant-treated nonsmokers but increased in smokers, although these findings were not statistically significant. The decreases of TNF-alpha and CySS were more pronounced in nonsmokers. These data suggest that (a) an antioxidant micronutrient cocktail can modulate biomarkers of oxidative stress and inflammation in humans and (b) the effects of antioxidant micronutrient supplementation on biomarkers of inflammation and oxidative stress may differ according to smoking status.

### **Micronutrienti antiossidanti e biomarker dello stress ossidativo ed infiammazione nei pazienti con adenoma coloretale: risultati di uno studio clinico randomizzato e controllato.**

Precedenti studi epidemiologici osservazionali e sperimentali hanno studiato il potenziale di micronutrienti antiossidanti di modulare il rischio di cancro, ma questi studi hanno prodotto risultati inconsistenti. In questo progetto pilota, randomizzato, in doppio cieco, controllato con placebo clinici ( $n = 47$ ), abbiamo valutato gli effetti di una combinazione di micronutrienti antiossidanti (800 mg di acetato di DL-alfa-tocoferolo, 24 mg di beta-carotene, 1,0 g di vitamina C, 200 microg L-selenometionina, 7.2 mg di riboflavina, niacina 80 mg, 60 mg di zinco, manganese 5 mg) somministrato ogni giorno oltre 4 mesi su biomarcatori ossidativo e infiammazione nei pazienti con storia di adenoma coloretale sporadico. fattore di necrosi tumorale Plasma-alfa (TNF-alfa), interleuchina-6, e le concentrazioni di F2-isoprostani sono stati misurati con metodo ELISA, e cistina (CySS) è stata misurata utilizzando alte prestazioni cromatografia liquida. La concentrazione plasmatica di TNF-alfa è diminuito nel gruppo di trattamento attivo del 37% rispetto al gruppo placebo ( $P = 0,002$ ), e CySS diminuiti del 19% ( $P = 0,03$ ), tuttavia, l'interleuchina-6 e le concentrazioni di F2-isoprostani è diminuito in antiossidanti -trattati non fumatrici, ma è aumentata nei fumatori, anche se questi risultati non erano statisticamente significativi. La diminuzione del TNF-alfa e CySS sono stati più pronunciati nei non fumatori. Questi dati suggeriscono che (a) un cocktail di micronutrienti antiossidanti in grado di modulare biomarker dello stress ossidativo e infiammazione negli esseri umani e (b) gli effetti della supplementazione di micronutrienti antiossidanti sui biomarcatori di infiammazione e lo stress ossidativo può variare a seconda lo stato di fumatore.

112: Takemura Y, Satoh M, Satoh K, Hamada H, Sekido Y, Kubota S.

### **High dose of ascorbic acid induces cell death in mesothelioma cells.**

Biochem Biophys Res Commun. 2010 Apr 2;394(2):249-53.

Malignant mesothelioma is an asbestos-related fatal disease with no effective cure. Recently, high dose of ascorbate in cancer treatment has been reexamined. We studied whether high dose of ascorbic acid induced cell death of four human mesothelioma cell lines. High dose of ascorbic acid induced cell death of all mesothelioma cell lines in a dose-dependent manner. We further clarified the cell killing mechanism that ascorbic acid induced reactive oxygen species and impaired mitochondrial membrane potential. In vivo experiment, intravenous administration of ascorbic acid significantly decreased the growth rate of mesothelioma tumor inoculated in mice. These data suggest that ascorbic acid may have benefits for patients with mesothelioma.

### **Alte dosi di acido ascorbico inducono morte cellulare in cellule di mesotelioma.**

Il mesotelioma maligno è una malattia legata all'amianto fatale con una cura efficace. Recentemente, ad alte dosi di acido ascorbico nel trattamento del cancro è stata riesaminata. Abbiamo studiato se alte dosi di acido ascorbico morte cellulare indotta da quattro linee cellulari umane di mesotelioma. Alte dosi di acido ascorbico ha indotto la morte delle cellule di linee cellulari di tutti mesotelioma in modo dose-dipendente. Abbiamo ulteriormente chiarito il meccanismo di morte cellulare indotto che l'acido ascorbico specie reattive dell'ossigeno e compromessa potenziale di membrana mitocondriale. In esperimenti in vivo, la somministrazione endovenosa di acido ascorbico significativamente diminuito il tasso di crescita del tumore del mesotelioma inoculati nei topi. Questi dati suggeriscono che l'acido ascorbico può avere benefici per i pazienti affetti da mesotelioma.

113: Biswas S, Zhao X, Mone AP, Mo X, Vargo M, Jarjoura D, Byrd JC, Muthusamy N.

### **Arsenic trioxide and ascorbic acid demonstrate promising activity against primary human CLL cells in vitro.**

Leuk Res. 2010 Jul;34(7):925-31.

The compromised antioxidant defense system in chronic lymphocytic leukemia (CLL) suggested a potential use for reactive oxygen species (ROS) generating arsenic trioxide (ATO) and ascorbic acid. While both ATO and ascorbic acid mediate cytotoxicity in CLL B cells as single agents, the efficacy of ATO is enhanced by ascorbic acid. This effect is dependent on increased ROS accumulation, as pretreatment of B-CLL cells with a glutathione reducing buthionine sulfoximine

or catalase inhibiting aminotriazole, enhanced ATO/ascorbic acid-mediated cytotoxicity. Pretreatment with reducing agents such as catalase, or thiol antioxidant, N-acetyl cysteine or GSH also abrogated ATO/ascorbic acid-mediated cytotoxicity. Furthermore, Hu1D10-mediated cell death was enhanced with ATO and ascorbic acid, thus justifying potential combination of ATO/arsenic trioxide therapy with antibodies such as Hu1D10 that also cause accumulation of ROS.

**Il triossido di arsenico e l'acido ascorbico hanno dimostrato un'attività promettente nei confronti delle cellule umane primarie CLL in vitro.**

Il compromesso sistema di difesa antiossidante nella leucemia linfatica cronica (LLC) hanno suggerito un potenziale uso per le specie reattive dell'ossigeno (ROS) generando triossido di arsenico (ATO) e l'acido ascorbico. Mentre sia ATO e acido ascorbico mediano citotossicità in cellule CLL B come agenti singoli, l'efficacia di ATO si arricchisce di acido ascorbico. Questo effetto dipende da un maggiore accumulo di ROS, come pretrattamento delle cellule B-CLL con una riduzione del glutatione sulfoximine butionine o catalasi Aminotriazolo inibendo, ATO migliorato / citotossicità acido ascorbico-mediata. Il pretrattamento con agenti riducenti come catalasi, o tiolo antiossidante, N-acetil cisteina e GSH ATO anche abolita / citotossicità acido ascorbico-mediata. Inoltre, la morte cellulare Hu1D10-mediata è stata arricchita con ATO e acido ascorbico, giustificando così potenziale combinazione di ATO / terapia con anticorpi arsenico triossido come Hu1D10 che anche causare l'accumulo di ROS.

116: Lee WJ.

**The prospects of vitamin C in cancer therapy.**

Immune Netw. 2009Oct;9(5):147-52. Epub 2009 Oct 30.

Ascorbate (vitamin C) is a cofactor for a number of metabolic enzymes and is an indisputable essential vitamin C for humans. However, the potential of ascorbate as an anticancer agent has been a topic of controversy. A number of previous reports have addressed both positive aspects and limitations of ascorbate in cancer therapy. In this review, we briefly summarize the potential antitumor effects of ascorbate and its prospects for clinical use.

**Vitamina C: prospettive nella terapia del cancro.**

L'ascorbato (vitamina C) è un cofattore per una serie di enzimi metabolici ed è un indiscutibile C vitamina essenziale per gli esseri umani. Tuttavia, il potenziale di acido ascorbico come agente antitumorale è stato un argomento di polemica. Una serie di studi precedenti hanno affrontato sia gli aspetti positivi e limiti di ascorbato nella terapia del cancro. In questa recensione abbiamo brevemente riassumere gli effetti antitumorali potenziali di ascorbato e delle sue prospettive per l'uso clinico.

117: Mikirova NA, Casciari JJ, Riordan NH.

**Ascorbate inhibition of angiogenesis in aortic rings ex vivo and subcutaneous Matrigel plugs in vivo.**

J AngiogenesRes. 2010 Jan 18;2:2.

**BACKGROUND:** Angiogenesis is critical to tumor growth and is therefore a potential target for cancer therapy. As many current inhibitors of angiogenesis exhibit host toxicity, natural alternatives are needed. At millimolar concentrations, ascorbate (vitamin C) inhibits migration and tubule formation by mature endothelial cells and endothelial progenitors. In the present study, we

examined the effects of ascorbate, at levels relevant during intravenous infusion therapy, on angiogenesis using an ex vivo and in vivo assay.

**METHODS:** Two assays were used to evaluate effect of high-doses ascorbic acid on angiogenesis: ex vivo rat aortic ring explant assay in Matrigel matrices and in vivo Matrigel plug assay. In aortic rings, we quantified microvessel growth, branching and vessel regression under different treatment conditions. In murine angiogenesis assay, male C57 mice 6-8 weeks old were treated by high-dose ascorbic acid and the number of microvessels was analyzed by histological method. To characterize the population of cells that formed capillary network and microvessels, the sections were stained by CD34 and CD31 antibodies.

**RESULTS:** Results show that sprouting of endothelial tubules from aortic rings was reduced in a concentration-dependent fashion by ascorbate: while controls roughly tripled sprout densities during the study, ascorbate (1 mg/mL, 5.5 mM) actually reduced sprout density. In vivo, the ability of mice to vascularize subcutaneously implanted Matrigel plug was diminished if the mice were treated with 430 mg/kg vitamin C: numbers of vessels, and vessel densities, in plugs from treated mice were roughly 30% less than those in plugs from untreated mice.

**CONCLUSIONS:** We conclude that the inhibition of angiogenesis by ascorbate suggested in vitro is confirmed in vivo, and that angiogenesis inhibition may be one mechanism by which intravenous ascorbate therapy shows efficacy in animal experiments and clinical case studies.

### **Inibizione da parte dell'ascorbato dell'angiogenesi negli anelli aortici ex vivo e spine Matrigel sottocutanee in vivo.**

La matrice da membrana basale BD Matrigel™ è un preparato di membrana basale in soluzione estratta dal sarcoma di topo di Engelbreth-Holm-Swarm (EHS), un tumore ricco di proteine della matrice extracellulare. I componenti principali sono la laminina, seguita dal collagene IV, dall'entactina e dal proteoglicano eparan-solfato. L'estratto contiene inoltre fattori di crescita che sono presenti naturalmente nel sarcoma di EHS. A temperatura ambiente, la matrice BD Matrigel si polimerizza per produrre una matrice biologicamente attiva che somiglia alla membrana basale delle cellule dei mammiferi. La matrice di membrana basale BD Matrigel™ è efficace per l'adesione e la differenziazione delle cellule epiteliali normali e trasformate dipendenti dall'ancoraggio, nonché di altri tipi di cellule. Il prodotto Growth Factor Reduced (GFR) è utile quando è richiesto un preparato basale a definizione superiore.

**BACKGROUND:** L'angiogenesi è fondamentale per la crescita del tumore e quindi è un potenziale bersaglio per la terapia del cancro. Come molti inibitori della corrente di tossicità ospite mostra l'angiogenesi, alternative naturali sono necessari. A concentrazioni millimolare, l'ascorbato (vitamina C) inibisce la migrazione e la formazione di tubuli da cellule endoteliali mature e di progenitori endoteliali. Nel presente studio, abbiamo esaminato gli effetti di ascorbato, a livelli rilevanti nel corso della terapia di infusione endovenosa, sull'angiogenesi usando un ex vivo di una prova in vivo.

**METODI:** Due saggi sono stati utilizzati per valutare effetti di alta dosi di acido ascorbico sull'angiogenesi: ex vivo aortica saggio anello espianto in matrici Matrigel e test in vivo del plug Matrigel. In anelli aortica, abbiamo quantificato la crescita dei microvasi, ramificazione e la regressione della nave in condizioni di disparità di trattamento. Nel saggio angiogenesi murino, di sesso maschile C57 topi 6-8 settimane di età sono stati trattati con alte dosi di acido ascorbico e il numero dei microvasi è stato analizzato con metodo istologico. Per caratterizzare la popolazione di cellule che formano rete capillare e microvasi, le sezioni sono state colorate con CD34 e CD31 anticorpi.

**RISULTATI:** I risultati mostrano che spuntano dei tubuli endoteliali da anelli aortica si è ridotto in modo concentrazione-dipendente con ascorbato: mentre i controlli circa triplicato germoglio densità

durante lo studio, l'ascorbato (1 mg / mL, 5,5 mm) effettivamente ridotto germoglio densità. In vivo, la capacità dei topi di vascolarizzano impiantato per via sottocutanea spina Matrigel è stata ridotta se i topi sono stati trattati con 430 mg / kg di vitamina C: numero di navi, e densità di navi in tappi dai topi trattati sono stati circa il 30% in meno rispetto a quelli spine da topi non trattati. CONCLUSIONI: Concludiamo che l'inibizione dell'angiogenesi con ascorbato suggerito in vitro è confermata in vivo, e che l'inibizione dell'angiogenesi potrebbe essere un meccanismo attraverso il quale terapia ascorbato endovena dimostra l'efficacia in esperimenti su animali e studi di casi clinici.

118: Hertz N, Lister RE.

**Improved survival in patients with end-stage cancer treated with coenzyme Q(10) and other antioxidants: a pilot study.**

Hertz N, Lister RE. Improved survival in patients with end-stage cancer treated with coenzyme Q(10) and other antioxidants: a pilot study. This pilot study evaluated the survival of patients with end-stage cancer who received supplements of coenzyme Q(10) and a

mixture of other antioxidants (e.g. vitamin C, selenium, folic acid and beta-carotene). During a period of 9 years, 41 patients who had end-stage cancer were included. Forty patients were followed until death and one patient was lost to follow-up and presumed dead. Primary cancers were located in the breast, brain, lungs, kidneys, pancreas, oesophagus, stomach, colon, prostate, ovaries and skin. The median predicted survival time was calculated from Kaplan-Meier curves for each patient at inclusion. Median predicted survival was 12 months (range 3 - 29 months), whereas median actual survival was 17 months (1 - 120 months), which is > 40% longer than the median predicted survival. Mean actual survival was 28.8 months versus 11.9 months for mean predicted survival. Ten patients (24%) survived for less time than predicted, whereas 31 (76%) survived for longer. Treatments were very well tolerated with few adverse effects.

### **Un miglioramento della sopravvivenza nei pazienti con cancro in fase terminale trattati con coenzima Q (10) e altri antiossidanti: uno studio pilota.**

Questo studio pilota ha valutato la sopravvivenza dei pazienti con cancro allo stadio terminale che hanno ricevuto supplementi di coenzima Q (10) e una miscela di antiossidanti (ad esempio la vitamina C, selenio, acido folico e beta-carotene). Durante un periodo di 9 anni, 41 pazienti che hanno avuto il cancro allo stadio terminale sono stati inclusi. Quaranta pazienti sono stati seguiti fino alla morte e un paziente è stato perso al follow-up e creduto morto. Tumori primari erano situati nella mammella, cervello, polmoni, reni, pancreas, esofago, stomaco, colon, prostata, ovaie e la pelle. Il tempo di sopravvivenza mediano predetto è stato calcolato dalle curve di Kaplan-Meier per ogni paziente al momento dell'inclusione. La sopravvivenza mediana previsto era di 12 mesi (range 3-29 mesi), mentre la sopravvivenza mediana era di 17 mesi effettivi (1 - 120 mesi), che è > 40% più lungo del previsto sopravvivenza mediana. La sopravvivenza media reale è stata 28,8 mesi versus 11,9 mesi per il medio predisse la sopravvivenza. Dieci pazienti (24%) sono sopravvissuti per meno tempo del previsto, mentre 31 (76%) sono sopravvissuti più a lungo. I trattamenti sono stati molto ben tollerato con pochi effetti collaterali.

124: Erkekoglu P, Baydar T.

### **Evaluation of the protective effect of ascorbic acid on nitrite- and nitrosamine-induced cytotoxicity and genotoxicity in human hepatoma line.**

Toxicol Mech Methods. 2010 Feb;20(2):45-52. PubMed PMID: 20100056.

Nitrites are ubiquitous environmental contaminants present in drinking water and foods. Nitrosamines can be formed endogenously from nitrate and nitrite and secondary amines or may be present in food, tobacco smoke, and drinking water. The major goal of this work was to evaluate the cytotoxic, reactive oxygen species (ROS)-producing and genotoxic effects of nitrite and nitrosamines and the possible protection by ascorbic acid in HepG2 cells. It was found that nitrite, N-nitrosodimethylamine (NDMA), N-nitrosodiethylamine (NDEA), and N-nitrosomorpholine (NMOR) decreased cell viability, increased intracellular ROS production, and caused genotoxicity. Compared to untreated cells as determined by alkaline Comet assay, nitrite, NDMA, NDEA, and NMOR raised the tail intensity up to 1.18-, 3.79-, 4.24-, and 4.16-fold, respectively. Ascorbic acid (AA, 10 µM) increased cell viability and reduced ROS production significantly ( $p < 0.05$ ). Additionally, AA treatment decreased the tail intensity caused by nitrite, NDMA, NDEA, and NMOR to 33.74%, 58.6%, 44.32%, and 43.97%, respectively. It can be concluded that ascorbic acid was able to reduce both tail intensity and tail moment in all of the nitrosamine treatments, particularly in NDMA. AA protected HepG2 cells against genotoxic effects caused by nitrosamines. This protection might be through different mechanisms, some of which are not still understood in depth. The future interest will be to understand which pathways are influenced by antioxidants, particularly by AA, and the outcomes of this prevention in other cell line types.

#### **Valutazione dell'effetto protettivo dell'acido ascorbico sulla citotossicità e genotossicità indotta dai nitriti e dalle nitrosamine in una linea umana di epatoma**

I nitriti sono contaminanti ambientali ubiquitari presenti in acqua potabile e alimenti. Nitrosammine può essere formato endogenamente da nitrati e nitriti e ammine secondarie o possono essere presenti nei prodotti alimentari, fumo di tabacco, e l'acqua potabile. L'obiettivo principale di questo lavoro è stato quello di valutare la citotossicità, le specie reattive dell'ossigeno (ROS)-produzione e gli effetti genotossici di nitriti e nitrosammine e la protezione possibile da acido ascorbico nelle cellule HepG2. Si è constatato che il nitrito, N-nitrosodimetilamina (NDMA), N-nitrosodiethylamine (NDEA), e N-nitrosomorpholine (NMOR) è diminuita la vitalità cellulare, aumento della produzione intracellulare di ROS, e genotossicità causato. Rispetto alle cellule non trattate come determinato dal Comet assay alcalino, nitriti, NDMA, NDEA, e NMOR sollevato la coda di intensità fino a 1.18-, 3,79, 4,24, e 4,16 volte, rispettivamente. L'acido ascorbico (AA, 10 µM) ha aumentato la vitalità cellulare e ridotta produzione di ROS in modo significativo ( $p < 0,05$ ). Inoltre, il trattamento AA è diminuita l'intensità coda causata da nitriti, NDMA, NDEA e NMOR al 33,74%, 58,6%, 44,32% e 43,97%, rispettivamente. Si può concludere che l'acido ascorbico è stato in grado di ridurre sia l'intensità della coda e tail momento in tutti i trattamenti nitrosamine, in particolare in NDMA. AA cellule HepG2 protetto contro gli effetti genotossici causati da nitrosammine. Questa protezione potrebbe essere attraverso meccanismi diversi, alcuni dei quali non sono ancora capito in profondità. L'interesse per il futuro sarà quello di capire quali percorsi sono influenzati da antiossidanti, in particolare di AA, e gli esiti di questa prevenzione in altri tipi di cellula.

128: Du J, Martin SM, Levine M, Wagner BA, Buettner GR, Wang SH, Taghiyev AF, Du C, Knudson CM, Cullen JJ.

#### **Mechanisms of ascorbate-induced cytotoxicity in pancreatic cancer.**

Clin Cancer Res. 2010 Jan 15;16(2):509-20. Epub 2010 Jan 12. PubMed PMID: 20068072; PubMed Central PMCID: PMC2807999.

**PURPOSE:** Pharmacologic concentrations of ascorbate may be effective in cancer therapeutics. We hypothesized that ascorbate concentrations achievable with i.v. dosing would be cytotoxic in pancreatic cancer for which the 5-year survival is <3%.

**EXPERIMENTAL DESIGN:** Pancreatic cancer cell lines were treated with ascorbate (0, 5, or 10 mmol/L) for 1 hour, then viability and clonogenic survival were determined. Pancreatic tumor cells were delivered s.c. into the flank region of nude mice and allowed to grow at which time they were randomized to receive either ascorbate (4 g/kg) or osmotically equivalent saline (1 mol/L) i.p. for 2 weeks.

**RESULTS:** There was a time- and dose-dependent increase in measured H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production with increased concentrations of ascorbate. Ascorbate decreased viability in all pancreatic cancer cell lines but had no effect on an immortalized pancreatic ductal epithelial cell line. Ascorbate decreased clonogenic survival of the pancreatic cancer cell lines, which was reversed by treatment of cells with scavengers of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Treatment with ascorbate induced a caspase-independent cell death that was associated with autophagy. In vivo, treatment with ascorbate inhibited tumor growth and prolonged survival.

**CONCLUSIONS:** These results show that pharmacologic doses of ascorbate, easily achievable in humans, may have potential for therapy in pancreatic cancer.

### **Meccanismi di citotossicità indotta dall'ascorbato nel cancro al pancreas**

SCOPO: le concentrazioni farmacologiche di acido ascorbico può essere efficace nelle terapie del cancro. Abbiamo ipotizzato che le concentrazioni di ascorbato ottenibile con iv dosaggio sarebbe citotossico nel cancro del pancreas per il quale è <la sopravvivenza a 5 anni del 3%.

DISEGNO SPERIMENTALE: linee cellulari del cancro pancreatico sono stati trattati con ascorbato (0, 5 o 10 mmol / L) per 1 ora, poi sono stati determinati vitalità e la sopravvivenza clonogenico. Cellule tumorali pancreatiche sono state consegnate s.c. nella regione del fianco di topi nudi e ha permesso di crescere in quel momento sono stati randomizzati a ricevere soluzione salina ascorbato (4 g / kg) o osmoticamente equivalente (1 mol / L) ip per 2 settimane.

RISULTATI: C'è stato un tempo-e aumento dose-dipendente in misura H (2) O (2) produzione con aumento delle concentrazioni di acido ascorbico. Ascorbato diminuita redditività in tutte le linee di cellule di cancro al pancreas, ma non ha avuto effetto su una linea immortalato pancreatico duttale cellule epiteliali. Ascorbato di ridotta sopravvivenza clonogeniche delle linee di cellule di cancro pancreatico, che è stato compensato da trattamento delle cellule con scavengers di H (2) O (2). Il trattamento con ascorbato indotto una morte cellulare caspasi-indipendente che è stata associata con l'autofagia. In vivo, il trattamento con acido ascorbico inibito la crescita tumorale e la sopravvivenza prolungata.

CONCLUSIONI: Questi risultati mostrano che dosi farmacologiche di acido ascorbico, facilmente realizzabile negli esseri umani, possono avere un potenziale per la terapia nel cancro del pancreas.

133: Esteban MA, Wang T, Qin B, Yang J, Qin D, Cai J, Li W, Weng Z, Chen J, Ni S, Chen K, Li Y, Liu X, Xu J, Zhang S, Li F, He W, Labuda K, Song Y, Peterbauer A, Wolbank S, Redl H, Zhong M, Cai D, Zeng L, Pei D.

**Vitamin C enhances the generation of mouse and human induced pluripotent stem cells.**

Cell Stem Cell.2010 Jan 8;6(1):71-9. Epub 2009 Dec 31. PubMed PMID: 20036631.

Somatic cells can be reprogrammed into induced pluripotent stem cells (iPSCs) by defined factors. However, the low efficiency and slow kinetics of the reprogramming process have hampered progress with this technology. Here we report that a natural compound, vitamin C (Vc), enhances iPSC generation from both mouse and human somatic cells. Vc acts at least in part by alleviating cell senescence, a recently identified roadblock for reprogramming. In addition, Vc accelerates gene expression changes and promotes the transition of pre-iPSC colonies to a fully reprogrammed state. Our results therefore highlight a straightforward method for improving the speed and efficiency of iPSC generation and provide additional insights into the mechanistic basis of the reprogramming process.

### **La vitamina C aumenta il numero di cellule staminali pluripotenti umane e di topo**

Le cellule somatiche possono essere riprogrammati in cellule staminali pluripotenti indotte (iPSCs) da fattori definiti. Tuttavia, la bassa efficienza e la cinetica lenta del processo di riprogrammazione hanno ostacolato i progressi con questa tecnologia. Qui segnaliamo che un composto naturale, la vitamina C (Vc), aumenta la generazione IPSC sia da mouse e cellule somatiche umane. Vc agisce almeno in parte alleviare la senescenza delle cellule, un blocco stradale recentemente identificato per la riprogrammazione. Inoltre, Vc accelera i cambiamenti di espressione genica e promuove il passaggio delle colonie pre-IPSC in uno stato completamente riprogrammato. I nostri risultati evidenziano quindi un metodo semplice per migliorare la velocità e l'efficienza della produzione IPSC e forniscono informazioni supplementari in base meccanicistica del processo di riprogrammazione.

137: Sakhi AK, Russnes KM, Thoresen M, Bastani NE, Karlsen A, Smeland S, Blomhoff R.

**Pre-radiotherapy plasma carotenoids and markers of oxidative stress are associated with survival in head and neck squamous cell carcinoma patients: a prospective study.**

BMC Cancer. 2009 Dec 21;9:458.

**BACKGROUND:** The purpose of this study was to compare plasma levels of antioxidants and oxidative stress biomarkers in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) patients with healthy controls. Furthermore, the effect of radiotherapy on these biomarkers and their association with survival in HNSCC patients were investigated.

**METHODS:** Seventy-eight HNSCC patients and 100 healthy controls were included in this study. Follow-up samples at the end of radiotherapy were obtained in 60 patients. Fifteen antioxidant biomarkers (6 carotenoids, 4 tocopherols, ascorbic acid, total antioxidant capacity, glutathione redox potential, total glutathione and total cysteine) and four oxidative stress biomarkers (total hydroperoxides, gamma-glutamyl transpeptidase, 8-isoprostaglandin F2alpha and ratio of oxidized/total ascorbic acid) were measured in plasma samples. Analysis of Covariance was used to compare biomarkers between patients and healthy controls. Kaplan-Meier plots and Cox' proportional hazards models were used to study survival among patients.

**RESULTS:** Dietary antioxidants (carotenoids, tocopherols and ascorbic acid), ferric reducing antioxidant power (FRAP) and modified FRAP were lower in HNSCC patients compared to controls and dietary antioxidants decreased during radiotherapy. Total hydroperoxides (d-ROMs), a marker for oxidative stress, were higher in HNSCC patients compared to controls and increased during radiotherapy. Among the biomarkers analyzed, high levels of plasma carotenoids before radiotherapy are associated with a prolonged progression-free survival (hazard rate ratio: 0.42, 95% CI: 0.20-0.91,  $p = 0.03$ ). Additionally, high relative increase in plasma levels of d-ROMs (hazard rate ratio: 0.31, 95% CI: 0.13-0.76,  $p = 0.01$ ) and high relative decrease in FRAP (hazard rate ratio: 0.42, 95% CI: 0.17-0.998,  $p = 0.05$ ) during radiotherapy are also positively associated with survival.

**CONCLUSIONS:** Biomarkers of antioxidants and oxidative stress are unfavourable in HNSCC patients compared to healthy controls, and radiotherapy affects many of these biomarkers. Increasing levels of antioxidant biomarkers before radiotherapy and increasing oxidative stress during radiotherapy may improve survival indicating that different factors/mechanisms may be important for survival before and during radiotherapy in HNSCC patients. Thus, the therapeutic potential of optimizing antioxidant status and oxidative stress should be explored further in these patients.

### **Nei pazienti con carcinoma squamoso della testa e del collo i carotenoidi nel siero pre-radioterapia e i marker dello stress ossidativo sono associati alla sopravvivenza: uno studio prospettico**

**BACKGROUND:** Lo scopo di questo studio era di confrontare i livelli plasmatici di antiossidanti e biomarcatori stress ossidativo in testa e carcinoma a cellule squamose del collo (HNSCC) pazienti con controlli sani. Inoltre, l'effetto della radioterapia in questi marcatori e la loro associazione con la sopravvivenza nei pazienti HNSCC sono stati studiati.

**METODI:** Settantotto HNSCC pazienti e 100 controlli sani sono stati inclusi in questo studio. Follow-up campioni alla fine della radioterapia sono stati ottenuti in 60 pazienti. Quindici biomarcatori antiossidante (6 carotenoidi, 4 tocoferoli, acido ascorbico, la capacità antiossidante totale, potenziale redox del glutatione, glutatione totale e la cisteina totale) e quattro marcatori di stress ossidativo (idroperossidi totali, gamma-glutamyl transpeptidasi, 8-isoprostaglandin F2alpha e rapporto di ossidato / totale di acido ascorbico) sono stati misurati nei campioni di plasma. Analisi della covarianza è stata utilizzata per confrontare i biomarcatori tra pazienti e controlli sani. appezamenti di Kaplan-Meier e Cox 'modelli di rischio proporzionale sono stati utilizzati per studiare la sopravvivenza tra i pazienti.

**RISULTATI:** antiossidanti nella dieta (carotenoidi, tocoferoli e acido ascorbico), ferrico potere antiossidante riducendo (FRAP) e modificato FRAP erano più bassi nei pazienti rispetto ai controlli HNSCC e antiossidanti alimentari è diminuito durante la radioterapia. idroperossidi totali (d-ROMs), un marker di stress ossidativo, erano più elevati nei pazienti HNSCC rispetto ai controlli e

una maggiore durante la radioterapia. Tra i biomarcatori analizzati, alti livelli di carotenoidi nel plasma prima di radioterapia sono associati con un prolungamento della sopravvivenza libera da progressione (hazard ratio tasso: 0,42, 95% CI: 0,20-0,91 p, = 0,03). Inoltre, alto aumento relativo dei livelli plasmatici del d-ROMs (tasso hazard ratio: 0,31, 95% CI: 0,13-0,76, p = 0,01) e alta relativa diminuzione FRAP (rapporto di rischio tasso: 0,42, 95% CI: 0,17- 0,998, p = 0,05) durante la radioterapia sono positivamente associate con la sopravvivenza. CONCLUSIONI: Biomarkers di antiossidanti e stress ossidativo sono sfavorevoli nei pazienti HNSCC rispetto ai controlli sani, e la radioterapia colpisce molti di questi biomarcatori. L'aumento dei livelli di biomarcatori antiossidanti prima di radioterapia e di aumentare lo stress ossidativo durante la radioterapia può migliorare la sopravvivenza che indicano che diversi fattori / meccanismi possono essere importanti per la sopravvivenza prima e durante la radioterapia nei pazienti HNSCC. Pertanto, il potenziale terapeutico di ottimizzare stato antiossidante e lo stress ossidativo opportunità di un approfondimento in questi pazienti.

**Pharmacologic concentrations of ascorbic acid cause diverse influence on differential expressions of angiogenic chemokine genes in different hepatocellular carcinoma cell lines.** Biomed Pharmacother. 2010 May;64(5):348-51. Epub 2009 Oct 22. PubMed PMID: 19932582.

This study was to investigate whether ascorbic acid (AA) at pharmacologic concentration became prooxidant and had the potential to influence the expressions of angiogenic and angiostatic chemokine genes in hepatocellular carcinoma (HCC) cell lines. Influence of low (1 mM) and high (30 mM) pharmacologic concentrations of AA on two HCC cell lines (cell line A, HCC24/KMUH; cell line B, HCC38/KMUH) were studied by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay and quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). Three angiogenic genes (CCL2, CXCL6, IL8), one angiostatic gene (CXCL10) and two genes related to oxidative stress (SOD2, VNN3) were selected for quantitative RT-PCR study. Both low and high pharmacologic concentrations of AA up-regulated CCL2, CXCL6, IL8, SOD2 and VNN3 genes in cell line A, but down-regulated CCL2 and IL8 genes in cell line B. CXCL6 gene in cell line B was down-regulated by high pharmacologic concentration of AA. CXCL10 gene was up-regulated by low pharmacologic concentration of AA, but was down-regulated by high pharmacologic concentration of AA in both cell lines. Low pharmacologic concentration of AA up-regulated VNN3 gene and high pharmacologic concentration of AA up-regulated SOD2 gene in cell line B. These results indicate that pharmacologic concentration of AA becomes prooxidant to HCC cells and has diverse influence on differential expressions of angiogenic chemokine genes in different HCC cell lines. Differential expressions of CXCL10 gene are determined by the concentrations of AA used. Clinical application of AA in patients with HCC should consider these effects.

**In diverse linee cellulari di carcinoma epatocellulare concentrazioni farmacologiche di acido ascorbico hanno influenze diverse sulla espressione differenziale dei geni delle chemochine angiogeniche**

Questo studio è stato valutare se l'acido ascorbico (AA) a concentrazione farmacologico è diventato proossidante e aveva il potenziale per influenzare l'espressione dei geni angiogenici chemochine e angiostatica nel carcinoma epatocellulare (HCC) linee cellulari. Influenza della bassa (1 mM) e alta (30 mM) le concentrazioni farmacologiche di AA su due linee cellulari di carcinoma epatocellulare (cella linea A, HCC24/KMUH; linea cellulare B, HCC38/KMUH) sono stati studiati da 3 - (4,5-dimethylthiazol -2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromuro (MTT), test e quantitativa catena inversa transcriptasi-polimerasi reazione (RT-PCR). Tre geni angiogenici (CCL2, CXCL6, IL8), un gene angiostatica (CXCL10) e due geni legati allo stress ossidativo (SOD2, VNN3) sono stati selezionati per lo studio quantitativo RT-PCR. CCL2 Entrambe le concentrazioni farmacologiche basse e alte di AA up-regolata, CXCL6, IL8, SOD2 VNN3 e geni in linee cellulari A, ma CCL2 down-regolato e IL8 geni in linee cellulari B. CXCL 6 geni in linee cellulari B era down-regolato da farmacologico alta concentrazione di AA. CXCL10 gene era up-regolata da bassa concentrazione farmacologica di AA, ma è stato down-regolato dalla concentrazione farmacologica elevato di AA in entrambe le linee cellulari. farmacologico bassa concentrazione di AA up-regolati gene VNN3 e concentrazione farmacologica elevato di AA gene SOD2 up-regolata in linea di cellule B. Questi risultati indicano che la concentrazione farmacologica di AA diventa proossidante a cellule di HCC e ha influenza su diverse espressioni differenziale dei geni angiogenici chemochine in diverse linee cellulari di carcinoma epatocellulare. espressione differenziale dei geni CXCL10 sono determinati dalla concentrazione di AA utilizzate. L'applicazione clinica di AA in pazienti con HCC dovrebbero prendere in considerazione questi effetti.

149: Das A, Banik NL, Ray SK.

## **Flavonoids activated caspases for apoptosis in human glioblastoma T98G and U87MG cells but not in human normal astrocytes.**

Cancer. 2010 Jan 1;116(1):164-76. PubMed PMID: 19894226.

**BACKGROUND:** Human glioblastoma is a deadly brain cancer that continues to defy all current therapeutic strategies. The authors induced apoptosis in human glioblastoma T98G and U87MG cells after treatment with apigenin, (-)-epigallocatechin, (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG), and genistein, which did not induce apoptosis in human normal astrocytes.

**METHODS:** Induction of apoptosis was examined using Wright staining and ApopTag assay. Production of reactive oxygen species (ROS) and increase in intracellular free Ca(2+) were measured by fluorescent probes. Analysis of mRNA and Western blotting indicated increases in expression and activities of the stress kinases and cysteine proteases for apoptosis. JC-1 showed changes in mitochondrial membrane potential (DeltaPsi(m)), and use of specific inhibitors confirmed activation of kinases and proteases in apoptosis.

**RESULTS:** Treatment of glioblastoma cells with apigenin, (-)-epigallocatechin, EGCG, or genistein triggered ROS production that induced apoptosis with phosphorylation of p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) and activation of the redox-sensitive c-Jun N-terminal kinase 1 pathway. Pretreatment of cells with ascorbic acid attenuated ROS production and p38 MAPK phosphorylation. Increases in intracellular free Ca2+ and activation of caspase-4 indicated involvement of endoplasmic reticulum stress in apoptosis. Other events in apoptosis included overexpression of Bax, loss of DeltaPsi(m), mitochondrial release of cytochrome c and Smac into the cytosol, down-regulation of baculoviral inhibitor-of-apoptosis repeat-containing proteins, and activation of calpain, caspase-9, and caspase-3. (-)-Epigallocatechin and EGCG also induced caspase-8 activity. Apigenin, (-)-epigallocatechin, EGCG, and genistein did not induce apoptosis in human normal astrocytes.

**CONCLUSIONS:** Results strongly suggest that flavonoids are potential therapeutic agents for induction of apoptosis in human glioblastoma cells.

## **I flavonoidi attivano le caspasi per l'apoptosi nelle cellule T98G e U87MG di glioblastoma umano ma non negli astrociti umani normali**

**BACKGROUND:** glioblastoma umano è un cancro al cervello mortale che continua a sfidare tutte le attuali strategie terapeutiche. Gli autori hanno indotto apoptosi nelle T98G glioblastoma e cellule umane U87MG dopo il trattamento con apigenina, (-)-epigallocatechina (-)-epigallocatechina-3-gallato (EGCG), e la genisteina, che non ha indotto apoptosi nelle cellule umane normali astrociti.

**METODI:** L'induzione di apoptosi è stata esaminata con la colorazione di Wright e ApopTag test. Produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e l'aumento intracellulare di Ca (2 +) sono stati misurati con sonde fluorescenti. Analisi di mRNA e Western blotting aumenti indicati nella espressione e attività della chinasi stress e le proteasi cisteina per apoptosi. JC-1 ha mostrato variazioni di potenziale della membrana mitocondriale (DeltaPsi (m)), e l'uso di inibitori specifici confermato l'attivazione delle chinasi e le proteasi in apoptosi.

**RISULTATI:** Il trattamento di cellule di glioblastoma con apigenina, (-)-epigallocatechina, EGCG, o genisteina innescato la produzione di ROS che l'apoptosi indotta con la fosforilazione di p38 mitogen-activated protein-chinasi (MAPK) e l'attivazione del redox-sensibili c-Jun N-terminale chinasi 1 percorso. Il pretrattamento delle cellule con acido ascorbico attenuato produzione di ROS e fosforilazione MAPK p38. Incrementi di Ca2 + libero intracellulare e l'attivazione della caspasi-4 coinvolgimento indicato di stress del reticolo endoplasmatico in apoptosi. Altri eventi in apoptosi incluso sovraespressione di Bax, perdita di DeltaPsi (m), rilascio mitocondriale di Smac e citocromo c nel citosol, down-regulation dei baculoviral inibitore-of-apoptosi ripetere contenenti proteine, e l'attivazione della calpaina, caspasi-9 , e caspasi-3. (-)-Epigallocatechin EGCG e anche indotta caspasi-8 attività. Apigenina, (-)-epigallocatechina, EGCG, e genisteina non ha indotto

apoptosi nelle cellule umane normali astrociti.  
CONCLUSIONI: I risultati suggeriscono fortemente che i flavonoidi sono potenziali agenti terapeutici per l'induzione di apoptosi in cellule di glioblastoma umano.

157: Kontek R, Drozda R, Sliwiński M, Grzegorzczak K.

**Genotoxicity of irinotecan and its modulation by vitamins A, C and E in human lymphocytes from healthy individuals and cancer patients.**

Toxicol In Vitro. 2010 Mar;24(2):417-24. Epub2009 Oct 22. PubMed PMID: 19853651.

Many patients being treated for cancer use dietary supplements, particularly antioxidants, in the hope of reducing the toxicity of chemotherapy or radiotherapy. However, clinicians should advise their patients against using antioxidant dietary supplements during chemotherapy. Irinotecan (CPT-11) is a common chemotherapeutic agent, but it causes side effects, including genotoxicity with damages the DNA of blood cells. The aim of this work was to evaluate the modulating effect of A, C and E vitamins on genotoxic activity of irinotecan (CPT-11) and to analyse the efficacy of DNA repair in lymphocytes of both patients with diagnosed colorectal carcinoma and healthy individuals in vitro. In healthy donors' cells CPT-11 did not exert a strong, genotoxic effect, both in the presence of vitamins and without them. In turn, a statistically significant increase of DNA migration in the comet tails was noted in patients' lymphocytes. The presence of vitamins A, C and E in incubation solutions acted synergistically, increasing the level of DNA lesions in cells caused by the exposure of the material on tested irinotecan concentrations. Analysis of the efficacy of DNA repair, performed after 2h of postincubation, showed the decrease of DNA percentage in comet tails in all experimental samples.

### **Genotossicità dell'irinotecan e sua modulazione da parte delle vitamine A, C ed E nei linfociti umani di individui sani e pazienti con tumore**

Molti pazienti in trattamento per uso integratori alimentari il cancro, in particolare antiossidanti, nella speranza di ridurre la tossicità della chemioterapia o radioterapia. Tuttavia, i medici dovrebbero consigliare ai loro pazienti di non usare gli integratori alimentari antiossidanti durante la chemioterapia. Irinotecan (CPT-11) è un agente chemioterapico comune, ma che provoca effetti collaterali, tra cui genotossicità con danni al DNA delle cellule del sangue. Lo scopo di questo lavoro è stato quello di valutare l'effetto di modulazione di A, vitamine C ed E su attività genotossica di irinotecan (CPT-11) e di analizzare l'efficacia della riparazione del DNA in linfociti di entrambi i pazienti con diagnosi di carcinoma del colon-retto e di individui sani in vitro . Nelle cellule donatori sani 'CPT-11 non hanno esercitato un forte effetto genotossico, sia in presenza di vitamine e senza di loro. A sua volta, un aumento statisticamente significativo della migrazione del DNA nella coda della cometa è stata osservata nei linfociti dei pazienti '. La presenza di vitamine A, C ed E nelle soluzioni di incubazione ha agito in sinergia, aumentando il livello di lesioni del DNA nelle cellule causati dalla esposizione del materiale sulle concentrazioni di irinotecan testati. Analisi dell'efficacia della riparazione del DNA, effettuato dopo 2h di postincubation, ha mostrato la diminuzione della percentuale di DNA nella coda della cometa in tutti i campioni sperimentali.

159: Chang HH, Chen CS, Lin JY.

**High dose vitamin C supplementation increases the Th1/Th2 cytokine secretion ratio, but decreases eosinophilic infiltration in bronchoalveolar lavage fluid of ovalbumin-sensitized and challenged mice.**

J AgricFood Chem. 2009 Nov 11;57(21):10471-6. PubMed PMID: 19831405.

Vitamin C is traditionally regarded to be beneficial for asthma, however the benefit is still controversial. In the present study, high dose vitamin C was supplemented to ovalbumin (OVA)-sensitized and challenged mice to evaluate the effects of dietary vitamin C on allergic asthma. In this study, the experimental mice were divided into four groups, including nonsensitized control, dietary control, positive control (cured ip with dexamethasone), and high dose vitamin C supplementation (130 mg of vitamin C/kg bw/day by gavage for 5 weeks). Differential leukocyte counts, levels of inflammatory mediators, as well as type 1 T-helper lymphocytes (Th1)-type and type 2 T-helper lymphocytes (Th2)-type cytokines in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were determined. The results showed that both high dose vitamin C supplementation and dexamethasone treatments significantly ( $P < 0.05$ ) decreased eosinophilic infiltration into BALF. High dose vitamin C supplementation significantly increased the secretion ratio of interferon (IFN)-gamma/interleukin (IL)-5 cytokines. This study suggests that high dose vitamin C supplementation might attenuate allergic inflammation in vivo via modulating the Th1/Th2 balance toward the Th1 pole during the Th2-skewed allergic airway inflammation and decreasing eosinophilic infiltration into BALF.

**Un incremento ad alta dose di vitamina C aumenta la percentuale di secrezione delle citochine Th1/Th2, ma diminuisce l'infiltrazione eosinofila nel fluido di lavaggio broncoalveolare di ovalbumina sintetizzata e topi**

La vitamina C è tradizionalmente considerato essere di beneficio per l'asma, ma il vantaggio è ancora controverso. Nel presente studio, alte dosi di vitamina C è stato completato per l'ovalbumina (OVA)-sensibilizzati e sfidato i topi per valutare gli effetti della vitamina C nella dieta in asma allergica. In questo studio, i topi sperimentali sono stati divisi in quattro gruppi, compreso il controllo nonsensitized, controllo della dieta, il controllo positivo (ip curato con desametasone), e ad alte dosi di vitamina C (130 mg di vitamina C / kg di peso corporeo / giorno mediante sonda gastrica per 5 settimane). Differenziale la conta dei leucociti, i livelli di mediatori infiammatori, come pure di tipo 1 linfociti T-helper (Th1)-tipo e di tipo 2 linfociti T-helper (Th2) citochine di tipo nel liquido di lavaggio broncoalveolare (BAL) sono stati determinati. I risultati hanno mostrato che entrambi i trattamenti con alte dosi di vitamina C e desametasone significativamente ( $P < 0,05$ ) è diminuita infiltrazione eosinofila nel BAL. Alte dosi di vitamina C ha aumentato significativamente la proporzione secrezione di interferone (IFN) -gamma/interleukin (IL) -5 citochine. Questo studio suggerisce che la dose elevata integrazione di vitamina C potrebbe attenuare l'infiammazione allergica in vivo attraverso la modulazione Th1/Th2 verso il polo Th1 durante l'infiammazione delle vie aeree oblique Th2-allergiche e diminuendo infiltrazione eosinofila nel BAL.

**Fucoidan-Vitamin C complex suppresses tumor invasion through the basement membrane, with scarce injuries to normal or tumor cells, via decreases in oxidative stress and matrix metalloproteinases.**

Int J Oncol. 2009 Nov;35(5):1183-9. PubMed PMID: 19787274.

Fucoidan (Fucdn) and vitamin C (VC) were saturatedly dissolved in water and lyophilized and thoroughly ethanol-rinsed until no detection for supernatant vitamin C to form the Fucdn-VC (1:0.23 wt/wt) inclusion body (Fucdn-VC-IB). Fucdn-VC-IB increased not only VC-stabilizing at 37 degrees C, but also hydroxyl-radical scavenging as shown by ESR/spin-trap method, more markedly than a mere mixture of Fucdn:VC (1:0.23 wt/wt). Invasion of human fibrosarcoma cells HT-1080 through the basement membrane was repressed by Fucdn-VC-IB of non-cytotoxic concentrations without significant inhibition to human skin dermal fibroblasts DUMS-16 cells. Fucdn-VC-IB suppressed the invasiveness-related gelatinases MMP-2/9, and diminished reactive oxygen species inside the cytoplasm around the nucleus, in HT-1080 cells as shown by electrophoretic zymography and the redox indicator NBT assay, respectively. Thus Fucdn-VC-IB markedly exhibits antioxidant and MMP-suppressing activities and preferentially inhibited tumor invasion without cytotoxicity to normal cells, and is suggested as a potent tumor-invasion suppressor.

**Il complesso fucoidan-vitamina C sopprime l'invasione tumorale attraverso la membrana basale, con scarse lesioni alle cellule normali o tumorali, attraverso la diminuzione dello stress ossidativo e delle metalloproteinasi della matrice**

Fucoidan (Fucdn) e vitamina C (VC) sono stati saturatedly disciolta in acqua e liofilizzato e accuratamente sciacquati etanolo fino nessun rilevamento per la vitamina C per formare il surnatante-Fucdn VC (1:0.23 peso / peso) del corpo di inclusione (Fucdn-VC-IB). Fucdn-VC-IB sono aumentate non solo VC-stabilizzazione a 37 gradi C, ma anche scavenging di radicali idrossile come dimostrato da ESR / metodo di spin-trap, più marcatamente di una miscela semplice Fucdn: VC (1:0.23 wt / wt) . L'invasione delle cellule fibrosarcoma umano HT-1080 attraverso la membrana basale è stata repressa da Fucdn-VC-IB di concentrazioni non citotossiche, senza una significativa inibizione a pelle umana cutanea Dums fibroblasti-16 celle. Fucdn-VC-IB soppresso la gelatinasi invasività legati MMP-2 / 9, e diminuito le specie reattive dell'ossigeno all'interno del citoplasma attorno al nucleo, in cellule HT-1080, come indicato da zimografia elettroforesi e la redox test NBT indicatore, rispettivamente. Così Fucdn-VC-IB marcatamente antiossidanti mostre e attività MMP-soppressione e preferenzialmente inibito invasione tumorale senza citotossicità nelle cellule normali, e si propone come un potente soppressore del tumore-invasione.

**[Vitamin C in complementary oncology--update 2009].**

Med MonatsschrPharm. 2009 Jul;32(7):263-7. Review. German. PubMed PMID: 19731754.

The antioxidant perhaps most widely used in complementary oncology is vitamin C, particularly by intravenous injection. In light of the recent clinical pharmacokinetic findings, the in vitro evidence of anti-tumour mechanisms and some well-documented cases of advanced cancers the role of high-dose intravenous vitamin C therapy in cancer treatment should be reassessed. High dose intravenous vitamin C therapy may have benefits in patients with advanced cancers, and cancers with poor prognosis and limited therapeutic options, but further clinical studies regarding the safety and efficacy of this therapy are necessary, especially in Germany.

**[Vitamina C nell'oncologia complementare--aggiornamento 2009].**

L'antiossidante forse più utilizzato in oncologia complementare è la vitamina C, in particolare per iniezione endovenosa. Alla luce dei recenti risultati clinici di farmacocinetica, la prova in vitro di meccanismi anti-tumorali e in alcuni casi ben documentati di tumori avanzati del ruolo di alte dosi di terapia endovenosa di vitamina C nel trattamento del cancro deve essere rivalutato. Alte dosi di vitamina C per via endovenosa terapia potrebbe avere benefici in pazienti con cancro avanzato, e tumori con prognosi infausta e limitate opzioni terapeutiche, ma ulteriori studi clinici per quanto riguarda la sicurezza e l'efficacia di questa terapia sono necessarie, soprattutto in Germania.

### **Bioactive compounds: historical perspectives, opportunities, and challenges.**

J Agric FoodChem. 2009 Sep 23;57(18):8142-60. PubMed PMID: 19719126.

Mom's conventional wisdom of eating fruits and vegetables to lead a healthy life has evolved with scientific, fact-finding research during the past four decades due to advances in science of "Foods for Health". Epidemiological and prospective studies have demonstrated the vital role of fruits, vegetables, and nuts in reducing the risk of cancer and cardiovascular diseases. In recent years, several meta-analyses strongly suggested that by adding one serving of fruits and vegetables to daily diet, the risk of cardiovascular diseases will be decreased up to 7%. The multidisciplinary and partnership efforts of agriculture and medical scientists across the globe stimulated interest in establishing certain interdisciplinary centers and institutes focusing on "Foods for Health". While the consumption of various healthy foods continues, several questions about toxicity, bioavailability, and food-drug interactions of bioactive compounds are yet to be fully understood on the basis of scientific evidence. Recent research on elucidation of the molecular mechanisms to understand the "proof of the concept" will provide the perfect answer when consumers are ready for a "consumer-to-farm" rather than the current "farm-to-consumer" approach. The multidisciplinary research and educational efforts will address the role of healthy foods to improve eye, brain, and heart health while reducing the risk of cancer. Through this connection, this review is an attempt to provide insight and historical perspectives on some of the bioactive compounds from the day of discovery to their current status. The bioactive compounds discussed in this review are flavonoids, carotenoids, curcumin, ascorbic acid, and citrus limonoids.

### **Composti bioattivi: prospettive storiche, opportunità e sfide**

La saggezza convenzionale delle madri di mangiare frutta e verdura di condurre una vita sana è evoluto con scientifica, la ricerca di accertamento dei fatti nel corso degli ultimi quattro decenni, grazie ai progressi della scienza di "alimenti per la salute". Epidemiologici e di studi prospettici hanno dimostrato il ruolo vitale di frutta, verdura, noci e nel ridurre il rischio di cancro e malattie cardiovascolari. Negli ultimi anni, diverse meta-analisi suggerisce fortemente che con l'aggiunta di una porzione di frutta e verdura alla dieta giornaliera, il rischio di malattie cardiovascolari è diminuita fino al 7%. Gli sforzi multidisciplinari e di partenariato del settore agricolo e gli scienziati medici in tutto il globo stimolato interesse nella creazione di alcuni centri interdisciplinari e istituti concentrandosi su "Gli alimenti per la salute". Mentre il consumo di vari cibi sani continua, diverse domande circa la tossicità, la biodisponibilità, e le interazioni alimenti-farmaco di composti bioattivi devono ancora essere pienamente compreso sulla base di prove scientifiche. Recenti ricerche sul chiarimento dei meccanismi molecolari di comprendere la "prova di concetto" fornirà la soluzione ideale quando i consumatori sono pronti per una "consumer-to-farm", piuttosto che l'attuale approccio "farm-to-consumer". La ricerca multidisciplinare e gli sforzi educativi affronterà il ruolo di cibi sani per migliorare occhio, cervello e salute del cuore riducendo il rischio di cancro. Attraverso questa connessione, questa recensione è un tentativo di fornire indicazioni e prospettive storiche su alcuni dei composti bioattivi a partire dal giorno della scoperta del loro stato attuale. I composti bioattivi discusso in questa rassegna sono i flavonoidi, carotenoidi, curcumina, acido ascorbico, e limonoidi agrumi.

174: Martinovich GG, Martinovich IV, Cherenkevich SN.

**Effects of ascorbic acid on calcium signaling in tumor cells.**

Bull Exp Biol Med. 2009 Apr;147(4):469-72.English, Russian. PubMed PMID: 19704951.

Effects of ascorbic acid on calcium homeostasis of human laryngeal carcinoma cells were studied. Intracellular concentration of free calcium and intracellular pH were measured by fluorescent analysis. Ascorbic acid in concentrations of 3-10 mM caused pH drop and sharply increased concentrations of free Ca ions in HEP-2 cells. Intracellular concentration of free Ca ions resulted from Ca ion release from the thapsigargin-sensitive Ca depots.

**Effetti dell'acido ascorbico sulla via di segnale del calcio nelle cellule tumorali**

Effetti di acido ascorbico sull'omeostasi del calcio delle cellule umane di carcinoma laringeo sono stati studiati. Concentrazione intracellulare di calcio libero intracellulare e pH sono stati misurati mediante analisi a fluorescenza. L'acido ascorbico in concentrazioni di 3-10 mM causato pH goccia e le concentrazioni di forte aumento di ioni liberi Ca in cellule HEP-2. Concentrazione intracellulare di ioni Ca libero provocato dal rilascio di ioni Ca dai depositi thapsigargin Ca-sensitive.

177: Bertoia M, Albanes D, Mayne ST, Männistö S, Virtamo J, Wright ME.

**No association between fruit, vegetables, antioxidant nutrients and risk of renal cell carcinoma.**

Int J Cancer. 2010 Mar 15;126(6):1504-12.

Previous epidemiologic studies that have examined the relationship between renal cell carcinoma (RCC) risk and intakes of plant foods and antioxidant nutrients have yielded inconsistent results. We therefore examined the associations between intakes of fruit, vegetables, carotenoids, flavonoids, vitamin E and vitamin C and RCC risk in the Alpha-Tocopherol, Beta-Carotene Cancer Prevention (ATBC) Study cohort. At baseline, 27,062 male Finnish smokers aged 50-69 years completed a 276-item dietary questionnaire that included questions on frequency of consumption and portion size. During up to 19 years of follow-up, 255 men developed RCC. Cox proportional hazards models were utilized to estimate relative risks (RR) and 95% confidence intervals (CI). Despite a large range in intake, no association was observed between fruit, vegetables or antioxidant nutrients and RCC risk. For example, multivariate RRs and 95% CIs for the highest versus the lowest quartile of intake were 0.79 (0.55-1.14), 1.23 (0.85-1.79), 1.09 (0.74-1.60), 0.83 (0.57-1.21), 1.09 (0.73-1.64) and 0.99 (0.67-1.46) for fruit, vegetables, total carotenoids, total flavonoids, total vitamin E and vitamin C, respectively (all p values for trend > 0.05). Our results indicate that diet may not play a large role in the etiology of RCC in male smokers, although further examination of these associations in nonsmokers, women and diverse racial populations is warranted.

**Nessuna associazione tra frutta, vegetali, nutrienti antiossidanti e rischio di carcinoma al rene.**

Precedenti studi epidemiologici che hanno esaminato la relazione tra carcinoma a cellule renali (RCC), il rischio e l'assunzione di cibi vegetali e nutrienti antiossidanti hanno dato risultati contraddittori. Abbiamo quindi esaminato l'associazione tra assunzione di frutta, verdura, carotenoidi, flavonoidi, vitamina E e vitamina C e rischio di RCC nel-Alpha Tocopherol, Beta-Carotene Cancer Prevention (ATBC) Cohort Study. Al basale, 27.062 fumatori maschi finlandesi di età compresa tra 50-69 anni hanno compilato un questionario 276-voce alimentari che includeva domande sulla frequenza del consumo e della grandezza della porzione. Nel corso fino a 19 anni di follow-up, 255 uomini hanno sviluppato carcinoma renale. Modelli di rischio proporzionale di Cox sono stati utilizzati per stimare i rischi relativi (RR) e intervalli di confidenza al 95% (CI). Nonostante una vasta gamma di aspirazione, nessuna associazione è stata osservata tra frutta, ortaggi o nutrienti antiossidanti e rischio di RCC. Ad esempio, RR multivariato e IC al 95% per il più alto rispetto al quartile più basso di assunzione sono stati 0,79 (0,55-1,14), 1,23 (0,85-1,79), 1,09 (0,74-1,60), 0,83 (0,57-1,21), 1,09 (0,73 -1,64) e 0,99 (0,67-1,46) per la frutta, verdura, carotenoidi totali, flavonoidi totali, la vitamina E e vitamina C totale, rispettivamente (tutti i valori p per trend <0,05). I nostri risultati indicano che la dieta non può giocare un ruolo importante nella eziologia della RCC nei fumatori di sesso maschile, anche se un ulteriore esame di queste associazioni nei non fumatori, le donne e diverse popolazioni di razza è garantito

178: Thompson CA, Habermann TM, Wang AH, Vierkant RA, Folsom AR, Ross JA, Cerhan JR.

## **Antioxidant intake from fruits, vegetables and other sources and risk of non-Hodgkin's lymphoma: the Iowa Women's Health Study.**

Int J Cancer. 2010 Feb 15;126(4):992-1003.

Antioxidant nutrients found in fruits, vegetables and other foods are thought to inhibit carcinogenesis and to influence immune status. We evaluated the association of these factors with risk of non-Hodgkin's lymphoma (NHL) overall and for diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) and follicular lymphoma specifically in a prospective cohort of 35,159 Iowa women aged 55-69 years when enrolled at baseline in 1986. Diet was ascertained using a validated semiquantitative food frequency questionnaire. Through 2005, 415 cases of NHL (including 184 DLBCL and 90 follicular) were identified. Relative risks (RRs) and 95% confidence intervals (CIs) were estimated using Cox regression, adjusting for age and total energy. The strongest associations of antioxidants with risk of NHL (RR for highest versus lowest quartile; *p* for trend) were observed for dietary vitamin C (RR = 0.78; *p* = 0.044), alpha-carotene (RR = 0.71; *p* = 0.015), proanthocyanidins (RR = 0.70; *p* = 0.0024) and dietary manganese (RR = 0.62; *p* = 0.010). There were no associations with multivitamin use or supplemental intake of vitamins C, E, selenium, zinc, copper or manganese. From a food perspective, greater intake of total fruits and vegetables (RR = 0.69; *p* = 0.011), yellow/orange (RR = 0.72; *p* = 0.015) and cruciferous (RR = 0.82; *p* = 0.017) vegetables, broccoli (RR = 0.72; *p* = 0.018) and apple juice/cider (RR = 0.65; *p* = 0.026) were associated with lower NHL risk; there were no strong associations for other antioxidant-rich foods, including whole grains, chocolate, tea or nuts. Overall, these associations were mainly observed for follicular lymphoma and were weaker or not apparent for DLBCL. In conclusion, these results support a role for vegetables, and perhaps fruits and associated antioxidants from food sources, as protective factors against the development of NHL and follicular lymphoma in particular.

## **Assunzioni di antiossidanti da frutta, verdure e altre risorse e rischio di linfoma non-Hodgkin: uno studio sulla salute delle donne in Iowa**

I nutrienti antiossidanti presenti nella frutta, verdura e altri alimenti sono ritenuti inibire la carcinogenesi e di influenzare lo stato immunitario. Abbiamo valutato l'associazione tra questi fattori di rischio di linfoma non-Hodgkin (NHL) in generale e per linfoma diffuso a grandi cellule B (DLBCL) ed il linfoma follicolare in particolare in una coorte di 35.159 donne di età compresa tra Iowa 55-69 anni, se iscritti al basale nel 1986. La dieta è stata accertata mediante un questionario validato semiquantitativo di frequenza alimentare. Fino al 2005, 415 casi di NHL (compresi i 184 DLBCL e 90 follicolare) sono stati identificati. I rischi relativi (RR) e intervalli di confidenza al 95% (IC) sono stati stimati tramite regressione di Cox, aggiustato per età e totale di energia. Le associazioni più forti di antiossidanti con il rischio di linfoma non Hodgkin (RR per il quartile più basso rispetto a più alto; *p* per trend) sono stati osservati per la vitamina C nella dieta (RR = 0,78, *p* = 0.044), alfa-carotene (RR = 0,71, *p* = 0,015), proantocianidine (RR = 0,70, *p* = 0,0024) e di manganese nella dieta (RR = 0,62, *p* = 0.010). Non ci sono state le associazioni con l'utilizzo multivitaminici o assunzione supplementare di vitamine C, E, selenio, zinco, rame o manganese. Dal punto di vista alimentare, una maggiore assunzione di frutta e verdura totale (RR = 0.69, *p* = 0,011), giallo / arancio (RR = 0.72, *p* = 0,015) e crucifere (RR = 0,82, *p* = 0,017) verdure, broccoli (RR = 0,72, *p* = 0,018) e succo di mela / sidro (RR = 0,65, *p* = 0.026) erano associati ad un minor rischio NHL e non vi erano forti associazioni per altri alimenti ricchi di antiossidanti, tra cui i cereali integrali, cioccolato, tè o dadi. Nel complesso, queste associazioni sono stati osservati principalmente per il linfoma follicolare e sono stati più deboli o non apparente per DLBCL. In conclusione, questi risultati supportano un ruolo per le verdure, e forse anche frutta e antiossidanti associati da fonti alimentari, come fattori protettivi contro lo sviluppo di NHL e del linfoma follicolare in particolare.

181: Yeom CH, Lee G, Park JH, Yu J, Park S, Yi SY, Lee HR, Hong YS, Yang J, LeeS.

**High dose concentration administration of ascorbic acid inhibits tumor growth in BALB/C mice implanted with sarcoma 180 cancer cells via the restriction of angiogenesis.**

J Transl Med. 2009 Aug 11;7:70.

To test the carcinostatic effects of ascorbic acid, we challenged the mice of seven experimental groups with  $1.7 \times 10^{-4}$  mol high dose concentration ascorbic acid after intraperitoneal administrating them with sarcoma S-180 cells. The survival rate was increased by 20% in the group that received high dose concentration ascorbic acid, compared to the control. The highest survival rate was observed in the group in which  $1.7 \times 10^{-4}$  mol ascorbic acid had been continuously injected before and after the induction of cancer cells, rather than just after the induction of cancer cells. The expression of three angiogenesis-related genes was inhibited by 0.3 times in bFGF, 7 times in VEGF and 4 times in MMP2 of the groups with higher survival rates. Biopsy Results, gene expression studies, and wound healing analysis in vivo and in vitro suggested that the carcinostatic effect induced by high dose concentration ascorbic acid occurred through inhibition of angiogenesis.

**La somministrazione ad alta concentrazione dell'acido ascorbico inibisce la crescita tumorale in topi BALB/C trapiantati con cellule cancerose di sarcoma 180 tramite la limitazione dell'angiogenesi**

Per testare gli effetti carcinostatic di acido ascorbico, abbiamo sfidato i topi di sette gruppi sperimentali con  $1,7 \times 10^{-4}$  mol alta concentrazione di acido ascorbico dopo la dose di somministrazione intraperitoneale con sarcoma di S-180 cellule. Il tasso di sopravvivenza è aumentata del 20% nel gruppo che aveva ricevuto ad alta concentrazione di acido ascorbico dose, rispetto al controllo. Il più alto tasso di sopravvivenza è stata osservata nel gruppo in cui  $1,7 \times 10^{-4}$  mol di acido ascorbico era stato continuamente iniettato prima e dopo l'induzione delle cellule di cancro, piuttosto che solo dopo l'induzione delle cellule tumorali. L'espressione dei tre geni angiogenesi connesse, è stato inibito dal 0,3 volte in bFGF, 7 volte di VEGF e 4 volte in MMP2 dei gruppi con tassi di sopravvivenza più elevati. I risultati della biopsia, studi di espressione genica, e la ferita analisi guarigione in vivo e in vitro, ha suggerito che l'effetto carcinostatic indotta da acido ascorbico ad alta dose di concentrazione avvenuta attraverso l'inibizione dell'angiogenesi.

183: Philips N, Dulaj L, Upadhya T.

**Cancer cell growth and extracellular matrix remodeling mechanism of ascorbate; beneficial modulation by *P. leucotomos*.**

Anticancer Res. 2009 Aug;29(8):3233-8. PubMed PMID: 19661340.

Ascorbate has dose-dependent inverse effects on cancer cells growth and expression of matrix metalloproteinases (MMP) and transforming growth factor-beta (TGF-beta), which regulate extracellular matrix (ECM) remodeling. We examined melanoma cell viability and ECM remodeling mechanisms of ascorbate and its modulation by an extract from *Polypodium leucotomos* (PL) (a fern) via the regulation of apoptosis, heat-shock proteins (HSPs), MMP-1 or tissue inhibitors of matrix metalloproteinase-1 (TIMP-1) that inhibits MMP-1. The dose-dependent regulation of cell viability/proliferation by ascorbate was associated with inverse regulation of apoptosis and stimulation of HSPs at growth-inhibitory concentrations. PL antagonized the stimulation of MMP-1, TGF-beta and HSPs by a growth-inhibitory ascorbate dose and stimulated the expression of TIMP-1, while maintaining growth inhibition. We infer that a combination of ascorbate with PL is beneficial to cancer management via the simultaneous inhibition of cell growth and expression of MMP-1, TGF-beta and HSPs, and furthermore, the stimulation of TIMP-1.

**Crescita cancerosa delle cellule e il meccanismo di rimodellamento della matrice extracellulare; modulazione positive da parte di *P. leucotomos*.**

Ascorbato ha effetti inversi dose-dipendente sulla crescita delle cellule tumorali e di espressione di matrix metalloproteinases (MMP) e fattore di crescita trasformante-beta (TGF-beta), che regolano la matrice extracellulare (ECM) rimodellamento. Abbiamo esaminato la vitalità delle cellule del melanoma e ECM meccanismi di rimodellamento di ascorbato e la sua modulazione da un estratto di *Polypodium leucotomos* (PL) (una felce) attraverso la regolazione dell'apoptosi, proteine heat-shock (HSP), MMP-1 o tessuto inibitori della metalloproteinasi della matrice -1 (TIMP-1) che inibisce MMP-1. Il regolamento dose-dipendente della vitalità cellulare / proliferazione di ascorbato è stata associata con la regolazione inversa di apoptosi e la stimolazione della HSP a concentrazioni di inibizione della crescita. PL antagonizzato la stimolazione della MMP-1, TGF-beta e HSP da una dose di inibizione della crescita ascorbato e stimolato l'espressione di TIMP-1, pur mantenendo l'inibizione della crescita. Si deduce che una combinazione di acido ascorbico con PL è benefico per la gestione del cancro tramite la contemporanea inibizione della crescita cellulare e l'espressione di MMP-1, TGF-beta e HSP, e, inoltre, la stimolazione del TIMP-1.

### **Identification and bioactivities of resveratrol oligomers and flavonoids from *Carex folliculata* seeds.**

J Agric Food Chem. 2009 Aug 26;57(16):7282-7. PubMed PMID: 19627089.

Plants of the *Carex* genus (Family: Cyperaceae) have attracted recent attention as potential food additives because they contain high levels of bioactive polyphenols commonly found in plant foods. Seven compounds, which included two resveratrol oligomers and five flavonoids, were isolated from seeds of *Carex folliculata* L. (northern long sedge), a forage prevalent in the northern United States. The compounds were identified by (1)H and (13)C nuclear magnetic resonance and mass spectrometry data. The resveratrol oligomers were pallidol (1), a resveratrol dimer reported to be present in levels equivalent to those of resveratrol in red wine, and kobophenol A (2), a resveratrol tetramer with a unique 2,3,4,5-tetraaryltetrahydrofuran skeleton. The flavonoids were isoorientin (3), luteolin (4), quercetin (5), 3-O-methylquercetin (6), and rutin (7). Compounds were evaluated for antioxidant activity in the diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay; cytotoxicity activity against human colon (HCT116, HT29) and breast (MCF7, MDA-MB-231) tumor cell lines; and antibacterial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). The antioxidant activities of the flavonoids (3-7; IC(50) values ranging from 50 to 200 microM) were comparable to that of ascorbic acid (IC(50) = 60 microM) and superior to those of the resveratrol derivatives (1 and 2; IC(50) > 1000 microM) and butylated hydroxytoluene (BHT; IC(50) = 1500 microM), a commercial antioxidant. In the cytotoxicity and antibacterial bioassays, compounds 4 (IC(50) for HCT116 = 45 microM) and 6 (IC(50) for MRSA = 6.4 microM) were the most active, respectively. Therefore, given the wide availability and underutilization of *C. folliculata*, this forage may provide a source of bioactive compounds useful for nutraceutical purposes. Also, this is the first reported phytochemical investigation of *C. folliculata*.

### **Identificazione e bioattività degli oligomeri del resveratrolo e dei flavonoidi derivati dai semi di *Carex folliculata***

Piante del genere *Carex* (Famiglia: Cyperaceae) hanno attirato l'attenzione recente come additivi alimentari potenziale perché contengono alti livelli di polifenoli bioattivi che si trovano comunemente negli alimenti vegetali. Sette composti, che comprendeva due oligomeri resveratrolo e cinque flavonoidi, sono stati isolati dai semi di *Carex folliculata* L. (nord carice lungo), un foraggio prevalente negli Stati Uniti settentrionali. I composti sono stati identificati da (1) e H (13) dati di spettrometria di risonanza magnetica nucleare C e di massa. Il resveratrolo oligomeri sono stati pallidol (1), un dimero resveratrolo segnalato per essere presente a livelli equivalenti a quelli del resveratrolo nel vino rosso, e kobophenol A (2), un tetramero resveratrolo con uno scheletro unico 2,3,4,5-tetraaryltetrahydrofuran. I flavonoidi sono state isoorientin (3), la luteolina (4), quercetina (5), 3-O-methylquercetin (6), e rutina (7). I composti sono stati valutati per l'attività antiossidante in diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) saggio radical scavenging, l'attività citotossica nei confronti del colon umano (HCT116, HT29) e della mammella (MCF7, MDA-MB-231) le linee di cellule tumorali, e l'attività antibatterica contro *Staphylococcus aureus* resistente alla meticillina (MRSA). L'attività antiossidante dei flavonoidi (3-7; IC (50) valori compresi tra 5-20 microM) sono paragonabili a quello di acido ascorbico (IC (50) = 60 microM) e superiori a quelle dei derivati resveratrolo (1 e 2; IC (50) > 1000 microM) e butilidrossitoluolo (BHT, IC (50) = 1500 microM), un antiossidante commerciale. Nei biotest citotossicità e antibatterico, composti di 4 (IC (50) per HCT116 = 45 microM) e 6 (IC (50) per MRSA = 6.4 microM) sono stati i più attivi, rispettivamente. Pertanto, data l'ampia disponibilità e la sottoutilizzazione delle folliculata C., questo foraggio può fornire una fonte di composti bioattivi utili ai fini della nutraceutica. Inoltre, questa è la prima indagine fitochimica riferito di folliculata C. folliculata.

190: Pocobelli G, Peters U, Kristal AR, White E.

**Use of supplements of multivitamins, vitamin C, and vitamin E in relation to mortality.**

Am J Epidemiol.2009 Aug 15;170(4):472-83.

In this cohort study, the authors evaluated how supplemental use of multivitamins, vitamin C, and vitamin E over a 10-year period was related to 5-year total mortality, cancer mortality, and cardiovascular disease (CVD) mortality. Participants (n = 77,719) were Washington State residents aged 50-76 years who completed a mailed self-administered questionnaire in 2000-2002. Adjusted hazard ratios and 95% confidence intervals were computed using Cox regression. Multivitamin use was not related to total mortality. However, vitamin C and vitamin E use were associated with small decreases in risk. In cause-specific analyses, use of multivitamins and use of vitamin E were associated with decreased risks of CVD mortality. The hazard ratio comparing persons who had a 10-year average frequency of multivitamin use of 6-7 days per week with nonusers was 0.84 (95% confidence interval: 0.70, 0.99); and the hazard ratio comparing persons who had a 10-year average daily dose of vitamin E greater than 215 mg with nonusers was 0.72 (95% confidence interval: 0.59, 0.88). In contrast, vitamin C use was not associated with CVD mortality. Multivitamin and vitamin E use were not associated with cancer mortality. Some of the associations we observed were small and may have been due to unmeasured healthy behaviors that were more common in supplement users.

**Uso di supplementi multivitaminici, della vitamina C e della vitamina E in relazione alla mortalità**

In questo studio di coorte, gli autori hanno valutato in che modo supplementare uso di multivitaminici, vitamina C e vitamina E in un periodo di 10 anni era collegato a 5 anni la mortalità totale, mortalità per cancro e malattie cardiovascolari (CVD) di mortalità. I partecipanti (n = 77.719) sono stati i residenti dello Stato di Washington di età compresa tra 50-76 anni che hanno completato un inviato questionario autosomministrato nel periodo 2000-2002. Hazard ratio e intervalli di confidenza al 95% sono stati calcolati usando la regressione di Cox. Multivitaminico uso non era collegato alla mortalità totale. Tuttavia, la vitamina C e vitamina E l'uso sono state associate a piccole riduzioni del rischio. Nelle analisi di causa-specifica, l'uso di multivitaminici e l'uso di vitamina E sono stati associati con rischi di diminuzione di mortalità cardiovascolare. Il rapporto di rischio a confronto persone che avevano una frequenza media di 10 anni di uso di multivitaminici 6-7 giorni alla settimana ai non-utilizzatori era 0.84 (intervallo di confidenza 95%: 0,70, 0,99), e il rapporto di rischio a confronto le persone che avevano una di 10 anni dose media giornaliera di vitamina E superiore a 215 mg ai non-utilizzatori è stata di 0,72 (intervallo di confidenza 95%: 0,59, 0,88). Al contrario, la vitamina C, l'uso non è stato associato con la mortalità cardiovascolare. Multivitaminico e vitamina E l'uso non sono stati associati con la mortalità per cancro. Alcune delle associazioni che abbiamo osservato erano piccole e potrebbe essere stato a causa di smisurato comportamenti sani che sono stati più comuni utenti supplemento.

193: Roswall N, Olsen A, Christensen J, Dragsted LO, Overvad K, Tjønneland A.

**Micronutrient intake and risk of urothelial carcinoma in a prospective Danish cohort.**

Eur Urol. 2009 Nov;56(5):764-70.

**BACKGROUND:** A range of plausible biological mechanisms support preventive effects of micronutrients in bladder cancer. So far, however, results from the few epidemiological studies on the relation have been inconsistent, with no clear associations found.

**OBJECTIVE:** To evaluate the association between total, dietary, and supplemental intake of beta-carotene, folate, vitamins C and E, and risk of urothelial carcinoma (UC) and to explore whether the association differs with smoking status.

**DESIGN, SETTING, AND PARTICIPANTS:** The association was evaluated in the Danish Diet, Cancer and Health Study, comprising 55,557 men and women aged 50-64 yr at inclusion with no previous cancer diagnosis.

**MEASUREMENTS:** At baseline, all participants completed a detailed food frequency questionnaire including information on consumption of vitamin C, E, folate, and beta-carotene from diet and supplements. Incidence rate ratios (IRRs) of UC were calculated using Cox proportional hazards models.

**RESULTS AND LIMITATIONS:** During a median of 10.6 yr of follow-up, 322 UC cases were diagnosed. Vitamin C, E, and folate showed no association with UC, regardless of source. There was a significantly lower risk of disease with dietary beta-carotene consumption (IRR: 0.82; 95% confidence interval [CI]: 0.69-0.98) and a borderline significant lower risk with total beta-carotene intake (IRR: 0.85; 95% CI: 0.73-1.00) pr. 5000 µg of intake. We found a significant interaction between both dietary (p=0.005) and total (p=0.002) beta-carotene and smoking status, with a significant protective effect of beta-carotene seen among current smokers only.

**CONCLUSIONS:** Our results indicate no preventive effect of vitamin C, E, or folate on UC. We found a protective effect of dietary, but not supplemental, beta-carotene on UC, but further studies are required.

**Assunzione di micronutrienti e rischio di carcinoma uroteliale in uno studio prospettico di coorte in Danimarca.**

**BACKGROUND:** Una serie di meccanismi biologici plausibili supportano gli effetti di prevenzione dei micronutrienti nel cancro della vescica. Finora, tuttavia, i risultati degli studi epidemiologici pochi sul rapporto sono stati contraddittori, senza chiare associazioni trovate.

**OBIETTIVO:** Per valutare l'associazione tra assunzione totale, dietetici e supplementare di beta-carotene, acido folico, vitamine C ed E, e rischio di carcinoma uroteliali (UC) e di esplorare se l'associazione si distingue con abitudine al fumo.

**DISEGNO, REGOLAZIONE E PARTECIPANTI:** L'associazione è stata valutata in lingua danese Dieta, Cancro e Health Study, di cui 55.557 uomini e donne di età compresa tra 50-64 yr al momento dell'inclusione, senza precedente diagnosi di cancro.

**MISURE:** Al basale, tutti i partecipanti hanno completato un dettagliato questionario di frequenza alimentare comprese le informazioni sul consumo di vitamina C, E, folati, e beta-carotene dalla dieta e integratori. rapporti di incidenza (IRR) del CU sono stati calcolati utilizzando modelli di rischio proporzionale di Cox.

**RISULTATI E LIMITI:** Durante un periodo medio di 10.6 anno di follow-up, 322 casi sono stati diagnosticati UC. Vitamina C, E e folati non ha mostrato alcuna associazione con UC, indipendentemente dalla fonte. C'era un rischio significativamente inferiore di malattia con il consumo di alimentari di beta-carotene (IRR: 0.82, 95% intervallo di confidenza [CI]: 0,69-0,98) e un rischio significativamente più basso di confine con l'assunzione totale di beta-carotene (IRR: 0,85; 95% CI: 0,73-1,00) pr. 5.000 mg di assunzione. Abbiamo trovato una interazione significativa

tra i due dietetici ( $p = 0,005$ ) e ( $p = 0,002$ ) totale di beta-carotene e di abitudine al fumo, con un significativo effetto protettivo del beta-carotene visto tra i fumatori correnti solo. **CONCLUSIONI:** I nostri risultati indicano alcun effetto preventivo della vitamina C, E, folati o su UC. Abbiamo trovato un effetto protettivo della dieta, ma non lo corredano, beta-carotene in UC, ma ulteriori studi sono necessari.

194: Nagel G, Linseisen J, van Gils CH, Peeters PH, Boutron-Ruault MC, Clavel-Chapelon F, Romieu I, Tjønneland A, Olsen A, Roswall N, Witt PM, Overvad K, Rohrmann S, Kaaks R, Drogan D, Boeing H, Trichopoulou A, Stratigakou V, Zylis D, Engeset D, Lund E, Skeie G, Berrino F, Grioni S, Mattiello A, Masala G, Tumino R, Zanetti R, Ros MM, Bueno-de-Mesquita HB, Ardanaz E, Sánchez MJ, Huerta JM, Amiano P, Rodríguez L, Manjer J, Wirfält E, Lenner P, Hallmans G, Spencer EA, Key TJ, Bingham S, Khaw KT, Rinaldi S, Slimani N, Boffetta P, Gallo V, Norat T, Riboli E.

### **Dietary beta-carotene, vitamin C and E intake and breast cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC).**

BreastCancer Res Treat. 2010 Feb;119(3):753-65.

So far, studies on dietary antioxidant intake, including beta-carotene, vitamin C and vitamin E, and breast cancer risk are inconclusive. Thus, we addressed this question in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. During a median follow-up time of 8.8 years, 7,502 primary invasive breast cancer cases were identified. Cox proportional hazard models were used to estimate hazard ratios (HR) and 95% confidence intervals (CI). All analyses were run stratified by menopausal status at recruitment and, additionally, by smoking status, alcohol intake, use of exogenous hormones and use of dietary supplements. In the multivariate analyses, dietary intake of beta-carotene, vitamin C and E was not associated with breast cancer risk in premenopausal [highest vs. lowest quintile: HR, 1.04 (95% CI, 0.85-1.27), 1.12 (0.92-1.36) and 1.11 (0.84-1.46), respectively] and postmenopausal women [0.93 (0.82-1.04), 0.98 (0.87-1.11) and 0.92 (0.77-1.11), respectively]. However, in postmenopausal women using exogenous hormones, high intake of beta-carotene [highest vs. lowest quintile; HR 0.79 (95% CI, 0.66-0.96), P (trend) 0.06] and vitamin C [0.88 (0.72-1.07), P (trend) 0.05] was associated with reduced breast cancer risk. In addition, dietary beta-carotene was associated with a decreased risk in postmenopausal women with high alcohol intake. Overall, dietary intake of beta-carotene, vitamin C and E was not related to breast cancer risk in neither pre- nor postmenopausal women. However, in subgroups of postmenopausal women, a weak protective effect between beta-carotene and vitamin E from food and breast cancer risk cannot be excluded.

### **Assunzione di beta-carotene, vitamina C e vitamina E e rischio di cancro al seno nello studio prospettico europeo sul cancro e nutrizione (EPIC).**

Finora, gli studi sulla apporto di antiossidanti nella dieta, tra cui beta-carotene, vitamina C e vitamina E, e rischio di cancro al seno sono inconcludenti. Così, abbiamo affrontato la questione nel Studio prospettico europeo sul cancro e nutrizione. Durante un periodo medio di follow-up di 8,8 anni, 7.502 casi di carcinoma primario invasivo della mammella sono stati identificati. modelli di rischio proporzionale di Cox sono stati utilizzati per stimare gli hazard ratio (HR) e il 95% intervalli di confidenza (CI). Tutte le analisi sono state eseguite stratificati in base allo stato menopausale al momento dell'assunzione e, ulteriormente, abitudine al fumo, assunzione di alcol, uso di ormoni esogeni e l'uso di integratori alimentari. Nelle analisi multivariata, l'assunzione nella dieta di beta-carotene, vitamina C ed E non è stato associato con il rischio di cancro al seno in [premenopausa più alto rispetto al quintile più basso: HR 1,04 (95% CI, 0,85-1,27), 1,12 (0,92-1,36 ) e 1,11 (0,84-

1,46), rispettivamente] e le donne in post-menopausa [0,93 (0,82-1,04), 0,98 (0,87-1,11) e 0,92 (0,77-1,11), rispettivamente]. Tuttavia, nelle donne in post-menopausa con ormoni esogeni, l'assunzione di beta-carotene [più alto quintile più basso rispetto; HR 0,79 (95% CI, 0,66-0,96), P (trend) 0,06] e vitamina C [0,88 (0,72-1,07) , P (trend) 0,05], è stato associato a ridotto rischio cancro al seno. Inoltre, la dieta di beta-carotene era associato ad un ridotto rischio nelle donne in postmenopausa con elevata assunzione di alcol. In generale, l'assunzione nella dieta di beta-carotene, vitamina C ed E non era correlata al rischio di cancro della mammella in pre-né, né donne in postmenopausa. Tuttavia, in sottogruppi di donne in postmenopausa, un debole effetto protettivo tra beta-carotene e la vitamina E da alimenti e rischio di cancro al seno non può essere escluso.

196: Hu J, La Vecchia C, Negri E, DesMeules M, Mery L Epidemiology Research Group. Canadian Cancer Registries

**Dietary vitamin C, E, and carotenoid intake and risk of renal cell carcinoma.**

Cancer Causes Control. 2009 Oct;20(8):1451-8.

**OBJECT:** The study examines the association between dietary intake of vitamin C, E, and carotenoids and the risk of renal cell carcinoma (RCC).

**METHODS:** Between 1994 and 1997 in 8 Canadian provinces, mailed questionnaires were completed by 1,138 incident, histologically confirmed cases of RCC and 5,039 population controls, including information on socio-economic status, lifestyle habits and diet. A 69-item food frequency questionnaire provided data on eating habits 2 years before data collection. Odds ratios (OR) and 95% confidence intervals (CI) were computed using unconditional logistic regression.

**RESULTS:** Dietary intake of beta-carotene and lutein/zeaxanthin was inversely associated with the risk of RCC. The ORs for the highest versus the lowest quartile were 0.74 (95% CI, 0.59-0.92) and 0.77 (95% CI, 0.62-0.95), respectively. The significant inverse association with beta-carotene and lutein/zeaxanthin was more pronounced in women, and in overweight or obese subjects. The relation of lutein/zeaxanthin to RCC was stronger in ever smokers. No clear association was observed with vitamin C and E, beta-cryptoxanthin, and lycopene.

**CONCLUSION:** The findings provide evidence that a diet rich in beta-carotene and lutein/zeaxanthin may play a role in RCC prevention.

**Assunzione di vitamina C, E e carotenoidi e rischio di carcinoma renale**

**OGGETTO:** Lo studio esamina l'associazione tra assunzione con la dieta di vitamina C, E e carotenoidi ed il rischio di carcinoma a cellule renali (RCC).

**METODI:** Tra il 1994 e il 1997 in 8 province canadesi, i questionari inviati sono stati completati da 1.138 incidenti, istologicamente confermati casi di RCC e 5.039 controlli di popolazione, comprese le informazioni sullo stato socio-economico, le abitudini di vita e dieta. A 69-item questionario di frequenza alimentare hanno fornito dati su abitudini alimentari 2 anni prima raccolta dei dati. Gli odds ratio (OR) e intervalli di confidenza al 95% (CI) sono stati calcolati usando regressione logistica.

**RISULTATI:** assunzione nella dieta di beta-carotene e luteina / zeaxantina era inversamente associato al rischio di RCC. Gli OR per il più alto rispetto al quartile più basso sono stati 0,74 (95% CI, 0,59-0,92) e 0,77 (95% CI, 0,62-0,95), rispettivamente. La significativa associazione inversa con il beta-carotene e luteina / zeaxantina è stato più pronunciato nelle donne e nei soggetti in sovrappeso o obesi. Il rapporto di luteina / zeaxantina di RCC era più forte nei fumatori mai. Nessuna chiara associazione è stata osservata con vitamina C ed E, beta-cryptoxanthin, e licopene.

**CONCLUSIONE:** I risultati forniscono la prova che una dieta ricca di beta-carotene e luteina / zeaxantina può giocare un ruolo nella prevenzione RCC.

197: Sengottuvelan M, Deeptha K, Nalini N.

### **Resveratrol ameliorates DNA damage, prooxidant and antioxidant imbalance in 1,2-dimethylhydrazine induced rat colon carcinogenesis.**

Chem Biol Interact. 2009 Oct 7;181(2):193-201.

Colorectal cancer is one of the most common internal malignancies in Western society. Currently oxidative stress has been increasingly postulated as a major contributor to carcinogenesis. The assessment of damage in various biological matrices, such as tissues and cells, is vital to understand the development of carcinogenesis and subsequently devising intervention strategies. Thus, the major objective of the present study was to examine the effect of resveratrol (Res) on DNA damage in a short-term study of 16 days and circulatory lipid peroxidation, enzymic/non-enzymic antioxidants status in a long-term study of 30 weeks in 1,2-dimethylhydrazine (DMH) induced colon carcinogenesis. Wistar male rats were divided into 6 groups, group 1 were control rats, group 2 rats received Res (8mg/kg body weight, orally, everyday), rats in groups 3-6 were administered (DMH, 20mg/kg body weight, s.c.) as four injections in order to induce DNA damage in the short-term or once a week for the first 15 weeks in the long-term study. In addition to DMH, group 4 (initiation), 5 (post-initiation) and 6 (entire-period) received Res (8mg/kg body weight, p.o., everyday). The results revealed that, supplementation with Res (entire-period) treatment regimen significantly reduced the DMH-induced leukocytic DNA damage (tail length, tail moment, % DNA in the comet tail and olive tail moment) as compared to DMH-alone treated rats. In addition, entire-period Res supplementation increased the enzymic (superoxide dismutase, catalase, glutathione reductase, glutathione peroxidase and glutathione S-transferase) and non-enzymic (reduced glutathione, vitamin C, vitamin E and beta-carotene) antioxidant status with a corresponding decrease in the extent of lipid peroxidation markers (thiobarbituric acid reactive substances, diene conjugates and lipid hydroperoxides). Conversely, Res supplementation during initiation and post-initiation regimen did not produce greater modulatory effects. Our results indicate that DMH-induced DNA damage and oxidative stress were suppressed/prevented effectively by chronic Res supplementation.

### **Il resveratrolo migliora il danno al DNA, l'equilibrio tra proossidanti e antiossidanti nei ratti con carcinogenesi del colon indotta dalla 1,2-dimetilidrazina**

Il cancro coloretale è una delle neoplasie più comuni interni nella società occidentale. Attualmente lo stress ossidativo è stato sempre più postulata come un contributo essenziale alla carcinogenesi. La valutazione dei danni in varie matrici biologiche, quali tessuti e cellule, è fondamentale per comprendere lo sviluppo della carcinogenesi e, successivamente, elaborare strategie di intervento. Pertanto, l'obiettivo principale del presente studio era di esaminare l'effetto del resveratrolo (FER), danno al DNA in uno studio a breve termine di 16 giorni e la perossidazione lipidica circolatorio, enzimatica / status non-enzimatica antiossidanti in uno studio a lungo termine di 30 settimane in 1,2-dimetilidrazina (DMH) ha indotto carcinogenesi del colon. ratti Wistar maschi sono stati divisi in 6 gruppi, gruppo 1 erano ratti di controllo, gruppo 2 ratti hanno ricevuto Res (8mg/kg peso corporeo, per via orale, tutti i giorni), in gruppi di topi sono stati somministrati 3-6 (DMH, 20 mg / kg di peso corporeo, sc ), come quattro iniezioni al fine di indurre danni al DNA nel breve termine, o una volta alla settimana per le prime 15 settimane dello studio a lungo termine. Oltre a DMH, gruppo 4 (apertura), 5 (post-apertura) e 6 (intero periodo) Res ricevuto (8mg/kg peso corporeo, po, tutti i giorni). I risultati hanno rivelato che la supplementazione con Res (intero periodo) regime di trattamento ha ridotto significativamente il danno del DNA indotto DMH leucocitaria (lunghezza

della coda, il momento della coda, il DNA% nella coda di cometa e il momento della coda d'oliva) rispetto a DMH-alone ratti trattati . Inoltre, l'intero periodo di supplementazione Res aumentato il enzimatica (superossido dismutasi, la catalasi, glutatione reduttasi, glutatione perossidasi e glutatione S-transferasi) e non-enzimatica (glutazione ridotto, vitamina C, vitamina E e beta-carotene), di antiossidanti con una corrispondente diminuzione nella misura di marcatori perossidazione dei lipidi (sostanze reattive all'acido tiobarbiturico, diene coniugati e idroperossidi lipidici). Per contro, la supplementazione di Res durante l'inizio e il regime post-iniziale non ha prodotto maggiori effetti modulatori. I nostri risultati indicano che DMH-indotto danni al DNA e lo stress ossidativo sono stati soppressi / impedita efficacemente cronica supplementazione Ris.

## **Role of the vitamin C in diethylnitrosamine-induced esophageal cancer in Wistar rats.**

Acta Cir Bras. 2009 May-Jun;24(3):183-8.

**PURPOSE:** To evaluate the inhibitory effect of vitamin C on the experimental esophageal carcinogenesis induced by diethylnitrosamine (NDEA).

**METHODS:** Sixty Wistar male rats aged three months, with mean weight of 210 g were employed in the study and were divided into four different groups according to the drinking drugs: group I--controls: only water, seven days a week; group II--only vitamin C, seven days a week; group III--NDEA, three days a week and water during the other four days; group IV--NDEA, three days a week and vitamin C during the other four days; group V--NDEA together with vitamin C three days a week, and only water during the other four days and group VI--NDEA together with vitamin C three days a week and vitamin C during the other four days. The dosages of NDEA were: --10 mg./Kg/day and vitamin C--200 mg/animal/day, dissolved in drinking water. The animals were observed during 180 days and after that each one was sacrificed and its esophagus and the stomach were removed together and macro and microscopically analyzed to identify any tumors.

**RESULTS:** The largest number of tumors was observed in the group III: 48 macroscopic lesions (4.8 lesions per animal) and 23 microscopic lesions (2.3 lesions per animal). The groups that received vitamin C (groups IV, V and VI) showed smaller number of tumors: group V--0.5 macroscopic lesions and 0.3 microscopic lesions per animal and group VI--0.1 macroscopic lesions and 0.1 microscopic lesions per animal. The incidence of tumors in the groups V and VI showed statistical significance ( $p < 0.05$ ), when compared to the other groups.

**CONCLUSION:** The vitamin C administered together with diethylnitrosamine showed an inhibitory effect on the experimental esophageal carcinogenesis in Wistar rats.

## **Ruolo della vitamina C nei ratti Wistar con cancro esofageo indotto dalla dietilnitrosamina**

**SCOPO:** Per valutare l'effetto inibitorio della vitamina C sulla cancerogenesi sperimentale esofageo indotta da diethylnitrosamine (NDEA).

**METODI:** Sixty ratti Wistar di sesso maschile di età compresa tra tre mesi, con peso medio di 210 g sono stati impiegati nello studio e sono stati suddivisi in quattro gruppi diversi a seconda della droga potabile: gruppo I - controlli: solo acqua, sette giorni alla settimana; gruppo II - solo la vitamina C, sette giorni alla settimana; gruppo III - NDEA, tre giorni alla settimana e l'acqua durante gli altri quattro giorni; gruppo IV - NDEA, tre giorni alla settimana e di vitamina C durante gli altri quattro giorni; gruppo V - NDEA insieme alla vitamina C tre giorni a settimana, e l'acqua solo durante gli altri quattro giorni e si raggruppano VI - NDEA insieme alla vitamina C tre giorni alla settimana e di vitamina C durante gli altri quattro giorni. I dosaggi di NDEA sono stati: - 10 mg. / kg / die e vitamina C - 200 mg / animale / giorno, disciolti in acqua potabile. Gli animali sono stati osservati durante 180 giorni e dopo che ognuno è stato sacrificato e il suo esofago e lo stomaco sono stati rimossi insieme, macro e microscopicamente analizzati per individuare eventuali tumori.

**RISULTATI:** Il maggior numero di tumori è stata osservata nel gruppo III: 48 lesioni macroscopiche (4,8 lesioni per animale) e 23 lesioni microscopiche (2.3 lesioni per animale). I gruppi che hanno ricevuto vitamina C (gruppi IV, V e VI) ha mostrato minore numero di tumori: gruppo V - 0,5 e 0,3 lesioni macroscopiche lesioni microscopiche per animale e di gruppo VI - 0,1 e 0,1 lesioni macroscopiche lesioni microscopiche per animale. L'incidenza dei tumori nel V e VI gruppi hanno mostrato significatività statistica ( $p < 0,05$ ), rispetto agli altri gruppi.

**CONCLUSIONE:** La vitamina C somministrata insieme a diethylnitrosamine hanno mostrato un effetto inibitorio sulla cancerogenesi sperimentale esofageo in ratti Wistar.

208: Bidoli E, Talamini R, Zucchetto A, Bosetti C, Negri E, Lenardon O, Maso LD, Polesel J, Montella M, Franceschi S, Serraino D, La Vecchia C.

### **Dietary vitamins E and C and prostate cancer risk.**

Acta Oncol. 2009;48(6):890-4.

**BACKGROUND:** The epidemiologic evidence on dietary vitamins E and C and prostate cancer is controversial. Therefore, a case-control study was carried out to investigate the role of dietary intake of vitamins E and C in the etiology of prostate cancer.

**MATERIAL AND METHODS:** Cases were 1 294 men with incident, histologically confirmed prostate cancer, admitted to the major teaching and general hospitals of five Italian areas between 1991 and 2002. Controls were 1 451 men admitted for acute, non-neoplastic conditions to the same hospitals. Information on dietary habits and nutrient intake was elicited using a validated food frequency questionnaire including 78 food groups and recipes. Odds ratios (OR) and 95% confidence intervals (CI) for increasing levels of vitamin intake were estimated after allowance for total energy intake and other confounding factors.

**RESULTS:** Vitamin E showed a significant inverse association with prostate cancer (OR = 0.78 for the highest versus the lowest tertile of intake, 95% CI: 0.58-0.96; p-value for trend = 0.02), whereas for vitamin C the inverse association was of borderline statistical significance (OR = 0.86; 95% CI: 0.65-1.08). Results were consistent in strata of age, body mass index, and family history of prostate cancer.

**DISCUSSION:** The present study shows an inverse association between dietary intake of vitamins E and prostate cancer incidence. This finding is likely to reflect the influence of diet itself since supplementation or food fortification with vitamins is rare in the Italian population.

### **Le vitamine E e C e rischio di cancro alla prostata**

**BACKGROUND:** L'evidenza epidemiologica sulla dieta vitamine E e C e il cancro alla prostata è controversa. Pertanto, uno studio caso-controllo è stato effettuato per studiare il ruolo di assunzione delle vitamine E e C nella eziologia del cancro alla prostata.

**MATERIALI E METODI:** I casi sono stati 1 294 uomini con incidenti, istologicamente confermato il cancro alla prostata, ha ammesso l'insegnamento principale e negli ospedali generali delle cinque aree italiane tra il 1991 e il 2002. I controlli sono stati ammessi 1 451 uomini per acuti, le condizioni non neoplastiche agli ospedali stessi. Informazioni sulle abitudini alimentari e l'assunzione di nutrienti è stato provocato con una convalidato questionario di frequenza alimentare di cui 78 gruppi di prodotti alimentari e ricette. Gli odds ratio (OR) e intervalli di confidenza al 95% (CI) per aumentare i livelli di assunzione di vitamina sono stati stimati dopo la detrazione per l'assunzione totale di energia e di altri fattori di confondimento.

**RISULTATI:** La vitamina E ha mostrato una significativa associazione inversa con il cancro alla prostata (OR = 0,78 per il più alto rispetto al terzile più basso di assunzione, 95% CI: 0,58-0,96; valore di p per trend = 0.02), mentre per la vitamina C, l'associazione inversa era al limite della significatività statistica (OR = 0,86, IC 95%: 0,65-1,08). I risultati sono stati coerenti in strati di età, indice di massa corporea, e la storia familiare di cancro alla prostata.

**DISCUSSIONE:** Il presente studio mostra un'associazione inversa tra assunzione con la dieta di vitamine e l'incidenza di cancro alla prostata. Questo risultato è probabilmente riflettono l'influenza della dieta sé, in quanto integrazione o la fortificazione degli alimenti con vitamine è rara nella popolazione italiana.

209: Sharma A, Tripathi M, Satyam A, Kumar L.

**Study of antioxidant levels in patients with multiple myeloma.**

Leuk Lymphoma. 2009 May;50(5):809-15. PubMedPMID: 19452319.

Multiple myeloma (MM), neoplastic disorder, is a B-cell malignancy characterised by the accumulation of clonal population of plasma cells. Reactive oxygen species and other free radicals mediate phenotypic and genotypic changes leading from mutation to neoplasia in all cancers including MM. In the present study, 50 clinically diagnosed patients with MM at stage II of international staging system and 50 healthy controls were included. beta(2) microglobulin levels were estimated by ELISA. The circulating levels of enzymatic antioxidants; superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPX) were spectrophotometrically estimated using RANDOX kits whereas catalase, malondialdehyde (MDA), vitamin C and E were estimated by standardised protocols using spectrophotometer/fluorometer. The serum beta(2) microglobulin levels were significantly higher (>3 microg/mL) in patients with MM than healthy controls. The estimated levels of SOD, GPX and catalase (enzymatic antioxidants) and vitamin C and E (non-enzymatic antioxidants) were significantly declined in patients whereas MDA levels were elevated as compared with controls. These results suggest that MM is closely associated with oxidative stress and reduced antioxidant capacity and further investigation might provide an insight to understand a putative causal link between oxidative stress and MM disease progression.

**Studio sui livelli degli antiossidanti nei pazienti con mieloma multiplo**

Il mieloma multiplo (MM), il disturbo neoplastico, è un tumore maligno delle cellule B caratterizzata dall'accumulo di popolazione clonale di plasmacellule. Specie reattive dell'ossigeno e di altri radicali liberi, mediano i cambiamenti fenotipici e genotipici che da mutazione per neoplasia in tutti i tumori tra cui MM. Nel presente studio, 50 pazienti con diagnosi clinica di MM in stadio II, del sistema di stadiazione internazionali e 50 controlli sani sono stati inclusi. beta (2) i livelli di microglobulina sono stati stimati mediante ELISA. I livelli circolanti di antiossidanti enzimatiche, la superossido dismutasi (SOD), glutatione perossidasi (GPx) sono stati stimati utilizzando i kit spettrofotometricamente Randox mentre catalasi, malondialdeide (MDA), vitamina C ed E sono stati stimati mediante protocolli standardizzati usando spettrofotometro / fluorimetro. La versione beta del siero (2) i livelli di microglobulina erano significativamente più alti (> 3 microg / mL) nei pazienti con MM rispetto ai controlli sani. I livelli stimati di SOD, GPX e catalasi (antiossidanti enzimatiche) e di vitamina C ed E (antiossidanti non enzimatici) sono risultati significativamente diminuiti nei pazienti mentre i livelli di MDA sono stati elevati rispetto ai controlli. Questi risultati suggeriscono che MM è strettamente associata allo stress ossidativo e una riduzione della capacità antiossidante e un'ulteriore indagine potrebbe fornire una panoramica per capire un nesso di causalità tra presunto stress ossidativo e la progressione della malattia MM.

217: Ohno S, Ohno Y, Suzuki N, Soma G, Inoue M.

**High-dose vitamin C (ascorbic acid) therapy in the treatment of patients with advanced cancer.**

Anticancer Res. 2009 Mar;29(3):809-15. Review. PubMed PMID: 19414313.

Vitamin C (ascorbic acid, ascorbate) has a controversial history in cancer treatment. Emerging evidence indicates that ascorbate in cancer treatment deserves re-examination. As research results concerning ascorbate pharmacokinetics and its mechanisms of action against tumor cells have been published, and as evidence from case studies has continued to mount that ascorbate therapy could be effective if the right protocols were used, interest among physicians and scientists has increased. In this review, high-dose vitamin C therapy in cancer treatment is re-evaluated.

**Terapia con vitamina C (acido ascorbico) ad alte dosi nel trattamento di pazienti con tumore in stadio avanzato**

Vitamina C (acido ascorbico, acido ascorbico) ha una storia controversa nel trattamento del cancro. Evidenze crescenti indicano che l'ascorbato nel trattamento del cancro merita di riesame. Come i risultati della ricerca in materia farmacocinetica ascorbato e dei suoi meccanismi di azione contro le cellule tumorali sono state pubblicate, e come prova da studi di casi ha continuato a montare che la terapia ascorbato potrebbe essere efficace se i protocolli sono stati utilizzati a destra, l'interesse tra i medici e gli scienziati è aumentato. In questa recensione, alte dosi di vitamina C terapia nel trattamento del cancro è rivalutato.

220: Chandrasekharan DK, Kagiya TV, Nair CK.

**Radiation protection by 6-palmitoyl ascorbic acid-2-glucoside: studies on DNA damage in vitro, ex vivo, in vivo and oxidative stress in vivo.**

J Radiat Res (Tokyo). 2009 May;50(3):203-12. Epub 2009 Apr 22. PubMed PMID: 19384055.

A palmitoyl derivative of ascorbic acid 2-glucoside, 6-palmitoyl ascorbic acid-2-glucoside (PAsAG), which possess good antioxidant properties, is examined for radioprotection in vitro, ex vivo and in vivo models. PAsAG protected plasmid DNA from gamma-radiation induced damages under in vitro conditions. Presence of 1.6 mM PAsAG inhibited the disappearance of ccc (covalently closed circular) form of plasmid pBR322 with a dose modifying factor of 1.5. Comet assay studies on mouse spleen cells exposed to 6 Gy gamma-radiation (ex vivo) in presence and absence of PAsAG revealed that cellular DNA was effectively protected by this compound from radiation induced damages. Oral administration of 80 mg/kg body weight of PAsAG to mice 1 hour prior to 6 Gy whole body gamma-radiation exposure, efficiently protected cellular DNA in tissues such as spleen, bone marrow and blood, from radiation induced damages as indicated by alkaline comet assay. Oxidative stress in tissues such as liver and brain of mice, following whole body exposure to various doses of gamma-radiation (2-8 Gy), monitored as levels of GSH and peroxidation of lipids, were found considerably reduced when PAsAG was orally administered (80 mg/kg body weight) to the mice one hour prior to the radiation exposure. PAsAG administration improved the per cent survival of mice following exposure to 10 Gy whole body gamma-radiation. Thus PAsAG could act as a radioprotector under in vitro, ex vivo and in vivo conditions of ionizing-radiation exposure.

**Protezione dalle radiazioni tramite il 6-palmitolo acido ascorbico-2-glucoside: studi sui danni al DNA in vitro, ex vivo, in vivo e stress ossidativo in vivo.**

Un derivato palmitoil di acido ascorbico 2-glucoside, 6-palmitoil acido ascorbico-2-glucoside (PAsAG), che possiedono proprietà antiossidanti bene, viene esaminato per la radioprotezione in vitro, ex vivo e in vivo modelli. PAsAG protetto DNA plasmidico dai danni indotti dalle radiazioni gamma-in vitro. Presenza di 1,6 mm PAsAG inibito la scomparsa di ccc (circolare covalentemente chiuso) sotto forma di plasmide pBR322 con una dose di modificare il fattore di 1,5. studi Comet assay sul milza mouse esposti a 6 Gy di radiazioni gamma (ex vivo) in presenza e in assenza di PAsAG ha rivelato che il DNA cellulare è stato efficacemente protette da questo composto dai danni indotti dalle radiazioni. La somministrazione orale di 80 mg / kg di peso corporeo di PAsAG a topi 1 ora prima a 6 dell'esposizione del corpo intero Gy di radiazioni gamma, efficacemente protetti DNA cellulare in tessuti come la milza, il midollo osseo e del sangue, da danni indotti dalle radiazioni, come indicato dalla cometa alcaline test. Lo stress ossidativo nei tessuti come il fegato e il cervello di topi, in seguito all'esposizione del corpo intero a varie dosi di radiazioni gamma (2-8 Gy), monitorati i livelli di GSH e la perossidazione dei lipidi, sono risultati sensibilmente ridotti se PAsAG è stato somministrato per via orale ( 80 mg / kg di peso corporeo) per i topi un'ora prima dell'esposizione alle radiazioni. amministrazione PAsAG migliorato la sopravvivenza per cento dei topi dopo esposizione a 10 Gy intera gamma corpo-radiazioni. Così PAsAG potrebbe svolgere un radioprotector sotto in vitro, ex vivo e in condizioni di esposizione in vivo contro le radiazioni ionizzanti.

227: Chen AA, Marsit CJ, Christensen BC, Houseman EA, McClean MD, Smith JF, Bryan JT, Posner MR, Nelson HH, Kelsey KT.

**Genetic variation in the vitamin C transporter, SLC23A2, modifies the risk of HPV16-associated head and neck cancer.**

Carcinogenesis. 2009 Jun;30(6):977-81.

Human papillomavirus (HPV) type 16 infection is an etiologic factor in a subset of head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC). It is unknown if host genetic susceptibility modifies the HPV16-HNSCC association. DNA samples collected as part of a Boston area case-control study of HNSCC were genotyped for single-nucleotide polymorphisms (SNPs) from the National Cancer Institute's SNP500Cancer database. Analysis of demographic, phenotypic and genotypic data for 319 HNSCC cases and 495 frequency-matched controls was performed using unconditional logistic regression. All reported P-values are two sided. We identified a polymorphism in the sodium-dependent vitamin C transporter SLC23A2 that modifies the risk of HNSCC associated with HPV16 infection. Among those with a wild-type allele at SLC23A2, the risk of HNSCC associated with HPV16-positive serology was 5.0 (95% confidence interval (CI) = 3.2-7.8). However, among those with a homozygous variant genotype, the risk of HNSCC associated with HPV16 was attenuated [odds ratio (OR) = 2.8; 95% CI = 1.2-6.2]. Further, when we tested whether genotype modified the interaction between citrus exposure, HPV16, and HNSCC, we found a dramatically increased risk of HNSCC for those with a wild-type SLC23A2 allele, HPV16-positive serology and high citrus intake (OR = 7.4; 95% CI = 3.6-15.1). These results suggest that SLC23A2 genetic variation alters HPV16-associated HNSCC while also highlighting the important role of citrus exposure in this disease.

**Variatione genetica nei trasportatori della vitamina C, SLC23A2, modifica il rischio di cancro alla testa e al collo correlate a HPV16**

Papillomavirus umano (HPV) di tipo 16 infezione è un fattore eziologico in un sottoinsieme di testa e di carcinomi a cellule squamose del collo (HNSCC). Non è noto se la suscettibilità genetica host modifica l'associazione HPV16-HNSCC. Campioni di DNA raccolti come parte di un'area di studio di Boston caso-controllo di HNSCC sono stati sottoposti a genotipizzazione di polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) dal database SNP500Cancer il National Cancer Institute. L'analisi dei dati demografici, fenotipica e genotipica per HNSCC 319 casi e 495 controlli appaiati in frequenza è stata effettuata utilizzando regressione logistica. Tutti i valori riportati P-sono due lati. Abbiamo identificato un polimorfismo del sodio-dipendente SLC23A2 trasportatore di vitamina C che modifica il rischio di HNSCC associati con HPV16 infezione. Tra quelli con un allele wild-type in SLC23A2, il rischio di HNSCC associati con sierologia HPV16-positive è stato 5,0 (intervallo di confidenza al 95% (CI) = 3,2-7,8). Tuttavia, tra coloro che hanno un genotipo omozigote variante, il rischio di HNSCC associati con HPV16 è stata attenuata [odds ratio (OR) = 2.8, IC 95% = 1,2-6,2]. Inoltre, quando abbiamo provato se genotipo modificato l'interazione tra l'esposizione di agrumi, HPV16 e HNSCC, abbiamo trovato un rischio notevolmente aumentato di HNSCC per quelli con un allele wild-type SLC23A2, sierologia HPV16-positive e un'elevata assunzione di agrumi (OR = 7.4; 95% CI = 3,6-15,1). Questi risultati suggeriscono che la variazione genetica SLC23A2 altera HPV16-associati HNSCC pur sottolineando il ruolo importante di esposizione di agrumi in questa malattia.

231: Miranda CL, Reed RL, Kuiper HC, Alber S, Stevens JF.

### **Ascorbic acid promotes detoxification and elimination of 4-hydroxy-2(E)-nonenal in human monocytic THP-1 cells.**

Chem Res Toxicol. 2009 May;22(5):863-74.

4-Hydroxy-2(E)-nonenal (HNE), a reactive aldehyde derived from oxidized lipids, has been implicated in the pathogenesis of cardiovascular and neurological diseases, in part by its ability to induce oxidative stress and by protein carbonylation in target cells. The effects of intracellular ascorbic acid (vitamin C) on HNE-induced cytotoxicity and protein carbonylation were investigated in human THP-1 monocytic leukemia cells. HNE treatment of these cells resulted in apoptosis, necrosis, and protein carbonylation. Ascorbic acid accumulated in the cells at concentrations of 6.4 or 8.9 mM after treatment with 0.1 or 1 mM ascorbate in the medium for 18 h. Pretreatment of cells with 1.0 mM ascorbate decreased HNE-induced formation of reactive oxygen species and formation of protein carbonyls. The protective effects of ascorbate were associated with an increase in the formation of GSH-HNE conjugate and its phase 1 metabolites, measured by LC-MS/MS, and with increased transport of GSH conjugates from the cells into the medium. Ascorbate pretreatment enhanced the efflux of the multidrug resistant protein (MRP) substrate, carboxy-2',7'-dichlorofluorescein (CDF), and it prevented the HNE-induced inhibition of CDF export from THP-1 cells, suggesting that the protective effect of ascorbate against HNE cytotoxicity is through modulation of MRP-mediated transport of GSH-HNE conjugate metabolites. The formation of ascorbate adducts of HNE was observed in the cell exposure experiments, but it represented a minor pathway contributing to the elimination of HNE and to the protective effects of ascorbate.

### **L'acido ascorbico promuove la detossificazione e l'eliminazione di 4-idrossi-2(E)-nonenal nelle cellule monocitiche umane THP-1**

4-idrossi-2 (E)-nonenale (HNE), un aldeide reattivo derivato da lipidi ossidati, è stato implicato nella patogenesi delle malattie cardiovascolari e neurologiche, in parte dalla sua capacità di indurre stress ossidativo e di carbonilazione proteica nelle cellule bersaglio. Gli effetti della intracellulare di acido ascorbico (vitamina C) su HNE citotossicità indotta e carbonilazione di proteine sono state studiate in umana THP-1 cellule di leucemia monocitica. HNE trattamento di queste cellule causato l'apoptosi, necrosi, e carbonilazione di proteine. Acido ascorbico accumulati nelle cellule a concentrazioni di 6,4 o 8,9 mM dopo il trattamento con 0,1 o 1 mM ascorbato nel medio per 18 h. Il pretrattamento delle cellule con 1,0 mM ascorbato ridotto HNE-indotta formazione di specie reattive dell'ossigeno e la formazione di carbonili proteici. Gli effetti protettivi di ascorbato sono state associate con un aumento della formazione di coniugato GSH-HNE e dei suoi metaboliti di fase 1, misurata con LC-MS/MS, e con trasporti sono aumentate di coniugati GSH dalle cellule nel mezzo. ascorbato di pretrattamento potenziato l'efflusso della proteina multiresistenti (MRP) substrato, carbossi-2', 7'-diclorofluoresceina (CDF), ed è impedito l'HNE inibizione della esportazione CDF da cellule THP-1, suggerendo che l'effetto protettivo di ascorbato contro la citotossicità HNE è attraverso la modulazione del trasporto MRP-mediata di metaboliti coniugato GSH-HNE. La formazione di addotti ascorbato di HNE è stato osservato negli esperimenti di esposizione della cellula, ma rappresentava una via metabolica minore contribuire alla eliminazione di HNE e per gli effetti protettivi di ascorbato.

241: Giommarelli C, Corti A, Supino R, Favini E, Paolicchi A, Pompella A, Zunino F.

**Gamma-glutamyltransferase-dependent resistance to arsenic trioxide in melanoma cells and cellular sensitization by ascorbic acid.**

Free Radic Biol Med. 2009 Jun 1;46(11):1516-26. Epub 2009 Mar 17. PubMed PMID: 19298852.

The cell ability of tumor cells to tolerate stress conditions is a typical feature of solid tumors. In particular, the resistance to oxidative stress of melanoma cells likely contributes to their intrinsic drug resistance. In an attempt to develop novel strategies for overcoming the mechanisms of cellular protection against oxidative stress, in this study we have explored the efficacy of the combination of two prooxidant agents in two human melanoma cell clones. The selected clones are characterized by a marked difference in expression of gamma-glutamyltransferase, which is known to produce a persistent low level of oxidative stress resulting in the stimulation of protective systems. The gamma-glutamyltransferase-overexpressing clone exhibited a low susceptibility to arsenic trioxide-induced apoptosis, associated with low reactive oxygen species induction and increased catalase activity. The combination of arsenic trioxide with subtoxic concentrations of ascorbic acid resulted in a sensitization to apoptotic cell death. The expression of protective mechanisms, in particular catalase activity, accounted for the behavior of the resistant clone. The sensitization achieved by the combination was associated with a cellular response involving the ASK1/p38 axis, which is implicated in the regulation of catalase expression and the activation of apoptotic signals. In conclusion, the results of our study provide evidence that a rational combination of prooxidant agents may be effective in overcoming cellular tolerance to oxidative stress.

**Resistenza all'arsenico triossido dipendente dalla gamma-glutamyltransferasi nelle cellule di melanoma e sensibilità delle cellule all'acido ascorbico**

La capacità delle cellule tumorali di tollerare condizioni di stress è una caratteristica tipica dei tumori solidi. In particolare, la resistenza allo stress ossidativo delle cellule di melanoma contribuisce probabilmente alla loro resistenza intrinseca. Nel tentativo di sviluppare nuove strategie per superare i meccanismi di protezione cellulare contro lo stress ossidativo, in questo studio abbiamo esplorato l'efficacia della combinazione di due agenti proossidanti in due cloni di cellule umane di melanoma. I cloni selezionati sono caratterizzati da una netta differenza di espressione della gamma-glutamyltransferasi, che è noto per produrre un persistente basso livello di stress ossidativo con conseguente stimolazione dei sistemi di protezione. Il clone di gamma-glutamyl-overexpressing mostrato una bassa suscettibilità di triossido di arsenico-indotto apoptosi, associata con l'induzione specie reattive di ossigeno e un aumento dell'attività della catalasi. La combinazione di triossido di arsenico sub-tossiche con concentrazioni di acido ascorbico portato ad una sensibilizzazione alla morte cellulare per apoptosi. L'espressione di meccanismi protettivi, in particolare l'attività della catalasi, ha rappresentato per il comportamento del clone resistente. La sensibilizzazione realizzato dagli combinazione è stata associata ad una risposta cellulare che coinvolge l'asse ASK1/p38, che è implicato nella regolazione dell'espressione catalasi e l'attivazione dei segnali apoptotici. In conclusione, i risultati del nostro studio dimostrano che una combinazione razionale di agenti proossidanti può essere efficace nel superamento della tolleranza allo stress ossidativo cellulare.

245: Park CH, Kimler BF, Yi SY, Park SH, Kim K, Jung CW, Kim SH, Lee ER, Rha M, Kim S, Park MH, Lee SJ, Park HK, Lee MH, Yoon SS, Min YH, Kim BS, Kim JA, Kim WS.

**Depletion of L-ascorbic acid alternating with its supplementation in the treatment of patients with acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndromes.**

Eur J Haematol. 2009 Aug;83(2):108-18.

Purpose: L-ascorbic acid (LAA) modifies the in vitro growth of leukemic cells from approximately 50% of patients with acute myeloid leukemia (AML) or myelodysplastic syndromes (MDS). To test the hypothesis that depletion of LAA, alternating with supplementation to prevent scurvy, would provide therapeutic benefit, a single-arm pilot trial was conducted (ClinicalTrials.gov identifier: NCT00329498). Experimental results: During depletion phase, patients with refractory AML or MDS were placed on a diet deficient in LAA; during supplementation phase, patients received daily intravenous administration of LAA. An in vitro assay was performed pretherapy for LAA sensitivity of leukemic cells from individual patients. Results: Of 18 patients enrolled, eight of 16 evaluable patients demonstrated a clinical response. Responses were obtained during depletion (four patients) as well as during supplementation (five patients) but at a pharmacologic plasma level achievable only with intravenous administration. Of nine patients for whom the in vitro assay indicated their leukemic cells were sensitive to LAA, seven exhibited a clinical response; compared with none of six patients who were insensitive to LAA. Conclusions: The clinical benefit, along with a conspicuous absence of significant adverse events, suggests that further testing of LAA depletion alternating with pharmacologic dose intravenous supplementation in patients with these and other malignancies is warranted.

**Esaurimento di L-acido ascorbico alternato alla sua integrazione nel trattamento di pazienti con leucemia mieloide acuta o sindromi mielodisplastiche**

Scopo: acido L-ascorbico (LAA) modifica la crescita in vitro di cellule leucemiche da circa il 50% dei pazienti con leucemia mieloide acuta (AML) o sindromi mielodisplastiche (MDS). Per verificare l'ipotesi che la deplezione di LAA, alternando con la supplementazione per prevenire lo scorbuto, fornirebbe beneficio terapeutico, un pilota a braccio singolo studio è stato condotto (ClinicalTrials.gov identificativo dell'invito: NCT00329498). I risultati sperimentali: durante la fase di esaurimento, i pazienti con leucemia mieloide acuta refrattaria o MDS sono stati sottoposti a una dieta carente di LAA, durante la fase di integrazione, i pazienti hanno ricevuto ogni giorno la somministrazione endovenosa di LAA. Un test in vitro è stata effettuata pretherapy per la sensibilità delle cellule leucemiche LAA da singoli pazienti. Risultati: Dei 18 pazienti arruolati, otto dei 16 pazienti valutabili hanno dimostrato una risposta clinica. Le risposte sono state ottenute nel corso di esaurimento (quattro pazienti), così come durante supplementazione (cinque pazienti), ma a un livello plasmatico farmacologico ottenibile solo con la somministrazione per via endovenosa. Dei nove pazienti per i quali i test in vitro hanno indicato le loro cellule leucemiche erano sensibili a LAA, sette hanno mostrato una risposta clinica, rispetto a nessuno dei sei pazienti che erano insensibili al LAA. Conclusioni: Il beneficio clinico, insieme a una cospicua assenza di significativi eventi avversi, suggerisce che ulteriori prove di esaurimento LAA alternati con la supplementazione farmacologica dose per via endovenosa nei pazienti con neoplasie questi e altri è giustificata.

252: Peng LJ, Lu DX, Qi RB, Zhang T, Wang Z, Sun Y.

**[Therapeutic effect of intravenous high-dose vitamin C on implanted hepatoma in rats].**

Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao. 2009 Feb;29(2):264-6.

**OBJECTIVE:** To study the therapeutic effect of intravenous high-dose vitamin C on implanted hepatoma in rats.

**METHODS:** The rats bearing implanted Walker-256 hepatoma were treated with high-dose vitamin C at 2.83 and 5.65 g/kg intravenously, and the general condition, liver functions (A/G, ALT, AST, GGT), tumor volume, and tumor growth of the rats were evaluated.

**RESULTS:** The A/G of the rats treated with 2.83 g/kg vitamin C was significantly higher, but the ALT and GCT were significantly lower than those of the model rats ( $P < 0.05$  or  $0.01$ ). The ALT level in rats with 5.65 g/kg vitamin C treatment was significantly lower than that of the model rats ( $P < 0.05$ ). The tumor necrosis rate was significantly higher in rats with 2.83 g/kg vitamin C treatment than in the model rats ( $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** Intravenous administration of 2.83 g/kg vitamin C can promote the necrosis and apoptosis of hepatoma Walker256 cells in rats and protect the liver function of the tumor-bearing rats.

**[Effetto terapeutico di alte dosi intravenose di vitamina C in ratti con epatoma trapiantati].**

Obiettivo: studiare l'effetto terapeutico di vitamina C per via endovenosa ad alte dosi per epatoma impiantati in topi.

**METODI:** Il cuscinetto ratti impiantati Walker-256 epatoma sono stati trattati con vitamina C ad alte dosi a 2,83 e 5,65 g / kg per via endovenosa, e la condizione generale, le funzioni del fegato (A / G, ALT, AST, GGT), il volume del tumore, e crescita tumorale dei topi sono stati valutati.

**RISULTATI:** La A / G di ratti trattati con 2,83 g / kg di vitamina C era significativamente più alta, ma l'ALT e GCT erano significativamente più bassi di quelli dei topi modello ( $P < 0,05$  o  $0,01$ ). Il livello di ALT in ratti con 5,65 g / kg di trattamento vitamina C è risultata significativamente inferiore a quello dei ratti modello ( $P < 0,05$ ). Il tasso di necrosi tumorale era significativamente più alto nei ratti trattati con 2,83 g / kg di vitamina C di trattamento rispetto al modello di ratti ( $P < 0,05$ ).

**CONCLUSIONE:** La somministrazione endovenosa di 2,83 g / kg di vitamina C può favorire la necrosi e l'apoptosi delle cellule di epatoma Walker256 nel ratto e nel proteggere la funzione del fegato dei ratti portatori di tumore.

253: Wright ME, Andreotti G, Lissowska J, Yeager M, Zatonski W, Chanock SJ, Chow WH, Hou L.

**Genetic variation in sodium-dependent ascorbic acid transporters and risk of gastric cancer in Poland.**

Eur J Cancer. 2009 Jul;45(10):1824-30. Epub2009 Feb 23.

Higher ascorbic acid consumption is associated with a reduced risk of gastric cancer in numerous epidemiologic studies. We investigated whether single nucleotide polymorphisms (SNPs) in SLC23A1 and SLC23A2--genes that encode key ascorbic acid transport proteins--affect gastric cancer risk in 279 incident cases and 414 age- and gender-matched controls drawn from a population-based case-control study in Poland. Compared to subjects who were homozygous for the common G allele of the SLC23A2 SNP rs12479919, carriers of the AA genotype had a 41% lower risk of gastric cancer [odds ratio (OR)=0.59, 95% confidence interval (CI): 0.36-0.95; P trend=0.06]. A haplotype that contained the common allele of the rs6139591, rs2681116 and rs14147458 SNPs in SLC23A2 was also significantly inversely associated with gastric malignancy. No other polymorphisms in either gene were related to risk, and there was no effect modification by ascorbic acid intake. These findings suggest that genetic variation in SLC23A2 impacts gastric cancer risk, although confirmation in other studies is required.

**Variazione genetica nei trasportatori dell'acido ascorbico dipendenti dal sodio e rischio di tumore gastrico in Polonia**

Più alto consumo di acido ascorbico è associata ad un ridotto rischio di cancro gastrico in numerosi studi epidemiologici. Abbiamo studiato se i polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) in SLC23A1 e SLC23A2 - geni che codificano chiave ascorbico proteine di trasporto acido - influenzano il rischio cancro gastrico in 279 casi incidenti e 414 per età e sesso-controlli appaiati che parte da un caso di popolazione-studio di controllo in Polonia. Rispetto ai soggetti che erano omozigoti per l'allele G del comune SLC23A2 SNP rs12479919, portatori del genotipo AA avevano un rischio inferiore del 41% gastrico [cancro odds ratio (OR) = 0,59, intervallo di confidenza al 95% (CI): 0.36-0,95, p tendenza = 0,06]. Un aplotipo che conteneva l'allele comune di SNPs rs6139591, rs14147458 rs2681116 e in SLC23A2 era significativamente inversamente associato con neoplasia gastrica. Nessun altro in entrambi i polimorfismi del gene sono stati correlati al rischio, e non vi era alcuna modifica effetto da assunzione di acido ascorbico. Questi risultati suggeriscono che le variazioni genetiche in effetti SLC23A2 rischio di cancro gastrico, anche se conferma in altri studi è richiesto.

259: Berenson JR, Yellin O, Woytowicz D, Flam MS, Cartmell A, Patel R, Duvivier H, Nassir Y, Eades B, Abaya CD, Hilger J, Swift RA.

**Bortezomib, ascorbic acid and melphalan (BAM) therapy for patients with newly diagnosed multiple myeloma: an effective and well-tolerated frontline regimen.**

Eur J Haematol. 2009Jun;82(6):433-9. Epub 2009 Feb 17. PubMed PMID: 19226361.

**BACKGROUND:** We conducted a single-arm, multicentre phase 2 study to evaluate bortezomib, ascorbic acid and melphalan (BAM) for patients with newly diagnosed multiple myeloma (MM).

**METHODS:** Induction consisted of up to eight 28-d cycles of bortezomib 1.0 mg/m<sup>2</sup> on days 1, 4, 8 and 11, plus oral ascorbic acid 1 g and oral melphalan 0.1 mg/kg on days 1-4, followed by maintenance bortezomib 1.3 mg/m<sup>2</sup> every 2 wk until progression.

**RESULTS:** Among 35 patients enrolled (median age 70 yr), responses occurred in 23/31 evaluable patients (74%) including five (16%) complete, three (10%) very good partial, six (19%) partial and nine (29%) minimal responses. Six patients (19%) had stable disease. Thus, disease control was achieved in 29 (94%) patients. Median times to first and best responses were 2 and 3 months (ranges 1-5 and 1-7), respectively. Median time to progression was 19 months and median overall survival has not been reached (range 2-23+ months). Grade 3 and 4 adverse events occurred in 17 and 5 patients, respectively; the most common were neutropenia, neuropathy and thrombocytopenia.

**CONCLUSIONS:** BAM is an efficacious, well-tolerated and steroid- and immunomodulatory drug (IMiD)-free frontline treatment regimen for MM patients.

**Terapia con bortezomib, acido ascorbico e melfalano (BAM) nei pazienti con mieloma multiplo diagnosticato di recente: un regime terapeutico di prima linea efficace e ben tollerato**

**BACKGROUND:** Abbiamo condotto uno studio a braccio singolo, multicentrico di fase 2 studio per valutare bortezomib, melphalan e acido ascorbico (BAM) per i pazienti con nuova diagnosi di mieloma multiplo (MM).

**METODI:** induzione costituito da un massimo di otto 28-d cicli di bortezomib 1,0 mg / m<sup>2</sup> nei giorni 1, 4, 8 e 11, oltre a melfalan per via orale di acido ascorbico da 1 g per via orale e 0,1 mg / kg nei giorni 1-4, seguita da bortezomib mantenimento 1,3 mg / m<sup>2</sup> ogni 2 settimane fino a progressione.

**RISULTATI:** Tra i 35 pazienti arruolati (età media 70 anni), le risposte si è verificato in 23/31 pazienti valutabili (74%) di cui cinque (16%) completa, tre (10%) molto buono parziale, sei (19%), parziale e nove (29%) le risposte minime. Sei pazienti (19%) hanno avuto una stabilizzazione della malattia. Così, il controllo della malattia è stata ottenuta in 29 (94%) pazienti. Tempi mediani di primo e miglior risposte sono state 2 e 3 mesi (range 1-5 e 1-7), rispettivamente. Il tempo mediano alla progressione è stato di 19 mesi e la sopravvivenza globale mediana non è stata raggiunta (intervallo 2-23 + mesi). Di grado 3 e 4 eventi avversi si sono verificati in 17 e 5 pazienti, rispettivamente; i più comuni sono state neutropenia, neuropatia e trombocitopenia.

**CONCLUSIONI:** BAM è un farmaco efficace, ben tollerato e steroidi e immunomodulatori (IMiD)-libero regime di trattamento di prima linea per pazienti affetti da MM.

263: Belin S, Kaya F, Duisit G, Giacometti S, Ciccolini J, Fontés M.

**Antiproliferative effect of ascorbic acid is associated with the inhibition of genes necessary to cell cycle progression.**

PLoS One. 2009;4(2):e4409. Epub 2009Feb 6. PubMed PMID: 19197388; PubMed Central PMCID: PMC2634969.

**BACKGROUND:** Ascorbic acid (AA), or Vitamin C, is most well known as a nutritional supplement with antioxidant properties. Recently, we demonstrated that high concentrations of AA act on PMP22 gene expression and partially correct the Charcot-Marie-Tooth disease phenotype in a mouse model. This is due to the capacity of AA, but not other antioxidants, to down-modulate cAMP intracellular concentration by a competitive inhibition of the adenylate cyclase enzymatic activity. Because of the critical role of cAMP in intracellular signalling, we decided to explore the possibility that ascorbic acid could modulate the expression of other genes.

**METHODS AND FINDINGS:** Using human pangenomic microarrays, we found that AA inhibited the expression of two categories of genes necessary for cell cycle progression, tRNA synthetases and translation initiation factor subunits. In in vitro assays, we demonstrated that AA induced the S-phase arrest of proliferative normal and tumor cells. Highest concentrations of AA led to necrotic cell death. However, quiescent cells were not susceptible to AA toxicity, suggesting the blockage of protein synthesis was mainly detrimental in metabolically-active cells. Using animal models, we found that high concentrations of AA inhibited tumor progression in nude mice grafted with HT29 cells (derived from human colon carcinoma). Consistently, expression of tRNA synthetases and ieF2 appeared to be specifically decreased in tumors upon AA treatment.

**CONCLUSIONS:** AA has an antiproliferative activity, at elevated concentration that could be obtained using IV injection. This activity has been observed in vitro as well in vivo and likely results from the inhibition of expression of genes involved in protein synthesis. Implications for a clinical use in anticancer therapies will be discussed.

**Effetto antiproliferativo dell'acido ascorbico è associate all'inibizione dei geni necessary alla progressione del ciclo cellulare**

**BACKGROUND:** l'acido ascorbico (AA), o la vitamina C, è più noto come supplemento nutrizionale con proprietà antiossidanti. Recentemente, abbiamo dimostrato che elevate concentrazioni di AA agire sull'espressione genica PMP22 e parzialmente corretto il fenotipo della malattia di Charcot-Marie-Tooth in un modello murino. Ciò è dovuto alla capacità di AA, ma non di altri antiossidanti, di down-modulare la concentrazione intracellulare di cAMP da una inibizione competitiva del ciclasti attività enzimatica. Per il ruolo critico del cAMP nella segnalazione intracellulare, abbiamo deciso di esplorare la possibilità che l'acido ascorbico potrebbe modulare l'espressione di altri geni.

**METODI E RISULTATI:** Usando umano pangenomic microarrays, abbiamo scoperto che AA ha inibito l'espressione di due categorie di geni necessari per la progressione del ciclo cellulare, tRNA sintetasi e la traduzione subunità fattore di iniziazione. In test in vitro, abbiamo dimostrato che AA indotto l'arresto della fase S proliferativa di cellule normali e tumorali. Le più alte concentrazioni di piombo AA alla morte delle cellule necrotiche. Tuttavia, le cellule quiescenti non erano suscettibili di tossicità AA, suggerendo il blocco della sintesi proteica è principalmente dannosi nelle cellule metabolicamente attive. Utilizzando modelli animali, abbiamo scoperto che alte concentrazioni di AA inibito la progressione del tumore nei topi nudi innestato con cellule HT29 (derivato da carcinoma del colon umano). Coerentemente, espressione di tRNA sintetasi e ieF2 sembrava essere specificamente diminuita nei tumori in seguito al trattamento AA.

**CONCLUSIONI:** AA ha una attività antiproliferativa, in concentrazione elevata che potrebbe essere

ottenuto con iniezione IV. Questa attività è stata osservata in vitro e in vivo i risultati e probabilmente dalla inibizione di espressione di geni coinvolti nella sintesi proteica. Implicazioni per un uso clinico nelle terapie antitumorali saranno discussi.

272: Mahdavi R, Faramarzi E, Seyedrezazadeh E, Mohammad-Zadeh M, Pourmoghaddam M.

### **Evaluation of oxidative stress, antioxidant status and serum vitamin C levels in cancer patients.**

Biol Trace Elem Res. 2009 Jul;130(1):1-6.

Taking into account the importance role of lipid peroxidation and antioxidants in the prevention and incidence of cancer, the present study was carried out to determine oxidative stress, serum total antioxidant (TAS), and vitamin C levels in cancer patients. Malondialdehyde(MDA), total antioxidant status, and vitamin C levels of 57cancer patients aged 19-80 years and 22 healthy subjects (control group) aged 22-76 years were evaluated. Serum concentrations of MDA as thiobarbituric acid complexes were measured by fluorometry method, the serum TAS by using commercial test kits from Randox Laboratories, and vitamin C by using spectrophotometric method. The mean serum MDA concentrations of all cancer groups except lung cancer were significantly higher than control group ( $P < 0.004$ ). The mean total antioxidant status was insignificantly higher than control group. The mean serum vitamin C level was significantly lower in patients as compared to the healthy subjects ( $PV < 0.0001$ ). In conclusion, an alteration in the lipid peroxidation with concomitant changes in antioxidant defense system in cancer patients may be due to excessive oxidative stress. Serum low levels of vitamin C in the different type of cancer patients in spite of adequate daily intake may be due to increased utilization to scavenge lipid peroxides as well as their sequestration by tumor cells.

### **Valutazione dello stress ossidativo, dello stato antiossidante e dei livelli di vitamina C nei pazienti con tumore**

Tenuto conto dell'importanza del ruolo della perossidazione lipidica e antiossidanti nella prevenzione e incidenza dei tumori, il presente studio è stato condotto per determinare lo stress ossidativo, antiossidante totale del siero (TAS), e livelli di vitamina C nei pazienti oncologici. Malondialdeide (MDA), lo stato antiossidante totale, ed i livelli di vitamina C di pazienti di età compresa tra 19-80 anni 57cancer e 22 soggetti sani (gruppo controllo) di età compresa tra 22-76 anni sono stati valutati. Le concentrazioni sieriche di MDA come complessi acido thiobarbituric sono stati misurati con metodo fluorometria, il TAS siero utilizzando kit di test commerciali da Laboratori Randox, e la vitamina C utilizzando il metodo spettrofotometrico. La media delle concentrazioni sieriche MDA di tutti i gruppi ad eccezione di cancro al polmone erano notevolmente superiori rispetto al gruppo controllo ( $P < 0,004$ ). Lo stato antiossidante totale media è stata leggermente superiore rispetto al gruppo di controllo. Il valore medio di vitamina C, livello sierico è risultata significativamente più bassa nei pazienti rispetto ai soggetti sani ( $PV < 0,0001$ ). In conclusione, una alterazione della perossidazione lipidica, con conseguenti modifiche nel sistema di difesa antiossidante nei pazienti con tumore può essere dovuto ad un eccessivo stress ossidativo. Livelli sierici di vitamina C nel diverso tipo di malati di cancro, nonostante un adeguato apporto giornaliero può essere dovuto al maggiore utilizzo di pulire i perossidi lipidici e la loro cattura da parte delle cellule tumorali.

275: Kurahashi N, Inoue M, Iwasaki M, Tanaka Y, Mizokami M, Tsugane S; JPHC StudyGroup.

**Vegetable, fruit and antioxidant nutrient consumption and subsequent risk of hepatocellular carcinoma: a prospective cohort study in Japan.**

Br J Cancer.2009 Jan 13;100(1):181-4.

In a population-based prospective study of 19,998 Japanese individuals, consumption of vegetables, green-yellow and green leafy vegetables was inversely associated with the risk of hepatocellular carcinoma (101 cases), with multivariable hazard ratios for the highest vs lowest tertile of 0.61 (95% confidence interval (CI)=0.36-1.03, P(trend)=0.07), 0.65 (95% CI=0.39-1.08, P(trend)=0.06) and 0.59 (95% CI=0.35-1.01, P(trend)=0.04), respectively.

**Assunzione di vegetali, frutta e nutrienti antiossidanti e rischio conseguente di carcinoma epatocellulare: uno studio prospettico di coorte in Giappone**

In uno studio prospettico basato sulla popolazione di 19.998 individui giapponese, il consumo di verdure, verde-giallo e verdure a foglia verde è risultato inversamente associato con il rischio di carcinoma epatocellulare (101 casi), con hazard ratio per il più alto vs terzile più basso di 0,61 (Intervallo di confidenza al 95% (CI) = 0,36-1,03, P (trend) = 0.07), 0.65 (95% CI = 0,39-1,08, P (trend) = 0,06) e 0,59 (95% CI = 0,35-1,01, P (tendenza) = 0.04), rispettivamente.

276: Lin J, Cook NR, Albert C, Zaharris E, Gaziano JM, Van Denburgh M, Buring JE, Manson JE.

**Vitamins C and E and beta carotene supplementation and cancer risk: a randomized controlled trial.**

J Natl Cancer Inst. 2009 Jan 7;101(1):14-23.

**BACKGROUND:** Observational studies suggested that a diet high in fruits and vegetables, both of which are rich with antioxidants, may prevent cancer development. However, findings from randomized trials of the association between antioxidant use and cancer risk have been mostly negative.

**METHODS:** From 8171 women who were randomly assigned in the Women's Antioxidant Cardiovascular Study, a double-blind, placebo-controlled 2 x 2 x 2 factorial trial of vitamin C (500 mg of ascorbic acid daily), natural-source vitamin E (600 IU of alpha-tocopherol every other day), and beta carotene (50 mg every other day), 7627 women who were free of cancer before random assignment were selected for this study. Diagnoses and deaths from cancer at a specific site were confirmed by use of hospital reports and the National Death Index. Cox proportional hazards regression models were used to assess hazard ratios (represented as relative risks [RRs]) of common cancers associated with use of antioxidants, either individually or in combination. Subgroup analyses were conducted to determine if duration of use modified the association of supplement use with cancer risk. All statistical tests were two-sided.

**RESULTS:** During an average 9.4 years of treatment, 624 women developed incident invasive cancer and 176 women died from cancer. There were no statistically significant effects of use of any antioxidant on total cancer incidence. Compared with the placebo group, the RRs were 1.11 (95% confidence interval [CI] = 0.95 to 1.30) in the vitamin C group, 0.93 (95% CI = 0.79 to 1.09) in the vitamin E group, and 1.00 (95% CI = 0.85 to 1.17) in the beta carotene group. Similarly, no effects of these antioxidants were observed on cancer mortality. Compared with the placebo group, the RRs were 1.28 (95% CI = 0.95 to 1.73) in the vitamin C group, 0.87 (95% CI = 0.65 to 1.17) in the vitamin E group, and 0.84 (95% CI = 0.62 to 1.13) in the beta carotene group. Duration and combined use of the three antioxidants also had no effect on cancer incidence and cancer death.

**CONCLUSIONS:** Supplementation with vitamin C, vitamin E, or beta carotene offers no overall benefits in the primary prevention of total cancer incidence or cancer mortality.

**Aggiunta di vitamina C , E e betacarotene e rischio di cancro: un trial randomizzato controllato**

**BACKGROUND:** studi osservazionali suggerisce che una dieta ricca di frutta e verdura, che sono entrambi ricchi di antiossidanti, possono impedire lo sviluppo del cancro. Tuttavia, i risultati di studi clinici randomizzati l'associazione tra uso di antiossidanti e rischio di cancro sono stati per lo più negative.

**METODI:** Da 8.171 le donne che sono stati randomizzati al Women's Antioxidant Cardiovascular Study, in doppio cieco, controllato verso placebo 2 x 2 x 2 trial fattoriale di vitamina C (500 mg al giorno di acido ascorbico), vitamina E di origine naturale (600 UI di alfa-tocoferolo ogni altro giorno), e beta carotene (50 mg a giorni alterni), 7.627 le donne che erano prive di cancro prima randomizzazione sono stati selezionati per questo studio. Diagnosi e decessi per cancro in un determinato sito sono stati confermati mediante l'uso di relazioni ospedale e la National Death Index. Modelli di regressione proporzionale di Cox pericoli sono stati utilizzati per valutare gli hazard ratio (rappresentato come rischio relativo [RR]) di tumori comuni associati con l'uso di antiossidanti, singolarmente o in combinazione. L'analisi dei sottogruppi sono stati condotti per

determinare se la durata dell'uso modificato l'associazione di uso di integratori con il rischio di cancro. Tutti i test statistici sono stati due lati.

**RISULTATI:** Durante una media di 9,4 anni di trattamento, 624 donne hanno sviluppato carcinoma invasivo incidente e 176 donne sono morte di cancro. Non ci sono stati effetti statisticamente significativi di utilizzo di tutti antiossidante sulla incidenza totale del cancro. Rispetto al gruppo placebo, il RR era 1.11 (95% intervallo di confidenza [CI] = 0,95-1,30) nel gruppo vitamina C, 0,93 (95% CI = 0,79-1,09) nel gruppo vitamina E, e 1.00 (95% CI = 0,85-1,17) nel gruppo di beta carotene. Allo stesso modo, senza effetti di questi antiossidanti sulla mortalità sono stati osservati tumori. Rispetto al gruppo placebo, il RR era 1.28 (95% CI = 0,95-1,73) nel gruppo vitamina C, 0.87 (IC 95% = 0,65-1,17) nel gruppo vitamina E, e 0,84 (95% CI = 0,62 a 1.13) nel gruppo di beta carotene. Durata e uso combinato dei tre antiossidanti anche non ha avuto effetto sull'incidenza del cancro e di morte per cancro.

**CONCLUSIONI:** La supplementazione con vitamina C, vitamina E, beta carotene o non offre vantaggi in prevenzione primaria della incidenza di neoplasie o di mortalità per cancro.

280: Ha YM, Park MK, Kim HJ, Seo HG, Lee JH, Chang KC.

**High concentrations of ascorbic acid induces apoptosis of human gastric cancer cell by p38-MAP kinase-dependent up-regulation of transferrin receptor.**

Cancer Lett. 2009 May8;277(1):48-54..

We investigated the molecular mechanism by which ascorbic acid (AA) induces apoptosis in human gastric cancer cells, AGS cells. High concentration (more than 5mM) of AA increased cellular iron uptake by increasing transferrin receptor (TfR) expression and induced AGS cell apoptosis which was inhibited by catalase. Interestingly, p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) inhibitor inhibited the upregulation of TfR and increased cell survival by AA. TfR-siRNA-transfected cells reduced apoptosis by AA. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> increased TfR expression in AGS cells. Taken together, we concluded that high concentration of AA, through H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, induces apoptosis of AGS cells by p38-MAPK-dependent upregulation of TfR.

**Alte concentrazioni di acido ascorbico inducono l'apoptosi delle cellule cancerose umane gastriche tramite la regolazione positive dipendente dalla p38-MAP chinasi del recettore della transferrina**

Abbiamo studiato il meccanismo molecolare con cui l'acido ascorbico (AA) induce apoptosi nelle cellule umane di cancro gastrico, le cellule AGS. L'alta concentrazione (più di 5 mM) di AA aumentato assorbimento cellulare di ferro da recettori della transferrina in aumento (TFR), espressione e induce apoptosi delle cellule AGS che è stato inibito dalla catalasi. È interessante notare che mitogeno p38-activated protein-chinasi (MAPK) inibitore inibito l'up-regulation del TFR e la sopravvivenza delle cellule aumentato di AA. Cellule TFR-siRNA transfettate ridotta apoptosi da AA. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aumento TFR espressione nelle cellule AGS. Nel loro insieme, abbiamo concluso che ad alta concentrazione di AA, attraverso H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, induce l'apoptosi delle cellule AGS da upregulation p38-MAPK-dipendente del TFR.

281: Alexandrescu DT, Dasanu CA, Kauffman CL.

### **Acute scurvy during treatment with interleukin-2.**

Clin Exp Dermatol. 2009 Oct;34(7):811-4..

The association of vitamin C deficiency with nutritional factors is commonly recognized. However, an acute form of scurvy can occur in patients with an acute systemic inflammatory response, which is produced by sepsis, medications, cancer or acute inflammation. The frequency of acute hypovitaminosis C in hospitalized patients is higher than previously recognized. We report the occurrence of acute signs and symptoms of scurvy (perifollicular petechiae, erythema, gingivitis and bleeding) in a patient hospitalized for treatment of metastatic renal-cell carcinoma with high-dose interleukin-2. Concomitantly, serum vitamin C levels decreased to below normal. Better diets and longer lifespan may result a lower frequency of acute scurvy and a higher frequency of scurvy associated with systemic inflammatory responses. Therefore, increased awareness of this condition can lead to early recognition of the cutaneous signs of acute scurvy in hospitalized patients with acute illnesses or in receipt of biological agents, and prevent subsequent morbidity such as bleeding, anaemia, impaired immune defences, oedema or neurological symptoms.

### **Scorbuto acuto durante il trattamento con interleuchina 2**

L'associazione di carenza di vitamina C con fattori nutrizionali è comunemente riconosciuto. Tuttavia, una forma acuta di scorbuto si può verificare in pazienti con una risposta infiammatoria sistemica acuta, che è prodotto da sepsi, farmaci, tumore o infiammazione acuta. La frequenza di ipovitaminosi C acuta nei pazienti ospedalizzati è superiore a quello precedentemente riconosciuto. Segnaliamo la comparsa dei segni e sintomi acuti di scorbuto (perifollicular petecchie, eritema, gengiviti e sanguinamento) in un paziente ricoverato per il trattamento del carcinoma a cellule renali con alte dosi di interleuchina-2. Al contempo, i livelli di vitamina C nel siero è diminuito al di sotto del normale. Le diete migliori e una vita più lunga può causare una frequenza più bassa di scorbuto acuto e una maggiore frequenza di scorbuto sistemica associata a reazioni infiammatorie. Pertanto, una maggiore consapevolezza di questa condizione può portare ad un precoce riconoscimento dei segni cutanei di scorbuto acuto nei pazienti ricoverati con malattie acute o in ricezione di agenti biologici, e di prevenire la morbilità successive come sanguinamento, anemia, compromissione delle difese immunitarie, edema o sintomi neurologici .

283: Bandera EV, Gifkins DM, Moore DF, McCullough ML, Kushi LH.

**Antioxidant vitamins and the risk of endometrial cancer: a dose-response meta-analysis.**

Cancer Causes Control. 2009 Jul;20(5):699-711.

Antioxidant vitamins may reduce cancer risk by limiting oxidative DNA damage. To summarize and quantify the current epidemiologic evidence of an association between antioxidant vitamin intake and endometrial cancer, we conducted a systematic literature review and meta-analysis. One cohort and 12 case-control studies presenting relevant risk estimates were identified by conducting bibliographical searches through June 2008. Dose-response meta-analyses were conducted for beta-carotene, vitamin C, and vitamin E from food sources. Intake from supplements was not considered in the meta-analyses because of the few studies that reported relevant information. Based on case-control data, the random-effects summary odds ratios (OR) were, for beta-carotene: 0.88 (95% CI: 0.79-0.98) per 1,000 mcg/1,000 kcal (I<sup>2</sup>: 77.7%;  $p < 0.01$ ); for vitamin C: 0.85 (95% CI: 0.73-0.98) per 50 mg/1,000 kcal (I<sup>2</sup>: 66.1%;  $p < 0.01$ ); and, for vitamin E: 0.91 (95% CI: 0.84-0.99) per 5 mg/1,000 kcal (I<sup>2</sup>: 0.0%;  $p: 0.45$ ). In contrast, the only prospective study identified provided little indication of an association. Although the current case-control data suggest an inverse relationship of endometrial cancer risk with dietary intakes of beta-carotene, vitamin C, and vitamin E from food sources, additional studies are needed, particularly cohort studies, to confirm an association.

**Vitamine antiossidanti e rischio di cancro all'endometrio: una meta-analisi dose-risposta**

Vitamine antiossidanti può ridurre il rischio di cancro, limitando il danno ossidativo del DNA. Per riassumere e quantificare le attuali evidenze epidemiologiche di un'associazione tra assunzione di vitamine antiossidanti e cancro dell'endometrio, abbiamo condotto una revisione sistematica della letteratura e meta-analisi. Uno studio di coorte e 12 studi caso-controllo che presenta le stime relative al rischio sono stati individuati effettuando ricerche bibliografiche a giugno 2008. Dose-risposta meta-analisi sono state condotte per il beta-carotene, vitamina C e vitamina E da fonti alimentari. L'assunzione di integratori non è stato considerato nella meta-analisi a causa dei pochi studi che ha segnalato le informazioni pertinenti. Sulla base dei dati caso-controllo, gli effetti casuali odds ratio di sintesi (OR) sono stati, per il beta-carotene: 0,88 (95% CI: 0,79-0,98) per 1.000 mcg / 1.000 kcal (I<sup>2</sup>: 77,7%,  $p < 0,01$ ) ; per la vitamina C: 0.85 (95% CI: 0,73-0,98) per ogni 50 mg / 1,000 kcal (I<sup>2</sup>: 66,1%,  $p < 0,01$ ) e, per la vitamina E: 0,91 (95% CI: 0,84-0,99) per 5 mg / 1,000 kcal (I<sup>2</sup>: 0.0%,  $p: 0,45$ ). Al contrario, l'unico studio prospettico individuato fornito poche indicazioni di una associazione. Anche se i dati attuali caso-controllo suggeriscono una relazione inversa tra rischio di tumore dell'endometrio con apporti alimentari di beta-carotene, vitamina C e vitamina E di origine alimentare, ulteriori studi sono necessari, in particolare gli studi di coorte, per confermare una associazione.

285: Chen Q, Jones D, Stone P, Ching LM, Chamley L.

**Vitamin C enhances phagocytosis of necrotic trophoblasts by endothelial cells and protects the phagocytosing endothelial cells from activation.**

Placenta. 2009 Feb;30(2):163-8. Epub 2008 Dec 13. PubMed PMID: 19070894.

Preeclampsia is a pregnancy-specific disease characterised by maternal hypertension that is preceded by endothelial cell activation and an inappropriate inflammatory response. The exact cause of preeclampsia is unclear but this disease is known to be induced by a placental factor and it is hypothesised that oxidative stress may also contribute to its pathogenesis. We have shown that dead trophoblasts shed from the placenta can be phagocytosed by endothelial cells and that phagocytosis of necrotic, but not apoptotic, trophoblasts leads to endothelial cells activation. Since phagocytosis may be accompanied by an oxidative burst which may lead to damage/activation of the phagocyte, in this study we have investigated whether the antioxidant vitamin C can protect endothelial cells that phagocytose necrotic trophoblasts from activation. We demonstrate that treatment of phagocytosing endothelial cells with vitamin C induced an increase in the phagocytosis of necrotic trophoblasts but that activation of the phagocytosing endothelial cells was prevented. Treatment of phagocytosing endothelial cells with vitamin C also prevented the increase in IL-6 secretion that normally accompanies phagocytosis of necrotic trophoblasts. Thus treatment of endothelial cells with vitamin C appears to modify both the phagocytosis of necrotic trophoblasts and the response of the endothelial cells to the necrotic trophoblastic material.

**La vitamina C aumenta la fagocitosi dei trofoblasti necrotici tramite le cellule endoteliali e protegge le cellule endoteliali fagocitanti dall'attivazione**

Preeclampsia è una malattia gravidanza-specifici caratterizzati da ipertensione materna che è preceduta da attivazione delle cellule endoteliali e una risposta inappropriata infiammatoria. La causa esatta della preeclampsia è chiaro, ma questa malattia è noto per essere indotta da un fattore placentare e si ipotizza che lo stress ossidativo possono contribuire alla sua patogenesi. Abbiamo dimostrato che trophoblasts morto capannone della placenta può essere fagocitati dalle cellule endoteliali e che la fagocitosi di necrotico, ma non apoptotica, trophoblasts porta alla attivazione delle cellule endoteliali. Dal momento che la fagocitosi può essere accompagnato da uno scoppio ossidativo che può portare a danni / attivazione del fagocita, in questo studio abbiamo esaminato se la vitamina C antiossidante in grado di proteggere le cellule endoteliali che phagocytose trophoblasts necrotico da attivazione. Abbiamo dimostrato che il trattamento di phagocytosing cellule endoteliali con la vitamina C ha indotto un aumento della fagocitosi di trophoblasts necrotico, ma che l'attivazione delle cellule endoteliali phagocytosing è stato impedito. Trattamento di phagocytosing cellule endoteliali con la vitamina C anche impedito l'aumento della secrezione di IL-6 che di solito accompagna la fagocitosi di trophoblasts necrotico. Così il trattamento di cellule endoteliali con la vitamina C sembra modificare sia la fagocitosi di trophoblasts necrotica e la risposta delle cellule endoteliali del materiale necrotico trofoblastica.

287: Gaziano JM, Glynn RJ, Christen WG, Kurth T, Belanger C, MacFadyen J, Bubes V, Manson JE, Sesso HD, Buring JE.

**Vitamins E and C in the prevention of prostate and total cancer in men: the Physicians' Health Study II randomized controlled trial. JAMA.**

2009 Jan 7;301(1):52-62. Epub 2008 Dec 9.

**CONTEXT:** Many individuals take vitamins in the hopes of preventing chronic diseases such as cancer, and vitamins E and C are among the most common individual supplements. A large-scale randomized trial suggested that vitamin E may reduce risk of prostate cancer; however, few trials have been powered to address this relationship. No previous trial in men at usual risk has examined vitamin C alone in the prevention of cancer.

**OBJECTIVE:** To evaluate whether long-term vitamin E or C supplementation decreases risk of prostate and total cancer events among men.

**DESIGN, SETTING, AND PARTICIPANTS:** The Physicians' Health Study II is a randomized, double-blind, placebo-controlled factorial trial of vitamins E and C that began in 1997 and continued until its scheduled completion on August 31, 2007. A total of 14,641 male physicians in the United States initially aged 50 years or older, including 1307 men with a history of prior cancer at randomization, were enrolled.

**INTERVENTION:** Individual supplements of 400 IU of vitamin E every other day and 500 mg of vitamin C daily.

**MAIN OUTCOME MEASURES:** Prostate and total cancer.

**RESULTS:** During a mean follow-up of 8.0 years, there were 1008 confirmed incident cases of prostate cancer and 1943 total cancers. Compared with placebo, vitamin E had no effect on the incidence of prostate cancer (active and placebo vitamin E groups, 9.1 and 9.5 events per 1000 person-years; hazard ratio [HR], 0.97; 95% confidence interval [CI], 0.85-1.09; P = .58) or total cancer (active and placebo vitamin E groups, 17.8 and 17.3 cases per 1000 person-years; HR, 1.04; 95% CI, 0.95-1.13; P = .41). There was also no significant effect of vitamin C on total cancer (active and placebo vitamin C groups, 17.6 and 17.5 events per 1000 person-years; HR, 1.01; 95% CI, 0.92-1.10; P = .86) or prostate cancer (active and placebo vitamin C groups, 9.4 and 9.2 cases per 1000 person-years; HR, 1.02; 95% CI, 0.90-1.15; P = .80). Neither vitamin E nor vitamin C had a significant effect on colorectal, lung, or other site-specific cancers. Adjustment for adherence and exclusion of the first 4 or 6 years of follow-up did not alter the results. Stratification by various cancer risk factors demonstrated no significant modification of the effect of vitamin E on prostate cancer risk or either agent on total cancer risk.

**CONCLUSIONS:** In this large, long-term trial of male physicians, neither vitamin E nor C supplementation reduced the risk of prostate or total cancer. These data provide no support for the use of these supplements for the prevention of cancer in middle-aged and older men.

**Vitamine E e C nella prevenzione del tumore alla prostata ed altri tipi di tumori nell'uomo: Physicians' Health Study II trial controllato randomizzato**

**CONTESTO:** Molti individui assumono vitamine nella speranza di prevenire le malattie croniche come il cancro, e le vitamine E e C sono tra i più comuni integratori individuale. Uno studio su vasta scala randomizzato suggerisce che la vitamina E può ridurre il rischio di cancro alla prostata, tuttavia, alcune prove sono state alimentate per affrontare questa relazione. Nessun precedente prova negli uomini a rischio solito ha esaminato solo la vitamina C nella prevenzione del cancro.

**OBIETTIVO:** Per valutare se la vitamina E a lungo termine o supplementazione C riduce il rischio di cancro alla prostata ed eventi totale tra gli uomini.

**DISEGNO, REGOLAZIONE E PARTECIPANTI:** Il Physicians 'Health Study II è uno studio randomizzato, in doppio cieco, controllato con placebo fattoriale di vitamine E e C che ha avuto

inizio nel 1997 ed è proseguita fino al suo completamento previsto il 31 agosto 2007. Un totale di 14.641 medici di sesso maschile negli Stati Uniti, inizialmente di 50 anni o più anziani, tra cui 1.307 uomini con una storia di cancro prima al momento della randomizzazione, sono stati arruolati.

INTERVENTO: Integratori individuale di 400 UI di vitamina E ogni due giorni e 500 mg di vitamina C al giorno.

MISURE PRINCIPALI DI RISULTATO: cancro alla prostata e totale.

RISULTATI: Durante un follow-up medio di 8,0 anni, 1008 casi incidenti di carcinoma della prostata confermato e il 1943 i tumori totali. Rispetto al placebo, la vitamina E non ha avuto effetto sull'incidenza del cancro della prostata (attivi e il placebo gruppi di vitamina E, 9.1 e 9.5 eventi per 1000 persone-anno; hazard ratio [HR], 0,97, 95% intervallo di confidenza [CI], 0,85 -1,09, P = 0,58) o totale del cancro (attivi e il placebo gruppi di vitamina E, 17,8 e 17,3 casi per 1000 persone-anno; HR, 1,04; 95% CI 0,95-1,13, p = 0,41). C'è stato anche un effetto significativo della vitamina C sul cancro (attivi e il placebo vitamina gruppi C, 17,6 e 17,5 eventi per 1000 persone-anno; HR, 1,01; 95% CI 0,92-1,10, p = 0,86) o il cancro alla prostata (attivi e il placebo vitamina gruppi C, 9.4 e 9.2 casi per 1000 persone-anno; HR, 1.02, 95% CI, 0,90-1,15, p = .80). Né la vitamina C, vitamina né ha avuto un effetto significativo sul colon-retto, del polmone, o di altri tumori site-specific. Adeguamento per l'adesione e l'esclusione dei primi 4 o 6 anni di follow-up non ha modificato i risultati. Stratificazione per vari fattori di rischio di cancro hanno dimostrato alcuna modifica significativa degli effetti della vitamina E sul rischio di cancro alla prostata o di entrambi i farmaci sul rischio di cancro totale.

CONCLUSIONI: In questo ampio studio a lungo termine di medici di sesso maschile, né supplementazione di vitamina C, né ridotto il rischio di cancro alla prostata o totale. Questi dati non forniscono alcun supporto per l'uso di questi integratori per la prevenzione del cancro in uomini di mezza età e anziani.

296: Duarte TL, Cooke MS, Jones GD.

### **Gene expression profiling reveals new protective roles for vitamin C in human skin cells.**

Free Radic Biol Med. 2009 Jan1;46(1):78-87..

The skin is a protective barrier against external insults and any lesion must be rapidly and efficiently repaired. Dermal fibroblasts are the major source of extracellular connective tissue matrix and play an important role in wound healing. Vitamin C is an important water-soluble free radical scavenger and an essential cofactor for collagen synthesis by dermal fibroblasts and, consequently, may contribute to the maintenance of healthy skin. Using microarray analysis, we investigated the effects of long-term exposure to a stable vitamin C derivative, ascorbic acid 2-phosphate (AA2P), in contact-inhibited populations of primary human dermal fibroblasts. Compared with "scorbutic" cells, cells exposed to AA2P increased the expression of genes associated with DNA replication and repair and with the G(2)/M phase of the cell cycle. Consistent with the gene expression changes, AA2P increased the mitogenic stimulation of quiescent fibroblasts by serum factors and cell motility in the context of wound healing. Furthermore, AA2P-treated fibroblasts showed faster repair of oxidatively damaged DNA bases. We propose that vitamin C may protect the skin by promoting fibroblast proliferation, migration, and replication-associated base excision repair of potentially mutagenic DNA lesions, and we discuss the putative involvement of hypoxia-inducible transcription factor-1 and collagen receptor-related signaling pathways.

### **Il profilo di espressione genica rivela un nuovo ruolo protettivo della vitamina C nelle cellule della pelle umana**

La pelle è una barriera protettiva contro gli insulti esterni ed ogni lesione deve essere rapidamente ed efficacemente riparata. Fibroblasti cutanei sono la fonte principale della matrice extracellulare del tessuto connettivo e svolgono un ruolo importante nella guarigione delle ferite. La vitamina C è un importante solubile in acqua scavenger di radicali liberi e un cofattore essenziale per la sintesi di collagene da parte dei fibroblasti dermici e, di conseguenza, possono contribuire al mantenimento della pelle sana. Usando l'analisi microarray, abbiamo studiato gli effetti dell'esposizione a lungo termine a una vitamina C stabile derivato, l'acido ascorbico 2-fosfato (AA2P), a contatto inibite le popolazioni di fibroblasti umani primari cutanea. Comparato con "scorbutica" le cellule, le cellule esposte a AA2P aumentato l'espressione dei geni associati alla replicazione e riparazione del DNA e con la G (2) / fase M del ciclo cellulare. Coerentemente con i cambiamenti di espressione genica, AA2P aumentato la stimolazione dei fibroblasti quiescenti mitogenica da fattori del siero e la motilità delle cellule nel contesto della guarigione della ferita. Inoltre, i fibroblasti AA2P-trattati hanno mostrato più veloce di riparazione di basi di DNA danneggiato ossidativo. Proponiamo che la vitamina C può proteggere la pelle, promuovendo la proliferazione dei fibroblasti, la migrazione e la replica associata a riparazione per escissione di base di lesioni del DNA potenzialmente mutagene, e discutiamo il coinvolgimento putativo di ipossia-inducibile fattore di trascrizione-1 e di collagene percorsi recettore nel segnalamento .

298: Greenlee H, Hershman DL, Jacobson JS.

**Use of antioxidant supplements during breast cancer treatment: a comprehensive review.** Breast Cancer Res Treat. 2009Jun;115(3):437-52.

**PURPOSE:** An estimated 45-80% of breast cancer patients use antioxidant supplements after diagnosis, and use of antioxidant supplements during breast cancer treatment is common. Dietary supplements with antioxidant effects include vitamins, minerals, phytonutrients, and other natural products. We conducted a comprehensive review of literature on the associations between antioxidant supplement use during breast cancer treatment and patient outcomes.

**METHODS:** Inclusion criteria were: two or more subjects; clinical trial or observational study design; use of antioxidant supplements (vitamin C, vitamin E, antioxidant combinations, multivitamins, glutamine, glutathione, melatonin, or soy isoflavones) during chemotherapy, radiation therapy, and/or hormonal therapy for breast cancer as exposures; treatment toxicities, tumor response, recurrence, or survival as outcomes.

**RESULTS:** We identified 22 articles that met those criteria. Their findings did not support any conclusions regarding the effects of individual antioxidant supplements during conventional breast cancer treatment on toxicities, tumor response, recurrence, or survival. A few studies suggested that antioxidant supplements might decrease side effects associated with treatment, including vitamin E for hot flashes due to hormonal therapy and glutamine for oral mucositis during chemotherapy. Underpowered trials suggest that melatonin may enhance tumor response during treatment.

**CONCLUSION:** The evidence is currently insufficient to inform clinician and patient guidelines on the use of antioxidant supplements during breast cancer treatment. Thus, well designed clinical trials and observational studies are needed to determine the short- and long-term effects of such agents.

### **Uso di supplementi antiossidanti durante il trattamento del cancro al seno: review**

**SCOPO:** Si stima che 45-80% dei malati di cancro al seno utilizzare integratori antiossidanti dopo la diagnosi, e l'uso di supplementi antiossidanti durante il trattamento del cancro al seno è comune. Gli integratori alimentari con effetti antiossidanti includono vitamine, minerali, fitonutrienti, e altri prodotti naturali. Abbiamo condotto una revisione completa della letteratura sulle associazioni tra uso di integratori antiossidanti durante il trattamento del cancro al seno risultati e paziente.

**METODI:** I criteri di inclusione erano: due o più soggetti; studio clinico o disegno dello studio osservazionale, uso di supplementi antiossidanti (vitamina C, vitamina E, antiossidante combinazioni, multivitaminici, glutammina, glutatione, melatonina, o gli isoflavoni di soia) durante la chemioterapia, radioterapia, e / o la terapia ormonale per il tumore al seno a quello delle esposizioni; tossicità del trattamento, la risposta del tumore, recidiva, la sopravvivenza o come dei risultati.

**RISULTATI:** Abbiamo identificato 22 articoli che ha incontrato a tali criteri. Le loro scoperte non hanno sostenuto alcuna conclusione in merito agli effetti dei supplementi antiossidanti individuale durante il trattamento convenzionale del cancro al seno su tossicità, la risposta del tumore, recidiva, o la sopravvivenza. Alcuni studi suggerisce che supplementi antiossidanti potrebbero ridurre gli effetti collaterali associati al trattamento, tra cui la vitamina E per vampate di calore dovuta alla terapia ormonale e glutammina per mucosite orale durante la chemioterapia. sottodimensionato prove suggeriscono che la melatonina può migliorare la risposta del tumore durante il trattamento.

**CONCLUSIONE:** La prova è attualmente insufficiente a informare le linee guida medico e paziente l'uso di supplementi antiossidanti durante il trattamento del cancro della mammella. Così, ben

disegnati studi clinici e studi osservazionali sono necessari per determinare gli effetti a breve e a lungo termine di tali agenti.

Ichim TE, Minev B, Braciak T, Luna B, Hunninghake R, Mikirova NA, Jackson JA, Gonzalez MJ, Miranda-Massari JR, Alexandrescu DT, Dasanu CA, Bogin V, Ancans J, Stevens RB, Markosian B, Koropatnick J, Chen CS, Riordan NH.

### **Intravenous ascorbic acid to prevent and treat cancer-associated sepsis?**

J Transl Med. 2011 Mar 4;9:25.

Department of Orthomolecular Studies, Riordan Clinic, 3100 N Hillside, Wichita, Kansas, 67210, USA. nhriordan@gmail.com.

**ABSTRACT:** The history of ascorbic acid (AA) and cancer has been marked with controversy. Clinical studies evaluating AA in cancer outcome continue to the present day. However, the wealth of data suggesting that AA may be highly beneficial in addressing cancer-associated inflammation, particularly progression to systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and multi organ failure (MOF), has been largely overlooked. Patients with advanced cancer are generally deficient in AA. Once these patients develop septic symptoms, a further decrease in ascorbic acid levels occurs. Given the known role of ascorbate in: a) maintaining endothelial and suppression of inflammatory markers; b) protection from sepsis in animal models; and c) direct antineoplastic effects, we propose the use of ascorbate as an adjuvant to existing modalities in the treatment and prevention of cancer-associated sepsis.

### **Acido ascorbico endovenosa per prevenire e trattare la sepsi associata al cancro?**

La storia di acido ascorbico (AA) e cancro è stata contrassegnata da polemiche. Gli studi clinici che hanno valutato AA in esito cancro continuare fino ai giorni nostri. Tuttavia, la ricchezza di dati che suggeriscono che AA può essere estremamente utile per affrontare l'infiammazione associata al cancro, in particolare la progressione di sindrome da risposta infiammatoria sistemica (SIRS) e insufficienza multi organo (MOF), è stato ampiamente trascurato. I pazienti con cancro avanzato sono generalmente carenti di AA. Una volta che questi pazienti sviluppano sintomi settici, un ulteriore calo dei livelli di acido ascorbico si è verificato. Dato il ruolo noto di ascorbato in: a) il mantenimento endoteliale e la soppressione dei marker di infiammazione, b) la protezione da sepsi in modelli animali, c) diretto effetti antineoplastici, proponiamo l'utilizzo di acido ascorbico come coadiuvante alle modalità esistenti nel trattamento e nella prevenzione della sepsi associata al cancro.

Nechuta S, Lu W, Chen Z, Zheng Y, Gu K, Cai H, Zheng W, Shu XO

## **Vitamin supplement use during breast cancer treatment and survival: a prospective cohort study.**

Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2011 Feb;20(2):262-71. Epub 2010 Dec 21.

Division of Epidemiology, Department of Medicine, Vanderbilt University School of Medicine, Nashville, Tennessee 37203, USA.

**BACKGROUND:** Antioxidants may protect normal cells from the oxidative damage that occurs during radiotherapy and certain chemotherapy regimens; however, the same mechanism could protect tumor cells and potentially reduce effectiveness of cancer treatments. We evaluated the association of vitamin supplement use in the first 6 months after breast cancer diagnosis and during cancer treatment with total mortality and recurrence.

**METHODS:** We conducted a population-based prospective cohort study of 4,877 women aged 20 to 75 years diagnosed with invasive breast cancer in Shanghai, China, between March 2002 and April 2006. Women were interviewed approximately 6 months after diagnosis and followed up by in-person interviews and record linkage with the vital statistics registry.

**RESULTS:** During a mean follow-up of 4.1 years, 444 deaths and 532 recurrences occurred. Vitamin use shortly after breast cancer diagnosis was associated with reduced mortality and recurrence risk, adjusted for multiple lifestyle factors, sociodemographics, and known clinical prognostic factors. Women who used antioxidants (vitamin E, vitamin C, multivitamins) had 18% reduced mortality risk (HR = 0.82, 95% CI: 0.65-1.02) and 22% reduced recurrence risk (HR = 0.78, 95% CI: 0.63-0.95). The inverse association was found regardless of whether vitamin use was concurrent or nonconcurrent with chemotherapy, but was present only among patients who did not receive radiotherapy.

**CONCLUSIONS:** Vitamin supplement use in the first 6 months after breast cancer diagnosis may be associated with reduced risk of mortality and recurrence.

**IMPACT:** Our results do not support the current recommendation that breast cancer patients should avoid use of vitamin supplements.

## **Uso di integratori vitaminici durante il trattamento del cancro al seno e sopravvivenza: uno studio prospettico di coorte.**

**BACKGROUND:** Gli antiossidanti possono proteggere le cellule sane dal danno ossidativo che si verifica durante la radioterapia e la chemioterapia certo, tuttavia, lo stesso meccanismo potrebbe proteggere le cellule tumorali e ridurre potenzialmente l'efficacia delle terapie antitumorali. Abbiamo valutato l'associazione tra uso di vitamina supplemento nei primi 6 mesi dopo la diagnosi del cancro al seno e durante il trattamento del cancro con la mortalità totale e le recidive. **METODI:** Abbiamo condotto uno studio basato sulla popolazione coorte di 4.877 donne tra i 20 ed i 75 anni con diagnosi di carcinoma mammario invasivo a Shanghai, in Cina, tra il marzo 2002 e aprile 2006. Le donne sono state intervistate circa 6 mesi dopo la diagnosi e seguiti da interviste in persona e record linkage con il Registro di stato civile. **RISULTATI:** Durante un follow-up medio di 4,1 anni, 444 morti e 532 recidive si è verificato. L'uso della vitamina subito dopo la diagnosi del cancro al seno era associata ad una riduzione della mortalità e rischio di ricorrenza, aggiustato per fattori di stile di vita più, sociodemographics e clinica nota fattori prognostici. Donne che hanno utilizzato sostanze antiossidanti (vitamina E, vitamina C, multivitaminici) avevano il 18% del rischio di mortalità ridotto (HR = 0,82, 95% CI: 0,65-1,02) e il 22% di riduzione del rischio di ricorrenza (HR = 0,78, 95% CI: 0,63-0,95 ). L'associazione inversa è stata trovata a prescindere dal fatto uso di vitamine è stata concomitante o nonconcurrent con la chemioterapia, ma era presente solo tra i pazienti che non avevano ricevuto radioterapia.

CONCLUSIONI: supplemento uso della vitamina nei primi 6 mesi dopo la diagnosi del cancro al seno può essere associata a ridotto rischio di mortalità e le recidive.  
IMPATTO: I nostri risultati non supportano la raccomandazione corrente che i pazienti con cancro al seno dovrebbero evitare l'uso di integratori vitaminici.

## **Cyclophosphamide and ascorbic acid-mediated ultrastructural and biochemical changes in Dalton's lymphoma cells in vivo.**

Eur J Pharmacol. 2010 Oct 25;645(1-3):47-54. Epub 2010 Jul 21.

Cell and Tumor Biology Laboratory, Department of Zoology, North-Eastern Hill University, Shillong-793022, India. sbpnehu@hotmail.com

Cyclophosphamide, an antineoplastic drug effective against a wide variety of cancers is cytotoxic to normal cells also. Ascorbic acid (vitamin C) at higher concentrations possesses cytotoxic effects and it can also enhance the cytotoxicity of 5-fluorouracil in a dose-dependent manner in mouse lymphoma. In the present study, effect of cyclophosphamide treatment alone and in combination with ascorbic acid in vivo on the ultrastructure and some biochemical changes in Dalton's lymphoma tumor cells were investigated. Cyclophosphamide treatment causes disappearance of cell membrane processes, thickening and reduction in the number of mitochondrial cristae as well as the manifestation of rounded shape of mitochondria. The combination treatment with ascorbic acid plus cyclophosphamide caused further changes in tumor cells showing disintegration in the cell surface membrane, disruption in the nuclear membrane and roundish mitochondria with reduction and disruption in the mitochondrial cristae. The observed ascorbic acid plus cyclophosphamide-mediated decrease in reduced glutathione (GSH) in tumor cells may play an important role in the antitumor activity of cyclophosphamide by weakening cellular antioxidant-mediated defense mechanism, thereby increasing tumor cell's susceptibility to cell death. The cyclophosphamide-mediated decrease in lactate dehydrogenase activity in tumor cells and simultaneous increase in ascites supernatant may possibly indicate alteration in the membrane permeability of tumor cells for lactate dehydrogenase as well as tumor cell injury. Further investigation should determine detailed mechanism(s) involved in cyclophosphamide-induced ultrastructural and biochemical changes in tumor cells.

## **Ciclofosfamide e acido ascorbico cambiamenti mediati ultrastrutturali e biochimici nelle cellule di linfoma di Dalton in vivo.**

Ciclofosfamide, un farmaco antineoplastico efficace contro una grande varietà di tumori è citotossica per le cellule normali anche. L'acido ascorbico (vitamina C) a concentrazioni più elevate possiede effetti citotossici e può anche aumentare la citotossicità del 5-fluorouracile in modo dose-dipendente di linfoma di topo. Nel presente studio, l'effetto del trattamento con ciclofosfamide solo e in combinazione con l'acido ascorbico in vivo sulla ultrastruttura e alcuni cambiamenti biochimici nelle cellule di linfoma di Dalton tumore sono stati studiati. Trattamento Ciclofosfamide cause scomparsa dei processi di membrana cellulare, l'ispessimento e la riduzione del numero di creste mitocondriali così come la manifestazione di forma arrotondata dei mitocondri. Il trattamento di combinazione con l'acido ascorbico e ciclofosfamide provocato ulteriori cambiamenti nelle cellule tumorali che mostra la disintegrazione della membrana superficie cellulare, rottura della membrana nucleare e mitocondri rotondeggianti con riduzione e interruzione della cresta mitocondriale. L'acido ascorbico, più osservata diminuzione ciclofosfamide-mediata in glutatione ridotto (GSH) in cellule tumorali possono svolgere un ruolo importante per l'attività antitumorale di ciclofosfamide, indebolendo cellulare meccanismo di difesa antiossidante-mediato, aumentando così la sensibilità della cellula tumorale di morte cellulare. La diminuzione ciclofosfamide-mediata in attività lattato deidrogenasi nelle cellule tumorali e contemporaneo aumento del supernatante ascite può eventualmente indicare un'alterazione della permeabilità della membrana delle cellule tumorali di lattato deidrogenasi così come lesioni delle cellule tumorali. Ulteriori indagini dovrebbero determinare meccanismo dettagliato (s) che operano nel ciclofosfamide indotte alterazioni ultrastrutturali e biochimici nelle cellule tumorali.

Hsieh BS, Huang LW, Su SJ, Cheng HL, Hu YC, Hung TC, Chang KL.

**Combined arginine and ascorbic acid treatment induces apoptosis in the hepatoma cell line HA22T/VGH and changes in redox status involving the pentose phosphate pathway and reactive oxygen and nitrogen species.**

J Nutr Biochem. 2011 Mar;22(3):234-41. Epub 2010 Jun 16.

Graduate Institute of Medicine, College of Medicine, Kaohsiung Medical University, Kaohsiung 80708, Taiwan.

Arginine is a physiological substrate for nitric oxide synthase to generate nitric oxide (NO), which can influence tumor cell survival, while ascorbic acid is selectively toxic for cancer cells. This study explored the effect of an arginine/ascorbic acid combination on human cancer cell lines. The hepatoma cell line HA22T/VGH was the most sensitive of the tested cells to combination treatment. A combination of 5.74 mM of arginine and 0.57 mM of ascorbic acid induced HA22T/VGH cell death through apoptosis and an increase in levels of reactive oxygen species and NO, as well as its stable products NO(2)(-) and NO(3)(-). The combination also reduced the activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase, 6-phosphogluconate dehydrogenase, and transaldolase in the pentose phosphate pathway, a major mechanism for producing NADPH, resulting in a marked decrease in intracellular NADPH levels. A dramatic decrease in intracellular glutathione (GSH) levels, a decrease in the mitochondrial membrane potential, ATP depletion and release of cytochrome c were also seen. Caspase-9 and caspase-3 were activated, apoptotic protein Bax expression increased and the expression of the anti-apoptotic proteins Bcl-2 and Bcl-xL decreased. These results suggest that this combination induced HA22T/VGH cell death by interfering with redox state regulation by a reduction in pentose phosphate pathway activity and increasing oxidative and nitrosative stress.

**Il trattamento combinato di acido ascorbico e arginina induce l'apoptosi nelle linee cellulari di epatoma HA22T/VGH e induce variazioni dello stato redox che coinvolgono la via dei pentosi fosfato e le specie reattive di ossigeno e azoto.**

L'arginina è un substrato fisiologico per la sintesi dell'ossido nitrico per produrre ossido nitrico (NO), che possono influenzare la sopravvivenza delle cellule tumorali, mentre l'acido ascorbico è selettivamente tossico per le cellule tumorali. Questo studio ha esaminato l'effetto di una combinazione acido ascorbico su linee di cellule umane di cancro. La linea cellulare di epatoma HA22T/VGH è stata la più sensibile delle cellule testate per il trattamento di combinazione. Una combinazione di 5,74 mM di arginina e 0,57 mM di acido ascorbico ha indotto la morte delle cellule HA22T/VGH attraverso l'apoptosi e un aumento dei livelli di specie reattive dell'ossigeno e NO, così come i suoi prodotti stabili NO (2) (-) e NO (3) (-). L'associazione ha inoltre ridotto l'attività della glucosio-6-fosfato deidrogenasi, 6-fosfogluconato e transaldolase nella via dei pentosi fosfato, un importante meccanismo per la produzione di NADPH, causando una marcata riduzione dei livelli intracellulari di NADPH. Una diminuzione drastica del glutathione intracellulare (GSH) i livelli, una diminuzione del potenziale della membrana mitocondriale, deplezione di ATP e il rilascio di citocromo c sono state anche osservate. Caspasi-9 e della caspasi-3 sono stati attivati, l'espressione della proteina apoptotica Bax aumentato e l'espressione delle proteine anti-apoptotica Bcl-2 e Bcl-xL diminuito. Questi risultati suggeriscono che questa combinazione di morte cellulare indotto HA22T/VGH interferendo con la regolazione di stato redox da una riduzione dell'attività percorso pentoso fosfato e di aumentare lo stress ossidativo e nitrosativo.

## **Selective ascorbate toxicity in malignant mesothelioma: a redox Trojan mechanism.**

Am J Respir Cell Mol Biol. 2011 Jan;44(1):108-17. Epub 2010 Mar 4.

Department of Environment and Life Sciences, DiSAV, University of Piemonte Orientale Amedeo Avogadro, Viale T. Michel 11, Alessandria, Italy. ranzato@mfn.unipmn.it

We studied the mechanism of ascorbate toxicity in malignant mesothelioma (MMe) cells. Neutral red uptake showed that ascorbate, but not dehydroascorbate, was highly toxic in the MMe cell lines REN and MM98, and less toxic in immortalized (human mesothelial cells-hTert) and primary mesothelial cells. Ascorbate transport inhibitors phloretin, sodium azide, and ouabain did not reduce ascorbate toxicity. Ascorbate promoted the formation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the cell medium, and its toxicity was suppressed by extracellular catalase, but the concentration of endogenous catalase was higher in MMe cells than in normal cells. The confocal imaging of cells loaded with the dihydrhodamine 123 reactive oxygen species probe showed that ascorbate caused a strong increase of rhodamine fluorescence in MMe cells, but not in mesothelial cells. MMe cells showed a higher production of superoxide and NADPH oxidase (NOX)4 expression than did mesothelial cells. Two inhibitors of cellular superoxide sources (apocynin and rotenone) reduced ascorbate toxicity and the ascorbate-induced rise in rhodamine fluorescence. NOX4 small interfering RNA also reduced ascorbate toxicity in REN cells. Taken together, the data indicate that ascorbate-induced extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production induces a strong oxidative stress in MMe cells because of their high rate of superoxide production. This explains the selective toxicity of ascorbate in MMe cells, and suggests its possible use in the clinical treatment of malignant mesothelioma.

### **Tossicità selettiva dell'ascorbato nel mesotelioma maligno: un meccanismo redox simile al cavallo di Troia.**

Abbiamo studiato il meccanismo di tossicità ascorbato nel mesotelioma maligno (MME) cellule. Captazione Rosso neutro ha dimostrato che l'ascorbato, ma non deidroascorbato, era altamente tossici in linee cellulari MMe REN e MM98, e meno tossici in immortalato (umane cellule mesoteliali-hTERT) e primario cellule mesoteliali. Trasporto Ascorbato inibitori Phloretin, sodio azide e ouabaina non ridurre la tossicità ascorbato. L'ascorbato promosso la formazione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nel mezzo delle cellule, e la sua tossicità è stato soppresso da catalasi extracellulare, ma la concentrazione di catalasi endogena è stata maggiore nelle cellule MMe rispetto alle cellule normali. L'imaging confocale di cellule caricate con la sonda di 123 specie reattive dell'ossigeno dihydrhodamine ha dimostrato che l'ascorbato ha causato un forte aumento della fluorescenza rodamina in cellule MME, ma non nelle cellule mesoteliali. MMe cellule hanno mostrato una maggiore produzione di superossido e della NADPH ossidasi (NOX) 4 espressione che ha fatto cellule mesoteliali. Due inibitori delle fonti superossido cellulari (apocinina e rotenone) tossicità ridotta ascorbato e ascorbato-aumento della fluorescenza indotta rodamina. NOX4 piccoli RNA interferenti anche ridotta tossicità nelle cellule ascorbato REN. Nel loro insieme, i dati indicano che l'ascorbato indotta extracellulare H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produzione induce una forte stress ossidativo nelle cellule MMe a causa del loro alto tasso di produzione di superossido. Questo spiega la tossicità selettiva di acido ascorbico nelle cellule MME, e suggerisce il suo possibile uso nel trattamento clinico del mesotelioma maligno.

## **VITAMINA D3**

3: Lambert JR, Eddy VJ, Young CD, Persons KS, Sarkar S, Kelly JA, Genova E, Lucia MS, Faller DV, Ray R.

**A Vitamin D Receptor-Alkylating Derivative of 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> Inhibits Growth of Human Kidney Cancer Cells and Suppresses Tumor Growth.**

Cancer Prev Res (Phila). 2010 Dec;3(12):1596-607. PubMed PMID: 21149334.

1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> [1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>] has shown strong promise as an antiproliferative agent in several malignancies, yet its therapeutic use has been limited by its toxicity leading to search for analogues with antitumor property and low toxicity. In this study, we evaluated the in vitro and in vivo properties of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-3-bromoacetate [1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-3-BE], an alkylating derivative of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, as a potential therapeutic agent for renal cancer. Dose response of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-3-BE in 2 kidney cancer cell lines was evaluated for its antiproliferative and apoptotic properties, and mechanisms were evaluated by Western blot and FACS analyses. Therapeutic potential of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-3-BE was assessed both by determining its stability in human serum and by evaluating its efficacy in a mouse xenograft model of human renal tumor. We observed that 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-3-BE is significantly more potent than an equivalent concentration of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> in inhibiting growth of A498 and Caki 1 human kidney cancer cells. 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-3-BE-mediated growth inhibition was promoted through inhibition of cell-cycle progression by downregulating cyclin A and induction of apoptosis by stimulating caspase activity. Moreover, 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-3-BE strongly inhibited Akt phosphorylation and phosphorylation of its downstream target, caspase-9. 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-3-BE seemed to be stable in human serum. In xenograft mouse model of human renal tumor, 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-3-BE was more potent at reducing tumor size than 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, which was accompanied by an increase in apoptosis and reduction of cyclin A staining in the tumors. These results suggest a translational potential of this compound as a therapeutic agent in renal cell carcinoma. Data from this study and extensive studies of vitamin D for the prevention of many malignancies support the potential of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-3-BE for preventing renal cancer and the development of relevant in vivo prevention models for assessing this potential, which do not exist at present.

**Un recettore della vitamina D alchilante derivato da 1 $\alpha$ ,25-Diidrossivitamina D<sub>3</sub> inibisce la crescita delle cellule renali cancerose e sopprime la crescita tumorale.**

1,25-diidrossivitamina D<sub>3</sub> [1,25 (OH) D<sub>2</sub> 3] ha indicato la promessa forte come agente antiproliferativo nei tumori diversi, ma il suo uso terapeutico è stato limitato dalla sua tossicità leader per la ricerca di analoghi con proprietà antitumorale e bassa tossicità. In questo studio, abbiamo valutato in vitro e in vivo le proprietà di 1,25-diidrossivitamina D<sub>3</sub>-3-bromoacetate [1,25 (OH) D<sub>2</sub> 3-3-BE], un derivato alchilante di 1,25 (OH) D<sub>2</sub> 3, come un potenziale agente terapeutico per il tumore renale. Risposta alla dose di 1,25 (OH) D<sub>2</sub> 3-3-BE in 2 linee di cellule del carcinoma renale è stato valutato per le sue proprietà antiproliferativa e apoptotica, ei meccanismi sono stati valutati da Western Blot e analisi FACS. Potenziale terapeutico di 1,25 (OH) D<sub>2</sub> 3-3-BE è stata valutata sia da determinare la sua stabilità nel siero umano e valutando la sua efficacia in un modello murino xenotrapianto di tumori umani renale. Abbiamo osservato che la 1,25 (OH) D<sub>2</sub> 3-3-

BE è significativamente più potente di una concentrazione equivalente di 1,25 (OH) D<sub>2</sub> a inibire la crescita di A498 e 1 Caki cellule umane di cancro del rene. 1,25 (OH) D<sub>2</sub> inibizione della crescita 3-3-BE-mediata è stata promossa attraverso l'inibizione della progressione del ciclo cellulare da downregulating ciclina A e induzione di apoptosi stimolando l'attività delle caspasi. Inoltre, 1,25 (OH) D<sub>2</sub> 3-3-BE fortemente inibita fosforilazione di Akt e la fosforilazione della sua destinazione a valle, caspasi-9. 1,25 (OH) D<sub>2</sub> 3-3-BE sembrava essere stabile nel siero umano. Nel modello murino xenotrapianto di tumori umani renale, 1,25 (OH) D<sub>2</sub> 3-3-BE è più potente a ridurre le dimensioni del tumore di 1,25 (OH) D<sub>2</sub>, che è stata accompagnata da un aumento in apoptosi e la riduzione della ciclina A colorazione nei tumori. Questi risultati suggeriscono un potenziale traslazione di questo composto come agente terapeutico nel carcinoma renale. I dati di questo studio e di studi approfonditi di vitamina D per la prevenzione di neoplasie molti sostenere il potenziale di 1,25 (OH) D<sub>2</sub> 3-3-BE per prevenire il cancro renale e lo sviluppo dei relativi modelli di prevenzione in vivo per valutare questo potenziale, che non esistono attualmente.

7: So JY, Lee HJ, Smolarek AK, Paul S, Wang CX, Maehr H, Uskokovic M, Zheng X, Conney AH, Cai L, Liu F, Suh N.

**A novel Gemini vitamin D analog represses the expression of a stem cell marker CD44 in breast cancer.**

Mol Pharmacol. 2010 Nov29. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 21115634.

CD44 is a multi-functional transmembrane protein involved in cell proliferation, angiogenesis, invasion and metastasis. CD44 is identified as a cancer stem cell marker, and the CD44 positive breast cancer cells are enriched in residual breast cancer cell populations after conventional therapies, suggesting that CD44 may be an important target for cancer prevention and therapy. Therefore, we investigated for the inhibitory effect of a novel Gemini vitamin D analog, BXL0124 [1 $\alpha$ ,25-dihydroxy-20R-21(3-hydroxy-3-deuteromethyl-4,4,4-trideuterobutyl)-23-yne-26,27-hexafluoro-cholecalciferol], on mammary tumor growth and CD44 expression in MCF10DCIS.com human breast cancer in vitro and in vivo. MCF10DCIS.com cells were injected into mammary fat pads in immunodeficient mice, BXL0124 was then administered intraperitoneally (0.1  $\mu$ g/kg body weight) or orally (0.03 or 0.1  $\mu$ g/kg body weight) six days a week for 5 weeks. At necropsy, mammary tumors and blood were collected for evaluating tumor growth, CD44 expression and serum calcium level. BXL0124 suppressed mammary tumor growth and markedly decreased the expression of CD44 protein in MCF10DCIS xenograft tumors without causing hypercalcemic toxicity. BXL0124 also inhibited the expression of CD44 protein and mRNA as well as the transcriptional activity of the CD44 promoter in cultured MCF10DCIS.com cells. The repression of CD44 expression induced by BXL0124 was blocked by siRNA VDR, indicating that the regulation of CD44 expression by BXL0124 is a VDR-dependent event. The novel Gemini vitamin D analog, BXL0124, represses CD44 expression in MCF10DCIS.com cells in vitro and in xenograft tumors, suggesting an inhibitory role of a Gemini vitamin D derivative on breast cancer stem cells.

**Un nuovo analogo della vitamina D reprime l'espressione di un marker delle cellule staminali CD44 nel cancro al seno**

CD44 è una proteina transmembrana multi-funzionali coinvolte nella proliferazione cellulare, angiogenesi, invasione e metastasi. CD44 è identificato come un marker delle cellule staminali del cancro, e il CD44 positivo cellule del cancro al seno sono arricchiti in popolazioni residue cellule di cancro al seno dopo terapie convenzionali, suggerendo che il CD44 può essere un obiettivo importante per la prevenzione e terapia dei tumori. Quindi, abbiamo studiato l'effetto inibitorio di un romanzo Gemini analogico vitamina D, BXL0124 [1 $\alpha$ ,25-diidrossi-20R-21 (3-idrossi-3-deuteromethyl-4,4,4-trideuterobutyl)-23-ino-26 ],27-hexafluoro-colecalciferolo, sulla crescita del tumore mammario e CD44 espressione nel carcinoma della mammella MCF10DCIS.com umana in vitro e in vivo. MCF10DCIS.com cellule sono state iniettate in cuscinetti di grasso mammario in topi immunodeficienti, BXL0124 è stato poi somministrato per via intraperitoneale (0,1 mcg / kg di peso corporeo) o per via orale (0,03 o 0,1 mg / kg di peso corporeo), sei giorni a settimana per 5 settimane. Alla necropsia, tumori mammari e di sangue sono stati raccolti per valutare la crescita del tumore, l'espressione CD44 e livelli sierici di calcio. BXL0124 sopprime la crescita del tumore mammario e marcatamente ridotta espressione di CD44 proteina in MCF10DCIS tumori trapiantati

senza causare tossicità ipercalcemia. BXL0124 anche inibito l'espressione della proteina CD44 e mRNA, nonché l'attività trascrizionale del promotore in colture di cellule CD44 MCF10DCIS.com. La repressione di CD44 espressione indotta da BXL0124 stato bloccato dai siRNA VDR, che indica che la regolazione dell'espressione di CD44 da BXL0124 è un evento VDR-dipendente. Il romanzo Gemini analogico vitamina D, BXL0124, reprime l'espressione in cellule CD44 MCF10DCIS.com in vitro e in tumori trapiantati, suggerendo un ruolo inibitorio di una vitamina D Gemini derivato sul cancro al seno cellule staminali.

8: Vashi PG, Trukova K, Lammersfeld CA, Braun DP, Gupta D.

**Impact of oral vitamin D supplementation on serum 25-hydroxyvitamin D levels in oncology.** Nutr J. 2010Nov 23;9:60. PubMed PMID: 21092237; PubMed Central PMCID: PMC3000371.

**BACKGROUND:** Serum 25-hydroxyvitamin D [25(OH)D] is the major circulating form of vitamin D and a standard indicator of vitamin D status. Emerging evidence in the literature suggests a high prevalence of suboptimal vitamin D (as defined by serum 25(OH)D levels of <32 ng/ml) as well as an association between lower serum levels and higher mortality in cancer. We investigated the effect of oral vitamin D supplementation as a means for restoring suboptimal levels to optimal levels in cancer.

**METHODS:** This is a retrospective observational study of 2198 cancer patients who had a baseline test prior to initiation of cancer therapy at our hospital to evaluate serum 25(OH)D levels between Jan 08 and Dec 09 as part of their initial nutritional evaluation. Patients with baseline levels of  $\leq$  32 ng/ml (n = 1651) were considered to have suboptimal serum 25(OH)D levels and were supplemented with 8000 IU of Vitamin D3 (four 2000 IU D3 capsules) daily as part of their nutritional care plan. The patients were retested at their first follow-up visit. Of 1651 patients, 799 were available for follow up assessment. The mean serum 25(OH)D levels were compared in these 799 patients across the 2 time points (baseline and first follow-up) using paired sample t-test. We also investigated the factors associated with response to vitamin D supplementation.

**RESULTS:** Of 2198 patients, 814 were males and 1384 females. 1051 were newly diagnosed and treated at our hospital while 1147 were diagnosed and treated elsewhere. The mean age at presentation was 55.4 years. The most common cancer types were breast (500, 22.7%), lung (328, 14.9%), pancreas (214, 9.7%), colorectal (204, 9.3%) and prostate (185, 8.4%). The mean time duration between baseline and first follow-up assessment was 14.7 weeks (median 10.9 weeks and range 4 weeks to 97.1 weeks). The mean serum 25(OH)D levels were 19.1 ng/ml (SD = 7.5) and 36.2 ng/ml (SD = 17.1) at baseline and first follow-up respectively;  $p < 0.001$ . Patients with prostate and lung cancer had the highest percentage of responders (70% and 69.2% respectively) while those with colorectal and pancreas had the lowest (46.7% each). Similarly, patients with serum levels 20-32 ng/ml at baseline were most likely to attain levels  $> 32$  ng/ml compared to patients with baseline levels  $< 20$  ng/ml.

**CONCLUSIONS:** The response to supplementation from suboptimal to optimal levels was greatest in patients with prostate and lung cancer as well as those with baseline levels between 20-32 ng/ml. Characteristics of non-responders as well as those who take longer to respond to supplementation need to be further studied and defined. Additionally, the impact of improved serum 25(OH)D levels on patient survival and quality of life needs to be investigated.

**Impatto dell'assunzione di vitamina D sui livelli sierici di 25-hydroxyvitamin D levels in oncologia.**

**BACKGROUND:** il siero di 25-idrossivitamina D [25 (OH) D] è la principale forma circolante di vitamina D e di un indicatore di livello di vitamina D. Evidenze crescenti in letteratura suggerisce

una elevata prevalenza di vitamina D non ottimali (come definito dal siero 25 (OH) livelli di D <32 ng / ml) così come una associazione tra livelli sierici più bassi e una più alta mortalità nel cancro. Abbiamo studiato l'effetto della supplementazione orale di vitamina D come un mezzo per ripristinare livelli subottimali a livelli ottimali in cancro.

**METODI:** Si tratta di uno studio osservazionale retrospettivo di 2198 malati di cancro che ha avuto un test di base prima di iniziare la terapia del cancro al nostro ospedale per valutare siero 25 (OH) livelli di D tra 8 gennaio e 9 dicembre come parte della loro prima valutazione nutrizionale. I pazienti con livelli basali di  $\leq 32$  ng / ml (n = 1651) erano stati considerati non ottimale siero 25 (OH) livelli di D e sono stati completati con 8000 UI di vitamina D3 (quattro capsule 2.000 UI D3) tutti i giorni come parte della loro nutrizionale piano di assistenza. I pazienti sono stati rianalizzati alla loro prima visita di follow-up. Di 1651 pazienti, 799 erano disponibili per il follow up di valutazione. La media del siero 25 (OH) livelli di D sono stati confrontati in questi 799 pazienti in tutto il tempo di 2 punti (valore base e il primo follow-up), utilizzando campioni appaiati t-test. Abbiamo anche studiato i fattori associati alla risposta alla vitamina D.

**RISULTATI:** Dei 2198 pazienti, 814 erano maschi e 1384 femmine. 1.051 sono state recentemente diagnosticati e trattati presso il nostro ospedale, mentre 1.147 sono stati diagnosticati e trattati altrove. L'età media alla presentazione era 55,4 anni. I tipi di cancro più comuni sono stati mammella (500, 22,7%), polmone (328, 14,9%), pancreas (214, 9,7%), colon-retto (204, 9,3%) e della prostata (185, 8,4%). La durata del tempo medio tra il basale e la prima valutazione di follow-up è stata del 14,7 settimane (mediana di 10,9 settimane e la gamma 4 settimane a 97,1 settimane). La media del siero 25 (OH) livelli di D sono stati 19,1 ng / ml (DS = 7,5) e 36,2 ng / ml (SD = 17.1) al basale e il primo follow-up, rispettivamente,  $p < 0,001$ . I pazienti con cancro alla prostata e ai polmoni era la più alta percentuale di responder (70% e 69,2% rispettivamente), mentre quelli con colon-retto e del pancreas avevano la più bassa (46,7% ciascuno). Allo stesso modo, i pazienti con livelli sierici di 20-32 ng / ml al basale erano più probabili di raggiungere i livelli > 32 ng / ml rispetto ai pazienti con livelli basali <20 ng / ml.

**CONCLUSIONI:** La risposta alla supplementazione da non ottimale a livelli ottimali era maggiore nei pazienti con cancro della prostata e del polmone così come quelli con livelli basali tra 20-32 ng / ml. Caratteristiche di non-responders così come quelli che impiegano più tempo per rispondere alla supplementazione devono essere ulteriormente studiati e definiti. Inoltre, l'impatto del siero migliorato di 25 (OH) livelli di D sulla sopravvivenza dei pazienti e la qualità della vita ha bisogno di essere indagato.

9: Proietti S, Cucina A, D'Anselmi F, Dinicola S, Pasqualato A, Lisi E, Bizzarri M.

**Melatonin and vitamin D(3) synergistically down-regulate Akt and MDM2 leading to TGF $\beta$ -1-dependent growth inhibition of breast cancer cells.**

J Pineal Res. 2010 Nov 22.

Melatonin and vitamin D3 inhibit breast cancer cell growth and induce apoptosis, but they have never been combined as a breast cancer treatment. Therefore, we investigated whether their association could lead to an enhanced anticancer activity. In MCF-7 breast cancer cells, melatonin together with vitamin D3, induced a synergistic proliferative inhibition, with an almost complete cell hr. Cell growth blockade is associated to an activation of growth arrest at 144 the TGF $\beta$ -1 pathway, leading to increased TGF $\beta$ -1, Smad4 and phosphorylated-Smad3 levels. Concomitantly, melatonin and D3, alone or in combination, caused a significant reduction in Akt phosphorylation and MDM2 values, with a consequent increase of p53/MDM2 ratio. These effects were completely suppressed by adding a monoclonal anti-TGF $\beta$ -1 antibody to the culture medium. Taken together, these results indicate that cytostatic effects triggered by melatonin and D3 are likely related to a complex TGF $\beta$ -1-dependent mechanism, involving down-regulation of both MDM2 and Akt-phosphorylation.

**Melatonina e vitamina D(3) regolano negativamente Akt e MDM2 portando alla inibizione della crescita di TGF $\beta$ -1 nelle cellule cancerose mammarie**

Melatonina e vitamina D3 inibisce la crescita del cancro al seno e di indurre l'apoptosi delle cellule, ma non sono mai stati combinati in un trattamento del cancro al seno. Pertanto, abbiamo valutato se la loro associazione potrebbe portare ad una maggiore attività antitumorale. Nelle cellule del seno MCF-7 il cancro, la melatonina insieme alla vitamina D3, ha indotto una inibizione sinergica proliferativa, con un hr cella quasi completo. Blocco della crescita delle cellule è associata ad una attivazione di arresto della crescita a 144 il percorso TGF $\beta$ -1, portando ad un aumento TGF $\beta$ -1, Smad4 e dei livelli di fosforilazione-Smad3. Contemporaneamente, la melatonina e D3, da soli o in combinazione, ha causato una significativa riduzione della fosforilazione di Akt e di valori MDM2, con un conseguente aumento di p53/MDM2 rapporto. Questi effetti sono stati completamente soppressi con l'aggiunta di un anticorpo monoclonale anti-TGF $\beta$ -1 anticorpo al mezzo di coltura. Presi insieme, questi risultati indicano che gli effetti citostatici innescato da melatonina e D3 sono probabilmente correlato ad un meccanismo complesso TGF $\beta$ -1-dipendente, che coinvolge una down-regulation sia MDM2 e Akt-fosforilazione.

10: Ahearn TU, McCullough ML, Flanders WD, Long Q, Sidelnikov E, Fedirko V, Daniel CR, Rutherford RE, Shaukat A, Bostick RM.

**A randomized clinical trial of the effects of supplemental calcium and vitamin D3 on markers of their metabolism in normal mucosa of colorectal adenoma patients.**

Cancer Res. 2010 Nov 17. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 21084270.

In cancer cell lines and rodent models, calcium and vitamin D favorably modulate cell proliferation, differentiation, and apoptosis in colonic epithelia. These effects may be modulated by local expression of the calcium receptor (CaR), the vitamin D receptor (VDR), and the P450 cytochromes, CYP27B1 and CYP24A1; however, they have yet to be investigated in humans. To address this gap, we conducted a randomized, double-blinded, placebo-controlled 2×2 factorial clinical trial. Patients with at least one pathology-confirmed colorectal adenoma were treated with 2 g/d elemental calcium and/or 800 IU/d vitamin D3 versus placebo over 6 months (n=92; 23 per group). CaR, VDR, CYP27B1, and CYP24A1 expression and distribution in biopsies of normal appearing rectal mucosa were detected by standardized, automated immunohistochemistry and quantified by image analysis. In the calcium-supplemented group, CaR expression increased 27% (P=0.03) and CYP24A1 expression decreased 21% (P=0.79). In the vitamin D3-supplemented group, CaR expression increased 39% (P=0.01) and CYP27B1 expression increased 159% (P=0.06). In patients supplemented with both calcium and vitamin D3, VDR expression increased 19% (P=0.13) and CaR expression increased 24% (P=0.05). These results provide mechanistic support for further investigation of calcium and vitamin D3 as chemopreventive agents against colorectal neoplasms, and CaR, VDR, CYP27B1, and CYP24A1 as modifiable, preneoplastic risk biomarkers for colorectal neoplasms.

**Uno studio clinico randomizzato degli effetti dell'assunzione supplementare di calcio e vitamina D3 sui marker del metabolismo nella mucosa normale dei pazienti con adenoma colon rettale**

In linee cellulari tumorali e modelli di roditori, calcio e vitamina D favorevolmente modulano la proliferazione cellulare, la differenziazione e l'apoptosi in epitelii colon. Questi effetti possono essere modulati per l'espressione locale del recettore del calcio (CaR), il recettore della vitamina D (VDR), e la citocromi P450, CYP27B1 e CYP24A1, tuttavia, devono ancora essere studiati sugli esseri umani. Per colmare questa lacuna, abbiamo condotto uno studio randomizzato, in doppio cieco, controllato verso placebo 2 × 2 fattoriale trial clinici. I pazienti con almeno una patologia ha confermato adenoma del colon-retto sono stati trattati con 2 g / die di calcio elementare e / o 800 UI / die di vitamina D3 placebo nell'arco di 6 mesi (n = 92; 23 per gruppo). CaR, VDR, CYP27B1 e CYP24A1 espressione e la distribuzione nelle biopsie di mucosa normale appare rettale sono stati rilevati da standardizzati, immunostochimica automatizzata e quantificato mediante analisi dell'immagine. Nel gruppo calcio-integrata, espressione CaR è aumentato del 27% (P = 0,03) e CYP24A1 espressione è diminuita del 21% (P = 0,79). Nel gruppo della vitamina D3-integrata, espressione CaR è aumentato del 39% (P = 0,01) e CYP27B1 espressione aumentata del 159% (P = 0,06). Nei pazienti integrato sia con calcio e vitamina D3, espressione di VDR sono aumentati del 19% (P = 0,13) e di espressione CaR aumentate del 24% (P = 0,05). Questi risultati forniscono il

supporto meccanico per ulteriori indagini di calcio e vitamina D3 come agenti chemiopreventivi contro le neoplasie del colon-retto, e auto, VDR, CYP27B1, e CYP24A1 come modificabili, biomarcatori di rischio preneoplastiche per le neoplasie del colon-retto.

11: Gröber U.

**[Vitamin D--an old vitamin in a new perspective].**

Med MonatsschrPharm. 2010 Oct;33(10):376-83.

Vitamin D, is a secosteroid which, in its active form 1,25-(OH)<sub>2</sub>-Vitamin D<sub>3</sub>, has hormone activities. Most cells and tissues in the human body have vitamin D receptors that stimulate the nuclear transcription of various genes to alter cellular function. Vitamin D, appears to have an effect on numerous disease states and disorders, including osteoporosis, chronic musculoskeletal pain, diabetes (types 1 and 2), multiple sclerosis, cardiovascular disease, and cancers of the breast, prostate, and colon. According to many researchers there is currently a worldwide vitamin D deficiency in various populations, including infants, pregnant and lactating women, and the elderly. The prevalence of vitamin D, insufficiency in the general German population is high. Vitamin D in the food supply is limited and most often inadequate to prevent deficiencies. Supplemental vitamin D is likely necessary to avoid deficiency, especially in winter months. The estimated cost saving effect of improving vitamin D status in Germany might be up to 37.5 billion euros annually.

**[Vitamina D—una vecchia vitamina in una nuova prospettiva].**

La vitamina D, è un secosteroid che, nella sua forma attiva 1,25 - (OH) 2-vitamina D<sub>3</sub>, ha attività ormonale. La maggior parte delle cellule e dei tessuti del corpo umano hanno i recettori della vitamina D che stimolano la trascrizione di vari geni nucleari di alterare la funzione cellulare. La vitamina D, sembra avere un effetto su stati di malattia e di numerosi disturbi, tra cui l'osteoporosi, dolore cronico, il diabete (tipo 1 e 2), sclerosi multipla, malattie cardiovascolari e tumori della prostata seno, e del colon. Secondo molti studiosi vi è attualmente una carenza di vitamina D a livello mondiale in diverse popolazioni, tra cui bambini, donne in gravidanza e in allattamento, e gli anziani. La prevalenza di vitamina D, insufficienza nella popolazione generale tedesco è alta. La vitamina D nella catena alimentare è limitato e spesso insufficiente per prevenire carenze. Gli integratori di vitamina D è probabilmente necessaria per evitare carenze, soprattutto nei mesi invernali. Il costo stimato risparmio effetto di migliorare lo stato della vitamina D in Germania potrebbe essere fino a 37,5 miliardi di euro annui.

12: Edlich RF, Mason SS, Reddig JS, Gubler K, Long Iii WB.

**Revolutionary advances in the diagnosis of vitamin D deficiency.**

J Environ Pathol Toxicol Oncol.2010;29(2):85-9. PubMed PMID: 20932243.

Vitamin D deficiency has been associated with bone diseases, cardiovascular diseases, cancer, and multiple sclerosis. Recent clinical studies have pointed out that these diseases could be prevented by either adequate sun exposure or oral vitamin D3 supplementation. In an effort to prevent these illnesses, emergency physicians and other clinicians must be aware of technological advances in the measurement of serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D. Realizing the importance of diagnosing vitamin D deficiency, we reviewed the following advanced diagnostic techniques: liquid chromatography tandem mass spectrometry, radioimmunoassay, and DiaSorin's immunochemiluminometric automated analyzer LIASION®. On the basis of this review, we have found that each of these diagnostic tests has documented limitations, and therefore we recommend an international standardization of these assays to accurately diagnose vitamin D deficiency.

**Avanzamenti rivoluzionari nella diagnosi in caso di carenza di vitamina D**

La carenza di vitamina D è associata a malattie delle ossa, le malattie cardiovascolari, cancro e sclerosi multipla. Recenti studi clinici hanno evidenziato che queste malattie potrebbero essere evitate da una adeguata esposizione al sole o supplementazione orale di vitamina D3. Nel tentativo di prevenire queste malattie, i medici di emergenza e altri medici devono essere consapevoli dei progressi tecnologici nella misurazione delle concentrazioni sieriche di 25-idrossivitamina D. Comprendendo l'importanza di una diagnosi di carenza di vitamina D, abbiamo riesaminato le seguenti tecniche avanzate di diagnostica: cromatografia in fase liquida spettrometria di massa tandem, radioimmunologici, e Liasion immunochemiluminometric Diasorin analizzatore automatico ®. Sulla base di questa revisione, abbiamo scoperto che ognuno di questi test diagnostici ha documentato le limitazioni, e pertanto si consiglia una standardizzazione internazionale di questi test per diagnosticare con precisione la carenza di vitamina D.

13: Pinczewski J, Slominski A.

**The potential role of vitamin D in the progression of benign and malignant melanocytic neoplasms.**

Exp Dermatol. 2010Oct;19(10):860-4.

Hormonally active vitamin D<sub>3</sub>, 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, is believed to have a role in the prevention of cancer formation and in limiting the aggressiveness of cancers that do arise. Therefore, much interest is presently being focused on 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> and its analogues as potential treatments for various cancers including melanoma. This article discusses the evidence in favour of a role for 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> in protection against the progression of melanocytic lesions and also summarizes the mechanisms by which 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> may act to protect against melanoma development and progression.

**Il potenziale ruolo della vitamina D nella progressione di neoplasie melanocitiche benigne e maligne**

Ormonalmente attivo vitamina D<sub>3</sub>, 1,25 - (OH) 2D<sub>3</sub>, si crede di avere un ruolo nella prevenzione della formazione del cancro e per limitare l'aggressività dei tumori che si presentano. Pertanto, molto interesse è attualmente orientata verso la 1,25 - (OH) 2D<sub>3</sub> e dei suoi analoghi come potenziali trattamenti per vari tipi di cancro tra cui il melanoma. Questo articolo discute le prove a favore di un ruolo per 1,25 - (OH) 2D<sub>3</sub> nella protezione contro la progressione delle lesioni melanocitiche e riassume anche i meccanismi con cui 1,25 - (OH) 2D<sub>3</sub> può agire per proteggere contro lo sviluppo del melanoma e progresso.

14: Kwon HJ, Won YS, Suh HW, Jeon JH, Shao Y, Yoon SR, Chung JW, Kim TD, Kim HM, Nam KH, Yoon WK, Kim DG, Kim JH, Kim YS, Kim DY, Kim HC, Choi I.

**Vitamin D3 upregulated protein 1 suppresses TNF- $\alpha$ -induced NF- $\kappa$ B activation in hepatocarcinogenesis.**

J Immunol. 2010 Oct 1;185(7):3980-9. Epub 2010 Sep 8. PubMed PMID: 20826751.

Vitamin D(3) upregulated protein 1 (VDUP1) is a candidate tumor suppressor, the expression of which is dramatically reduced in various tumor tissues. In this study, we found that VDUP1 expression is suppressed during human hepatic carcinogenesis, and mice lacking VDUP1 are much more susceptible to diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis compared with wild type mice. VDUP1-deficient tumors proliferated significantly more than wild type tumors and had corresponding changes in the expression of key cell cycle regulatory proteins. In addition, the hepatomitogen-induced response was associated with a considerable increase in the release of TNF- $\alpha$  and subsequent enhancement of NF- $\kappa$ B activation in VDUP1-deficient mice. When cells were treated with TNF- $\alpha$ , the VDUP1 level was markedly reduced, concomitant with elevated NF- $\kappa$ B activation. Furthermore, the overexpression of VDUP1 resulted in the robust suppression of TNF- $\alpha$ -activated NF- $\kappa$ B activity via association with HDAC1 and HDAC3. These results indicate that VDUP1 negatively regulates hepatocarcinogenesis by suppressing TNF- $\alpha$ -induced NF- $\kappa$ B activation.

**Vitamina D3 che regola positivamente la proteina 1 inibisce l'attivazione di TNF- $\alpha$  indotta da NF- $\kappa$ B nell'epatocarcinogenesi**

La vitamina D (3) proteina upregulated 1 (VDUP1) è un soppressore del tumore candidato, la cui espressione è drammaticamente ridotta nei tessuti tumorali. In questo studio, abbiamo trovato che l'espressione VDUP1 viene inibita durante umano carcinogenesi epatica, e topi che mancano VDUP1 sono molto più sensibili alle diethylnitrosamine epatocarcinogenesi-indotta rispetto ai topi wild-type. Tumori VDUP1-deficient proliferato in modo significativo più di tumori di tipo selvatico e aveva corrispondenti cambiamenti nell'espressione delle proteine chiave regolano il ciclo cellulare. Inoltre, la risposta hepatomitogen indotta era associato ad un aumento considerevole del rilascio di TNF- $\alpha$  valorizzazione e successiva attivazione di NF- $\kappa$ B nei topi con deficit di VDUP1. Quando le cellule sono state trattate con TNF- $\alpha$ , il livello VDUP1 era notevolmente ridotta, in concomitanza con elevata attivazione di NF- $\kappa$ B. Inoltre, la sovraespressione di VDUP1 portato alla soppressione robusta di TNF- $\alpha$ -attivata l'attività di NF- $\kappa$ B mediante associazione con HDAC1 e HDAC3. Questi risultati indicano che VDUP1 regola negativamente epatocarcinogenesi sopprimendo TNF- $\alpha$  indotta da attivazione di NF- $\kappa$ B.

16: Zhang J, Harrison JS, Studzinski GP.

**Isoforms of p38MAPK gamma and delta contribute to differentiation of human AML cells induced by 1,25-dihydroxyvitaminD<sub>3</sub>.**

Exp Cell Res. 2011 Jan 1;317(1):117-30.

Inhibition of p38MAPK alpha/beta is known to enhance 1,25-dihydroxyvitamin (1,25D)-induced monocytic differentiation, but the detailed mechanism of this effect was not clear. We now show that the enhancement of differentiation becomes apparent with slow kinetics (12-24 h). Interestingly, the inhibition of p38MAPK alpha/beta by their selective inhibitor SB202190 (SB) leads to an upregulated expression of p38MAPK isoforms gamma and delta in 1,25D-treated AML cells, in cell lines and in primary culture. Although the expression and activating phosphorylations of p38MAPK alpha are also increased by an exposure of the cells to SB, its kinase activity is blocked by SB, as shown by reduced levels of phosphorylated Hsp27, a downstream target of p38MAPK alpha. A positive role of p38MAPKs in 1,25D-induced differentiation is shown by the inhibition of differentiation by antisense oligonucleotides to all p38MAPK isoforms. Other principal branches of MAPK pathways showed early (6 h) activation of MEK/ERK by SB, followed by activation of JNK1/2 pathway and enhanced expression and/or activation of PU.1, ATF-2 differentiation-related transcription factors. Taken together with previous reports, the results indicate that 1,25D-induced differentiation is enhanced by the activation of at least three branches of MAPK pathways (ERK1/2; p38MAPK gamma/delta; JNK1/2). This activation may result from the removal of feedback inhibition of an upstream regulator of those pathways, when p38MAPK alpha and beta are inhibited by SB.

**Isoforme di p38MAPK gamma e delta contribuiscono alla differenziazione delle cellule AML indotta da 1,25-dihydroxyvitaminD<sub>3</sub>**

L'inibizione della p38MAPK alfa / beta è noto per migliorare la 1,25-diidrossivitamina (1,25 D)-indotta differenziazione monocitaria, ma il meccanismo dettagliato di questo effetto non era chiara. Mostriamo ora che il miglioramento della differenziazione diventa evidente con cinetica lenta (12-24 ore). È interessante notare che l'inibizione di p38MAPK alfa / beta da loro SB202190 inibitore selettivo (SB) porta ad una espressione di upregulated p38MAPK isoforme di gamma e delta a 1,25 D cellule trattate con leucemia mieloide acuta, in linee cellulari e in colture primarie. Anche se l'espressione e l'attivazione di fosforilazioni di alfa p38MAPK sono anche aumentati di un esposizione delle cellule a SB, la sua attività chinasi è bloccato da SB, come dimostrato da ridotti livelli di hsp27 fosforilata, un obiettivo a valle di alfa p38MAPK. Un ruolo positivo di p38MAPKs a 1,25 D-differenziazione indotta è dimostrato dalla inibizione del differenziamento di oligonucleotidi antisense per tutti p38MAPK isoforme. Altri rami principali delle vie di MAPK ha anticipato (6 h) attivazione di MEK / ERK da SB, seguita dalla attivazione di JNK1 / 2 percorso e l'espressione migliore e / o l'attivazione di PU.1, ATF-2 fattori di trascrizione differenziazione-related. Nel loro insieme alle relazioni precedenti, i risultati indicano che la 1,25 D-indotta la differenziazione è aumentata mediante l'attivazione di almeno tre rami di percorsi MAPK (ERK1 /

2; p38MAPK gamma / delta; JNK1 / 2). Questa attivazione può derivare dalla rimozione di inibizione feedback di un regolatore a monte di quelle vie, quando p38MAPK alfa e beta sono inibiti da SB.

17: Flores O, Burnstein KL.

**GADD45gamma: a new vitamin D-regulated gene that is antiproliferative in prostate cancer cells.**

Endocrinology. 2010Oct;151(10):4654-64.

1,25-dihydroxyvitamin D3 [1,25-(OH)2D3] inhibits proliferation of normal and malignant prostate epithelial cells at least in part through inhibition of G1 to S phase cell cycle progression. The mechanisms of the antiproliferative effects of 1,25-(OH)2D3 have yet to be fully elucidated but are known to require the vitamin D receptor. We previously developed a 1,25-(OH)2D3-resistant derivative of the human prostate cancer cell line, LNCaP, which retains active vitamin D receptors but is not growth inhibited by 1,25-(OH)2D3. Gene expression profiling revealed two novel 1,25-(OH)2D3-inducible genes, growth arrest and DNA damage-inducible gene gamma (GADD45 $\gamma$ ) and mitogen induced gene 6 (MIG6), in LNCaP but not in 1,25-(OH)2D3-resistant cells. GADD45 $\gamma$  up-regulation was associated with growth inhibition by 1,25-(OH)2D3 in human prostate cancer cells. Ectopic expression of GADD45 $\gamma$  in either LNCaP or ALVA31 cells resulted in G1 accumulation and inhibition of proliferation equal to or greater than that caused by 1,25-(OH)2D3 treatment. In contrast, ectopic expression of MIG6 had only minimal effects on cell cycle distribution and proliferation. Whereas GADD45 $\gamma$  has been shown to be induced by androgens in prostate cancer cells, up-regulation of GADD45 $\gamma$  by 1,25-(OH)2D3 was not dependent on androgen receptor signaling, further refuting a requirement for androgens/androgen receptor in vitamin D-mediated growth inhibition. These data introduce two novel 1,25-(OH)2D3-regulated genes and establish GADD45 $\gamma$  as a growth-inhibitory protein in prostate cancer. Furthermore, the induction of GADD45 $\gamma$  gene expression by 1,25-(OH)2D3 may mark therapeutic response in prostate cancer.

**GADD45gamma:una nuova vitamina D che regola il gene che antiproliferativo nelle cellule cancerose prostatiche**

1,25-diidrossivitamin D3 [1,25 - (OH) 2D3] inibisce la proliferazione delle cellule prostatiche normali e maligne epiteliali almeno in parte attraverso l'inibizione del G1 alla fase progressione del ciclo cellulare S. I meccanismi degli effetti antiproliferativi della 1,25 - (OH) 2D3 devono ancora essere completamente chiarito, ma è noto per richiedere il recettore della vitamina D. Abbiamo già messo a punto un 1,25 - (OH) 2D3 derivati-resistente della linea cellulare umana cancro alla prostata, LNCaP, che mantiene attiva la vitamina D recettori, ma non è la crescita inibita dalla 1,25 - (OH) 2D3. Profili di espressione genica hanno rivelato due nuovi 1,25 - (OH) 2D3 geni-inducibile, arresto della crescita e gamma gene del DNA damage-inducibile (GADD45 $\gamma$ ) e mitogeno indotto gene 6 (MIG6), in LNCaP ma non in 1,25 - (OH) cellule 2D3-resistente. GADD45 $\gamma$  up-regolazione è stato associato a inibizione della crescita di 1,25 - (OH) 2D3 in cellule umane di cancro alla prostata. Espressione ectopica di GADD45 $\gamma$  sia in cellule LNCaP o ALVA31 portato G1 accumulo e l'inibizione della proliferazione pari o superiore a quello causato da 1,25 - (OH) 2D3 trattamento. Al contrario, l'espressione ectopica di MIG6 avuto solo effetti minimi sulla distribuzione del ciclo cellulare e la proliferazione. Considerando che GADD45 $\gamma$  ha mostrato di essere indotta da androgeni in cellule tumorali della prostata, up-regulation dei GADD45 $\gamma$  dalla 1,25 - (OH) 2D3 non

era dipendente del recettore degli androgeni segnalazione, ulteriori confutando l'obbligo per gli androgeni / recettore degli androgeni in vitamina D inibizione della crescita mediata. Questi dati introdurre due nuovi 1,25 - (OH) 2D3 geni regolati e stabilire GADD45 $\gamma$  come una proteina di inibizione della crescita nel cancro alla prostata. Inoltre, l'induzione dell'espressione genica GADD45 $\gamma$  da 1,25 - (OH) 2D3 può segnare la risposta terapeutica nel carcinoma della prostata.

20: Liu W, Guo M, Ezzat S, Asa SL.

**Vitamin D inhibits CEACAM1 to promote insulin/IGF-I receptor signaling without compromising anti-proliferative action.**

Lab Invest. 2010 Aug 16. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 20714323.

Population studies suggest putative links between vitamin D (VD)-deficiency and risk of cancer and diabetes. The insulin/IGF-I receptor represents a signaling target of the carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 (CEACAM1) that is implicated in both diabetes and cancer, therefore we hypothesized that VD actions may be mediated through this adhesion molecule. In this study, we show that 1,25 vitamin D3 and its analogues EB1089 and KH1060 potently inhibit CEACAM1 expression in cancer cells. This effect was associated with significant reductions in mRNA and protein levels, resulting from transcriptional and posttranslational actions respectively. Insulin/IGF-I-mediated IRS-1 and Akt activation were enhanced by VD treatment. Similarly, CEACAM1 downregulation significantly upregulated the insulin and IGF-I receptors and mimicked the effect of VD-mediated enhanced insulin/IGF-I receptor signaling. Despite improved insulin/IGF-I signaling, the anti-proliferative actions of VD were preserved in the absence or presence of forced CEACAM1 expression. Forced CEACAM1, however, abrogated the anti-invasive actions of VD. Our findings highlight CEACAM1 as a target of VD action. The resulting inhibition of CEACAM1 has potentially beneficial effects on metabolic disorders without necessarily compromising the anticancer properties of this vitamin.

**Vitamina D inibisce CEACAM1 che promuove il segnale recettoriale insulin/IGF-I senza compromettere l'azione antiproliferativa**

Studi di popolazione suggeriscono legami putativo tra vitamina D (VD)-deficit e il rischio di cancro e diabete. L'insulina / IGF-I recettori rappresenta un target di segnalazione della molecola carcinoembrionario cellule antigene-correlate adesione 1 (CEACAM1) che è implicato nel diabete e il cancro, cui si può ipotizzare che le azioni VD possono essere mediate attraverso questa molecola di adesione. In questo studio, dimostriamo che la 1,25 vitamina D3 e EB1089 suoi analoghi inibiscono fortemente e KH1060 CEACAM1 espressione nelle cellule tumorali. Questo effetto è stato associato a riduzioni significative nei livelli di mRNA e di proteine, derivanti da azioni trascrizionale e post-traduzionali rispettivamente. Insulina / IGF-I-mediata IRS-1 e l'attivazione di Akt sono stati aumentati con trattamento VD. Allo stesso modo, down-regulation CEACAM1 upregulated significativamente i recettori IGF-I e insulina e ha imitato l'effetto di VD-mediata insulina maggiore / IGF-I recettori di segnalazione. Nonostante insulina migliorato / IGF-I di segnalazione, le azioni anti-proliferativo di VD sono stati conservati in assenza o in presenza di forzata espressione CEACAM1. Costretto CEACAM1, tuttavia, ha abrogato le azioni anti-invasiva del VD. I nostri risultati evidenziano CEACAM1 come bersaglio d'azione VD. L'inibizione risultante di CEACAM1 ha potenzialmente effetti benefici sui disturbi del metabolismo, senza necessariamente compromettere le proprietà antitumorali di questa vitamina.

21: Yu WD, Ma Y, Flynn G, Muindi JR, Kong RX, Trump DL, Johnson CS.

**Calcitriol enhances gemcitabine anti-tumor activity in vitro and in vivo by promoting apoptosis in a human pancreatic carcinoma model system.**

Cell Cycle. 2010 Aug 1;9(15):3022-9. Epub 2010 Aug 17. PubMed PMID: 20699664.

Gemcitabine is the standard care chemotherapeutic agent to treat pancreatic cancer. Previously we demonstrated that calcitriol (1, 25-dihydroxycholecalciferol) has significant anti-proliferative effects in vitro and in vivo in multiple tumor models and enhances the activity of a variety of chemotherapeutic agents. We therefore investigated whether calcitriol could potentiate the cytotoxic activity of gemcitabine in the human pancreatic cancer Capan-1 model system. Isobologram analysis revealed that calcitriol and gemcitabine had synergistic antiproliferative effect over a wide range of drug concentrations. Calcitriol did not reduce the cytidine deaminase activity in Capan-1 tumors nor in the livers of Capan-1 tumor bearing mice. Calcitriol and gemcitabine combination promoted apoptosis in Capan-1 cells compared with either agent alone. The combination treatment also increased the activation of caspases-8, -9, -6 and -3 in Capan-1 cells. This result was confirmed by substrate-based caspase activity assay. Akt phosphorylation was reduced by calcitriol and gemcitabine combination treatment compared to single agent treatment. However, ERK1/2 phosphorylation was not modulated by either agent alone or by the combination. Tumor regrowth delay studies showed that calcitriol in combination with gemcitabine resulted in a significant reduction of Capan-1 tumor volume compared to single agent treatment. Our study suggests that calcitriol and gemcitabine in combination promotes caspase-dependent apoptosis, which may contribute to increased anti-tumor activity compared to either agent alone.

**Il calcitriolo aumenta l'attività antitumorale della gemcitabina in vitro and in vivo tramite la promozione dell'apoptosi in un modello di carcinoma pancreatico umano**

Gemcitabina è lo standard di cura agente chemioterapico per il trattamento di cancro al pancreas. In precedenza abbiamo dimostrato che il calcitriolo (1, 25-diidrossicolecalciferolo) ha significativi effetti anti-proliferativo in vitro e in vivo in modelli tumorali multiple e migliora l'attività di una varietà di agenti chemioterapici. Abbiamo quindi studiato se calcitriolo potrebbe potenziare l'attività citotossica della gemcitabina nel carcinoma pancreatico umano Capan-1 sistema modello. Isobologram analisi ha rivelato che calcitriolo e gemcitabina non ha avuto effetto antiproliferativo sinergico in un ampio range di concentrazioni del farmaco. Calcitriolo non ha ridotto l'attività citidina deaminasi in Capan-1 né i tumori nel fegato di topi tumore Capan-1 cuscinetto. Calcitriolo e apoptosi combinazione di gemcitabina promosso in cellule Capan-1 rispetto a due farmaci da soli. Il trattamento di combinazione è aumentato anche l'attivazione di caspasi-8, -9, -6 e -3 in Capan-1 celle. Questo risultato è stato confermato da test caspasi substrato a base di attività. Fosforilazione di Akt è stata ridotta di trattamento di combinazione calcitriolo e gemcitabina rispetto al trattamento in monoterapia. Tuttavia, ERK1 / 2 fosforilazione non è stata modulata da una agente da solo o con la combinazione. Tumore studi hanno dimostrato che ritardare la ricrescita calcitriolo in associazione con la gemcitabina ha comportato una riduzione significativa del Capan-1 il volume

del tumore, rispetto al trattamento in monoterapia. Il nostro studio suggerisce che calcitriolo e gemcitabina in associazione promuove l'apoptosi caspasi-dipendente, che può contribuire a una maggiore attività anti-tumorale rispetto a due farmaci da soli.

24: Holt SK, Kwon EM, Koopmeiners JS, Lin DW, Feng Z, Ostrander EA, Peters U, Stanford JL.

### **Vitamin D pathway gene variants and prostate cancer prognosis.**

Prostate. 2010 Sep 15;70(13):1448-60.

**BACKGROUND:** Observational studies linking vitamin D deficiency with increased prostate cancer (PCa) mortality and the pleiotropic anticancer effects of vitamin D in malignant prostate cell lines have initiated trials examining potential therapeutic benefits of vitamin D metabolites. There have been some successes but efforts have been hindered by risk of inducing hypercalcemia. A limited number of studies have investigated associations between variants in vitamin D pathway genes with aggressive forms of PCa. Increased understanding of relevant germline genetic variation with disease outcome could aid in the development of vitamin-D-based therapies.

**METHODS:** We undertook a comprehensive analysis of 48 tagging single-nucleotide polymorphisms (tagSNPs) in genes encoding for vitamin D receptor (VDR), vitamin D activating enzyme 1-alpha-hydroxylase (CYP27B1), and deactivating enzyme 24-hydroxylase (CYP24A1) in a cohort of 1,294 Caucasian cases with an average of 8 years of follow-up. Disease recurrence/progression and PCa-specific mortality risks were estimated using adjusted Cox proportional hazards regression.

**RESULTS:** There were 139 cases with recurrence/progression events and 57 cases who died of PCa. Significantly altered risks of recurrence/progression were observed in relation to genotype for two VDR tagSNPs (rs6823 and rs2071358) and two CYP24A1 tagSNPs (rs927650 and rs2762939). Three VDR tagSNPs (rs3782905, rs7299460, and rs11168314), one CYP27B1 tagSNP (rs3782130), and five CYP24A1 tagSNPs (rs3787557, rs4809960, rs2296241, rs2585428, and rs6022999) significantly altered risks of PCa death.

**CONCLUSIONS:** Genetic variations in vitamin D pathway genes were found to alter both risk of recurrence/progression and PCa-specific mortality.

### **Varianti geniche di segnale della vitamina D e prognosi nel cancro prostatico**

**BACKGROUND:** studi osservazionali che collega la carenza di vitamina D con il cancro della prostata è aumentato (PCa) la mortalità e gli effetti pleiotropici anticancro della vitamina D nelle linee di cellule tumorali della prostata hanno avviato studi l'esame di potenziali benefici terapeutici di metaboliti della vitamina D. Ci sono stati alcuni successi, ma gli sforzi sono stati ostacolati dal rischio di indurre ipercalcemia. Un numero limitato di studi ha esaminato le associazioni tra le varianti di vitamina D geni percorso con forme aggressive di PCa. Una maggiore comprensione della variazione genetica germinale pertinente con l'esito della malattia potrebbero essere di aiuto nello sviluppo di terapie vitamina-D-based.

**METODI:** Abbiamo eseguito una analisi esaustiva di 48 polimorfismi a singolo nucleotide tagging (tagSNPs) in geni che codificano per i recettori della vitamina D (VDR), la vitamina D l'attivazione dell'enzima alfa-1-idrossilasi (CYP27B1), e la disattivazione dell'enzima di 24 idrossilasi (CYP24A1) in una coorte di 1.294 casi caucasica con una media di 8 anni di follow-up. Recidiva / progressione e rischi di mortalità PCa-specifici sono stati stimati utilizzando adeguati regressione di Cox di rischio proporzionale.

**RISULTATI:** Ci sono stati 139 casi con recidiva / eventi di progressione e di 57 casi che morì di PCa. Rischi significativamente alterato di recidiva / progressione sono stati osservati in relazione al genotipo per due tagSNPs VDR (rs6823 e rs2071358) e due CYP24A1 tagSNPs (rs927650 e rs2762939). Tre tagSNPs VDR (rs3782905, rs7299460 e rs11168314), uno CYP27B1 tagSNP (rs3782130), e cinque CYP24A1 tagSNPs (rs3787557, rs4809960, rs2296241, rs2585428 e rs6022999) modificato in modo significativo i rischi di morte PCa.  
**CONCLUSIONI:** variazioni genetiche nei geni percorso vitamina D sono stati trovati a modificare sia il rischio di recidiva / progressione e mortalità PCa-specific.

26: Stepien T, Krupinski R, Sopinski J, Kuzdak K, Komorowski J, Lawnicka H, Stepien H.

### **Decreased 1-25 dihydroxyvitamin D3 concentration in peripheral blood serum of patients with thyroid cancer.**

Arch Med Res. 2010 Apr;41(3):190-4. PubMedPMID: 20682176.

**BACKGROUND AND AIMS:** Vitamin D(3), in addition to its role in calcium homeostasis, has been recognized as playing a role in human cancer development. However, little is known about the association between vitamin D status and the development of thyroid cancer. This study aimed to investigate vitamin D metabolism by measuring 25(OH) D(3), 1-25 (OH)(2) D(3), PTH and calcium concentrations in the peripheral blood of patients with different forms of thyroid tumors.

**METHODS:** The 25-hydroxyvitamin D(3), 1-25- dihydroxyvitamin D(3), PTH and calcium serum levels of 50 consecutive patients with epithelial thyroid cancer 27 cases of papillary cancers (PTC), 16 follicular cancers (FTC), and seven cases of anaplastic cancers (ATC) and 34 multinodular nontoxic goiter (MNG) were measured by specific immunoassay. The control group consisted of 26 healthy volunteers.

**RESULTS:** Our results revealed significantly lower 1-25 (OH)(2) D(3) concentration in the PTC group (22.67 pg/mL +/- 8.12; p <0.05), FTC group (16.09 pg/mL +/- 6.15; p <0.02) and ATC group (9.48 pg/mL +/- 5.18; p <0.02). Levels of 1-25 (OH)(2) D(3) varied by cancer stage and were also significantly different. A significant decrease in circulating 1-25 (OH)(2) D(3) concentration was found in patients with stage I (24.12 pg/mL +/- 6.77; p <0.05), stage II (16.93 pg/mL +/- 4.55; p <0.05), stage III (12.44 +/- 8.98; p <0.02) and in stage IVa (6.18 +/- 2.22; p <0.01). There were no significant differences when comparing serum levels of 25(OH) D(3), PTH or calcium concentrations among individuals with multinodular goiter, thyroid cancer and age- and sex-matched control volunteers.

**CONCLUSIONS:** Our study revealed that impaired vitamin D(3) metabolism may play an important role in thyroid follicular cell oncogenesis.

### **Diminuzione della concentrazione di 1-25 diidrossivitamina D3 in sangue periferico di pazienti con cancro alla tiroide**

**CONTESTO E OBIETTIVI:** La vitamina D (3), oltre al suo ruolo nella omeostasi del calcio, è stato riconosciuto come un ruolo nello sviluppo del cancro umano. Tuttavia, poco si sa circa l'associazione tra vitamina D e lo sviluppo del cancro della tiroide. Questo studio ha lo scopo di indagare il metabolismo della vitamina D da parte di 25 (OH) D (3), 1-25 (OH) (2) le concentrazioni di D (3), PTH e calcio nel sangue periferico di pazienti affetti da diverse forme di tumori tiroidei.

**METODI:** 25-idrossivitamina D (3), 1-25-dihydroxyvitamin D (3), i livelli sierici di PTH e di calcio degli 50 pazienti con carcinoma della tiroide 27 casi di tumori papillari (PTC), 16 tipi di cancro follicolare (FTC), e sette casi di cancro anaplastico (ATC) e 34, gozzo multinodulare tossico

(MNG) sono stati misurati mediante immunodosaggio specifico. Il gruppo di controllo era costituito da 26 volontari sani.

**RISULTATI:** I nostri risultati hanno rivelato significativamente più bassi 1-25 (OH) (2) D (3) la concentrazione nel gruppo PTC (22,67 pg / ml +/- 8.12, p <0,05), il gruppo FTC (16,09 pg / ml +/- 6,15, p <0,02) e del gruppo ATC (9,48 pg / ml +/- 5.18, p <0,02). I livelli di 1-25 (OH) (2) D (3) varia da stadio del cancro e sono stati anche significativamente diversi. Una significativa diminuzione dei livelli circolanti di 1-25 (OH) (2) D (3) la concentrazione è stata trovata in pazienti con stadio I (24,12 pg / ml +/- 6,77, p <0,05), fase II (16,93 pg / ml +/- 4,55, p <0,05), stadio III (12,44 +/- 8,98, p <0,02) e in fase IVa (6.18 +/- 2.22, p <0,01). Non ci sono state differenze significative quando i livelli sierici di confronto di 25 (OH) D (3), le concentrazioni di PTH o calcio tra gli individui con gozzo multinodulare, cancro alla tiroide e volontari di controllo per età e sesso.

**CONCLUSIONI:** Il nostro studio ha rivelato che la compromissione della vitamina D (3) metabolismo possono giocare un ruolo importante nella tiroide oncogenesi cellulare follicolare.

27: Seubwai W, Wongkham C, Puapairoj A, Okada S, Wongkham S.

### **22-oxa-1,25-dihydroxyvitamin D3 efficiently inhibits tumor growth in inoculated mice and primary histoculture of cholangiocarcinoma.**

Cancer. 2010 Dec1;116(23):5535-43.

**BACKGROUND:** It is well known that 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D3 (1,25[OH]<sub>2</sub> D3) restrains cell proliferation and induces differentiation and apoptosis in normal and tumor cells. The authors of this report recently demonstrated that 1,25(OH)<sub>2</sub> D3 effectively inhibits the proliferation of cholangiocarcinoma (CCA) cell lines. The antitumor activity and the underlying mechanism of 22-oxa-D3, an analog of vitamin D, in mice and in tissue cultures from patients with CCA were further explored in the current study.

**METHODS:** Cell growth and cell cycle distribution were examined in CCA cells by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay and flow cytometry. Mice were injected subcutaneously with 4 $\times$ 10<sup>6</sup> CCA cells at both flank sides and intraperitoneal injections with phosphate-buffered saline or 22-oxa-D3 (15  $\mu$ g/kg/day) for 17 days thereafter. Tumors were removed the next day. The expression levels of cyclin D1 and the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 were determined by Western blot analysis and immunohistochemistry. Growth inhibition of 22-oxa-D3 in fresh tissue samples from patients with CCA was analyzed by using a histodrug response assay.

**RESULTS:** 22-oxa-D3 effectively suppressed the growth of CCA cell lines in a time-dependent and dose-dependent manner. 22-oxa-D3 arrested CCA cells at G1 phase to S phase by the suppression of cyclin D1 expression and the up-regulation of p21. Supplementation of 22-oxa-D3 to CCA-inoculated mice significantly inhibited tumor growth without hypercalcemia or serious side effects. The treatment also induced cellular apoptosis in tissue samples from patients with CCA.

**CONCLUSIONS:** 22-oxa-D3 effectively suppressed tumor growth in CCA-inoculated mice and induced cellular apoptosis in tissue samples from patients with CCA. The current data encourage further investigation of 1,25(OH)<sub>2</sub> D3 or its analogues as therapeutic agents in the treatment of patients with CCA

### **22-ossa-1,25-diidrossivitamina D3 inibisce efficacemente la crescita tumorale in topi inoculati e nelle colture primarie di colangiocarcinoma**

**BACKGROUND:** E 'ben noto che 1 $\alpha$ ,25-diidrossivitamina D3 (1,25 [OH] 2 D3) frena la proliferazione cellulare e induce la differenziazione e l'apoptosi in cellule normali e tumorali. Gli autori di questo rapporto recentemente dimostrato che 1,25 (OH) 2 D3 inibisce efficacemente la

proliferazione del colangiocarcinoma (CCA) linee cellulari. L'attività antitumorale e il meccanismo alla base del 22-oxa-D3, un analogo della vitamina D, nei topi e in colture di tessuti di pazienti con CCA sono stati ulteriormente esplorato in questo studio. METODI: la crescita cellulare e la distribuzione del ciclo cellulare sono stati esaminati nelle cellule CCA di 3 - (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromuro (MTT), test e citometria a flusso. I topi sono stati iniettati per via sottocutanea con  $4 \times 10^6$  (6) cellule CCA su entrambi i lati fianco e le iniezioni intraperitoneale con una soluzione salina tampone fosfato o 22-oxa-D3 (15 mcg / kg / die) per 17 giorni successivi. I tumori sono stati rimossi il giorno successivo. I livelli di espressione della ciclina D1 e l'inibitore della chinasi ciclina-dipendente p21 sono state determinate mediante analisi Western blot ed immunohistochemica. Inibizione della crescita del 22-oxa-D3 in campioni di tessuto fresco di pazienti con CCA è stata analizzata mediante un test di risposta histodrug.

RISULTATI: 22-oxa-D3 sopprime efficacemente la crescita di linee cellulari CCA in un modo dipendente dal tempo e dose-dipendente. 22-oxa-D3 arrestato cellule CCA in fase G1 alla fase S dalla soppressione dell'espressione della ciclina D1 e l'up-regolazione di p21. La supplementazione di 22-oxa-D3-CCA a topi inoculati significativamente inibito la crescita tumorale senza effetti collaterali di ipercalcemia o gravi. Il trattamento inoltre indotto apoptosi cellulare in campioni di tessuto provenienti da pazienti con CCA.

CONCLUSIONI: 22-oxa-D3 sopprime efficacemente la crescita tumorale nei topi CCA-inoculati e indotto apoptosi cellulare in campioni di tessuto provenienti da pazienti con CCA. I dati attuali incoraggiare ulteriori indagini di 1,25 (OH) 2 D3 o suoi analoghi come agenti terapeutici nel trattamento di pazienti affetti da CCA.

29: Matsugaki T, Zenmyo M, Hiraoka K, Fukushima N, Shoda T, Komiya S, Ono M, Kuwano M, Nagata K.

**N-myc downstream-regulated gene 1/Cap43 expression promotes cell differentiation of human osteosarcoma cells.**

Oncol Rep. 2010 Sep;24(3):721-5.

The N-myc downstream regulated gene 1 (NDRG1)/Cap43 is closely associated with cell differentiation, and its expression is induced by hypoxia and increasing intracellular calcium levels. Whether the NDRG1/Cap43 expression in cancer cells is a predictive marker of good or poor prognosis in patients, depends upon tumor types and differentiation status. In this study, we examined whether the NDRG1/Cap43 expression was involved in the differentiation of osteosarcoma cells, using three osteosarcoma cell lines, MG63, U2OS and SaOS2. The NDRG1/Cap43 expression in MG63 and U2OS was significantly enhanced by vitamin D3, which also induced the production of osteocalcin, a differentiation marker of osteoblasts. The knockdown of NDRG1/Cap43 using small interfering RNA also suppressed the production of osteocalcin and enhanced cell proliferation, accompanied by the suppression of p21 expression. Furthermore, the acquired invasiveness of osteosarcoma cells during the invasion in Matrigel resulted in the decreased expression of NDRG1/Cap43. On the basis of these results, our proposed role for NDRG1/Cap43 would be in the capacity of differentiation and invasion in osteosarcoma cells.

**Espressione del gene N-myc regolato a valle da 1/Cap43 che promuove la differenziazione di cellule di osteosarcoma umano.**

L'N-myc gene a valle regolamentati 1 (NDRG1) / Cap43 è strettamente associata con la differenziazione cellulare, e la sua espressione è indotta da ipossia e aumentando i livelli intracellulari di calcio. Se l'espressione NDRG1/Cap43 nelle cellule tumorali è un marker predittivo di prognosi favorevole o sfavorevole in pazienti, dipende tipi di tumore e lo stato di differenziazione. In questo studio, abbiamo esaminato se l'espressione NDRG1/Cap43 è stato coinvolto nella differenziazione delle cellule di osteosarcoma, con tre linee di cellule di osteosarcoma, MG63, U2OS e SaOS2. L'espressione NDRG1/Cap43 in MG63 e U2OS è stata significativamente arricchita da vitamina D3, che ha anche indotto la produzione di osteocalcina, un marker di differenziazione degli osteoblasti. Il colpo di NDRG1/Cap43 utilizzando piccoli RNA interferenti anche soppresso la produzione di osteocalcina e la proliferazione cellulare avanzata, accompagnata dalla soppressione di p21 espressione. Inoltre, l'invasività delle cellule di osteosarcoma acquisito durante l'invasione in Matrigel portato alla diminuita espressione di NDRG1/Cap43. Sulla base di questi risultati, il nostro ruolo proposto per NDRG1/Cap43 sarebbe la capacità di differenziazione e di invasione in cellule di osteosarcoma.

30: Jain RK, Trump DL, Egorin MJ, Fernandez M, Johnson CS, Ramanathan RK.

**A phase I study of the vitamin D(3) analogue ILX23-7553 administered orally to patients with advanced solid tumors.**

Invest New Drugs. 2010 Jul 27.

Purpose ILX23-7553 (1,25-dihydroxy-16-ene-23-yne vitamin D3) is a vitamin D analogue that was developed to avoid the hypercalcemia that may limit the use of vitamin D as an anti-cancer agent. We performed a phase I study of ILX23-7553 to determine its side-effect profile, pharmacokinetics, and to document any observed antitumor activity. Patients and Methods Adult patients with refractory solid tumors were enrolled. A modified Fibonacci dose escalation scheme was employed. ILX23-7553 was administered orally daily for three consecutive days, and repeated in 7-day cycles. Plasma drug concentrations were assayed by radioimmunoassay and radioreceptor assay. Results Sixteen patients were enrolled to 10 dose levels ranging from 1.7 to 37.3 mug/m(2)/day. The maximum tested dose was six times higher than the maximally-tolerated dose (MTD) in dogs. Dose-limiting toxicity was not observed. ILX23-7553 concentrations on cycle 1 day 1 of treatment were comparable to concentrations on cycle 2 day 1, suggesting limited accumulation. One patient with adrenal cortical cancer had stable disease for 23 weeks, but no objective responses were observed. Conclusions ILX23-7553 was well tolerated at the doses tested, with no evidence of hypercalcemia. The plasma concentrations achieved were approximately 100-fold lower than those associated with tumor growth inhibition in vitro, limiting use of this formulation.

**Uno studio di prima fase della vitamina D (3) analogo di ILX23 7553 somministrato per via orale a pazienti con tumori solidi avanzati.**

Scopo ILX23-7.553 (vitamina D3 1,25-diidrossi-16-ene-23-ino) è un analogo della vitamina D che è stato sviluppato al fine di evitare l'ipercalcemia che possono limitare l'uso della vitamina D come agente anti-cancro. Abbiamo eseguito uno studio di fase I di 7.553 ILX23-determinare il proprio profilo di effetti collaterali, farmacocinetica, e di documentare tutte le attività antitumorale osservata. Pazienti e Metodi I pazienti adulti con tumori solidi refrattari sono stati arruolati. Una modifica regime di dose escalation di Fibonacci è stato impiegato. ILX23-7.553 è stato somministrato per via orale al giorno per tre giorni consecutivi, e ripetuto in cicli di 7 giorni. Le concentrazioni plasmatiche di droga sono stati analizzati mediante il test radioimmunologico e saggio radiorecettoriale. Risultati Sedici pazienti sono stati arruolati a 10 livelli di dose-ranging 1,7-37,3 mug / m (2) / giorno. La dose massima testata è stato sei volte superiore alla massima dose tollerata (MTD) nei cani. Tossicità dose-limitante non è stato rispettato. ILX23-7.553 concentrazioni sul ciclo di 1 giorno 1 di trattamento sono stati paragonabili a concentrazioni sul ciclo 2 giorno 1, suggerendo accumulo limitato. Un paziente con il cancro corticale surrenale era una stabilizzazione della malattia per 23 settimane, ma non sono state osservate risposte obiettive. Conclusioni ILX23-7.553 è stato ben tollerato ai dosaggi testati, senza evidenza di ipercalcemia. Le concentrazioni plasmatiche sono stati raggiunti circa 100 volte inferiori a quelli associati con l'inibizione della crescita tumorale in vitro, limitando l'uso di questa formulazione.

34: Persons KS, Eddy VJ, Chadid S, Deoliveira R, Saha AK, Ray R.

**Anti-growth effect of 1,25-dihydroxyvitamin D3-3-bromoacetate alone or in combination with 5-amino-imidazole-4-carboxamide-1-beta-4-ribofuranoside in pancreatic cancer cells.**

Anticancer Res. 2010 Jun;30(6):1875-80. PubMed PMID: 20651329.

1,25-Dihydroxyvitamin D(3)-3-bromoacetate (1,25(OH)(2)D(3)-3-BE) is a vitamin D receptor-alkylating derivative of 1,25(OH)(2)D(3). The strong dose-dependent antiproliferative and apoptotic effects of this compound in androgen-sensitive and androgen-insensitive prostate cancer cells have been reported. In this communication, it is reported that 1,25(OH)(2)D(3)-3-BE strongly inhibits the growth of several pancreatic cancer cell lines. This effect is further accentuated by combination with 5-amino-imidazole-4-carboxamide-1-beta-4-ribofuranoside (AICAR), an activator of AMP-activated protein kinase (AMPK)/acetyl-Co-enzyme A carboxylase (ACC) phosphorylation pathways and an inhibitor of Akt phosphorylation. It was observed that the anti-growth property of 1,25(OH)(2)D(3)-3-BE, either alone or in combination with AICAR resulted in the inhibition of Akt phosphorylation in BxPC-3 cells. In conclusion, 1,25(OH)(2)D(3)-3-BE displays a strong therapeutic potential, alone and in combination with AICAR, in pancreatic cancer.

**Effetto anti-crescita di 1,25-diidrossivitamina D3-3-bromoacetate da solo o in combinazione con 5-amino-imidazolo-4-carbossamide-1-beta-4-ribofuranoside in cellule di cancro pancreatico.**

1,25-diidrossivitamina D (3)-3-bromoacetate (1,25 (OH) (2) D (3)-3-BE) è un recettore della vitamina D-alchilante derivato di 1,25 (OH) (2) D (3). Il forte effetto dose-dipendente antiproliferativa e apoptotica di questo composto nelle cellule della prostata androgeno-sensibili e androgeno-insensibili cancro sono stati segnalati. In questa comunicazione, si segnala che 1,25 (OH) (2) D (3)-3-BE inibisce fortemente la crescita di diverse linee di cancro del pancreas cellule. Questo effetto è ulteriormente accentuata dalla combinazione con 5-amino-imidazolo-4-carbossamide-1-beta-4-ribofuranoside (AICAR), un attivatore di AMP-activated protein chinasi (AMPK) / acetil-coenzima A carbossilasi (ACC ) percorsi fosforilazione e un inibitore della fosforilazione di Akt. E 'stato osservato che la proprietà anti-crescita di 1,25 (OH) (2) D (3)-3-BE, da solo o in combinazione con AICAR portato alla inibizione della fosforilazione di Akt in BxPC-3 celle. In conclusione, 1,25 (OH) (2) D (3)-3-BE mostra un forte potenziale terapeutico, da solo e in combinazione con AICAR, nel cancro del pancreas.

35: Fedirko V, Bostick RM, Goodman M, Flanders WD, Gross MD.

**Blood 25-hydroxyvitamin D3 concentrations and incident sporadic colorectal adenoma risk: a pooled case-control study.**

Am J Epidemiol. 2010 Sep 1;172(5):489-500.

The authors examined the association between circulating 25-hydroxyvitamin D(3) (25(OH)D(3)), the best indicator of total vitamin D exposure, and incident, sporadic colorectal adenoma risk in a pooled analysis of primary data from 3 colonoscopy-based case-control studies conducted in Minnesota, North Carolina, and South Carolina between 1991 and 2002. The pooled study included 616 colorectal adenoma cases and 770 polyp-free controls. Multivariable logistic regression was used to estimate the association between circulating 25(OH)D(3) and colorectal adenoma risk. Stratified analyses and the likelihood ratio test were used to examine effect modification by various risk factors. In the pooled analysis, higher circulating 25(OH)D(3) concentrations were statistically significantly associated with decreased colorectal adenoma risk (highest vs. lowest quartile odds ratio = 0.59, 95% confidence interval: 0.41, 0.84). The observed inverse association was stronger among participants who used nonsteroidal antiinflammatory drugs regularly (highest vs. lowest quartile odds ratio = 0.33, 95% confidence interval: 0.19, 0.56). Inverse associations between 25(OH)D(3) and colorectal adenoma did not differ substantially by other risk factors or by adenoma characteristics. These findings support the hypothesis that greater vitamin D exposure may reduce the risk of colorectal adenoma and suggest that it may do so more strongly in combination with antiinflammatory agents.

**Concentrazioni di 25-idrossivitamina D3 nel sangue e rischio di incidenti sporadici di adenoma coloretale: uno studio a campione.**

Gli autori hanno esaminato l'associazione tra circolante di 25-idrossivitamina D (3) (25 (OH) D (3)), il migliore indicatore di esposizione totale vitamina D, e di incidente, il rischio di adenoma coloretale sporadico in un'analisi aggregata dei dati primari di 3 colonscopia a base di studi caso-controllo condotto in Minnesota, North Carolina e South Carolina tra il 1991 e il 2002. Lo studio ha incluso 616 casi in pool adenoma del colon-retto e 770 controlli di polipo-free. Multivariata di regressione logistica è stata utilizzata per stimare l'associazione tra circolante 25 (OH) D (3) e il rischio adenoma coloretale. Analisi stratificate e il test rapporto di verosimiglianza sono stati utilizzati per esaminare le modifiche in vigore da diversi fattori di rischio. Nella analisi globale superiore circolanti 25 (OH) D (3) le concentrazioni erano statisticamente significativamente associato con una diminuzione del rischio adenoma del colon-retto (più alto rispetto al quartile più basso rapporto di probabilità = 0,59, intervallo di confidenza 95%: 0,41, 0,84). L'associazione inversa osservata era più forte tra i partecipanti che hanno utilizzato farmaci antinfiammatori non steroidei regolarmente (più alto rispetto al quartile più basso odds ratio = 0,33, intervallo di confidenza 95%: 0,19, 0,56). Associazioni inverse tra 25 (OH) D (3) e adenoma coloretale non differivano sostanzialmente da altri fattori di rischio o da caratteristiche adenoma. Questi risultati

supportano l'ipotesi che una maggiore esposizione vitamina D può ridurre il rischio di adenoma del colon-retto e suggeriscono che essa può farlo con più forza in combinazione con farmaci antinfiammatori.

Newton-Bishop JA, Beswick S, Randerson-Moor J, Chang YM, Affleck P, Elliott F, Chan M, Leake S, Karpavicius B, Haynes S, Kukalich K, Whitaker L, Jackson S, Gerry E, Nolan C, Bertram C, Marsden J, Elder DE, Barrett JH, Bishop DT.

### **Serum 25-hydroxyvitamin D3 levels are associated with breslow thickness at presentation and survival from melanoma.**

**PURPOSE:** A cohort study was carried out to test the hypothesis that higher vitamin D levels reduce the risk of relapse from melanoma.

**METHODS:** A pilot retrospective study of 271 patients with melanoma suggested that vitamin D may protect against recurrence of melanoma. We tested these findings in a survival analysis in a cohort of 872 patients recruited to the Leeds Melanoma Cohort (median follow-up, 4.7 years).

**RESULTS:** In the retrospective study, self-reports of taking vitamin D supplements were nonsignificantly correlated with a reduced risk of melanoma relapse (odds ratio = 0.6; 95% CI, 0.4 to 1.1; P = .09). Nonrelapsers had higher mean 25-hydroxyvitamin D(3) levels than relapsers (49 v 46 nmol/L; P = .3; not statistically significant). In the cohort (prospective) study, higher 25-hydroxyvitamin D(3) levels were associated with lower Breslow thickness at diagnosis (P = .002) and were independently protective of relapse and death: the hazard ratio for relapse-free survival (RFS) was 0.79 (95% CI, 0.64 to 0.96; P = .01) for a 20 nmol/L increase in serum level. There was evidence of interaction between the vitamin D receptor (VDR) BsmI genotype and serum 25-hydroxyvitamin D(3) levels on RFS.

**CONCLUSION:** Results from the retrospective study were consistent with a role for vitamin D in melanoma outcome. The cohort study tests this hypothesis, providing evidence that higher 25-hydroxyvitamin D(3) levels, at diagnosis, are associated with both thinner tumors and better survival from melanoma, independent of Breslow thickness. Patients with melanoma, and those at high risk of melanoma, should seek to ensure vitamin D sufficiency. Additional studies are needed to establish optimal serum levels for patients with melanoma.

**Livelli sierici di 25-idrossi vitamina D3 superiori al momento della presentazione sono associati ad un miglioramento della sopravvivenza da melanoma, ma non vi è alcuna evidenza che siano protratti nel tempo.**

Commentato su :

J Clin Oncol. 2009 Nov 10;27(32):5439-44.

**I livelli sierici di 25-idrossivitamin D3 sono associati con ispessimento del tumore ( indice di Breslow) alla presentazione e alla sopravvivenza di melanoma.**

SCOPO: uno studio di coorte è stato condotto per testare l'ipotesi che maggiori livelli di vitamina D riduce il rischio di recidiva da melanoma.

METODI: Uno studio retrospettivo pilota di 271 pazienti con melanoma ha suggerito che la

vitamina D può proteggere contro la reiterazione del melanoma. Abbiamo testato questi risultati in una analisi di sopravvivenza in una coorte di 872 pazienti reclutati per il Melanoma Leeds coorte (follow-up medio, 4.7 anni).

**RISULTATI:** In questo studio retrospettivo, self-report di assumere supplementi di vitamina D sono stati non significativamente correlati con un ridotto rischio di ricaduta melanoma (odds ratio = 0.6, 95% CI, 0,4-1,1, p = 0,09). Nonrelapsers avevano una più alta media di 25-idrossivitamina D (3) livelli di relapser (49 v 46 nmol / L, P = 0,3; non statisticamente significativa). Nella coorte (potenziale) di studio, superiore di 25-idrossivitamina D (3) livelli sono stati associati ad una minore spessore di Breslow alla diagnosi (P = .002) e sono risultati indipendentemente protettivo di recidiva e di morte: l'hazard ratio per la sopravvivenza libera da recidiva (RFS ) è stato 0.79 (95% CI, 0,64-0,96, p = 0,01) per un nmol 20 / L aumento del livello sierico. Non c'era evidenza di interazione tra il recettore della vitamina D (VDR) genotipo BsmI e siero di 25-idrossivitamina D (3) livelli su RFS.

**CONCLUSIONE:** I risultati dello studio retrospettivo sono stati coerenti con un ruolo della vitamina D in esito melanoma. Lo studio di coorte prove di questa ipotesi, dimostrando che l'aumento di 25-idrossivitamina D (3) livelli, al momento della diagnosi, sono associati con entrambi i tumori più sottile e una migliore sopravvivenza da melanoma, indipendente da spessore di Breslow. I pazienti con melanoma, e di quelli ad alto rischio di melanoma, devono cercare di garantire la sufficienza di vitamina D. Sono necessari ulteriori studi per stabilire i livelli sierici ottimali per i pazienti con melanoma.

37: Chatterjee M, Janarthan M, Manivannan R, Rana A, Chatterjee M.

**Combinatorial effect of fish oil (Maxepa) and 1alpha,25-dihydroxyvitamin D(3) in the chemoprevention of DMBA-induced mammary carcinogenesis in rats.**

Chem Biol Interact. 2010 Oct 6;188(1):102-10.

The present study demonstrates the anti-tumor effects of combined supplementations of dietary fish oil (Maxepa) and 1alpha,25-dihydroxyvitamin D(3) (vitamin D(3)) on 7,12-dimethylbenz(alpha)anthracene (DMBA)-induced rat mammary carcinogenesis. Female Sprague-Dawley rats at 50 days of age were treated with 7,12-dimethylbenz(alpha)anthracene (DMBA; 0.5mg/100g body weight) by a single tail vein injection in an oil emulsion. Both fish oil (rich in EPA and DHA) and vitamin D(3) were administered orally at a dose of 0.5 ml/day/rat and 0.3 microg/100 microL propylene glycol twice a week respectively and continued to 35 weeks after DMBA administration. Fish oil in combination with vitamin D(3) resulted in a significant reduction in incidence, multiplicity and volume of mammary tumors. These supplementation also inhibited DMBA-induced mammary 7-methylguanine DNA adducts formation, which was measured by HPLC-fluorescence assay (at four sequential time points; ANOVA, F=42.56, P<0.0001). Immunohistochemical analysis revealed that the effect of fish oil and vitamin D(3) occurred through suppression of cell proliferation (BrdU-LI: P<0.0001). Fish oil and vitamin D(3) together also reduced the mRNA expression of iNOS (84%, P<0.05). In view of their natural availability, non-toxicity and acceptability; combined supplementation of fish oil and vitamin D(3) might be effective for chemoprevention of mammary carcinogenesis.

**Effetto combinato di olio di pesce (Maxepa) e 1alfa ,25-diidrossivitamina D (3) nella chemioprevenzione dei DMBA carcinogenesi mammaria indotta nei ratti.**

Il presente studio dimostra gli effetti anti-tumorali di supplementazioni combinato di olio di pesce nella dieta (Maxepa) e 1alfa ,25-diidrossivitamina D (3) (vitamina D (3)) a 7,12 dimetilbenz-(alpha) antracene (DMBA) - carcinogenesi mammaria indotta nel ratto. Maschio ratti Sprague-Dawley a 50 giorni di età sono stati trattati con 7,12-dimetilbenz (alpha) antracene (DMBA; peso corporeo 0.5mg/100g) da una singola iniezione in vena della coda una emulsione di olio. Sia l'olio di pesce (ricco di EPA e DHA) e vitamina D (3) sono stati somministrati per via orale alla dose di 0,5 ml / giorno / ratto e 0,3 microg/100 glicole propilenico microL due volte la settimana, rispettivamente, e continuò a 35 settimane dopo la somministrazione DMBA. L'olio di pesce, in combinazione con la vitamina D (3) ha determinato una significativa riduzione dell'incidenza, la molteplicità e il volume dei tumori mammari. Questi supplementazione anche inibito DMBA indotta mammaria 7-metilguanina formazione addotti di DNA, che è stata misurata mediante test HPLC-fluorescenza (a quattro punti di tempo sequenziale; ANOVA, F = 42,56, P <0,0001). L'analisi immunoistochimica ha rivelato che l'effetto dell'olio di pesce e vitamina D (3) è avvenuta attraverso la soppressione della proliferazione cellulare (BrdU-LI: P <0,0001). Olio di pesce e vitamina D (3) insieme anche ridotto l'espressione di mRNA di iNOS (84%, P <0,05). In considerazione della loro disponibilità

naturale, non-tossicità e accettabilità; integrazione combinata di olio di pesce e vitamina D (3) potrebbe essere efficace per la chemioprevenzione della carcinogenesi mammaria.

38: Kimura M, Rabbani Z, Mouraviev V, Tsivian M, Caso J, Satoh T, Baba S, Vujaskovic Z, Baust JM, Baust JG, Polascik TJ.

**Role of vitamin D(3) as a sensitizer to cryoablation in a murine prostate cancer model: preliminary in vivo study.**

Urology. 2010 Sep;76(3):764.e14-20. PubMed PMID: 20599255.

**OBJECTIVES:** Calcitriol has been reported to have antitumor efficacy in several cancers. In this study, we hypothesized that calcitriol may potentially function as a cryosensitizer that can enhance cryoablation, and we investigated several molecular marker changes in a murine model of prostate cancer.

**METHODS:** Murine prostate tumors (RM-9) were grown in male C57BL/6J mice subcutaneously with neoadjuvant intratumoral injection of calcitriol followed by cryoablation. The microenvironmental changes after cryoablation alone and in combination with calcitriol were analyzed in a comparative fashion using immunohistochemistry and Western blot analyses.

**RESULTS:** Both cryoablation and the combination group could suppress tumor growth after treatment compared with the control. At final pathologic assessment, a larger necrotic area was seen in the combination group ( $P = .026$ ). Although microvessel density (CD31) and the area of hypoxia (pimonidazole) was not different between the control and combination groups, cell proliferation (Ki-67) significantly decreased in the combination treatment ( $P = .035$ ). In Western blot analyses, several markers for apoptosis were expressed significantly higher with the combination treatment.

**CONCLUSIONS:** The synergistic effect of calcitriol with cryoablation was demonstrated because of enhanced antitumor efficacy by increasing necrosis and apoptosis and reduced cell proliferation. This study suggests that calcitriol is a potentially applicable reagent as a freeze sensitizer to cryoablation.

**Ruolo della vitamina D (3) come sensibilizzatore per la crioablazione in un modello murino di carcinoma prostatico: studio preliminare in vivo.**

**OBIETTIVI:** calcitriolo è stato segnalato per avere efficacia antitumorale di diversi tipi di cancro. In questo studio, abbiamo ipotizzato che il calcitriolo può potenzialmente funzionare come un cryosensitizer che possono migliorare la crioablazione, e abbiamo studiato diverse modifiche marker molecolari in un modello murino di cancro alla prostata.

**METODI:** i tumori della prostata murina (RM-9) sono state allevate in topi di sesso maschile C57BL/6J per via sottocutanea con neoadiuvante iniezione intratumorale di calcitriolo seguita da crioablazione. I cambiamenti microambientali dopo crioablazione da solo e in combinazione con calcitriolo sono stati analizzati in modo comparato con immunoistochimica e western blot.

**RISULTATI:** Entrambi crioablazione e il gruppo di combinazione potrebbe sopprimere la crescita del tumore dopo il trattamento rispetto al controllo. Alla valutazione patologica finale, una più grande zona necrotica è stato osservato nel gruppo di combinazione ( $P = 0,026$ ). Sebbene densità

dei microvasi (CD31) e la zona di ipossia (pimonidazole) non era differente tra i gruppi di controllo e combinazione, la proliferazione cellulare (Ki-67) è diminuito in modo significativo nel trattamento di combinazione (P = 0,035). Nelle analisi di Western blot, i marcatori diversi per apoptosi sono state espresse significativamente più elevata con la terapia di associazione. **CONCLUSIONI:** L'effetto sinergico di calcitriolo con crioablazione è stata dimostrata a causa di una maggiore efficacia antitumorale di necrosi in aumento e l'apoptosi e la proliferazione cellulare ridotto. Questo studio suggerisce che calcitriolo è un reagente potenzialmente applicabile come sensibilizzante congelare per crioablazione.

39:Thill M, Fischer D, Hoellen F, Kelling K, Dittmer C, Landt S, Salehin D, Diedrich K, Friedrich M, Becker S.

**Prostaglandin metabolising enzymes and PGE2 are inversely correlated with vitamin D receptor and 25(OH)2D3 in breast cancer.**

Anticancer Res. 2010 May;30(5):1673-9. PubMed PMID: 20592360.

**BACKGROUND:** Breast cancer is associated with inflammatory processes based on an up-regulation of cyclooxygenase-2 (COX-2) expression. The antiproliferative effects of calcitriol (1,25(OH)(2)D(3)) mediated via the vitamin D receptor (VDR) render vitamin D a promising target in breast cancer therapy. First data suggest a correlation between vitamin D and prostaglandin metabolism.

**MATERIALS AND METHODS:** We determined the expression of VDR, COX-2, 15-PGDH and the prostaglandin receptors EP(2)/EP(4) in normal and malignant breast tissue by real-time PCR and Western blot analysis, as well as 25(OH)(2)D(3) and PGE(2) plasma levels from healthy and breast cancer patients.

**RESULTS:** Significantly higher COX-2, lower VDR and lower EP(2) and EP(4) receptor protein levels in the malignant tissue and a significantly lower 15-PGDH protein level in normal breast tissue were detected. Breast cancer patients older than 45 years, diagnosed and sampled in the winter time had significantly lower 25(OH)(2)D(3) and higher PGE(2) serum levels.

**CONCLUSION:** The inverse correlation between VDR and both COX-2 and 15-PGDH, as well as between PGE(2) and 25(OH)(2)D(3) levels, suggests a possible link between VDR-associated target genes and prostaglandin metabolism.

**Le prostaglandine PGE2 e gli enzimi che le metabolizzano sono inversamente correlati con il recettore della vitamina D e 25 (OH) 2D3 nel cancro della mammella.**

**BACKGROUND:** Il carcinoma mammario è associata a processi infiammatori basa su un up-regolazione della ciclossigenasi-2 (COX-2) espressione. L'effetto antiproliferativo di calcitriolo (1,25 (OH) (2) D (3)) mediata dal recettore della vitamina vitamina rendere D (VDR) D un bersaglio promettente nella terapia del cancro al seno. I primi dati indicano una correlazione tra vitamina D e il metabolismo delle prostaglandine.

**MATERIALI E METODI:** Abbiamo determinato l'espressione di VDR, COX-2, 15-PGDH ei recettori delle prostaglandine EP (2) / EP (4) nei tessuti normali e maligni del seno mediante PCR real-time e l'analisi occidentale della macchia, così come 25 (OH) (2) D (3) e PGE (2) i livelli plasmatici di pazienti affetti da cancro al seno e sano.

**RISULTATI:** COX-2 significativamente più alto, più basso e inferiore VDR EP (2) e PE (4) i livelli di proteina recettore nel tessuto maligno e un livello significativamente più basso della proteina 15-

PGDH in tessuto normale del seno sono stati rilevati. Pazienti con tumore mammario di età superiore ai 45 anni, diagnosticati e campione d'inverno era significativamente più bassa di 25 (OH) PGE (2) D (3) e superiore (2) i livelli sierici. CONCLUSIONE: La correlazione inversa tra VDR e sia la COX-2 e 15-PGDH, nonché tra PGE (2) e 25 (OH) (2) D (3) livelli, suggerisce un possibile legame tra geni bersaglio VDR-associati e prostaglandina metabolismo.

40: Muindi JR, Yu WD, Ma Y, Engler KL, Kong RX, Trump DL, Johnson CS.

### **CYP24A1 inhibition enhances the antitumor activity of calcitriol.**

Endocrinology. 2010 Sep;151(9):4301-12.

High systemic exposures to calcitriol are necessary for optimal antitumor effects. Human prostate cancer PC3 cells are insensitive to calcitriol treatment. Therefore, we investigated whether the inhibition of 24-hydroxylase (CYP24A1), the major calcitriol inactivating enzyme, by ketoconazole (KTZ) or RC2204 modulates calcitriol serum pharmacokinetics and biologic effects. Dexamethasone (Dex) was added to minimize calcitriol-induced hypercalcemia and as a steroid replacement for the KTZ inhibition of steroid biosynthesis cytochrome P450 enzymes. KTZ effectively inhibited time-dependent calcitriol-inducible CYP24A1 protein expression and enzyme activity in PC3 cells and C3H/HeJ mouse kidney tissues. Systemic calcitriol exposure area under the curve was higher in mice treated with a combination of calcitriol and KTZ than with calcitriol alone. KTZ and Dex synergistically potentiated calcitriol-mediated antiproliferative effects in PC3 cells in vitro; this effect was associated with enhanced apoptosis. After treatment with calcitriol and KTZ/Dex, although caspase-9 and caspase-3 were not activated and cytochrome c was not released by mitochondria, caspase-8 was activated and the truncated Bid protein level was increased. Translocation of apoptosis-inducing factor to the nucleus was observed, indicating a role of the apoptosis-inducing factor-mediated and caspase-independent apoptotic pathways. Calcitriol and KTZ/Dex combination suppressed the clonogenic survival and enhanced the growth inhibition observed with calcitriol alone in PC3 human prostate cancer xenograft mouse model. Our results show that the administration of calcitriol in combination with CYP24A1 inhibitor enhances antiproliferative effects, increases systemic calcitriol exposure, and promotes the activation of caspase-independent apoptosis pathway.

### **Inibizione di CYP24A1 migliora l'attività antitumorale del calcitriolo.**

Esposizioni di alta sistemica al calcitriolo sono necessari per gli effetti antitumorali ottimale. Cellule umane di cancro alla prostata PC3 sono insensibili al trattamento calcitriolo. Quindi, abbiamo studiato se l'inibizione di 24-idrossilasi (CYP24A1), l'enzima calcitriolo principali inattivanti, dal ketoconazolo (KTZ) o RC2204 modula farmacocinetica sierica di calcitriolo e effetti biologici. Desametasone (Dex) è stato aggiunto per ridurre al minimo calcitriolo ipercalcemia indotta e in sostituzione degli steroidi per l'inibizione degli enzimi KTZ steroide biosintesi del citocromo P450. KTZ efficacemente inibito tempo-dipendente l'espressione calcitriolo-inducibile della proteina CYP24A1 e l'attività enzimatica nelle cellule PC3 e C3H/HeJ tessuti di rene di topo. Area di esposizione sistemica calcitriolo sotto la curva era più alta nei topi trattati con una combinazione di calcitriolo e KTZ che con calcitriolo solo.

KTZ e Dex sinergicamente potenziati gli effetti antiproliferativi calcitriolo-mediata in cellule PC3 in vitro; questo effetto è stato associato con una maggiore apoptosi. Dopo il trattamento con calcitriolo e KTZ / Dex, sebbene caspasi-9 e della caspasi-3 non sono stati attivati e il citocromo c non è stato rilasciato dai mitocondri, caspasi-8 è stata attivata e il livello di proteina troncata offerta è stata aumentata. Traslocazione di indurre apoptosi-fattore per il nucleo è stato osservato, indicando un ruolo di indurre l'apoptosi mediata dal fattore di percorsi e di caspasi-indipendente apoptotici. Calcitriolo e KTZ combinazione di Dex ha soppresso la sopravvivenza clonogenica e rafforzato l'inibizione della crescita osservata con calcitriolo solo nel modello umano PC3 cancro alla prostata del mouse xenotrapianto. I nostri risultati mostrano che la somministrazione di calcitriolo in combinazione con inibitori CYP24A1 migliora effetto antiproliferativo, aumenta l'esposizione sistemica calcitriolo, e promuove l'attivazione del pathway apoptosi caspasi-indipendente.

42: Ma Y, Yu WD, Trump DL, Johnson CS.

### **1,25D3 enhances antitumor activity of gemcitabine and cisplatin in human bladder cancer models.**

Cancer. 2010 Jul 1;116(13):3294-303.

**BACKGROUND:** 1,25 dihydroxyvitamin D3 (1,25D3) potentiates the cytotoxic effects of several common chemotherapeutic agents. The combination of gemcitabine and cisplatin is a current standard chemotherapy regimen for bladder cancer. The authors investigated whether 1,25D3 could enhance the antitumor activity of gemcitabine and cisplatin in bladder cancer model systems.

**METHODS:** Human bladder cancer T24 and UMUC3 cells were pretreated with 1,25D3 followed by gemcitabine and cisplatin. Apoptosis was assessed by annexin V staining. Caspase activation was examined by immunoblot analysis and substrate-based caspase activity assay. The cytotoxic effects were examined by using 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) and in vitro clonogenic assay. p73 protein levels were assessed by immunoblot analysis. Knockdown of p73 was achieved by siRNA. The in vivo antitumor activity was assessed by in vivo excision clonogenic assay and tumor regrowth delay in the T24 xenograft model.

**RESULTS:** 1,25D3 pretreatment enhanced gemcitabine and cisplatin-induced apoptosis and the activities of caspases 8, 9, and 3 in T24 and UMUC3 cells. 1,25D3 synergistically reduced gemcitabine and cisplatin-suppressed surviving fraction in T24 cells. 1,25D3, gemcitabine, or cisplatin induced p73 accumulation, which was enhanced by gemcitabine and cisplatin or 1,25D3 and gemcitabine and cisplatin. p73 expression was lower in human primary bladder tumor tissue compared with adjacent normal tissue. Knockdown of p73 increased clonogenic capacity of T24 cells treated with 1,25D3, gemcitabine and cisplatin, or 1,25D3 and gemcitabine and cisplatin. 1,25D3 and gemcitabine and cisplatin combination enhanced tumor regression compared with 1,25D3 or gemcitabine and cisplatin alone.

**CONCLUSIONS:** 1,25D3 potentiates gemcitabine and cisplatin-mediated growth inhibition in human bladder cancer models in vitro and in vivo, which involves p73 induction and apoptosis.

### **1,25 D3 aumenta l'attività antitumorale di gemcitabina e cisplatino in modelli umani cancro della vescica**

**BACKGROUND:** 1,25 diidrossivitamin D3 (1,25 D3) potenzia l'effetto citotossico di alcuni comuni agenti chemioterapici. La combinazione di gemcitabina e cisplatino è un regime attuale standard di chemioterapia per il cancro della vescica. Gli autori hanno studiato se 1,25 D3 può aumentare l'attività antitumorale di gemcitabina e cisplatino nei sistemi di cancro della vescica

modello.

**METODI:** Human T24 tumore della vescica e le cellule UMUC3 sono stati pretrattati con 1,25 D3 seguita da gemcitabina e cisplatino. L'apoptosi è stata valutata mediante annessina V colorazione. L'attivazione delle caspasi è stata esaminata mediante analisi immunoblot e substrato a base di dosaggio dell'attività di caspasi. Gli effetti citotossici sono stati esaminati usando 3 - (4,5-dimetil-2-tiazolil) bromuro -2,5-difenil-2H-tetrazolio (MTT) e test in vitro clonogenico. Livelli della proteina p73 sono stati valutati mediante analisi immunoblot. Colpo di p73 è stato raggiunto da siRNA. L'attività antitumorale in vivo è stata valutata mediante test in vivo clonogenica escissione e la ricrescita del tumore in ritardo il modello T24 xenotrapianto.

**RISULTATI:** gemcitabina 1,25 pretrattamento D3 rafforzata e cisplatino apoptosi indotta e le attività delle caspasi 8, 9 e 3 in T24 e cellule UMUC3. 1,25 D3 sinergicamente ridotto gemcitabina e cisplatino-soppresso superstita frazione nelle cellule T24. 1,25 D3, gemcitabina, cisplatino o indotta da p73 accumulo, che è stata arricchita da gemcitabina e cisplatino o 1,25 D3 e gemcitabina e cisplatino. p73 espressione era più bassa nel tessuto primario del tumore della vescica rispetto al tessuto normale adiacente. Colpo di p73 aumento della capacità di clonogeniche T24 cellule trattate con 1,25 D3, gemcitabina e cisplatino, o 1,25 D3 e gemcitabina e cisplatino. 1,25 e D3 gemcitabina e cisplatino maggiore regressione del tumore rispetto a 1,25 D3 o gemcitabina e cisplatino da solo.

**CONCLUSIONI:** 1,25 D3 potenzia gemcitabina e cisplatino inibizione della crescita mediata nei modelli di tumore della vescica umana in vitro e in vivo, che coinvolge p73 e l'induzione dell'apoptosi.

45: Cordes T, Fischer D, Thill M, Becker S, Friedrich M, Salehin D.

**Vitamin D-1alpha-hydroxylase and vitamin D-24-hydroxylase in benign and malign breast tissue.**

Eur J Gynaecol Oncol. 2010;31(2):151-5. PubMed PMID: 20527229.

**BACKGROUND:** It is known that 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> can be metabolized to 1,24(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> in breast tissue. This tissue-specific expression of 24-OHase may act as a pivotal link between vitamin D status (25(OH)D<sub>3</sub> level) and the anticancer effects of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. Different expressions of the enzymes of vitamin D metabolism are found in breast cancer cells and tissues, and alternative splicing may play a role in biological functions and may cause tissue-specific variations. We describe the expression of vitamin D-1alpha-hydroxylase and vitamin D-24-hydroxylase in benign and malign breast tissues. We estimated that alternative splicing of the enzymes would lead to a catalytically dysfunctional product and may lead to a lower reduction of the target protein.

**MATERIAL AND METHODS:** Expression of 1alpha-OHase and 24-OHase RNA and protein was assessed using a real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) and on protein level by Western blot in benign and malign breast tissue samples.

**RESULTS:** In breast cancer tissue the expression of 1alpha-OHase and 24-OHase were reduced significantly compared to benign breast tissue.

**CONCLUSION:** The results described above do not support results of previous studies. Alternative splicing of 1alpha-OHase and 24-OHase may regulate the levels of active enzyme but is more likely due to different cell types in samples with the result of testing a variety of tissue samples not purified benign and malign breast cancer cells. The significance of smaller variants in cells has not been clarified either, but it is known that they are not able to use 25(OH)D<sub>3</sub> as a substrate to generate 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>.

**Vitamina D-1alfa-idrossilasi e vitamina D-24-idrossilasi nel tessuto mammario benigno e maligno.**

**BACKGROUND:** È noto che la 1,25 (OH) 2D<sub>3</sub> può essere metabolizzato a 1,24 (OH) 2D<sub>3</sub> nel tessuto del seno. Questa espressione tessuto-specifica di 24-OHase può agire come un legame cruciale tra lo stato della vitamina D (25 (OH) livello D<sub>3</sub>) e gli effetti antitumorali di 1,25 (OH) 2D<sub>3</sub>. Diverse espressioni degli enzimi del metabolismo della vitamina D si trovano nelle cellule di carcinoma mammario e tessuti, e splicing alternativo può giocare un ruolo in funzioni biologiche e possono indurre alterazioni tessuto-specifiche. Descriviamo l'espressione di vitamina D-1alfa-

idrossilasi e vitamina D-24-idrossilasi in natura benigna o maligna dei tessuti del seno. Abbiamo stimato che lo splicing alternativo degli enzimi porterebbe ad un prodotto cataliticamente disfunzionale e può portare ad una riduzione inferiore della proteina bersaglio. MATERIALI E METODI: Espressione di 1alfa-OHase e 24-OHase RNA e proteine è stata valutata utilizzando un real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) e della proteina mediante Western Blot in campioni mammarie benigne e maligne del tessuto.

RISULTATI: Nel tessuto del cancro della mammella l'espressione di 1alfa-OHase e 24-OHase sono sensibilmente diminuiti, rispetto al tessuto mammario benigno.

CONCLUSIONE: I risultati sopra descritti non supportano i risultati di studi precedenti. Splicing alternativo di 1alfa-OHase e 24-OHase possono regolare i livelli di enzima attivo ma è più probabile a causa di diversi tipi di cellule in campioni con il risultato delle prove una serie di campioni di tessuto non depurata benigne e maligne delle cellule del cancro al seno. L'importanza delle piccole varianti in cellule non è stata chiarita neanche, ma si sa che non sono in grado di utilizzare 25 (OH) D3 come substrato per la generazione 1,25 (OH)<sub>2</sub> D3.

46: McCullough ML, Bostick RM, Daniel CR, Flanders WD, Shaukat A, Davison J, Rangaswamy U, Hollis BW.

#### **Vitamin D status and impact of vitamin D3 and/or calcium supplementation in a randomized pilot study in the Southeastern United States.**

J Am Coll Nutr. 2009 Dec;28(6):678-86. PubMed PMID: 20516268.

OBJECTIVE: Vitamin D supplementation may be required for certain subgroups in the United States in whom status and intake are inadequate, but the impact of various doses, and whether calcium administration jointly or independently influences vitamin D metabolite levels, is unclear.

METHODS: In a pilot chemoprevention trial of biomarkers of risk for colorectal adenoma, we measured the impact of vitamin D supplementation and/or calcium supplementation on plasma vitamin D metabolite concentrations. Ninety-two adult men and women living in the southeastern United States were randomized to 800 IU vitamin D(3), 2000 mg elemental calcium, both, or placebo daily for 6 months. We examined vitamin D status at baseline and postintervention and compared the change in plasma 25-hydroxyvitamin D (25(OH)D) and 1,25(OH)<sub>2</sub>D levels by intervention group using general linear models.

RESULTS: Eighty-two percent of the study population had insufficient plasma 25(OH)D concentrations (<75 nmol/L) at baseline, with the lowest levels observed among African American participants. Vitamin D supplements, with or without calcium supplementation, raised plasma 25(OH)D concentrations, on average, by 25 to 26 nmol/L. Half of the study participants were classified as having sufficient 25(OH)D status after 6 months of 800 IU of vitamin D(3) daily. Calcium alone did not influence 25(OH)D concentrations.

CONCLUSION: In this southeastern U.S. population, half of the study participants receiving 800 IU vitamin D(3) daily had blood 25(OH)D concentrations of  $\leq 75$  nmol/L after a 6-month intervention period, supporting higher vitamin D dose requirements estimated by some groups. More research is needed to identify the optimal vitamin D dose to improve 25(OH)D status in various at-risk populations.

#### **La vitamina D e l'impatto della vitamina D3 e / o integratori di calcio in uno studio pilota randomizzato nel sud-est degli Stati Uniti.**

OBIETTIVO: integrazione di vitamina D può essere richiesto per alcuni sottogruppi negli Stati Uniti, in cui stato e di aspirazione sono insufficienti, ma l'impatto di varie dosi, e se la somministrazione di calcio, congiuntamente o in maniera indipendente influenza i livelli di

vitamina D metabolita, non è chiaro.

**METODI:** In uno studio pilota chemioprevenzione dei biomarkers di rischio per adenoma coloretale, abbiamo misurato l'impatto della supplementazione di vitamina D e / o integratori di calcio sulle concentrazioni plasmatiche di vitamina D metabolita. Ninety-two uomini adulti e donne che vivono nel sud degli Stati Uniti sono stati randomizzati a 800 UI di vitamina D (3), 2000 mg di calcio elementare, entrambi o placebo al giorno per 6 mesi. Abbiamo esaminato lo stato della vitamina D al basale e post-intervento e hanno confrontato i cambiamenti nel plasma di 25-idrossivitamina D (25 (OH) D) e 1,25 (OH) (2) livelli di D da parte del gruppo di intervento utilizzando i modelli lineari generali.

**RISULTATI:** L'ottanta per cento della popolazione di studio era insufficiente plasma 25 (OH) D concentrazioni (<75 nmol / L) al basale, con i più bassi livelli osservati tra gli afro americani partecipanti. Integratori di vitamina D, con o senza supplementazione di calcio, ha sollevato plasma 25 (OH) D concentrazioni, in media, da 25 a 26 nmol / L. Metà dei partecipanti allo studio sono stati classificati come sufficienti 25 (OH) D di stato dopo 6 mesi di 800 UI di vitamina D (3) al giorno. Il calcio da solo non ha influenza 25 (OH) D concentrazioni.

**CONCLUSIONE:** In questa popolazione del sud-est degli Stati Uniti, la metà dei partecipanti allo studio ricevere 800 UI di vitamina D (3) al giorno hanno il sangue 25 (OH) D di concentrazione <= 75 nmol / L dopo un periodo di intervento di 6 mesi, il sostegno maggiore di vitamina D requisiti dose stimata da alcuni gruppi. Sono necessarie ulteriori ricerche per identificare la dose ottimale di vitamina D per migliorare la 25 (OH) D di stato in varie popolazioni a rischio.

47: Lagunova Z, Porojnicu AC, Grant WB, Bruland Ø, Moan JE.

**Obesity and increased risk of cancer: does decrease of serum 25-hydroxyvitamin D level with increasing body mass index explain some of the association?**

Mol Nutr Food Res. 2010 Aug;54(8):1127-33.

Low levels of vitamin D and excess body weight are both factors associated with increased risk of cancer. The increased risk seems to be proportional to the increase in BMI, and to decrease in serum 25-hydroxyvitamin D (25(OH)D) level. Our earlier investigations suggest that serum 25(OH)D levels decrease with increasing BMI. Although the connection between cancer risk, BMI and vitamin D status might be arbitrary, it has not been discussed in the literature so far. In this study, we analyze data published in current meta-analysis, prospective studies, and systematic reviews on cancer-specific risk attributed to high BMI and low vitamin D status. The contribution of low 25(OH)D levels associated with high BMI to increased cancer risk was calculated for 13 vitamin-D-sensitive cancers with a focus on colorectal and breast cancer as the most frequently studied vitamin-D-sensitive cancer types. Our study suggests that a low vitamin D status may explain at least 20% of the cancer risk attributable to high BMI. The contribution of low 25(OH)D to the increased cancer risk with increasing BMI may be different for different cancer types. Thus, we find 40% for breast cancer, and 26 and 75% for colorectal cancer in men and women, respectively.

**L'obesità e l' aumento del rischio di cancro: i livelli sierici di 25-idrossivitamina D non diminuiscono con l'aumentare dell'indice di massa corporea .**

Bassi livelli di vitamina D e del peso corporeo in eccesso sono entrambi fattori associati con un aumentato rischio di cancro. L'aumento del rischio sembra essere proporzionale all'aumento del BMI, e per diminuire nel siero di 25-idrossivitamina D (25 (OH) D) livello. Le nostre indagini precedenti suggeriscono che il siero 25 (OH) D diminuire i livelli con l'aumento del BMI. Anche se la connessione tra rischio di cancro, BMI e di vitamina D potrebbe risultare arbitrario, non è stato discusso nella letteratura finora. In questo studio, abbiamo analizzato i dati pubblicati nella corrente meta-analisi, gli studi prospettici, e revisioni sistematiche sul rischio di cancro-specifica attribuita al BMI alto e basso livello di vitamina D. Il contributo della bassa 25 (OH) D associata a livelli elevati di BMI aumentato rischio di cancro è stato calcolato per 13 tipi di cancro della vitamina-D-sensitive con un focus sul cancro del colon-retto e della mammella, come i tipi di cancro più frequentemente studiate vitamina-D-sensitive. Il nostro studio suggerisce che un basso livello di vitamina D può spiegare almeno il 20% del rischio di cancro attribuibile ad alto indice di massa corporea. Il contributo di basso di 25 (OH) D di rischio di cancro aumenta con l'aumento del BMI possono essere diverse per diversi tipi di cancro. Così, troviamo il 40% per il cancro al seno, e il 26 e il 75% per i tumori coloretali negli uomini e nelle donne, rispettivamente.

48: Krishnan AV, Trump DL, Johnson CS, Feldman D.

**The role of vitamin D in cancer prevention and treatment.**

Endocrinol Metab Clin North Am. 2010 Jun;39(2):401-18, table of contents.

Calcitriol (1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>), the hormonally active form of vitamin D, exerts growth inhibitory and prodifferentiating effects on many malignant cells and retards tumor growth in animal models. Calcitriol is being evaluated as an anticancer agent in several human cancers. The mechanisms underlying the anticancer effects of calcitriol include inhibition of cell proliferation, stimulation of apoptosis, suppression of inflammation, and inhibition of tumor angiogenesis, invasion, and metastasis. This review discusses some of the molecular pathways mediating these anticancer actions of calcitriol and the preclinical data in cell culture and animal models. The clinical trials evaluating the use of calcitriol and its analogues in the treatment of patients with cancer are described. The reasons for the lack of impressive beneficial effects in clinical trials compared with the substantial efficacy seen in preclinical models are discussed.

**Il ruolo della vitamina D nella prevenzione del cancro e il trattamento.**

Calcitriolo (1,25-diidrossivitamina D (3)), la forma ormonale attiva della vitamina D, esercita inibizione della crescita e gli effetti prodifferentiating su molte cellule maligne e ritarda la crescita tumorale in modelli animali. Calcitriolo viene valutato come un agente antitumorale in diversi tumori umani. I meccanismi alla base degli effetti antitumorali di calcitriolo includono l'inibizione della proliferazione cellulare, la stimolazione di apoptosi, la soppressione della infiammazione, e l'inibizione dell'angiogenesi tumorale, invasione e metastasi. Questa recensione descrive alcune delle vie molecolari di queste azioni di mediazione antitumorale di calcitriolo ed i dati preclinici in modelli di colture cellulari e animali. Gli studi clinici che hanno valutato l'impiego di calcitriolo e dei suoi analoghi per il trattamento dei pazienti con tumore sono descritti. Le ragioni della mancanza di impressionanti effetti benefici in studi clinici in confronto con l'efficacia sostanziale visto in modelli preclinici sono discusse.

49: Binkley N, Ramamurthy R, Krueger D.

**Low vitamin D status: definition, prevalence, consequences, and correction.**

Endocrinol Metab Clin North Am. 2010 Jun;39(2):287-301, table of contents.

Vitamin D is obtained from cutaneous production when 7-dehydrocholesterol is converted to vitamin D(3) (cholecalciferol) by ultraviolet B radiation or by oral intake of vitamin D(2) (ergocalciferol) and D(3). An individual's vitamin D status is best evaluated by measuring the circulating 25-hydroxyvitamin D (25(OH)D) concentration. Although controversy surrounds the definition of low vitamin D status, there is increasing agreement that the optimal circulating 25(OH)D level should be approximately 30 to 32 ng/mL or above. Using this definition, it has been estimated that approximately three-quarters of all adults in the United States have low levels. Low vitamin D status classically has skeletal consequences such as osteomalacia/rickets. More recently, associations between low vitamin D status and increased risk for various nonskeletal morbidities have been recognized; whether all of these associations are causally related to low vitamin D status remains to be determined. To achieve optimal vitamin D status, daily intakes of at least 1000 IU or more of vitamin D are required. The risk of toxicity with "high" amounts of vitamin D intake is low. Substantial between-individual variability exists in response to the same administered vitamin D dose. When to monitor 25(OH)D levels has received little attention. Supplementation with vitamin D(3) may be preferable to vitamin D(2).

**Bassi di vitamina D: definizione, prevalenza, le conseguenze, e la correzione.**

La vitamina D è ottenuto dalla produzione cutanea quando 7-deidrocolesterolo viene convertito in vitamina D (3) (coleciferolo) da radiazioni ultraviolette B o da assunzione orale di vitamina D (2) (ergocalciferolo) e D (3). Di un individuo status di vitamina D è meglio valutata misurando la circolare 25-idrossivitamina D (25 (OH) D) la concentrazione. Sebbene circonda polemica la definizione dello status bassi di vitamina D, vi è un crescente accordo che la circolazione ottimale di 25 (OH) D livello deve essere di circa 30-32 ng / mL o superiore. Usando questa definizione, si è stimato che circa tre quarti di tutti gli adulti negli Stati Uniti hanno bassi livelli. Basso lo stato della vitamina D è classicamente conseguenze scheletriche, come osteomalacia / rachitismo. Più recentemente, le associazioni tra lo stato di carenza di vitamina D e rischio aumentato per diverse patologie nonskeletal sono stati riconosciuti; se tutte queste associazioni sono causalmente correlate a stato di carenza di vitamina D rimane da stabilire. Per raggiungere lo stato ottimale di vitamina D, assunzione giornaliera di almeno 1000 UI o più di vitamina D sono necessari. Il rischio di tossicità con "alta" quantità di assunzione di vitamina D è basso. Notevole variabilità tra individuo esiste in risposta alla dose somministrata vitamina D stessa. Quando per monitorare 25 (OH) livelli di D ha ricevuto scarsa attenzione. La supplementazione con vitamina D (3) può essere preferibile alla vitamina D (2).

53: Brüggemann LW, Queiroz KC, Zamani K, van Straaten A, Spek CA, Bijlsma MF.

**Assessing the efficacy of the hedgehog pathway inhibitor vitamin D3 in a murine xenograft model for pancreatic cancer.**

Cancer Biol Ther. 2010 Jul;10(1):79-88.

The developmental Hedgehog (Hh) pathway has been shown to cause malignancies in the adult organism, specifically in the proximal gastrointestinal tract. Previous studies have used the Hh-inhibitory alkaloid cyclopamine to treat Hh-dependent tumor growth. The present study aimed to determine the efficacy and specificity of the recently discovered endogenous inhibitor of the Hh pathway, vitamin D3, on inhibition of pancreatic adenocarcinoma cell growth in vitro and in vivo. Vitamin D3 was found to inhibit cell growth specifically through inactivation of Smo and the downstream Hh pathway, rather than activation of the vitamin D3 receptor. However, in in vivo models vitamin D3 was not found to be effective against tumor cell growth.

**Valutare l'efficacia della vitamina D3 nel riccio come inibitore del cancro al pancreas in un modello murino xenotrapianto.**

The Hedgehog sviluppo (Hh) percorso è stato indicato per causare tumori maligni nell'organismo adulto, in particolare nel tratto prossimale gastrointestinale. Precedenti studi hanno utilizzato il Cyclopamine HH-inibitori alcaloide per curare la crescita del tumore Hh-dipendente. Il presente studio ha l'obiettivo di determinare l'efficacia e la specificità del inibitore endogeno recente scoperta della via Hh, vitamina D3, sulla inibizione della crescita delle cellule pancreatiche adenocarcinoma in vitro e in vivo. La vitamina D3 è stato trovato per inibire la crescita delle cellule in particolare attraverso l'inattivazione di Smo e la via a valle Hh, piuttosto che l'attivazione del recettore della vitamina D3. Tuttavia, in vivo in vitamina D3 modelli non è stata trovata per essere efficace contro la crescita delle cellule tumorali

54: Lange TS, Zou Y, Singh RK, Kim KK, Kristjansdottir K, Sholler GL, Brard L.

**Chemotherapeutic effect of calcidiol derivative B3CD in a neuroblastoma xenograft model.**

Chem Biol Drug Des. 2010 Aug;76(2):164-73. Epub 2010 May 11. PubMed PMID: 20492445.

Bromoacetoxy-calcidiol (B3CD), a pro-apoptotic and cytotoxic agent in neuroblastoma (NB) cell lines, displayed therapeutic potential in vivo as an anticancer drug in a NB xenograft mouse model. Tumors of all animals treated intraperitoneally with B3CD went into regression within 10-30 days of treatment, while tumors in control animals grew aggressively. The response mechanisms of NB cells to B3CD in vitro were studied and included differential targeting of cell cycle key regulators p21 and cyclin D1 on the transcriptional and expression level leading to arrest in G0/G1 phase. In contrast to the effect in ovarian cancer cells, B3CD-induced cell death in SMS-KCNR NB cells was only marginally mediated by the p38 MAPK signaling pathway. Signaling induced by exogenous recombinant EGF leads to a partial restoration of the negative effects of B3CD on SMS-KCNR cell proliferation and survival. Upon combinational treatment of SMS-KCNR cells with B3CD and recombinant EGF, the EGF receptor (EGF-R) was highly activated. We suggest future studies to include analysis of the effects of B3CD in combination therapy with pharmacological inhibitors of cell cycle regulators or with EGF-R-targeting inhibitors, -toxins or -antibodies in vitro and their translation into in vivo models of tumor development.

**Effetto chemioterapico di B3CD derivato del calcidiolo in un modello di neuroblastoma trapiantato**

Bromoacetoxy-calcidiolo (B3CD), un agente pro-apoptotico e citotossici in neuroblastoma (NB) le linee di cellule, esposti potenziale terapeutico in vivo come un farmaco antitumorale in un modello murino xenograft NB. I tumori di tutti gli animali trattati per via intraperitoneale con B3CD andò in regressione entro 10-30 giorni di trattamento, mentre i tumori negli animali di controllo è cresciuto in modo aggressivo. I meccanismi di risposta delle cellule di NB B3CD in vitro sono state studiate e inserite differenziale targeting del ciclo cellulare regolatori chiave p21 e ciclina D1 a livello trascrizionale ed espressione che porta ad arrestare in fase G0/G1. In contrasto con l'effetto in cellule di carcinoma ovarico, B3CD indotta la morte cellulare in SMS-KCNR cellule di NB è stata solo marginalmente mediata dal p38 MAPK pathway di segnalazione. Signaling indotti da EGF ricombinante esogena porta ad un parziale ripristino degli effetti negativi della proliferazione delle cellule B3CD su SMS-KCNR e la sopravvivenza. In seguito al trattamento combinatoria delle cellule SMS-KCNR con B3CD e ricombinante EGF, recettore EGF (EGF-R) è stato molto attivo. Si consiglia di studi futuri per includere l'analisi degli effetti della B3CD in terapia di combinazione con inibitori farmacologici dei regolatori del ciclo cellulare o con EGF-R-targeting inibitori,-tossine o anticorpi in vitro e la loro traduzione in modelli in vivo dello sviluppo del tumore.

55: Wei MY, Giovannucci EL.

### **Vitamin D and multiple health outcomes in the Harvard cohorts.**

Mol Nutr Food Res. 2010 Aug;54(8):1114-26.

The hypothesis that vitamin D is inversely associated with multiple health outcomes has been studied in the Harvard cohorts, including the Nurses' Health Study I (n=121,700 female nurses aged 37-64 at baseline in 1984), Nurses' Health Study II (n=116,671 female nurses aged 27-44 years at baseline in 1991), Health Professionals Follow-up Study (n=51,529 male health professionals aged 40-75 years at baseline in 1986), and Physicians' Health Study (n=22 071 male physicians aged 40-84 years at baseline in 1982). These studies assessed vitamin D through circulating 25-hydroxyvitamin D, dietary and supplemental intake, predicted 25-hydroxyvitamin D, and vitamin D receptor polymorphisms. This review summarizes studies of vitamin D and various endpoints considered in these cohorts, including risk of cardiovascular disease, hypertension, elevated plasma C-peptide, various cancers, bone fractures, and multiple sclerosis. Based on the multiple observed benefits of vitamin D, this article postulates recommendations for vitamin D intake in the US population for reduced incidence of multiple health outcomes.

### **Vitamina D e obiettivi nelle coorti ad Harvard**

L'ipotesi che la vitamina D è inversamente associato ad esiti di salute più è stato studiato nelle coorti di Harvard, tra cui il Nurses 'Health Study I (n = 121.700 infermiere di età compresa tra 37-64 al basale nel 1984), Nurses 'Health Study II (n = 116.671 infermiere di età compresa tra 27-44 anni al basale nel 1991), Health Professionals Follow-up Study (n = 51.529 operatori sanitari di sesso maschile di età compresa tra 40-75 anni al basale nel 1986), e Physicians 'Health Study (n = 22 071 di sesso maschile i medici di età compresa tra 40-84 anni al basale nel 1982). Questi studi hanno valutato la vitamina D attraverso circolanti di 25-idrossivitamina D, assunzione con la dieta e supplementari, previsti 25-idrossivitamina D e vitamina D polimorfismi del recettore. Questa revisione riassume gli studi di vitamina D e vari endpoint considerati in queste coorti, compreso il rischio di malattie cardiovascolari, ipertensione, elevati plasma C-peptide, vari tumori, fratture ossee, e la sclerosi multipla. Sulla base dei molteplici vantaggi osservati di vitamina D, in questo articolo postulati raccomandazioni per la vitamina D nella popolazione degli Stati Uniti per la ridotta incidenza di esiti sanitari multiple.

57: Lamblin M, Dabbas B, Spingarn R, Mendoza-Sanchez R, Wang TT, An BS, Huang DC, Kremer R, White JH, Gleason JL.

**Vitamin D receptor agonist/histone deacetylase inhibitor molecular hybrids.**

Bioorg Med Chem. 2010 Jun 1;18(11):4119-37.

Incorporation of zinc-binding groups into the side-chain of 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D(3) (1,25D) fully bifunctional hybrid molecules which act both as vitamin D receptor agonists and histone deacetylase inhibitors. These bifunctional hybrids display in vitro antiproliferative activity against the AT84 squamous carcinoma cell line while lacking the in vivo hypercalcemic effects of 1,25D.

**Ibridi molecolari come l'agonista del recettore della vitamina D/inibitore dell'istone deacetilasi**

Incorporazione di gruppi di zinco-vincolante nella catena laterale di 1 $\alpha$ ,25-diidrossivitamina D (3) (1,25 D) molecole ibride completamente bifunzionali che agiscono sia come agonisti del recettore della vitamina D e gli inibitori delle istone deacetilasi. Questi ibridi bifunzionali display in attività antiproliferativa in vitro contro la linea AT84 carcinoma a cellule squamose, mentre manca in vivo degli effetti ipercalcemia di 1,25 D.

59: Stefanska B, Rudnicka K, Bednarek A, Fabianowska-Majewska K.

**Hypomethylation and induction of retinoic acid receptor beta 2 by concurrent action of adenosine analogues and natural compounds in breast cancer cells.**

Eur J Pharmacol. 2010 Jul25;638(1-3):47-53. Epub 2010 May 3. PubMed PMID: 20447390.

DNA methylation is considered as a potential cause of aberrations in regulation of gene expression during carcinogenesis. Therefore, changes in DNA methylation patterns may be targets for chemoprevention. In the present study, we investigated effects of all-trans retinoic acid (ATRA), vitamin D(3), and resveratrol alone and in combination with adenosine analogues: 2-chloro-2'-deoxyadenosine (2CdA) and 9-beta-D-arabinosyl-2-fluoroadenine (F-ara-A), on methylation and expression of retinoic acid receptor beta 2 (RAR beta 2) in MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cell lines. Alterations in methylation and expression levels after treatment of cells with the tested compounds were evaluated by methylation-sensitive restriction analysis (MSRA) and real-time PCR, respectively. RAR beta 2 promoter in the tested fragment was partially methylated in MCF-7 cells and non-methylated in MDA-MB-231 cells. In MCF-7 cells, all compounds, except for resveratrol, inhibited promoter methylation and increased expression of RAR beta 2. All natural compounds improved the action of 2CdA and F-ara-A on RAR beta 2 methylation and/or expression. Combination of ATRA or vitamin D(3) with 2CdA was the most effective. In MDA-MB-231 cells, only 2CdA, F-ara-A, and ATRA induced RAR beta 2 expression without any notable effects in combined treatment. Our results demonstrate that both natural compounds and adenosine analogues are able to reduce promoter methylation and/or induce expression of RAR beta 2 in non-invasive MCF-7 cells. Furthermore, the natural compounds improve effects of adenosine analogues, however only at early non-invasive stages of carcinogenesis.

**Ipometilazione e induzione del recettore dell'acido retinoico beta 2 tramite l'azione concorrente degli analoghi dell'adenosina e i composti naturali nelle cellule mammary cancerose**

La metilazione del DNA è considerata come una potenziale causa di aberrazioni nella regolazione dell'espressione genica durante la cancerogenesi. Pertanto, i cambiamenti nei modelli di metilazione del DNA possono essere bersagli per la chemioprevenzione. Nel presente studio, abbiamo studiato gli effetti di all-trans retinoico (ATRA), la vitamina D (3), e resveratrolo solo e in combinazione con analoghi adenosina: 2-cloro-2'-deossiadenosina (2CdA) e 9-beta- D-arabinosyl-2-fluoroadenine (F-ara-A), sulla metilazione e l'espressione del recettore beta dell'acido retinoico 2 (RAR beta 2) in MCF-7 e MDA-MB-231 linee di cellule di cancro al seno. Alterazioni nei livelli di metilazione e di espressione, dopo trattamento delle cellule con i composti testati sono stati valutati mediante analisi di restrizione metilazione-sensibili (MSRA) e la PCR real-time, rispettivamente. RAR beta 2 promotore nel frammento di prova è stato parzialmente metilato in cellule MCF-7 e non metilato

nei MDA-MB-231 cellule. In cellule MCF-7, tutti i composti, ad eccezione di resveratrolo, ha inibito metilazione del promotore e una maggiore espressione di RAR beta 2. Tutti i composti naturali migliorata l'azione di 2CdA e F-ara-A su RAR beta 2 metilazione e / o di espressione. Combinazione di ATRA o di vitamina D (3) con 2CdA è stato il più efficace. In MDA-MB-231 celle, solo 2CdA, F-ara-A, e ATRA indotto RAR beta 2 di espressione, senza effetti notevoli nel trattamento combinato. I nostri risultati dimostrano che entrambi i composti naturali e analoghi dell'adenosina sono in grado di ridurre la metilazione del promotore e / o inducono l'espressione di RAR beta 2 in non invasiva cellule MCF-7. Inoltre, i composti naturali migliorare gli effetti degli analoghi adenosina, ma solo in fase precoce non invasiva della cancerogenesi.

62: Marik R, Fackler M, Gabrielson E, Zeiger MA, Sukumar S, Stearns V, Umbricht CB.

### **DNA methylation-related vitamin D receptor insensitivity in breast cancer.**

Cancer Biol Ther. 2010 Jul;10(1):44-53. Epub 2010 Jul 9. PubMed PMID: 20431345.

Calcitriol (1 $\alpha$ , 25(OH)(2)-Vitamin D3) binds to the vitamin D receptor (VDR) and regulates differentiation of the normal mammary gland, and may therefore be useful in breast cancer treatment or prevention. Many breast cancer cells are, however, resistant to Calcitriol. In this study, we investigated the resistance mechanism and the role of epigenetic silencing of VDR by promoter hypermethylation. Bisulfite sequencing of the VDR promoter region revealed methylated CpG islands at -700 base pairs (bp) upstream and near the transcription start site. VDR CpG islands were demethylated by 5'deoxy-azacytidine treatment, and this was accompanied by a parallel increase in VDR mRNA levels in breast cancer cell lines. Quantitative methylation-specific PCR analyses confirmed hypermethylation of these CpG islands in primary tumors, and its absence in normal breast tissue. VDR transcripts detected in breast cancers were predominantly 5'-truncated, while normal breast tissue expressed full-length transcripts. Consistent with this observation, genes containing the VDR-responsive element (VDRE), such as cytochrome p450 hydroxylases, p21 or C/EBP were underexpressed in breast cancers compared to normal breast samples. Expression of the active longer transcripts of VDR was restored with 5'deoxy-Azacytidine (AZA) treatment, with a concurrent increase in expression of VDRE-containing genes. Thus, promoter methylation-mediated silencing of expression of the functional variants of VDR may contribute to reduced expression of downstream effectors of the VDR pathway and subsequent Calcitriol insensitivity in breast cancer. These data suggest that pharmacological reversal of VDR methylation may re-establish breast cancer cell susceptibility to differentiation therapy using Calcitriol.

### **Metilazione del DNA legata all'insensibilità del recettore della vitamina D nel cancro al seno.**

Calcitriolo (1 $\alpha$ , 25 (OH) (2)-Vitamina D3) si lega al recettore della vitamina D (VDR) e regola la differenziazione della ghiandola mammaria normale, e può quindi essere utile nel trattamento del cancro al seno o di prevenzione. Molte cellule tumorali del seno, tuttavia, sono resistenti alla calcitriolo. In questo studio, abbiamo studiato il meccanismo di resistenza e il ruolo del silenziamento epigenetico di VDR da ipermetilazione del promotore. Bisolfuro sequenziamento della regione del promotore VDR rivelato isole CpG metilate a -700 paia di basi (bp) a monte e in prossimità del sito di inizio della trascrizione. VDR isole CpG sono stati demetilato dal trattamento 5'deoxy-azacitidina, e questo è stato accompagnato da un parallelo aumento VDR livelli di mRNA nelle linee di cancro al seno cellule. Quantitative di analisi della metilazione-specific PCR ha confermato ipermetilazione di queste isole CpG nei tumori primari, e la sua assenza nel tessuto mammario normale. trascrizioni VDR rilevata nei tumori al seno sono stati prevalentemente 5'-tronco, mentre il tessuto mammario normale espresso le trascrizioni integrali. Coerentemente con

questa osservazione, i geni che contengono l'elemento VDR-reattiva (VDRE), come il citocromo p450 idrossilasi, p21 o di C / EBP sono stati underexpressed del tumore della mammella rispetto a campioni del seno normale. Espressione delle trascrizioni attivi più a lungo di VDR è stato restaurato con 5'deoxy-azacitidina (AZA) trattamento, con un contestuale aumento di espressione VDRE contenenti geni. Così, mettendo a tacere la metilazione del promotore-mediata di espressione delle varianti funzionali di VDR può contribuire alla ridotta espressione di effettori a valle della filiera di VDR e successive insensibilità calcitriolo nel cancro della mammella. Questi dati suggeriscono che l'inversione farmacologica di metilazione VDR può ristabilire il cancro al seno sensibilità delle cellule alla terapia di differenziazione con calcitriolo.

65: Ahn J, Yu K, Stolzenberg-Solomon R, Simon KC, McCullough ML, Gallicchio L, Jacobs EJ, Ascherio A, Helzlsouer K, Jacobs KB, Li Q, Weinstein SJ, Purdue M, Virtamo J, Horst R, Wheeler W, Chanock S, Hunter DJ, Hayes RB, Kraft P, Albanes D.

### **Genome-wide association study of circulating vitamin D levels.**

Hum Mol Genet. 2010 Jul 1;19(13):2739-45.

The primary circulating form of vitamin D, 25-hydroxy-vitamin D [25(OH)D], is associated with multiple medical outcomes, including rickets, osteoporosis, multiple sclerosis and cancer. In a genome-wide association study (GWAS) of 4501 persons of European ancestry drawn from five cohorts, we identified single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in the gene encoding group-specific component (vitamin D binding) protein, GC, on chromosome 4q12-13 that were associated with 25(OH)D concentrations: rs2282679 ( $P=2.0 \times 10^{-30}$ ), in linkage disequilibrium (LD) with rs7041, a non-synonymous SNP (D432E;  $P=4.1 \times 10^{-22}$ ) and rs1155563 ( $P=3.8 \times 10^{-25}$ ). Suggestive signals for association with 25(OH)D were also observed for SNPs in or near three other genes involved in vitamin D synthesis or activation: rs3829251 on chromosome 11q13.4 in NADSYN1 [encoding nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) synthetase;  $P=8.8 \times 10^{-7}$ ], which was in high LD with rs1790349, located in DHCR7, the gene encoding 7-dehydrocholesterol reductase that synthesizes cholesterol from 7-dehydrocholesterol; rs6599638 in the region harboring the open-reading frame 88 (C10orf88) on chromosome 10q26.13 in the vicinity of ACADSB (acyl-Coenzyme A dehydrogenase), involved in cholesterol and vitamin D synthesis ( $P=3.3 \times 10^{-7}$ ); and rs2060793 on chromosome 11p15.2 in CYP2R1 (cytochrome P450, family 2, subfamily R, polypeptide 1, encoding a key C-25 hydroxylase that converts vitamin D<sub>3</sub> to an active vitamin D receptor ligand;  $P=1.4 \times 10^{-5}$ ). We genotyped SNPs in these four regions in 2221 additional samples and confirmed strong genome-wide significant associations with 25(OH)D through meta-analysis with the GWAS data for GC ( $P=1.8 \times 10^{-49}$ ), NADSYN1/DHCR7 ( $P=3.4 \times 10^{-9}$ ) and CYP2R1 ( $P=2.9 \times 10^{-17}$ ), but not C10orf88 ( $P=2.4 \times 10^{-5}$ ).

### **Studio di associazione genomico sui livelli circolanti di vitamina D**

La forma primaria circolanti di vitamina D, 25-idrossi-vitamina D [25 (OH) D], è associata con più risultati medici, tra cui il rachitismo, osteoporosi, sclerosi multipla e cancro. In uno studio di associazione sull'intero genoma (GWAS) di 4.501 persone di discendenza europea tratte da cinque coorti, abbiamo identificato polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) del gene che codifica componente specifico del gruppo (vitamina D binding) proteina, GC, il cromosoma 4q12 -13 che sono stati associati con 25 (OH) D concentrazioni: rs2282679 ( $P = 2.0 \times 10^{-30}$ ), in linkage disequilibrium (LD) con rs7041, un non-sinonimo SNP (D432E,  $P = 4.1 \times 10^{-22}$ ) e rs1155563 ( $P = 3.8 \times 10^{-25}$ ). Segnali suggestivo per associazione con 25 (OH) D sono state osservate anche per

SNP all'interno o in prossimità di altri tre geni coinvolti nella sintesi di vitamina D o di attivazione: rs3829251 sul cromosoma 11q13.4 in NADSYN1 [codifica nicotinammide adenin dinucleotide (NAD) sintetasi,  $P = 8.8 \times 10^{-7}$ ], che era in alto con LD rs1790349, che si trova in DHCR7, il gene che codifica reductasi 7-deidrocolesterolo che sintetizza il colesterolo dal 7-deidrocolesterolo, rs6599638 nella regione di ospitare la struttura aperta di lettura 88 (C10orf88) sul cromosoma 10q26.13 nelle vicinanze di ACADSB (acil-coenzima A deidrogenasi), coinvolto in colesterolo e la sintesi di vitamina D ( $P = 3.3 \times 10^{-7}$ ); e rs2060793 sul cromosoma 11p15.2 in CYP2R1 (citocromo P450, famiglia 2, sottofamiglia R, polipeptide 1, che codifica per una chiave di C-25 idrossilasi, che converte la vitamina D3 per un attivo ligando del recettore della vitamina D,  $P = 1.4 \times 10^{-5}$ ). Siamo sottoposti a genotipizzazione SNPs in queste quattro regioni in 2.221 campioni supplementari e confermato forti associazioni genome-wide significative con 25 (OH) D attraverso la meta-analisi con i dati GWAS per GC ( $P = 1.8 \times 10^{-49}$ ), NADSYN1/DHCR7 ( $P = 3.4 \times 10^{-9}$ ) e CYP2R1 ( $P = 2.9 \times 10^{-17}$ ), ma non C10orf88 ( $P = 2.4 \times 10^{-5}$ ).

66: Matthews D, LaPorta E, Zinser GM, Narvaez CJ, Welsh J.

**Genomic vitamin D signaling in breast cancer: Insights from animal models and human cells.** J Steroid Biochem Mol Biol. 2010 Jul;121(1-2):362-7.

These studies focus on identification of vitamin D regulated pathways that impact development or progression of breast cancer. In mouse experiments, we assessed genomic profiles of glandular tissue and established tumors from MMTV-neu mice fed adequate (250 IU/kg) or high (5000 IU/kg) vitamin D (cholecalciferol). Genomic profiles were also obtained in murine mammary cells that differentially express VDR that were cultured in vitro with 100 nM 1,25-dihydroxyvitamin D (1,25D). Ten candidate genes were identified that were commonly regulated in murine cells treated with 1,25D in vitro and in mammary gland of mice fed high dietary vitamin D. In complementary studies, the vitamin D pathway was evaluated in human mammary epithelial cells as a function of transformation. Genes regulated by 1,25D in human mammary epithelial cells included those involved in innate immunity (CD14), differentiation (Bmp6), extracellular matrix remodeling (Plau) and cell survival (Birc3). Transformation reduced VDR content and blunted the induction of some, but not all, target genes by 1,25D in human mammary cells. Collectively, these in vivo and in vitro data demonstrate that vitamin D signaling impacts on common pathways that drive differentiation, alter metabolism, remodel the extracellular matrix and trigger innate immunity in mammary tissue.

**Segnalazione genomica della vitamina D nel cancro al seno: approfondimenti da modelli animali e cellule umane**

Questi studi si concentrano sulla individuazione di percorsi di vitamina D regolamentato che l'impatto sullo sviluppo o la progressione del cancro al seno. Negli esperimenti del mouse, abbiamo valutato profili genomici di tessuto ghiandolare e tumori istituito da topi alimentati MMTV-neu adeguata (250 UI / kg) o alta (5000 UI / kg), vitamina D (coleciferolo). Profili genomici sono stati ottenuti anche nelle cellule mammarie murine che differenzialmente espresso VDR che sono state coltivate in vitro con 100 nM di 1,25-diidrossivitamin D (1,25 D). Dieci sono stati identificati geni candidati che erano comunemente regolamentata in cellule murine trattate con 1,25 D in vitro ed in ghiandola mammaria di topi alimentati con dieta ad alta vitamina D. In studi complementari, il percorso di vitamina D è stato valutato in cellule epiteliali mammarie umane in funzione della trasformazione. Geni regolati da 1,25 D in cellule epiteliali mammarie umane incluse quelle coinvolte nell'immunità innata (CD14), differenziazione (Bmp6), rimodellamento della matrice extracellulare (Plau) e la sopravvivenza cellulare (Birc3). Trasformazione VDR ridotto contenuto e attenuato l'induzione di alcuni, ma non tutti, geni bersaglio per 1,25 D nelle cellule mammarie

umane. Collettivamente, questi in vivo e in vitro dimostrano i dati che la vitamina D di segnalazione impatti sulla percorsi comuni che la differenziazione unità, alterare il metabolismo, rimodellare la matrice extracellulare immunità innata e innescare nel tessuto mammario.

67: Courbebaisse M, Souberbielle JC, Prié D, Thervet E.

**[Non phosphocalcic actions of vitamin D].**

Med Sci (Paris). 2010 Apr;26(4):417-21.

Vitamin D cannot any more be considered as exclusively necessary to prevent rickets or osteomalacia. Calcitriol produced in the kidney is known to have classical endocrine phosphocalcic properties. However, many other tissues express both vitamin D receptor and 1 $\alpha$ -hydroxylase and can convert 25-hydroxy vitamin D into calcitriol. Calcitriol produced locally is considered to have autocrine and paracrine actions on cellular proliferation and differentiation, apoptosis, insulin and renin secretion, interleukin and bactericidal proteins production. Epidemiologic and experimental data argue in favour of a protective role of vitamin D against cancers, type 2 diabetes, cardiovascular, auto-immune and infectious diseases, chronic kidney disease and loss of muscular strength. A few interventional studies confirm the protective effect of vitamin D against cancers, intermediate markers of cardiovascular risk, epidemic influenza, albuminuria and risk of fall. We present here the non phosphocalcic actions of vitamin D.

**[Azioni non fosfocalcihe della vitamina D].**

La vitamina D non può più essere considerato come esclusivamente necessarie per prevenire il rachitismo o osteomalacia. Calcitriolo prodotta nel rene è conosciuto per avere proprietà classica endocrino fosfo-calcico. Tuttavia, molti altri tessuti esprimere sia recettore della vitamina D e 1 $\alpha$ -idrossilasi e in grado di convertire 25-idrossi vitamina D in calcitriolo. Calcitriolo prodotta localmente è considerata azioni autocrino e paracrino sulla proliferazione e differenziazione cellulare, apoptosi, l'insulina e la secrezione di renina, l'interleuchina e battericida produzione di proteine. Epidemiologici e dati sperimentali sono a favore di un ruolo protettivo della vitamina D contro i tumori, diabete di tipo 2, malattie cardiovascolari, malattie autoimmuni e infettive, malattie renali croniche e la perdita di forza muscolare. Alcuni studi interventistici confermare l'effetto protettivo della vitamina D contro i tumori, i marker di rischio cardiovascolare intermedio, l'influenza epidemica, albuminuria e rischio di caduta. Vi presentiamo qui le azioni non fosfo-calcico di vitamina D.

68: Thompson T, Andreeff M, Studzinski GP, Vassilev LT.

**1,25-dihydroxyvitamin D3 enhances the apoptotic activity of MDM2 antagonist nutlin-3a in acute myeloid leukemia cells expressing wild-type p53.**

Mol Cancer Ther. 2010 May;9(5):1158-68.

The tumor suppressor p53 is often referred to as "the guardian of the genome" because of its central role in the cellular response to oncogenic stress and prevention of tumor development. Mutations of p53 in acute myeloid leukemia (AML) are rare but resistance to chemotherapy has been reported because of the deregulation of the p53 signaling and differentiation pathways. It is known that the interaction of the vitamin D metabolite 1,25-dihydroxyvitamin D(3) (1,25D) with its functional vitamin D receptor leads to differentiation, G(1) arrest, and increased cell survival in p53-null AML cells. However, there are no reports on the effect of 1,25D in leukemia cells expressing wild-type p53. Here, we examine vitamin D signaling in AML cells MOLM-13 and OCI-AML3 expressing wild-type p53 in the presence and absence of the MDM2 antagonist nutlin-3. We find that 1,25D alone induces monocytic differentiation in these cell lines similar to that seen in p53-null AML cells, suggesting that the presence of wild-type p53 is compatible with activation of vitamin D signaling. Combination of nutlin-3a with 1,25D accelerated programmed cell death, likely because of enhanced nutlin-induced upregulation of the proapoptotic PIG-6 protein and downregulation of antiapoptotic BCL-2, MDMX, human kinase suppressor of Ras 2, and phosphorylated extracellular signal-regulated kinase 2.

**1,25-diidrossivitamin D3 aumenta l'attività apoptica di MDM2 antagonista di nutlina-3a nelle cellule con leucemia mieloide acuta che esprimono p53 wild-type.**

L'oncosoppressore p53 è spesso definito come "il guardiano del genoma" a causa del suo ruolo centrale nella risposta cellulare allo stress oncogeni e la prevenzione dello sviluppo tumorale. Mutazioni di p53 nella leucemia mieloide acuta (AML) sono rare ma la resistenza alla chemioterapia è stato segnalato a causa della deregolamentazione del p53 segnalazione e percorsi di differenziazione. E 'noto che l'interazione della vitamina D metabolita 1,25-diidrossivitamin D (3) (1,25 D) con la sua funzionale recettore della vitamina D porta al differenziamento, G (1) arresto, e una maggiore sopravvivenza delle cellule in p53-null AML cellule. Tuttavia, non ci sono rapporti sugli effetti di 1,25 D nelle cellule leucemiche esprimono p53 wild-type. Qui, esaminiamo la vitamina D di segnalazione in cellule MOLM AML-13 e OCI-AML3 p53 wild-type che esprimono in presenza e assenza del MDM2 nutlin antagonista-3. Troviamo che la 1,25 D induce la differenziazione monocitica solo in queste linee di cellule simile a quello osservato in cellule p53-null AML, suggerendo che la presenza di p53 wild-type è compatibile con l'attivazione della vitamina D di segnalazione. Combinazione di nutlin-3a con 1,25 D accelerato la morte cellulare programmata, probabilmente a causa di una maggiore nutlin sovraregolazione-indotta del

proapoptotici PIG-6 proteine e down-regulation di antiapoptotica BCL-2, MDMX, umano soppressore chinasi di Ras 2 e fosforilato segnale extracellulare regolamentati chinasi 2.

70: Giovannucci E.

### **Epidemiology of vitamin D and colorectal cancer: casual or causal link?**

J Steroid Biochem Mol Biol. 2010 Jul;121(1-2):349-54.

**INTRODUCTION:** Since Garland and Garland hypothesized that better vitamin D status lowered risk of colorectal cancer in 1980, the relation between vitamin D status and colorectal cancer risk has been investigated in epidemiologic studies. These studies are reviewed.

**MATERIALS AND METHODS:** Various approaches have been used to estimate vitamin D status, including direct measures of circulating 25(OH)vitamin D levels, surrogates or determinants of vitamin D (including region of residence, intake, and sun exposure estimates, or a combination of these). These measures of vitamin D status have been studied in relation to colorectal adenoma, cancer incidence and mortality.

**RESULTS:** In general, all lines of inquiry from observational studies indicate that an association between better vitamin D status and lower colorectal cancer risk exists. While most of the studies have examined vitamin D status in relation to risk of cancer, some evidence suggests that vitamin D may be additionally important for colorectal cancer progression and mortality.

**DISCUSSION:** Although confounding factors cannot be entirely excluded, the consistency of the association using various approaches to measure vitamin D, for diverse endpoints and in diverse populations shows high consistency and is suggestive of a causal association. Thus, improving vitamin D status could be potentially beneficial against colorectal cancer incidence and mortality.

### **Epidemiologia della vitamina D e cancro colonrettale: casuale o esiste una relazione?**

**INTRODUZIONE:** Dal Garland e Garland ipotizzato che meglio lo stato della vitamina D abbassa il rischio di cancro coloretale nel 1980, la relazione tra vitamina D e rischio di cancro del colon-retto è stato valutato in studi epidemiologici. Questi studi sono esaminati.

**MATERIALI E METODI:** Vari approcci sono stati utilizzati per stimare lo stato della vitamina D, comprese le misure dirette di far circolare 25 (OH) i livelli di vitamina D, surrogati o determinanti della vitamina D (compresi regione di residenza, di aspirazione, e le stime esposizione al sole, o una combinazione di questi). Queste misure dello stato della vitamina D sono stati studiati in relazione alle adenoma del colon-retto, l'incidenza del cancro e la mortalità.

**RISULTATI:** In generale, tutte le linee di indagine da studi osservazionali indicano che l'associazione tra stato vitaminico D meglio e ridurre il rischio di cancro coloretale esiste. Mentre la maggior parte degli studi hanno esaminato lo stato della vitamina D in relazione al rischio di cancro, alcune evidenze suggeriscono che la vitamina D può essere anche importante per la progressione del cancro del colon-retto e della mortalità.

**DISCUSSIONE:** Anche se i fattori di confondimento non può essere completamente esclusa, la consistenza dell'associazione utilizzando vari approcci per misurare la vitamina D, per gli endpoint

diversi e in diverse popolazioni mostra consistenza elevata ed è indicativo di una associazione causale. Di conseguenza, migliorare lo stato di vitamina D potrebbe essere potenzialmente utile contro l'incidenza del cancro coloretale e mortalità.

71: Karlsson S, Olausson J, Lundh D, Sögård P, Mandal A, Holmström KO, Stahel A, Bengtsson J, Larsson D.

**Vitamin D and prostate cancer: the role of membrane initiated signaling pathways in prostate cancer progression.**

J Steroid BiochemMol Biol. 2010 Jul;121(1-2):413-6.

1,25-Dihydroxyvitamin D3 (1,25(OH)2D3) has been demonstrated to mediate both genomic and non-genomic responses in prostate cancer (CaP) cells. Here, we give an overview of membrane initiated 1,25(OH)2D3 signaling in prostate cancer cell progression. The presence of PDIA3 was investigated and homologous modeling of the putative PDIA3 receptor complex was conducted. Furthermore, the cellular distribution of nVDR was analyzed. We could show that both nVDR and PDIA3 are expressed in the prostate cancer cell lines investigated. The homologous modeling of PDIA3 showed that the receptor complex exists in a trimer formation, which suggests for allosteric activity. Our findings support previous reports and suggest that 1,25(OH)2D3 is an important therapeutic agent in inhibiting prostate cancer progression. Furthermore, our data show that 1,25(OH)2D3 regulate prostate cell biology via multiple pathways and targeting specific pathways for 1,25(OH)2D3 might provide more effective therapies compared to the vitamin D therapies currently clinically tested.

**Vitamina D e cancro prostatico: il ruolo della via di segnale di membrane nella progressione del cancro prostatico.**

1,25-diidrossivitamina D3 (1,25 (OH) 2D3) è stata dimostrata per mediare sia le risposte genomiche e non-genomica del cancro della prostata (CaP) cellule. Qui, diamo una panoramica di membrana avviato 1,25 (OH) 2D3 di segnalazione cellulare nella progressione del cancro alla prostata. La presenza di PDIA3 è stato studiato e omologa la modellazione del complesso del putativo recettore PDIA3 è stata condotta. Inoltre, la distribuzione cellulare di nVDR è stato analizzato. Abbiamo potuto dimostrare che entrambi nVDR e PDIA3 sono espressi nelle linee di cellule di cancro alla prostata studiata. L'omologo di modellazione PDIA3 ha dimostrato che il complesso recettore esiste in una formazione trimero, che suggerisce per l'attività allosterici. I nostri risultati confermano i rapporti precedenti e indicano che la 1,25 (OH) 2D3 è un importante agente terapeutico nella progressione inibire il cancro alla prostata. Inoltre, i nostri dati mostrano che 1,25 (OH) 2D3 regolano la biologia delle cellule della prostata attraverso diverse vie e percorsi specifici per il targeting 1,25 (OH) 2D3 potrebbe fornire le terapie più efficaci rispetto alle terapie di vitamina D al momento clinicamente testato.

72: Hidalgo AA, Trump DL, Johnson CS.

### **Glucocorticoid regulation of the vitamin D receptor.**

J Steroid Biochem Mol Biol. 2010 Jul;121(1-2):372-5.

Many studies indicate calcitriol has potent anti-tumor activity in different types of cancers. However, high levels of vitamin D can produce hypercalcemia in some patients. Glucocorticoids are used to ameliorate hypercalcemia and to enhance calcitriol anti-tumor activity. Calcitriol in combination with the glucocorticoid dexamethasone (Dex) increased vitamin D receptor (VDR) protein levels and ligand binding in squamous cell carcinoma VII (SCC). In this study we found that both calcitriol and Dex induce VDR- and glucocorticoid receptor (GR)-mediated transcription respectively, indicating both hormone receptors are active in SCC. Pre-treatment with Dex increases VDR-mediated transcription at the human CYP24A1 promoter. Whereas, pre-treatment with other steroid hormones, including dihydrotestosterone and R1881, has no effect on VDR-mediated transcription. Real-time PCR indicates treatment with Dex increases Vdr transcripts in a time-dependent manner, suggesting Dex may directly regulate expression of Vdr. Numerous putative glucocorticoid response elements (GREs) were found in the Vdr gene. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay demonstrated GR binding at several putative GREs located within the mouse Vdr gene. However, none of the putative GREs studied increase GR-mediated transcription in luciferase reporter assays. In an attempt to identify the response element responsible for Vdr transcript regulation, future studies will continue to analyze newly identified GREs more distal from the Vdr gene promoter.

### **Regolazione dei glucocorticoidi del recettore della vitamina D**

Molti studi indicano calcitriolo ha una potente attività anti-tumorale in diversi tipi di tumori. Tuttavia, gli alti livelli di vitamina D può produrre ipercalcemia in alcuni pazienti. I glucocorticoidi sono utilizzati per migliorare l'ipercalcemia e di migliorare calcitriolo attività anti-tumorale. Calcitriolo in combinazione con il desametasone glucocorticoide (Des) sono aumentati del recettore della vitamina D (VDR) livelli di proteina e ligando in VII carcinoma a cellule squamose (SCC). In questo studio abbiamo rilevato che sia calcitriolo e inducono VDR-Dex e del recettore glucocorticoide (GR) trascrizione-mediata rispettivamente, indicando entrambi i recettori ormonali sono attivi in SCC. Pre-trattamento con la trascrizione Dex aumenti VDR-mediata alla umano CYP24A1 promotore. Considerando che, pre-trattamento con altri ormoni steroidei, tra diidrotosterone e R1881, non ha alcun effetto sulla trascrizione VDR-mediata. PCR in tempo reale indica il trattamento con aumenti Dex VDR trascritti in un modo dipendente dal tempo, suggerendo Dex può direttamente regolano l'espressione di VDR. Numerosi elementi putativi risposta glucocorticoide (gres) sono state trovate nel gene VDR. Immuno-precipitazione della cromatina (ChIP) test hanno dimostrato GR vincolante a diversi GRES putativo trova all'interno del

gene VDR mouse. Tuttavia, nessuno dei GRES putativo studiato trascrizione aumento GR-mediata nei saggi reporter luciferasi. Nel tentativo di identificare l'elemento di risposta responsabile per la regolamentazione trascrizione VDR, gli studi futuri continuerà ad analizzare GRES recentemente identificati più distale del promotore del gene VDR.

73: Horváth HC, Khabir Z, Nittke T, Gruber S, Speer G, Manhardt T, Bonner E, Kallay E.

**CYP24A1 splice variants--implications for the antitumorigenic actions of 1,25-(OH)2D3 in colorectal cancer.**

J Steroid Biochem Mol Biol. 2010 Jul;121(1-2):76-9.

25-hydroxyvitamin D3 24-hydroxylase (CYP24A1), the catabolizing enzyme of the active vitamin D3, is often overexpressed in solid tumors. The unbalanced high levels of CYP24A1 seem to be a determinant of vitamin D resistance in tumors. Splice variants of CYP450 enzymes are common. Existence of CYP24A1 isoforms has been reported recently. We have investigated the presence of CYP24A1 splicing variants (SV) in human colon cancer cell lines and tissue samples. Using a set of primer combination we have screened the entire coding sequence of CYP24A1 and identified three splice variants in colon cancer cell lines. The presence of these SVs in human colon tissue samples showed a correlation with histological type of the tissue and gender of patients. The sequencing of the alternatively spliced fragments showed that two have lost the mitochondrial target domain, while the third lacks the heme-binding domain. All SVs retained their sterol binding domain. Translation of these variants would lead to a dysfunctional enzyme without catalytic activity that still binds its substrates therefore they might compete for substrate with the synthesizing and catabolizing enzymes of vitamin D.

**CYP24A1 varianti di splice—implicazioni delle azioni antitumorali di 1,25-(OH)2D3 nel cancro colonrettale**

25-idrossivitaminina D3 24-idrossilasi (CYP24A1), l'enzima catabolizing della vitamina D3 attiva, è spesso sovraespresso nei tumori solidi. I livelli elevati di squilibrio CYP24A1 sembra essere un determinante di vitamina D resistenza nei tumori. Varianti di splicing degli enzimi CYP450 sono comuni. Esistenza di CYP24A1 isoforme è stata segnalata di recente. Abbiamo studiato la presenza di CYP24A1 varianti di splicing (SV) in linee di cellule di cancro del colon umano e campioni di tessuto. Utilizzando una serie di combinazione di primer abbiamo analizzato l'intera sequenza codificante del CYP24A1 e individuato tre varianti di splicing in linee di cellule cancro del colon. La presenza di questi SV in campioni di tessuto umano del colon ha mostrato una correlazione con il tipo istologico del tessuto e del sesso dei pazienti. Il sequenziamento dei frammenti di splicing alternativo ha dimostrato che i due hanno perso il dominio mitocondriale di destinazione, mentre il terzo non ha il dominio eme-vincolante. Tutte le SV mantenuto il loro dominio steroli vincolanti. Traduzione di queste varianti porterebbe a un enzima disfunzionale, senza attività catalitica che lega ancora i suoi substrati quindi potrebbero competere per il substrato con la sintesi e catabolizing enzimi della vitamina D.

74: Yang J, Ikezoe T, Nishioka C, Ni L, Koeffler HP, Yokoyama A.

**Inhibition of mTORC1 by RAD001 (everolimus) potentiates the effects of 1,25 dihydroxyvitamin D(3) to induce growth arrest and differentiation of AML cells in vitro and in vivo.**

Exp Hematol. 2010 Aug;38(8):666-76.

**OBJECTIVE:** Differentiation-inducing therapy by agents such as 1,25-dihydroxyvitamin D(3) (1,25(OH)(2)D(3)) represents a useful approach for the treatment of acute myelogenous leukemia (AML). We previously showed that Gemini-23-yne-26,27-hexafluoro-D(3) inhibited the proliferation of MCF-7 breast cancer cells in association with inhibition of the mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling. This study explored the drug interaction of 1,25(OH)(2)D(3) and rapamycin analog RAD001 (everolimus) in AML cells.

**MATERIALS AND METHODS:** Effects of RAD001 and 1,25-(OH)(2)D(3) on the proliferation and differentiation of U937 cells were assessed by colony-forming assay and quantification of CD11b cell surface antigens and their endocytic capability, respectively. Effects of RAD001 and 1,25-(OH)(2)D(3) on Akt/mTOR complex-1 (mTORC1) signaling and cell-cycle-related molecules were explored by Western blot analysis. The reporter gene and chromatin immunoprecipitation assays were employed to examine the effects of RAD001 and 1,25-(OH)(2)D(3) on the promoter of the p21(waf1) gene. U937 murine xenograft model was utilized to explore the effects of RAD001 and 1,25-(OH)(2)D(3) in vivo.

**RESULTS:** RAD001 potentiated the ability of 1,25(OH)(2)D(3) to induce growth arrest and differentiation of AML cells in parallel with downregulation of the levels of p-S6K and p-4E-BP1, substrates of mTORC1. In addition, RAD001 significantly enhanced 1,25(OH)(2)D(3)-mediated transcriptional activity of p21(waf1) in association with increased levels of the acetylated forms of histone H3 and vitamin D receptor bound to the p21(waf1) promoter in U937 cells. Moreover, RAD001 (3 mg/kg, every another day) significantly enhanced 1,25(OH)(2)D(3)-induced growth inhibition of U937 tumor xenografts in nude mice without adverse effects.

**CONCLUSIONS:** Concomitant administration of 1,25(OH)(2)D(3) and the mTORC1 inhibitor may be a promising treatment strategy for individuals with AML.

**Inibizione di mTORC1 da RAD001 (everolimus) potenzia gli effetti di 1,25 diidrossivitamina D(3) nell' induzione dell'arresto della crescita e della differenziazione nelle cellule AML in vitro e in vivo.**

**OBIETTIVO:** differenziazione di induzione della terapia da parte di agenti quali 1,25-diidrossivitamina D (3) (1,25 (OH) (2) D (3)) rappresenta un approccio utile per il trattamento della leucemia mieloide acuta (AML). Abbiamo precedentemente dimostrato che Gemini-23-ino-26 ,27-hexafluoro-D (3) ha inibito la proliferazione delle cellule tumorali MCF-7 al seno in collaborazione

con l'inibizione del target della rapamicina nei mammiferi (mTOR) di segnalazione. Questo studio ha esplorato l'interazione farmacologica di 1,25 (OH) (2) D (3) e la rapamicina analogico RAD001 (everolimus) in cellule di leucemia mieloide acuta.

**MATERIALI E METODI:** effetti di RAD001 e 1,25 - (OH) (2) D (3) sulla proliferazione e differenziazione delle cellule U937 sono stati valutati mediante test che formano colonie e la quantificazione degli antigeni di superficie CD11b e la loro capacità endocitica, rispettivamente . Effetti di RAD001 e 1,25 - (OH) (2) D (3) su Akt / mTOR complesso-1 (mTORC1) di segnalazione e le molecole del ciclo cellulare-correlati sono stati esplorati da analisi Western blot. I saggi di immunoprecipitazione della cromatina gene reporter e sono stati impiegati per esaminare gli effetti di RAD001 e 1,25 - (OH) (2) D (3) il promotore del (waf1) gene p21. U937 modello murino xenotrapianto è stata utilizzata per esplorare gli effetti di RAD001 e 1,25 - (OH) (2) D (3) in vivo.

**RISULTATI:** RAD001 potenziato la capacità di 1,25 (OH) (2) D (3) per indurre arresto della crescita e differenziazione delle cellule AML in parallelo con down-regulation dei livelli di P-S6K e p-4E-BP1, substrati di mTORC1 . Inoltre, RAD001 notevolmente migliorato 1,25 (OH) (2) D (3) per attività trascrizionale di p21 mediata (waf1) in associazione con aumentati livelli delle forme acetilata dell'istone H3 e recettore della vitamina D associati al p21 (waf1 ), promotore in cellule U937. Inoltre, RAD001 (3 mg / kg, ogni altro giorno) significativamente maggiore 1,25 (OH) (2) D (3)-indotta inibizione della crescita di U937 eterotrapianti tumore nei topi nudi, senza effetti negativi.

**CONCLUSIONI:** La somministrazione concomitante di 1,25 (OH) (2) D (3) e la mTORC1 inibitore può essere una strategia di trattamento promettente per gli individui affetti da LAM.

75: Tse AK, Zhu GY, Wan CK, Shen XL, Yu ZL, Fong WF.

**1alpha,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits transcriptional potential of nuclear factor kappa B in breast cancer cells.**

Mol Immunol. 2010 May;47(9):1728-38.

1alpha,25-Dihydroxyvitamin D(3) (VD(3)), the biologically active form of vitamin D, may have either pro- or anti-inflammatory activities because of its diverse actions on nuclear factor kappa B (NF-kappaB). Previous studies indicated that VD(3) can either activate or inhibit NF-kappaB via Akt-induced I kappaB alpha phosphorylation and increase in I kappaB alpha synthesis respectively. At present, the relevant contribution of each mechanism has not been fully explored. We observed a VD(3)-mediated NF-kappaB inhibitory effect in vitamin D receptor (VDR)-positive MCF-7 breast cancer cells. We showed that VD(3) induced VDR-dependent I kappaB alpha expression but still able to lead on transient NF-kappaB p65 nuclear translocation through Akt-induced I kappaB alpha phosphorylation. Upon TNFalpha stimulation, VD(3) was not capable to inhibit I kappaB alpha degradation, p65 nuclear translocation and p65/p50-DNA binding. Here, we found that VD(3) strongly repressed p65 transactivation in MCF-7 cells using Gal4-p65 chimeras system. VDR was required for the VD(3)-mediated transrepression and mutations in VDR affected its suppressive ability. We also demonstrated that neither inhibition of p65 phosphorylation nor acetylation was responsible for the transrepression. In fact, we found that treatment of MCF-7 cells with histone deacetylase inhibitors abrogated VD(3)-induced p65 transrepression. In addition, knockdown of two nuclear corepressors HDAC3 and SMRT relieved p65 transactivation and particular TNFalpha-triggered gene expression. In conclusion, the reduction of gene activation by VD(3) in breast cancer cells was caused by the interference of the transactivation potential of NF-kappaB p65 subunit. Our studies provide a scientific background for rational use of vitamin D in the prevention and treatment of inflammatory diseases.

**1alfa,25-Diidrossivitamina D3 inibisce il fattore nucleare di trascrizione kappa B nelle cellule mammarie cancerose**

1alfa ,25-diidrossivitamina D (3) (VD (3)), la forma biologicamente attiva della vitamina D, possono disporre di attività pro-o anti-infiammatori per le sue diverse azioni sulle fattore nucleare kappa B (NF-kB). Precedenti studi hanno indicato che VD (3) può attivare o inibire NF-kB via Akt-indotta io fosforilazione kappaB alfa e l'aumento della sintesi di alfa mi kappaB rispettivamente. Allo stato attuale, il relativo contributo di ogni meccanismo non è stato completamente esplorato. Abbiamo osservato un effetto inibitorio VD (3)-mediata di NF-kB in recettore della vitamina D (VDR)-positive MCF-7 cellule di cancro al seno. Abbiamo dimostrato che VD (3) indotta VDR-I dipendenti alfa espressione kappaB ma ancora in grado di portare sul transitorio di NF-kB p65 traslocazione nucleare attraverso Akt indotta io alfa fosforilazione kappaB. Dopo stimolazione

TNF $\alpha$ , VD (3) non era in grado di inibire la degradazione I $\alpha$  kappaB, p65 traslocazione nucleare e p65/p50-DNA vincolanti. Qui, abbiamo trovato che VD (3) fortemente represso p65 transattivazione in cellule MCF-7 con Gal4-p65 sistema chimere. VDR è stato richiesto per la VD (3) transrepression-mediata e mutazioni nel VDR colpito la sua capacità soppressiva. Abbiamo anche dimostrato che né l'inibizione della fosforilazione di p65, né l'acetilazione era responsabile della transrepression. In effetti, abbiamo trovato che il trattamento di cellule MCF-7 con inibitori delle istone deacetilasi abrogata VD (3)-indotta P65 transrepression. In aggiunta, colpo di due nucleare corepressors HDAC3 e SMRT sollevato p65 transattivazione e particolare espressione genica TNF $\alpha$ -triggered. In conclusione, la riduzione di attivazione del gene da VD (3) in cellule di carcinoma mammario è stato causato dalle interferenze del potenziale di transattivazione di p65 NF- $\kappa$ B subunità. I nostri studi forniscono una base scientifica per l'uso razionale di vitamina D nella prevenzione e nel trattamento delle malattie infiammatorie.

77: Callens C, Coulon S, Naudin J, Radford-Weiss I, Boissel N, Raffoux E, Wang PH, Agarwal S, Tamouza H, Paubelle E, Asnafi V, Ribeil JA, Dessen P, Canioni D, Chandesris O, Rubio MT, Beaumont C, Benhamou M, Dombret H, Macintyre E, Monteiro RC, Moura IC, Hermine O.

### **Targeting iron homeostasis induces cellular differentiation and synergizes with differentiating agents in acute myeloid leukemia.**

J Exp Med. 2010 Apr 12;207(4):731-50.

Differentiating agents have been proposed to overcome the impaired cellular differentiation in acute myeloid leukemia (AML). However, only the combinations of all-trans retinoic acid or arsenic trioxide with chemotherapy have been successful, and only in treating acute promyelocytic leukemia (also called AML3). We show that iron homeostasis is an effective target in the treatment of AML. Iron chelating therapy induces the differentiation of leukemia blasts and normal bone marrow precursors into monocytes/macrophages in a manner involving modulation of reactive oxygen species expression and the activation of mitogen-activated protein kinases (MAPKs). 30% of the genes most strongly induced by iron deprivation are also targeted by vitamin D3 (VD), a well known differentiating agent. Iron chelating agents induce expression and phosphorylation of the VD receptor (VDR), and iron deprivation and VD act synergistically. VD magnifies activation of MAPK JNK and the induction of VDR target genes. When used to treat one AML patient refractory to chemotherapy, the combination of iron-chelating agents and VD resulted in reversal of pancytopenia and in blast differentiation. We propose that iron availability modulates myeloid cell commitment and that targeting this cellular differentiation pathway together with conventional differentiating agents provides new therapeutic modalities for AML.

### **L'omeostasi del ferro induce differenziazione cellulare e sinergizza con agenti differenzianti nella leucemia mieloide acuta**

Agenti differenzianti sono state proposte per superare la differenziazione cellulare alterata nella leucemia mieloide acuta (AML). Tuttavia, solo le combinazioni di acido all-trans retinoico o triossido di arsenico con la chemioterapia hanno avuto successo, e solo nel trattamento della leucemia promielocitica acuta (chiamato anche AML3). Si dimostra che l'omeostasi del ferro è un obiettivo efficace nel trattamento della leucemia mieloide acuta. La terapia chelante del ferro induce la differenziazione dei blasti di leucemia e normali precursori del midollo osseo in monociti / macrofagi in un modo che coinvolge la modulazione dell'espressione di specie reattive di ossigeno e l'attivazione di proteine chinasi mitogeno-attivata (MAPKs). Il 30% dei geni più fortemente indotta da privazione di ferro sono mirati anche dal vitamina D3 (VD), un agente ben conosciuto di differenziazione. Agenti chelanti del ferro inducono l'espressione e la fosforilazione del recettore

VD (VDR), e la privazione di ferro e di agire sinergicamente VD. VD amplifica l'attivazione di MAPK JNK e l'induzione di geni bersaglio VDR. Quando viene utilizzato per il trattamento di un paziente AML refrattario alla chemioterapia, la combinazione di agenti chelanti del ferro e VD portato a un'inversione di pancitopenia e nella differenziazione di scoppio. Proponiamo che la disponibilità di ferro modula impegno mieloide cellulare e che rivolgendosi a questo percorso di differenziazione cellulare insieme ai tradizionali agenti differenzianti fornisce nuove modalità terapeutiche per AML.

80: Blomberg Jensen M, Andersen CB, Nielsen JE, Bagi P, Jørgensen A, Juul A, Leffers H.

**Expression of the vitamin D receptor, 25-hydroxylases, 1alpha-hydroxylase and 24-hydroxylase in the human kidney and renal clear cell cancer.**

J Steroid Biochem Mol Biol. 2010 Jul;121(1-2):376-82.

**BACKGROUND:** The vitamin D receptor (VDR), CYP27B1 and CYP24A1 are expressed in the human kidney, but the segmental expression of the 25-hydroxylases is unknown. A comprehensive analysis of CYP2R1, CYP27A1, CYP27B1, VDR and CYP24A1 expression in normal kidney and renal clear cell cancer (CCc) would reveal the segmental location of expression, and clarify whether the reported loss of VDR in CCc is coincident with alterations of vitamin D metabolism.

**MATERIALS AND METHODS:** Tissue was obtained from nine patients (eight CCc and one atrophic kidney), mRNAs were detected with RT-PCR and in situ hybridisation (ISH), and expression of proteins determined by immunohistochemistry and western blotting.

**RESULTS:** We detected expression of VDR and the vitamin D metabolising enzymes in normal kidney. VDR and CYP27B1 were strongly expressed in proximal tubules, while CYP2R1 and CYP27A1 had a marked expression in distal tubules. In CCc expression was lost for VDR and all the enzymes, except for very few cells expressing all the investigated proteins.

**CONCLUSION:** This study shows that VDR and all the vitamin D metabolising enzymes are expressed in the normal kidney. During the malignant transformation to CCc, expression of VDR and the metabolising enzymes is lost, however the implications of this loss are unknown.

**Espressione del recettore della vitamina D, 25-idrossilasi, 1alfa-idrossilasi e 24-idrossilasi nel rene e nel cancro renale a cellule chiare .**

**BACKGROUND:** Il recettore della vitamina D (VDR), CYP27B1 e CYP24A1 sono espressi nel rene umano, ma l'espressione segmentale della 25-idrossilasi è sconosciuto. Un analisi completa delle CYP2R1, CYP27A1, CYP27B1, VDR e CYP24A1 espressione nel rene normale e tumore renale a cellule chiare (CCC) avrebbe rivelato l'ubicazione segmentale di espressione, e chiarire se la perdita riportata di VDR in CCC è coincidente con alterazioni di vitamina D metabolismo.

**MATERIALI E METODI:** il tessuto è stato ottenuto da nove pazienti (otto CCC e un rene atrofico), mRNA sono stati rilevati con RT-PCR e ibridazione in situ (ISH), e l'espressione delle proteine determinato da immunoistochimica e western blotting.

**RISULTATI:** Abbiamo rilevato l'espressione di VDR e la vitamina D enzimi che metabolizzano nel rene normale. VDR e CYP27B1 erano fortemente espressi in tubuli prossimali, mentre CYP2R1 e CYP27A1 aveva un'espressione segnate in tubuli distali. Nel espressione CCC è stato perso per VDR e tutti gli enzimi, ad eccezione di pochissime cellule che esprimono tutte le proteine indagate.

**CONCLUSIONE:** Questo studio dimostra che VDR e tutti gli enzimi che metabolizzano vitamina D sono espressi nel rene normale. Durante la trasformazione maligna di CCC, espressione di VDR e gli enzimi che metabolizzano è perso, tuttavia le implicazioni di questa perdita sono sconosciuti.

81: Grant WB, Schwalfenberg GK, Genuis SJ, Whiting SJ.

### **An estimate of the economic burden and premature deaths due to vitamin D deficiency in Canada.**

MolNutr Food Res. 2010 Aug;54(8):1172-81. Review. PubMed PMID: 20352622.

The objective of this work is to estimate the economic burden and premature death rate in Canada attributable to low serum 25-hydroxyvitamin D (25(OH)D) levels. Vitamin D deficiency has been linked to many diseases and conditions in addition to bone diseases, including many types of cancer, several bacterial and viral infections, autoimmune diseases, cardiovascular diseases, and adverse pregnancy outcomes. Canadians have mean serum 25(OH)D levels averaging 67 nmol/L. The journal literature was searched for papers reporting dose-response relationships for vitamin D indices and disease outcomes. The types of studies useful in this regard include randomized controlled trials, observational, cross-sectional, and ecological studies, and meta-analyses. The mortality rates for 2005 were obtained from Statistics Canada. The economic burden data were obtained from Health Canada. The estimated benefits in disease reduction were based on increasing the mean serum 25(OH)D level to 105 nmol/L. It is estimated that the death rate could fall by 37,000 deaths (22,300-52,300 deaths), representing 16.1% (9.7-22.7%) of annuals deaths and the economic burden by 6.9% (3.8-10.0%) or \$14.4 billion (\$8.0 billion-\$20.1 billion) less the cost of the program. It is recommended that Canadian health policy leaders consider measures to increase serum 25(OH)D levels for all Canadians.

### **Stima del peso economico e delle morti premature dovute a carenza di vitamina d in Canada**

L'obiettivo di questo lavoro è quello di stimare l'onere economico e tasso di morte prematura in Canada attribuibile al siero D bassi di 25-idrossivitamin (25 (OH) D) i livelli. La carenza di vitamina D è stata associata a molte malattie e condizioni, oltre a malattie ossee, tra cui molti tipi di cancro, diverse infezioni batteriche e virali, malattie autoimmuni, malattie cardiovascolari, e gli esiti negativi della gravidanza. I canadesi hanno plasmatica media di 25 (OH) livelli di D media 67 nmol / L. La letteratura giornale è stata perquisita per i documenti di reporting relazione dose-risposta per la vitamina D e gli indici esiti della malattia. I tipi di studi utili a questo proposito sono studi randomizzati e controllati, osservazionali, studi trasversali, ed ecologico, e meta-analisi. I tassi di mortalità per il 2005 sono stati ottenuti da Statistics Canada. I dati onere economico sono stati ottenuti da Health Canada. I benefici stimati in riduzione delle malattie erano basate sull'aumento medio del siero 25 (OH) D livello a 105 nmol / L. Si stima che il tasso di mortalità potrebbe diminuire di 37.000 morti (22,300-52,300 morti), pari al 16,1% (9,7-22,7%) dei decessi annuali e l'onere economico del 6,9% (3,8-10,0%) o di 14,4 miliardi dollari (\$ 8,0 miliardi - 20,1 miliardi

dollari), meno il costo del programma. Si raccomanda che la politica sanitaria canadese leader in considerazione misure volte ad aumentare nel siero 25 (OH) livelli di D per tutti i canadesi.

82: Mordan-McCombs S, Brown T, Wang WL, Gaupel AC, Welsh J, Tenniswood M.

**Tumor progression in the LPB-Tag transgenic model of prostate cancer is altered by vitamin D receptor and serum testosterone status.**

J Steroid Biochem Mol Biol.2010 Jul;121(1-2):368-71.

Previous studies have suggested that 1,25 dihydroxyvitamin D(3) (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) induces cell cycle arrest and/or apoptosis in prostate cancer cells in vitro, suggesting that vitamin D may be a useful adjuvant therapy for prostate cancer and a chemopreventive agent. Most epidemiological data however shows a weak link between serum 25(OH)D<sub>3</sub> and risk of prostate cancer. To explore this dichotomy we have compared tumor progression in the LPB-Tag model of prostate in VDR knock out (VDRKO) and wild type (VDRWT) mice. On the C57BL/6 background LPB-Tag tumors progress significantly more rapidly in the VDRKO mice. VDRKO tumors show significantly higher levels of cell proliferation than VDRWT tumors. In mice supplemented with testosterone to restore the serum levels to the normal range, these differences in tumor progression, and proliferation are abrogated, suggesting that there is considerable cross-talk between the androgen receptor (AR) and the vitamin D axis which is reflected in significant changes in steady state mRNA levels of the AR, PCNA, cdk2 survivin and IGFR1 and 2 genes. These alterations may explain the differences between the in vitro data and the epidemiological studies.

**La progressione tumorale in un modello transgenico LPB-Tag di cancro prostatico è alterata dal recettore della vitamina D e dallo stato sierico di testosterone**

Studi precedenti hanno suggerito che la 1,25 diidrossivitamina D (3) (1,25 (OH) 2D<sub>3</sub>) induce l'arresto del ciclo cellulare e / o apoptosi in cellule di cancro alla prostata in vitro, suggerendo che la vitamina D può essere utile una terapia adiuvante per il carcinoma della prostata e un agente chemiopreventivo. La maggior parte dei dati epidemiologici mostrano tuttavia una debole nesso tra livelli sierici di 25 (OH) D<sub>3</sub> e il rischio di cancro alla prostata. Per esplorare questa dicotomia abbiamo confrontato la progressione del tumore nel modello LPB-Tag di prostata in VDR knock out (VDRKO) e la wild-type (VDRWT) topi. Sullo sfondo / 6 C57BL progresso LPB-Tag tumori significativamente più rapidamente nei topi VDRKO. Tumori VDRKO mostrano livelli significativamente più alti di proliferazione delle cellule dei tumori VDRWT. Nei topi integrato con testosterone per ripristinare i livelli sierici a valori normali, queste differenze nella progressione tumorale e la proliferazione sono abrogate, suggerendo che c'è una considerevole cross-talk tra il recettore degli androgeni (AR) e l'asse di vitamina D che si riflette nella cambiamenti significativi nei livelli di mRNA costante stato dell'arte, AR PCNA, CDK2 survivina e IGFR1 e 2 geni. Queste alterazioni possono spiegare le differenze tra i dati in vitro e gli studi epidemiologici.

83: Berkovich L, Ben-Shabat S, Sintov AC.

**Induction of apoptosis and inhibition of prostate and breast cancer growth by BGP-15, a new calcipotriene-derived vitamin D3 analog.**

Anticancer Drugs. 2010 Jul;21(6):609-18. PubMed PMID:20335794.

The role of vitamin D3 in cancer prevention and its potential as an anticancer therapeutic agent have been researched and are well established. However, the clinical use of the natural vitamin D3 metabolite, 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D3 [1,25(OH)2D3 or calcitriol] is limited by a possible cause of hypercalcemia and hypercalciuria. A new 24-chloro calcipotriene-based vitamin D3 analog (BGP-15) was synthesized and examined for antiproliferative activity in the androgen-dependent cell lines of prostate cancer (LNCaP) and breast cancer (MCF-7). The new analog led to significant decrease in cell viability in cultured LNCaP and MCF-7 cell lines compared with calcipotriene and 1,25(OH)2D3. We observed elevated vitamin D receptor protein levels in both LNCaP and MCF-7 cells, which were treated with 5 micromol/l of 1,25(OH)2D3, calcipotriene or BGP-15 for 20 h, indicating vitamin D receptor-binding ability. Treatments of LNCaP and MCF-7 cells with 5 micromol/l BGP-15 and calcipotriene for 20 h generated procaspase-3 cleavage and therefore, apoptosis. Interestingly, BGP-15, and to a lesser extent calcipotriene, but not 1,25(OH)2D3, activated caspase-3 in MCF-7 cells, a cell line that normally lacks this specific caspase (and procaspase). It is presumed that management of MCF-7 with BGP-15 modulates procaspase-3 expression and cleavage, and a subsequent activation of caspase-3. Similar treatments of LNCaP cells induced procaspase-9 cleavage and therefore caspase-9 activation, whereas similar treatments of MCF-7 cells failed to induce caspase-9 activation. Cytochrome c release was, however, detected in both cell lines, LNCaP and MCF-7. In-vivo results suggested that BGP-15 (similar to its parent drug) did not cause calcium-related toxic side effects after chronic treatment.

**Induzione dell'apoptosi e inibizione della crescita del cancro prostatico e mammario tramite BGP-15, un nuovo analogo della vitamina D3 derivato dal calcipotriene.**

Il ruolo della vitamina D3 nella prevenzione del cancro e il suo potenziale come agente antitumorale sono stati studiati e sono ben consolidate. Tuttavia, l'uso clinico del metabolita naturale della vitamina D3, 1 $\alpha$ ,25-diidrossivitamina D3 [1,25 (OH) 2D3 o calcitriolo] è limitato da una possibile causa di ipercalcemia ed ipercalciuria. Un nuovo 24-cloro Calcipotriene a base di vitamina D3 analogico (BGP-15) è stato sintetizzato ed esaminati per l'attività antiproliferativa nelle linee di cellule androgeno-dipendenti del cancro della prostata (LNCaP) e cancro della mammella (MCF-7). L'analogico nuovo ha portato a diminuzione significativa della vitalità cellulare in colture di LNCaP e le linee di cellule MCF-7 rispetto a Calcipotriene e 1,25 (OH) 2D3. Abbiamo osservato elevati di vitamina D i livelli di proteina recettore sia in LNCaP e cellule MCF-7, che sono stati

trattati con 5 micromoli / l di 1,25 (OH) 2D3, Calcipotriene o BGP-15 per 20 h, che indica la capacità della vitamina D recettoriale . Trattamenti di LNCaP e cellule MCF-7 con 5 micromoli / l BGP-15 e Calcipotriene per 20 h generato procaspasi-3 scissione e, quindi, l'apoptosi. È interessante notare che, BGP-15, e ad un Calcipotriene misura minore, ma non 1,25 (OH) 2D3, attivata caspasi-3 nelle cellule MCF-7, una linea cellulare che manca normalmente questa caspasi specifiche (e procaspasi). Si presume che la gestione di MCF-7 con BGP-15 modula procaspasi-3 espressione e di scissione, e una successiva attivazione della caspasi-3. trattamenti analoghi delle cellule LNCaP indotta procaspasi caspasi-9 scissione e quindi l'attivazione-9, mentre i trattamenti analoghi delle cellule MCF-7 non è riuscito a indurre l'attivazione della caspasi-9. Rilascio del citocromo c era, tuttavia, rilevato in entrambe le linee cellulari LNCaP e MCF-7. risultati in-vivo suggerito che BGP-15 (simile al suo farmaco di origine) non ha causato il calcio relativi effetti collaterali tossici dopo trattamento cronico.

86: Thill M, Fischer D, Kelling K, Hoellen F, Dittmer C, Hornemann A, Salehin D, Diedrich K, Friedrich M, Becker S.

**Expression of vitamin D receptor (VDR), cyclooxygenase-2 (COX-2) and 15 hydroxyprostaglandin dehydrogenase (15-PGDH) in benign and malignant ovarian tissue and 25-hydroxycholecalciferol (25(OH)2D3) and prostaglandin E2 (PGE2) serum level in ovarian cancer patients.**

J Steroid BiochemMol Biol. 2010 Jul;121(1-2):387-90.

Ovarian carcinomas are associated with increased inflammation which is based upon an up-regulation of inducible cyclooxygenase-2 (COX-2). Moreover, based on our previous published data, the extra-renal vitamin D metabolism seems to be dysregulated in comparison to healthy tissue. In order to gain further insight into the prostaglandin (PG)- and vitamin D-metabolism in ovarian carcinomas, the study aimed to evaluate the expression of the PG metabolising enzymes COX-2 and 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase (15-PGDH) compared to the vitamin D receptor (VDR) in benign and malignant ovarian tissues. Additionally, we determined the 25-hydroxycholecalciferol (25(OH)2D3) serum levels. Expression of VDR, COX-2 and 15-PGDH was determined by Western blot analysis. Serum levels of 25(OH)2D3 and PGE2 were measured by chemiluminescence-based and colorimetric immunoassay. We detected significantly higher expressions of the PG metabolising enzymes 15-PGDH and COX-2 in malignant tissue and PGE2 serum levels were 2-fold higher in tumour patients. Furthermore, we found an inverse correlation to the VDR-expression which was 62.1% lower in malignant tissues compared to that in benign tissues. Surprisingly, we could not detect any differences between the 25(OH)2D3 serum levels in either group (n=20). These data suggest a correlation between PG- and vitamin D-metabolism in ovarian carcinomas.

**Espressione del recettore della vitamina D (VDR), cicloossigenasi-2 (COX-2) e 15 idrossiprostaglandina deidrogenasi (15-PGDH) nei tessuti ovarici benigni e maligni e livelli sierici di 25-idrossicolcalciferolo (25(OH)2D3) e prostaglandina E2 (PGE2) nei pazienti con cancro ovarico.**

Carcinomi ovarici sono associati con un aumento dell'infiammazione che si basa su un up-regolazione di inducibile della cicloossigenasi-2 (COX-2). Inoltre, sulla base delle nostre precedenti dati pubblicati, l'extra-renale metabolismo della vitamina D sembra essere deregolazione rispetto al tessuto sano. Al fine di ottenere una visione più completa della prostaglandina (PG) - e di vitamina D nel metabolismo dei carcinomi ovarici, lo studio mirava a valutare l'espressione degli enzimi che metabolizzano il PG COX-2 e 15-hydroxyprostaglandin deidrogenasi (15-PGDH) rispetto al

recettore della vitamina D (VDR) nei tessuti ovarici benigni e maligni. Inoltre, abbiamo determinato il 25-idrossicolecalciferolo (25 (OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub>), i livelli sierici. Espressione di VDR, COX-2 e 15-PGDH è stata determinata mediante analisi Western blot. I livelli sierici di 25 (OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> e PGE<sub>2</sub> sono stati misurati mediante immunodosaggio chemiluminescenza-based e colorimetriche. Abbiamo rilevato espressioni molto più elevato del enzimi che metabolizzano PG 15-PGDH e COX-2 nei tessuti maligni e livelli sierici di PGE<sub>2</sub> sono 2 volte più alti nei pazienti con tumore. Inoltre, abbiamo riscontrato una correlazione inversa con l'espressione VDR, che è stato del 62,1% più bassa nei tessuti maligni rispetto a quella nei tessuti benigni. Sorprendentemente, non abbiamo rilevato alcuna differenza tra il 25 (OH)<sub>2</sub> i livelli sierici D<sub>3</sub> in entrambi i gruppi (n = 20). Questi dati suggeriscono una correlazione tra PG-e-il metabolismo della vitamina D nei carcinomi ovarici.

87: Lee HJ, So JY, DeCastro A, Smolarek A, Paul S, Maehr H, Uskokovic M, Suh N.

**Gemini vitamin D analog suppresses ErbB2-positive mammary tumor growth via inhibition of ErbB2/AKT/ERK signaling.**

J Steroid Biochem Mol Biol. 2010 Jul;121(1-2):408-12.

Numerous synthetic vitamin D analogs have been studied for their effects on the prevention and treatment of breast cancer. However, the inhibitory effects of naturally occurring 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> or its synthetic analogs on ErbB2 overexpressing mammary tumorigenesis have not been reported. Gemini vitamin D analogs are novel synthetic vitamin D derivatives with a unique structure of two six-carbon chains at C-20. We have previously shown that Gemini vitamin D analogs significantly inhibited carcinogen-induced estrogen receptor (ER)-positive mammary tumorigenesis and reduced ER-negative MCF10DCIS.com xenograft tumor growth without hypercalcemic toxicity. In the present study, we have determined the inhibitory effect of a potent Gemini vitamin D analog BXL0124 (1 $\alpha$ ,25-dihydroxy-20R-21(3-hydroxy-3-deuteromethyl-4,4,4-trideuterobutyl)-23-yne-26,27-hexafluoro-cholecalciferol) on the ErbB2/Her-2/neu overexpressing mammary tumorigenesis. The Gemini BXL0124 inhibits ErbB2-positive mammary tumor growth and down-regulates the phosphorylation of ErbB2, ERK and AKT in tumors of MMTV-ErbB2/neu transgenic mice. These effects of Gemini BXL0124 in vivo were confirmed by using the ErbB2 overexpressing tumor cells derived from the mammary tumors of MMTV-ErbB2/neu mice. In conclusion, the Gemini vitamin D analog BXL0124 inhibits the growth of ErbB2 overexpressing mammary tumors through regulating the ErbB2/AKT/ERK signaling pathways, suggesting that Gemini vitamin D analog may be considered for translational studies.

**Analogo gemellare della vitamina D sopprime la crescita di cellule tumorali mammarie positive a ErbB2 tramite l'inibizione della via di segnale di ErbB2/AKT/ERK signaling.**

Numerosi sintetici analoghi della vitamina D sono stati studiati per i loro effetti sulla prevenzione e il trattamento del carcinoma mammario. Tuttavia, gli effetti inibitori di natura D<sub>3</sub> 1 $\alpha$ ,25-diidrossivitaminina o dei suoi analoghi sintetici su ErbB2 sovraespressione tumorigenesi mammaria non sono stati segnalati. Gemini analoghi della vitamina D sono nuovi derivati sintetici della vitamina D con una struttura unica di due catene di sei-carbonio a C-20. Abbiamo precedentemente dimostrato che Gemini analoghi della vitamina D ha inibito significativamente cancerogeno indotto recettore dell'estrogeno (ER) positivi tumorigenesi mammaria e ridotto ER-negativo di crescita xenotrapianto MCF10DCIS.com tumore senza tossicità ipercalcemia. Nel presente studio, abbiamo determinato l'effetto inibitorio di una potente BXL0124 vitamina D Gemini analogico (1 $\alpha$ ,25-diidrossi-20R-21 (3-idrossi-3-deuteromethyl-4,4,4-trideuterobutyl)-23-ino -26,27-hexafluoro-colecalciferolo) sul ErbB2/Her-2/neu sovraespressione tumorigenesi mammaria. Il BXL0124 Gemini inibisce ErbB2-positive la crescita del tumore mammario e down-regola la fosforilazione di

ErbB2, ERK e AKT nei tumori dei topi transgenici MMTV-ErbB2/neu. Questi effetti dei Gemelli BXL0124 in vivo sono stati confermati utilizzando il ErbB2 sovraespressione cellule tumorali derivate da tumori mammari di topi MMTV-ErbB2/neu. In conclusione, la vitamina D Gemini BXL0124 analogico inibisce la crescita di ErbB2 overesprimenti tumori mammari attraverso la regolazione delle vie di segnalazione ErbB2/AKT/ERK, il che suggerisce che la vitamina D Gemini analogico può essere considerato per gli studi di traduzione.

88: Filip B, Milczarek M, Wietrzyk J, Chodyński M, Kutner A.

### **Antitumor properties of (5E,7E) analogs of vitamin D3.**

J Steroid Biochem Mol Biol. 2010 Jul;121(1-2):399-402.

Geometric isomers (5E,7E) of major active metabolites of vitamin D3 [1 $\alpha$ ,25(OH)2D3 and (24R)-1,24(OH)2D3] were synthesized by a new convenient procedure. Vitamin D triene system of the metabolites was first derivatized as a Diels-Alder adduct. Removal of the triene protecting group, in a key synthetic step, yielded the title compounds PRI-2208 and PRI-2209, respectively. The analogs were examined for their antiproliferative activity in vitro against human breast cancer cells (MCF-7) and promyelocytic leukemia (HL-60) cells. The activity was compared with one of the parent compounds. Both analogs examined revealed similar or higher antiproliferative activity compared to 1 $\alpha$ ,25(OH)2D3 or to (24R)-1,24(OH)2D3. The studies of calcemic activity in vivo showed that analogs PRI-2208 and PRI-2209 did not influence the serum calcium level in doses, in which 1 $\alpha$ ,25(OH)2D3 or (24R)-1,24(OH)2D3 significantly increased this level. The antitumor activity of these analogs in the LLC mice tumor model was studied. Analog PRI-2208 was found to be more active in inhibiting LLC tumor growth than 1 $\alpha$ ,25(OH)2D3, as well as than PRI-2191 and PRI-2209.

### **Proprietà antitumorali di analoghi della vitamina D3 (5E,7E)**

Isomeri geometrici (5E, 7E) dei principali metaboliti attivi della vitamina D3 [1 $\alpha$ , 25 (OH) 2D3 e (24R) -1,24 (OH) 2D3], sono stati sintetizzati da una nuova procedura conveniente. La vitamina D trienici coniugati sistema dei metaboliti della prima derivatizzati come un addotto di Diels-Alder. La rimozione del gruppo trienici coniugati tutela, in un passaggio chiave sintetica, ha dato il titolo di composti PRI-PRI-2208 e 2209, rispettivamente. Il analoghi sono stati esaminati per la loro attività antiproliferativa in vitro contro le cellule umane di cancro al seno (MCF-7) e la leucemia promielocitica (HL-60) le cellule. L'attività è stata confrontata con uno dei composti genitore. Entrambi gli analoghi esaminati hanno rivelato simile o maggiore attività antiproliferativa rispetto alla 1 $\alpha$ , 25 (OH) 2D3 o (24R) -1,24 (OH) 2D3. Gli studi di attività calcemici in vivo hanno dimostrato che gli analoghi PRI-2208 e PRI-2209 non ha influenzato il livello di calcio sierico in dosi, in cui 1 $\alpha$ , 25 (OH) 2D3 o (24R) -1,24 (OH) 2D3 significativamente aumentato questo livello. L'attività antitumorale di questi analoghi nel tumore LLC topi modello è stato studiato. Analog PRI-2208 è risultato essere più attivo nell'inibire la crescita tumorale LLC di 1 $\alpha$ , 25 (OH) 2D3, così come di PRI-2191-2209 e PRI.

89: Wang X, Studzinski GP.

**Expression of MAP3 kinase COT1 is up-regulated by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in parallel with activated c-jun during differentiation of human myeloid leukemia cells.**

J Steroid Biochem Mol Biol. 2010Jul;121(1-2):395-8.

The role of MAP kinase pathways in 1,25-dihydroxyvitamin D3 (1,25D)-induced differentiation of myeloid leukemia cells is well established, but the mechanisms by which 1,25D activates these pathways are not entirely clear. Following the finding that kinase suppressors of ras (KSR) 1 and 2 are directly regulated by 1,25D and participate in the monocytic differentiation process, we investigated if the COT1 oncogene (Tpl2 in the rat), known to interact with human KSR2 (hKSR2), is also involved in 1,25D-induced differentiation in leukemia cells. Here we report that the exposure of HL60 and U937 myeloid leukemia cells to 1,25D increases COT1 expression in a concentration-dependent manner. However, COT1 appears to have a differentiation-limiting role in these cells, as an exposure of HL60 and U937 cells to a pharmacological inhibitor of COT1 kinase activity, 4-(3-chloro-4-fluorophenylamino)-6-(pyridin-3-yl-methylamino-3-cyano-[1-7]-naphthyridine, results in increased 1,25D-induced differentiation. These findings provide an additional insight into the 1,25D-regulation of MAPK pathways that contribute to monocytic differentiation process of myeloid leukemia cells.

**Espressione di MAP3 chinasi COT1 è regolata positivamente da 1,25-diidrossivitamina D3 in parallelo all'attivazione di c-jun durante la differenziazione delle cellule umane con leucemia mieloide.**

Il ruolo dei percorsi della MAP chinasi in 1,25-diidrossivitamina D3 (1,25 D)-differenziazione indotta delle cellule della leucemia mieloide è ben definito, ma i meccanismi con cui 1,25 D attiva queste vie non sono del tutto chiare. In seguito alla constatazione che soppressori chinasi di Ras (KSR) 1 e 2 sono direttamente regolate da 1,25 D e partecipare al processo di differenziazione monocitaria, abbiamo studiato se il COT1 oncogene (Tpl2 nel ratto), noto per interagire con KSR2 umani (hKSR2 ), si occupa anche di 1,25 D-differenziazione indotta in cellule leucemiche. Qui segnaliamo che l'esposizione di HL60 e U937 leucemia mieloide aumenta di 1,25 D COT1 espressione in modo concentrazione-dipendente. Tuttavia, COT1 sembra avere un ruolo di differenziazione-limitante in queste cellule, come una esposizione di HL60 e U937 per un inibitore farmacologico di COT1 attività della chinasi, 4 - (3-cloro-4-fluorophenylamino) -6 - (pyridin-3 -ile-metilammino-3-ciano-[1-7]-naphthyridine, si traduce in un aumento di 1,25 D-differenziazione indotta. Questi risultati forniscono un quadro aggiuntivo in D 1,25-regolazione delle vie MAPK che contribuiscono al processo di differenziazione monocitica cellule di leucemia mieloide.

90: Haussler MR, Haussler CA, Whitfield GK, Hsieh JC, Thompson PD, Barthel TK, Bartik L, Egan JB, Wu Y, Kubicek JL, Lowmiller CL, Moffet EW, Forster RE, Jurutka PW.

**The nuclear vitamin D receptor controls the expression of genes encoding factors which feed the "Fountain of Youth" to mediate healthful aging.**

J Steroid Biochem Mol Biol. 2010 Jul;121(1-2):88-97.

The nuclear vitamin D receptor (VDR) binds 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> (1,25D), its high affinity renal endocrine ligand, to signal intestinal calcium and phosphate absorption plus bone remodeling, generating a mineralized skeleton free of rickets/osteomalacia with a reduced risk of osteoporotic fractures. 1,25D/VDR signaling regulates the expression of TRPV6, BGP, SPP1, LRP5, RANKL and OPG, while achieving feedback control of mineral ions to prevent age-related ectopic calcification by governing CYP24A1, PTH, FGF23, PHEX, and klotho transcription. Vitamin D also elicits numerous intracrine actions when circulating 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub>, the metabolite reflecting vitamin D status, is converted to 1,25D locally by extrarenal CYP27B1, and binds VDR to promote immunoregulation, antimicrobial defense, xenobiotic detoxification, anti-inflammatory/anticancer actions and cardiovascular benefits. VDR also affects Wnt signaling through direct interaction with beta-catenin, ligand-dependently blunting beta-catenin mediated transcription in colon cancer cells to attenuate growth, while potentiating beta-catenin signaling via VDR ligand-independent mechanisms in osteoblasts and keratinocytes to function osteogenically and as a pro-hair cycling receptor, respectively. Finally, VDR also drives the mammalian hair cycle in conjunction with the hairless corepressor by repressing SOSTDC1, S100A8/S100A9, and PTHrP. Hair provides a shield against UV-induced skin damage and cancer in terrestrial mammals, illuminating another function of VDR that facilitates healthful aging.

**Il recettore nucleare della vitamina D controlla l'espressione dei geni che codificano per i fattori che alimentano la "Fontana della Giovinezza" e che mediano l'invecchiamento sano**

Il nucleare recettore della vitamina D (VDR) si lega 1,25-diidrossivitamina D<sub>3</sub> (1,25 D), il suo ligando ad alta affinità renale endocrino, per la segnalazione e l'assorbimento intestinale del calcio fosfato più rimodellamento osseo, generando uno scheletro mineralizzato libero di rachitismo / osteomalacia con un ridotto rischio di fratture osteoporotiche. 1,25 D / segnalazione VDR regola l'espressione di TRPV6, BGP, SPP1, LRP5, RANKL e OPG, oltre a raggiungere il controllo di retroazione di ioni minerali per prevenire legate all'età calcificazione ectopica governando CYP24A1, PTH, FGF23, PHEX, e la trascrizione Klotho. La vitamina D provoca anche numerose azioni intracrine quando circolano 25-idrossivitamina D<sub>3</sub>, il metabolita che riflette lo stato della vitamina D, viene convertito in 1,25 D a livello locale da extrarenale CYP27B1, e si lega VDR per

promuovere immunoregolazione, difesa antimicrobica, disintossicazione xenobiotici, anti-inflammatori/anticancer azioni e benefici cardiovascolari. VDR colpisce anche Wnt segnalazione attraverso l'interazione diretta con beta-catenina, ligando-dipendente ottundimento beta-catenina trascrizione mediata in cellule di cancro del colon per attenuare la crescita, mentre il potenziamento beta-catenina attraverso meccanismi di segnalazione VDR ligando-indipendente in osteoblasti e cheratinociti di funzionare e osteogenicamente come recettore ciclo pro-capelli, rispettivamente. Infine, VDR unita anche il ciclo dei mammiferi capelli in collaborazione con il corepressor glabro reprimendo SOSTDC1, S100A8/S100A9 e PTHrP. Capelli fornisce uno scudo contro i raggi UV-indotto danni alla pelle e tumori nei mammiferi terrestri, illuminando un'altra funzione di VDR che facilita l'invecchiamento sano.

91: Stambolsky P, Tabach Y, Fontemaggi G, Weisz L, Maor-Aloni R, Siegfried Z, Shiff I, Kogan I, Shay M, Kalo E, Blandino G, Simon I, Oren M, Rotter V.

### **Modulation of the vitamin D3 response by cancer-associated mutant p53.**

Cancer Cell. 2010 Mar 16;17(3):273-85. Erratum in: Cancer Cell. 2010 May 18;17(5):523. Siegfried, Zahava [corrected to Siegfried, Zehava].

The p53 gene is mutated in many human tumors. Cells of such tumors often contain abundant mutant p53 (mutp53) protein, which may contribute actively to tumor progression via a gain-of-function mechanism. We applied ChIP-on-chip analysis and identified the vitamin D receptor (VDR) response element as overrepresented in promoter sequences bound by mutp53. We report that mutp53 can interact functionally and physically with VDR. Mutp53 is recruited to VDR-regulated genes and modulates their expression, augmenting the transactivation of some genes and relieving the repression of others. Furthermore, mutp53 increases the nuclear accumulation of VDR. Importantly, mutp53 converts vitamin D into an antiapoptotic agent. Thus, p53 status can determine the biological impact of vitamin D on tumor cells.

### **Modulazione della risposta della vitamina D3 tramite p53 mutata in associazione al tumore.**

Il gene p53 è mutato in molti tumori umani. Le cellule di questi tumori spesso contengono abbondanti p53 mutante (mutp53) di proteine, che possono contribuire attivamente alla progressione del tumore attraverso un meccanismo di guadagno-di-funzione. Abbiamo applicato l'analisi ChIP-on-chip e identificato il recettore della vitamina D (VDR) come elemento di risposta sovrarappresentati nelle sequenze promotore vincolati da mutp53. Si segnala che mutp53 possono interagire funzionalmente e fisicamente con VDR. Mutp53 è reclutato per geni VDR-regolamentato e modula la loro espressione, aumentando la transattivazione di alcuni geni e alleviare la repressione degli altri. Inoltre, mutp53 aumenta l'accumulo nucleare di VDR. È importante sottolineare che mutp53 converte vitamina D in un agente antiapoptotici. Pertanto, lo stato di p53 in grado di determinare l'impatto biologico della vitamina D sulle cellule tumorali.

92: Ordóñez-Morán P, Alvarez-Díaz S, Valle N, Larriba MJ, Bonilla F, Muñoz A.

**The effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on colon cancer cells depend on RhoA-ROCK-p38MAPK-MSK signaling.**

J Steroid Biochem Mol Biol. 2010 Jul;121(1-2):355-61.

Many studies support a protective action of vitamin D against colon cancer. 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) exerts wide gene regulatory effects in human colon cancer cells. We previously reported that 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> increases cytosolic Ca<sup>2+</sup> concentration and transiently activates RhoA and its effector the Rho-associated coiled-kinase (ROCK), and later p38MAPK-MSK. We found that the inhibition of ROCK signaling by Y27632 or that of MSK by Ro318220 prevent the formation of epithelioid islands of SW480-ADH cells by 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> and disrupts the adhesive phenotype of HT29 cells. ROCK and MSK inhibition also abrogates the induction of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 24-hydroxylase (CYP24), E-cadherin, and vinculin and the repression of cyclin D1 by 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. Moreover, 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> does not promote the localization of the tight junction protein occludin at the plasma membrane in cells expressing a dominant negative RhoA (N19-RhoA). In addition, 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> specifically increases the level of the cysteine protease-inhibitor cystatin D, whereas that of cystatin SN is unaffected. The increase of cystatin D protein caused by 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> is abrogated in N19-RhoA cells. Thus, activation of the RhoA-ROCK-p38MAPK-MSK signaling pathway is essential for the regulation of the phenotype and of the CST5/cystatin D candidate tumor suppressor and other target genes by 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> in colon cancer cells.

**Gli effetti di 1,25-diidrossivitamina D3 sulle cellule del colon cancerose dipendono dalla via di segnale RhoA-ROCK-p38MAPK-MSK**

Molti studi supportano una azione protettiva della vitamina D contro il cancro al colon. D<sub>3</sub> 1 $\alpha$ , 25-diidrossivitamina (1,25 (OH) 2D<sub>3</sub>) esercita effetti a livello di regolamentazione gene in cellule umane di cancro del colon. Precedentemente abbiamo segnalato che la 1,25 (OH) 2D<sub>3</sub> aumenta la concentrazione di Ca<sup>2+</sup> citosolico e transitoriamente attiva p38MAPK RhoA e il suo effettore di Rho-associati arrotolato-chinasi (ROCK), e poi-MSK. Abbiamo scoperto che l'inibizione della segnalazione da parte ROCK Y27632 o quella di MSK Ro318220 da impedire la formazione di isole di cellule epitelioidi SW480-ADH dalla 1,25 (OH) 2D<sub>3</sub> e disturba il fenotipo delle cellule HT29 adesivo. Inibizione ROCK e MSK abroga anche l'induzione di 1,25 (OH) 2D<sub>3</sub> 24-idrossilasi (CYP24), E-caderina, e vinculin e la repressione della ciclina D1 con 1,25 (OH) 2D<sub>3</sub>. Inoltre, 1,25 (OH) 2D<sub>3</sub> non favorisce la localizzazione della proteina occludina stretto raccordo a livello della membrana plasmatica in cellule che esprimono una posizione dominante RhoA negativo (N19-RhoA). Inoltre, 1,25 (OH) 2D<sub>3</sub> aumenta in particolare il livello di cistatina cisteina proteasi-inibitore D, mentre quella di cistatina SN è inalterato. L'aumento della proteina cistatina D causati

da 1,25 (OH) 2D3 è abrogata in cellule N19-RhoA. Pertanto, l'attivazione della via RhoA-ROCK-p38MAPK-MSK segnalazione è essenziale per la regolazione del fenotipo e del candidato soppressore del tumore CST5/cystatin D e altri geni bersaglio da 1,25 (OH) 2D3 nelle cellule tumorali del colon.

94: Trémezaygues L, Seifert M, Vogt T, Tilgen W, Reichrath J.

**1,25-dihydroxyvitamin D3 modulates effects of ionizing radiation (IR) on human keratinocytes: in vitro analysis of cell viability/proliferation, DNA-damage and -repair.**

J Steroid Biochem Mol Biol. 2010 Jul;121(1-2):324-7.

We investigated the capacity of 1,25-dihydroxyvitamin D3 (1,25(OH)2D3) to protect spontaneously immortalized human keratinocytes (HaCaT) and cutaneous squamous cell carcinoma cells (SCL-1) against the hazardous effects of ionizing radiation (IR). We pretreated HaCaT and SCL-1 cells in vitro with 1,25(OH)2D3 (10<sup>-7</sup> M) over 48 h and then irradiated them once with IR (1 Gy, 2 Gy, and 5 Gy). Using WST-1-assay and crystal violet (CV) assay, we compared viability/proliferation in 1,25(OH)2D3-pretreated cells with controls that were pretreated with the carrier substance ethanol alone. Additionally, we analyzed the effects of 1,25(OH)2D3 on the presence of IR-induced DNA-damage by immunocytochemical detection of gamma-H2AX-foci in HaCaT-keratinocytes. We demonstrate that 1,25(OH)2D3 (10<sup>-7</sup> M) inhibits proliferation of human keratinocytes and that IR (1-5 Gy) has no significant effect on proliferation and viability of HaCaT-keratinocytes and SCL-1 cells. Moreover, we show that IR modulates dose-dependently the number of gammaH2AX-foci in HaCaT-keratinocytes. Pretreatment of the cells with 1,25(OH)2D3 reduces the number of IR-induced gammaH2AX-foci after irradiation with 1 Gy and 2 Gy and increases it after irradiation with 5 Gy. To put it in a nutshell, our data support the hypothesis that 1,25(OH)2D3 modulates the effects of low-dose IR (1-5 Gy) on cultured human keratinocytes.

**1,25-diidrossivitamina D3 modula gli effetti delle radiazioni ionizzanti (IR) sui cheratinociti umani: in vitro analisi della viabilità/proliferazione, danno del DNA e correzione.**

Abbiamo studiato la capacità della 1,25-diidrossivitamina D3 (1,25 (OH) 2D3) per proteggere spontaneamente immortalato cheratinociti umani (HaCaT) e le cellule cutanee carcinoma a cellule squamose (SCL-1) contro gli effetti nocivi delle radiazioni ionizzanti (IR). Noi pretrattati HaCaT e SCL-1 le cellule in vitro con 1,25 (OH) 2D3 (10<sup>-7</sup> M) oltre 48 ore e poi li irradiati una volta con il IR (1 Gy, 2 Gy, e 5 Gy). Utilizzo di vitalità WST-1-test e viola di cristallo (CV) del test, abbiamo confrontato / proliferazione in 1,25 (OH) 2D3 pretrattati cellule con i controlli che sono stati pretrattati con l'etanolo sostanza utilizzata come supporto da solo. Inoltre, abbiamo analizzato gli effetti della 1,25 (OH) 2D3 sulla presenza di IR-indotta danno del DNA tramite rilevazione immunocitochimiche di gamma-H2AX-foci in HaCaT-cheratinociti. Abbiamo dimostrato che 1,25 (OH) 2D3 (10<sup>-7</sup> M) inibisce la proliferazione dei cheratinociti umani e che IR (1-5 Gy) non ha alcun effetto significativo sulla proliferazione e la vitalità di HaCaT-cheratinociti e SCL-1 celle. Inoltre, dimostriamo che IR modula dose-dipendente del numero di focolai in gammaH2AX-HaCaT-cheratinociti. Il pretrattamento delle cellule con 1,25 (OH) 2D3 riduce il numero di IR-indotta gammaH2AX-foci dopo irradiazione con 1 Gy e 2 Gy e aumenta dopo irradiazione con 5

Gy. Per dirla in poche parole, i nostri dati supportano l'ipotesi che la 1,25 (OH) 2D3 modula gli effetti dei raggi infrarossi a basso dosaggio (1-5 Gy) su cheratinociti umani in coltura.

96: Gavrilov V, Leibovich Y, Ariad S, Lavrenkov K, Shany S.

**A combined pretreatment of 1,25-dihydroxyvitamin D3 and sodium valproate enhances the damaging effect of ionizing radiation on prostate cancer cells.**

J Steroid Biochem Mol Biol. 2010 Jul;121(1-2):391-4.

Radiotherapy is one of the curative treatment options for prostate cancer (PCa). However, effective doses of ionizing radiation (IR) have a high risk of side effects. To increase sensitivity of PCa to IR we pretreated human androgen-refractory DU145 PCa cells with a combination of sodium valproate (VPA), a well-tolerated drug with histone deacetylases inhibiting activity, and 1,25-dihydroxyvitamin D3, 1,25(OH)2D3, the active metabolite of vitamin D, a well known anticancer agent. The results show that irradiation (4Gy) of DU145 PCa cells pretreated with a combination of 1 mM VPA and 100 nM 1,25(OH)2D3 efficiently suppressed (87.9%) PCa cell proliferation. IR after combined pretreatment resulted in increased DNA double-strand breaks expressed as levels of phosphorylated histone H2A.X, compared with non-treated cells the increase was 58.1% in pretreated cells and 11.8% in non-pretreated cells ( $p < 0.002$ ). Combined pretreatment enhanced IR-induced activation of DNA damage checkpoint kinase Chk2, 39.0% in pretreated cells compared to 23.8% in non-pretreated cells ( $p < 0.05$ ). These molecular changes led to DNA replication blockade, S-phase cell-cycle arrest and enhanced apoptosis. Cumulatively, the results indicate that combined pretreatment with VPA and 1,25(OH)2D3 followed by IR is a highly effective treatment for human PCa cells. This observation may have important implications for reducing doses of radiation administered to cancer patients thus limiting the severity of side effects.

**Un pretrattamento combinato con 1,25-diidrossivitamina D3 e sodio valproato aumenta l'effetto dannoso delle radiazioni ionizzanti sulle cellule prostatiche cancerose.**

La radioterapia è una delle opzioni di trattamento curativo per il cancro della prostata (PCA). Tuttavia, dosi efficaci di radiazioni ionizzanti (IR) hanno un alto rischio di effetti collaterali. Per aumentare la sensibilità della PCA per IR abbiamo pretrattati umano androgeno-refrattario DU145 cellule APC con una combinazione di sodio valproato (VPA), un farmaco ben tollerato con istone deacetilasi attività di inibizione, e di 1,25-diidrossivitamina D3, 1,25 (OH) 2D3, il metabolita attivo della vitamina D, un agente antitumorale ben noto. I risultati mostrano che l'irradiazione (4Gy) di DU145 cellule PCa pretrattati con una combinazione di 1 mm VPA e 100 nm 1,25 (OH) 2D3 efficacemente repressa (87,9%), la proliferazione cellulare PCA. IR dopo pre-trattamento combinato ha portato a rotture del DNA a doppio filamento maggiore espressi in livelli di istone H2A.X fosforilata, rispetto alle cellule non trattate con l'incremento è stato del 58,1% nelle cellule pretrattati e 11,8% in cellule non-trattati ( $p < 0,002$ ). Pretrattamento combinato migliorato IR-indotto l'attivazione di danno al DNA checkpoint chinasi Chk2, 39,0% in cellule pretrattate contro il 23,8% in cellule non-trattati ( $p < 0,05$ ). Questi cambiamenti molecolari ha portato alla replicazione del

DNA blocco, in fase S arresto del ciclo cellulare e apoptosi aumentata. Complessivamente, i risultati indicano che il pretrattamento combinato con VPA e 1,25 (OH) 2D3 seguita da IR è un trattamento altamente efficace per cellule umane PCa. Questa osservazione potrebbe avere importanti implicazioni per la riduzione delle dosi di radiazioni somministrate a pazienti con tumore limitando così la gravità degli effetti collaterali.

97: Sertznig P, Seifert M, Tilgen W, Reichrath J.

**Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) and vitamin D receptor (VDR) signaling pathways in melanoma cells: promising new therapeutic targets?**

J Steroid Biochem Mol Biol. 2010 Jul;121(1-2):383-6.

Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) and vitamin D receptor (VDR) signaling pathways regulate a multitude of genes that are of importance for a multitude of cellular functions including cell proliferation, cell differentiation, immune responses and apoptosis. Ligands and other agents influencing the PPAR and VDR signaling pathways have been shown to reveal chemopreventive potential by mediating tumor suppressive activities in a variety of human cancers. Use of these compounds may represent a potential novel strategy to prevent melanoma pathogenesis and to inhibit melanoma progression. We recently showed that 1,25-dihydroxyvitamin D3 and some of the investigated PPAR ligands inhibited proliferation of the human melanoma cell line MeWo. In addition to this, our results gave an indication of an interconnection of the PPAR and VDR signaling pathways at the level of cross-regulation of their respective transcription factor mRNA levels. The provided link between VDR and PPAR may play an important role in treatment and prevention of melanoma. This review summarizes the currently available data on the roles of the PPARs and the VDR in pathogenesis and progression of melanoma as well as their role as promising future therapeutic targets.

**Il perossisoma proliferatore attivato dal recettore (PPAR) e le vie di segnale del recettore della vitamina D (VDR) nelle cellule con melanoma: nuovi target terapeutici promettenti?**

Peroxisome proliferator-recettore attivato (PPAR) e del recettore della vitamina D (VDR) le vie di segnalazione regolamentare un gran numero di geni che sono importanti per un gran numero di funzioni cellulari tra cui la proliferazione cellulare, differenziamento cellulare, risposta immunitaria e apoptosi. Leganti e gli altri agenti che influenzano il PPAR e VDR vie di segnalazione sono stati indicati per rivelare potenziali chemiopreventivi mediando le attività di tumore soppressiva in una varietà di tumori umani. L'uso di questi composti possono rappresentare una potenziale strategia romanzo di prevenire patogenesi del melanoma e di inibire la progressione del melanoma. Abbiamo recentemente dimostrato che la 1,25-diidrossivitamina D3 e alcuni dei ligandi PPAR indagati hanno inibito la proliferazione della linea di melanoma umano MeWo cellulare. Oltre a questo, i nostri risultati hanno dato un'indicazione di una interconnessione dei PPAR e delle vie di segnalazione VDR a livello di cross-regolazione dei rispettivi livelli di mRNA del fattore di trascrizione. Il link fornito tra VDR e PPAR può giocare un ruolo importante nel trattamento e nella prevenzione del melanoma. Questa review riassume i dati attualmente disponibili sui ruoli del PPAR e del VDR nella patogenesi e nella progressione del melanoma, nonché il loro ruolo di promettente futuro bersagli terapeutici.

99: Bao BY, Ting HJ, Hsu JW, Yasmin-Karim S, Messing E, Lee YF.

**Down-regulation of NF-kappaB signals is involved in loss of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 responsiveness.**

J Steroid Biochem Mol Biol. 2010 May;120(1):11-21.

Vitamin D anti-tumor effect is often found reduced in the late stages of cancer. To uncover vitamin D resistance mechanism, we established a vitamin D-resistant human prostate cancer LNCaP cell line, LNCaP-R, by chronic exposure of cells to 1alpha,25-dihydroxyvitamin D(3) (1,25-VD). The vitamin D receptor (VDR)-mediated transcriptional activity was reduced in LNCaP-R, whereas VDR expression level and DNA-binding capacity were similar compared to parental cells (LNCaP-P). The expressions of the key factors involved in VDR transactivity, including CYP24A1 and VDR-associated proteins are all increased in LNCaP-R cells, and yet treatment with ketoconazole, P450 enzymes inhibitor, as well as trichostatin A (TSA), a histone deacetylase inhibitor, did not sensitize LNCaP-R cells response to vitamin D, suggesting that neither a local 1,25-VD availability, nor VDR-associated proteins are responsible for the vitamin D resistance. Interestingly, nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) signaling, which is critical for 1,25-VD/VDR activity was found reduced in LNCaP-R cells, thereby treatment with NF-kappaB activator, 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA), can sensitize LNCaP-R vitamin D response. Together, we conclude that NF-kappaB signaling is critical for vitamin D sensitivity, and dysregulation of this pathway would result in vitamin D resistance and disease progression.

**Sotto-regolazione dei segnali di NF-kappaB è coinvolta nella perdita della risposta di 1alfa,25-diidrossivitamina D3**

La vitamina D effetto anti-tumorale si trova spesso ridotta nelle fasi avanzate del cancro. Per scoprire la vitamina D meccanismo di resistenza, abbiamo stabilito una vitamina D-resistente umane di cancro alla prostata LNCaP linea cellulare, LNCaP-R, da esposizione cronica delle cellule di 1alfa ,25-diidrossivitamina D (3) (1,25-VD). Il recettore della vitamina D (VDR)-mediata attività trascrizionale è stata ridotta in LNCaP-R, mentre i livelli di espressione di VDR e la capacità di legame al DNA sono stati simili rispetto alle cellule parentali (LNCaP-P). Le espressioni dei fattori chiave coinvolti nella transactivity VDR, tra cui CYP24A1 e proteine VDR-associati sono aumentate in tutte le cellule LNCaP-R, e tuttavia il trattamento con ketoconazolo, inibitore degli enzimi del citocromo P450, così come tricostatina A (TSA), un inibitore delle istone deacetilasi , non ha sensibilizzare LNCaP-R la risposta delle cellule di vitamina D, suggerendo che né una disponibilità locale 1,25-VD, né proteine VDR-associati sono responsabili della resistenza alla vitamina D. È interessante notare che il fattore nucleare-kB (NF-kB) di segnalazione, che è critica per 1,25-VD / attività VDR è stata trovata ridotta in cellule LNCaP-R, in tal modo il trattamento con attivatore di NF-kB, 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetato (TPA), possono sensibilizzare la

vitamina LNCaP-R D risposta. Insieme, possiamo concludere che la segnalazione NF-kB è un fattore critico per la vitamina D la sensibilità, e la disregolazione di questa via si tradurrebbe in vitamina D e di resistenza alla progressione della malattia.

101: King AN, Beer DG, Christensen PJ, Simpson RU, Ramnath N.

#### **The vitamin D/CYP24A1 story in cancer.**

Anticancer Agents Med Chem. 2010 Mar;10(3):213-24.

There is increasing evidence linking the incidence of certain cancers to low serum Vitamin D levels. The active metabolite of Vitamin D, calcitriol (1, 25-Dihydroxyvitamin D(3), 1,25(OH)(2)D(3)) apart from a crucial role in maintaining mineral homeostasis and skeletal functions, has antiproliferative, apoptosis and differentiation inducing as well as immunomodulatory effects in cancer. In studying the role of 1,25(OH)(2)D(3) in cancer, it is imperative to examine the potential pathways that control local tissue levels of 1,25(OH)(2)D(3). The enzyme CYP24A1 or 24-hydroxylase converts 1,25(OH)(2)D(3) to inactive calcitroic acid. Extra-renal production of this enzyme is observed and has been increasingly recognized as present in cancer cells. This enzyme is rate limiting for the amount of local 1,25(OH)(2)D(3) in cancer tissues and elevated expression is associated with an adverse prognosis. The gene that encodes CYP24A1 has been reported as an oncogene and may contribute to tumor aggressiveness by abrogating local anti-cancer effects of 1,25(OH)(2)D(3). It is imperative to study the regulation of CYP24A1 in cancer and especially the local metabolism of 1,25(OH)(2)D(3) in cancer cells. CYP24A1 may be a predictive marker of 1,25(OH)(2)D(3) efficacy in patients with cancer as an adjunctive therapy. The following review summarizes the available literature on CYP24A1 as it relates to 1,25(OH)(2)D(3) in cancer and outlines potential ways to inhibit CYP24A1 in an effort to improve the efficacy of exogenous 1,25(OH)(2)D(3).

#### **La storia della vitamina D/CYP24A1 story nel cancro.**

Vi sono crescenti prove che collegano l'incidenza di alcuni tumori a basso sierici di vitamina D. Il metabolita attivo della vitamina D, calcitriolo (1, 25-diidrossivitamin D (3), 1,25 (OH) (2) D (3)) a parte un ruolo cruciale nel mantenimento dell'omeostasi minerale e le funzioni dello scheletro, ha apoptosi antiproliferativa, e la differenziazione inducendo così come effetti immunomodulatori nel cancro. Nello studiare il ruolo di 1,25 (OH) (2) D (3) nel cancro, è necessario esaminare le possibili vie che controllano i livelli del tessuto locale di 1,25 (OH) (2) D (3). L'enzima CYP24A1 o 24-idrossilasi converte 1,25 (OH) (2) D (3) ad acido inattivo calcitroic. produzione extra-renale di questo enzima è osservata ed è stata sempre più riconosciuta come presente nelle cellule tumorali. Questo enzima è la limitazione della quantità di locali 1,25 (OH) (2) D (3) nei tessuti tumorali e di espressione elevata è associata ad una prognosi sfavorevole. Il gene che codifica CYP24A1 è stato segnalato come un oncogene e può contribuire alla aggressività del tumore, mediante l'abrogazione locali effetti anti-cancro di 1,25 (OH) (2) D (3). E 'indispensabile per studiare la regolazione del CYP24A1 nel cancro e in particolare il metabolismo locale di 1,25 (OH) (2) D (3) nelle cellule tumorali. CYP24A1 può essere un marker predittivo di 1,25 (OH) (2) D (3) l'efficacia in pazienti

con cancro come terapia aggiuntiva. La rassegna che segue riassume la letteratura disponibile su CYP24A1 cui si riferisce allo 1,25 (OH) (2) D (3) nel cancro e delinea le modalità in grado di inibire CYP24A1 nel tentativo di migliorare l'efficacia della esogene 1,25 (OH) (2) D (3).

102: Erkek E, Kurtipek GS, Duman D, Sanli C, Erdoğan S.

**Eruptive vellus hair cysts: report of a pediatric case with partial response to calcipotriene therapy.**

Cutis. 2009 Dec;84(6):295-8.

Eruptive vellus hair cysts (EVHCs) are characterized by asymptomatic, follicular, comedonelike papules usually located on the anterior chest and abdomen. We present a pediatric case of EVHC associated with attention deficit hyperactivity disorder that partially responded to calcipotriene cream within 2 months. Our aim is to refamiliarize clinicians with a common albeit frequently unrecognized disorder of vellus hair follicles.

**Cisti eruttive dei capelli: report di un caso pediatrico con parziale risposta alla terapia con calcipotriene.**

Cisti eruttive capelli vellus (EVHCs) sono caratterizzati da asintomatica, follicolare, papule comedonelike di solito si trova sulla parte anteriore del torace e l'addome. Presentiamo un caso pediatrico di EVHC associata a disturbo da deficit di attenzione che in parte ha risposto a Calcipotriene crema entro 2 mesi. Il nostro obiettivo è quello di refamiliarize clinici con un disturbo comune, sebbene spesso non riconosciuta di follicoli di capelli vellus.

103: Chadha MK, Tian L, Mashtare T, Payne V, Silliman C, Levine E, Wong M, Johnson C, Trump DL.

**Phase 2 trial of weekly intravenous 1,25 dihydroxy cholecalciferol (calcitriol) in combination with dexamethasone for castration-resistant prostate cancer.**

Cancer. 2010 May 1;116(9):2132-9.

**BACKGROUND:** Preclinical data indicate that there is substantial antitumor activity and synergy between calcitriol and dexamethasone. On the basis of these data, the authors conducted a phase 2 trial of intravenous (iv) calcitriol at a dose of 74 microg weekly (based on a recent phase 1 trial) and dexamethasone in patients with castration-resistant prostate cancer (CRPC).

**METHODS:** A 2-stage Kepner-Chang design was used. Oral dexamethasone at a dose of 4 mg was given weekly on Days 1 and 2, and iv calcitriol (74 microg over 1 hour) was administered weekly on Day 2 from 4 to 8 hours after the dexamethasone dose in patients with CRPC. Laboratory data were monitored weekly, and renal sonograms, computed tomography scans, and bone scans were obtained every 3 months. Disease response was assessed by using the Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST) and standard criteria for prostate-specific antigen (PSA) response. The calcitriol dose was delineated by from the authors' recent phase 1 trial.

**RESULTS:** Of 18 evaluable patients, 15 patients were Caucasian (83%). No patients had a complete or partial response by either RECIST or PSA response criteria. Fourteen patients had progressive disease, 2 patients refused to continue treatment (after 64 days and 266 days), and 2 patients remain on the trial (for 306 days and 412 days). The median time to disease progression was 106 days (95% confidence interval, 80-182 days). Fourteen episodes of grade 3 or 4 toxicity were noted in 7 patients (hyperglycemia, hypocalcemia, chest pain, dyspnea, hypercalcemia, hypophosphatemia, cardiac arrhythmia, and pain). Only 1 episode of grade 3/4 toxicity was related definitely to calcitriol (hypercalcemia). No treatment-related deaths were noted.

**CONCLUSIONS:** High-dose, iv calcitriol at a dose of 74 microg weekly in combination with dexamethasone was well tolerated but failed to produce a clinical or PSA response in men with CRPC.

**Trial di fase 2 di iniezioni intravenose settimanali di 1,25 diidrossi colecalciferolo (calcitriol) in combinazione con dexametasone nei casi di cancro prostatico resistenti alla castrazione.**

**BACKGROUND:** I dati preclinici indicano che vi è notevole attività antitumorale e la sinergia tra calcitriolo e desametasone. Sulla base di questi dati, gli autori hanno condotto uno studio di fase 2 per via endovenosa (iv) calcitriolo al dosaggio di 74 microg desametasone settimanale (sulla base di un recente studio di fase 1) e nei pazienti con tumore della prostata castrazione-resistente (CRPC).

**METODI:** A 2-fase di progettazione Kepner-Chang è stato utilizzato. desametasone orale alla dose di 4 mg è stata somministrata settimanalmente nei giorni 1 e 2, e calcitriolo ev (74 microg oltre 1

ora) è stato somministrato settimanalmente su Day 2 da 4 a 8 ore dopo la dose di desametasone in pazienti con CRPC. I dati di laboratorio sono stati monitorati settimanalmente, e ecografie renali, le scansioni di tomografia computerizzata, e scintigrafia ossea sono stati ottenuti ogni 3 mesi. risposta della malattia è stata valutata utilizzando il Response Evaluation Criteria in tumori solidi (RECIST) e criteri standard per l'antigene prostatico specifico (PSA) risposta. La dose di calcitriolo è stato delineato dalla recente da autori 'fase 1 di prova.

**RISULTATI:** Dei 18 pazienti valutabili, 15 pazienti sono stati caucasici (83%). Nessun paziente ha avuto una risposta completa o parziale di una o RECIST criteri di risposta del PSA. Quattordici pazienti avevano una malattia progressiva, 2 pazienti hanno rifiutato di continuare il trattamento (dopo 64 giorni e 266 giorni), e 2 pazienti rimangono sul processo (per 306 giorni e 412 giorni). Il tempo mediano alla progressione della malattia è stato 106 giorni (95% intervallo 80-182 giorni). Quattordici episodi di grado 3 o 4 di tossicità sono stati notati in 7 pazienti (iperglicemia, hypocalemia, dolore toracico, dispnea, ipercalcemia, ipofosfatemia, aritmia cardiaca, e dolore). Solo 1 episodio di grado 3 / 4 la tossicità era legata sicuramente a calcitriolo (ipercalcemia). No decessi correlati al trattamento sono stati notati.

**CONCLUSIONI:** High-dose, calcitriolo iv alla dose di 74 microg settimane in associazione con desametasone è stato ben tollerato, ma non riuscì a produrre una risposta clinica o di PSA negli uomini con CRPC.

104: Trump DL, Deeb KK, Johnson CS.

**Vitamin D: considerations in the continued development as an agent for cancer prevention and therapy.**

Cancer J. 2010Jan-Feb;16(1):1-9.

Considerable preclinical and epidemiologic data suggest that vitamin D may play a role in the pathogenesis, progression, and therapy for cancer. Numerous epidemiologic studies support the hypothesis that individuals with lower serum vitamin D levels have a higher risk of a number of cancers. Measures of vitamin D level in such studies include both surrogate estimates of vitamin D level (residence in more northern latitudes, history of activity, and sun exposure) as well as measured serum 25(OH) cholecalciferol levels. Perhaps, the most robust of these epidemiologic studies is that of Giovannucci et al, who developed and validated an estimate of serum 25(OH) cholecalciferol level and reported that among >40,000 individuals in the Health Professionals Study, an increase in 25(OH) cholecalciferol level of 62.5 ng/mL was associated with a reduction in the risk of head/neck, esophagus, pancreas cancers, and acute leukemia by >50%. Unfortunately, very limited data are available to indicate whether or not giving vitamin D supplements reduces the risk of cancer. Many preclinical studies indicate that exposing cancer cells, as well as vascular endothelial cells derived from tumors, to high concentrations of active metabolites of vitamin D halts progression through cell cycle, induces apoptosis and will slow or stop the growth of tumors in vivo. There are no data that one type of cancer is more or less susceptible to the effects of vitamin D. Vitamin D also potentiates the antitumor activity of a number of types of cytotoxic anticancer agents in in vivo preclinical models. Vitamin D analogues initiate signaling through a number of important pathways, but the pathway(s) essential to the antitumor activities of vitamin D are unclear. Clinical studies of vitamin D as an antitumor agent have been hampered by the lack of a suitable pharmaceutical preparation for clinical study. All commercially available formulations are inadequate because of the necessity to administer large numbers of caplets and the poor "bioavailability" of calcitriol (the most carefully studied analogue) at these high doses. Preclinical data suggest that high exposures to calcitriol are necessary for the antitumor effects. Clinical data do indicate that high doses of calcitriol (>100 mcg weekly, intravenously, and 0.15 microg /kg weekly, orally) can be given safely. The maximum tolerated dose of calcitriol is unclear. While a 250-patient trial in men with castration-resistant prostate cancer comparing docetaxel (36 mg/sqm weekly) +/- calcitriol 0.15 microg/kg indicated that calcitriol was very safe may have reduced to death rate, an adequately powered (1000 patients) randomized study of weekly docetaxel + calcitriol versus q3 week docetaxel was negative. The limitations of this trial were the unequal chemotherapy arms compared in this study and the failure to use an optimal biologic dose or maximum-tolerated dose of calcitriol. In view of the substantial preclinical and epidemiologic data supporting the potential role of vitamin D in cancer, careful studies to evaluate the impact of vitamin D replacement on the frequency of cancer and the impact of an appropriate dose and

schedule of calcitriol or other active vitamin D analogue on the treatment of established cancer are indicated.

### **Vitamina D: considerazioni nel continuo sviluppo come agente per la prevenzione tumorale e la terapia.**

Considerabile di dati preclinici ed epidemiologici suggeriscono che la vitamina D può avere un ruolo nella progressione patogenesi, e la terapia per il cancro. Numerosi studi epidemiologici supportano l'ipotesi che gli individui con bassi livelli sierici di vitamina D hanno un rischio maggiore di un certo numero di tumori. Misure del livello di vitamina D in tali studi comprendono sia le stime surrogate della vitamina D livello (residenza in latitudini più settentrionali, la storia di attività, e l'esposizione al sole), come siero così come misurato 25 (OH) livelli di colecalciferolo. Forse, la più robusta di questi studi epidemiologici è quello di al Giovannucci e altri, che hanno sviluppato e validato una stima del siero 25 (OH) livello colecalciferolo e ha riferito che tra > 40.000 individui nel Health Professionals Study, un aumento di 25 (OH) colecalciferolo livello di 62,5 ng / ml era associato ad una riduzione del rischio di testa e collo, esofago, tumori del pancreas, e la leucemia acuta da > 50%. Purtroppo, molto pochi dati sono disponibili per indicare o meno di dare integratori di vitamina D riduce il rischio di cancro. Molti studi preclinici indicano che le cellule tumorali esponendo, così come cellule endoteliali vascolari derivate da tumori, ad alte concentrazioni dei metaboliti attivi della vitamina D arresta la progressione attraverso il ciclo cellulare, induce l'apoptosi e rallentare o arrestare la crescita di tumori in vivo. Non ci sono dati che un tipo di tumore è più o meno sensibili agli effetti della vitamina D. La vitamina D potenzia anche l'attività antitumorale di un certo numero di tipi di agenti antitumorali citotossici in vivo in modelli preclinici. Analoghi della vitamina D avviare segnalazione attraverso un certo numero di percorsi importanti, ma il percorso (s) essenziali per l'attività antitumorale della vitamina D non sono chiare. Gli studi clinici di vitamina D come agente antitumorale sono stati ostacolati dalla mancanza di una adeguata preparazione farmaceutica per lo studio clinico. Tutte le formulazioni in commercio disponibili sono inadeguati a causa della necessità di amministrare un gran numero di pillole e dei poveri "biodisponibilità" di calcitriolo (il riferimento più attentamente studiato) a queste alte dosi. I dati preclinici suggeriscono che elevate esposizioni al calcitriolo sono necessari per gli effetti antitumorali. I dati clinici indicano che alte dosi di calcitriolo (> 100 mcg alla settimana, per via endovenosa, e 0,15 microg / kg alla settimana, per via orale) possono essere dati in modo sicuro. La dose massima tollerata di calcitriolo non è chiaro. Mentre uno studio di 250 pazienti negli uomini con tumore della prostata castrazione-resistente confronto docetaxel (36 mg / mq settimanale) + / - calcitriolo 0,15 microg / kg indicato che calcitriolo era molto sicuro potrebbe essere ridotto a tasso di mortalità, una adeguata potenza (1000 pazienti) studio randomizzato di docetaxel settimanale + calcitriolo versus docetaxel q3 settimana è stata negativa. Le limitazioni di questo studio sono state le braccia chemioterapia impari rispetto a questo studio e la mancata utilizzazione di una dose ottimale biologico o della dose massima tollerata di calcitriolo. In considerazione della sostanziale dati preclinici ed epidemiologici sostenere il ruolo potenziale della vitamina D nel cancro, accurati studi per valutare l'impatto della vitamina D in sostituzione la frequenza di cancro e l'impatto di una dose appropriata e il calendario di vitamina D calcitriolo o altri attivi analogica per il trattamento del cancro stabilito sono indicati.

106: Ooi LL, Zhou H, Kalak R, Zheng Y, Conigrave AD, Seibel MJ, Dunstan CR.

**Vitamin D deficiency promotes human breast cancer growth in a murine model of bone metastasis.**

Cancer Res. 2010 Mar 1;70(5):1835-44.

Vitamin D exerts antiproliferative, prodifferentiation, and proapoptotic effects on nonclassic target tissues such as breast. Blood levels of 25-hydroxyvitamin D [25(OH)D], the most sensitive indicator of vitamin D status, are inversely correlated with breast cancer risk; however, a causal relationship between vitamin D deficiency and breast cancer growth in bone has not been assessed. We examined the effect of vitamin D deficiency on the intraskeletal growth of the human breast cancer cell line MDA-MB-231-TxSA in a murine model of malignant bone lesions. Subsets of mice were treated concurrently with osteoprotegerin (OPG) to abrogate bone resorption. Outcomes were assessed by repeated radiographic and end-point micro-computed tomography and histologic analyses. Mice weaned onto a vitamin D-free diet developed vitamin D deficiency within 4 weeks [mean  $\pm$  SE serum 25(OH)D: 11.5  $\pm$  0.5 nmol/L], which was sustained throughout the study and was associated with secondary hyperparathyroidism and accelerated bone turnover. Osteolytic lesions appeared earlier and were significantly larger in vitamin D-deficient than in vitamin D-sufficient mice after 2 weeks (radiographic osteolysis: +121.5%; histologic tumor area: +314%;  $P < 0.05$ ). Although OPG treatment reduced the size of radiographic osteolyses and tumor area in both groups, tumors remained larger in OPG-treated vitamin D-deficient compared with OPG-treated vitamin D-sufficient mice (0.53  $\pm$  0.05 mm<sup>2</sup>) versus 0.19  $\pm$  0.05 mm<sup>2</sup>;  $P < 0.05$ ). We conclude that vitamin D deficiency promotes the growth of human breast cancer cells in the bones of nude mice. These effects are partly mediated through secondary changes in the bone microenvironment, along with direct effects of vitamin D on tumor growth.

**Una carenza di vitamina D promuove la crescita di cancro al seno growth in un modello murino con metastasi ossee.**

La vitamina D esercita antiproliferativa, prodifferentiation, e gli effetti sui tessuti bersaglio proapoptotici nonclassic come al seno. I livelli ematici di 25-idrossivitamina D [25 (OH) D], l'indicatore più sensibile di vitamina D, sono inversamente correlati al rischio di cancro della mammella, tuttavia, un nesso causale tra carenza di vitamina D e la crescita del cancro al seno nelle ossa non è stata valutata. Abbiamo esaminato l'effetto della carenza di vitamina D sulla crescita intraskeletal dell'essere umano linea di cellule di cancro al seno MDA-MB-231-TxSA in un modello murino di lesioni ossee maligne. Sottoinsiemi di topi sono stati trattati contemporaneamente con osteoprotegerina (OPG) di abrogare il riassorbimento osseo. I risultati sono stati valutati da ripetute tomografia radiografica e end-point micro-calcolate e analisi istologica. I topi svezzati con una dieta di vitamina D-free sviluppato carenza di vitamina D nelle 4

settimane [media +/- SE siero 25 (OH) D: 11.5 +/- 0,5 nmol / L], che è stata sostenuta per tutto lo studio ed era associata secondaria iperparatiroidismo e turnover osseo accelerato. Lesioni osteolitiche manifestato in precedenza ed erano significativamente più grandi di vitamina D-carente di vitamina D nei topi-sufficiente dopo 2 settimane (radiografici osteolisi: 121,5%; area istologica del tumore: 314%, p <0,05). Sebbene il trattamento OPG ridotto le dimensioni del osteolyses radiografici e la zona del tumore in entrambi i gruppi, i tumori sono rimasti più in OPG trattati con vitamina D-carenti rispetto ai topi trattati con vitamina OPG D-sufficiente (0,53 +/- 0,05 mm (2) versus 0,19 +/- 0,05 mm2; P <0,05). Concludiamo che il deficit di vitamina D favorisce la crescita di cellule umane di cancro al seno nelle ossa di topi nudi. Questi effetti sono in parte mediati attraverso i cambiamenti secondari nel microambiente osseo, con effetti diretti della vitamina D sulla crescita tumorale.

107: Krishnan AV, Swami S, Feldman D.

### **Vitamin D and breast cancer: inhibition of estrogen synthesis and signaling.**

J Steroid Biochem Mol Biol. 2010Jul;121(1-2):343-8.

Calcitriol (1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>), the hormonally active metabolite of vitamin D, inhibits the growth and induces the differentiation of many malignant cells including breast cancer (BCa) cells. Calcitriol exerts its anti-proliferative activity in BCa cells by inducing cell cycle arrest and stimulating apoptosis. Calcitriol also inhibits invasion, metastasis and tumor angiogenesis in experimental models of BCa. Our recent studies show additional newly discovered pathways of calcitriol action to inhibit the growth of BCa cells. Calcitriol suppresses COX-2 expression and increases that of 15-PGDH thereby reducing the levels and biological activity of prostaglandins (PGs). Calcitriol decreases the expression of aromatase, the enzyme that catalyzes estrogen synthesis selectively in BCa cells and the breast adipose tissue surrounding BCa, by a direct repression of aromatase transcription via promoter II as well as an indirect effect due to the reduction in the levels and biological activity of PGE<sub>2</sub>, which is a major stimulator of aromatase transcription through promoter II in BCa. Calcitriol down-regulates the expression of estrogen receptor alpha and thereby attenuates estrogen signaling in BCa cells including the proliferative stimulus provided by estrogens. We hypothesize that the inhibition of estrogen synthesis and signaling by calcitriol and its anti-inflammatory actions will play an important role in the use of calcitriol for the prevention and/or treatment of BCa.

### **Vitamina D e cancro al seno: inibizione della sintesi e del segnale degli estrogeni.**

Calcitriolo (1,25-diidrossivitamina D<sub>3</sub>), il metabolita ormonale attiva della vitamina D, inibisce la crescita e induce la differenziazione di molte cellule maligne tra cui il cancro al seno (BCA) cellule. Calcitriolo esercita la sua attività anti-proliferativa in cellule BCA inducendo l'arresto del ciclo cellulare e stimolare l'apoptosi. Calcitriolo inibisce anche l'invasione, metastasi e l'angiogenesi tumorale in modelli sperimentali di BCA. I nostri studi recenti indicano ulteriori percorsi di recente scoperta di azione calcitriolo per inibire la crescita delle cellule BCA. Calcitriolo sopprime COX-2 e aumenta quella dei 15-PGDH riducendo così i livelli e l'attività biologica delle prostaglandine (PG). Calcitriol diminuisce l'espressione di aromatasi, l'enzima che catalizza la sintesi degli estrogeni selettivamente nelle cellule BCA e il tessuto adiposo mammario circostante BCA, da una repressione diretta di trascrizione aromatasi via promotore II così come un effetto indiretto dovuto alla riduzione dei livelli e biologico attività di PGE<sub>2</sub>, che è un importante stimolatore di trascrizione aromatasi attraverso promotore II in Acb. Calcitriolo down-regola l'espressione del recettore alfa e attenua così segnalazione estrogeni nelle cellule BCA tra cui lo stimolo proliferativo forniti da estrogeni. Ipotizziamo che l'inibizione della sintesi degli estrogeni e di segnalazione da parte

calcitriolo e le sue azioni anti-infiammatorie svolgerà un ruolo importante nell'utilizzo di calcitriolo per la prevenzione e / o trattamento di BCA.

108: Essa S, Denzer N, Mahlknecht U, Klein R, Collnot EM, Tilgen W, Reichrath J.

### **VDR microRNA expression and epigenetic silencing of vitamin D signaling in melanoma cells.**

J Steroid Biochem Mol Biol. 2010 Jul;121(1-2):110-3.

Malignant melanoma cells express the vitamin D receptor (VDR). However, some melanoma cell lines fail to respond to the antiproliferative effects of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>). We reported previously that out of seven melanoma cell lines analyzed, three cell lines (MeWo, SK-Mel28, SM) respond to the antiproliferative effects of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, while the others (SK-Mel5, SK-Mel25, IGR, Meljuso) are resistant. It was the aim of this study to investigate whether epigenetic mechanisms are of importance for the abrogation of vitamin D signaling in vitamin D resistant melanoma cells. We used the histone deacetylase inhibitor (HDACI) trichostatin A (TSA) and the DNA methyltransferase inhibitor (DNMTI) 5-azacytidine (5-Aza) to elucidate the effects of protein acetylation and of DNA hypermethylation on 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-induced effects on cell proliferation, respectively. Additionally we analyzed the expression of VDR microRNA in 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-responding and resistant melanoma cells. TSA and 5-Aza exerted dose- and time-dependent antiproliferative effects on melanoma cell lines. Interestingly, combination therapy with 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> and TSA exerted synergistic antiproliferative effects in a 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-resistant melanoma cell line (IGR) (p<0.05). Combination therapy with 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> and 5-Aza resulted in synergistic (MeWo after 72 h; p<0.05) or additive (other melanoma cell lines analyzed) antiproliferative effects. Additionally, we could show that VDR mRNA expression is relatively high in two of three 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-responsive melanoma cells as compared to resistant cells, moreover this relatively high VDR expression is associated with low expression of miRNA125b in MeWo and SK-Mel28 cells. Our results suggest that the endogenous VDR mRNA level is inversely associated with expression of miRNA125b in melanoma cell lines analyzed. Moreover, miRNA125b may be involved in the regulation of VDR expression and in the resistance against 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> in melanoma cells. It can be speculated whether miRNA125b may be of prognostic importance and/or may represent a therapeutic target for malignant melanoma. Drugs that influence epigenetic mechanisms might be promising therapeutics for the treatment of metastasized malignant melanoma, alone or in combination with antiproliferative or cytotoxic agents such as 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>.

### **Espressione di VDR microRNA e silenziamento epigenetico del segnale della vitamina D nelle cellule con melanoma.**

Nelle cellule di melanoma maligno esprimono il recettore della vitamina D (VDR). Tuttavia, alcune linee di cellule di melanoma non rispondono agli effetti antiproliferativi della 1,25-diidrossivitamina D<sub>3</sub> (1,25 (OH) 2D<sub>3</sub>). Abbiamo riportato in precedenza che su linee di melanoma

sette cassoni analizzati, tre linee cellulari (MeWo, SK-Mel28, SM) rispondono agli effetti antiproliferativi della 1,25 (OH) 2D3, mentre gli altri (SK-Mel5, SK-Mel25, IGR, Meljuso) sono resistenti. È stato l'obiettivo di questo studio per verificare se i meccanismi epigenetici sono di importanza per l'abrogazione di vitamina D di segnalazione in cellule di melanoma vitamina D resistente. Abbiamo utilizzato l'inibitore delle istone deacetilasi (HDACi) tricostatina A (TSA) e l'inibitore della DNA metiltransferasi (DNMTI) 5-azacitidina (5-AZA) per chiarire gli effetti di acetilazione delle proteine e di ipermetilazione del DNA in 1,25 (OH) 2D3- ha indotto effetti sulla proliferazione cellulare, rispettivamente. Inoltre abbiamo analizzato l'espressione di VDR microRNA in 1,25 (OH) 2D3-rispondere e cellule di melanoma resistenti. TSA e 5-Aza esercitata dose e gli effetti antiproliferativi in funzione del tempo su linee cellulari di melanoma. È interessante notare che la terapia di combinazione con 1,25 (OH) 2D3 e TSA esercita effetti antiproliferativi sinergici in una linea di 1,25 (OH) 2D3 melanoma resistenti delle cellule (IGR) ( $p < 0,05$ ). La terapia di combinazione con 1,25 (OH) 2D3 e 5-Aza portato sinergica (MeWo dopo 72 h;  $p < 0,05$ ) o additivo (altre linee cellulari di melanoma analizzati) effetti antiproliferativi. Inoltre, abbiamo potuto dimostrare che l'espressione di mRNA VDR è relativamente alto in due dei tre 1,25 (OH) 2D3 cellule di melanoma-sensibile rispetto alle cellule resistenti, del resto questa espressione VDR relativamente elevato è associato a una bassa espressione di miRNA125b in MeWo e SK Mel28-cellule. I nostri risultati suggeriscono che il livello di mRNA endogeno VDR è inversamente associata con l'espressione di miRNA125b in linee cellulari di melanoma analizzati. Inoltre, miRNA125b possono essere coinvolti nella regolazione della espressione di VDR e nella resistenza contro i 1,25 (OH) (2) D (3) in cellule di melanoma. Può essere ipotizzato se miRNA125b possono essere di importanza prognostica e / o possono rappresentare un obiettivo terapeutico per il melanoma maligno. Farmaci che influenzano i meccanismi epigenetici potrebbero essere promettenti terapie per il trattamento del melanoma metastatico, da soli o in combinazione con agenti antiproliferativi o citotossici come 1,25 (OH) 2D3.

109: Lagishetty V, Chun RF, Liu NQ, Lisse TS, Adams JS, Hewison M.

**1alpha-hydroxylase and innate immune responses to 25-hydroxyvitamin D in colonic cell lines.**

J Steroid Biochem Mol Biol. 2010 Jul;121(1-2):228-33.

Vitamin D-insufficiency is a prevalent condition in populations throughout the world, with low serum levels of 25-hydroxyvitamin D (25OHD) linked to a variety of human health concerns including cancer, autoimmune disease and infection. Current data suggest that 25OHD action involves localized extra-renal conversion to 1,25-dihydroxyvitamin D (1,25(OH)<sub>2</sub>D) via tissue-specific expression of the enzyme 25-hydroxyvitamin D-1alpha-hydroxylase (1alpha-hydroxylase). In cells such as macrophages, expression of 1alpha-hydroxylase is intimately associated with toll-like receptor (TLR) recognition of pathogens. However, this mechanism may not be exclusive to extra-renal generation of 1,25(OH)<sub>2</sub>D. To investigate the relationship between TLR-mediated pathogen recognition and vitamin D-induced antibacterial activity, intracrine responses to 25OHD metabolism were explored in vitro using the established colonic cell lines Caco-2 and Caco-2 clone BBe. Analysis of antibacterial factors such as cathelicidin (LL37) and beta-defensin-4 (DEFB4) was carried out following co-treatment with TLR ligands. Data indicate that, unlike macrophages, Caco-2 and BBe colonic cell lines are unresponsive to TLR-induced 1alpha-hydroxylase. Alternative activators of 1alpha-hydroxylase such as transforming growth factor beta were also ineffective at priming intracrine responses to 25OHD. Thus, in common with other barrier sites such as the skin or placenta, colonic epithelial cells may require specific factors to initiate intracrine responses to vitamin D.

**1alfa-idrossilasi e risposta immunitaria innata a 25-idrossivitamina D nelle linee cellulari del colon.**

La vitamina D-insufficienza è una condizione prevalente nella popolazione di tutto il mondo, con livelli sierici di 25-idrossivitamina D (25OHD) legati a una serie di preoccupazioni per la salute umana tra cui il cancro, malattie autoimmuni e le infezioni. I dati attuali suggeriscono che l'azione 25OHD coinvolge localizzato conversione extra-renale di 1,25-diidrossivitamina D (1,25 (OH) 2D) tramite l'espressione tessuto-specifica dell'enzima 25-idrossivitamina D-1alfa-idrossilasi (1alfa-idrossilasi). Nelle cellule come i macrofagi, espressione di 1alfa-idrossilasi è intimamente associata a recettore toll-like (TLR) il riconoscimento di agenti patogeni. Tuttavia, questo meccanismo non può essere esclusiva di generazione extra-renale di 1,25 (OH) 2D. Per indagare il rapporto tra agente patogeno riconoscimento TLR-mediata e vitamina D indotta da attività antibatterica, le risposte a intracrine 25OHD metabolismo sono stati studiati in vitro utilizzando le linee cellulari del colon stabilito Caco-2 e Caco-2 BBE clone. Analisi dei fattori antibatterici come catelicidina (LL37) e beta-defensine-4 (DEFB4) è stata effettuata a seguito della co-trattamento con ligandi

TLR. I dati indicano che, a differenza dei macrofagi, Caco-2 e le linee di cellule BBE colon non rispondono alla TLR-indotta 1alfa-idrossilasi. attivatori alternative di 1alfa-idrossilasi, come il fattore di crescita beta sono stati inefficaci a adescamento risposte intracrine a 25OHD. Così, in comune con altri siti barriera come la pelle o con placenta, cellule epiteliali del colon può richiedere fattori specifici di avviare risposte intracrine di vitamina D.

110: Washington MN, Weigel NL.

**1{alpha},25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits growth of VCaP prostate cancer cells despite inducing the growth-promoting TMPRSS2:ERG gene fusion.**

Endocrinology. 2010 Apr;151(4):1409-17.

Vitamin D receptor (VDR) agonists have been shown to reduce the growth of several prostate cancer cell lines. However, the effects of VDR activation have not been examined in the presence of the recently identified androgen-regulated TMPRSS2:ERG gene fusions, which occur in a high percentage of prostate cancers and play a role in growth and invasiveness. In a previous microarray study, we found that VDR activation induces TMPRSS2 expression in LNCaP prostate cancer cells. Here we show that the natural VDR agonist 1alpha,25-dihydroxyvitamin D(3) and its synthetic analog EB1089 increase expression of TMPRSS2:ERG mRNA in VCaP prostate cancer cells; this results in increased ETS-related gene (ERG) protein expression and ERG activity as demonstrated by an increase in the ERG target gene CACNA1D. In VCaP cells, we were not able to prevent EB1089-mediated TMPRSS2:ERG induction with an androgen receptor antagonist, Casodex, although in LNCaP cells, as reported for some other common androgen receptor and VDR target genes, Casodex reduces EB1089-mediated induction of TMPRSS2. However, despite inducing the fusion gene, VDR agonists reduce VCaP cell growth and expression of the ERG target gene c-Myc, a critical factor in VDR-mediated growth inhibition. Thus, the beneficial effects of VDR agonist treatment override some of the negative effects of ERG induction, although others remain to be tested.

**1{alfa},25-Diidrossivitamina D3 inibisce la crescita di VCaP cellule prostatiche cancerose nonostante induca la crescita di TMPRSS2:fusione del gene ERG.**

Recettore della vitamina D (VDR) agonisti hanno dimostrato di ridurre la crescita di diverse linee di cellule di cancro alla prostata. Tuttavia, gli effetti di attivazione VDR non sono stati esaminati in presenza del TMPRSS2 recentemente identificato androgeno-regolamentato: fusioni geniche ERG, che si verificano in una percentuale elevata di tumori della prostata e di svolgere un ruolo nella crescita e invasività. In uno studio precedente microarray, abbiamo scoperto che l'attivazione VDR induce l'espressione TMPRSS2 nelle cellule del cancro alla prostata LNCaP. Qui mostriamo che la naturale agonista VDR 1alfa,25-diidrossivitamina D (3) e il suo analogo sintetico aumentano l'espressione di TMPRSS2 EB1089: ERG mRNA nelle cellule del cancro alla prostata VCAP, questo si traduce in un aumento gene ETS-correlate (ERG) ERG espressione proteica e attività come dimostrato da un aumento del CACNA1D gene bersaglio ERG. Nelle cellule VCAP, non siamo stati in grado di prevenire TMPRSS2 EB1089-mediata: induzione ERG con un antagonista del recettore degli androgeni, Casodex, anche se in cellule LNCaP, come riportato per alcuni recettori degli androgeni altri comuni e geni bersaglio VDR, Casodex riduce induzione EB1089-mediata di TMPRSS2. Tuttavia, nonostante inducendo il gene di fusione, agonisti VDR ridurre la

crescita delle cellule VCAP e l'espressione del gene bersaglio ERG c-Myc, un fattore critico di inibizione della crescita VDR-mediata. Pertanto, gli effetti benefici del trattamento agonista VDR ignorare alcuni degli effetti negativi di induzione ERG, anche se altri rimangono da analizzare.

111: Flores O, Wang Z, Knudsen KE, Burnstein KL.

**Nuclear targeting of cyclin-dependent kinase 2 reveals essential roles of cyclin-dependent kinase 2 localization and cyclin E in vitamin D-mediated growth inhibition.**

Endocrinology.2010 Mar;151(3):896-908.

1,25-Dihydroxyvitamin D(3) (1,25-(OH)(2)D(3)), inhibits proliferation of a variety of cell types including adenocarcinoma of the prostate. We have previously shown that 1,25-(OH)(2)D(3) increases the stability of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(KIP1), decreases cyclin-dependent kinase 2 (CDK2) activity, and promotes G(1) phase accumulation in human prostate cancer cells. These effects correlate with cytoplasmic relocalization of CDK2. In this study, we investigated the role of CDK2 cytoplasmic relocalization in the antiproliferative effects of 1,25-(OH)(2)D(3). CDK2 was found to be necessary for prostate cancer cell proliferation. Although induced by 1,25-(OH)(2)D(3), the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(KIP1) was dispensable for 1,25-(OH)(2)D(3)-mediated growth inhibition. Reduction in CDK2 activity by 1,25-(OH)(2)D(3) was associated with decreased T160 phosphorylation, a residue whose phosphorylation in the nucleus is essential for CDK2 activity. Ectopic expression of cyclin E was sufficient to overcome 1,25-(OH)(2)D(3)-mediated cytoplasmic mislocalization of CDK2 and all antiproliferative effects of 1,25-(OH)(2)D(3), yet endogenous levels of cyclin E or binding to CDK2 were not affected by 1,25-(OH)(2)D(3). Similarly, knockdown of the CDK2 substrate retinoblastoma, which causes cyclin E up-regulation, resulted in resistance to 1,25-(OH)(2)D(3)-mediated growth inhibition. Human prostate cancer cells resistant to growth inhibition by 1,25-(OH)(2)D(3) but retaining fully functional vitamin D receptors were developed. These cells did not exhibit 1,25-(OH)(2)D(3)-mediated cytoplasmic relocalization of CDK2. Targeting CDK2 to the nucleus of 1,25-(OH)(2)D(3)-sensitive cancer cells blocked G(1) accumulation and growth inhibition by 1,25-(OH)(2)D(3). These data establish central roles for CDK2 nuclear-cytoplasmic trafficking and cyclin E in the mechanism of 1,25-(OH)(2)D(3)-mediated growth inhibition in prostate cancer cells.

**Target nucleare della ciclina-dipendente dalla chinasi 2 rivela un ruolo essenziale nella localizzazione della ciclina-dipendente chinasi 2 e della ciclina E nella inibizione della crescita mediata dalla vitamina D**

1,25-diidrossivitamina D (3) (1,25 - (OH) (2) D (3)), inibisce la proliferazione di una varietà di tipi di cellule compreso l'adenocarcinoma della prostata. Abbiamo precedentemente dimostrato che la 1,25 - (OH) (2) D (3) aumenta la stabilità del inibitore della chinasi ciclina-dipendente p27 (KIP1),

diminuisce la chinasi ciclina-dipendente 2 (CDK2) di attività e promuove la G (1 ) fase di accumulo nelle cellule umane di cancro alla prostata. Questi effetti sono correlati con la rilocalizzazione citoplasmatica di CDK2. In questo studio, abbiamo studiato il ruolo della CDK2 rilocalizzazione citoplasmatica in effetti antiproliferativi della 1,25 - (OH) (2) D (3). CDK2 è stato ritenuto necessario per la proliferazione delle cellule del cancro alla prostata. Anche se indotta dalla 1,25 - (OH) (2) D (3), l'inibitore della chinasi ciclina-dipendente p27 (KIP1) era superflua per 1,25 - (OH) (2) D (3) inibizione della crescita mediata. Riduzione dell'attività di CDK2 dalla 1,25 - (OH) (2) D (3) è stata associata con la fosforilazione T160 è diminuito, un residuo la cui fosforilazione nel nucleo è essenziale per l'attività CDK2. espressione ectopica di ciclina E è stato sufficiente a superare 1,25 - (OH) (2) D (3) mislocalization-mediata citoplasmatica di CDK2 e tutti gli effetti antiproliferativi della 1,25 - (OH) (2) D (3), ancora livelli endogeni di E ciclina o vincolanti per CDK2 non sono state colpite da 1,25 - (OH) (2) D (3). Allo stesso modo, colpo del retinoblastoma substrato CDK2, che provoca E ciclina up-regulation, ha provocato la resistenza a 1,25 - (OH) (2) D (3) inibizione della crescita mediata. Cellule umane di cancro alla prostata resistenti alla inibizione della crescita di 1,25 - (OH) (2) D (3), ma conservando pienamente funzionali i recettori della vitamina D sono state sviluppate. Queste cellule non hanno esibito 1,25 - (OH) (2) D rilocalizzazione (3)-mediata citoplasmatica di CDK2. Targeting CDK2 al nucleo di 1,25 - (OH) (2) cellule tumorali D (3)-sensibili bloccato G (1) l'accumulo e l'inibizione della crescita di 1,25 - (OH) (2) D (3). Questi dati centrale per stabilire ruoli CDK2 traffico nucleare-citoplasmatica e ciclina E nel meccanismo di 1,25 - (OH) (2) D inibizione della crescita (3)-mediata in cellule di cancro alla prostata.

112: Larriba MJ, Bonilla F, Muñoz A.

**The transcription factors Snail1 and Snail2 repress vitamin D receptor during colon cancer progression.**

J Steroid Biochem MolBiol. 2010 Jul;121(1-2):106-9.

Vitamin D receptor (VDR) mediates the antitumoral action of the active vitamin D metabolite 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>). However, VDR expression is lost during colon cancer progression, possibly causing unresponsiveness to 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. Although several mechanisms responsible for resistance to 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> action in different types of cancer had been reported, none explained the loss of VDR expression. We have found that the transcription factors Snail1 and Snail2, known as inducers of epithelial-to-mesenchymal transition (EMT), inhibit VDR expression and block 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> action in colon cancer cells. Snail1 and Snail2 have an additive repressing effect on VDR gene promoter. These effects are specific to the Snail family, as other transcription factors that function as EMT inducers do not inhibit VDR expression in colon cancer cells. Moreover, we also found that the RNA expression of SNAIL1 and SNAIL2 is upregulated in human colorectal tumors and inversely correlates with that of VDR. Our results suggest that high levels of SNAIL1 and SNAIL2 are a probable cause of VDR downregulation and 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> unresponsiveness in colon cancer. In addition, they may contribute to the improvement of protocols for the clinical use of vitamin D compounds, as they indicate that advanced colon cancer patients overexpressing SNAIL1 and SNAIL2 are not suitable candidates for this therapy.

**I fattori di trascrizione Snail1 e Snail2 reprimono il recettore della vitamina D receptor durante la progressione nel cancro al colon.**

Recettore della vitamina D (VDR) media l'azione antitumorale della D<sub>3</sub> attiva la vitamina D metabolita 1 $\alpha$ ,25-diidrossivitamina (1,25 (OH) 2D<sub>3</sub>). Tuttavia, l'espressione di VDR è perso durante la progressione del cancro del colon, causando refrattarietà a 1,25 (OH) 2D<sub>3</sub>. Anche se diversi meccanismi responsabili della resistenza a 1,25 (OH) 2D<sub>3</sub> azione in diversi tipi di cancro era stato segnalato, nessuno ha spiegato la perdita di espressione di VDR. Abbiamo trovato che i fattori di trascrizione e Snail1 Snail2, noto come induttori di transizione epiteliale-to-mesenchimale (EMT), inibiscono la VDR espressione e di blocco 1,25 (OH) 2D<sub>3</sub> azione nelle cellule tumorali del colon. Snail1 e Snail2 avere un effetto additivo sulla repressione promotore del gene VDR. Questi effetti sono specifici per la famiglia tradizionale, non altri fattori di trascrizione che fungono da induttori EMT non inibire l'espressione di VDR nelle cellule tumorali del colon. Inoltre, abbiamo anche scoperto che l'espressione di RNA SNAIL1 e SNAIL2 è up-regolato nei tumori umani del colon-retto e inversamente correlata con quella di VDR. I nostri risultati suggeriscono che alti livelli di

SNAIL1 e SNAIL2 sono una causa probabile di down-regulation VDR e 1,25 (OH) 2D3 assenza di reazione in cancro del colon. Inoltre, essi possono contribuire al miglioramento dei protocolli per l'uso clinico della vitamina D composti, in quanto indicano che pazienti affetti da tumore avanzato del colon iperespressione SNAIL1 e SNAIL2 non sono candidati ideali per questa terapia.

113: Marcinkowska E, Gocek E.

**Heat shock protein 90 interacts with vitamin D receptor in human leukemia cells.**

J Steroid Biochem Mol Biol. 2010Jul;121(1-2):114-6.

The active form of vitamin D, 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 (1,25D), has a broad range of effects which are mediated by nuclear vitamin D receptor (VDR). Many experiments that investigate the role of VDR can be done in human acute myeloid leukemia (AML) cells, since these cells are responsive to 1,25D and express VDR in a 1,25D-regulated manner. In this paper we show that in HL60 and in THP-1 cells VDR protein interacts with heat shock protein 90 (Hsp90) and that Hsp90 is important for differentiation of AML cells. Geldanamycin (GA), an Hsp90 inhibitor, is able to suppress 1,25-induced differentiation of HL60 cells.

**Heat shock protein 90 interagisce con il recettore della vitamina D in cellule leucemiche umane.**

La forma attiva della vitamina D, D3 1alfa ,25-diidrossivitamina (1,25 D), ha una vasta gamma di effetti che sono mediati da recettori nucleari della vitamina D (VDR). Molti esperimenti che indagano il ruolo di VDR può essere fatto in umano leucemia mieloide acuta (AML), le cellule, dal momento che queste cellule sono sensibili alle 1,25 D VDR ed esprimere in maniera 1,25 D-regolamentato. In questo lavoro si dimostra che in HL60 e in cellule THP-1 VDR interagisce con la proteina heat shock protein 90 (Hsp90) e che Hsp90 è importante per la differenziazione delle cellule AML. Geldanamycin (GA), un inibitore Hsp90, è in grado di sopprimere 1,25 differenziazione, indotta delle cellule HL60.

115: Beani JC, Jeanmougin M.

**[Narrow-band UVB therapy in psoriasis vulgaris: good practice guideline and recommendations of the French Society of Photodermatology].**

Ann Dermatol Venereol. 2010 Jan;137(1):21-31.

**BACKGROUND:** Phototherapy, PUVA therapy and narrow-band UVB are recognised forms of first-line therapy for extensive and severe plaque psoriasis. Based on a systematic review of the medical literature, we propose a good practice guideline for the use of narrow-band UVB phototherapy in this indication.

**METHODS:** We carried out a review of the literature published over the 20 years (1998 to 2009) in the online PubMed database. Our conclusions are based on the results of control studies or where these are absent, on a synthesis of the recommendations common practice approved by the experts of the French Society of Photodermatology. The levels of scientific proof given are based on the criteria defined by Sackett. **RESULTS RECOMMENDATIONS:** (1) Practical aspects. Irradiation cabins equipped with Philips TL01 tubes, either for monotherapy (42 tubes) or for combined therapy (21 UVB tubes and 21 UVA tubes), were to be certified (CE marking, ISO-DIN certification) and equipped with an accurate dosimetry system. Several valid and usable protocols exist. The indication was based on the severity and extent of the episode of psoriasis, the psychological consequences of the dermatosis, comparison of the benefit/risk ratios of the various available treatments, the ability of the patient to attend sessions (a vital factor in therapeutic compliance), the cumulative doses of UV from previous courses of treatment, and absence of contraindications, including the use of photosensitising medication. Informed consent was to be obtained from patients, who were given a validated information sheet (available at [www.sfdermato.org](http://www.sfdermato.org)). The study results and the value of maintenance therapy were not confirmed. (2) Adverse effects. The immediate adverse effects were generally of little consequence, with later effects alone posing problems. Because of the risk of induction of cataract, ocular protection must be used during sessions. In the absence of symptoms or known ocular disorder, prior ophthalmologic control is not considered necessary. The risk of skin cancer remains poorly defined, and this risk has not been clearly shown to be lower than with broad-spectrum UVB therapy or PUVA. The studies give no indication of the number of sessions after which therapy must be completely discontinued. In the absence of clear evaluation of oncogenic risk, it seems reasonable to set the maximum number of sessions of UVB TL01 phototherapy at 250 as with PUVA, and to include in this limit the total of all PUVA and TL01 phototherapy sessions for patients receiving both types of phototherapy (level of proof: B). In the absence of lesions requiring treatment in these areas, the face and male genital organs should be protected during treatment sessions. There is no currently available data concerning carcinogenic risk induced by TL01 in patients also on cyclosporine, methotrexate or biotherapies. In order to reduce risk and maintain patients' capacity to undergo further phototherapy sessions, we suggest (level of proof: A) the following measures: strict

patient selection, use of combined synergistic therapies, annual examination of the skin and appendages of subjects receiving more than 150 phototherapy sessions, and the creation of nationally accessible patient phototherapy files. (3) Combined treatments. The purpose of such treatment is twofold: to reduce the risk of adverse effects while increasing the efficacy of TL01 phototherapy. Lesions should be sloughed before the start of phototherapy. Synergistic effects have been demonstrated for dermal corticosteroids and tazarotene, but such effects are less noticeable with topical vitamin D3 derivatives. If there are no contraindications to its prescription, we feel that acitretine has demonstrated efficacy in enhancing the effect of TL01 phototherapy. (4) Efficacy. Narrow-spectrum UVB phototherapy is considered highly effective in extensive psoriasis. At a rate of three sessions per week, it results in complete (or almost complete) eradication of lesions in 60 to 90 % of patients within 20 to 40 sessions (level of proof: A). However, the efficacy of this therapy varies according to plaque size and noticeably better results are obtained in guttate and nummular psoriasis than in psoriasis involving large plaques.

**CONCLUSION:** Narrow-spectrum UVB phototherapy offers a good alternative to PUVA therapy since concomitant psoralen is not required, but there are few immediate adverse effects, there is less risk of drug-induced photosensitisation, and there is no need for skin or ocular photoprotection after sessions. We recommend this approach as the first-line phototherapy (level of proof: A) in children and adolescents, and in adults with extensive moderate psoriasis involving small superficial plaques. It may also be used in pregnant or breastfeeding women and in patients with renal or hepatic insufficiency. In addition, it is preferable for HIV-positive subjects (level of proof: C). However, PUVA therapy is preferable as first-line treatment in extensive severe psoriasis involving large thick plaques (level of proof: A) and in adults of phototypes IV to VI (level of proof: B); it should also be contemplated for psoriasis refractory to UVB TL01 (level of proof: B).

**[terapia con UVB a banda stretta nella psoriasi vulgaris: line guida di buona pratica e raccomandazioni della Società francese di Fotodermatologia].**

**BACKGROUND:** fototerapia, terapia PUVA e UVB a banda stretta sono riconosciute forme di terapia di prima linea per la psoriasi a placche estesa e grave. Sulla base di una revisione sistematica della letteratura medica, noi proponiamo una linea guida di buona pratica per l'uso di fototerapia UVB a banda stretta in questa indicazione.

**METODI:** Abbiamo condotto una revisione della letteratura pubblicata nel corso dei 20 anni (dal 1998 al 2009) nella banca dati on-line PubMed. Le nostre conclusioni sono basate sui risultati di studi di controllo o dove questi sono assenti, su una sintesi delle raccomandazioni pratica comune approvato dagli esperti della Società Francese di Photodermatology. I livelli delle prove scientifiche fornite si basano sui criteri definiti da Sackett. **RACCOMANDAZIONI RISULTATI:** (1) Gli aspetti pratici. L'irradiazione cabine dotate di Philips TL01 tubi, sia per la monoterapia (42 tubi) o per la terapia combinata (21 tubi UVB e 21 tubi UVA), sono stati sottoposti a certificazione (marcatura CE, certificazione ISO-DIN) e dotato di un sistema di dosimetria accurata. Diversi protocolli validi e utilizzabili esistono. L'indicazione è basata sulla gravità e la portata degli episodi di psoriasi, le conseguenze psicologiche della dermatosi, confronto tra i rapporti di beneficio / rischio dei vari trattamenti disponibili, la capacità del paziente di partecipare alle sessioni (un fattore vitale nel rispetto terapeutico), le dosi cumulative di UV dai corsi precedenti di trattamento, e l'assenza di controindicazioni, compreso l'uso di farmaci fotosensibilizzanti. Il consenso informato è stato quello di essere ottenuti da pazienti che hanno avuto un foglio di informazioni convalidate (disponibile presso [www.sfdermato.org](http://www.sfdermato.org)). I risultati dello studio e il valore della terapia di mantenimento non sono stati confermati. (2) gli effetti negativi. Gli effetti immediati avverse sono state generalmente di poco conto, con effetti solo dopo che pongono problemi. A causa del rischio di induzione di cataratta, la protezione oculare deve essere utilizzato durante le sessioni. In assenza di sintomi o conosciuta disturbo oculare, il controllo oftalmologico precedenti non sia ritenuto necessario. Il rischio di cancro della pelle rimane scarsamente definita, e questo rischio non è stato

chiaramente dimostrato di essere inferiore a terapia con UVB ad ampio spettro o PUVA. Gli studi non danno alcuna indicazione del numero di sedute dopo il quale la terapia deve essere completamente interrotto. In assenza di una chiara valutazione del rischio oncogeno, sembra ragionevole fissare il numero massimo di sedute di fototerapia UVB TL01 a 250 come con PUVA, e di includere in questo limite il totale di tutti PUVA e la fototerapia TL01 sedute per i pazienti che ricevono entrambi i tipi della fototerapia (livello di prova: B). In assenza di lesioni che richiedono un trattamento in questi settori, il volto e gli organi genitali maschili devono essere protetti durante le sessioni di trattamento. Non ci sono dati attualmente disponibili in materia di rischio cancerogeno indotto da TL01 in pazienti anche ciclosporina, metotressato o bioterapie. Al fine di ridurre il rischio e mantenere la capacità patients 'di sottoporsi a sedute di fototerapia ulteriormente, si consiglia (livello di prova: A) le seguenti misure: rigorosa selezione dei pazienti, l'uso combinato di terapie sinergiche, l'esame annuale della pelle e appendici di soggetti che hanno ricevuto più oltre 150 sessioni di fototerapia, e la creazione di file accessibili su scala nazionale fototerapia paziente.

(3) Trattamenti combinati. Lo scopo di tale trattamento è duplice: per ridurre il rischio di effetti negativi aumentando l'efficacia della fototerapia TL01. Le lesioni dovrebbero essere fuor del vecchio scoglio prima dell'inizio della fototerapia. Effetti sinergici sono stati dimostrati ai corticosteroidi per via cutanea e Tazarotene, ma tali effetti sono meno evidenti con i derivati della vitamina D3 topici. Se non vi sono controindicazioni alla sua prescrizione, riteniamo che acitretine ha dimostrato efficacia nel migliorare l'effetto della fototerapia TL01.

(4) Efficacia. UVB a spettro ristretto fototerapia è considerata altamente efficace nella psoriasi estesa. Ad un ritmo di tre sedute a settimana, il risultato è completo (o quasi totale) l'eradicazione delle lesioni in 60 al 90% dei pazienti entro 20 o 40 sessioni (livello di prova: A). Tuttavia, l'efficacia di questa terapia varia a seconda delle dimensioni della placca e risultati sensibilmente migliori si ottengono nella psoriasi guttata e nummular che nella psoriasi che coinvolgono placche di grandi dimensioni.

**CONCLUSIONE:** UVB a spettro ristretto fototerapia offre una buona alternativa alla terapia PUVA dal psoralene concomitante non è richiesto, ma ci sono pochi effetti negativi immediati, ci sono meno rischi di fotosensibilizzazione indotta dai farmaci, e non vi è alcuna necessità di pelle o di fotoprotezione oculare dopo sessioni. Si consiglia questo approccio come la fototerapia prima linea (livello di prova: A) nei bambini e negli adolescenti e negli adulti con psoriasi da moderata ampio coinvolgimento di piccole placche superficiali. Può anche essere utilizzato in donne incinte o che allattano e nei pazienti con insufficienza renale o epatica. Inoltre, è preferibile che i soggetti HIV-positivi (livello di prova: C). Tuttavia, la terapia PUVA è preferibile come trattamento di prima linea in ampia forma grave di psoriasi che coinvolgono grandi placche di spessore (livello di prova: A) e negli adulti di fototipi IV-VI (livello di prova: B): si dovrebbe anche essere prevista per la psoriasi refrattaria di UVB TL01 (livello di prova: B).

116: Macejová D, Ondková S, Brtko J.

**Vitamin D3 affects expression of thyroid hormone receptor alpha and deiodinase activity in liver of MNU-treated Sprague-Dawley rats.**

Gen Physiol Biophys. 2009 Dec;28(4):363-70.

1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D3 and its analogue, Seocalcitol (EB1089), are able to reverse or slow the process of carcinogenesis in experimental models and cell cultures. The aim of this study was to investigate the effect of administration vitamin D or Seocalcitol to female Sprague-Dawley rats with 1-methyl-1-nitrosourea (MNU)-induced carcinogenesis of mammary glands on binding characteristics and mRNA levels of thyroid hormone receptors (TRs). Chemopreventive administration of vitamin D caused significant reduction of animal body weight. The expression of TR $\alpha$  mRNA was significantly higher in liver of animals treated with vitamin D after detection of first tumour. In our experiment, administration of vitamin D or Seocalcitol significantly reduced KA (group MNU+Seo; MNU+D) and increased Bmax (group MNU+Seo) of thyroid receptors in liver when compared to healthy animals. We show that the activity type I 5'-deiodinase was significantly decreased in livers of animals treated with vitamin D. The data from our in vivo experiment has clearly shown, for the first time, that vitamin D but not Seocalcitol i) may affect the body weight of animals, ii) can cause an increase in the expression of TR $\alpha$  in rat liver, remaining the functionality of the TRs unaffected, and iii) is responsible for type I iodothyronine 5'-deiodinase activity decrease in rat liver, remaining the expression of the enzyme unaffected.

**La vitamina D3 influenza l'espressione del recettore alfa dell'ormone tiroideo e l'attività di and della deiodinasi nel fegato dei ratti Sprague-Dawley trattati con MNU.**

D3 1 $\alpha$ ,25-diidrossivitaminina e il suo analogo, Seocalcitol (EB1089), sono in grado di invertire o rallentare il processo di carcinogenesi in modelli sperimentali e colture cellulari. Lo scopo di questo studio era di studiare l'effetto della vitamina D amministrazione o Seocalcitol a femmina ratti Sprague-Dawley con 1-metil-1-nitrosourea (MNU)-carcinogenesi indotta delle ghiandole mammarie delle caratteristiche vincolanti e livelli di mRNA dei recettori degli ormoni tiroidei (TRS). Somministrazione chemiopreventive di vitamina D ha causato una significativa riduzione del peso corporeo degli animali. L'espressione di mRNA TR $\alpha$  era significativamente maggiore nel fegato degli animali trattati con la vitamina D dopo il rilevamento del primo tumore. Nel nostro esperimento, la somministrazione di vitamina D o Seocalcitol significativamente ridotto KA (gruppo MNU + Seo; MNU + D) e un aumento Bmax (gruppo MNU + Seo) dei recettori tiroidei nel fegato, rispetto ad animali sani. Si dimostra che il tipo di attività ho 5'-deiodinasi era significativamente diminuito nel fegato degli animali trattati con la vitamina D. I dati in nostro esperimento in vivo ha dimostrato chiaramente, per la prima volta, che la vitamina D, ma non Seocalcitol i) possono influenzare la peso corporeo degli animali, ii) può causare un aumento della espressione di TR $\alpha$  nel fegato di ratto, rimanendo la funzionalità del TRs inalterato, e iii) è

responsabile di tipo I iodotironina diminuire l'attività 5'-deiodinasi nel fegato di ratto, rimanendo l'espressione dell'enzima inalterato.

118: Pan L, Matloob AF, Du J, Pan H, Dong Z, Zhao J, Feng Y, Zhong Y, Huang B, Lu J.

**Vitamin D stimulates apoptosis in gastric cancer cells in synergy with trichostatin A /sodium butyrate-induced and 5-aza-2'-deoxycytidine-induced PTEN upregulation.**

FEBS J. 2010 Feb;277(4):989-99.

Previous studies have shown an anticancer effect of vitamin D, but the mechanisms underlying this action have not been fully explored. Here we show that 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> (VD<sub>3</sub>, the active form of vitamin D) significantly promoted apoptosis in the undifferentiated gastric cancer cell line HGC-27, and this was accompanied by a concurrent increase in phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10 (PTEN) expression on VD<sub>3</sub> treatment. In contrast, knockdown of PTEN expression by stable transfection of PTEN small interfering RNA greatly decreased the apoptosis rate. We further demonstrated that VD<sub>3</sub> induced PTEN expression through vitamin D receptor. In addition, our evidence showed that vitamin D receptor, Egr-1 and p300 induced PTEN expression in a synergistic fashion. Furthermore, we found that the histone deacetylase inhibitors trichostatin A and sodium butyrate and the methylation inhibitor 5-aza-2'-deoxycytidine played important roles in vitamin D-induced apoptosis through PTEN upregulation. The data presented in this article suggest potential benefits of vitamin D in gastric cancer therapies in association with the use of trichostatin A/sodium butyrate and 5-aza-2'-deoxycytidine.

**La vitamina D stimola l'apoptosi nelle cellule gastriche cancerose in sinergia con la sovra regolazione di PTEN tricostatina A /sodio butirato-indotta e 5-aza-2'-deossicitidina-indotta.**

Studi precedenti hanno mostrato un effetto antitumorale della vitamina D, ma i meccanismi alla base di questa azione non sono state pienamente esplorate. Qui ci mostrano che 1,25-diidrossivitamina D<sub>3</sub> (VD<sub>3</sub>, la forma attiva della vitamina D) significativamente promosso apoptosi nella linea di cellule di cancro gastrico indifferenziato HGC-27, e questo è stato accompagnato da un contemporaneo aumento della fosfatasi e tensina sul cromosoma omologo eliminato 10 (PTEN) espressione sul trattamento VD<sub>3</sub>. Al contrario, colpo di PTEN espressione di trasfezione stabile di PTEN piccoli RNA interferenti notevolmente diminuito il tasso di apoptosi. Abbiamo inoltre dimostrato che l'espressione di PTEN VD<sub>3</sub> indotta attraverso recettore della vitamina D. Inoltre, la nostra prova ha dimostrato che il recettore della vitamina D, Egr-1 e P300 indotto PTEN espressione in modo sinergico. Inoltre, abbiamo riscontrato che gli inibitori delle istone deacetilasi la tricostatina A e butirato di sodio e l'inibitore della 5-metilazione aza-2'-deossicitidina svolto un ruolo importante di vitamina D apoptosi indotta attraverso PTEN upregulation. I dati presentati in questo articolo suggerire potenziali benefici della vitamina D nella terapia del cancro gastrico in associazione con l'uso di un tricostatina / butirato di sodio e 5-aza-2'-deossicitidina.

19: McEwan IJ, Nardulli AM.

**Nuclear hormone receptor architecture - form and dynamics: The 2009 FASEB Summer Conference on Dynamic Structure of the Nuclear Hormone Receptors.**

Nucl Recept Signal. 2009 Dec 31;7:e011.

Nuclear hormone receptors (NHRs) represent a large and diverse family of ligand-activated transcription factors involved in regulating development, metabolic homeostasis, salt balance and reproductive health. The ligands for these receptors are typically small hydrophobic molecules such as steroid hormones, thyroid hormone, vitamin D3 and fatty acid derivatives. The first NHR structural information appeared approximately 20 years ago with the solution and crystal structures of the DNA binding domains and was followed by the structure of the agonist and antagonist bound ligand binding domains of different NHR members. Interestingly, in addition to these defined structural features, it has become clear that NHRs also possess significant structural plasticity. Thus, the dynamic structure of the NHRs was the topic of a recent stimulating and informative FASEB Summer Research Conference held in Vermont.

**Architettura del recettore degli ormoni nucleari e dinamiche: La conferenza 2009 FASEB Conference sulle strutture dinamiche dei recettori ormonali nucleari.**

Recettori ormonali nucleari (NHRs) rappresentano una famiglia numerosa e diversificata di fattori di trascrizione ligando attivati coinvolti nella regolazione dello sviluppo, l'omeostasi metabolica, bilancio sale e salute riproduttiva. I ligandi di questi recettori sono in genere piccole molecole idrofobiche come gli ormoni steroidei, ormoni tiroidei, vitamina D3 e derivati degli acidi grassi. Le prime informazioni NHR strutturale apparso circa 20 anni fa con le strutture soluzione e cristallo dei domini di legame al DNA ed è stato seguito dalla struttura di agonisti ed antagonisti legati ligando domini di legame dei membri NHR diversi. È interessante notare che, in aggiunta a queste caratteristiche definite strutturali, è diventato chiaro che NHRs possiedono anche significative plasticità strutturale. Così, la struttura dinamica del NHRs è stato il tema di un recente stimolante e informativo FASEB Summer Research Conference tenutasi nel Vermont.

120: Kovalenko PL, Zhang Z, Cui M, Clinton SK, Fleet JC.

**1,25 dihydroxyvitamin D-mediated orchestration of anticancer, transcript-level effects in the immortalized, non-transformed prostate epithelial cell line, RWPE1.**

BMC Genomics.2010 Jan 13;11:26.

**BACKGROUND:** Prostate cancer is the second leading cause of cancer mortality among US men. Epidemiological evidence suggests that high vitamin D status protects men from prostate cancer and the active form of vitamin D, 1alpha,25 dihydroxyvitamin D3 (1,25(OH)2D) has anti-cancer effects in cultured prostate cells. Still, the molecular mechanisms and the gene targets for vitamin D-mediated prostate cancer prevention are unknown.

**RESULTS:** We examined the effect of 1,25(OH)2D (+/- 100 nM, 6, 24, 48 h) on the transcript profile of proliferating RWPE1 cells, an immortalized, non-tumorigenic prostate epithelial cell line that is growth arrested by 1,25(OH)2D (Affymetrix U133 Plus 2.0, n = 4/treatment per time and dose). Our analysis revealed many transcript level changes at a 5% false detection rate: 6 h, 1571 (61% up), 24 h, 1816 (60% up), 48 h, 3566 (38% up). 288 transcripts were regulated similarly at all time points (182 up, 80 down) and many of the promoters for these transcripts contained putative vitamin D response elements. Functional analysis by pathway or Gene Set Analysis revealed early suppression of WNT, Notch, NF-kB, and IGF1 signaling. Transcripts related to inflammation were suppressed at 6 h (e.g. IL-1 pathway) and suppression of proinflammatory pathways continued at later time points (e.g. IL-17 and IL-6 pathways). There was also evidence for induction of anti-angiogenic pathways and induction of transcripts for protection from oxidative stress or maintenance of cell redox homeostasis at 6 h.

**CONCLUSIONS:** Our data reveal of large number of potential new, direct vitamin D target genes relevant to prostate cancer prevention. In addition, our data suggests that rather than having a single strong regulatory effect, vitamin D orchestrates a pattern of changes within prostate epithelial cells that limit or slow carcinogenesis.

**L'orchestrazione antitumorale mediata da 1,25 diidrossivitamina D, effetti sui livelli di trascrizione delle cellule immortalizzate, linee cellulari epiteliali prostatiche non trasformate, RWPE1.**

**BACKGROUND:** Il cancro della prostata è la seconda causa principale di mortalità per cancro fra gli uomini degli Stati Uniti. L'evidenza epidemiologica suggerisce che un alto livello di vitamina D protegge gli uomini dal cancro alla prostata e la forma attiva della vitamina D, 1alfa, 25 diidrossivitamina D3 (1,25 (OH) 2D) ha effetti anti-cancro nelle cellule della prostata in coltura. Eppure, i meccanismi molecolari e gli obiettivi gene per la prevenzione della prostata vitamina D-mediata cancro sono sconosciuti.

**RISULTATI:** Abbiamo esaminato l'effetto di 1,25 (OH) 2D (+ / - 100 nm, 6, 24, 48 h) del profilo di

trascrizione di cellule proliferanti RWPE1, un immortalata, non-tumorali linea di cellule epiteliali della prostata che è la crescita arrestato dalla 1,25 (OH) 2D (Affymetrix U133 Plus 2.0, n = 4/treatment tempo e per dose). La nostra analisi ha rivelato molti cambiamenti a livello della trascrizione al un tasso del 5% di rilevazione false: 6 h, 1571 (61% in su), 24 h, 1816 (60% in su), 48 h, 3.566 (38% in su). 288 trascrizioni sono state regolate in modo simile a tutti i tempi (182 su, 80 giù) e molti dei promotori di queste trascrizioni contenute putativo vitamina D elementi di risposta. Analisi funzionale di via o Gene Set Analysis rivelato soppressione precoce di WNT, Notch, NF-kB, e IGF1 segnalazione. Trascrizioni relative ad infiammazione sono stati soppressi a 6 ore (ad esempio, IL-1 via) e la soppressione di percorsi proinfiammatorie continuato in momenti successivi (ad esempio, IL-17 e IL-6 percorsi). Ci fu anche la prova per l'induzione di percorsi anti-angiogenici e induzione di trascrizioni per la protezione dallo stress ossidativo o mantenimento dell'omeostasi redox cellulare a 6 h.

**CONCLUSIONI:** I nostri dati rivelano di un gran numero di potenziali nuovi geni bersaglio diretto della vitamina D importante per la prevenzione del cancro alla prostata. Inoltre, i nostri dati suggeriscono che, piuttosto che avere un unico effetto forte regolamentazione, la vitamina D orchestra un pattern di cambiamenti all'interno delle cellule epiteliali della prostata che limitano o carcinogenesi lento.

121: Antony P, Sigüeiro R, Huet T, Sato Y, Ramalanjaona N, Rodrigues LC, Mouriño A, Moras D, Rochel N.

**Structure-function relationships and crystal structures of the vitamin D receptor bound 2 alpha-methyl-(20S,23S)- and 2 alpha-methyl-(20S,23R)-epoxymethano-1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3.**

J Med Chem.2010 Feb 11;53(3):1159-71.

The vitamin D nuclear receptor is a ligand-dependent transcription factor that controls multiple biological responses such as cell proliferation, immune responses, and bone mineralization. Numerous 1 alpha,25(OH)(2)D(3) analogues, which exhibit low calcemic side effects and/or antitumoral properties, have been synthesized. We recently showed that the synthetic analogue (20S,23S)-epoxymethano-1 alpha,25-dihydroxyvitamin D(3) (2a) acts as a 1 alpha,25(OH)(2)D(3) superagonist and exhibits both antiproliferative and prodifferentiating properties in vitro. Using this information and on the basis of the crystal structures of human VDR ligand binding domain (hVDR LBD) bound to 1 alpha,25(OH)(2)D(3), 2 alpha-methyl-1 alpha,25(OH)(2)D(3), or 2a, we designed a novel analogue, 2 alpha-methyl-(20S,23S)-epoxymethano-1 alpha,25-dihydroxyvitamin D(3) (4a), in order to increase its transactivation potency. Here, we solved the crystal structures of the hVDR LBD in complex with the 4a (C23S) and its epimer 4b (C23R) and determined their correlation with specific biological outcomes.

**Relazione struttura-funzione e struttura cristallina del recettore della vitamina D legato a 2 alfa-metil-(20S,23S)- e 2 alfa-metil-(20S,23R)-epossimetano-1 alfa,25-diidrossivitamina D3**

Il recettore della vitamina D nucleare è un fattore di trascrizione ligando-dipendenti che più controlli risposte biologiche, come la proliferazione cellulare, la risposta immunitaria, e la mineralizzazione ossea. Numerosi 1 alfa, 25 (OH) (2) D (3) analoghi, che presentano effetti collaterali calcemici basso e / o le proprietà antitumorali, sono stati sintetizzati. Abbiamo recentemente dimostrato che l'analogo sintetico (20S, 23S)-epoxymethano-1 alfa,25-diidrossivitamina D (3) (2 bis) agisce come un alfa 1, 25 (OH) (2) D (3) superagonist e mostra sia antiproliferativa e le proprietà prodifferentiating in vitro. Utilizzando queste informazioni e sulla base delle strutture cristalline di VDR umano dominio di legame ligando (LBD hVDR) per il 1 alfa, 25 (OH) (2) D (3), 2 alfa-metil-1 alfa, 25 (OH) (2) D (3), o 2 bis, abbiamo progettato un analogo romanzo, 2 alfa-metil-(20S, 23S)-epoxymethano-1 alfa,25-diidrossivitamina D (3) (4 bis), al fine di aumentare la sua transattivazione potenza. Qui, abbiamo risolto la struttura cristallina del LBD hVDR in complesso con la 4a (C23S) e la sua 4b epimero (C23R) e determinato la loro correlazione con specifici risultati biologici.

123: Wu W, Beilhartz G, Roy Y, Richard CL, Curtin M, Brown L, Cadieux D, Coppolino M, Farach-Carson MC, Nemere I, Meckling KA.

**Nuclear translocation of the 1,25D3-MARRS (membrane associated rapid response to steroids) receptor protein and NFkappaB in differentiating NB4 leukemia cells.**

Exp Cell Res. 2010Apr 15;316(7):1101-8.

1,25 Dihydroxyvitamin D(3) (1,25D(3)) primes NB4 promyelocytic leukemia cells to differentiate along the monocyte/macrophage lineage through a non-genomic mechanism. Here we show that NB4 cells express high levels of the recently identified membrane receptor for 1,25D(3), which is a distinct gene product from the classical nuclear vitamin D receptor. This 57 kDa protein, named 1,25D(3)-MARRS (Membrane Activated Rapid Response to Steroids)/ERp57/PIA3 appears to associate in a complex with the transcription factor, nuclear factor kappa B (NFkappaB). In unstimulated cells, 1,25D(3)-MARRS can be co-immunoprecipitated with antibodies directed at NFkappaB, and NFkappaB is co-precipitated when antibodies against 1,25D(3)-MARRS or ERp57 are used. Confocal microscopy and subcellular fractionation studies demonstrate that both 1,25D(3)-MARRS and NFkappaB begin translocating to the nucleus within minutes of co-stimulation with 1,25D(3) and phorbol ester. The predominant nuclear localization of both proteins precedes the expression of the monocyte/macrophage phenotype and suggests that this event may be critical to the differentiation pathway. This suggests a role for 1,25D(3)-MARRS in the nucleus as a regulator of gene expression. Here it may also regulate the activity of NFkappaB and other factors with which it may be interacting.

**Traslocazione nucleare del recettore proteico di 1,25D3-MARRS (steroidi di risposta associate alla membrana) e di NFkappaB nel differenziamento delle cellule leucemiche NB4**

1,25 diidrossivitamina D (3) (1,25 D (3)) i numeri primi NB4 cellule della leucemia promielocitica per differenziare lungo i monociti / macrofagi lignaggio attraverso un meccanismo di non-genomica. Qui ci mostrano che le cellule NB4 esprimono alti livelli del recettore di membrana recentemente identificato per 1,25 D (3), che è un prodotto del gene distinto dal recettore della vitamina D nucleare classica. Questa proteina 57 kDa, denominata 1,25 D (3)-Marrs (membrana Activated di risposta rapida agli steroidi) / ERp57/PIA3 sembra associare in un complesso con il fattore di trascrizione, fattore nucleare kappa B (NFkappaB). Nelle cellule non stimolate, 1,25 D (3)-Marrs può essere co-immunoprecipitati con anticorpi diretti a NFkappaB, e NFkappaB è co-precipitata quando gli anticorpi contro il 1,25 D (3)-Marrs o ERp57 sono utilizzati. Microscopia confocale e studi di frazionamento subcellulare dimostrare che entrambe le 1,25 D (3)-Marrs e NFkappaB iniziare translocating al nucleo in pochi minuti di co-stimolazione con 1,25 D (3) e estere phorbol. La localizzazione prevalente nucleare di entrambe le proteine precede l'espressione dei monociti / macrofagi e fenotipo suggerisce che questo evento potrebbe essere cruciale per il percorso di differenziazione. Ciò suggerisce un ruolo per 1,25 D (3)-Marrs nel nucleo come

regolatore dell'espressione genica. Qui si può anche regolare l'attività di NFkappaB e altri fattori con i quali si può interagire.

124: Fedirko V, Bostick RM, Long Q, Flanders WD, McCullough ML, Sidelnikov E, Daniel CR, Rutherford RE, Shaikat A.

**Effects of supplemental vitamin D and calcium on oxidative DNA damage marker in normal colorectal mucosa: a randomized clinical trial.**

Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2010 Jan;19(1):280-91.

The exact antineoplastic effects of calcium and vitamin D(3) in the human colon are unclear. Animal and in vitro studies show that these two agents reduce oxidative stress; however, these findings have never been investigated in humans. To address this, we conducted a pilot, randomized, double-blind, placebo-controlled, 2 x 2 factorial clinical trial to test the effects of calcium and vitamin D(3) on a marker of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OH-dG), in the normal colorectal mucosa. Patients (N = 92) with at least one pathology-confirmed colorectal adenoma were treated with 2 g/d calcium and/or 800 IU/d vitamin D(3) versus placebo over 6 months. Overall labeling and colorectal crypt distribution of 8-OH-dG in biopsies of normal-appearing rectal mucosa were detected by standardized automated immunohistochemistry and quantified by image analysis. After 6 months of treatment, 8-OH-dG labeling along the full lengths of colorectal crypts decreased by 22% (P = 0.15) and 25% (P = 0.10) in the calcium and vitamin D(3) groups, respectively, but not in the calcium plus vitamin D(3) group. The estimated treatment effects were strongest among participants with higher baseline colon crypt vitamin D receptor expression (P = 0.05). Overall, these preliminary results indicate that calcium and vitamin D(3) may decrease oxidative DNA damage in the normal human colorectal mucosa, support the hypothesis that 8-OH-dG labeling in colorectal crypts is a treatable oxidative DNA damage biomarker of risk for colorectal neoplasms, and provide support for further investigation of calcium and vitamin D(3) as chemopreventive agents against colorectal neoplasms.

**Effetti di un supplemento di vitamina D e del calcio sui marker del danno ossidativo al DNA nella mucosa colonrettale: un trial clinico randomizzato.**

Gli effetti antineoplastici esatto di calcio e vitamina D (3) nel colon umano non sono chiari. Studi in vitro e in animali indicano che questi due agenti ridurre lo stress ossidativo, tuttavia, questi risultati non sono mai stati studiati sugli esseri umani. A questo scopo, abbiamo condotto un pilota, randomizzato, in doppio cieco, controllato con placebo, 2 x 2 trial clinici fattoriale per testare gli effetti di calcio e vitamina D (3) su un marker di danno ossidativo al DNA, l'8-idrossi-2'-deossiguanosina (8-OH-dG), nella mucosa normale del colon-retto. I pazienti (n = 92) con almeno una patologia ha confermato adenoma del colon-retto sono stati trattati con 2 g / d di calcio e / o 800 UI / die di vitamina D (3) rispetto al placebo nell'arco di 6 mesi. Nel complesso l'etichettatura e distribuzione del colon-retto cripta di 8-OH-dG nelle biopsie di aspetto normale mucosa rettale sono stati rilevati da standardizzati immunoistochimica automatizzata e quantificato mediante analisi dell'immagine. Dopo 6 mesi di trattamento, 8-OH-dG etichettatura lungo la lunghezza totale delle

cripte del colon-retto sono diminuiti del 22% (P = 0,15) e il 25% (P = 0,10) nel calcio e vitamina D (3) gruppi, rispettivamente, ma non nel calcio più vitamina D (3) del gruppo. Gli effetti del trattamento sono stati stimati a più forte tra i partecipanti con più alta espressione di due punti di riferimento cripta recettore della vitamina D (P = 0,05). Complessivamente, questi risultati preliminari indicano che calcio e vitamina D (3) può diminuire il danno ossidativo del DNA nella mucosa normale del colon umano, supportano l'ipotesi che l'8-OH-dG etichettatura nelle cripte del colon-retto è un curabile ossidativo biomarker del danno al DNA di rischio per colon-retto neoplasie, e forniscono il supporto per ulteriori indagini di calcio e vitamina D (3) come agenti chemiopreventivi contro le neoplasie del colon-retto.

125: Egan JB, Thompson PA, Vitanov MV, Bartik L, Jacobs ET, Haussler MR, Gerner EW, Jurutka PW.

**Vitamin D receptor ligands, adenomatous polyposis coli, and the vitamin D receptor FokI polymorphism collectively modulate beta-catenin activity in colon cancer cells.**

Mol Carcinog. 2010 Apr;49(4):337-52.

The activity of beta-catenin, commonly dysregulated in human colon cancers, is inhibited by the vitamin D receptor (VDR), and this mechanism is postulated to explain the putative anti-cancer activity of vitamin D metabolites in the colon. We investigated the effect of a common FokI restriction site polymorphism (F/f) in the human VDR gene as well as the effect of anti-tumorigenic 1,25-dihydroxyvitamin D(3) (1,25D) and pro-tumorigenic lithocholic acid (LCA) VDR ligands on beta-catenin transcriptional activity. Furthermore, the influence of a major regulatory protein of beta-catenin, the APC tumor suppressor gene, on VDR-dependent inhibition of beta-catenin activity was examined. We report herein that beta-catenin-mediated transcription is most effectively suppressed by the VDR FokI variant F/M4 when 1,25D is limiting. Using Caco-2 colorectal cancer (CRC) cells, it was observed that VDR ligands, 1,25D and LCA, both suppress beta-catenin transcriptional activity, though 1,25D exhibited significantly greater inhibition. Moreover, 1,25D, but not LCA, suppressed endogenous expression of the beta-catenin target gene DKK-4 independent of VDR DNA-binding activity. These results support beta-catenin sequestration away from endogenous gene targets by 1,25D-VDR. This activity is most efficiently mediated by the FokI gene variant F/M4, a VDR allele previously associated with protection against CRC. Interestingly, we found the inhibition of beta-catenin activity by 1,25D-VDR was significantly enhanced by wild-type APC. These results reveal a previously unrecognized role for 1,25D-VDR in APC/beta-catenin cross talk. Collectively, these findings strengthen evidence favoring a direct effect on the Wnt-signaling molecule beta-catenin as one anti-cancer target of 1,25D-VDR action in the colorectum.

**I ligandi dei recettori della vitamina D, le poliposi adenomatose, e il polimorfismo del recettore della vitamina D FokI modula l'attività della beta-catenina nelle cellule del colon cancerose**

L'attività di beta-catenina, comunemente deregolazione nei tumori del colon umano, è inibita dal recettore della vitamina D (VDR), e questo meccanismo è ipotizzato per spiegare la presunta attività anti-cancro di metaboliti della vitamina D nel colon. Abbiamo studiato l'effetto di un comune polimorfismo del sito di restrizione FokI (F / F) nel gene VDR umano così come l'effetto di anti-tumoralmente 1,25-diidrossivitamina D (3) (1,25 D) e pro-tumoralmente acido lithocholic (LCA) leganti di VDR in beta-catenina attività trascrizionale. Inoltre, l'influenza di una proteina importante regolamentare della beta-catenina, il gene tumore soppressore APC, sulla inibizione VDR-dipendente dell'attività beta-catenina è stato esaminato. Segnaliamo qui che la trascrizione beta-

catenina-mediata è più efficace soppressa dal F/M4 VDR variante FokI 1,25 quando D è limitante. Utilizzo di Caco-2 del cancro del colon-retto (CRC), le cellule, si è osservato che leganti di VDR, 1,25 D e LCA, sia sopprimere beta-catenina attività trascrizionale, anche se 1,25 D esposto inibizione significativamente maggiore. Inoltre, 1,25 D, ma non LCA, sopprime l'espressione del gene endogeno bersaglio beta-catenina DKK-4 indipendenti di attività VDR legate al DNA. Questi risultati supportano sequestro beta-catenina lontano dagli obiettivi gene endogeno per 1,25 D-VDR. Questa attività è più efficace mediata dal gene variante F/M4 FokI, un allele VDR precedentemente associato alla protezione contro CRC. È interessante notare, abbiamo trovato l'inibizione di attività beta-catenina da 1,25 D-VDR è stata significativamente arricchita da APC wild-type. Questi risultati rivelano un ruolo precedentemente non riconosciuto per 1,25 D-VDR in APC / talk beta-catenina cross. Collettivamente, questi risultati rafforzano le prove a favore di un effetto diretto sulla segnalazione Wnt-beta-catenina molecola come un obiettivo anti-cancro di 1,25 azione D-VDR del colon-retto.

127: Richard CL, Farach-Carson MC, Rohe B, Nemere I, Meckling KA.

**Involvement of 1,25D3-MARRS (membrane associated, rapid response steroid-binding), a novel vitamin D receptor, in growth inhibition of breast cancer cells.**

Exp Cell Res.2010 Mar 10;316(5):695-703.

In addition to classical roles in calcium homeostasis and bone development, 1,25 dihydroxyvitamin D3 [1,25(OH)2D3] inhibits the growth of several cancer types, including breast cancer. Although cellular effects of 1,25(OH)2D3 traditionally have been attributed to activation of a nuclear vitamin D receptor (VDR), a novel receptor for 1,25(OH)2D3 called 1,25D3-MARRS (membrane-associated, rapid response steroid-binding) protein was identified recently. The purpose of this study was to determine if the level of 1,25D3-MARRS expression modulates 1,25(OH)2D3 activity in breast cancer cells. Relative levels of 1,25D3-MARRS protein in MCF-7, MDA MB 231, and MCF-10A cells were estimated by real-time RT-PCR and Western blotting. To determine if 1,25D3-MARRS receptor was involved in the growth inhibitory effects of 1,25(OH)2D3 in MCF-7 cells, a ribozyme construct designed to knock down 1,25D(3)-MARRS mRNA was stably transfected into MCF-7 cells. MCF-7 clones in which 1,25D3-MARRS receptor expression was reduced showed increased sensitivity to 1,25(OH)2D3 (IC<sub>50</sub> 56±24 nM) compared to controls (319±181 nM; P<0.05). Reduction in 1,25D3-MARRS receptor lengthened the doubling time in transfectants treated with 1,25(OH)2D3. Knockdown of 1,25D3-MARRS receptor also increased the sensitivity of MCF-7 cells to the vitamin D analogs KH1060 and MC903, but not to unrelated agents (all-trans retinoic acid, paclitaxel, serum/glucose starvation, or the isoflavone, pomiferin). These results suggest that 1,25D3-MARRS receptor expression interferes with the growth inhibitory activity of 1,25(OH)2D3 in breast cancer cells, possibly through the nuclear VDR. Further research should examine the potential for pharmacological or natural agents that modify 1,25D3-MARRS expression or activity as anticancer agents.

**Coinvolgimento di 1,25D3-MARRS (associate alla membrana, risposta rapida legata agli steroidi), un nuovo recettore della vitamina D, nell'inibizione della crescita delle cellule mammarie cancerose.**

In aggiunta ai ruoli classici nell'omeostasi del calcio e dello sviluppo delle ossa, la 1,25 diidrossivitamina D3 [1,25 (OH) 2D3], inibisce la crescita di diversi tipi di tumore, compreso il cancro al seno. Anche se gli effetti cellulari di 1,25 (OH) 2D3 tradizionalmente sono stati attribuiti ad attivazione di un recettore nucleare della vitamina D (VDR), un recettore romanzo di 1,25 (OH) 2D3 chiamato 1,25 D3-Marrs (associata alla membrana, rapida risposta steroide-binding) proteina è stata identificata di recente. Lo scopo di questo studio era di determinare se il livello di 1,25

espressione D3-Marrs modula 1,25 (OH) 2D3 attività in cellule di cancro al seno. relativi livelli di proteina 1,25 D3-Marrs in MCF-7, MDA MB 231, e le cellule MCF-10A sono stati stimati mediante real-time RT-PCR e Western blotting. Per determinare se 1,25 recettori D3-Marrs è stato coinvolto nel effetti inibitori della crescita di 1,25 (OH) 2D3 in cellule MCF-7, un ribozima termine creato per abbattere 1,25 D (3)-Marrs mRNA era trasfettate stabilmente in cellule MCF-7. MCF-7 cloni in cui è stato ridotto 1,25 recettori D3-Marrs espressione hanno mostrato una maggiore sensibilità a 1,25 (OH) 2D3 (IC (50) 56 +/- 24 nM) rispetto ai controlli (319 +/- 181 nM; P <0,05). Riduzione del 1,25 D3-Marrs recettore allungato il tempo di raddoppio in trasfettanti trattati con 1,25 (OH) 2D3. Atterramento di 1,25 recettori D3-Marrs inoltre aumentato la sensibilità di cellule MCF-7 per la vitamina D KH1060 analoghi e MC903, ma non ad agenti indipendenti (all-trans retinoico, paclitaxel, siero / fame di glucosio, o l'isoflavone, pomiferin ). Questi risultati suggeriscono che il recettore 1,25 D3-Marrs espressione interferisce con l'attività inibitoria della crescita della 1,25 (OH) 2D3 in cellule di cancro al seno, probabilmente attraverso il VDR nucleare. Ulteriori ricerche dovrebbero esaminare la possibilità di agenti farmacologici o naturali che modificano l'espressione 1,25 D3-Marrs o attività come agenti antitumorali.

131: Janjetovic Z, Tuckey RC, Nguyen MN, Thorpe EM Jr, Slominski AT.

**20,23-dihydroxyvitamin D3, novel P450ccc product, stimulates differentiation and inhibits proliferation and NF-kappaB activity in human keratinocytes.**

J CellPhysiol. 2010 Apr;223(1):36-48.

We have examined effects of the 20,23-dihydroxyvitamin D3 (20,23(OH)2D3), on differentiation and proliferation of human keratinocytes and the anti-inflammatory potential of 20,23(OH)2D3 from its action on nuclear factor-kappaB (NF-kappaB). 20,23(OH)2D3 inhibited growth of keratinocytes with a potency comparable to that for 1,25-dihydroxyvitamin D3 (1,25(OH)2D3). Cell cycle analysis showed that this inhibition was associated with G1/G0 and G2/M arrests. 20,23(OH)2D3 stimulated production of involucrin mRNA and inhibited production of cytokeratin 14 mRNA in a manner similar to that seen for 1,25(OH)2D3. Flow cytometry showed that these effects were accompanied by increased involucrin protein expression, and an increase in the cell size and granularity. Silencing of the vitamin D receptor (VDR) by corresponding siRNA abolished the stimulatory effect on involucrin gene expression demonstrating an involvement of VDR in 20,23(OH)2D3 action. This mode of action was further substantiated by stimulation of CYP24 gene expression and stimulation of the CYP24 promoter-driven reporter gene activity. 20,23(OH)2D3 displayed several fold lower potency for induction of CYP24 gene expression than 1,25(OH)2D3. Finally, 20,23(OH)2D3 inhibited the transcriptional activity of NF-kappaB in keratinocytes as demonstrated by EMSA, NF-kappaB-driven reporter gene activity assays and measurements of translocation of p65 from the cytoplasm to the nucleus. These inhibitory effects were connected with stimulation of the expression of IkappaBalpha with subsequent sequestration of NF-kappaB in the cytoplasm and consequent attenuation of transcriptional activity. In summary, we have characterized 20,23(OH)2D3 as a novel secosteroidal regulator of keratinocytes proliferation and differentiation and a modifier of their immune activity.

**20,23-diidrossivitamina D3, un nuovo prodotto P450ccc, stimola la differenziazione e inibisce la proliferazione e l'attività di NF-kappaB nei cheratinociti umani.**

Abbiamo esaminato gli effetti della D3-diidrossivitamina 20,23 (20,23 (OH) 2D3), sulla differenziazione e la proliferazione dei cheratinociti umani e il potenziale anti-infiammatori di 20,23 (OH) 2D3 dalla sua azione sul fattore nucleare- kappaB (NF-kB). 20,23 (OH) 2D3 inibito la

crescita dei cheratinociti con una potenza paragonabile a quella di 1,25-diidrossivitamina D<sub>3</sub> (1,25 (OH) 2D<sub>3</sub>). analisi del ciclo cellulare ha dimostrato che questa inibizione è stata associata con G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub> e G<sub>2</sub> / M arresti. 20,23 (OH) 2D<sub>3</sub> stimolato la produzione di mRNA involucrin e ha inibito la produzione di citocheratina 14 mRNA in un modo simile a quello visto per 1,25 (OH) 2D<sub>3</sub>. La citometria a flusso ha dimostrato che questi effetti sono stati accompagnati da un aumento dell'espressione della proteina involucrin, e un aumento delle dimensioni della cella e la granularità. Silenziamento del recettore della vitamina D (VDR) con siRNA corrispondente abolito l'effetto stimolante sulla espressione genica involucrin dimostrare un coinvolgimento di VDR in 20,23 (OH) 2D<sub>3</sub> azione. Questa modalità di azione è stata ulteriormente corroborata dalla stimolazione dell'espressione del gene CYP24 e stimolazione dell'attività CYP24 reporter promotore del gene-driven. 20,23 (OH) 2D<sub>3</sub> appaiano diverse volte più bassa potenza per l'induzione dell'espressione del gene CYP24 di 1,25 (OH) 2D<sub>3</sub>. Infine, 20,23 (OH) 2D<sub>3</sub> inibito l'attività trascrizionale di NF-κB nei cheratinociti, come dimostrato da EMSA, NF-κB-driven reporter saggi di attività del gene e le misure di traslocazione di p65 dal citoplasma al nucleo. Questi effetti inibitori sono stati collegati con la stimolazione della espressione di IkappaBalpha con conseguente sequestro di NF-kappaB nel citoplasma e conseguente attenuazione della attività trascrizionale. In sintesi, abbiamo caratterizzato 20,23 (OH) 2D<sub>3</sub> come regolatore romanzo secosteroidal di proliferazione e differenziazione dei cheratinociti e un modificatore della loro attività immunitaria.

132: Alvarez-Díaz S, Larriba MJ, López-Otín C, Muñoz A.

**Vitamin D: Proteases, protease inhibitors and cancer.**

Cell Cycle. 2010 Jan 1;9(1):32-7.

The active vitamin D metabolite 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D(3) (1,25(OH)(2)D(3), Calcitriol) is a major regulator of gene expression in higher organisms. Protein abundance is an endpoint of gene expression that results from the balance between induction and degradation and is essential for adequate cell function. Proteins are degraded by proteases whose activity is in turn controlled by a number of endogenous protease inhibitors. 1,25(OH)(2)D(3) regulates several proteases and protease inhibitors in different cell types, putatively contributing to its regulatory effects of cell physiology. We have recently shown that 1,25(OH)(2)D(3) strongly induces the expression of cystatin D, an inhibitor of several cysteine proteases of the cathepsin family. Cystatin D induction may contribute to the antitumor effect of 1,25(OH)(2)D(3) against colon cancer by mechanisms that are both dependent and independent of cathepsin inhibition. Transcriptomic studies suggest that 1,25(OH)(2)D(3) also modulates the function of the ubiquitin-proteasome system. Thus, proteases and protease inhibitors are candidates to mediate to a certain extent the complex action of 1,25(OH)(2)D(3) in cancer cells.

**Vitamina D: Proteasi, inibitori delle protease e cancro.**

La vitamina D attiva 1 $\alpha$  metabolita,25-diidrossivitamina D (3) (1,25 (OH) (2) D (3), calcitriolo) è il principale regolatore dell'espressione genica in organismi superiori. Abbondanza di proteine è un endpoint di espressione genica che risulta dal saldo tra induzione e il degrado ed è essenziale per la funzione delle cellule adeguata. Le proteine sono degradate da proteasi la cui attività è a sua volta controllata da una serie di inibitori delle proteasi endogene. 1,25 (OH) (2) D (3) regola la proteasi e inibitori della proteasi diverse in diversi tipi di cellule, contribuendo alla sua putativamente effetti regolatori della fisiologia delle cellule. Abbiamo recentemente dimostrato che 1,25 (OH) (2) D (3) induce fortemente l'espressione della cistatina D, un inibitore della proteasi cisteina diversi della famiglia catepsina. Cistatina induzione D può contribuire l'effetto antitumorale di 1,25 (OH) (2) D (3) contro il cancro al colon con meccanismi che sono sia dipendenti ed indipendenti di inibizione catepsina. Gli studi suggeriscono che la trascrittomica 1,25 (OH) (2) D (3) modula anche la funzione del sistema ubiquitina-proteasoma. Così, proteasi e inibitori della proteasi sono candidati a mediare in una certa misura la complessa azione di 1,25 (OH) (2) D (3) nelle cellule tumorali.

138: García-Becerra R, Díaz L, Camacho J, Barrera D, Ordaz-Rosado D, Morales A, Ortiz CS, Avila E, Bargallo E, Arrecillas M, Halhali A, Larrea F.

**Calcitriol inhibits Ether-à go-go potassium channel expression and cell proliferation in human breast cancer cells.**

Exp Cell Res. 2010 Feb 1;316(3):433-42.

Antiproliferative actions of calcitriol have been shown to occur in many cell types; however, little is known regarding the molecular basis of this process in breast carcinoma. Ether-à-go-go (Eag1) potassium channels promote oncogenesis and are implicated in breast cancer cell proliferation. Since calcitriol displays antineoplastic effects while Eag1 promotes tumorigenesis, and both factors antagonically regulate cell cycle progression, we investigated a possible regulatory effect of calcitriol upon Eag1 as a mean to uncover new molecular events involved in the antiproliferative activity of this hormone in human breast tumor-derived cells. RT real-time PCR and immunocytochemistry showed that calcitriol suppressed Eag1 expression by a vitamin D receptor (VDR)-dependent mechanism. This effect was accompanied by inhibition of cell proliferation, which was potentiated by astemizole, a nonspecific Eag1 inhibitor. Immunohistochemistry and Western blot demonstrated that Eag1 and VDR abundance was higher in invasive-ductal carcinoma than in fibroadenoma, and immunoreactivity of both proteins was located in ductal epithelial cells. Our results provide evidence of a novel mechanism involved in the antiproliferative effects of calcitriol and highlight VDR as a cancer therapeutic target for breast cancer treatment and prevention.

**Calcitriolo inibisce l'espressione del canale del potassio Ether-à go-go e la proliferazione cellulare nelle cellule mammarie cancerose.**

Azioni antiproliferativa di calcitriolo è stato dimostrato che si verificano in molti tipi di cellule, tuttavia, poco è noto circa le basi molecolari di questo processo nel carcinoma mammario. Ether-à-go-go (Eag1) i canali del potassio promuovere oncogenesi e sono implicati nella proliferazione delle cellule di cancro al seno. Dato che gli effetti visualizza calcitriolo antineoplastico, mentre Eag1 promuove tumorigenesi, ed entrambi i fattori antagonicamente regolano la progressione del ciclo cellulare, abbiamo studiato un possibile effetto di regolamentazione di calcitriolo su Eag1 come mezzo per scoprire nuovi eventi molecolari coinvolti nella attività antiproliferativa di questo ormone nel tumore mammario umano-cellule derivate. RT-PCR in tempo reale e immunocitochimica ha dimostrato che il calcitriolo Eag1 soppressa l'espressione di un recettore della vitamina D (VDR) meccanismo-dipendente. Questo effetto è stato accompagnato da inibizione della proliferazione cellulare, che è stato potenziato da astemizolo, un inibitore non specifico Eag1. Immunoistochimica e Western blot ha dimostrato che Eag1 e abbondanza VDR è stata maggiore nel carcinoma duttale invasivo, rispetto al fibroadenoma, e immunoreattività di entrambe le proteine si trovava in duttale cellule epiteliali. I nostri risultati forniscono la prova di un nuovo meccanismo

coinvolto nella effetti antiproliferativi di calcitriolo e VDR evidenziare come bersaglio terapeutico per il trattamento del cancro del seno e la prevenzione.

140: Krishnan AV, Feldman D.

**Molecular pathways mediating the anti-inflammatory effects of calcitriol: implications for prostate cancer chemoprevention and treatment.**

Endocr Relat Cancer. 2010 Jan 29;17(1):R19-38.

Calcitriol, the hormonally active form of vitamin D, exerts multiple anti-proliferative and pro-differentiating actions including cell cycle arrest and induction of apoptosis in many malignant cells, and the hormone is currently being evaluated in clinical trials as an anti-cancer agent. Recent research reveals that calcitriol also exhibits multiple anti-inflammatory effects. First, calcitriol inhibits the synthesis and biological actions of pro-inflammatory prostaglandins (PGs) by three mechanisms: i) suppression of the expression of cyclooxygenase-2, the enzyme that synthesizes PGs; ii) up-regulation of the expression of 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase, the enzyme that inactivates PGs; and iii) down-regulation of the expression of PG receptors that are essential for PG signaling. The combination of calcitriol and nonsteroidal anti-inflammatory drugs results in a synergistic inhibition of the growth of prostate cancer (PCa) cells and offers a potential therapeutic strategy for PCa. Second, calcitriol increases the expression of mitogen-activated protein kinase phosphatase 5 in prostate cells resulting in the subsequent inhibition of p38 stress kinase signaling and the attenuation of the production of pro-inflammatory cytokines. Third, calcitriol also exerts anti-inflammatory activity in PCa through the inhibition of nuclear factor-kappaB signaling that results in potent anti-inflammatory and anti-angiogenic effects. Other important direct effects of calcitriol as well as the consequences of its anti-inflammatory effects include the inhibition of tumor angiogenesis, invasion, and metastasis. We hypothesize that these anti-inflammatory actions, in addition to the other known anti-cancer effects of calcitriol, play an important role in its potential use as a therapeutic agent for PCa. Calcitriol or its analogs may have utility as chemopreventive agents and should be evaluated in clinical trials in PCa patients with early or precancerous disease.

**Vie di segnale molecolari che mediano gli effetti anti-infiammatori del calcitriolo: implicazioni per il trattamento e la chemio prevenzione nel cancro prostatico.**

Calcitriolo, la forma ormonale attiva della vitamina D, esercita di più anti-proliferativo e pro-differenziare le azioni, tra cui l'arresto del ciclo cellulare e induzione di apoptosi in molte cellule maligne, e l'ormone è in corso di valutazione in studi clinici come agente anti-cancro. Una recente ricerca rivela che il calcitriolo presenta anche molteplici effetti anti-infiammatori. In primo luogo, calcitriolo inibisce la sintesi e le azioni biologiche delle prostaglandine pro-infiammatorie (PG) da tre meccanismi: i) la soppressione della espressione della cicloossigenasi-2, l'enzima che sintetizza PG, ii) la up-regolazione dell'espressione di 15-hydroxyprostaglandin deidrogenasi, l'enzima che inattiva PG, e iii) down-regolazione dell'espressione di recettori PG che sono essenziali per PG segnalazione. La combinazione dei risultati anti-infiammatori non steroidei calcitriolo e droga in un sinergico inibizione della crescita del tumore della prostata (PCa), le cellule e offre una potenziale

strategia terapeutica per PCa. In secondo luogo, calcitriolo aumenta l'espressione di fosfatasi della proteina chinasi mitogeno-attivata 5 in cellule della prostata con conseguente inibizione conseguente stress chinasi p38 segnalazione e l'attenuazione della produzione di citochine pro-infiammatorie. In terzo luogo, calcitriolo esercita anche attività anti-infiammatoria in PCa attraverso l'inibizione del fattore nucleare-kB segnalazione che si traduce in potenti effetti anti-infiammatori e anti-angiogenici. Altri importanti effetti diretti di calcitriolo, nonché le conseguenze dei suoi effetti anti-infiammatori includono l'inibizione dell'angiogenesi tumorale, invasione e metastasi. Ipotizziamo che queste azioni anti-infiammatorie, in aggiunta agli altri ben noti effetti anti-cancro di calcitriolo, un ruolo importante nel suo uso potenziale come agente terapeutico per PCa. Calcitriolo o di suoi analoghi possono avere utilità come agenti chemiopreventivi e dovrebbero essere valutati in studi clinici in pazienti con malattia PCa precoce o pre-cancerose.

141: Amir E, Simmons CE, Freedman OC, Dranitsaris G, Cole DE, Vieth R, Ooi WS, Clemons M.

**A phase 2 trial exploring the effects of high-dose (10,000 IU/day) vitamin D(3) in breast cancer patients with bone metastases.**

Cancer. 2010 Jan15;116(2):284-91.

**BACKGROUND:** Vitamin D deficiency has potential roles in breast cancer etiology and progression. Vitamin D deficiency has also been associated with increased toxicity from bisphosphonate therapy. The optimal dose of vitamin D supplementation is unknown, but daily sunlight exposure can generate the equivalent of a 10,000-IU oral dose of vitamin D(3). This study therefore aimed to assess the effect of this dose of vitamin D(3) in patients with bone metastases from breast cancer.

**METHODS:** Patients with bone metastases treated with bisphosphonates were enrolled into this single-arm phase 2 study. Patients received 10,000 IU of vitamin D(3) and 1000 mg of calcium supplementation each day for 4 months. The effect of this treatment on palliation, bone resorption markers, calcium metabolism, and toxicity were evaluated at baseline and monthly thereafter.

**RESULTS:** Forty patients were enrolled. No significant changes in bone resorption markers were seen. Despite no change in global pain scales, there was a significant reduction in the number of sites of pain. A small but statistically significant increase in serum calcium was seen, as was a significant decrease in serum parathyroid hormone. Treatment unmasked 2 cases of primary hyperparathyroidism, but was not associated with direct toxicity.

**CONCLUSIONS:** Daily doses of 10,000 IU vitamin D(3) for 4 months appear safe in patients without comorbid conditions causing hypersensitivity to vitamin D. Treatment reduced inappropriately elevated parathyroid hormone levels, presumably caused by long-term bisphosphonate use. There did not appear to be a significant palliative benefit nor any significant change in bone resorption.

**Un trial di fase 2 che espone gli effetti di dosi alte di (10,000 IU/day) vitamina D(3) in pazienti con cancro al seno e con metastasi ossee.**

**BACKGROUND:** La carenza di vitamina D ha un ruolo potenziale nella eziologia del cancro al seno e la progressione. La carenza di vitamina D è stata anche associata ad un aumento della tossicità della terapia con bifosfonati. La dose ottimale di vitamina D è sconosciuta, ma l'esposizione alla luce solare in grado di generare ogni giorno l'equivalente di una dose di 10.000 UI di vitamina D per via orale (3). Questo studio ha quindi lo scopo di valutare l'effetto di questa dose di vitamina D (3) in pazienti con metastasi ossee da carcinoma della mammella.

**METODI:** I pazienti con metastasi ossee trattati con bisfosfonati sono stati arruolati in questo braccio singolo, di fase 2 dello studio. I pazienti hanno ricevuto 10.000 UI di vitamina D (3) e 1000 mg di supplementazione di calcio ogni giorno per 4 mesi. L'effetto di questo trattamento palliativo, marcatori di riassorbimento osseo, sul metabolismo del calcio, e la tossicità sono stati valutati al basale e, successivamente, mensile.

**RISULTATI:** Quaranta pazienti sono stati arruolati. Nessun cambiamento significativo nei marker di riassorbimento osseo sono state osservate. Nonostante alcun cambiamento nella scala del dolore a livello mondiale, c'è stata una significativa riduzione del numero di siti di dolore. Un aumento modesto ma statisticamente significativo della calcemia è stato visto, come è stato una diminuzione significativa di ormone paratiroideo siero. Trattamento smascherato 2 casi di iperparatiroidismo primario, ma non è stato associato a tossicità diretta.

**CONCLUSIONI:** Dosi giornaliere di 10.000 UI di vitamina D (3) per 4 mesi apparire sicuro in pazienti senza comorbidità causare ipersensibilità alla vitamina D. Il trattamento ridotto inappropriatamente elevati livelli di ormone paratiroideo, presumibilmente causata da uso prolungato di bifosfonati. Ci non sembra essere un beneficio significativo palliativo né alcun cambiamento significativo nel riassorbimento osseo.

142: Gonzalez-Pardo V, Martin D, Gutkind JS, Verstuyf A, Bouillon R, de Boland AR, Boland RL.

**1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 and its TX527 analog inhibit the growth of endothelial cells transformed by Kaposi sarcoma-associated herpes virus G protein-coupled receptor in vitro and in vivo.**

Endocrinology. 2010Jan;151(1):23-31.

The Kaposi sarcoma-associated herpes virus-G protein-coupled receptor is a key molecule in the pathogenesis of Kaposi sarcoma, playing a central role in promoting vascular endothelial growth factor-driven angiogenesis and spindle cell proliferation. We studied the effects of 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D(3) [1 alpha,25(OH)(2)D(3)] and the analog TX527 on the proliferation of endothelial cells (SVECs) and SVECs transformed by the viral G protein-coupled receptor (SVEC-vGPCR). 1 alpha,25(OH)(2)D(3) and TX527 decreased SVEC-vGPCR and SVEC numbers, the response being time dependent and similar in both cell lines. Vitamin D receptor (VDR) levels increased on treatment with 10 nm 1 alpha,25(OH)(2)D(3) or 1 nm TX527 in a time-dependent manner (1.5-24 h) in SVECs and SVEC-vGPCR. Basal VDR levels were increased in SVEC-vGPCR. The antiproliferative effects were accompanied by reduction in cyclin D1 and accumulation of p27 in SVECs but not SVEC-vGPCR. Induction of VDR was blocked by transfection of short hairpin RNA against VDR in SVEC-vGPCR and the antiproliferative effects of 1 alpha,25(OH)(2)D(3) and TX527 were decreased, involving the VDR genomic pathway in the hormone and analog mechanism of action. In vivo experiments showed that 1 alpha,25(OH)(2)D(3) and TX527 decreased SVEC-vGPCR tumor progression when the tumor cells were implanted in nude mice. In conclusion, we have demonstrated that 1 alpha,25(OH)(2)D(3) and its TX527 analog have antiproliferative effects on the growth of endothelial cells transformed by the vGPCR in vitro and in vivo, the vitamin D receptor being part of the inhibitory mechanism of action.

**1alfa,25-diidrossivitamina D3 e il suo anaologo TX527 inibisce la crescita delle cellule endoteliali trasformate dal Kaposi sarcoma associato al recettore accoppiato a proteina G dell'herpes virus in vitro e in vivo.**

L'herpes Kaposi sarcoma-collegato del virus-G accoppiati alle proteine del recettore è una molecola chiave nella patogenesi del sarcoma di Kaposi, giocando un ruolo centrale nel promuovere l'angiogenesi vascolare Endothelial Growth Factor-driven e la proliferazione delle cellule dell'alberino. Abbiamo studiato gli effetti della 1 alfa ,25-diidrossivitamina D (3) [1 alfa, 25 (OH)

(2) D (3)] e il TX527 analogico sulla proliferazione delle cellule endoteliali (SVECs) e SVECs trasformato dal virale proteina G-recettori accoppiati (Svec-vGPCR). 1 alfa, 25 (OH) (2) D (3) e TX527 è diminuito Svec-vGPCR Svec e numeri, il tempo di risposta di essere dipendente e simile nei due linee cellulari. Recettore della vitamina D (VDR) aumento dei livelli in trattamento con 10 nm 1 alfa, 25 (OH) (2) D (3) o 1 nm TX527 in maniera tempo-dipendente (1,5-24 h) in SVECs e Svec-vGPCR. I livelli basali di VDR sono state aumentate in Svec-vGPCR. Gli effetti antiproliferativi sono stati accompagnati da riduzione della ciclina D1 e accumulo di p27 in SVECs ma non Svec-vGPCR. L'induzione di VDR è stato bloccato dalla trasfezione di RNA hairpin breve contro VDR in Svec-vGPCR e gli effetti antiproliferativi della 1 alfa, 25 (OH) (2) D (3) e TX527 erano diminuite, coinvolgendo il percorso genomica VDR in ormonale e meccanismo analogico di azione. In vivo gli esperimenti hanno dimostrato che 1 alfa, 25 (OH) (2) D (3) e TX527 è diminuito Svec-vGPCR progressione del tumore, quando le cellule del tumore sono state impiantate in topi nudi. In conclusione, abbiamo dimostrato che 1 alfa, 25 (OH) (2) D (3) e la sua TX527 analogico avere effetti antiproliferativi sulla crescita di cellule endoteliali trasformato dal vGPCR in vitro e in vivo, il recettore della vitamina D di essere parte del meccanismo inibitorio di azione.

143: Krishnan AV, Swami S, Peng L, Wang J, Moreno J, Feldman D.

### **Tissue-selective regulation of aromatase expression by calcitriol: implications for breast cancer therapy.**

Endocrinology. 2010 Jan;151(1):32-42.

Aromatase, the enzyme that catalyzes estrogen synthesis, is critical for the progression of estrogen receptor-positive breast cancer (BCa) in postmenopausal women. We show that calcitriol, the hormonally active form of vitamin D, regulates the expression of aromatase in a tissue-selective manner. Calcitriol significantly decreased aromatase expression in human BCa cells and adipocytes and caused substantial increases in human osteosarcoma cells (a bone cell model exhibiting osteoblast phenotype in culture) and modest increases in ovarian cancer cells. Calcitriol administration to immunocompromised mice bearing human BCa xenografts decreased aromatase mRNA levels in the tumors and the surrounding mammary adipose tissue but did not alter ovarian aromatase expression. In BCa cells, calcitriol also reduced the levels of prostaglandins (PGs), major stimulators of aromatase transcription, by suppressing the expression of cyclooxygenase-2 (which catalyzes PG synthesis) and increasing that of 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase (which catalyzes PG degradation). The mechanism of aromatase down-regulation by calcitriol in BCa cells is therefore 2-fold: a direct repression of aromatase transcription via promoter II through the vitamin D-response elements identified in this promoter and an indirect suppression by reducing the levels of PGs. Combinations of calcitriol with three different aromatase inhibitors (AIs) caused enhanced inhibition of BCa cell growth. The combination of calcitriol and an AI may have potential benefits for BCa therapy. In addition to augmenting the ability of AIs to inhibit BCa growth, calcitriol acting as a selective aromatase modulator that increases aromatase expression in bone would reduce the estrogen deprivation in bone caused by the AIs, thus ameliorating the AI-induced side effect of osteoporosis.

### **Regolazione selettiva tissutale dell'espressione dell'aromatasi tramite il calcitriolo: implicazioni nella terapia del cancro al seno.**

Aromatasi, l'enzima che catalizza la sintesi degli estrogeni, è fondamentale per la progressione del tumore della mammella positivo per il recettore dell'estrogeno (BCA) nelle donne in postmenopausa. Abbiamo dimostrato che il calcitriolo, la forma ormonale attiva della vitamina D, regola l'espressione di aromatasi in maniera tessuto-selettivo. Calcitriol significativamente diminuita espressione dell'aromatasi nelle cellule umane BCA e adipociti e ha causato un

sostanziale aumento in cellule di osteosarcoma umano (un modello di cellule ossee espositrici fenotipo di osteoblasti in coltura) e modesti incrementi nelle cellule di carcinoma ovarico. somministrazione di calcitriolo topi immunocompromessi tollerano gli eterotrapianti umani Bca diminuito aromatasi livelli di mRNA nei tumori e la circostante tessuto adiposo mammario, ma non alterare l'espressione ovarica aromatasi. Nelle cellule BCA, calcitriolo ha inoltre ridotto i livelli di prostaglandine (PG), importanti stimolatori della trascrizione aromatasi, sopprimendo l'espressione della cicloossigenasi-2 (che catalizza la sintesi PG) e aumentando quella dei 15-hydroxyprostaglandin deidrogenasi (che catalizza la degradazione PG). Il meccanismo di aromatasi down-regulation con calcitriolo in cellule BCA è quindi due volte: una repressione diretta di trascrizione aromatasi via promotore II attraverso gli elementi di vitamina D-risposta individuate nel presente e promotore di una soppressione indiretta, riducendo i livelli di PG. Combinazioni di calcitriolo, con tre differenti inibitori dell'aromatasi (IA) ha causato una maggiore inibizione della crescita cellulare BCA. La combinazione di calcitriolo e una IA può avere benefici potenziali per la terapia BCA. Oltre ad aumentare la capacità del sistema AIS di inibire la crescita BCA, calcitriolo agisce come un modulatore selettivo dell'aromatasi che aumenta l'espressione dell'aromatasi nelle ossa ridurrebbe la privazione di estrogeni nel tessuto osseo causata dalla AIS, quindi alleviare i effetto collaterale AI indotto di osteoporosi.

144: Bolland MJ, Bacon CJ, Horne AM, Mason BH, Ames RW, Wang TK, Grey AB, Gamble GD, Reid IR.

#### **Vitamin D insufficiency and health outcomes over 5 y in older women.**

Am J Clin Nutr. 2010 Jan;91(1):82-9.

**BACKGROUND:** Vitamin D insufficiency was shown to be associated with adverse musculoskeletal and nonskeletal outcomes in numerous observational studies. However, some studies did not control for confounding factors such as age or seasonal variation of 25-hydroxyvitamin D [25(OH)D].

**OBJECTIVE:** We sought to determine the effect of vitamin D status on health outcomes.

**DESIGN:** Healthy community-dwelling women (n = 1471) with a mean age of 74 y were followed in a 5-y trial of calcium supplementation. 25(OH)D was measured at baseline in all women. Skeletal and nonskeletal outcomes were evaluated according to seasonally adjusted vitamin D status at baseline.

**RESULTS:** Fifty percent of women had a seasonally adjusted 25(OH)D concentration <50 nmol/L. These women were significantly older, heavier, and less physically active and had more comorbidities than women with a seasonally adjusted 25(OH)D concentration > or =50 nmol/L. Women with a seasonally adjusted 25(OH)D concentration <50 nmol/L had an increased incidence of stroke and cardiovascular events that did not persist after adjustment for between-group differences in age or comorbidities. Women with a seasonally adjusted 25(OH)D concentration <50 nmol/L were not at increased risk of adverse consequences for any musculoskeletal outcome, including fracture, falls, bone density, or grip strength or any nonskeletal outcomes, including death, myocardial infarction, cancer, heart failure, diabetes, or adverse changes in blood pressure, weight, body composition, cholesterol, or glucose.

**CONCLUSIONS:** Vitamin D insufficiency is more common in older, frailer women. Community-dwelling older women with a seasonally adjusted 25(OH)D concentration <50 nmol/L were not at risk of adverse outcomes over 5 y after control for comorbidities. Randomized placebo-controlled trials are needed to determine whether vitamin D supplementation in individuals with vitamin D insufficiency influences health outcomes. This trial was registered at [www.anzctr.org.au](http://www.anzctr.org.au) as ACTRN 012605000242628.

#### **Carenza di vitamina D e risultati a 5 anni sulla salute di donne anziane**

**BACKGROUND:** L'insufficienza di vitamina D è risultata essere associata a esiti avversi muscoloscheletrici e nonskeletal in numerosi studi osservazionali. Tuttavia, alcuni studi non hanno il controllo per fattori confondenti come l'età o le variazioni stagionali di 25-idrossivitamina D [25 (OH) D].

**OBIETTIVO:** Abbiamo cercato di determinare l'effetto della vitamina D sui risultati di salute.

**DESIGN:** donne sane in comunità alloggio (n = 1471) con un'età media di 74 y sono stati seguiti in uno studio 5-y della supplementazione di calcio. 25 (OH) D è stata misurata al basale in tutte le donne. Scheletrico e nonskeletal risultati sono stati valutati in base allo stato della vitamina D destagionalizzato al basale.

**RISULTATI:** Il cinquanta per cento delle donne ha avuto un destagionalizzato 25 (OH) D concentrazione <50 nmol / L. Queste donne erano significativamente più anziani, più pesanti e meno fisicamente attivi e avevano più comorbidità di donne con un destagionalizzato di 25 (OH) > concentrazione D o = 50 nmol / L. Le donne con una destagionalizzato 25 (OH) D concentrazione <50 nmol / L hanno presentato un'aumentata incidenza di eventi cardiovascolari e di ictus che non persiste dopo l'aggiustamento per le differenze tra i gruppi di età o comorbidità. Le donne con una destagionalizzato 25 (OH) D concentrazione <50 nmol / L non erano ad aumentato rischio di conseguenze negative per qualsiasi risultato muscoloscheletrico, tra cui fratture, cadute, la densità ossea, o la forza di presa o di qualsiasi nonskeletal risultati, compresa la morte, infarto miocardico, cancro, infarto, diabete, o cambiamenti sfavorevoli della pressione arteriosa, peso, composizione corporea, colesterolo, o glucosio.

**CONCLUSIONI:** L'insufficienza di vitamina D è più comune negli anziani, le donne fragile. donne anziane residenti in comunità con un destagionalizzato 25 (OH) D concentrazione <50 nmol / L non erano a rischio di esiti avversi oltre 5 y dopo il controllo per le comorbidità. Studi clinici randomizzati controllati con placebo sono necessari per determinare se la supplementazione di vitamina D in persone con insufficienza di vitamina D influenza risultati di salute. Questo studio è stato registrato presso [www.anzctr.org.au](http://www.anzctr.org.au) come ACTRN 012.605.000.242.628.

145: Clifford RL, Knox AJ.

**Vitamina D – un nuovo trattamento per il rimodellamento delle vie aeree nell'asma?**

Br J Pharmacol. 2009 Nov;158(6):1426-8.

Increased airway smooth muscle (ASM) mass plays a critical role in chronic asthmatic airway remodelling. ASM cell hypertrophy and hyperplasia are likely to contribute to increased ASM mass and a variety of mitogens induce ASM proliferation in cell culture. Recent recognition of widespread vitamin D deficiency and identification of the vitamin D receptor on many cells has implicated vitamin D as a potential therapeutic target for many disorders including cancer, infection and asthma. In this issue of British Journal of Pharmacology, Damera et al. show that calcitriol, a secosteroidal modulator of vitamin D receptors, inhibited thrombin and platelet-derived growth factor-induced ASM cell proliferation. They also, perhaps surprisingly, show the glucocorticoid dexamethasone to potentiate mitogen-induced ASM proliferation. Their results begin to elucidate the molecular mechanism(s) utilized by calcitriol to inhibit cell proliferation and suggest hyperphosphorylation of retinoblastoma protein and activation of checkpoint kinase 1 (Chk1) as critical to this process. This study identifies inhibition of ASM proliferation as a cellular effect of vitamin D and supports the hypothesis that vitamin D is a potential treatment for airway remodelling in asthma.

146: Gocek E, Kielbiński M, Bauraska H, Haus O, Kutner A, Marcinkowska E.

**Different susceptibilities to 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-induced differentiation of AML cells carrying various mutations.**

Leuk Res. 2010 May;34(5):649-57.

This study was designed to compare the differentiation-inducing potential of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> (1,25D) with some analogs (VDAs) in a panel of acute myeloid leukemia (AML) cell lines and in blast cells isolated from patients with AML. Of the cell lines studied, HL60 proved to be the most sensitive to each of the differentiation-inducing agents when compared to THP-1, NB-4 and U-937 cell lines. Three of the VDAs tested (PRI-1906, PRI-2191 and PRI-2201) were similarly effective as 1,25D in all the cell lines tested. However, blast cells from AML showed a varying sensitivity towards 1,25D. For example, blast cells isolated from patients in which the whole or part of chromosome 7 was deleted were extremely sensitive to 1,25D and its analogs. In contrast, 1,25D failed to increase the expression of differentiation markers in blast cells isolated from patients carrying activating mutations in Flt3 gene. Since, the expression of vitamin D receptor (VDR) in cells with Flt3 mutations was increased to the same extent as in other AML cells this suggests that failure of these cells to differentiate lies downstream of the receptor. That blast cells with different cytogenetic abnormalities have dissimilar responses to 1,25D and its analogs, may have

implications in the use of 1,25D as a 'differentiation therapy' for myeloid leukemias. The analog PRI-2191 (tacalcitol) was found to be the most potent in inducing patient's cells differentiation.

**Suscettibilità differenti alla differenziazione indotta da 1,25-diidrossivitamina D3 delle cellule AML che hanno diverse mutazioni.**

Questo studio è stato disegnato per confrontare il potenziale di differenziazione di induzione di 1,25-diidrossivitamina D (3) (1,25 D) con alcuni analoghi (VDAs) in un pannello di leucemia mieloide acuta (AML), linee cellulari e in cellule isolate da scoppio i pazienti con leucemia mieloide acuta. Delle linee cellulari studiati, HL60 dimostrato di essere i più sensibili a ciascuno degli agenti che inducono la differenziazione rispetto al THP-1, NB-4 e linee-U 937 cellule. Tre dei VDAs testati (PRI-1906, PRI-2191 e PRI-2201) sono stati altrettanto efficaci, come 1,25 D in tutte le linee cellulari testate. Tuttavia, le cellule di scoppio da leucemia mieloide acuta ha mostrato una diversa sensibilità verso 1,25 D. Ad esempio, le cellule di scoppio isolato da pazienti in cui la totalità o parte del cromosoma 7 è stato eliminato erano estremamente sensibili alle 1,25 D e suoi analoghi. Al contrario, 1,25 D riuscita ad aumentare l'espressione di marcatori di differenziazione in cellule isolate da scoppio pazienti portatori di mutazioni attivanti nel gene FLT3. Dal momento che, l'espressione del recettore della vitamina D (VDR) in cellule con mutazioni FLT3 è stata aumentata nella stessa misura come in altre cellule AML questo suggerisce che il fallimento di queste cellule a differenziarsi si trova a valle del recettore. Che le cellule di scoppio con diverse anomalie citogenetiche hanno risposte diverse a 1,25 D e suoi analoghi, può avere implicazioni nell'uso di 1,25 D come 'terapia di differenziazione' per leucemie mieloidi. L'analogico PRI-2191 (tacalcitolo) è risultato essere il più potente nell'indurre la differenziazione delle cellule del paziente.

147: Zhang J, Harrison JS, Uskokovic M, Danilenko M, Studzinski GP.

**Silibinin can induce differentiation as well as enhance vitamin D3-induced differentiation of human AML cells ex vivo and regulates the levels of differentiation-related transcription factors.**

Hematol Oncol. 2010 Sep;28(3):124-32.

Induction of terminal differentiation is a conceptually attractive approach for the therapy of neoplastic diseases. Although vitamin D derivatives (deltanoids) can induce differentiation of AML cells in vitro, so far deltanoids have not been successfully brought to the clinic, due to the likelihood of life-threatening hypercalcemia. Here, we incubated freshly obtained blood cells from patients with AML with a plant antioxidant (PAOx), silibinin (SIL), alone or together with a deltanoid. Twenty patients with AML (all subtypes except M3) were available for this study, and in 14 (70%), SIL (60  $\mu$ M) either induced differentiation ex vivo, or enhanced differentiation induced by deltanoids, or both. Interestingly, SIL acting alone induced differentiation only in cases in which chromosome aberrations could not be detected. In eleven samples sufficient material was available for a limited analysis of the underlying events. Quantitative RT-PCR showed that differentiation markers were upregulated at the mRNA level by both SIL and deltanoids, suggesting that intracellular signaling pathways upstream of transcription factors (TFs) were activated by these agents. Western analysis for proteins which function as TFs in deltanoid-induced monocytic differentiation, such as members of Jun and C/EBP families, surprisingly demonstrated that SIL upregulated all these TFs in the cases tested. This suggests that although the presence of SIL may not always be sufficient to induce differentiation, it can serve as a differentiation enabling factor for blasts obtained from a large proportion of patients with AML. Thus, SIL/deltanoid combinations warrant further consideration as preventive/therapeutic regimens in human leukaemia.

**Silibinina può indurre differenziazione e aumentare la differenziazione indotta dalla vitamina D3 nelle cellule AML ex vivo e regola i livelli di differenziazione collegata ai fattori di trascrizione**

L'induzione del differenziamento terminale è un approccio concettualmente interessante per la terapia delle malattie neoplastiche. Anche se i derivati della vitamina D (deltanoidi) può indurre la differenziazione delle cellule di leucemia mieloide acuta in vitro, finora deltanoidi non sono stati correttamente portati alla clinica, a causa del rischio di ipercalcemia pericolo di vita. Qui, abbiamo incubato le cellule del sangue fresco ottenuto da pazienti con leucemia mieloide acuta con un antiossidante delle piante (PAOx), silibinin (SIL), da soli o insieme ad un deltanoid. Venti pazienti con leucemia mieloide acuta (ad eccezione di tutti i sottotipi M3) erano disponibili per questo studio, e in 14 (70%), SIL (60 microM) o indotta differenziazione ex vivo, o indotti da una maggiore differenziazione deltanoidi, o entrambi. È interessante notare che, da soli SIL indotto

differenziazione solo nei casi in cui aberrazioni cromosomiche non possono essere rilevati. In campioni di materiale undici erano sufficienti per un'analisi limitata degli eventi di riferimento. RT-PCR quantitativa hanno dimostrato che i marcatori sono stati upregulated differenziazione a livello di mRNA sia da SIL e deltanoidi, suggerendo che vie di segnalazione intracellulare a monte dei fattori di trascrizione (FT) sono stati attivati da questi agenti. analisi Western per proteine con funzione di FT in deltanoid indotto differenziazione monocitaria, come i membri di Jun e C / EBP famiglie, a sorpresa ha dimostrato che la SIL upregulated tutti questi TFs nei casi testati. Questo suggerisce che, sebbene la presenza di SIL può non essere sempre sufficiente a indurre la differenziazione, può servire come un fattore di differenziazione che consenta di blasti ottenuti da una grande proporzione di pazienti con leucemia mieloide acuta. Così, SIL / combinazioni deltanoid meritano una riflessione ulteriore, come prevenzione / regimi terapeutici nella leucemia umana.

148: Costa JL, Eijk PP, van de Wiel MA, ten Berge D, Schmitt F, Narvaez CJ, Welsh J, Ylstra B.

**Anti-proliferative action of vitamin D in MCF7 is still active aftersiRNA-VDR knock-down.**  
BMC Genomics. 2009 Oct 28;10:499.

**BACKGROUND:** The active form of Vitamin D, 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> (1,25D), has strong anti-proliferative effects, yet the molecular mechanisms underneath this effect remain unclear. In contrast, the molecular mechanism of 1,25D for the regulation of calcium homeostasis has principally been resolved, demonstrating a pivotal role for the vitamin D receptor (VDR).

**RESULTS:** We first addressed the question whether the anti-proliferative effects of 1,25D are influenced by VDR. Knockdown of VDR by siRNA did not affect the anti-proliferative effects of 1,25D in MCF7 breast cancer cells. This unanticipated finding led us to take an alternative approach using genome wide screens to study the molecular mechanisms of 1,25D in proliferation. For that purpose, four independently developed and stable 1,25D resistant MCF7 cell lines were analyzed. Array CGH identified a copy number alteration in a region of 13.5 Mb at chromosome 11q13.4-14.1 common to all four 1,25D resistant cell lines. Expression arrays revealed that no single gene was differentially expressed between the sensitive and resistant cells, but multiple membrane receptor signaling pathways were altered in the 1,25D resistant cell lines. Importantly, in the genome wide experiments neither VDR, CYP24A1 nor other known vitamin D signaling pathway genes were associated with 1,25D resistance.

**CONCLUSION:** In conclusion, siRNA and genome wide studies both suggest that the anti-proliferative effects of 1,25D in MCF7 breast tumor cell lines do not rely on classical Vitamin D pathway per se.

**Azione anti-proliferativa della vitamina D nelle cellule MCF7 è ancora attiva dopo siRNA-VDR knock-down.**

**BACKGROUND:** La forma attiva della vitamina D, 1,25-diidrossivitamina D<sub>3</sub> (1,25 D), ha forti effetti anti-proliferativa, ma i meccanismi molecolari sottostanti questo effetto rimangono poco chiari. Al contrario, il meccanismo molecolare di 1,25 D per la regolazione dell'omeostasi del calcio è principalmente stato risolto, dimostrando un ruolo centrale per il recettore della vitamina D (VDR).

**RISULTATI:** In primo luogo abbiamo affrontato la questione se gli effetti anti-proliferativo di 1,25 D sono influenzati da VDR. Colpo di VDR da siRNA non ha influenzato gli effetti anti-proliferativo di 1,25 D nelle cellule di cancro al seno MCF7. Questo risultato imprevisto ci ha portato ad adottare un approccio alternativo utilizzando genoma schermi di grandi dimensioni per

studiare i meccanismi molecolari di 1,25 D in proliferazione. A tal fine, quattro in modo indipendente sviluppato e stabile 1,25 D resistente MCF7 linee cellulari sono stati analizzati. CGH Array individuato una alterazione del numero di copie in una regione di 13,5 Mb sul cromosoma 11q13.4-14,1 comuni a tutte e quattro le linee di cellule 1,25 D resistente. Espressione matrici rivelato che non solo gene è stato differenzialmente espressi tra le cellule sensibili e resistenti, ma diverse vie di segnalazione dei recettori di membrana sono stati modificati nella 1,25 linee cellulari D resistente. È importante sottolineare che, negli esperimenti genoma largo né VDR, CYP24A1 né altri geni noti vitamina D pathway di segnalazione sono stati associati a 1,25 resistenza D. CONCLUSIONE: In conclusione, siRNA e genoma ampi studi suggeriscono che gli effetti anti-proliferativo di 1,25 D in MCF7 linee di cellule tumorali del seno non si basano sul classico percorso di vitamina D per sé.

149: Fedirko V, Bostick RM, Flanders WD, Long Q, Sidelnikov E, Shaukat A, Daniel CR, Rutherford RE, Woodard JJ.

### **Effects of vitamin d and calcium on proliferation and differentiation in normal colon mucosa: a randomized clinical trial.**

CancerEpidemiol Biomarkers Prev. 2009 Nov;18(11):2933-41.

To investigate the potential efficacy of calcium and vitamin D in reducing risk for colorectal neoplasms and to develop "treatable" phenotypic biomarkers of risk for colorectal neoplasms, we conducted a pilot, randomized, double-blind, placebo-controlled, 2 x 2 factorial clinical trial to test the effects of these agents on cell cycle markers in the normal colorectal mucosa. Ninety-two men and women with at least one pathology-confirmed colorectal adenoma were treated with 2 g/day calcium and/or 800 IU/day vitamin D(3) versus placebo over 6 months. Overall expression and distributions of p21(waf1/cip1) (marker of differentiation), MIB-1 (marker of short-term proliferation), and hTERT (marker of long-term proliferation) in colorectal crypts in the normal-appearing rectal mucosa were detected by automated immunohistochemistry and quantified by image analysis. In the calcium, vitamin D, and calcium plus vitamin D groups relative to the placebo, p21 expression increased by 201% (P = 0.03), 242% (P = 0.005), and 25% (P = 0.47), respectively, along the full lengths of colorectal crypts after 6 months of treatment. There were no statistically significant changes in the expression of either MIB-1 or hTERT in the crypts overall; however, the proportion of hTERT, but not MIB-1, expression that extended into the upper 40% of the crypts was reduced by 15% (P = 0.02) in the vitamin D plus calcium group relative to the placebo. These results indicate that calcium and vitamin D promote colorectal epithelial cell differentiation and may "normalize" the colorectal crypt proliferative zone in sporadic adenoma patients, and support further investigation of calcium and vitamin D as chemopreventive agents against colorectal neoplasms.

### **Effetti della vitamina d e calcio sulla proliferazione e differenziazione nella mucosa normale del colon: un trial clinico randomizzato.**

Per studiare la potenziale efficacia di calcio e vitamina D nel ridurre il rischio per le neoplasie del colon-retto e di sviluppare "trattabile" biomarkers fenotipica di rischio per le neoplasie del colon-retto, abbiamo condotto un pilota, randomizzato, in doppio cieco, controllato con placebo, 2 x 2 cliniche fattoriale prova per testare gli effetti di questi agenti sui marcatori del ciclo cellulare nella mucosa normale del colon-retto. Ninety-two uomini e le donne con almeno una patologia ha confermato adenoma del colon-retto sono stati trattati con 2 g / giorno di calcio e / o 800 UI / die di vitamina D (3) rispetto al placebo nell'arco di 6 mesi. espressione complessiva e le distribuzioni di p21 (waf1/cip1) (marker di differenziazione), MIB-1 (marcatore di proliferazione a breve termine),

e hTERT (marker di proliferazione di lunga durata) nelle cripte del colon-retto nella mucosa di aspetto normale rettale sono stati rilevati da immunocistochimica automatizzata e quantificati mediante analisi dell'immagine. Nel calcio, vitamina D e calcio più vitamina D gruppi rispetto al placebo, p21 espressione è aumentata del 201% (P = 0,03), 242% (P = 0,005), e il 25% (P = 0,47), rispettivamente, lungo la lunghezza totale delle cripte del colon-retto dopo 6 mesi di trattamento. Non ci sono state variazioni statisticamente significative nell'espressione di una MIB-1 o hTERT nelle cripte generali, tuttavia, la proporzione di hTERT, ma non MIB-1, espressione che si estendeva nella parte superiore del 40% delle cripte è stata ridotta del 15% (P = 0.02) nel gruppo vitamina D più calcio rispetto al placebo. Questi risultati indicano che calcio e vitamina D promuovono la differenziazione delle cellule epiteliali del colon-retto e può "normalizzare" la zona del colon-retto nei pazienti cripta proliferativa adenoma sporadico, e il supporto di ulteriori indagini di calcio e vitamina D come agenti chemiopreventivi contro le neoplasie del colon-retto.

150: Bieniasz M, Kwiatkowski A, Domagała P, Gozdowska J, Kieszek R, Ostrowski K, Deptuła A, Durlik M, Paczek L, Chmura A.

**Serum concentration of vitamin D and parathyroid hormone after living kidney donation.** Transplant Proc. 2009Oct;41(8):3067-8.

**BACKGROUND:** Metabolic consequences resulting from loss of renal mass in living kidney donors remain uncertain. There is recent focus on the changes in the active form of vitamin D because it is an agent for cancer regulation. The objective of the study was to measure serum concentrations of 1,25-dihydroxycholecalciferol, parathyroid hormone and insulin-like growth factor-1 (IGF-1) in living donors after kidney donation.

**PATIENTS AND METHODS:** Forty living kidney donors reported for follow-up visits. Their mean age was 46.14 years. They were women in 52.5% of cases. The mean observation period was 65.6 months. Serum 1,25(OH)2D3 and IGF-1 concentrations were measured by radioimmunoassay after extraction. Serum intact parathyroid hormone (PTH) was quantified using an enhanced chemiluminescence immunoassay system.

**RESULTS:** 1,25-dihydroxycholecalciferol deficiency in 57.5% patients after nephrectomy was the most important change we noted. No correlation was observed between 1,25(OH)2D3 and PTH. A decreased serum IGF-1 concentration was observed in 17.5% of donors. However, decreases in both serum IGF-1 and 1,25(OH)2D3 concentrations were observed in 12.5% of donors.

**CONCLUSION:** Prospective studies may be essential to determine metabolic changes after nephrectomy among living kidney donors.

**Concentrazioni sieriche della vitamina D e dell'ormone paratiroideo dopo la donazione di rene.**

**BACKGROUND:** conseguenze metaboliche derivanti da perdita di massa renale in donatori viventi di rene rimane incerto. C'è recente attenzione sui cambiamenti nella forma attiva della vitamina D, perché è un agente per la regolazione del cancro. L'obiettivo dello studio è stato quello di misurare le concentrazioni sieriche di 1,25-diidrossicolecalciferolo, ormone paratiroideo e insulin-like growth factor-1 (IGF-1) in donatori viventi dopo la donazione del rene.

**PAZIENTI E METODI:** Forty donatori di rene viventi segnalati per visite di follow-up. La loro età media era di 46,14 anni. Erano le donne a 52,5% dei casi. Il periodo di osservazione medio è stato 65,6 mesi. Siero di 1,25 (OH) 2D3 e le concentrazioni di IGF-1 sono state misurate con metodo radioimmunologico dopo l'estrazione. Paratormone sierico intatto (PTH) è stata quantificata con un migliorato sistema immunologico chemiluminescenza.

**RISULTATI:** deficit di 1,25-diidrossicolecalciferolo nel 57,5% dei pazienti dopo nefrectomia è

stato il cambiamento più importante che abbiamo notato. Nessuna correlazione è stata osservata tra 1,25 (OH) 2D3 e PTH. Un siero diminuita concentrazione di IGF-1 è stata osservata nel 17,5% dei donatori. Tuttavia, la diminuzione sia nel siero IGF-1 e 1,25 (OH) 2D3 concentrazioni sono state osservate nel 12,5% dei donatori.  
CONCLUSIONE: studi prospettici può essere essenziale per determinare i cambiamenti metabolici dopo nefrectomia tra i donatori di rene viventi.

155: Kelly JL, Friedberg JW, Calvi LM, van Wijngaarden E, Fisher SG.

**Vitamin D and non-Hodgkin lymphoma risk in adults: a review.**

Cancer Invest. 2009Nov;27(9):942-51.

Animal and human studies support a protective effect of vitamin D sufficiency related to malignancy by uncovering paracrine and autocrine effects of extra-renal 25-hydroxyvitamin D (25(OH)D) activation including regulation of cell cycle proliferation, apoptosis induction, and increased cell differentiation signaling. Recent epidemiologic studies demonstrate a reduction in non-Hodgkin lymphoma (NHL) risk with increased sunlight exposure. As sunlight is a major vitamin D source, it has been suggested that vitamin D status may mediate this observed association. This review provides a comprehensive discussion of the current epidemiologic evidence with regard to the investigation of an association between vitamin D status and NHL risk.

**Vitamina D e rischio di non-Hodgkin linfoma negli adulti: una review.**

Studi su animali e umani sostegno di un effetto protettivo della vitamina D sufficienza correlate a neoplasie maligne, scoprendo effetti paracrini e autocrino di extra-renale di 25-idrossivitamina D (25 (OH) D) attivazione compreso la regolazione della proliferazione del ciclo cellulare, apoptosi, e un aumento delle cellule differenziazione di segnalazione. Studi epidemiologici recenti dimostrano una riduzione linfoma non-Hodgkin (NHL) con rischio di esposizione alla luce solare aumentata. Come la luce del sole è un importante fonte di vitamina D, è stato suggerito che la vitamina D può mediare questa associazione osservata. Questa revisione fornisce una trattazione completa delle prove epidemiologiche attuali per quanto riguarda l'indagine di una associazione tra vitamina D e rischio di NHL.

156: Levendusky MC, Basle J, Chang S, Mandalaywala NV, Voigt JM, Dearborn RE Jr.

**Expression and regulation of vitamin D3 upregulated protein 1 (VDUP1) is conserved in mammalian and insect brain.**

J Comp Neurol. 2009 Dec10;517(5):581-600.

Originally characterized as a cell-cycle inhibitor induced by vitamin D(3), the tumor suppressor vitamin-D(3) upregulated protein 1 (VDUP1) has increasingly been shown to play major physiological roles in cell differentiation and glucose metabolism. Here we show evolutionarily conserved expression patterns of VDUP1 in *Drosophila* and rat nervous systems, including subcellular localization--cytoplasmic enrichment in neurons and nuclear expression in glia. These anatomical correlates suggested conservation of VDUP1 regulation, which was investigated both functionally and through promoter studies. Characterization of orthologous *vdup1* cis-regulatory regions identified evolutionarily conserved sequence blocks (CSBs) with similarities to neural enhancers, including basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factor Neurogenin/Math/atonal and Mash/achaete-scute family members. E-boxes (CANNTG), the binding sites for bHLH proteins, were associated with these CSBs as well, including E-boxes known to mediate glucose-dependent upregulation of VDUP1 in nonneuronal cells. Hyperglycemia-induced upregulation of VDUP1 was observed in brain tumor cells and in the *Drosophila* nervous system, which resulted in developmental arrest. Taken together, these data demonstrate evolutionary conservation of VDUP1 regulation and function, and suggest an expanding role for VDUP1 in nervous system development.

**Espressione e regolazione della proteina 1 (VDUP1) regolata positivamente dalla vitamina D3 che è conservata nel cervello di insetto e di mammifero**

Originariamente caratterizzato come un inibitore del ciclo cellulare indotta dalla vitamina D (3), il soppressore del tumore di vitamina D (3) proteine upregulated 1 (VDUP1) ha sempre dimostrato di giocare importanti ruoli fisiologici nel differenziamento cellulare e metabolismo del glucosio. Qui vi mostriamo evolutivamente conservato pattern di espressione di VDUP1 in *Drosophila* e nel ratto sistema nervoso, compresa la localizzazione subcellulare - arricchimento citoplasmatiche nei neuroni e di espressione nucleare in cellule gliali. Questi correlati anatomici suggerito conservazione del regolamento VDUP1, che è stato indagato sia funzionalmente e tramite studi promotore. Caratterizzazione di orthologous *vdup1* regioni cis-regolatori identificati evolutivamente conservati i blocchi di sequenza (CSBs), con analogie con stimolatori neurali, compresa l'elica-loop-elica (bHLH) fattore di trascrizione neurogenina / Math / familiari atonale e Mash / achaete-scute. E-box (CANNTG), i siti di legame per le proteine bHLH, sono stati associati con questi CSBs come pure, tra E-box noto per mediare upregulation glucosio-dipendente di VDUP1 nelle cellule nonneuronal. L'iperglicemia indotta sovraregolazione di VDUP1 è stata osservata nelle cellule tumorali del cervello e nel sistema nervoso della *Drosophila*, che ha provocato l'arresto dello

sviluppo. Presi insieme, questi dati dimostrano la conservazione evolutiva del regolamento VDUP1 e funzione, e suggeriscono un ruolo crescente per VDUP1 in SVILUPPO sistema nervoso

157: Selimoglu H, Duran C, Kiyici S, Ersoy C, Guclu M, Ozkaya G, Tuncel E, ErturkE, Imamoglu S.

**The effect of vitamin D replacement therapy on insulin resistance and androgen levels in women with polycystic ovary syndrome.**

J Endocrinol Invest.2010 Apr;33(4):234-8.

Insulin resistance (IR) is one of the common features of the polycystic ovary syndrome (PCOS), and recent studies indicate the possible role of vitamin D in the pathogenesis of IR and glucose metabolism. Aim of this study was aimed to determine the effect of vitamin D replacement therapy on glucose metabolism, insulin, and androgen levels in obese, insulin-resistant women with PCOS. Eleven women with PCOS were included in the study. Mean age of the patients was 23.6+/-5.7 yr, body mass index 33.9+/-5.1 kg/m(2). Six patients (54.5%) had acantosis nigricans and 10 (90.9%) oligoamenorrhea. The mean Ferriman Gallwey score was 14.1+/-4.6. Only 2 women were within the normal limits of vitamin D levels as >20 ng/ml. Three weeks after the administration of the single dose of 300,000 units of vitamin D3 orally, 25-hydroxyvitamin D3 significantly increased from 16.9+/-16 ng/ml to 37.1+/-14.6 ng/ml (p: 0.027) and only 2 women were detected to have vitamin D3 levels <20 ng/ml. Although glucose and insulin levels were decreased non-significantly, homeostasis model assessment (HOMA)-IR significantly decreased from 4.41+/-1.38 to 3.67+/-1.48 (p: 0.043). No significant alterations were witnessed at the levels of DHEAS, total and free testosterone, androstenedione. No correlation was found between vitamin D with HOMA and other hormonal parameters. In conclusion, women with PCOS have mostly insufficient vitamin D levels, and vitamin D replacement therapy may have a beneficial effect on IR in obese women with PCOS.

**L'effetto della vitamina D in sostituzione alla terapia sulla resistenza all'insulina e i livelli di androgeni nelle donne con la sindrome dell'ovaio policistico**

La resistenza all'insulina (IR) è una delle caratteristiche comuni della sindrome dell'ovaio policistico (PCOS), e studi recenti indicano il possibile ruolo della vitamina D nella patogenesi della IR e metabolismo del glucosio. Scopo di questo studio era volto a determinare l'effetto della terapia con vitamina D sostitutiva sul metabolismo del glucosio, insulina e livelli di androgeni in obese, donne insulino-resistenti con sindrome dell'ovaio policistico. Undici donne con sindrome dell'ovaio policistico sono stati inclusi nello studio. L'età media dei pazienti era di 23,6 + / -5,7 anni, l'indice di massa corporea 33,9 + / -5,1 kg / m (2). Sei pazienti (54,5%) hanno avuto nigricans acantosis e 10 (90,9%) oligoamenorrhea. La media punteggio Ferriman Gallwey era 14,1 + / -4,6. Solo 2 donne erano entro i limiti normali livelli di vitamina D come > 20 ng / ml. Tre settimane dopo la somministrazione della dose singola di 300.000 unità di vitamina D3 per os, 25-idrossivitamina D3 significativamente aumentata dal 16,9 + / -16 ng / ml a 37,1 + / -14,6 ng / (p: 0,027) e solo 2 ml di donne sono stati rilevati per avere livelli di vitamina D3 <20 ng / ml. Anche se

i livelli di glucosio e di insulina erano diminuite non significativamente, HOMA (HOMA)-IR significativamente diminuiti da 4,41 + / -1,38 a 3,67 + / -1,48 (p: 0,043). Alterazioni significative sono state testimoni ai livelli di DHEAS, testosterone totale e libero, androstenedione. Nessuna correlazione è stata trovata tra la vitamina D con HOMA e ad altri parametri ormonali. In conclusione, le donne con PCOS hanno per lo più insufficienti livelli di vitamina D e vitamina D terapia sostitutiva potrebbe avere un effetto benefico su IR in donne obese con sindrome dell'ovaio policistico.

158: Rucević I, Barisić-Drusko V, Glavas-Obrovac L, Stefanić M.

### **Vitamin D endocrine system and psoriasis vulgaris--review of the literature.**

ActaDermatovenerol Croat. 2009;17(3):187-92. Review. PubMed PMID: 19818218.

Vitamin D exerts its physiological functions on calcium and bone metabolism in humans through the active metabolite 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>(1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>). The other spectrum of vitamin D activities includes important effects on cellular proliferation, differentiation and the immune system. These effects are mediated through the intracellularly located vitamin D receptor (VDR). VDR is a member of the steroid, estrogen and retinoid receptor gene family of proteins that mediate transcriptional activities of the respective ligands. The VDR complex binds in the nucleus to the vitamin D responsive element on the gene. Several polymorphisms of the vitamin D receptor (VDR) gene have been described including FokI in exon 2, BsmI and ApaI in intron 8 and TaqI in exon 9. Alterations in vitamin D-1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> levels and polymorphisms of VDR gene have been shown to be associated with several malignant or autoimmune diseases such as sclerosis multiplex, breast cancer, diabetes mellitus, malignant melanoma, and psoriasis vulgaris. The effects of VDR gene polymorphisms including immunomodulation, stimulation of cellular differentiation and inhibition of proliferation make it a possible candidate for therapy of psoriasis as well as for the psoriasis gene modification. The objective of this article is to present the state-of-the-art in the VDR gene polymorphism research in psoriasis vulgaris.

### **Sistema endocrine della vitamina D e psoriasi vulgaris--review della letteratura.**

La vitamina D esercita le sue funzioni fisiologiche sul calcio e sul metabolismo osseo in esseri umani attraverso il metabolita attivo D<sub>3</sub> 1,25-diidrossivitamina (1,25 (OH) <sub>2</sub>D<sub>3</sub>). Lo spettro di altre attività della vitamina D include importanti effetti sulla proliferazione cellulare, differenziamento e il sistema immunitario. Questi effetti sono mediati attraverso il recettore della vitamina D si trova all'interno delle cellule (VDR). VDR è un membro di steroidi, gli estrogeni e retinoidi famiglia gene del recettore di proteine che mediano le attività trascrizionale dei rispettivi ligandi. La lega VDR complesso nel nucleo all'elemento vitamina D reattivo sul gene. Diversi polimorfismi del recettore della vitamina D (VDR) del gene sono state descritte anche FokI nell'esone 2, BSMI e APAI in introne 8 e TaqI nell'esone 9. Alterazioni della vitamina D-1, 25 (OH) <sub>2</sub>D<sub>3</sub> livelli e polimorfismi del gene VDR sono stati indicati per essere associati a diverse malattie maligne o autoimmuni come la sclerosi multipla, tumore al seno, diabete mellito, melanoma maligno, e psoriasi vulgaris. Gli effetti dei polimorfismi del gene VDR compresi immunomodolazione, la stimolazione della differenziazione cellulare e l'inibizione della proliferazione lo rendono un possibile candidato per la terapia della psoriasi così come per la modificazione genetica della psoriasi. L'obiettivo di questo articolo è quello di presentare lo stato dell'arte nella ricerca polimorfismo del gene VDR nella psoriasi vulgaris.

159: Hughes PJ, Marcinkowska E, Gocek E, Studzinski GP, Brown G.

**Vitamin D3-driven signals for myeloid cell differentiation--implications for differentiation therapy.**

Leuk Res. 2010 May;34(5):553-65. Epub 2009 Oct 6.

Primitive myeloid leukemic cell lines can be driven to differentiate to monocyte-like cells by 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D(3) (1,25(OH)(2)D(3)), and, therefore, 1,25(OH)(2)D(3) may be useful in differentiation therapy of myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes (MDS). Recent studies have provided important insights into the mechanism of 1,25(OH)(2)D(3)-stimulated differentiation. For myeloid progenitors to complete monocytic differentiation a complex network of intracellular signals has to be activated and/or inactivated in a precise temporal and spatial pattern. 1,25(OH)(2)D(3) achieves this change to the 'signaling landscape' by (i) direct genomic modulation of the level of expression of key regulators of cell signaling and differentiation pathways, and (ii) activation of intracellular signaling pathways. An improved understanding of the mode of action of 1,25(OH)(2)D(3) is facilitating the development of new therapeutic regimens.

**Segnali dati dalla vitamina D3 per la differenziazione cellulare mieloidi—implicazioni nella differenziazione della terapia**

Primitive linee di cellule leucemiche mieloidi può essere guidato a differenziare le cellule monocito-simile da 1 $\alpha$ ,25-diidrossivitamina D (3) (1,25 (OH) (2) D (3)), e, quindi, 1,25 (OH) (2) D (3) possono essere utili nella terapia di differenziazione di leucemia mieloidi e delle sindromi mielodisplastiche (MDS). Recenti studi hanno fornito indicazioni importanti nel meccanismo di 1,25 (OH) (2) D (3)-differenziazione stimolata. Per i progenitori mieloidi per completare la differenziazione monocitica una complessa rete di segnali intracellulari deve essere attivato e / o inattivato in un preciso schema temporale e spaziale. 1,25 (OH) (2) D (3) realizza questa modifica al 'paesaggio di segnalazione' da (i) modulazione diretta genomica del livello di espressione dei regolatori chiave della cella di segnalazione e di percorsi di differenziazione, e (ii) l'attivazione di vie di segnalazione. Una migliore comprensione delle modalità di azione di 1,25 (OH) (2) D (3) è facilitare lo sviluppo di nuovi regimi terapeutici.

160: Goldstein BD, Kurt RA.

**Dietary vitamin D3 restriction influences tumor growth, but not the ability to generate an antigen-specific immune response in OTII transgenic mice.**

Immunol Invest. 2009;38(5):365-82.

Initially, we wanted to know whether dietary vitamin D(3) restriction would influence growth and metastasis of the 4T1 murine mammary carcinoma. We confirmed serum 25(OH)D levels were modulated by dietary vitamin D(3) restriction, mice were healthy, and when challenged with the 4T1 tumor alterations in tumor growth, but not metastasis were evident. Tumors grew more rapidly in mice on the vitamin D(3) restricted diet. To delineate whether dietary vitamin D(3) restriction influenced the ability to generate an antigen-specific immune response we used OTII transgenic mice which express a T cell receptor specific for ovalbumin. We found that dietary vitamin D(3) restriction did not influence the health of OTII mice, the number of circulating CD3/CD4(+), CD3/CD8(+), CD4/CD25(+) T cells, nor the ability to generate CD11c(+) bone-marrow derived dendritic cells. T cells from OTII mice maintained on the vitamin D(3) restricted diet also exhibited no significant alterations in proliferative capacity or ability to secrete IFN-gamma or IL-4 in an antigen-specific manner. Yet, EL-4 tumors grew more rapidly in OTII mice on the vitamin D(3) restricted diet. These data show that dietary vitamin D(3) restriction impacts tumor growth, but not the ability to generate an antigen-specific immune response.

**Influenze di carenza di vitamina D3 sulla crescita tumorale, ma non nell'abilità di generare una risposta immunitaria antigene-specifica nei topi transgenici OTII.**

Inizialmente, volevamo sapere se nella dieta di vitamina D (3) limitazione dovrebbe influenzare la crescita e la metastasi del carcinoma mammario murino 4T1. Abbiamo confermato siero 25 (OH) livelli di D sono stati modulati dalla dieta di vitamina D (3) limitazione, i topi erano sani, e quando provocati con le alterazioni tumore 4T1 nella crescita del tumore, metastasi, ma non erano evidenti. I tumori sono cresciuti più rapidamente nei topi sulla vitamina D (3) dieta ristretta. Per delineare se nella dieta di vitamina D (3) restrizione influenzato la capacità di generare una risposta immunitaria antigene-specifici abbiamo utilizzato topi transgenici OTII che esprimono un recettore delle cellule T specifiche per l'ovoalbumina. Abbiamo scoperto che nella dieta di vitamina D (3) limitazione non ha influito sulla salute dei topi OTII, il numero di circolanti CD3/CD4 (+), CD3/CD8 (+), CD4/CD25 (+) le cellule T, né la capacità di generare CD11c (+) di midollo osseo le cellule dendritiche derivate. Le cellule T di topi OTII mantenuti sulla vitamina D (3) dieta ristretta esposti anche alterazioni significative della capacità proliferativa o la capacità di secernere IFN-gamma o IL-4 in modo antigene-specifiche. Eppure, EL-4 tumori è cresciuta più rapidamente nei topi OTII sulla vitamina D (3) dieta ristretta. Questi dati dimostrano che nella dieta di vitamina D (3)

limitazione degli impatti della crescita del tumore, ma non la capacità di generare una risposta immunitaria antigene-specifica.

161: Jung GH, Kim JD, Cho Y, Chung SH, Lee JH, Sohn KR.

**A 9-month-old phosphaturic mesenchymal tumor mimicking the intractable rickets.**

J PediatrOrthop B. 2010 Jan;19(1):127-32.

Phosphaturic mesenchymal tumor is an extremely rare disease and is frequently associated with oncogenic osteomalacia showing paraneoplastic syndrome, which is characterized by phosphaturia, hypophosphatemia, normocalcemia, and decreased levels of 1,25-dihydroxyvitamin D3 associated with a tumor. A 2-year-old boy, who had a soft tissue tumor on his right thigh and previously diagnosed as myositis ossificans at 9-months-old, was presented with rachitic rosary and mildly enlarged tumor. Biochemical investigations showed hypophosphatemia, hyperphosphaturia, and an increased alkaline phosphatase level of 440 U/l (25-100 U/l), suggesting rickets, which was resistant to vitamin D dietary supplementation. We were certain of intractable rickets because of oncogenic hypophosphatemia and thus decided to excise the soft tissue mass. We observed laboratory improvement of rickets after 2 weeks. On the basis of surgical and histopathological examinations, the tumor was finally diagnosed as the phosphaturic mesenchymal tumor.

**Un tumore mesenchimale fosfaturico di 9 mesi mima il rachitismo intrattabile**

Phosphaturic tumore mesenchimale è una malattia estremamente rara ed è spesso associato con osteomalacia oncogenica mostrando sindrome paraneoplastica, che è caratterizzato da fosfaturia, ipofosfatemia, normocalcemia, e livelli ridotti di 1,25-diidrossivitamina D3 associati a un tumore. Un ragazzo di 2 anni, che aveva un tumore dei tessuti molli sulla coscia destra e precedentemente diagnosticati come miosite ossificante a 9 mesi di età, è stato presentato con rosario rachitico e leggermente tumore allargata. Indagini biochimiche hanno mostrato ipofosfatemia, iperfosfaturia, e un aumento del livello di fosfatasi alcalina di 440 U / l (25-100 U / l), suggerendo il rachitismo, che era resistente alla vitamina D integrazione alimentare. Eravamo certi di rachitismo intrattabile a causa di ipofosfatemia oncogeni e quindi ha deciso di accise, la massa di tessuto molle. Abbiamo osservato un miglioramento laboratorio di rachitismo dopo 2 settimane. Sulla base degli esami istopatologici e chirurgico, il tumore è stato finalmente diagnosticato il tumore phosphaturic mesenchimali.

163: Charalampopoulos A, Charalabopoulos A, Batistatou A, Golias C, Anogeianaki A, Peschos D, Iliadis I, Macheras A, Charalabopoulos K.

**Parathormone and 1,25(OH)2D3 but not 25(OH)D3 serum levels, in an inverse correlation, reveal an association with advanced stages of colorectal cancer.**

Clin Exp Med. 2010Mar;10(1):69-72.

Experimental, epidemiologic, and clinical trial data indicate the antineoplastic effects of calcium and vitamin D in large-bowel neoplasia. The aim of this study was to determine serum levels of vitamin D metabolites and parathormone (PTH) in patients with colorectal cancer (CRC) and to extract conclusions comparing their different levels in serum with healthy individuals. Group 1 (cancer patients) was consisted of 140 patients with CRC with clinical stages Duke's A: 12, B: 52, C: 62, and D: 14. Serum levels of 25(OH)D(3), 1,25(OH)(2)D(3), and PTH were determined in all patients. The findings are: (a) No significant difference was found in the serum levels of 25(OH)D(3) in each Duke's clinical stage in cancer patients, (b) serum 1,25(OH)(2)D(3) levels decreased with advanced cancer stages, and (c) serum levels of PTH showed a corresponding increase. Low serum levels of 1,25(OH)(2)D(3) on one hand and increased levels of PTH in patients with CRC on the other might be strongly related to the carcinogenetic process.

**Livelli sierici di paratormone e 1,25(OH)2D3 ma non 25(OH)D3, in una correlazione inversa, rivelano un'associazione con gli stadi avanzati del cancro colonrettale.**

Sperimentali, epidemiologici e dati degli studi clinici indicano gli effetti antineoplastici di calcio e vitamina D in neoplasie del grosso intestino. Lo scopo di questo studio era di determinare i livelli sierici di metaboliti della vitamina D e paratormone (PTH) in pazienti con carcinoma del colon-retto (CRC) e per estrarre conclusioni confrontando i loro diversi livelli nel siero di soggetti sani. Gruppo 1 (pazienti oncologici) era costituito da 140 pazienti con CRC con stadi clinici Duca A: 12, B: 52, C: 62, e D: 14. I livelli sierici di 25 (OH) D (3), 1,25 (OH) (2) D (3), e PTH sono stati determinati in tutti i pazienti. I risultati sono: (a) Nessuna differenza significativa è stata trovata nei livelli sierici di 25 (OH) D (3) in stadio clinico di ogni Duke nei pazienti con tumore, (b) nel siero 1,25 (OH) (2) D (3 Livelli) è diminuita con stadi avanzati del cancro, e (c) i livelli sierici di PTH ha mostrato un aumento corrispondente. Livelli sierici bassi di 1,25 (OH) (2) D (3) da un lato e aumento dei livelli di PTH nei pazienti con CRC, dall'altro potrebbe essere fortemente legate al processo carcinogenetico.

164: Kommagani R, Whitlatch A, Leonard MK, Kadakia MP.

**p73 is essential for vitamin D-mediated osteoblastic differentiation.**

Cell Death Differ. 2010Mar;17(3):398-407.

The secosteroid hormone vitamin D3 (VD3) exerts its biological actions through its cognate receptor, the vitamin D receptor (VDR). Vitamin D3 and VDR have a key function in bone formation and keratinocyte differentiation, exert antiproliferative actions in human cancer, and is widely used as a chemotherapeutic agent for cancer. In addition, VD3 promotes differentiation of human osteosarcoma cells by up-regulating genes involved in cell cycle arrest and osteoblastic differentiation. Although considerable work has been carried out in understanding the molecular mechanisms underlying the VD3-mediated differentiation of human osteosarcoma cells, the upstream regulation of VD3 signaling pathway is still unclear. In this study, we show that p73 acts as an upstream regulator of VD3-mediated osteoblastic differentiation. Transcription factor p73, a p53 homolog, has been shown to have a function in development and recently been termed as a tumor suppressor. Silencing p73 results in a significant reduction of VD3-mediated osteoblastic differentiation; although DNA damage induced p73 leads to an increase in VD3-mediated differentiation of osteosarcoma cells. Together, our data implicate a novel function for p73 in vitamin D-mediated differentiation of human osteosarcoma cells.

**p73 è essenziale per la differenziazione osteoblastica mediata dalla vitamina D**

La vitamina D3 secosteroid ormone (VD3) esercita la sua azione biologica attraverso il suo recettore, il recettore della vitamina D (VDR). La vitamina D3 e VDR hanno una funzione chiave nella formazione delle ossa e la differenziazione dei cheratinociti, esercitano azioni antiproliferativa nei tumori umani, ed è ampiamente usato come agente chemioterapico per il cancro. Inoltre, VD3 promuove la differenziazione delle cellule di osteosarcoma umano up-regolazione di geni coinvolti in arresto del ciclo cellulare e la differenziazione osteoblastica. Anche se il lavoro considerevole è stato effettuato nella comprensione dei meccanismi molecolari alla base della differenziazione VD3-mediata delle cellule di osteosarcoma umano, la regolamentazione a monte della via di segnalazione VD3 è ancora chiaro. In questo studio, dimostriamo che p73 agisce come un regolatore a monte di VD3-mediata differenziazione osteoblastica. Fattore di trascrizione p73, un omologo p53, ha dimostrato di avere una funzione di sviluppo e stato recentemente definito come un soppressore del tumore. Zittire p73 si traduce in una riduzione significativa del VD3-mediata differenziazione osteoblastica, anche se il danno al DNA indotti p73 porta ad un aumento della differenziazione VD3-mediata delle cellule di osteosarcoma. Insieme, i nostri dati implicano una funzione romanzo di p73 nel differenziamento vitamina D-mediata delle cellule di osteosarcoma umano.

165: Reichrath J.

**Skin cancer prevention and UV-protection: how to avoid vitamin D-deficiency?**  
Br J Dermatol. 2009 Nov;161 Suppl 3:54-60.

Because solar UV-radiation represents the most important environmental risk factor for the development of non-melanoma skin cancer, UV protection is important to prevent these malignancies. Consequently, public health campaigns were developed to improve the knowledge of the general population regarding the role of UV-radiation for the development of skin cancer. However, it has to be noted that vitamin D-mediated positive effects of UV light were not adequately considered in most of these campaigns, that often propose a strict 'no sun policy' without giving recommendations how to prevent vitamin D-deficiency. Under our living conditions, approximately 90% of all vitamin D needed by the human body has to be formed in the skin through the action of UV-B-radiation and it has been shown that strict sun protection causes vitamin D-deficiency. This dilemma represents a serious problem, for an association of vitamin D-deficiency and multiple independent diseases including various types of cancer, bone diseases, autoimmune diseases, infectious diseases, cardiovascular diseases and hypertension has now been reported in a large number of laboratory and epidemiologic investigations. Although further work is necessary to define an adequate vitamin D-status and adequate guidelines for UV-exposure, it is at present mandatory that guidelines for UV-exposure (e.g. in skin cancer prevention campaigns) consider these facts and give recommendations how to prevent vitamin D-deficiency. At present, most experts in the field agree that the evidence to date suggests that daily intake of 1000-2000 IU vitamin D could reduce the incidence of vitamin D-deficiency-related diseases with minimal risk in Europe, the US, and other countries. In this review, we analyze the present literature to help developing well-balanced guidelines on UV-protection that ensure an adequate vitamin D-status. These recommendations will hopefully protect us against vitamin D-deficiency without increasing the risk to develop UV-induced skin cancer.

**Prevenzione del cancro alla pelle e protezione UV: come evitare carenza di vitamina D?**

Poiché la radiazione solare UV rappresenta il più importante fattore di rischio ambientale per lo sviluppo di tumore cutaneo non-melanoma, la protezione UV è importante per prevenire queste malattie. Di conseguenza, le campagne di salute pubblica sono stati sviluppati per migliorare la conoscenza della popolazione in generale riguardo al ruolo delle radiazioni UV per lo sviluppo del cancro della pelle. Tuttavia, va osservato che la vitamina D effetti mediati positiva della luce UV non sono stati adeguatamente considerati nella maggior parte di queste campagne, che spesso propongono un rigoroso 'politica di non sole' senza dare consigli come evitare che la vitamina D-carezza. Sotto i nostri condizioni di vita, circa il 90% di tutti i vitamina D necessari al corpo umano deve essere formato nella pelle attraverso l'azione di raggi UV-B radiazioni ed è stato dimostrato

che la rigorosa protezione solare provoca carenza di vitamina D. Questo dilemma rappresenta un problema serio, per una associazione di vitamina D da carenza di molte malattie e indipendenti tra cui vari tipi di cancro, malattie ossee, malattie autoimmuni, malattie infettive, malattie cardiovascolari e ipertensione è stato segnalato in un gran numero di laboratorio ed epidemiologici indagini. Anche se un ulteriore lavoro è necessario definire un adeguato di vitamina D-status e orientamenti adeguati per l'esposizione ai raggi UV, è obbligatoria al presente che le linee guida per l'esposizione ai raggi UV (ad esempio in campagne di prevenzione del cancro della pelle) prende in considerazione questi fatti e dare consigli su come prevenire la vitamina D-deficit. Attualmente, la maggior parte degli esperti del settore concordano sul fatto che le prove di oggi suggerisce che l'apporto giornaliero di 1000-2000 UI di vitamina D può ridurre l'incidenza delle malattie vitamina D da carenza connessi con il minimo rischio in Europa, Stati Uniti e in altri paesi. In questa revisione, si analizza la letteratura presente per aiutare lo sviluppo di linee guida ben bilanciata su protezione UV che garantiscono un adeguato di vitamina D-status. Queste raccomandazioni, si spera, ci proteggono da carenza di vitamina D senza aumentare il rischio di sviluppare UV-indotta cancro della pelle.

167: Newton-Bishop JA, Beswick S, Randerson-Moor J, Chang YM, Affleck P, Elliott F, Chan M, Leake S, Karpavicius B, Haynes S, Kukalich K, Whitaker L, Jackson S, Gerry E, Nolan C, Bertram C, Marsden J, Elder DE, Barrett JH, Bishop DT.

#### **Serum 25-hydroxyvitamin D3 levels are associated with breslow thickness at presentation and survival from melanoma.**

J Clin Oncol. 2009 Nov 10;27(32):5439-44.

**PURPOSE:** A cohort study was carried out to test the hypothesis that higher vitamin D levels reduce the risk of relapse from melanoma.

**METHODS:** A pilot retrospective study of 271 patients with melanoma suggested that vitamin D may protect against recurrence of melanoma. We tested these findings in a survival analysis in a cohort of 872 patients recruited to the Leeds Melanoma Cohort (median follow-up, 4.7 years).

**RESULTS:** In the retrospective study, self-reports of taking vitamin D supplements were nonsignificantly correlated with a reduced risk of melanoma relapse (odds ratio = 0.6; 95% CI, 0.4 to 1.1; P = .09). Nonrelapsers had higher mean 25-hydroxyvitamin D(3) levels than relapsers (49 v 46 nmol/L; P = .3; not statistically significant). In the cohort (prospective) study, higher 25-hydroxyvitamin D(3) levels were associated with lower Breslow thickness at diagnosis (P = .002) and were independently protective of relapse and death: the hazard ratio for relapse-free survival (RFS) was 0.79 (95% CI, 0.64 to 0.96; P = .01) for a 20 nmol/L increase in serum level. There was evidence of interaction between the vitamin D receptor (VDR) BsmI genotype and serum 25-hydroxyvitamin D(3) levels on RFS.

**CONCLUSION:** Results from the retrospective study were consistent with a role for vitamin D in melanoma outcome. The cohort study tests this hypothesis, providing evidence that higher 25-hydroxyvitamin D(3) levels, at diagnosis, are associated with both thinner tumors and better survival from melanoma, independent of Breslow thickness. Patients with melanoma, and those at high risk of melanoma, should seek to ensure vitamin D sufficiency. Additional studies are needed to establish optimal serum levels for patients with melanoma.

#### **I livelli sierici di 25-idrossivitamina D3 sono associati allo spessore di breslow e alla sopravvivenza del melanoma.**

SCOPO: uno studio di coorte è stato condotto per testare l'ipotesi che maggiori livelli di vitamina D riduce il rischio di recidiva da melanoma.

**METODI:** Uno studio retrospettivo pilota di 271 pazienti con melanoma ha suggerito che la vitamina D può proteggere contro la reiterazione del melanoma. Abbiamo testato questi risultati in una analisi di sopravvivenza in una coorte di 872 pazienti reclutati per il Melanoma Leeds coorte (follow-up medio, 4.7 anni).

**RISULTATI:** In questo studio retrospettivo, self-report di assumere supplementi di vitamina D sono stati non significativamente correlati con un ridotto rischio di ricaduta melanoma (odds ratio = 0.6, 95% CI, 0,4-1,1, p = 0,09). Nonrelapsers avevano una più alta media di 25-idrossivitamina D (3) livelli di relapser (49 v 46 nmol / L, P = 0,3; non statisticamente significativa). Nella coorte (potenziale) di studio, superiore di 25-idrossivitamina D (3) livelli sono stati associati ad una minore spessore di Breslow alla diagnosi (P = .002) e sono risultati indipendentemente protettivo di recidiva e di morte: l'hazard ratio per la sopravvivenza libera da recidiva (RFS ) è stato 0.79 (95% CI, 0,64-0,96, p = 0,01) per un nmol 20 / L aumento del livello sierico. Non c'era evidenza di interazione tra il recettore della vitamina D (VDR) genotipo BsmI e siero di 25-idrossivitamina D (3) livelli su RFS.

**CONCLUSIONE:** I risultati dello studio retrospettivo sono stati coerenti con un ruolo della vitamina D in esito melanoma. Lo studio di coorte prove di questa ipotesi, dimostrando che l'aumento di 25-idrossivitamina D (3) livelli, al momento della diagnosi, sono associati con entrambi i tumori più sottile e una migliore sopravvivenza da melanoma, indipendente da spessore di Breslow. I pazienti con melanoma, e di quelli ad alto rischio di melanoma, devono cercare di garantire la sufficienza di vitamina D. Sono necessari ulteriori studi per stabilire i livelli sierici ottimali per i pazienti con melanoma.

172: Sánchez-Abella L, Fernández S, Verstuyf A, Verlinden L, Gotor V, Ferrero M.

**Synthesis, conformational analysis, and biological evaluation of 19-nor-vitamin D3 analogues with A-ring modifications.**

J Med Chem. 2009 Oct 8;52(19):6158-62.

We have synthesized several isomers of 19-nor-vitamin D analogues possessing a hydroxy group at C-2 as well as novel derivatives bearing an epoxy substituent at the A-ring. All vitamins were prepared in convergent syntheses utilizing the modified Julia olefination. 1 $\alpha$ ,2 $\alpha$ ,25-Trihydroxy-19-nor-vitamin D(3) (3) and 2 $\beta$ ,3 $\beta$ -epoxy-1 $\alpha$ ,25-dihydroxy-3-deoxy-19-nor-vitamin D(3) (10), which showed the highest affinity to the vitamin D receptor, displayed the highest potency among the tested compounds to inhibit the proliferation of MCF-7 breast cancer cells.

**Sintesi, analisi conformazionale, e valutazione biologica di analoghi della 19-nor-vitamina D3 con modificazioni A-ring.**

Abbiamo sintetizzato più isomeri di 19-nor-analoghi della vitamina D in possesso di un gruppo idrossilico in C-2, come pure nuovi derivati recanti un sostituito epossidico a A-ring. Tutte le vitamine sono state preparate in sintesi convergente che utilizzano il olefinazione modificato Julia. 1 $\alpha$ , 2 $\alpha$ ,25-Trihydroxy-19-nor-vitamina D (3) (3) e 2 $\beta$ , 3 $\beta$ -epossi-1 $\alpha$  ,25-diidrossi-3-deossi-19-nor-vitamina D (3) (10), che ha mostrato la più alta affinità per il recettore della vitamina D, appaiano la più alta potenza tra i composti testati per inibire la proliferazione delle cellule del seno MCF-7 il cancro.

175: Dong LM, Ulrich CM, Hsu L, Duggan DJ, Benitez DS, White E, Slattery ML, Farin FM, Makar KW, Carlson CS, Caan BJ, Potter JD, Peters U.

**Vitamin D related genes, CYP24A1 and CYP27B1, and colon cancer risk.**  
Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2009 Sep;18(9):2540-8.

Genetic association studies investigating the role of vitamin D in colon cancer have primarily focused on the vitamin D receptor (VDR), with limited data available for other genes in the vitamin D pathway, including vitamin D activating enzyme 1-alpha hydroxylase (CYP27B1) and vitamin D deactivating enzyme 24-alpha hydroxylase (CYP24A1). We evaluated whether 12 tagging single nucleotide polymorphisms (SNP) in CYP24A1, identified by resequencing the gene in 32 Caucasian samples, and 1 SNP in CYP27B1 were associated with colon cancer risk. In addition, we evaluated whether these two genes modify associations between colon cancer on the one hand and total vitamin D intake and UV-weighted sun exposure on the other, as well as other variants in VDR. Unconditional logistic regression was used to calculate odds ratios (OR) and 95% confidence intervals (95% CI) for the association between polymorphisms and haplotypes in CYP27B1 and CYP24A1 in a multicenter population-based case-control study of 1,600 cases and 1,949 controls. The CYP24A1 polymorphism IVS4-66T > G showed a statistically significant association with risk of colon cancer overall, particularly for proximal colon cancer. When stratified by anatomic site, we also found statistically significant associations for three CYP24A1 polymorphisms with risk of distal colon cancer (IVS4 + 1653C > T: OR for CT/TT versus CC, 0.81; 95% CI, 0.68-0.96; IVS9 + 198T > C: OR for CC versus TT, 1.33; 95% CI, 1.03-1.73; and within whites only: +4125bp 3' of STPC > G: OR for GG versus CC, 1.44; 95% CI, 1-2.05). In addition, a possible interaction between CYP27B1 and UV-weighted sun exposure with proximal colon cancer was observed. As this is the first study to evaluate these genes in relation to colon cancer, additional studies are needed to confirm these results.

**Geni legati alla vitamina D, CYP24A1 e CYP27B1, e rischio di cancro al colon.**

Studi di associazione genetica indagare il ruolo della vitamina D nel cancro del colon sono incentrate prevalentemente sul recettore della vitamina D (VDR), con i pochi dati disponibili per altri geni nel pathway di vitamina D, compresa la vitamina D attivazione dell'enzima idrossilasi 1-alpha (CYP27B1) e vitamina D disattivazione dell'enzima idrossilasi 24-alfa (CYP24A1). Abbiamo valutato se i polimorfismi 12 tagging a singolo nucleotide (SNP) in CYP24A1, identificati da risequenziamento il gene in 32 campioni caucasica, e 1 SNP in CYP27B1 sono stati associati al rischio di cancro del colon. Inoltre, abbiamo valutato se questi due geni modificare le associazioni tra cancro del colon, da un lato e la totale assunzione di vitamina D e l'esposizione al sole UV-ponderata, dall'altro, così come altre varianti in VDR. Regressione logistica è stata utilizzata per

calcolare le odds ratio (OR) e gli intervalli di confidenza al 95% (95% CI) per l'associazione tra polimorfismi e aplotipi in CYP27B1 e CYP24A1 in uno studio multicentrico di popolazione caso-controllo di 1.600 casi e 1.949 controlli. Il polimorfismo CYP24A1 IVS4-66T> G ha mostrato un'associazione statisticamente significativa con il rischio di cancro al colon globale, in particolare per il cancro del colon prossimale. Quando stratificato per sede anatomica, abbiamo anche trovato associazioni statisticamente significative per tre CYP24A1 polimorfismi con il rischio di tumore del colon distale (IVS4 + 1653C> T: OR per CT / TT versus CC, 0,81, 95% CI, 0,68-0,96; IVS9 + 198T bianchi e nel giro di soli OR per CC TT versus, 1,33, 95% CI, 1,03-1,73: 4.125 bp 3 'di STPC> G:> C o per GG versus CC, 1,44, IC 95%, 1-2,05). Inoltre, una possibile interazione tra CYP27B1 e l'esposizione al sole UV-pesati con tumore del colon prossimale è stata osservata. Poiché questo è il primo studio per valutare questi geni in relazione al cancro al colon, ulteriori studi sono necessari per confermare questi risultati.

179: Maehr H, Lee HJ, Perry B, Suh N, Uskokovic MR. Calcitriol derivatives with two different side chains at C-20. V.

**Potent inhibitors of mammary carcinogenesis and inducers of leukemia differentiation.**  
J Med Chem. 2009 Sep 10;52(17):5505-19.

Calcitriol is implicated in many cellular functions including cellular growth and differentiation, thus explaining its antitumor effects. It was shown that gemini, the calcitriol derivative containing two side chain at C20, is also active in gene transcription with enhanced antitumor activity. We have now further optimized both the A-ring and the two side chains. The chemical structures of the resulting 18 geminis were correlated with biological activities. Those containing the 1alpha-fluoro A-ring are the least active. Those featuring 23-yne and 23(E) side-chains are generally more active in human breast cancer cell growth inhibition and human leukemia cell differentiation induction than their 23(Z) counterparts. On the basis of these evaluations, we selected as lead compound a 20(R) gemini, related to calcitriol in terms of it is A-ring, where one side chain was modified by introduction of a 23-yne function and replacement of the geminal methyl groups with trifluoromethyl groups, the other created by extension of C21 with a 3-hydroxy-3-trideuteromethyl-4,4,4-trideutero-butyl moiety.

**Inibitori potenti della carcinogenesi mammaria e induttori della differenziazione nelle leucemie.**

Calcitriolo è implicato in molte funzioni cellulari tra cui la crescita cellulare e la differenziazione, spiegando così i suoi effetti antitumorali. È stato dimostrato che i Gemelli, il derivato calcitriolo contenente due catene laterali a C20, è attiva anche nella trascrizione del gene con attività antitumorale potenziata. Abbiamo ora ulteriormente ottimizzato, sia l'A-ring e le due catene laterali. Le strutture chimiche della conseguente Geminis 18 sono stati correlati con le attività biologiche. Quelli contenenti la 1alfa-fluoro-ring A sono i meno attivi. Quelli con 23-ino e 23 (E) con catene laterali sono generalmente più attivo nella inibizione della crescita del cancro umano della mammella delle cellule e l'induzione di cellule umane di leucemia differenziazione rispetto ai 23 (Z) controparti. Sulla base di queste valutazioni, abbiamo selezionato come piombo composto da 20 (R), Gemelli, collegato al calcitriolo, in termini di esso è A-ring, dove è stata modificata una catena laterale di introduzione di una funzione 23-ino e la sostituzione del geminali gruppi metilici con gruppi trifluorometil, l'altro creato per estensione di C21 con un residuo di 3-idrossi-3-trideuteromethyl-4,4,4-trideutero-butile.

181: Cross HS, Nittke T, Peterlik M.

**Modulation of vitamin D synthesis and catabolism in colorectal mucosa: a new target for cancer prevention.**

AnticancerRes. 2009 Sep;29(9):3705-12.

Sporadic colorectal cancer is a disease of advancing age and the percentage of the population which reaches an advanced age is strongly increasing. Multiple factors are responsible for the etiology of this cancer since the colorectal mucosa is directly influenced by nutrients reaching the colonic lumen and impacting on mucosal cells. The vitamin D system appears to be central to several preventative molecular pathways. Insufficiency of the serum precursor 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> has been linked by epidemiology to enhanced colon tumor incidence, most likely because it is a major determinant of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> synthesis in colonic mucosal cells. Bound to its receptor, vitamin D regulates colonic proliferation, differentiation and apoptosis in an autocrine/paracrine manner. During early malignancy, vitamin D synthesis is enhanced to counteract hyperproliferation, whereas in high-grade tumors catabolism by far surpasses synthesis. The colonic vitamin D system is regulated by several known natural factors. One of the most important ones is nutritional calcium that, if supply is low, will result in enhanced catabolism of colonic 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. Estrogenic compounds can increase expression and activity of the synthesizing 25-hydroxyvitamin D-1alpha-hydroxylase. Due to enhanced synthesis of the active metabolite, this can lead to protection against colorectal tumors in women. During tumor progression, expression of 25-hydroxyvitamin D-1alpha-hydroxylase as well as of the catabolizing 25-hydroxyvitamin D-24-hydroxylase appears to be under epigenetic control as demonstrated by studies with phytoestrogens and folate. It is commonly accepted that sporadic colorectal cancer pathogenesis is multifactorial and these are just a few examples of the regulatory capacity of natural (nutrient) substances for improving the colonic vitamin D system. However, protection by vitamin D might have central importance, with nutrients increasing the efficiency of the vitamin D system in a targeted manner. This could result in prevention of hyperproliferation or retardation of progression to clinically manifest primary colonic tumors.

**Modulazione della sintesi della vitamina D e del catabolismo nella mucosa colonrettale: un nuovo target per la prevenzione del cancro.**

Il cancro del colon-retto sporadico è una malattia di avanzare dell'età e la percentuale di popolazione che raggiunge in età avanzata è in forte aumento. Molteplici fattori sono responsabili per l'eziologia di questo tumore in quanto la mucosa del colon-retto è direttamente influenzato da nutrienti di raggiungere il lume intestinale e che incidono sulle cellule della mucosa. Il sistema di vitamina D sembra essere al centro di diverse vie di prevenzione molecolare. Insufficienza della D<sub>3</sub>

precursore livelli sierici di 25-idrossivitamina è stato collegato con l'epidemiologia di una maggiore incidenza del tumore del colon, molto probabilmente perché è un fattore determinante di 1,25-diidrossivitamina D<sub>3</sub> di sintesi in cellule della mucosa del colon. Legata al suo recettore, la vitamina D regola del colon proliferazione, differenziazione e apoptosi in modo autocrino / paracrino modo. Durante la malignità precoce, la sintesi di vitamina D è stato migliorato per contrastare iperproliferazione, mentre in alta qualità catabolismo tumori supera di gran lunga sintesi. Il colon sistema vitamina D è regolata da diversi fattori naturali conosciute. Una delle più importanti è il calcio nutrizionale che, se l'offerta è bassa, si tradurrà in una maggiore catabolismo di colon 1,25-diidrossivitamina D<sub>3</sub>. composti estrogenici possono aumentare l'espressione e l'attività della sintesi di 25-idrossivitamina D-1alfa-idrossilasi. A causa di una maggiore sintesi del metabolita attivo, questo può portare alla protezione contro i tumori del colon-retto nelle donne. Durante la progressione del tumore, espressione di 25-idrossivitamina D-1alfa-idrossilasi, nonché del catabolizing 25-idrossivitamina D-24-idrossilasi sembra essere sotto controllo epigenetico come dimostrato da studi con fitoestrogeni e folati. E 'comunemente accettato che il cancro coloretale sporadico patogenesi è multifattoriale e questi sono solo alcuni esempi della capacità di regolamentazione delle risorse naturali (nutrienti) sostanze per migliorare il sistema di vitamina D colon. Tuttavia, la protezione dalla vitamina D potrebbe avere importanza centrale, con le sostanze nutrienti aumentare l'efficienza del sistema di vitamina D in modo mirato. Ciò potrebbe portare a prevenzione di iperproliferazione o l'inibizione della progressione di tumori primari del colon clinicamente manifesto.

182: Peterlik M, Grant WB, Cross HS.

### **Calcium, vitamin D and cancer.**

AnticancerRes. 2009 Sep;29(9):3687-98.

A low vitamin D status and inadequate calcium intake are important risk factors for various types of cancer. Ecological studies using solar UV-B exposure as an index of vitamin D<sub>3</sub> photoproduction in the skin found a highly significant inverse association between UV-B and mortality in fifteen types of cancer. Of these, colon, rectal, breast, gastric, endometrial, renal and ovarian cancer exhibit a significant inverse relationship between incidence and oral intake of calcium. In addition, lung and endometrial cancer as well as multiple myeloma are considered calcium and vitamin D sensitive. Studies on tissue-specific expression of the CYP27B1-encoded 25-hydroxyvitamin D-1 $\alpha$ -hydroxylase and of the extracellular calcium-sensing receptor (CaR) have led to an understanding how locally produced 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) and extracellular Ca<sup>2+</sup> act jointly as key regulators of cellular proliferation, differentiation and function. Thus, impairment of antimitogenic, proapoptotic and prodifferentiating signaling from the 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-activated vitamin D receptor (VDR) and from the CaR in vitamin D and calcium insufficiency has been implicated in the pathogenesis of the aforementioned types of cancer. 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> and calcium interact in modulating cell growth in different ways: (i) Signaling pathways from the VDR and the CaR converge on the same downstream elements, e.g. of the canonical Wnt pathway; (ii) high extracellular calcium modulates extrarenal vitamin D metabolism in favor of higher local steady-state concentrations of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>; (iii) 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> may up-regulate expression of the CaR and thus augment CaR-mediated antiproliferative responses to high extracellular Ca<sup>2+</sup>. This can explain why combined supplementation is required for optimal chemoprevention of cancer by calcium and vitamin D.

### **Calcio, vitamina D e cancro.**

Un basso livello di vitamina D e inadeguato apporto di calcio sono importanti fattori di rischio per vari tipi di cancro. studi ecologici con l'esposizione solare UV-B come indice di vitamina D<sub>3</sub> fotoproduzione nella pelle trovato un'associazione altamente significativa inversa tra UV-B e di mortalità nei quindici tipi di cancro. Di questi, colon, del retto, del seno, mostra cancro gastrico, carcinoma dell'endometrio, renale e ovarica una significativa relazione inversa tra incidenza e l'assunzione orale di calcio. Inoltre, il polmone e il cancro endometriale e mieloma multiplo sono considerati di calcio e vitamina D sensibili. Studi sulla espressione tessuto-specifica del CYP27B1 con codifica 25-hydroxyvitamin D-1 $\alpha$ -idrossilasi e del recettore sensibile al calcio extracellulare (CaR) hanno portato ad una comprensione di come prodotto localmente 1,25-diidrossivitamina D<sub>3</sub> (1,25 (OH ) 2D<sub>3</sub>) ed extracellulare di Ca<sup>2+</sup> + congiuntamente da regolatori chiave della proliferazione cellulare, differenziamento e la funzione. Così, compromissione della antimitogenic,

proapoptotici e prodifferentiating segnalazione dal recettore 1,25 (OH) 2D3-vitamina D attiva (VDR) e dalla macchina di vitamina D e di insufficienza di calcio è stato implicato nella patogenesi delle suddette tipologie di cancro. 1,25 (OH) 2D3 e calcio interagire nel modulare la crescita cellulare in diversi modi: (i) le vie di segnalazione dal VDR e il CaR convergono sugli stessi elementi a valle, ad esempio, della via canonica Wnt, (ii) ad alta calcio extracellulare modula extrarenali metabolismo della vitamina D in favore di una maggiore concentrazione locale steady-state di 1,25 (OH) 2D3, (iii) 1,25 (OH) 2D3 può up-regolare l'espressione della vettura e quindi aumentare le risposte antiproliferativa CAR-mediata di alto Ca<sup>2+</sup> + extracellulare. Questo può spiegare perché è necessaria l'integrazione combinata ottimale per la chemioprevenzione del cancro di calcio e vitamina D.

183: Vieth R.

**How to optimize vitamin D supplementation to prevent cancer, based on cellular adaptation and hydroxylase enzymology.**

Anticancer Res. 2009Sep;29(9):3675-84.

The question of what makes an 'optimal' vitamin D intake is usually equivalent to, 'what serum 25-hydroxyvitamin D [25(OH)D] do we need to stay above to minimize risk of disease?'. This is a simplistic question that ignores the evidence that fluctuating concentrations of 25(OH)D may in themselves be a problem, even if concentrations do exceed a minimum desirable level. Vitamin D metabolism poses unique problems for the regulation of 1,25-dihydroxyvitamin D [1,25(OH)2D] concentrations in the tissues outside the kidney that possess 25(OH)D-1-hydroxylase [CYP27B1] and the catabolic enzyme, 1,25(OH)2D-24-hydroxylase [CYP24]. These enzymes behave according to first-order reaction kinetics. When 25(OH)D declines, the ratio of 1-hydroxylase/24-hydroxylase must increase to maintain tissue 1,25(OH)2D at its set-point level. The mechanisms that regulate this paracrine metabolism are poorly understood. I propose that delay in cellular adaptation, or lag time, in response to fluctuating 25(OH)D concentrations can explain why higher 25(OH)D in regions at high latitude or with low environmental ultraviolet light can be associated with the greater risks reported for prostate and pancreatic cancers. At temperate latitudes, higher summertime 25(OH)D levels are followed by sharper declines in 25(OH)D, causing inappropriately low 1-hydroxylase and high 24-hydroxylase, resulting in tissue 1,25(OH)2D below its ideal set-point. This hypothesis can answer concerns raised by the World Health Organization's International Agency for Research on Cancer about vitamin D and cancer risk. It also explains why higher 25(OH)D concentrations are not good if they fluctuate, and that desirable 25(OH)D concentrations are ones that are both high and stable.

**Come ottimizzare il supplemento di vitamina D per prevenire il cancro, basato sull'adattamento cellulare e l'enzimologia dell'idrossilasi enzymology.**

La questione di ciò che rende un apporto 'ottimale' di vitamina D è generalmente equivalente a, 'che cosa sierici di 25-idrossivitamin D [25 (OH) D] abbiamo bisogno di restare al di sopra di ridurre al minimo il rischio di malattia?'. Questa è una domanda semplice che ignora l'evidenza che le concentrazioni fluttuanti di 25 (OH) D può essere di per sé un problema, anche se le concentrazioni non superano un livello minimo auspicabile. Metabolismo della vitamina D pone problemi unico per la regolamentazione della 1,25-diidrossivitamin D [1,25 (OH) 2D] concentrazioni nei tessuti al di fuori del rene che possiedono 25 (OH) D-1-idrossilasi [CYP27B1] e l'enzima catabolico , 1,25

(OH) 2D-24-idrossilasi [CYP24]. Questi enzimi si comportano secondo la cinetica di reazione di primo ordine. Quando 25 (OH) D diminuisce, il rapporto tra 1-hydroxylase/24-hydroxylase deve aumentare per mantenere il tessuto 1,25 (OH) 2D al suo livello di set-point. I meccanismi che regolano questo metabolismo paracrini sono capiti male. Propongo che il ritardo adattamento cellulare, o tempo di ritardo, in risposta alle fluttuazioni 25 (OH) D concentrazioni può spiegare perché più alta di 25 (OH) D in regioni ad alta latitudine o con scarsa luce ultravioletta ambientale può essere associata a maggiori rischi segnalati per i tumori della prostata e del pancreas. A latitudini temperate, superiore estate 25 (OH) livelli di D sono seguiti da più nitide declina in 25 (OH) D, che causa impropriamente basso 1-idrossilasi e alta 24-idrossilasi, con conseguente tessuto 1,25 (OH) 2D di sotto del suo set ideale -point. Questa ipotesi può rispondere a preoccupazioni espresse dalla Organizzazione Mondiale della Sanità l'Agenzia internazionale per la ricerca sul cancro sulla vitamina D e rischio di cancro. Ciò spiega anche perché più alta di 25 (OH) D le concentrazioni non sono buoni se possono variare, e che auspicabile 25 (OH) D concentrazioni sono quelli che sono entrambi stabili ed elevate.

184: Nürnberg B, Gräber S, Gärtner B, Geisel J, Pföhler C, Schadendorf D, Tilgen W, Reichrath J.

#### **Reduced serum 25-hydroxyvitamin D levels in stage IV melanomapatients.**

Anticancer Res. 2009 Sep;29(9):3669-74.

**BACKGROUND:** Reduced serum 25-hydroxyvitamin D3 (25(OH)D) levels are associated with an increased incidence and an unfavorable outcome of various types of cancer. However, the influence of serum 25(OH)D on the incidence and outcome of patients with malignant melanoma is unknown.

**PATIENTS AND METHODS:** The association between serum 25(OH)D levels and clinical and histopathological data among 205 patients with malignant melanoma was examined. Additionally, 141 healthy controls were investigated. All the blood samples were taken between October and April to minimize seasonal variations; basal serum 25(OH)D levels were analyzed using the LIAISON 25-OH Vitamin D-Assay (DiaSorin, Dietzenbach, Germany). The study started in 1997. The patients were observed until death or March 2007, whichever came first.

**RESULTS:** Serum 25(OH)D levels were significantly reduced in stage IV melanoma patients as compared to stage I melanoma patients ( $p=0.006$ ). A trend toward a greater tumor thickness of the primary cutaneous melanomas was seen in the patients with low ( $<10$  ng/ml) serum 25(OH)D levels (median: 2.55 mm) as compared to those with 25(OH)D serum levels  $>20$  ng/ml (median: 1.5 mm), although this difference was not statistically significant ( $p=0.078$ ). The patients with low 25(OH)D serum levels ( $<10$  ng/ml) had earlier distant metastatic disease (median: 24.37 months) as compared to those with 25(OH)D serum levels  $>20$  ng/ml (median: 29.47 months), although this difference was also not statistically significant ( $p=0.641$ ).

**CONCLUSION:** Among the patients with malignant melanoma, significantly reduced serum 25(OH)D levels were found in the stage IV patients as compared to stage I patients, and those with low 25(OH)D serum levels ( $<10$  ng/ml) may develop earlier distant metastatic disease compared to those with higher 25(OH)D serum levels ( $>20$  ng/ml). Further study of the vitamin D pathway and its influence on pathogenesis and progression of malignant melanoma is warranted.

#### **Livelli sierici di 25-idrossivitamina Dridotti in pazienti con melanoma al IV stadio.**

**BACKGROUND:** D3 sierica ridotta di 25-idrossivitamina (25 (OH) D) I livelli sono associati con un aumento di incidenza e di un esito sfavorevole di vari tipi di cancro. Tuttavia, l'influenza di siero 25 (OH) D sull'incidenza e prognosi di pazienti con melanoma maligno è sconosciuto. **PAZIENTI E METODI:** L'associazione tra livelli sierici di 25 (OH) livelli di D e di dati clinici ed

istopatologici tra i 205 pazienti con melanoma maligno è stato esaminato. Inoltre, 141 controlli sani sono stati studiati. Tutti i campioni di sangue sono stati prelevati tra ottobre e aprile per ridurre al minimo le variazioni stagionali; sierici basali di 25 (OH) livelli di D sono stati analizzati utilizzando il LIAISON 25-OH-vitamina D Analisi (DiaSorin, Dietzenbach, Germania). Lo studio è iniziato nel 1997. I pazienti sono stati osservati fino alla morte o marzo 2007, se è venuto prima. RISULTATI: il siero 25 (OH) livelli di D sono risultati significativamente ridotti nei pazienti con melanoma IV stadio rispetto ai pazienti con melanoma in stadio I ( $p = 0,006$ ). Una tendenza verso un maggiore spessore del tumore del melanoma cutaneo primario è stato osservato nei pazienti con bassa ( $<10$  ng / ml) nel siero 25 (OH) livelli di D (mediana: 2,55 mm) rispetto a quelli con 25 (OH) D sierica livelli  $> 20$  ng / ml (mediana: 1,5 mm), sebbene questa differenza non era statisticamente significativa ( $p = 0,078$ ). I pazienti con bassa 25 (OH) livelli sierici D ( $<10$  ng / ml) in precedenza aveva metastasi a distanza (media: 24,37 mesi) rispetto a quelli con 25 (OH) D i livelli sierici  $> 20$  ng / ml (mediana: 29,47 mesi), anche se questa differenza non era statisticamente significativa ( $p = 0,641$ ).

CONCLUSIONE: Tra i pazienti con melanoma maligno, ha significativamente ridotto siero 25 (OH) livelli di D sono stati trovati nei pazienti di stadio IV rispetto ai pazienti in stadio I, e quelli con basso di 25 (OH) D i livelli sierici ( $<10$  ng / ml) possono sviluppare metastasi a distanza in precedenza rispetto a quelli con più alto 25 (OH) D i livelli sierici ( $> 20$  ng / ml). Ulteriori studi del percorso di vitamina D e la sua influenza sulla patogenesi e nella progressione del melanoma maligno è giustificata.

186: Sertznig P, Dunlop T, Seifert M, Tilgen W, Reichrath J.

**Cross-talk between vitamin D receptor (VDR)- and peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-signaling in melanoma cells.**

Anticancer Res. 2009 Sep;29(9):3647-58.

The expression and signaling of the vitamin D receptor (VDR) and peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha, delta, gamma was investigated in the melanoma cell line MeWo. Using real-time PCR, the mRNA of the nuclear receptors (NR) was detected. The strongest expression was found for the VDR, approximately 3-fold higher compared to the expression of PPARalpha or PPARdelta, and the weakest expression was for PPARgamma. After treatment with corresponding ligands, the expression of the VDR, PPARalpha and PPARdelta was elevated up to 5-fold, while the PPARgamma expression was not significantly affected. Treatment with 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 (1,25(OH)2D3, calcitrol) resulted in 40% inhibition of MeWo cell proliferation, that was associated with a 5-fold increase in VDR mRNA. Interestingly, cell proliferation was differentially modulated by treatment with the PPAR ligands. While docosahexaenoic acid (DHA) treatment resulted in a statistically significant increase (approximately 10%), the other PPAR ligands inhibited MeWo cell proliferation. GW501516 (PPARdelta ligand) and WY14643 (PPARalpha ligand) both had an antiproliferative effect of approximately 10%. These antiproliferative effects were not associated with modulation of PPARalpha or PPARdelta expression. In contrast, stimulation of MeWo proliferation by DHA was associated with a 3- and 4-fold increase in the expression of PPARalpha and PPARdelta, respectively. Analyzing the cross-talk between the VDR and PPAR signaling pathways, the 1,25(OH)2D3 treatment resulted in an approximately 2-fold increase in expression of PPARalpha and PPARdelta, while the expression of PPARgamma was unaffected. Treatment with GW501516 and WY14643 resulted in an increase in the VDR expression (2-fold after 120 h). The simultaneous treatment with 1,25(OH)2D3 partially antagonised the DHA- and alpha-linolenicacid (ALA)-induced up-regulation of PPAR expression. In contrast, treatment with the PPAR ligands had no pronounced effect on the 1,25(OH)2D3-induced increase in VDR expression. Simultaneous treatment with the PPAR ligands bezafibrate or ALA resulted in an up to 6-fold reduction of the 1,25(OH)2D3-induced elevation of the 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3-24-hydroxylase (CYP24A1) expression. Simultaneous treatment with the PPAR ligands and 1,25(OH)2D3 resulted in only marginal modulation of 1,25(OH)2D3-induced inhibition of cell proliferation. However, simultaneous treatment with bezafibrate and 1,25(OH)2D3 resulted in a statistically significant partial antagonisation of the 1,25(OH)2D3-induced inhibition of MeWo cell proliferation. In conclusion, PPAR and VDR have a role in growth regulation in melanoma cells and functionally relevant cross-talk between these nuclear signaling pathways is indicated, but not at the level of cell proliferation, where 1,25(OH)2D3 has a dominant effect.

## **Cross-talk tra recettore della vitamina D (VDR)- e il segnale del recettore attivato dal proliferatore del perossisoma (PPAR) nelle cellule con melanoma.**

L'espressione e di segnalazione del recettore della vitamina D (VDR) e recettore peroxisome proliferator-activated (PPAR) alfa, delta, gamma è stata studiata in linea cellulare MeWo melanoma. Real-time PCR, l'mRNA dei recettori nucleari (NR) è stata rilevata. L'espressione più forte è stato trovato per la VDR, circa 3 volte superiore rispetto alla espressione di PPARalpha o PPARdelta, e l'espressione era più debole per PPARgamma. Dopo il trattamento con ligandi corrispondenti, l'espressione della, VDR PPARalpha e PPARdelta è stata elevata fino a 5 volte, mentre l'espressione di PPAR-gamma non è stato influenzato in modo significativo. Il trattamento con D3 1alfa ,25-diidrossivitamina (1,25 (OH) 2D3, calcitriolo) ha determinato nel 40% di inibizione della proliferazione delle cellule MeWo, che era associato ad un aumento di 5 volte in VDR mRNA. È interessante notare che la proliferazione cellulare è stato differenzialmente modulata dal trattamento con i ligandi PPAR. Mentre l'acido docosaesaenoico (DHA) trattamento ha determinato un aumento statisticamente significativo (circa il 10%), i ligandi PPAR altri inibito la proliferazione cellulare MeWo. GW501516 (PPARdelta ligando) e WY14643 (PPARalpha ligando), entrambi hanno avuto un effetto antiproliferativo del 10% circa. Questi effetti antiproliferativi non sono stati associati con modulazione di PPARalpha o espressione PPARdelta. Al contrario, la stimolazione della proliferazione MeWo di DHA è stata associata con un 3 - e aumentare di 4 volte l'espressione di PPARalpha e PPARdelta, rispettivamente. Analizzando il cross-talk tra il VDR e percorsi PPAR segnalazione, la 1,25 (OH) 2D3 trattamento ha comportato un aumento di circa 2 volte in espressione di PPARalpha e PPARdelta, mentre l'espressione di PPAR-gamma è rimasta inalterata. Il trattamento con GW501516 e WY14643 portato a un aumento della espressione di VDR (2 volte dopo 120 h). Il trattamento simultaneo con 1,25 (OH) 2D3 parzialmente contrapposto il DHA-e alfa-linolenicacid (ALA) indotta up-regolazione dell'espressione del PPAR. Al contrario, il trattamento con i ligandi PPAR non ha avuto effetto sui (OH) 2D3 1,25 aumento indotto in espressione di VDR. Il trattamento simultaneo con il PPAR ligandi Bezafibrate o ALA portato ad un massimo di riduzione di 6 volte della (OH) 2D3 1,25-aumento indotto della 1alfa ,25-diidrossivitamina D3-24-idrossilasi (CYP24A1) espressione. Il trattamento simultaneo con i ligandi PPAR e 1,25 (OH) 2D3 portato solo a modulazione marginale di 1,25 (OH) 2D3 inibizione della proliferazione cellulare. Tuttavia, il trattamento simultaneo con bezafibrato e 1,25 (OH) 2D3 ha determinato un antagonisation statisticamente significativo parziale di (OH) 2D3 1,25 inibizione della proliferazione cellulare MeWo. In conclusione, PPAR e VDR avere un ruolo nella regolazione della crescita in cellule di melanoma e funzionalmente rilevanti cross-talk tra queste vie di segnalazione nucleare è indicato, ma non a livello di proliferazione delle cellule, dove 1,25 (OH) 2D3 ha un effetto dominante .

187: Fischer D, Becker S, Cordes T, Bücken B, Diedrich K, Friedrich M, Salehin D, Thill M.

**Vitamin D-24-hydroxylase in benign and malignant breast tissue and cell lines.**

Anticancer Res. 2009 Sep;29(9):3641-5.

Tissue-specific expression of 25-hydroxyvitamin D-1 $\alpha$ -hydroxylase (1 $\alpha$ -OHase) and vitamin D-hydroxylase (24-OHase) may act as the pivotal link between 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> (25(OH)D<sub>3</sub>) serum levels and the anticancer effects of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) and alternative splicing of the enzymes may regulate their biological function. The expression of 24-OHase in cells and breast tissue was investigated and its splice variants were detected. The expression of 24-OHase RNA and protein was assessed by RT-PCR followed by Western blot. The expression of 24-OHase was reduced by about 57% in MCF-7 breast cancer cells, compared to MCF-10F benign breast cells. In the Western blot, a signal at 56 kDa was found and further bands were detected at 42 and 44 kDa. In the breast cancer tissue, the expression of 24-OHase was reduced by about 58% compared to benign tissue. However, in the Western blot, only one signal was found in the benign tissue at 56 kDa, while in malignant tissue, a further band was detected at 40 kDa. Alternative splicing of 24-OHase may lead to a catalytically dysfunctional enzyme and may lead to less reduction of the target protein.

**Vitamina D-24-idrossilasi nei tessuti mammari benigni e maligni e nelle linee cellulari**

Espressione tessuto-specifica di 25-idrossivitamina D-1 $\alpha$ -idrossilasi (1 $\alpha$ -OHase) e vitamina D-idrossilasi (24-OHase) può agire come il legame fondamentale tra D<sub>3</sub> 25-idrossivitamina (25 (OH) D<sub>3</sub>) i livelli sierici e la effetti antitumorali di D<sub>3</sub>-dihydroxyvitamin 1,25 (1,25 (OH) 2D<sub>3</sub>) e splicing alternativo degli enzimi possono disciplinare la loro funzione biologica. L'espressione di 24-OHase in cellule e tessuti del seno è stato studiato e le sue varianti di splicing sono stati rilevati. L'espressione di 24-OHase RNA e proteine è stata valutata mediante RT-PCR seguita da Western Blot. L'espressione di 24-OHase è stata ridotta di circa il 57% in cellule del seno MCF-7 del cancro, rispetto a MCF-10F cellule mammarie benigne. Nella Western Blot, un segnale a 56 kDa è stato trovato e bande ulteriore è stata rilevata a 42 e 44 kDa. Nel tessuto del cancro al seno, l'espressione di 24-OHase è stata ridotta di circa il 58% rispetto al tessuto benigno. Tuttavia, per il Western Blot, solo un segnale è stato trovato nel tessuto benigno a 56 kDa, mentre nel tessuto maligno, una band ulteriore è stato rilevato a 40 kDa. Splicing alternativo di 24-OHase può portare ad un enzima cataliticamente disfunzionale e può portare a una minore riduzione della proteina bersaglio.

190: Chiang KC, Persons KS, Istfan NW, Holick MF, Chen TC.

**Fish oil enhances the antiproliferative effect of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 on liver cancer cells.**

Anticancer Res. 2009 Sep;29(9):3591-6. Erratum in: Anticancer Res.2010 Mar;30(3):1033. Anticancer Res.2010 Jan;30(1):277.

**BACKGROUND:** Laboratory and epidemiological studies have indicated that 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 [1alpha,25(OH)2D3] and dietary omega 3 (omega3)-polyunsaturated fatty acids (PUFAs) are capable of inhibiting the proliferation of various cancer cells.

**MATERIALS AND METHODS:** Human hepatoblastoma cells (HepG2) were treated with 1alpha,25(OH)2D3 and fish oil alone and in combination. Cell proliferation was measured either by the uptake of [3H]-thymidine into DNA or by counting the cell numbers using a hemocytometer.

**RESULTS:** The HepG2 cell proliferation was inhibited by 1alpha,25(OH)2D3 and fish oil in a dose-dependent manner. The lowest effective concentration of 1alpha,25(OH)2D3 was 10(-7) M and 10(-8) M using the [3H]-thymidine incorporation method and the cell counting method, respectively. Fish oil also caused a significant inhibition in HepG2 cell proliferation at 25 microg/mL. When HepG2 cells were treated with 1alpha,25(OH)2D3 in combination with fish oil, it was found that fish oil increased the antiproliferative effect of 1alpha,25(OH)2D3 on HepG2 cell growth compared to treatment with 1alpha,25(OH)2D3 alone.

**CONCLUSION:** 1alpha,25(OH)2D3 could be used to treat hepatocellular carcinoma (HCC). However, the major side-effect of hypercalcemia limits its use. An enhanced 1alpha,25(OH)2D3-induced inhibition of HepG2 cell proliferation in the presence of PUFAs in the form of fish oil suggests that a lower concentration of 1alpha,25(OH)2D3 could be used to treat hepatocellular carcinoma in the presence of PUFAs to decrease the risk of hypercalcemia caused by high concentrations of 1alpha,25(OH)2D3.

**L'olio di pesce aumenta l'effetto anti-proliferativo di 1alfa,25-diidrossivitamina D3 sulle cellule cancerose del fegato.**

**BACKGROUND:** laboratorio e studi epidemiologici hanno indicato che 1alpha [1alfa, 25 (OH) 2D3] ,25-diidrossivitamina D3 e omega 3 nella dieta (omega3)-acidi grassi polinsaturi (PUFA) sono in grado di inibire la proliferazione delle cellule tumorali diverse.

**MATERIALI E METODI:** epatoblastoma cellule umani (HepG2) sono stati trattati con la 1alfa, 25 (OH) 2D3 e olio di pesce da solo e in combinazione. La proliferazione cellulare è stata misurata mediante la captazione di [3H]-timidina nel DNA o contando il numero di cellule utilizzando un emocitometro.

**RISULTATI:** La proliferazione delle cellule HepG2 è stato inibito dalla 1alfa, 25 (OH) 2D3 e olio

di pesce in modo dose-dipendente. La concentrazione più bassa efficace di 1alfa, 25 (OH) 2D3 è stata 10<sup>-7</sup> M e 10<sup>-8</sup> M per mezzo della [3H]-timidina metodo di incorporazione e il metodo di conteggio delle cellule, rispettivamente. L'olio di pesce ha anche causato una significativa inibizione della proliferazione cellulare HepG2 a 25 microg / mL. Quando le cellule HepG2 sono state trattate con 1alfa, 25 (OH) 2D3 in combinazione con olio di pesce, è emerso che l'olio di pesce aumentato l'effetto antiproliferativo della 1alfa, 25 (OH) 2D3 sulla crescita delle cellule HepG2 rispetto al trattamento con 1alfa, 25 (OH) 2D3 solo. CONCLUSIONE: 1alfa, 25 (OH) 2D3 potrebbero essere usati per trattare il carcinoma epatocellulare (HCC). Tuttavia, i principali effetti collaterali di ipercalcemia ne limita l'utilizzo. Un 1alfa rafforzata, 25 (OH) 2D3-indotto l'inibizione della proliferazione delle cellule HepG2 in presenza di PUFA in forma di olio di pesce suggerisce che una minore concentrazione di 1alfa, 25 (OH) 2D3 potrebbero essere usati per trattare il carcinoma epatocellulare in presenza di PUFA per diminuire il rischio di ipercalcemia causata da alte concentrazioni di 1alfa, 25 (OH) 2D3.

191: Vanoirbeek E, Eelen G, Verlinden L, Marchal K, Engelen K, De Moor B, Beullens I, Marcelis S, De Clercq P, Bouillon R, Verstuyf A.

### **Microarray analysis of MCF-7 breast cancer cells treated with 1,25-dihydroxyvitamin D3 or a 17-methyl-D-ring analog. A**

Anticancer Res. 2009 Sep;29(9):3585-90.

**BACKGROUND:** 1alpha,25-Dihydroxyvitamin D3 [1,25-(OH)2D3] is the biological active form of vitamin D. Its antiproliferative capacities make it a potential drug to treat diseases such as cancer. The clinical use of 1,25-(OH)2D3 as an antiproliferative agent is hampered by its calcemic effects. Hence, structural analogs such as the seco-9,11-bisnor-17-methyl analog, WY1112, have been developed with superagonistic capacities. This study aims to distinct the molecular activities of 1,25-(OH)2D3 and WY1112 and identify possible differences in gene expression.

**MATERIALS AND METHODS:** Total RNA was extracted from MCF-7 breast cancer cells treated with 1,25-(OH)2D3 or WY1112 and was used for microarray analysis.

**RESULTS:** The experiments revealed that WY1112 induces the same genes as 1,25-(OH)2D3, but the induction level of the individual genes is higher. Microarray analysis did not reveal genes that were exclusively regulated by WY1112.

**CONCLUSION:** The superagonistic vitamin D analog WY1112 induces the same set of genes as 1,25-(OH)2D3, but the level of induction of the individual genes is higher.

### **Analisi con i microarray delle cellule mammary cancerose MCF-7trattate con 1,25-diidrossivitamina D3 o l'analogo 17-metil-D-ring**

**BACKGROUND:** 1alfa ,25-diidrossivitamina D3 [1,25 - (OH) 2D3], è la forma biologica attiva della vitamina D. Le sue capacità antiproliferativa ne fanno un potenziale farmaco per curare malattie come il cancro. L'uso clinico di 1,25 - (OH) 2D3 come agente antiproliferativo è ostacolata dai suoi effetti calcemici. Quindi, analoghi strutturali, come l'analogo seco-9,11-bisnor-17-metile, WY1112, sono stati sviluppati con capacità superagonistic. Questo studio mira a distinte le attività molecolare di 1,25 - (OH) 2D3 e WY1112 e individuare eventuali differenze di espressione genica.

**MATERIALI E METODI:** L'RNA totale è stato estratto da cellule del seno MCF-7 con tumore trattati con 1,25 - (OH) 2D3 o WY1112 ed è stato utilizzato per l'analisi microarray.

**RISULTATI:** Gli esperimenti hanno rivelato che WY1112 induce gli stessi geni 1,25 - (OH) 2D3, ma il livello di induzione dei singoli geni è maggiore. Analisi di Microarray non ha rivelato che i geni erano esclusivamente regolate da WY1112.

**CONCLUSIONE:** Il superagonistic WY1112 vitamina D analogico induce lo stesso set di geni come 1,25 - (OH) 2D3, ma il livello di induzione dei singoli geni è maggiore.

194: Flanagan JN, Zheng S, Chiang KC, Kittaka A, Sakaki T, Nakabayashi S, Zhao X, Spanjaard RA, Persons KS, Mathieu JS, Holick MF, Chen TC.

**Evaluation of 19-nor-2alpha-(3-hydroxypropyl)-1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 as a therapeutic agent for androgen-dependent prostate cancer.**

Anticancer Res. 2009 Sep;29(9):3547-53. Erratum in: Anticancer Res. 2010 Jan;30(1):277. AnticancerRes. 2010 Mar;30(3):1033.

The high incidence of prostate cancer and lack of an effective, long-term treatment for metastatic disease highlights the need for more potent non-calcemic vitamin D analogs as potential alternative or combinational prostate cancer therapies. Among the analogs, 19-nor-1alpha,25-dihydroxyvitamin D2 (19-nor-1alpha,25(OH)2D2) known as paricalcitol or Zempler, has less calcemic effects and an equipotential activity as 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 (1alpha,25(OH)2D3) in several in vivo and in vitro systems. It was recently demonstrated that a modified analog of paricalcitol, 19-nor-2alpha-(3-hydroxypropyl)-1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 (MART-10) compared to 1alpha,25(OH)2D3 was more effective in inhibiting proliferation of an immortalized normal prostate cell line (PZ-HPV-7) (1,000-fold) and invasion of PC-3 prostate cancer cells (10-fold). In this study, the effects of MART-10 and 1alpha,25(OH)2D3 on proliferation, vitamin D receptor transactivation, vitamin D-binding protein (DBP) binding, CYP24A1 (24-OHase) substrate hydroxylation kinetics, and induction of CYP24A1 gene expression were compared in an androgen-dependent prostate cancer cell model, LNCaP. The results demonstrated that MART-10 was 1,000-fold more active than 1alpha,25(OH)2D3 in inhibiting LNCaP cell proliferation. MART-10 was more active than 1alpha,25(OH)2D3 in up-regulating a vitamin D receptor-responsive Luciferase construct and inducing CYP24A1 gene expression in LNCaP prostate cancer cells. In addition, MART-10 has a lower affinity for DBP and less substrate degradation by CYP24A1 compared to 1alpha,25(OH)2D3, indicating that MART-10 has more bioavailability and a longer half-life. Thus, these data suggest that MART-10 may be a potential candidate as a therapeutic agent for prostate cancer, especially for patients who fail in conventional therapies.

**Valutazione di 19-nor-2alfa-(3-idrossipropil)-1alfa,25-diidrossivitamina D3 come agente terapeutico per il cancro prostatico dipendente dagli androgeni.**

L'alta incidenza di cancro alla prostata e la mancanza di un efficace trattamento a lungo termine per la malattia metastatica evidenzia la necessità di più potenti analoghi della vitamina D non calcemici come potenziale alternativa o combinatoria terapie del cancro alla prostata. Tra gli analoghi, 19-nor-1alfa ,25-diidrossivitamina D2 (19-nor-1alfa , 25 (OH) 2D2), noto come paricalcitol o Zempler, ha effetti meno calcemici e un'attività potenziale come D3 1alfa ,25-diidrossivitamina (1alfa , 25 (OH) 2D3) in diversi in vivo e in sistemi in vitro. E 'stato recentemente dimostrato che un analogo D3 modificata del paricalcitol, 19-nor-2alfa-(3-idrossipropil)-1alfa ,25-diidrossivitamina (MART-

10) rispetto al 1alfa, 25 (OH) 2D3 è risultato più efficace in inibendo la proliferazione di uno immortalato normale linea di cellule della prostata (PZ-HPV-7) (1.000 volte) e invasione delle cellule della prostata PC-3 cancro (10 volte). In questo studio, gli effetti del MART-10 e 1alfa, 25 (OH) 2D3 sulla proliferazione, la vitamina transattivazione del recettore D, la vitamina D proteina legante (DBP) vincolante, CYP24A1 (24-OHase) substrato cinetica idrossilazione e induzione di CYP24A1 espressione genica sono stati confrontati in un androgeno-dipendente modello delle cellule del cancro alla prostata, LNCaP. I risultati hanno dimostrato che il Mart-10 era 1.000 volte più attivo di 1alfa, 25 (OH) 2D3 in inibendo la proliferazione delle cellule LNCaP. MART-10 è stato più attivo di 1alfa, 25 (OH) 2D3 in up-regolazione di un recettore della vitamina D Luciferase-responsive costruire e indurre CYP24A1 espressione genica nelle cellule del cancro alla prostata LNCaP. Inoltre, MART-10 ha una minore affinità per il DBP e il degrado del substrato da CYP24A1 meno rispetto al 1alfa, 25 (OH) 2D3, indicando che la biodisponibilità MART-10 ha di più e più un tempo di dimezzamento. Pertanto, questi dati suggeriscono che MART-10 può essere un potenziale candidato come agente terapeutico per il cancro alla prostata, soprattutto per i pazienti che non riescono a terapie convenzionali.

196: Alvarez-Díaz S, Valle N, García JM, Peña C, Freije JM, Quesada V, Astudillo A, Bonilla F, López-Otín C, Muñoz A.

**Cystatin D is a candidate tumor suppressor gene induced by vitamin D in human colon cancer cells.**

J Clin Invest. 2009Aug;119(8):2343-58.

The active vitamin D metabolite 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 [1alpha,25(OH)2D3] has wide but not fully understood antitumor activity. A previous transcriptomic analysis of 1alpha,25(OH)2D3 action on human colon cancer cells revealed cystatin D (CST5), which encodes an inhibitor of several cysteine proteases of the cathepsin family, as a candidate target gene. Here we report that 1alpha,25(OH)2D3 induced vitamin D receptor (VDR) binding to, and activation of, the CST5 promoter and increased CST5 RNA and protein levels in human colon cancer cells. In cells lacking endogenous cystatin D, ectopic cystatin D expression inhibited both proliferation in vitro and xenograft tumor growth in vivo. Furthermore, cystatin D inhibited migration and anchorage-independent growth, antagonized the Wnt/beta-catenin signaling pathway, and repressed c-MYC expression. Cystatin D repressed expression of the epithelial-mesenchymal transition inducers SNAI1, SNAI2, ZEB1, and ZEB2 and, conversely, induced E-cadherin and other adhesion proteins. CST5 knockdown using shRNA abrogated the antiproliferative effect of 1alpha,25(OH)2D3, attenuated E-cadherin expression, and increased c-MYC expression. In human colorectal tumors, expression of cystatin D correlated with expression of VDR and E-cadherin, and loss of cystatin D correlated with poor tumor differentiation. Based on these data, we propose that CST5 has tumor suppressor activity that may contribute to the antitumoral action of 1alpha,25(OH)2D3 in colon cancer.

**Cistatina D è un gene candidato alla soppressione tumorale indotto dalla vitamina D nelle cellule umane del colon cancerose.**

Il metabolita attivo della vitamina D [1alfa, 25 (OH) 2D3] 1alfa ,25-diidrossivitamina D3 dispone di ampie attività antitumorale, ma non pienamente compreso. Una precedente analisi trascrittomico di 1alfa, 25 (OH) 2D3 azione sulle cellule umane di cancro del colon rivelato cistatina D (CST5), che codifica per un inibitore della proteasi cisteina diversi della famiglia catepsina, come un gene bersaglio candidato. Qui segnaliamo che 1alfa, 25 (OH) 2D3 indotto recettore della vitamina D (VDR) vincolanti, e l'attivazione di, il promotore CST5 CST5 e aumentato i livelli di RNA e

proteine nelle cellule umane di cancro del colon. Nelle cellule endogene manca cistatina D, espressione ectopica di cistatina D inibito sia la proliferazione in vitro e la crescita tumorale in vivo xenotrapianto. Inoltre, la cistatina D inibisce la migrazione e la crescita ancoraggio-indipendente, antagonizza la via Wnt / beta-catenina di segnalazione, e repressi espressione di c-myc. Cistatina D espressione repressa del induttori transizione epitelio-mesenchimale SNAI1, SNAI2, ZEB1, e ZEB2 e, viceversa, ha indotto E-caderina e altre proteine di adesione. atterramento CST5 utilizzando shRNA abrogata l'effetto antiproliferativo della 1alfa, 25 (OH) 2D3, attenuato l'espressione E-caderina, e un aumento di c-MYC espressione. In tumori umani del colon-retto, espressione della cistatina correlata con l'espressione di VDR e E-caderina, e la perdita di cistatina D correlati con scarsa differenziazione del tumore D. Sulla base di questi dati, noi proponiamo che CST5 ha attività di soppressore del tumore che possono contribuire all'azione antitumorale della 1alfa, 25 (OH) 2D3 nel cancro del colon.

197: Tuohimaa P, Keisala T, Minasyan A, Cachat J, Kalueff A.

### **Vitamin D, nervous system and aging.**

Psychoneuroendocrinology. 2009 Dec;34 Suppl 1:S278-86.

This is a mini-review of vitamin D(3), its active metabolites and their functioning in the central nervous system (CNS), especially in relation to nervous system pathologies and aging. The vitamin D(3) endocrine system consists of 3 active calcipherol hormones: calcidiol (25OHD(3)), 1alpha-calcitriol (1alpha,25(OH)2D(3)) and 24-calcitriol (24,25(OH)2D(3)). The impact of the calcipherol hormone system on aging, health and disease is discussed. Low serum calcidiol concentrations are associated with an increased risk of several chronic diseases including osteoporosis, cancer, diabetes, autoimmune disorders, hypertension, atherosclerosis and muscle weakness all of which can be considered aging-related diseases. The relationship of many of these diseases and aging-related changes in physiology show a U-shaped response curve to serum calcidiol concentrations. Clinical data suggest that vitamin D(3) insufficiency is associated with an increased risk of several CNS diseases, including multiple sclerosis, Alzheimer's and Parkinson's disease, seasonal affective disorder and schizophrenia. In line with this, recent animal and human studies suggest that vitamin D insufficiency is associated with abnormal development and functioning of the CNS. Overall, imbalances in the calcipherol system appear to cause abnormal function, including premature aging, of the CNS.

### **Vitamina D, sistema nervosa ed età.**

Questa è una mini-recensione di vitamina D (3), dei suoi metaboliti attivi e il loro funzionamento nel sistema nervoso centrale (SNC), specialmente in relazione alle patologie del sistema nervoso e l'invecchiamento. La vitamina D (3) sistema endocrino è composto da 3 ormoni attivi calcipherol: calcidiolo (25OHD (3)), 1alfa-calcitriolo (1alfa, 25 (OH) 2D (3)) e 24-calcitriolo (24,25 (OH) 2D (3)). L'impatto del sistema ormonale calcipherol in materia di invecchiamento, la salute e la malattia è discussa. Calcidiolo basse concentrazioni di siero sono associati ad un aumentato rischio di parecchie malattie croniche, tra cui l'osteoporosi, il cancro, diabete, malattie autoimmuni, ipertensione, aterosclerosi e debolezza muscolare di tutti che possono essere considerate malattie legate all'invecchiamento. Il rapporto di molte di queste malattie e le variazioni legate all'invecchiamento della popolazione in fisiologia mostrano una curva di risposta a forma di U per le concentrazioni sieriche di calcidiolo. I dati clinici suggeriscono che la vitamina D (3) L'insufficienza è associata ad un aumentato rischio di diverse patologie del SNC, tra cui la sclerosi multipla, l'Alzheimer e il morbo di Parkinson, disturbo affettivo stagionale e la schizofrenia. In linea con questo, animali e studi recenti suggeriscono che umano insufficienza di vitamina D è

associata ad anomalie dello sviluppo e il funzionamento del sistema nervoso centrale. Nel complesso, gli squilibri nel sistema calcipherol sembrano causare un funzionamento anomalo, tra cui l'invecchiamento precoce, del sistema nervoso centrale.

199: Khan QJ, Reddy PS, Kimler BF, Sharma P, Baxa SE, O'Dea AP, Klemp JR, Fabian CJ.

**Effect of vitamin D supplementation on serum 25-hydroxy vitamin D levels, joint pain, and fatigue in women starting adjuvant letrozole treatment for breast cancer.**

Breast Cancer Res Treat. 2010 Jan;119(1):111-8.

Vitamin D deficiency and insufficiency may contribute to musculoskeletal symptoms and bone loss observed in women taking aromatase inhibitors (AIs). This study was conducted to determine the prevalence of suboptimal vitamin D levels in women initiating adjuvant letrozole for breast cancer and to determine whether supplementation with 50,000 IU of vitamin D3 weekly could reduce musculoskeletal symptoms and fatigue in women who have suboptimal vitamin D levels. Sixty women about to begin an adjuvant AI were enrolled. Baseline 25OHD levels were obtained, and women completed symptom questionnaires. They were then started on letrozole, along with standard dose calcium and vitamin D. Four weeks later, women with baseline 25OHD levels  $\leq 40$  ng/ml started additional vitamin D3 supplementation at 50,000 IU per week for 12 weeks. 25OHD levels were re-assessed at 4, 10, and 16 weeks; the questionnaires were repeated at weeks 4 and 16. At baseline, 63% of women exhibited vitamin D deficiency ( $< 20$  ng/ml) or insufficiency (20-31 ng/ml). 25OHD levels  $> 40$  ng/ml were achieved in all 42 subjects who received 12 weeks of supplementation with 50,000 IU vitamin D3 weekly, with no adverse effects. After 16 weeks of letrozole, more women with 25OHD levels  $> 66$  ng/ml (median level) reported no disability from joint pain than did women with levels  $< 66$  ng/ml (52 vs. 19%;  $P = 0.026$ ). Vitamin D deficiency and insufficiency are prevalent in post-menopausal women initiating adjuvant AI. Vitamin D3 supplementation with 50,000 IU per week is safe, significantly increases 25OHD levels, and may reduce disability from AI-induced arthralgias.

**Effetti di un supplemento della vitamina D sui livelli sierici di 25-idrossi vitamina D, sui dolori articolari, e sulla fatica nelle donne che iniziano un trattamento per il cancro al seno con l'adiuvante letrozolo.**

La carenza di vitamina D e di insufficienza può contribuire a sintomi muscoloscheletrici e perdita di massa ossea osservata nelle donne che assumono inibitori dell'aromatasi (AIS). Questo studio è stato condotto per determinare la prevalenza di livelli subottimali di vitamina D nelle donne in avvio Letrozolo adiuvante per il carcinoma mammario e per determinare se la supplementazione con 50.000 UI di vitamina D3 settimanale potrebbe ridurre i sintomi muscolo-scheletriche e fatica nelle donne che hanno livelli di vitamina D non ottimale. Sessanta donne in procinto di iniziare un adiuvante AI sono stati arruolati. Livelli basali di 25OHD sono stati ottenuti, e le donne hanno compilato i questionari sintomo. Sono stati poi è iniziato il letrozolo, insieme al calcio dose standard e vitamina D. Quattro settimane più tardi, le donne con livelli basali 25OHD  $\leq 40$  ng / ml iniziato supplementazione di vitamina D3 supplementari a 50.000 UI a settimana per 12

settimane. livelli 25OHD sono stati riesaminati alla 4, 10, e 16 settimane, i questionari sono state ripetute alle settimane 4 e 16. Al basale, il 63% delle donne esposte deficit di vitamina D (<20 ng / ml) o insufficienza (20-31 ng / ml). 25OHD livelli > 40 ng sono stati raggiunti / ml in tutti i 42 soggetti che avevano ricevuto 12 settimane di supplementazione con 50.000 UI di vitamina D3 settimanali, senza effetti negativi. Dopo 16 settimane di letrozolo, le donne con livelli più 25OHD > 66 ng / ml (valore mediano) non ha riportato la disabilità da dolore articolare che hanno le donne con livelli <66 ng / ml (52 vs 19%, P = 0,026). La carenza di vitamina D e di insufficienza sono prevalenti nelle donne in post-menopausa avvio adiuvante AI. supplementazione con vitamina D3 50.000 UI a settimana è di sicuro, aumenta in modo significativo i livelli di 25OHD, e può ridurre la disabilità da AI-artralgie indotto.

201: Gocek E, Studzinski GP.

### **Vitamin D and differentiation in cancer.**

Crit Rev Clin Lab Sci. 2009;46(4):190-209.

This paper reviews the current understanding of the vitamin D-induced differentiation of neoplastic cells, which results in the generation of cells that acquire near-normal, mature phenotype. Examples of the criteria by which differentiation is recognized in each cell type are provided, and only those effects of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D(3) (1,25D) on cell proliferation and survival that are associated with the differentiation process are emphasized. The existing knowledge, often fragmentary, of the signaling pathways that lead to vitamin D-induced differentiation of colon, breast, prostate, squamous cell carcinoma, osteosarcoma, and myeloid leukemia cancer cells is outlined. The important distinctions between the different mechanisms of 1,25D-induced differentiation that are cell-type and cell-context specific are pointed out where known. There is a considerable body of evidence that the principal human cancer cells can be suitable candidates for chemoprevention or differentiation therapy with vitamin D. However, further studies are needed to fully understand the underlying mechanisms in order to improve the therapeutic approaches.

### **Vitamina D e differenziazione nel cancro.**

Questo articolo esamina l'attuale comprensione della vitamina D indotta la differenziazione delle cellule neoplastiche, che provoca la generazione di cellule che acquisiscono quasi normale, fenotipo maturo. Esempi di criteri con i quali è riconosciuta una differenziazione in ogni tipo cellulare sono forniti, e solo quegli effetti di 1alfa ,25-diidrossivitamina D (3) (1,25 D) sulla proliferazione cellulare e la sopravvivenza che sono associati con il processo di differenziazione sono accentuati. Le conoscenze attuali, spesso frammentari, delle vie di segnalazione che portano alla vitamina D differenziazione, indotta del colon, della mammella, della prostata, carcinoma a cellule squamose, l'osteosarcoma e leucemia mieloide cellule tumorali è delineato. Le importanti differenze tra i diversi meccanismi di 1,25 D differenziazione, indotta che sono cellule di tipo specifico di cellule e di contesto sono il luogo in cui noti. Vi è un notevole corpus di evidenze che le cellule tumorali umane principali possono essere candidati adatti per la chemioprevenzione o terapia di differenziazione con la vitamina D. Tuttavia, sono necessari ulteriori studi per comprendere appieno i meccanismi alla base, al fine di migliorare gli approcci terapeutici.

202: Pasquali M, Mandanici G, Conte C, Muci ML, Mazzaferro S.

**[Understanding the different functions of vitamin D].**

G Ital Nefrol. 2009 Jul-Aug;26 Suppl 46:53-7.

Exposure of the skin to sunlight is now considered the most important source of vitamin D in Western countries. It is presumed to contribute approximately two thirds of the total requirement, leaving the remaining one third to the few foods naturally rich in this vitamin. In the skin, vitamin D is synthesized as a cholesterol chain which undergoes structural modifications following exposure to UVB rays. Once produced in the skin or absorbed in the gut as cholecalciferol, vitamin D enters the blood to be transported by a specific vitamin D binding protein, which is synthesized in the liver and has a powerful buffering capacity. The transport system carries the metabolites to the sites of further activation (25-hydroxylation in the liver and 1alpha-hydroxylation in the kidney), ultimately resulting in the production of calcitriol. This last compound, now regarded as a hormone, circulates freely in minimal amounts and, compared with the other metabolites, shows the highest affinity for the vitamin D receptor (VDR). The mechanism of VDR activation is rather complex, resulting in either stimulation or inhibition of protein synthesis. Importantly, besides its presence in parathyroid, bone, kidney and intestine, this receptor has been demonstrated in several tissues, where its stimulation results in a reduced proliferation rate and increased differentiation. Accordingly, vitamin D is now regarded as a complex hormonal system, involved not only in the regulation of divalent ions and bone, but also in the proliferation and differentiation of numerous cell types with potential involvement in several diseases like cancer, immune diseases, diabetes, hypertension and heart failure.

**[Comprensione delle funzioni diverse della vitamina D].**

L'esposizione della pelle alla luce solare è oggi considerato il più importante fonte di vitamina D nei paesi occidentali. Si presume di contribuire circa due terzi del fabbisogno totale, lasciando il restante terzo a pochi alimenti naturalmente ricchi di questa vitamina. Nella pelle, la vitamina D viene sintetizzata come una catena di colesterolo che subisce modifiche strutturali in seguito all'esposizione ai raggi UVB. Una volta prodotta nella cute o assorbita nell'intestino come colecalciferolo, di vitamina D entra nel sangue per essere trasportato da una proteina specifica vitamina D, il che è sintetizzata nel fegato ed ha una potente capacità di buffering. Il sistema di trasporto porta i metaboliti per i siti di nuova attivazione (25-idrossilazione nel fegato e 1alfa-idrossilazione nel rene), che si traduce nella produzione di calcitriolo. Questo composto scorso, ora considerato come un ormone, circola liberamente e in quantità minime, in confronto con gli altri metaboliti, mostra la più alta affinità per il recettore della vitamina D (VDR). Il meccanismo di attivazione del VDR è piuttosto complessa, con conseguente sia stimolazione o inibizione della

sintesi proteica. Importante, oltre alla sua presenza in paratiroidi, le ossa, reni e intestino, questo recettore è stata dimostrata in diversi tessuti, dove i suoi risultati stimolazione in un ridotto tasso di proliferazione e differenziazione aumentata. Di conseguenza, la vitamina D è ora considerato come un complesso sistema ormonale, coinvolto non solo nella regolazione degli ioni bivalenti e ossa, ma anche nella proliferazione e la differenziazione di numerosi tipi di cellule con potenziale coinvolgimento in numerose malattie come il cancro, malattie autoimmuni, il diabete, ipertensione e insufficienza cardiaca.

204: Stelmaszuk T, Jałocha L, Wojtuń S, Gil J.

**[Chemoprevention of colorectal cancer].**

Pol Merkur Lekarski. 2009 May;26(155):565-8.

Gastrointestinal cancer poses a major clinical challenge in the developed world where the disease is common. Cancer chemoprevention is defined as the use of natural, synthetic or chemical agents to reverse, suppress or prevent carcinogenic progression to invasive cancer. The success of several clinical trials in preventing cancer in high-risk populations suggests that chemoprevention can be rational strategy. Besides, in population-based observational studies, people had lower rates of colorectal cancer if they were taking various agents, including nonsteroidal anti-inflammatory drugs, calcium, folate. Cyclooxygenase-2 inhibitors and NSAIDs reduce the incidence of colonic adenomas. However, these agents are associated with important cardiovascular events and gastrointestinal harms. Contemporary, the balance of benefits to risk does not favor chemoprevention in average-risk individuals.

**[Chemioprevenzione del cancro colonrettale].**

Cancro gastrointestinale rappresenta una grande sfida clinica nei paesi sviluppati dove la malattia è comune. Chemioprevenzione del cancro è definita come l'uso di agenti naturali, sintetici o chimici per invertire, sopprimere o prevenire la progressione cancerogena per cancro invasivo. Il successo di diversi studi clinici nella prevenzione del cancro in popolazioni ad alto rischio, suggerisce che la chemioprevenzione può essere la strategia razionale. Inoltre, in studi osservazionali basati sulla popolazione, la gente aveva una minore incidenza di cancro coloretale se fossero prendendo diversi agenti, compresi i farmaci anti-infiammatori, calcio, acido folico. Cicloossigenasi-2 inibitori e FANS riducono l'incidenza di adenomi del colon. Tuttavia, questi agenti sono associati ad importanti eventi cardiovascolari e di danni gastrointestinali. Contemporaneo, il saldo delle prestazioni a rischio non favorisce la chemioprevenzione in individuali a medio rischio.

205: Chakraborty A, Mishra AK, Soni A, Regina T, Mohil R, Bhatnagar D, Bhatnagar A, Chintamani C, Sharma PC, Saxena S.

**Vitamin D receptor gene polymorphism(s) and breast cancer risk in north Indians.**  
Cancer Detect Prev. 2009;32(5-6):386-94.

**BACKGROUND:** Vitamin D (1,25-dihydroxyVitamin D3) has shown experimentally anticarcinogenic effects and is thought to protect against breast cancer. The actions of Vitamin D are mediated via the Vitamin D receptor (VDR), and the polymorphisms at 3'UTR region of this gene are associated with the risk and progression of breast carcinoma. The current study is an attempt to examine the association of these variations with breast cancer risk in north Indians.

**METHODS:** A total of 160 cases and 140 control subjects were studied for the polymorphisms at 3' end of the VDR gene. A polymerase chain reaction-based restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method and fragment analysis was performed to determine ApaI and TaqI polymorphisms and variable length poly-A microsatellite repeats. Linkage disequilibrium (LD) was calculated for each pair of polymorphisms. Unadjusted and adjusted odds ratios for breast cancer with genotypes comprising the polymorphic sites were calculated to understand their role towards breast cancer susceptibility.

**RESULTS:** Patient's with long poly-A repeat showed a significant association with disease ( $\chi^2 = 9.52$ ,  $df = 2$ ,  $P \leq 0.01$ ). Compared to subjects having two S alleles (SS), odds ratios (and 95% CI) were 0.75 (0.45-1.23) and 2.49 (1.18-5.27) for subjects having genotypes SL and LL, respectively. Among matched pairs (age), the poly-A LL genotype was found significantly associated with increased risk of breast cancer among early-onset cases ( $P = 0.02$ ). The unconditional logistic regression analysis demonstrated a significant association between grade and LL genotype [(unadjusted odds ratio (95% CI): 4.45 (1.87, 10.63); adjusted odds ratio: 4.66 (1.88, 11.53)]. No significant association was observed for the VDR ApaI ( $\chi^2 = 1.00$ ,  $df = 2$ ,  $P = 0.60$ ) and TaqI polymorphism ( $\chi^2 = 0.35$ ,  $df = 2$ ,  $P = 0.83$ ). Although, strong LD was not observed among these polymorphic sites, it denies the total equilibrium at the same time. Based on haplotype distribution, the most common one observed among cases and controls was ATS while, genotype AATTLL had shown a significant association with the breast cancer risk ( $P = 0.02$ ).

**CONCLUSIONS:** The results indicate that the VDR poly-A polymorphism is significantly associated with breast cancer risk in north Indians especially with early onset disease. Although, ApaI and TaqI did not show any significant association with the disease when analyzed in isolation, but TaqI might modulate the risk associated with L alleles. Further, understanding the functional role of these variants residing on the VDR haplotype associated with disease susceptibility may suggest novel approaches for breast cancer prevention and therapy.

## **Polimorfismi del gene del recettore della vitamina D e rischio di cancro al seno negli Indiani del Nord.**

**BACKGROUND:** la vitamina D (1,25-diidrossivitamina D<sub>3</sub>), ha dimostrato sperimentalmente effetti anticancerogeni ed è pensato per proteggere contro il cancro al seno. Le azioni della vitamina D sono mediate attraverso il recettore della vitamina D (VDR), e la regione 3'UTR a polimorfismi di questo gene sono associate con il rischio e la progressione del carcinoma mammario. Il presente studio è un tentativo di esaminare l'associazione di queste variazioni con il rischio di cancro al seno negli indiani nord.

**METODI:** Un totale di 160 casi e 140 soggetti di controllo sono stati studiati per i polimorfismi a fine 3 'del gene VDR. Una reazione a catena della polimerasi a base di polimorfismo della lunghezza del frammento di restrizione (PCR-RFLP) metodo e analisi dei frammenti è stata eseguita per determinare i polimorfismi Apai e TaqI e di lunghezza variabile di poli-A ripete microsatelliti. Linkage disequilibrium (LD) è stata calcolata per ogni coppia di polimorfismi. Unadjusted e adeguati odds ratio per il cancro al seno con genotipi che comprende i siti polimorfici sono stati calcolati per capire il loro ruolo nei confronti suscettibilità del cancro al seno.

**RISULTATI:** paziente con lunghi poly-A ripetizione ha mostrato una significativa associazione con la malattia ( $\chi^2 = 9.52$ ,  $df = 2$ ,  $P < 0,01$ ). Rispetto ai soggetti che hanno due alleli S (SS), odds ratio (e 95% CI) sono stati 0,75 (0,45-1,23) e 2,49 (1,18-5,27) per i soggetti con genotipi SL e LL, rispettivamente. Tra le coppie di pari (età), il poli-A genotipo LL è stata trovata significativamente associato ad un aumentato rischio di cancro al seno tra i casi ad esordio precoce ( $p = 0,02$ ). L'analisi di regressione logistica ha dimostrato una significativa associazione tra genotipo grado e LL [(odds ratio aggiustato (95% CI): 4.45 (1.87, 10.63); odds ratio aggiustato: 4,66 (1,88, 11,53)] Nessuna associazione significativa è stata osservata per il Apai VDR ( $\chi^2 = 1.00$ ,  $df = 2$ ,  $P = 0,60$ ) e il polimorfismo TaqI ( $\chi^2 = 0.35$ ,  $df = 2$ ,  $P = 0,83$ ). Anche se, LD forte non è stata osservata tra questi siti polimorfici, nega equilibrio complessivo, allo stesso tempo. basato sulla distribuzione degli aplotipi, la più comune osservata tra i casi ed i controlli, mentre è stato ATS, genotipo AATTLL aveva mostrato una significativa associazione con il rischio di cancro al seno ( $P = 0,02$ ).

**CONCLUSIONI:** I risultati indicano che i poli VDR-Un polimorfismo è significativamente associato con il rischio di cancro al seno nelle indiani del Nord soprattutto con la malattia ad esordio precoce. Anche se, Apai e TaqI non ha mostrato alcuna significativa associazione con la malattia se analizzato in modo isolato, ma TaqI possano modulare il rischio associato con alleli L. Inoltre, la comprensione del ruolo funzionale di queste varianti residenti sul aplotipo VDR associati alla suscettibilità della malattia possono suggerire nuovi approcci per la prevenzione del cancro al seno e terapia.

211: Seckin D, Cerman AA, Yildiz A, Ergun T.

### **Can topical calcipotriol be a treatment alternative in actinic keratoses?**

A preliminary report. *J Drugs Dermatol.* 2009 May;8(5):451-4.

**BACKGROUND:** Recent research demonstrated that vitamin D, apart from calcium-related actions, has antiproliferative, prodifferentiative and immunomodulatory activities.

**OBJECTIVE:** To determine whether actinic keratoses may benefit from the antiproliferative and prodifferentiative effects of topical vitamin D.

**MATERIALS AND METHODS:** The study was an investigator-blinded, half-side comparison trial. Patients applied calcipotriol cream to one side and Ultrabase cream as placebo to the other side of the scalp and/or face for 12 weeks. The total number of actinic keratoses (AKs), diameters and total scores of the target lesions were determined at each visit.

**RESULTS:** Nine patients were included, eight of whom completed the treatment. There was a statistically significant difference between the total number of AKs at baseline and at week 12 on calcipotriol applied side whereas no difference was detected on placebo applied side ( $p = 0.028$  vs  $p = 1.00$ ). The mean total score of the target lesions reduced significantly at week 12 on calcipotriol side; however, no significant reduction was found on placebo side ( $p = 0.017$  vs  $p = 0.056$ ). Although side effects were more common on calcipotriol side, the difference was not statistically significant.

**CONCLUSION:** Topical calcipotriol may show promise in the treatment of actinic keratoses. More studies are needed to confirm its efficacy.

### **Può l'uso topico di calcipotriolo essere un trattamento alternativo nella cheratosi attinica?**

**BACKGROUND:** Recenti ricerche hanno dimostrato che la vitamina D, a parte le azioni di calcio-correlati, ha attività antiproliferativa, prodifferentiazione ed immunomodulanti.

**OBIETTIVO:** Per determinare se cheratosi attiniche possono beneficiare degli effetti antiproliferativi e prodifferentiative di vitamina D. attualità

**MATERIALI E METODI:** Lo studio è stato un investigatore cieco, confronto a metà lato processo. Pazienti hanno applicato la crema calcipotriolo da un lato e crema Ultrabase come placebo per l'altro lato del cuoio capelluto e / o del viso per 12 settimane. Il numero totale di cheratosi attiniche (AK), diametri e punteggio totale delle lesioni bersaglio sono stati determinati a ogni visita.

**RISULTATI:** Nove pazienti sono stati inclusi, di cui otto hanno completato il trattamento. Vi era una differenza statisticamente significativa tra il numero totale di AK al basale e alla 12 ° settimana il Calcipotriolo lato pratico, mentre nessuna differenza è stata rilevata sul lato placebo applicato ( $p = 0,028$  vs  $p = 1,00$ ). Il punteggio medio totale della lesione target ridotto in modo significativo alla settimana 12 sul lato calcipotriolo, tuttavia, nessuna riduzione significativa è stata trovata sul lato placebo ( $p = 0.017$  vs  $p = 0,056$ ). Anche se gli effetti collaterali sono stati più comuni sul lato

calcipotriolo, la differenza non era statisticamente significativa.  
CONCLUSIONE: calcipotriolo topico può mostrare promessa nel trattamento della cheratosi attinica. Ulteriori studi sono necessari per confermare la sua efficacia.

212: Larriba MJ, Martín-Villar E, García JM, Pereira F, Peña C, de Herreros AG, Bonilla F, Muñoz A.

**Snail2 cooperates with Snail1 in the repression of vitamin D receptor in colon cancer.** Carcinogenesis. 2009 Aug;30(8):1459-68.

Vitamin D receptor (VDR) mediates the antitumoral action of the active vitamin D metabolite 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D(3) (1,25(OH)(2)D(3)). VDR expression is lost during colon cancer progression causing unresponsiveness to 1,25(OH)(2)D(3) and its analogs. Previously, Snail1, an inducer of epithelial-to-mesenchymal transition (EMT), was reported to inhibit VDR expression. Here, we show that Snail2/Slug, but not other EMT inducers such as Zeb1, Zeb2, E47 or Twist1, represses VDR gene promoter. Moreover, Snail2 and Snail1 show additive repressing effect on VDR promoter. Snail2 inhibits VDR RNA and protein and blocks the induction of E-cadherin and an adhesive phenotype by 1,25(OH)(2)D(3). Snail2 reduces the ligand-induced VDR transcriptional activation of a consensus response element and of the CYP24 promoter. Concordantly, Snail2 inhibits the induction of CYP24 RNA and p21(CIP1), filamin A and vinculin proteins and the repression of c-MYC by 1,25(OH)(2)D(3). Additionally, Snail2 abrogates beta-catenin nuclear export and the antagonism of the transcriptional activity of beta-catenin-T-cell factor complexes by 1,25(OH)(2)D(3). SNAI2 expression is upregulated in 58% of colorectal tumors and correlates inversely with that of VDR. However, VDR downregulation is higher in tumors coexpressing SNAI2 and SNAI1 than in those expressing only one of these genes. Together, these data indicate that Snail2 and Snail1 cooperate for VDR repression in colon cancer.

**Snail2 coopera con Snail1 nella repressione del recettore della vitamina D receptor nel cancro al colon.**

Recettore della vitamina D (VDR) media l'azione antitumorale della 1 $\alpha$  attiva la vitamina D metabolita, 25-diidrossivitamina D (3) (1,25 (OH) (2) D (3)). Espressione di VDR è persa durante la progressione del tumore del colon provocando insensibilità a 1,25 (OH) (2) D (3) e suoi analoghi. In precedenza, Snail1, un induttore di transizione epitelio-to-mesenchimale (EMT), è stato segnalato per inibire l'espressione di VDR. Qui, indichiamo che induttori EMT Snail2/Slug, ma non altri, come Zeb1, Zeb2, E47 o Twist1, reprime promotore del gene VDR. Inoltre, Snail2 e Snail1 show effetto additivo sulla repressione promotore VDR. Snail2 inibisce VDR RNA e proteine e blocca l'induzione di E-caderina e un fenotipo adesivo da 1,25 (OH) (2) D (3). Snail2 riduce il ligando indotta VDR attivazione trascrizionale di un elemento di risposta del consenso e del promotore CYP24. Concordemente, Snail2 inibisce l'induzione di CYP24 RNA e p21 (CIP1), filamina proteine A e vinculin e la repressione di c-myc di 1,25 (OH) (2) D (3). Inoltre, Snail2 abroga beta-

catenina esportazione nucleare e l'antagonismo delle attività trascrizionale di complessi di fattore beta-catenina-T-cell da 1,25 (OH) (2) D (3). Espressione SNAI2 è up-regolato nel 58% dei tumori del colon-retto e inversamente correlata con quella di VDR. Tuttavia, down-regulation VDR è più alto nei tumori coexpressing SNAI2 e SNAI1 rispetto a quelli che esprimono solo uno di questi geni. Insieme, questi dati indicano che Snail2 e Snail1 collaborare per la repressione VDR nel cancro del colon.

212: Penna-Martinez M, Ramos-Lopez E, Stern J, Hinsch N, Hansmann ML, Selkinski I, Grünwald F, Vorländer C, Wahl RA, Bechstein WO, Zeuzem S, Holzer K, Badenhoop K.

### **Vitamin D receptor polymorphisms in differentiated thyroid carcinoma.**

Carcinogenesis. 2009 Aug;30(8):1459-68.

**BACKGROUND:** Vitamin D receptor (VDR) expression has been shown to be upregulated in several tumors and is supposed to represent an important endogenous response to tumor progression. To investigate the role of the VDR gene and its influence on 25(OH)D(3) and 1,25(OH)(2)D(3) plasma levels in thyroid carcinoma, we analyzed four VDR polymorphisms in patients and healthy controls (HC).

**METHODS:** Patients with thyroid carcinoma (n = 172) (n = 132 for papillary and n = 40 for follicular) and HC (n = 321) were genotyped for the ApaI (rs7975232), TaqI (rs731236), BsmI (rs1544410), and FokI (rs10735810) polymorphisms within the VDR gene and correlated with 25(OH)D(3) and 1,25(OH)(2)D(3) plasma levels.

**RESULTS:** The genotypes AA of the ApaI (rs7975232) and FF of the FokI (rs10735810) polymorphisms were significantly less frequent (12.5% vs. 35.2% and 25% vs. 42.1%, respectively, both corrected p [p(c)] = 0.04) in patients with follicular thyroid cancer (FTC) than in HC. Additionally, the haplotypes, Ta (57.5% vs. 41.4%; p(c) = 0.0207), af (24.6% vs. 14.3%; p(c) = 0.0116), Tab (51.1% vs. 36.8%; p(c) = 0.0495), and Tabf (18.7% vs. 13.6%; p(c) = 0.0240) were more frequent, whereas the haplotypes AF (17.1% vs. 37.2%; p(c) = 0.0008), BF (11.4% vs. 31.9%; p(c) = 0.012), tF (7.9% vs. 25.5%; p(c) = 0.0016), and tABF (7.6% vs. 23%; p(c) = 0.0115) were less frequent in the FTC patients compared to HC. Neither genotype nor haplotype frequencies differed between patients with papillary thyroid cancer (PTC) and HC. Further, individuals with PTC and FTC had a significantly lower level of circulating 1,25(OH)(2)D(3) compared to controls. In contrast, no differences of the 25(OH)D(3) concentration between patients and HC were observed. VDR polymorphisms were not associated with 25(OH)D(3) and 1,25(OH)(2)D(3) plasma levels.

**CONCLUSIONS:** Lower circulating levels of 1,25(OH)(2)D(3) are observed in patients with differentiated thyroid carcinoma. Further, while the alleles AA and FF of the ApaI (rs7975232) and FokI (rs10735810) VDR polymorphisms and the haplotype tABF confer to protection from follicular carcinoma, the haplotype Tabf appeared to be associated with an increased FTC risk. Since this is the first report associating VDR polymorphisms with thyroid carcinoma, these findings need to be confirmed in studies with larger numbers of patients.

### **Polimorfismi del recettore della vitamina D nel carcinoma differenziato della tiroide.**

**BACKGROUND:** recettore della vitamina D (VDR) espressione ha dimostrato di essere up-regolato nei tumori diversi e dovrebbe rappresentare una risposta importante endogeno alla progressione del tumore. Per studiare il ruolo del gene VDR e la sua influenza su 25 (OH) D (3) e 1,25 (OH) (2) D (3) i livelli plasmatici di carcinoma tiroideo, abbiamo analizzato quattro polimorfismi di VDR in pazienti e controlli sani (HC). **METODI:** I pazienti con carcinoma della tiroide (n = 172) (n = 132 per papillari e n = 40 per follicolare) e HC (n = 321) sono stati sottoposti a genotipizzazione per la Apai (rs7975232), TaqI (rs731236), BSMI (rs1544410), e FokI (rs10735810) polimorfismi all'interno del gene VDR e correlata con 25 (OH) D (3) e 1,25 (OH) (2) D (3) livelli plasmatici.

**RISULTATI:** I genotipi AA del Apai (rs7975232) e FF del FokI (rs10735810) polimorfismi erano significativamente meno frequenti (12,5% vs 35,2% e 25% vs 42,1%, rispettivamente, entrambe corrette p [p (c)] = 0,04) nei pazienti con cancro follicolare della tiroide (FTC) che in HC. Inoltre, gli aplotipi, Ta (57,5% vs 41,4%, p (c) = 0,0,207 mila), AF (24,6% vs 14,3%, p (c) = 0,0,116 mila), Tab (51,1% vs 36,8%, p (c) = 0,0,495 mila), e Tabf (18,7% vs 13,6%, p (c) = 0,0,24 mila) sono stati più frequenti, mentre gli aplotipi AF (17,1% vs 37,2%, p (c) = 0,0008), BF (11,4 % vs 31,9%, p (c) = 0,012), tF (7,9% vs 25,5%, p (c) = 0,0016), e tABF (7,6% vs 23%, p (c) = 0,0,115 mila) sono stati meno frequente nei pazienti FTC rispetto a HC. Né frequenze genotipiche né aplotipo differivano tra i pazienti con tumore papillare della tiroide (PTC) e HC. Inoltre, gli individui con PTC e FTC ha avuto un livello significativamente più basso di circolazione 1,25 (OH) (2) D (3) rispetto ai controlli. Al contrario, nessuna differenza di (OH) D 25 (3) operazione di concentrazione tra i pazienti e HC sono stati osservati. Polimorfismi di VDR non sono stati associati con 25 (OH) D (3) e 1,25 (OH) (2) D (3) livelli plasmatici.

**CONCLUSIONI:** Abbassare i livelli circolanti di 1,25 (OH) (2) D (3) sono stati osservati nei pazienti con carcinoma differenziato della tiroide. Inoltre, mentre l'AA e FF alleli del Apai (rs7975232) e FokI (rs10735810) VDR polimorfismi e l'aplotipo tABF conferiscono alla protezione da carcinoma follicolare, l'aplotipo Tabf sembra essere associato ad un aumentato rischio FTC. Poiché questo è il primo rapporto l'associazione dei polimorfismi VDR con carcinoma della tiroide, questi risultati devono essere confermati in studi con un numero maggiore di pazienti.

215: Tachibana S, Yoshinari K, Chikada T, Toriyabe T, Nagata K, Yamazoe Y.

### **Involvement of Vitamin D receptor in the intestinal induction of human ABCB1.**

Drug Metab Dispos. 2009 Aug;37(8):1604-10.

ABCB1 (P-glycoprotein) is an efflux transporter that limits the cellular uptake levels of various drugs in intestine, brain, and other tissues. The expression of human ABCB1 has recently been reported to be under the control of nuclear receptor NR1I subfamily members, pregnane X receptor (PXR, NR1I2) and constitutive androstane receptor (CAR, NR1I3). Here, we have investigated the involvement of another NR1I member, vitamin D receptor (VDR, NR1I1), in ABCB1 expression. In the human colorectal adenocarcinoma cell line LS174T, which abundantly expresses VDR, both 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D(3) (1,25-VD3) and lithocholic acid (LCA) increased ABCB1 mRNA levels. Reporter gene assays in LS174T cells with constructs containing various lengths of the ABCB1 regulatory region revealed that the region containing multiple nuclear receptor binding motifs located at -7.8 kilobases [termed nuclear receptor-responsive module (NURREM)], to which PXR and CAR also bind, is essential for the VDR-mediated ABCB1 transactivation. Further reporter assays with constructs containing truncated NURREM and gel shift assays suggested simultaneous binding of multiple VDR/retinoid X receptor alpha heterodimers to NURREM. Furthermore, knockdown of VDR expression in LS174T cells blocked the LCA- and the 1,25-VD3-induced transcription of ABCB1 reporter genes. In human hepatoma HepG2 cells, in contrast with LS174T cells, 1,25-VD3 activated the ABCB1 transcription only in the presence of ectopically expressed VDR. These results suggest that the NR1I subfamily members regulate the ABCB1 expression sharing the binding sites within NURREM and that the physiologically produced LCA and 1,25-VD3 may modulate the ABCB1 expression in human intestines, possibly associated with interindividual variations of ABCB1 expression.

### **Coinvolgimento di recettore della vitamina D nella induzione intestinale di ABCB1 umano.**

ABCB1 (P-glicoproteina) è un trasportatore di efflusso che limita i livelli di assorbimento cellulare di vari farmaci in intestino, cervello e altri tessuti. L'espressione di umana ABCB1 recentemente è stato segnalato per essere sotto il controllo del recettore nucleare membri sottofamiglia NR1I, pregnano recettore X (PXR, NR1I2) e costitutiva del recettore androstano (CAR, NR1I3). Qui, abbiamo studiato il coinvolgimento di un altro membro NR1I, recettore della vitamina D (VDR, NR1I1), in ABCB1 espressione. Nella linea cellulare di adenocarcinoma del colon umano LS174T, che esprime abbondantemente VDR, sia 1 $\alpha$ ,25-diidrossivitamina D (3) (1,25-VD3) e acido lithocholic (LCA) è aumentato ABCB1 livelli di mRNA. Analisi del gene reporter in cellule

LS174T con costrutti contenenti diverse lunghezze della regione ABCB1 normativo ha rivelato che la regione contenente molteplici motivi recettore di legame nucleare situato a -7,8 kilobasi [chiamato recettore nucleare modulo-reattiva (NURREM)], a cui PXR e CAR anche associare, è essenziale per la transattivazione VDR-mediata ABCB1. Ulteriori saggi reporter con costrutti contenenti troncato NURREM e saggi di gel shift suggerito simultanea del VDR multiple / retinoidi X eterodimeri recettore alfa per NURREM.

Inoltre, colpo di espressione VDR nelle cellule LS174T bloccato il LCA e il 1,25-VD3-trascrizione indotto di ABCB1 geni reporter. Nelle cellule umane HepG2 epatocarcinoma, in contrasto con le cellule LS174T, 1,25-VD3 attivata la trascrizione ABCB1 solo in presenza di ectopicamente espresso VDR. Questi risultati suggeriscono che i membri della sottofamiglia NR1I regolare l'espressione ABCB1 condividere i siti di legame all'interno NURREM e che il prodotto fisiologicamente LCA e 1,25-VD3 possono modulare l'espressione ABCB1 in intestini umani, eventualmente associata a variazioni interindividuali di ABCB1 espressione.

217: Cross HS, Kallay E.

### **Regulation of the colonic vitamin D system for prevention of tumor progression: an update.**

Future Oncol. 2009 May;5(4):493-507.

A compromised vitamin D status and nutritional calcium deficit are linked with sporadic colorectal cancer incidence. 25(OH)D(3) serum concentration is a major determinant of 1,25-dihydroxyvitamin D3 (1,25[OH](2)D(3)) synthesis in colonic mucosa, which expresses the vitamin D receptor and both the synthesizing (CYP27B1) and catabolic (CYP24A1) hydroxylases. Receptor-bound, 1,25(OH)(2)D(3) regulates proliferation, differentiation and apoptosis in an autocrine/paracrine manner. During early malignancy 1,25(OH)(2)D(3) synthesis is often enhanced to counteract hyperproliferation. In many advanced tumors, vitamin D catabolism surpasses synthesis. In vivo, expression and activity of CYP27B1 and vitamin D receptor are stimulated by (phyto)estrogens. Conversely, low nutritional calcium and folate enhance vitamin D catabolism. These insights could explain the lower colorectal cancer incidence in females, the chemopreventive potency of vitamin D and calcium against colorectal cancer, and the benefit of nutritional folate as a methyl donor for epigenetic regulation of the vitamin D system.

### **Regolazione del sistema del colon vitamina D per la prevenzione della progressione del tumore: un aggiornamento.**

Un compromesso stato della vitamina D e calcio deficit nutrizionale sono legati con sporadici incidenza di cancro del colon-retto. 25 (OH) D (3) concentrazione sierica è un fattore determinante di 1,25-diidrossivitamin D3 (1,25 [OH] (2) D (3)) in sintesi mucosa del colon, che esprime il recettore della vitamina D e sia il sintetizzando (CYP27B1) e catabolici (CYP24A1) idrossilasi. Recettore-bound, 1,25 (OH) (2) D (3) regola la proliferazione, la differenziazione e l'apoptosi in modo autocrino / paracrino. Durante la malignità precoce 1,25 (OH) (2) D (3) sintesi è spesso rafforzata per contrastare iperproliferazione. In molti tumori in stadio avanzato, la vitamina D catabolismo supera sintesi. In vivo, l'espressione e l'attività di CYP27B1 e recettore della vitamina D sono stimulate da (fito) estrogeni. Al contrario, bassi livelli di calcio nutrizionale e folati aumentare il catabolismo della vitamina D. Queste intuizioni potrebbe spiegare la minore incidenza del cancro del colon-retto nelle femmine, la potenza chemiopreventivi di vitamina D e calcio contro il cancro del colon-retto, e il beneficio di folato nutrizionale come donatore di metile per la regolazione epigenetica del sistema vitamina D.

218: Tuohimaa P.

### **Vitamin D and aging.**

J Steroid Biochem Mol Biol. 2009 Mar;114(1-2):78-84.

Recent studies using genetically modified mice, such as FGF23<sup>-/-</sup> and Klotho<sup>-/-</sup> mice that exhibit altered mineral homeostasis due to a high vitamin D activity showed features of premature aging that include retarded growth, osteoporosis, atherosclerosis, ectopic calcification, immunological deficiency, skin and general organ atrophy, hypogonadism and short lifespan. The phenotype reversed by normalizing vitamin D and/or mineral homeostasis. Thus, hypervitaminosis D due to an increased 1 $\alpha$ -hydroxylase activity seems to be a cause of the premature aging. In several studies, we have described that a complete or partial lack of vitamin D action (VDR<sup>-/-</sup> mice and CYP27B1<sup>-/-</sup>) show almost similar phenotype as FGF23<sup>-/-</sup> or Klotho<sup>-/-</sup> mice. VDR mutant mice have growth retardation, osteoporosis, kyphosis, skin thickening and wrinkling, alopecia, ectopic calcification, progressive loss of hearing and balance as well as short lifespan. CYP27B1<sup>-/-</sup> mice do not show alopecia nor balance deficit, which might be apoVDR-dependent or calcidiol-dependent. The features are typical to premature aging. The phenotype is resistant to a normalization of the mineral homeostasis by a rescue diet containing high calcium and phosphate. Taken together, aging shows a U-shaped dependency on hormonal forms of vitamin D suggesting that there is an optimal concentration of vitamin D in delaying aging phenomena. Our recent study shows that calcidiol is an active hormone. Since serum calcidiol but not calcitriol is fluctuating in physiological situations, calcidiol might determine the biological output of vitamin D action. Due to its high serum concentration and better uptake of calcidiol-DBP by the target cells through the cubilin-megalin system, calcidiol seems to be an important circulating hormone. Therefore, serum calcidiol might be associated with an increased risk of aging-related chronic diseases more directly than calcitriol. Aging and cancer seem to be tightly associated phenomena. Accumulation of damage on DNA and telomeres cause both aging and cancer, moreover the signalling pathways seem to converge on tumour suppressor protein, p53, which seems to be regulated by vitamin D. Also, the insulin-like growth factor signalling pathway (IGF-1, IGF-BPs, IGF-R) and fibroblast growth factor-23 (FGF-23) regulate growth, aging and cancer. Vitamin D can regulate these signalling pathways, too. Also NF-kappaB and telomerase reverse transcriptase (TERT) might be molecular mechanisms mediating vitamin D action in aging and cancer. Calcidiol serum concentrations show a U-shaped risk of prostate cancer suggesting an optimal serum concentration of 40-60 nmol/L for the lowest cancer risk. Therefore, it is necessary to study several common aging-associated diseases such as osteoporosis, hypertension and diabetes known to be vitamin D-dependent before any recommendations of an optimal serum concentration of calcidiol are given.

### **La vitamina D e l'invecchiamento.**

Recenti studi utilizzando topi geneticamente modificati, come FGF23<sup>-/-</sup> - e Klotho<sup>-/-</sup> - i topi che presentano alterata omeostasi minerale a causa di una elevata attività di vitamina D ha mostrato le

caratteristiche di invecchiamento precoce che includono un ritardo nella crescita, osteoporosi, aterosclerosi, calcificazione ectopica, deficit immunologici, la pelle e l'atrofia degli organi generale, ipogonadismo e vita breve. Il fenotipo invertito normalizzando vitamina D e / o omeostasi minerale. Così, ipervitaminosi a causa di un aumento di attività 1 $\alpha$ -idrossilasi D sembra essere una causa del precoce invecchiamento. In diversi studi, che abbiamo descritto che la mancanza totale o parziale di azione della vitamina D (VDR-/- e topi CYP27B1-/-) mostrano quasi fenotipo simile come FGF23-/- o Klotho-/- topi. VDR topi mutanti hanno un ritardo di crescita, osteoporosi, cifosi, ispessimento della pelle e rughe, alopecia, calcificazione ectopica, la perdita progressiva dell'udito e dell'equilibrio, nonché breve durata di vita. CYP27B1-/- i topi non mostrano né alopecia deficit della bilancia, che potrebbe essere apoVDR-dipendente o calcidiolo-dipendenti. Le caratteristiche sono tipiche di invecchiamento precoce. Il fenotipo è resistente ad una normalizzazione della omeostasi minerale da una dieta di salvataggio che contengono calcio e fosfato alto. Nel loro insieme, l'invecchiamento della mostra una dipendenza a forma di U sulle forme ormonale della vitamina D che suggerisce che vi è una concentrazione ottimale di vitamina D nel ritardare i fenomeni di invecchiamento. Il nostro studio recente mostra che calcidiolo è un ormone attivo. Dal calcitriolo calcidiolo siero, ma non è fluttuante in situazioni fisiologiche, calcidiolo potrebbe determinare la produzione biologica della vitamina D azione. Grazie alla sua elevata concentrazione sierica e una migliore diffusione delle calcidiolo-DBP da parte delle cellule bersaglio attraverso il sistema cubilin-megalina, calcidiolo sembra essere un importante ormone circolante. Pertanto, calcidiolo siero potrebbe essere associato ad un aumentato rischio di malattie croniche legate all'invecchiamento della popolazione più direttamente calcitriolo. Invecchiamento e il cancro sembrano essere strettamente associati fenomeni. L'accumulo di danni al DNA e telomeri causare sia l'invecchiamento e cancro, inoltre le vie di segnalazione sembrano convergere su proteina soppressore tumorale, p53, che sembra essere regolato dalla vitamina D. Inoltre, la via del fattore di crescita insulino-simile di segnalazione (IGF-1, IGFBP, IGFR) e del fattore di crescita dei fibroblasti-23 (FGF-23) regolano la crescita, l'invecchiamento e il cancro. La vitamina D può regolare queste vie di segnalazione, anche. Anche NF-kB e trascrittasi inversa della telomerasi (TERT) potrebbe essere meccanismi molecolari che mediano l'azione della vitamina D in invecchiamento e il cancro. Concentrazioni sieriche calcidiolo presentano un rischio a forma di U di cancro alla prostata suggeriscono una concentrazione ottimale di siero di 40-60 nmol / L per il rischio più basso di cancro. Pertanto, è necessario studiare molte malattie comuni età-associate come l'osteoporosi, l'ipertensione e il diabete noto che la vitamina D-dipendente prima che le raccomandazioni di una concentrazione sierica ottimale di calcidiolo sono dati.

221:Amano Y, Cho Y, Matsunawa M, Komiyama K, Makishima M.

**Increased nuclear expression and transactivation of vitamin D receptor by the cardiotonic steroid bufalin in human myeloid leukemia cells.**

J Steroid Biochem Mol Biol. 2009 Apr;114(3-5):144-51.

The active form of vitamin D(3), 1alpha,25-dihydroxyvitamin D(3) [1,25(OH)(2)D(3)], is a potent ligand for the nuclear receptor vitamin D receptor (VDR) and induces myeloid leukemia cell differentiation. The cardiotonic steroid bufalin enhances vitamin D-induced differentiation of leukemia cells and VDR transactivation activity. In this study, we examined the combined effects of 1,25(OH)(2)D(3) and bufalin on differentiation and VDR target gene expression in human leukemia cells. Bufalin in combination with 1,25(OH)(2)D(3) enhanced the expression of VDR target genes, such as CYP24A1 and cathelicidin antimicrobial peptide, and effectively induced differentiation phenotypes. An inhibitor of the Erk mitogen-activated protein (MAP) kinase pathway partially inhibited bufalin induction of VDR target gene expression. 1,25(OH)(2)D(3) treatment induced transient nuclear expression of VDR in HL60 cells. Interestingly, bufalin enhanced 1,25(OH)(2)D(3)-induced nuclear VDR expression. The MAP kinase pathway inhibitor increased nuclear VDR expression induced by 1,25(OH)(2)D(3) and did not change that by 1,25(OH)(2)D(3) plus bufalin. A proteasome inhibitor also enhanced 1,25(OH)(2)D(3)-induced CYP24A1 expression and nuclear VDR expression. Bufalin-induced nuclear VDR expression was associated with histone acetylation and VDR recruitment to the CYP24A1 promoter in HL60 cells. Thus, the Na(+),K(+)-ATPase inhibitor bufalin modulates VDR function through several mechanisms, including Erk MAP kinase activation and increased nuclear VDR expression.

**Aumento della espressione nucleare e transattivazione del recettore della vitamina D da parte del cardiotonico bufalin steroide in cellule umane di leucemia mieloide.**

La forma attiva della vitamina D (3), 1alfa ,25-diidrossivitamina D (3) [1,25 (OH) (2) D (3)], è un ligando potente per il recettore nucleare del recettore della vitamina D (VDR) e induce la differenziazione delle cellule mieloidi di leucemia. Il bufalin cardiotonico steroide aumenta la vitamina D indotta la differenziazione delle cellule leucemiche e di attività di transattivazione VDR. In questo studio, abbiamo esaminato gli effetti combinati di 1,25 (OH) (2) D (3) e bufalin sulla differenziazione e la destinazione di espressione del gene VDR nelle cellule di leucemia umana. Bufalin in combinazione con 1,25 (OH) (2) D (3) rafforzata l'espressione di geni bersaglio VDR, come CYP24A1 e catelicidina peptidi antimicrobici, e fenotipi differenziazione efficace indotta. Un inibitore della proteina Erk mitogeno-attivata (MAP) pathway della chinasi inibita parzialmente bufalin induzione dell'espressione del gene bersaglio VDR. 1,25 (OH) (2) D (3) il trattamento ha indotto l'espressione transiente nucleare di VDR nelle cellule HL60. È interessante notare che

bufalin avanzata 1,25 (OH) (2) D (3)-indotta espressione nucleare VDR. Il percorso MAP chinasi maggiore espressione nucleare VDR indotta dalla 1,25 (OH) (2) D (3) e non ha modificato che da 1,25 (OH) (2) D (3) bufalin plus. Un inibitore del proteasoma anche migliorato 1,25 (OH) (2) D (3)-indotta CYP24A1 espressione e di espressione VDR nucleare. Bufalin indotta espressione di VDR nucleare è stato associato ad acetilazione degli istoni e di assunzione VDR al promotore CYP24A1 in cellule HL60. Così, il Na (+), K (+)-ATPasi bufalin inibitore VDR modula la funzione attraverso meccanismi diversi, inclusa l'attivazione Erk MAP chinasi e una maggiore espressione nucleare VDR.

222.: Marchionatti AM, Picotto G, Narvaez CJ, Welsh J, Tolosa de Talamoni NG.

### **Antiproliferative action of menadione and 1,25(OH)2D3 on breast cancer cells.**

JSteroid Biochem Mol Biol. 2009 Feb;113(3-5):227-32.

Calcitriol or 1,25(OH)(2)D(3) is a negative growth regulator of MCF-7 breast cancer cells. The growth arrest is due to apoptosis activation, which involves mitochondrial disruption. This effect is blunted in vitamin D resistant cells (MCF-7(DRes) cells). Menadione (MEN), a glutathione (GSH)-depleting compound, may potentiate antitumoral effects of anticancer drugs. The aim of this study was to investigate whether MEN enhances cellular responsiveness of MCF-7 cells to 1,25(OH)(2)D(3). Cells were cultured and treated with different concentrations of 1,25(OH)(2)D(3)+/-MEN or vehicle for 96 h. GSH levels and the activity of antioxidant enzymes were determined by spectrophotometry and ROS production by flow cytometry. Both drugs decreased growth and enhanced ROS in MCF-7 cells, obtaining the maximal effects when 1,25(OH)(2)D(3) was combined with MEN (P<0.01 vs. Control and vs. each compound alone). MCF-7(DRes) cells were not responsive to 1,25(OH)(2)D(3), but the cell proliferation was slightly inhibited by the combined treatment. Calcitriol and MEN separately enhanced antioxidant enzyme activities, but when they were used in combination, the effect was more pronounced (P<0.05 vs. Control and vs. each compound alone). MEN, calcitriol and the combined treatment decreased GSH levels (P<0.05 vs. Control). The data indicate that MEN potentiates the effect of 1,25(OH)(2)D(3) on growth arrest in MCF-7 cells by oxidative stress and increases the activities of antioxidant enzymes, probably as a compensatory mechanism.

### **Azione antiproliferativa di menadione e 1,25 (OH) 2D3 sulle cellule di cancro al seno.**

Calcitriolo o 1,25 (OH) (2) D (3) è un regolatore negativo di crescita delle cellule del seno MCF-7 il cancro. L'arresto della crescita è dovuta alla attivazione dell'apoptosi, che comporta disagi mitocondriale. Questo effetto è attenuato di vitamina D le cellule resistenti (MCF-7 (DRE), le cellule). Menadione (MEN), un glutatione (GSH) che riducono l'composto, può potenziare gli effetti antitumorali dei farmaci antitumorali. Lo scopo di questo studio era di indagare se gli uomini aumenta la reattività cellulare di cellule MCF-7 a 1,25 (OH) (2) D (3). Cellule sono coltivate e trattate con differenti concentrazioni di 1,25 (OH) (2) D (3) + /-MEN o un veicolo per 96 h. I livelli di GSH e l'attività degli enzimi antiossidanti sono state determinate mediante spettrofotometria e produzione di ROS mediante citometria a flusso. Entrambi i farmaci hanno ridotto la crescita e una maggiore ROS in cellule MCF-7, ottenendo il massimo effetto quando la 1,25 (OH) (2) D (3) è stato combinato con altri uomini (P <0,01 vs Controllo e contro ogni composto da solo). MCF-7 (DRE), le cellule non sono sensibili alle 1,25 (OH) (2) D (3), ma la proliferazione delle cellule è stato leggermente inibita dal trattamento combinato. Calcitriolo e UOMINI separatamente maggiore attività degli enzimi antiossidanti, ma quando sono stati usati in combinazione, l'effetto è stato più pronunciato (P <0.05 vs controllo e contro ciascuno composto da solo). UOMINI, calcitriolo e il

trattamento combinato ha ridotto i livelli di GSH ( $P < 0.05$  vs controllo). I dati indicano che MEN potenzia l'effetto della 1,25 (OH) (2) D (3) su arresto della crescita in cellule MCF-7 da stress ossidativo ed aumenta l'attività degli enzimi antiossidanti, probabilmente come meccanismo compensatorio.

225: McCullough ML, Bostick RM, Mayo TL.

### **Vitamin D gene pathway polymorphisms and risk of colorectal, breast, and prostate cancer.**

Annu Rev Nutr. 2009;29:111-32.

Higher vitamin D exposure is hypothesized to prevent several cancers, possibly through genomic effects modulated by the vitamin D receptor (VDR), and autocrine/paracrine metabolism of the VDR's ligand, 1alpha,25-(OH)(2)-vitamin D. Herein we review the background and evidence to date on associations between polymorphisms in VDR and selected genes in the vitamin D pathway in relation to colorectal, breast, and prostate cancer. Although most studies to date have examined only a few VDR polymorphisms, more are beginning to comprehensively investigate polymorphisms in the VDR as well as in other vitamin D pathway genes, such as the vitamin D-binding protein gene (Gc) and CYP27B1 and CYP24A1, which code for enzymes that, respectively, synthesize and degrade 1alpha,25-(OH)(2)-vitamin D. Currently, there is no strong, consistent epidemiologic evidence for substantial influences of single variants in vitamin D pathway genes on risk for colorectal, breast, or prostate cancer, but promising leads are developing.

### **Via della vitamina D polimorfismi e il rischio di cancro del colon-retto, della mammella e della prostata.**

Maggiore esposizione vitamina D è ipotizzato per prevenire diversi tipi di cancro, probabilmente attraverso effetti genomici modulata dal recettore della vitamina D (VDR), e il metabolismo autocrino / paracrino di ligando del VDR, 1alfa, 25 - (OH) (2)-vitamina D. Qui passiamo in rassegna il contesto e le prove fino ad oggi sulle associazioni tra polimorfismi in geni selezionati VDR e nella via di vitamina D in relazione al colon-retto, della mammella e il cancro alla prostata. Sebbene la maggior parte degli studi fino ad oggi hanno esaminato solo un polimorfismo VDR pochi, più stanno cominciando a studiare i polimorfismi in modo esaustivo la VDR così come in altri geni percorso vitamina D, come il gene della vitamina D-Binding Protein (GC) e CYP27B1 e CYP24A1, che codificano per gli enzimi che, rispettivamente, sintetizzare e degradare 1alfa, 25 - (OH) (2)-vitamina D. Al momento, non vi è forte, evidenze epidemiologiche coerenti per influenza sostanziale di singole varianti di vitamina D in via di geni di rischio per colon-retto , conduce al seno, alla prostata o cancro, ma promettenti sono in via di sviluppo.

228: Crew KD, Shane E, Cremers S, McMahon DJ, Irani D, Hershman DL.

**High prevalence of vitamin D deficiency despite supplementation in premenopausal women with breast cancer undergoing adjuvant chemotherapy.**

J Clin Oncol. 2009 May 1;27(13):2151-6.

**PURPOSE:** Vitamin D deficiency is associated with increased breast cancer risk and decreased breast cancer survival. The purpose of this study was to determine the prevalence of vitamin D deficiency, as measured by serum 25-hydroxyvitamin D (25-OHD), in premenopausal women at initiation of adjuvant chemotherapy for breast cancer and after 1 year of vitamin D supplementation.

**PATIENTS AND METHODS:** The study included 103 premenopausal women from the northeastern United States with stages I to III breast cancer who received adjuvant chemotherapy and participated in a 1-year zoledronate intervention trial. All patients were prescribed vitamin D(3) (cholecalciferol) 400 IU and calcium carbonate 1,000 mg daily. At baseline and at 6 and 12 months, bone mineral density (BMD) measurements were obtained and blood was collected and analyzed in batches for serum 25-OHD. Vitamin D deficiency was defined as serum 25-OHD less than 20 ng/mL, insufficiency as 20 to 29 ng/mL, and sufficiency as 30 ng/mL or greater.

**RESULTS:** At baseline, 74% of women were vitamin D deficient (median, 17 ng/mL). Vitamin D deficiency was slightly less common in white women (66%) compared with black (80%) and Hispanic (84%) women. After vitamin D supplementation for 1 year, less than 15% of white and Hispanic women, and no black women, achieved sufficient 25-OHD levels. Vitamin D levels did not correlate with baseline BMD and were not altered by chemotherapy or bisphosphonate use.

**CONCLUSION:** Vitamin D deficiency is highly prevalent in women with breast cancer. The current recommended dietary allowance of vitamin D is too low to increase serum 25-OHD greater than 30 ng/mL. Optimal dosing for bone health and, possibly, improved survival has yet to be determined.

**L'alta prevalenza di carenza di vitamina D, nonostante l'integrazione nelle donne in premenopausa con carcinoma mammario sottoposte a chemioterapia adiuvante.**

**SCOPO:** La carenza di vitamina D è associata ad aumentato rischio di tumore al seno e ridotta sopravvivenza cancro al seno. Lo scopo di questo studio era di determinare la prevalenza di carenza di vitamina D, misurata come livelli sierici di 25-idrossivitamina D (25-OHD), in donne in premenopausa all'inizio della chemioterapia adiuvante per tumore al seno e dopo 1 anno di supplementazione di vitamina D.

**PAZIENTI E METODI:** Lo studio ha incluso 103 donne in premenopausa da nordest degli Stati Uniti con le fasi da I a III del cancro al seno che avevano ricevuto chemioterapia adiuvante e ha

partecipato a uno studio di 1 anno di intervento zoledronato. Tutti i pazienti è stata prescritta la vitamina D (3) (colecalfiferolo) 400 UI e carbonato di calcio 1.000 mg al giorno. Al basale e dopo 6 e 12 mesi, la densità minerale ossea (BMD) misurazioni sono state ottenute e di sangue sono stati raccolti e analizzati in lotti per il siero 25-OHD. La carenza di vitamina D è stata definita come livelli sierici di 25-OHD inferiore a 20 ng / mL, insufficienza da 20 a 29 ng / mL, e la sufficienza di 30 ng / mL o superiore.

RISULTATI: Al basale, il 74% delle donne sono carenti di vitamina D (mediana, 17 ng / mL). La carenza di vitamina D è stato un po 'meno comune nelle donne bianche (66%) rispetto alle donne nere (80%) e ispanico (84%). Dopo la supplementazione di vitamina D per 1 anno, meno del 15% delle donne bianche e ispanici, e non le donne nere, ha raggiunto sufficienti livelli di 25-OHD. Livelli di vitamina D non è stata correlata BMD basale e non sono state alterate da chemioterapia o l'uso bisfosfonato.

CONCLUSIONE: La carenza di vitamina D è molto diffusa nelle donne con tumore al seno. L'attuale dose giornaliera raccomandata di vitamina D è troppo bassa per aumentare sierici di 25-OHD superiore a 30 ng / mL. Dosaggio ottimale per la salute delle ossa e, possibilmente, un miglioramento della sopravvivenza è ancora da determinare.

238: Grant WB, Cross HS, Garland CF, Gorham ED, Moan J, Peterlik M, Porojnicu AC, Reichrath J, Zittermann A.

### **Estimated benefit of increased vitamin D status in reducing the economic burden of disease in western Europe.**

Prog Biophys Mol Biol.2009 Feb-Apr;99(2-3):104-13.

Vitamin D has important benefits in reducing the risk of many conditions and diseases. Those diseases for which the benefits are well supported and that have large economic effects include many types of cancer, cardiovascular diseases, diabetes mellitus, several bacterial and viral infections, and autoimmune diseases such as multiple sclerosis. Europeans generally have low serum 25-hydroxyvitamin D [25(OH)D] levels owing to the high latitudes, largely indoor living, low natural dietary sources of vitamin D such as cold-water ocean fish, and lack of effective vitamin D fortification of food in most countries. Vitamin D dose-disease response relations were estimated from observational studies and randomized controlled trials. The reduction in direct plus indirect economic burden of disease was based on increasing the mean serum 25(OH)D level to 40 ng/mL, which could be achieved by a daily intake of 2000-3000 IU of vitamin D. For 2007, the reduction is estimated at euro187,000 million/year. The estimated cost of 2000-3000 IU of vitamin D3/day along with ancillary costs such as education and testing might be about euro10,000 million/year. Sources of vitamin D could include a combination of food fortification, supplements, and natural and artificial UVB irradiation, if properly acquired. Additional randomized controlled trials are warranted to evaluate the benefits and risks of vitamin D supplementation. However, steps to increase serum 25(OH)D levels can be implemented now based on what is already known.

### **Vantaggio stimato dell'incremento della vitamina D nel ridurre il peso economico della malattia in Europa occidentale.**

La vitamina D ha importanti vantaggi nel ridurre il rischio di molte condizioni e malattie. Le malattie per le quali i benefici sono ben supportato e che hanno grandi effetti economici sono molti tipi di cancro, malattie cardiovascolari, il diabete mellito, diverse infezioni batteriche e virali e malattie autoimmuni come la sclerosi multipla. Gli europei hanno in genere bassi livelli sierici di

25-idrossivitamina D [25 (OH) D] livelli a causa delle alte latitudini, in gran parte di vita interna, basso fonti alimentari naturali di vitamina D, come oceano pesci di acqua fredda, e la mancanza di fortificazione efficace di vitamina D alimentare in molti paesi. La vitamina D relazioni dose-risposta della malattia sono stati stimati da studi osservazionali e trial randomizzati e controllati. La riduzione in diretta più indiretta peso economico della malattia è basata sull'aumento della media siero 25 (OH) D a livello di 40 ng / mL, che potrebbe essere raggiunto da un apporto giornaliero di 2000-3000 UI di vitamina D. Per il 2007 il riduzione è stimato a euro187, 000 milioni / anno. Il costo stimato di 2000-3000 UI di vitamina D3/day insieme con le spese accessorie, quali l'istruzione e la sperimentazione potrebbe essere di circa 10 Euro, 000 milioni / anno. Fonti di vitamina D potrebbe includere una combinazione di fortificazione degli alimenti, integratori, e l'irradiazione UVB naturale e artificiale, se adeguatamente acquisite. Ulteriori studi controllati randomizzati sono garantiti per valutare i benefici ei rischi di vitamina D. Tuttavia, misure per aumentare nel siero 25 (OH) livelli di D può essere attuata sulla base di ciò che ora è già noto.

240: Fedirko V, Bostick RM, Flanders WD, Long Q, Shaukat A, Rutherford RE, Daniel CR, Cohen V, Dash C.

**Effects of vitamin D and calcium supplementation on markers of apoptosis in normal colon mucosa: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial.**

Cancer Prev Res (Phila). 2009 Mar;2(3):213-23.

To further clarify and/or develop calcium and vitamin D as chemopreventive agents against colorectal cancer in humans, understand the mechanisms by which these agents reduce risk for the disease, and develop "treatable" biomarkers of risk for colorectal cancer, we conducted a pilot, randomized, double-blind, placebo-controlled, 2 x 2 factorial clinical trial to test the effects of calcium and vitamin D3, alone and in combination on markers of apoptosis, in the normal colorectal mucosa. Ninety-two men and women with at least one pathology-confirmed colorectal adenoma were treated with 2.0 g/d calcium or 800 IU/d vitamin D3, alone or in combination, versus placebo over 6 months. Overall expression and colorectal crypt distributions of Bcl-2 (an apoptosis inhibitor) and Bax (an apoptosis promoter) in biopsies of normal-appearing rectal mucosa were detected by automated immunohistochemistry and quantified by image analysis. After 6 months of treatment, Bax expression along the full lengths of crypts increased 56% (P = 0.02) in the vitamin D group and 33% in both the calcium (P = 0.31) and calcium plus vitamin D (P = 0.36) groups relative to the placebo group. The vitamin D treatment effect was more pronounced in the upper 40%, or differentiation zone, of crypts (80%; P = 0.01). There were no statistically significant treatment effects on Bcl-2 expression. Overall, these preliminary results suggest that calcium and vitamin D, individually or together, may enhance apoptosis in the normal human colorectal epithelium, and the strongest treatment effects may be vitamin D related and in the upper sections of the colorectal crypts.

**Effetti della supplementazione di vitamina D e calcio sui marcatori di apoptosi nella mucosa del colon normale: uno studio randomizzato, in doppio cieco, controllato con placebo clinica.**

Per chiarire ulteriormente e / o sviluppare calcio e vitamina D come agenti chemiopreventivi contro il cancro al colon negli esseri umani, capire i meccanismi con cui questi agenti ridurre il rischio per la malattia, e sviluppare "trattabile" biomarkers di rischio per il cancro coloretale, abbiamo condotto un progetto pilota, randomizzato, in doppio cieco, controllato con placebo, 2 x 2 trial

clinici fattoriale per testare gli effetti di calcio e vitamina D3, da soli o in combinazione sui marcatori di apoptosi, nella mucosa normale del colon-retto. Ninety-two uomini e le donne con almeno una patologia ha confermato adenoma del colon-retto sono stati trattati con 2,0 g / d di calcio o 800 UI / die di vitamina D3, da soli o in combinazione, rispetto al placebo in 6 mesi. espressione generale e del colon-retto distribuzioni cripta di Bcl-2 (un inibitore apoptosi) e Bax (un promotore apoptosi) nelle biopsie di aspetto normale mucosa rettale sono stati individuati mediante immunoistochimica automatizzata e quantificato mediante analisi dell'immagine. Dopo 6 mesi di trattamento, espressione di Bax lungo le lunghezze piena di cripte aumentati del 56% (P = 0.02) nel gruppo vitamina D e il 33% sia di calcio (P = 0,31) e il calcio più vitamina D (P = 0,36) i gruppi rispetto al gruppo placebo. La vitamina D effetto del trattamento è stato più pronunciato nella parte superiore del 40%, o zona di differenziazione, di cripte (80%, p = 0,01). Non ci sono stati gli effetti del trattamento statisticamente significativi sulla Bcl-2. Nel complesso, questi risultati preliminari suggeriscono che calcio e vitamina D, individualmente o congiuntamente, possono aumentare l'apoptosi nel normale epitelio umano del colon-retto, e gli effetti più forti trattamento può essere collegato e vitamina D nelle sezioni superiore delle cripte del colon-retto.

242: Matsunawa M, Amano Y, Endo K, Uno S, Sakaki T, Yamada S, Makishima M.

### **The aryl hydrocarbon receptor activator benzo[a]pyrene enhances vitamin D3 catabolism in macrophages.**

Toxicol Sci. 2009 May;109(1):50-8.

Benzo[a]pyrene (BaP), a polycyclic aromatic hydrocarbon produced by cigarette combustion, is implicated as a causative agent in smoking-related cancer and atherosclerosis. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 [1,25(OH)2D3], a potent ligand for the nuclear receptor vitamin D receptor (VDR), has been shown to decrease the risk of osteoporosis, some types of cancer and cardiovascular disease, suggesting an opposing effect of vitamin D3 to cigarette smoking. In this study, we investigated the effects of BaP on the vitamin D3 signaling pathway. BaP effectively enhanced the 1,25(OH)2D3-dependent induction of cytochrome P450 24A1 (CYP24A1) in human monocyte/macrophage-derived THP-1 cells and breast cancer MCF-7 cells. BaP combination was less or not effective on mRNA expression of CD14, arachidonate 5-lipoxygenase, and cathelicidin antimicrobial peptide in THP-1 cells. BaP also increased the expression of CYP24A1 induced by a non-vitamin D VDR ligand, lithocholic acid acetate. Another aryl hydrocarbon receptor (AhR) ligand, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, enhanced CYP24A1 expression by 1,25(OH)2D3 in THP-1 cells. Treatment of cells with an AhR antagonist and a protein synthesis inhibitor inhibited the enhancing effect of BaP on CYP24A1 induction, indicating that the effects of BaP are mediated by AhR activation and de novo protein synthesis. BaP pretreatment increased 1,25(OH)2D3-dependent recruitment of VDR and retinoid X receptor to the CYP24A1 promoter. Analysis of 1,25(OH)2D3 metabolism showed that BaP enhanced the hydroxylation of 1,25(OH)2D3 by CYP24A1 in THP-1 cells. Thus, AhR activation by BaP stimulates vitamin D3 catabolism. Modulation of vitamin D signaling by AhR may represent a mechanism underlying cigarette smoking-related diseases.

### **Il recettore aril idrocarburo attivatore del benzo [a] pirene aumenta il catabolismo della vitamina D3 nei macrofagi.**

Benzo [a] pirene (BaP), uno di idrocarburi policiclici aromatici prodotti dalla combustione delle sigarette, è implicato come agente causativo nel cancro legato al fumo e l'aterosclerosi. 1,25-diidrossivitamina D<sub>3</sub> [1,25 (OH) 2D<sub>3</sub>], un ligando potente per il recettore nucleare del recettore della vitamina D (VDR), ha dimostrato di diminuire il rischio di osteoporosi, alcuni tipi di cancro e malattie cardiovascolari, suggerendo un'opposta l'effetto della vitamina D<sub>3</sub> al fumo di sigaretta. In questo studio, abbiamo studiato gli effetti di BaP sulla vitamina D<sub>3</sub> via di segnalazione. BaP migliorare efficacemente la 1,25 (OH) 2D<sub>3</sub> induzione-dipendente della 24A1 citocromo P450 (CYP24A1) in monociti umani / macrofagi derivati da cellule THP-1 e il cancro al seno cellule MCF-7. Combinazione BaP è meno o per niente efficace l'espressione di mRNA di CD14, arachidonato 5-lipossigenasi, e catelicidina peptidi antimicrobici in cellule THP-1. BaP anche aumentato l'espressione di CYP24A1 indotta da una non-vitamina D VDR ligando, acetato di acido lithocholic. Un altro recettore arilico (AhR) ligando, 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-diossina, rafforzata CYP24A1 espressione di 1,25 (OH) 2D<sub>3</sub> in cellule THP-1.

BaP anche aumentato l'espressione di CYP24A1 indotta da una non-vitamina D VDR ligando, acetato di acido lithocholic. Un altro recettore arilico (AhR) ligando, 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-diossina, rafforzata CYP24A1 espressione di 1,25 (OH) 2D<sub>3</sub> in cellule THP-1. Il trattamento delle cellule con un antagonista AhR e un inibitore della sintesi proteica inibito l'effetto di rafforzare il BaP CYP24A1 induzione, indicando che gli effetti di BaP sono mediati attraverso l'attivazione della proteina AhR e de novo sintesi. Pretrattamento BaP aumentato 1,25 (OH) 2D<sub>3</sub>-dipendente assunzione di retinoidi e recettore VDR X al promotore CYP24A1. Analisi di 1,25 (OH) 2D<sub>3</sub> metabolismo hanno mostrato che BaP migliorato l'idrossilazione di 1,25 (OH) 2D<sub>3</sub> di CYP24A1 in cellule THP-1. Pertanto, l'attivazione di AhR BaP stimola il catabolismo della vitamina D<sub>3</sub>. Modulazione di vitamina D di segnalazione da AhR può rappresentare un meccanismo alla base di malattie correlate al fumo di sigaretta.

245: Wang X, Gocek E, Liu CG, Studzinski GP.

**MicroRNAs181 regulate the expression of p27Kip1 in human myeloid leukemia cells induced to differentiate by 1,25-dihydroxyvitamin D3.**

Cell Cycle. 2009 Mar 1;8(5):736-41.

Human myeloid leukemia cells exposed to 1,25-dihydroxyvitamin D(3) (1,25D), a major cancer chemopreventive agent, acquire features of normal monocytes and arrest in the G(1) phase of the cell cycle, due to the upregulation of p27(Kip1) and p21(Cip1), but the mechanism is not clear. Here evidence is provided that an exposure of HL60 and U937 cells to low (1-10 nM) concentrations of 1,25D decreases the expression of miR181a and miR181b in a concentration and time-dependent manner. Since the predicted miR181 targets include the 3'-UTR of p27(Kip1), we expressed pre-miR181a in these cells, and found that the elevation of cellular miR181a levels abrogates the 1,25D-induced increase in p27(Kip1) at both mRNA and protein levels. In contrast, transfection of pre-miR181a resulted in a slight elevation of p21(Cip1) expression. Importantly, transfection of pre-miR181a blunted the effect of 1,25D on the expression of monocytic differentiation markers, and reduced the G(1) block in 1,25D-treated cells, while transfection of anti-miR181a increased 1,25D-induced differentiation. Together, these data show that miR181a participates in 1,25D-induced differentiation of HL60 and U937 cells, and suggest that a high constitutive expression of members of miR181 family may contribute to the malignant phenotype in the myeloid lineage.

**MicroRNAs181 regola l'espressione di p27Kip1 in cellule umane di leucemia mieloide indotte a differenziarsi da 1,25-diidrossivitamina D3.**

Cellule della leucemia mieloide umana esposta a 1,25-diidrossivitamina D (3) (1,25 D), un agente del cancro principali chemiopreventivi, acquisire caratteristiche di monociti normali e d'arresto nei G (1) fase del ciclo cellulare, a causa della upregulation di p27 (Kip1) e p21 (Cip1), ma il meccanismo non è chiaro. Qui viene fornita la prova che l'esposizione di HL60 e U937 a bassa (1-10 nM) le concentrazioni di 1,25 D diminuisce l'espressione di miR181a e miR181b in concentrazione e modo tempo-dipendente. Poiché il predetto miR181 obiettivi includono il 3'-UTR di p27 (Kip1), abbiamo espresso la pre-miR181a in queste cellule, e ha scoperto che l'elevazione dei livelli di miR181a cellulare abolisce la D 1,25-aumento indotto in p27 (Kip1) sia a livello mRNA e proteine. Al contrario, la trasfezione di pre-miR181a portato a una leggera elevazione di p21 (Cip1) espressione. È importante sottolineare che la trasfezione di pre-miR181a attenuato l'effetto di 1,25 D sul espressione di marcatori di differenziazione monocitica, e ha ridotto il G (1) blocco di celle a 1,25 D-trattate, mentre la trasfezione di anti-miR181a aumentato 1,25 D-indotta differenziazione. Insieme, questi dati dimostrano che miR181a partecipa a 1,25 D-differenziamento indotto di HL60

e U937, e suggeriscono che un'alta espressione costitutiva dei membri della miR181 famiglia può contribuire al fenotipo maligno in linea mieloide.

247: Rao MV, Berk J, Almojaly SA, Goodloe Iii S, Margarone Iii J, Sullivan M, Dziak R.

**Effects of platelet-derived growth factor, vitamin D and parathyroid hormone on osteoblasts derived from cancer patients on chronic bisphosphonate therapy.**

Int J Mol Med. 2009 Mar;23(3):407-13.

Bisphosphonates consist of a family of pyrophosphate analogues that are currently being used to treat metastatic bone diseases as well as systemic bone diseases such as osteoporosis. There is accumulating evidence suggesting that patients treated with these bisphosphonates can develop, particularly with invasive dental procedures, osteonecrosis of the jaw. This present study investigated the ability of osteoblastic cells obtained from the alveolar bone of patients on long term intravenous bisphosphonate therapy to respond to agents normally involved in bone regulation and repair. The effects of platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB), 1,25-dihydroxycholecalciferol [1,25(OH)<sub>2</sub>VitaminD<sub>3</sub>] and parathyroid hormone (PTH) on basic parameters of cell viability, proliferation, and differentiation were studied. Osteoblastic cells from a diagnosed necrotic alveolar bone specimen obtained with consent from a multiple myeloma female patient, and a non-necrotic sample from a breast cancer female patient both on chronic bisphosphonate therapy (zoledronic acid) were successfully cultured. Cells from an alveolar bone specimen obtained from a female donor with no known medical conditions were also studied for comparative responses. The cells were exposed to 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, PDGF, or PTH under various incubation conditions. The osteoblastic cell differentiation marker, alkaline phosphatase activity, was assayed using a biochemical analysis. Cell viability was assessed with an MTT assay which measures mitochondrial activity and cell proliferation with a tritiated thymidine assay. This study on osteoblastic cells grown from a necrotic alveolar bone from a multiple myeloma patient and a non-necrotic sample from a breast cancer patient, both on long term bisphosphonate treatment, suggests that viable cells from the bone are responsive to agents such as PTH, PDGF and 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> with changes in alkaline phosphatase activity, proliferation and viability suggestive of normal osteoblastic cell responses observed in cultures from a donor of the same gender and age, but not on bisphosphonate treatment. This work provides a rationale for clinical studies to further assess whether the osteonecrosis that sometimes develops in patients treated with bisphosphonates, can be controlled or prevented by close attention to the levels of bone/calcium regulatory agents and/or, in some cases, therapeutic intervention with PDGF to restore regenerative processes that may be compromised at the necrotic site.

**Effetti del fattore di crescita derivato dalle piastrine, vitamina D e l'ormone paratiroideo sugli osteoblasti derivati da pazienti affetti da cancro in terapia cronica con bifosfonati.**

bifosfonati consiste di una famiglia di analoghi del pirofosfato, che sono attualmente utilizzate per trattare malattie metastatica ossea, nonché malattie ossee come l'osteoporosi sistemica. Ci sta accumulando evidenze che suggeriscono che i pazienti trattati con bisfosfonati questi possono sviluppare, in particolare, procedure odontoiatriche invasive, l'osteonecrosi della mandibola. Questo studio ha valutato la capacità delle cellule osteoblastiche ottenuto dalla osso alveolare dei pazienti a lungo termine la terapia endovenosa con bifosfonati per rispondere agli agenti normalmente coinvolta nella regolazione delle ossa e la riparazione. Gli effetti del platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB), 1,25-diidrossicolecalciferolo [1,25 (OH) 2VitaminD3] e l'ormone paratiroideo (PTH) sui parametri di base della vitalità cellulare, la proliferazione e la differenziazione sono stati studiati. Cellule osteoblastiche da una diagnosi di necrosi dell'osso alveolare campione ottenuto con il consenso di un paziente con mieloma multiplo femminile, e un campione non-necrotico da un cancro al seno paziente di sesso femminile sia in terapia cronica con bifosfonati (acido zolendronic) sono state coltivate con successo. Le cellule da un campione di osso alveolare ottenuto da un donatore femminile con nessuna condizione medica conosciuta Sono stati studiati anche per le risposte comparativa. Le cellule sono state esposte a 1,25 (OH) 2D3, PDGF, PTH o in condizioni di incubazione diversi. Il marker di differenziazione cellulare degli osteoblasti, attività della fosfatasi alcalina, è stata determinata utilizzando un analisi biochimiche. La vitalità cellulare è stata valutata con un test MTT che misura l'attività mitocondriale e la proliferazione cellulare con un saggio di timidina triziata. Questo studio sulle cellule osteoblastiche cresciuto da un osso necrotico alveolare di un paziente con mieloma multiplo e di un campione non-necrotico da un malato di cancro al seno, sia in trattamento a lungo termine con bifosfonati, suggerisce che le cellule vitali dalle ossa sono sensibili ad agenti come PTH, PDGF e 1,25 (OH) 2D3 con i cambiamenti in attività di fosfatasi alcalina, la proliferazione e la vitalità suggestivi della normale risposte delle cellule osteoblastiche osservati in colture da un donatore dello stesso sesso ed età, ma non in trattamento con bisfosfonati. Questo lavoro fornisce una spiegazione razionale per studi clinici per valutare ulteriormente se l'osteonecrosi che talvolta si sviluppa in pazienti trattati con bifosfonati, può essere controllato o impedito da attenzione ai livelli di osso / agenti di calcio regolamentari e / o, in alcuni casi, l'intervento terapeutico con PDGF per ripristinare i processi rigenerativi che può essere compromessa nel sito necrotico.

248: Stolzenberg-Solomon RZ, Hayes RB, Horst RL, Anderson KE, Hollis BW, Silverman DT.

**Serum vitamin D and risk of pancreatic cancer in the prostate, lung, colorectal, and ovarian screening trial.**

Cancer Res. 2009 Feb15;69(4):1439-47.

Experimental evidence suggests that vitamin D has anticarcinogenic properties; however, a nested case-control study conducted in a population of male Finnish smokers found that higher 25-hydroxyvitamin D [25(OH)D], the best indicator of vitamin D status as determined by the sun and diet, was associated with a significant 3-fold increased risk for pancreatic cancer. We conducted a nested case-control study in the Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian Screening Trial cohort of men and women 55 to 74 years of age at baseline to test whether prediagnostic serum 25(OH)D concentrations were associated with pancreatic cancer risk. Between 1994 and 2006, 184 incident cases of pancreatic adenocarcinoma occurred (follow-up to 11.7 years). Two controls (n = 368) who were alive at the time the case was diagnosed were selected for each case and matched by age, race, sex, and calendar date of blood draw (to control for seasonal variation). We calculated odds ratios (OR) and 95% confidence intervals (95% CI) using conditional logistic regression, adjusting for smoking and body mass index. Vitamin D concentrations were not associated with pancreatic cancer overall (highest versus lowest quintile, >82.3 versus <45.9 nmol/L: OR, 1.45; 95% CI, 0.66-3.15; P trend = 0.49). However, positive associations were observed among subjects with low estimated annual residential solar UVB exposure, but not among those with moderate to high annual exposure (P interaction = 0.015). We did not confirm the previous strong positive association between 25(OH)D and pancreatic cancer; however, the increased risk among participants with low residential UVB exposure is similar.

**Siero di vitamina D e rischio di cancro al pancreas nella prostata, polmone, colon-retto, dell'ovaio e del processo di screening.**

Prove sperimentali suggeriscono che la vitamina D ha proprietà anticancerogene, tuttavia, uno studio nested caso-controllo condotto su una popolazione di fumatori di sesso maschile finlandese ha constatato che più elevati di 25-idrossivitamina D [25 (OH) D], il miglior indicatore di stato della vitamina D, come determinato dal sole e la dieta, è stato associato ad un significativo rischio 3 volte maggiore di cancro al pancreas. Abbiamo condotto uno studio caso-controllo annidato nella coorte ovarica prostata, polmone, colon-retto, e Screening Trial di uomini e donne 55-74 anni di età al basale per verificare se prediagnostici nel siero 25 (OH) le concentrazioni di D sono stati associati al rischio di cancro al pancreas . Tra il 1994 e il 2006, 184 casi incidenti di adenocarcinoma pancreatico si è verificato (follow-up a 11,7 anni). Due controlli (n = 368) che erano vivi al momento della diagnosi del caso sono stati selezionati per ciascun caso e confrontati

per età, razza, sesso, data di calendario e di tiraggio di anima (per il controllo delle variazioni stagionali). Abbiamo calcolato odds ratio (OR) e gli intervalli di confidenza al 95% (95% CI), utilizzando la regressione logistica condizionale, la regolazione per il fumo e l'indice di massa corporea. 82,3 versus <45,9 nmol/L: OR, 1,45; 95% CI, 0,66-3,15; P trend = 0,49)." onmouseout="this.style.backgroundColor='#fff'"Le concentrazioni di vitamina D non sono stati associati con il cancro al pancreas complessivo (quintile più alto rispetto al più basso, > 82,3 versus <45,9 nmol / L: OR 1,45, IC 95%, 0,66-3,15; trend P = 0,49). Tuttavia, le associazioni positive sono state osservate nei soggetti con bassa stima annuale residenziale esposizione solare UVB, ma non tra quelli con moderata a elevata esposizione annuale (interazione P = 0,015). Non abbiamo la conferma della precedente forte associazione positiva tra il 25 (OH) D e cancro del pancreas, tuttavia, l'aumento del rischio tra i soggetti con bassa esposizione UVB residenziale è simile.

250: Kulbersh JS, Day TA, Gillespie MB, Young MR.

### **1alpha,25-Dihydroxyvitamin D(3) to skew intratumoral levels of immune inhibitory CD34(+) progenitor cells into dendritic cells.**

Otolaryngol Head Neck Surg. 2009 Feb;140(2):235-40.

**OBJECTIVES:** Prior studies showed that immune inhibitory CD34(+) progenitor cells, whose numbers are increased in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) patients, can be differentiated into immune stimulatory dendritic cells by culture with 1alpha,25-dihydroxyvitamin D(3) (1,25[OH](2)D(3)). This was extended to a pilot study to diminish intratumoral levels of CD34(+) progenitor cells by inducing their maturation into dendritic cells with 1,25(OH)(2)D(3).

**STUDY DESIGN:** Newly diagnosed HNSCC patients were untreated for 3 weeks or received 3 weeks of 1,25(OH)(2)D(3) treatment before surgical treatment.

**SUBJECTS AND METHODS:** HNSCC tissue was collected by biopsy from six patients who had no prior 1,25(OH)(2)D(3) treatment and at the time of surgical treatment from six untreated patients and 11 patients who completed 1,25(OH)(2)D(3) treatment. Tissues were analyzed by immunohistochemistry for levels of CD34(+) cells and dendritic cells.

**RESULTS:** After 1,25(OH)(2)D(3) treatment, intratumoral levels of CD34(+) cells and levels of immature dendritic cells declined. However, levels of intratumoral mature dendritic cells increased. Clinical effects of 1,25(OH)(2)D(3) treatment are premature to analyze.

**CONCLUSIONS:** Treatment of HNSCC patients with 1,25(OH)(2)D(3) reduced levels of immune inhibitory CD34(+) cells while increasing maturation of dendritic cells. This supports added studies to determine the effect of 1,25(OH)(2)D(3) on intratumoral immune competence.

### **1alfa,25-diidrossivitamina D(3) per inclinare i livelli di CD34 (+)inibitorio immune intratumorale in cellule dendritiche progenitrici.**

**OBIETTIVI:** Precedenti studi hanno dimostrato che CD34 immune inibitorio (+) le cellule progenitrici, il cui numero è aumentato in testa e del carcinoma a cellule squamose del collo (HNSCC) pazienti, possono differenziarsi in cellule immunitarie stimolante dendritiche dalla cultura con 1alfa ,25-diidrossivitamina D (3 ) (1,25 [OH] (2) D (3)). Questo è stato esteso a uno studio pilota a diminuire i livelli intratumorale di CD34 (+) le cellule progenitrici inducendo la loro maturazione in cellule dendritiche con 1,25 (OH) (2) D (3).

**DISEGNO DI STUDIO:** pazienti di nuova diagnosi non trattati sono stati HNSCC per 3 settimane o ricevuto 3 settimane di 1,25 (OH) (2) D (3) il trattamento prima del trattamento chirurgico. Soggetti e metodi: Il tessuto HNSCC stati raccolti mediante biopsia da sei pazienti che non avevano

precedenti 1,25 (OH) (2) D (3) trattamento e al momento del trattamento chirurgico di sei pazienti non trattati e 11 pazienti che hanno completato 1,25 (OH) (2) D (3) il trattamento. I tessuti sono stati analizzati mediante immunistochemica per i livelli di CD34 (+) le cellule e le cellule dendritiche.

RISULTATI: Dopo 1,25 (OH) (2) D (3) trattamento, i livelli intratumorale di CD34 (+) delle cellule e dei livelli di cellule dendritiche immature rifiutato. Tuttavia, i livelli di cellule mature intratumorale dendritiche aumentato. Effetti clinici di 1,25 (OH) (2) D (3) il trattamento precoce sono da analizzare.

CONCLUSIONI: Il trattamento dei pazienti HNSCC con 1,25 (OH) (2) D (3) una riduzione della immune inibitorio CD34 (+) delle cellule aumentando la maturazione delle cellule dendritiche. Questo supporta aggiunto studi per determinare l'effetto di 1,25 (OH) (2) D (3) in materia di competenza intratumorale immunitario.

252: Rohan JN, Weigel NL.

### **1Alpha,25-dihydroxyvitamin D3 reduces c-Myc expression, inhibiting proliferation and causing G1 accumulation in C4-2 prostate cancer cells.**

Endocrinology. 2009 May;150(5):2046-54.

There is an inverse correlation between exposure to sunlight (the major source of vitamin D) and the risk for prostate cancer, the most common noncutaneous cancer and second most common cause of death from cancer in American men. The active metabolite of vitamin D, 1alpha,25-dihydroxyvitamin D(3) [1,25(OH)(2)D(3)] acting through the vitamin D receptor decreases prostate cancer cell growth and invasiveness. The precise mechanisms by which 1,25(OH)(2)D(3) inhibits growth in prostate cancer have not been fully elucidated. Treatment with 1,25(OH)(2)D(3) causes an accumulation in the G(0)/G(1) phase of the cell cycle in several prostate cancer cell lines. One potential target known to regulate the G(0)/G(1) to S phase transition is c-Myc, a transcription factor whose overexpression is associated with a number of cancers including prostate cancer. We find that 1,25(OH)(2)D(3) reduces c-Myc expression in multiple prostate epithelial cell lines, including C4-2 cells, an androgen-independent prostate cancer cell line. Reducing c-Myc expression to the levels observed after 1,25(OH)(2)D(3) treatment resulted in a comparable decrease in proliferation and G(1) accumulation demonstrating that down-regulation of c-Myc is a major component in the growth-inhibitory actions of 1,25(OH)2D(3). Treatment with 1,25(OH)(2)D(3) resulted in a 50% decrease in c-Myc mRNA but a much more extensive reduction in c-Myc protein. Treatment with 1,25(OH)(2)D(3) decreased c-Myc stability by increasing the proportion of c-Myc phosphorylated on T58, a glycogen synthase kinase-3beta site that serves as a signal for ubiquitin-mediated proteolysis. Thus, 1,25(OH)(2)D(3) reduces both c-Myc mRNA levels and c-Myc protein stability to inhibit growth of prostate cancer cells.

### **Il D3 1alfa ,25-diidrossivitamina riduce l'espressione di c-Myc, inibendo la proliferazione e provocando l'accumulo G1 nelle cellule del cancro alla prostata.**

C'è una correlazione inversa tra esposizione alla luce solare (la principale fonte di vitamina D) e il rischio di cancro alla prostata, il tumore più comune noncutaneous e seconda più comune causa di morte per cancro negli uomini americani. Il metabolita attivo della vitamina D, 1alfa ,25-diidrossivitamina D (3) [1,25 (OH) (2) D (3)] che agisce attraverso il recettore della vitamina D riduce la crescita del cancro alla prostata e l'invasività delle cellule. I meccanismi precisi con cui 1,25 (OH) (2) D (3) inibisce la crescita del cancro alla prostata non sono stati ancora completamente chiariti. Il trattamento con 1,25 (OH) (2) D (3) causa un accumulo nel G (0) / G (1) fase del ciclo cellulare in diverse linee di cellule di cancro alla prostata. Un potenziale bersaglio noto per regolare

la G (0) / G (1) alla fase di transizione S è c-Myc, un fattore di trascrizione la cui sovraespressione è associata con un certo numero di tumori tra cui il cancro alla prostata. Troviamo che la 1,25 (OH) (2) D (3) riduce l'espressione di c-Myc in più linee di cellule epiteliali della prostata, comprese cellule C4-2, un androgeno-indipendente del cancro alla prostata linea cellulare. Ridurre l'espressione di c-Myc ai livelli osservati dopo 1,25 (OH) (2) D (3) il trattamento ha determinato una riduzione analoga nella proliferazione e G (1) accumulo di dimostrare che down-regolazione di c-Myc è una componente importante nelle azioni di inibizione della crescita di 1,25 (OH) 2D (3). Il trattamento con 1,25 (OH) (2) D (3) ha determinato una riduzione del 50% in c-Myc mRNA, ma una riduzione molto più ampio in proteina c-Myc. Il trattamento con 1,25 (OH) (2) D (3) ridotta stabilità c-Myc, aumentando la percentuale di c-Myc fosforilata su T58, un glicogeno sintasi chinasi-3beta sito che funge da segnale per la proteolisi ubiquitina-mediata. Così, 1,25 (OH) (2) D (3) riduce sia i livelli di c-Myc mRNA e la stabilità della proteina c-Myc per inibire la crescita di cellule tumorali della prostata.

254: Godar DE, Landry RJ, Lucas AD.

**Increased UVA exposures and decreased cutaneous Vitamin D(3) levels may be responsible for the increasing incidence of melanoma.**

Med Hypotheses. 2009 Apr;72(4):434-43.

Cutaneous malignant melanoma (CMM) has been increasing at a steady exponential rate in fair-skinned, indoor workers since before 1940. A paradox exists between indoor and outdoor workers because indoor workers get three to nine times less solar UV (290-400 nm) exposure than outdoor workers get, yet only indoor workers have an increasing incidence of CMM. Thus, another "factor(s)" is/are involved that increases the CMM risk for indoor workers. We hypothesize that one factor involves indoor exposures to UVA (321-400 nm) passing through windows, which can cause mutations and can break down vitamin D(3) formed after outdoor UVB (290-320 nm) exposure, and the other factor involves low levels of cutaneous vitamin D(3). After vitamin D(3) forms, melanoma cells can convert it to the hormone, 1,25-dihydroxyvitamin D(3), or calcitriol, which causes growth inhibition and apoptotic cell death in vitro and in vivo. We measured the outdoor and indoor solar irradiances and found indoor solar UVA irradiances represent about 25% (or 5-10 W/m(2)) of the outdoor irradiances and are about 60 times greater than fluorescent light irradiances. We calculated the outdoor and indoor UV contributions toward different biological endpoints by weighting the emission spectra by the action spectra: erythema, squamous cell carcinoma, melanoma (fish), and previtamin D(3). Furthermore, we found production of previtamin D(3) only occurs outside where there is enough UVB. We agree that intense, intermittent outdoor UV overexposures and sunburns initiate CMM; we now propose that increased UVA exposures and inadequately maintained cutaneous levels of vitamin D(3) promotes CMM.

**L'aumento dell'esposizione a raggi UVA e la diminuzione cutanea dei livelli di vitamina D (3) possono essere responsabili della crescente incidenza del melanoma.**

Melanoma maligno cutaneo (CMM) è aumentata ad un tasso costante esponenziale in pelle chiara, i lavoratori interni da prima del 1940. Un paradosso esistente tra i lavoratori interni ed esterni perché i lavoratori interni arrivare 3-9 volte meno solare UV (290-400 nm) esposizione di lavoratori outdoor arrivare, ma soltanto i lavoratori interni hanno una crescente incidenza di CMM. Così, un altro "fattore di (s)" è / sono coinvolti che aumenta il rischio CMM per i lavoratori interni. Ipotizziamo che uno dei fattori che coinvolge le esposizioni al coperto di UVA (321-400 nm) passando attraverso le finestre, che possono causare mutazioni e può abbattere la vitamina D (3) formata dopo UVB esterna (290-320 nm) di esposizione, e l'altro fattore comporta bassi livelli di

vitamina D cutaneo (3). Dopo la vitamina D (3) le forme, le cellule del melanoma in grado di convertire l'ormone, 1,25-diidrossivitamina D (3), o calcitriolo, che provoca l'inibizione della crescita e morte cellulare per apoptosi in vitro e in vivo. Abbiamo misurato la irradiances all'aperto e al coperto solare e trovò coperta irradiances solare UVA rappresentano circa il 25% (o 50-10 W / m (2)) del irradiances all'aperto e sono circa 60 volte superiore a quella della luce fluorescente irradiances. Abbiamo calcolato i contributi UV esterni ed interni verso differenti meccanismi biologici attraverso la ponderazione dei spettri di emissione spettri di azione: eritema, carcinoma a cellule squamose, il melanoma (pesce), e previtamin D (3). Inoltre, abbiamo trovato la produzione di previtamin D (3) si verifica solo in cui non è sufficiente UVB. Siamo d'accordo che intenso, intermittente sovraesposizione ai raggi UV per esterni e scottature avviare CMM, ci proponiamo ora che l'esposizione maggiore UVA e non adeguatamente mantenuto livelli cutanea di vitamina D (3) promuove la CMM.

257: Chung I, Han G, Seshadri M, Gillard BM, Yu WD, Foster BA, Trump DL, Johnson CS.

**Role of vitamin D receptor in the antiproliferative effects of calcitriol in tumor-derived endothelial cells and tumor angiogenesis in vivo.**

Cancer Res. 2009 Feb 1;69(3):967-75.

Calcitriol (1,25-dihydroxycholecalciferol), the major active form of vitamin D, is antiproliferative in tumor cells and tumor-derived endothelial cells (TDEC). These actions of calcitriol are mediated at least in part by vitamin D receptor (VDR), which is expressed in many tissues including endothelial cells. To investigate the role of VDR in calcitriol effects on tumor vasculature, we established TRAMP-2 tumors subcutaneously into either VDR wild-type (WT) or knockout (KO) mice. Within 30 days post-inoculation, tumors in KO mice were larger than those in WT ( $P < 0.001$ ). TDEC from WT expressed VDR and were able to transactivate a reporter gene whereas TDEC from KO mice were not. Treatment with calcitriol resulted in growth inhibition in TDEC expressing VDR. However, TDEC from KO mice were relatively resistant, suggesting that calcitriol-mediated growth inhibition on TDEC is VDR-dependent. Further analysis of the TRAMP-C2 tumor sections revealed that the vessels in KO mice were enlarged and had less pericyte coverage compared with WT ( $P < 0.001$ ). Contrast-enhanced magnetic resonance imaging showed an increase in vascular volume of TRAMP tumors grown in VDR KO mice compared with WT mice ( $P < 0.001$ ) and FITC-dextran permeability assay suggested a higher extent of vascular leakage in tumors from KO mice. Using ELISA and Western blot analysis, there was an increase of hypoxia-inducible factor-1alpha, vascular endothelial growth factor, angiopoietin 1, and platelet-derived growth factor-BB levels observed in tumors from KO mice. These results indicate that calcitriol-mediated antiproliferative effects on TDEC are VDR-dependent and loss of VDR can lead to abnormal tumor angiogenesis.

**Ruolo del recettore della vitamina D negli effetti antiproliferativi di calcitriolo in cellule endoteliali di derivazione tumorale e angiogenesi tumorale in vivo.**

Calcitriolo (1,25-diidrossicolecalciferolo), la principale forma attiva della vitamina D, è antiproliferativa su cellule tumorali e cellule endoteliali tumorali derivati (TDEC). Queste azioni di calcitriolo sono mediate, almeno in parte dal recettore della vitamina D (VDR), che è espressa in numerosi tessuti comprese le cellule endoteliali. Per studiare il ruolo della VDR in effetti il calcitriolo sistema vascolare del tumore, abbiamo stabilito TRAMP-2 tumori o per via sottocutanea nella VDR wild-type (WT) o knockout (KO) topi. Entro 30 giorni post-inoculazione, i tumori nei topi KO sono stati più grandi di quelle WT ( $p < 0,001$ ). TDEC da WT espresso VDR e sono stati in

grado di transattivazione un gene reporter mentre TDEC da topi KO non lo erano. Il trattamento con calcitriolo provocato inibizione della crescita in TDEC esprimere VDR. Tuttavia, TDEC da topi KO sono relativamente resistenti, suggerendo che l'inibizione della crescita calcitriolo mediata su TDEC è VDR-dipendente. Un'ulteriore analisi delle sezioni tumore TRAMP-C2 ha rivelato che le navi in topi KO sono state ingrandite e avuto meno copertura periciti rispetto al WT ( $p < 0,001$ ). Intensificazione del contrasto in risonanza magnetica ha mostrato un aumento del volume vascolare del tumore TRAMP coltivate in VDR topi KO rispetto ai topi WT ( $p < 0,001$ ) e del test di permeabilità FITC-destrano suggerito in misura maggiore di perdita vascolare nei tumori dei topi KO. Utilizzo di ELISA e Western blot, c'è stato un aumento di ipossia-inducibile fattore-1 $\alpha$ , fattore di crescita vascolare endoteliale, angiopoietina 1, e la crescita derivato dalle piastrine livelli di fattore-BB osservate nei tumori dei topi KO. Questi risultati indicano che gli effetti antiproliferativi calcitriolo-mediata su TDEC sono VDR-dipendenti e la perdita di VDR può portare a angiogenesi tumorale anormale.

259: Protiva P, Cross HS, Hopkins ME, Kállay E, Bises G, Dreyhaupt E, Augenlicht L, Lipkin M, Lesser M, Livote E, Holt PR.

### **Chemoprevention of colorectal neoplasia by estrogen: potential role of vitamin D activity.**

Cancer Prev Res (Phila). 2009 Jan;2(1):43-51.

Postmenopausal hormone replacement therapy lowers colon cancer incidence. In humans, the mechanism is unknown, but animal models suggest that it may involve activation of the vitamin D receptor (VDR) pathway. The aims of our study were to determine whether estrogen intervention affects global gene expression in rectal mucosal biopsies and whether vitamin D-related genes are affected. Estradiol was given to raise serum estradiol to premenopausal levels in 10 postmenopausal women under close nutritional control. Primary end points were expression of VDR, CYP24A1, CYP27B1, and E-cadherin in rectal mucosa by reverse transcription-PCR and examining response to estradiol by genome-wide arrays. Responses in gene expression in rectal biopsies to estrogen were determined in each subject individually and compared with a human estrogen response gene array database and a custom array in vitro-generated database. Cluster analysis showed that subjects maintained their overall gene expression profile and that interindividual differences were greater than intraindividual differences after intervention. Eight of 10 subjects showed significant enrichment in estrogen-responsive genes. Gene array group analysis showed activation of the VDR pathway and down-regulation of inflammatory and immune signaling pathways. Reverse transcription-PCR analysis showed significant up-regulation of VDR and E-cadherin, a downstream target of vitamin D action. These data suggest that the chemopreventive action of hormone replacement therapy on colon neoplasia results, at least in part, from changes in vitamin D activity. Evaluation of gene arrays is useful in chemopreventive intervention studies in small groups of subjects.

### **Chemioprevenzione delle neoplasie del colon-retto attraverso gli estrogeni: possibile ruolo dell'attività della vitamina D.**

La terapia ormonale sostitutiva post-menopausa diminuisce l'incidenza di cancro del colon. Nell'uomo, il meccanismo non è noto, ma i modelli animali suggeriscono che può comportare l'attivazione del recettore della vitamina D (VDR) via. Gli obiettivi del nostro studio sono stati per stabilire se un intervento di estrogeni influisce genica globale in biopsie della mucosa rettale e vitamina D se i geni correlati sono colpite. Estradiolo è stato dato a elevare a livelli sierici di estradiolo in pre-menopausa in 10 donne in postmenopausa sotto stretto controllo nutrizionale. Gli

endpoint primari erano l'espressione di VDR, CYP24A1, CYP27B1, e E-caderina nella mucosa rettale da trascrizione inversa-PCR e la risposta dell'esame di estradiolo da array di genoma. Le risposte di espressione genica in biopsie rettali di estrogeni sono stati determinati in ogni soggetto individualmente e rispetto a un umano database risposta array estrogeni gene e una vasta banca dati personalizzata in vitro-generated. La cluster analysis ha mostrato che i soggetti hanno mantenuto la loro profilo di espressione genica globale e che le differenze interindividuali sono stati superiori a differenze intraindividuale dopo l'intervento. Otto dei 10 soggetti ha mostrato un arricchimento significativo nei geni estrogeno-sensibili. analisi di matrice Gene gruppo ha mostrato l'attivazione della via VDR e down-regolazione di vie di segnalazione infiammatorie e immunitarie. Analisi trascrizione inversa-PCR hanno mostrato significativa up-regolazione di VDR e E-caderina, un bersaglio a valle di vitamina D azione. Questi dati suggeriscono che l'azione chemiopreventiva della terapia ormonale sostitutiva sui risultati neoplasia del colon, almeno in parte, da cambiamenti di vitamina D attività. Valutazione del gene array è utile in studi di intervento chemiopreventivi in piccoli gruppi di soggetti.

261: Shen M, Yen A.

**Nicotinamide cooperates with retinoic acid and 1,25-dihydroxyvitamin D(3) to regulate cell differentiation and cell cycle arrest of human myeloblastic leukemia cells.**

Oncology. 2009;76(2):91-100.

Nicotinamide, the amide derivative of vitamin B(3), cooperates with retinoic acid (RA), a form of vitamin A, and 1,25-dihydroxyvitamin D(3) (D3), to regulate cell differentiation and proliferation of human myeloblastic leukemia cells. In human myeloblastic leukemia cells, RA or D3 are known to cause MAPK signaling leading to myeloid or monocytic differentiation and G0 cell cycle arrest. In this process, RA or D3 induces the early expression of CD38, a receptor that causes ERK signaling and propels further differentiation. Our study demonstrates that nicotinamide in combination with RA or D3 affected induced expression levels of CD38, CD11b and CD14, suggesting a cooperative function of nicotinamide and RA or D3. Nicotinamide transiently retarded the initial RA- or D3-induced expression of CD38, which subsequently reached the same nearly 100% expression. Nicotinamide induced ERK activation and further enhanced the RA-induced ERK activation, but the D3-induced ERK activation was diminished by nicotinamide, although levels still exceeded those induced by RA, suggesting lineage-specific nicotinamide responses. Nicotinamide enhanced both RA- and D3-induced CD11b expression, inducible oxidative metabolism, and G0 cell cycle arrest, accelerating their induced occurrence in all instances. Consistent with this, the RA- or D3-induced downregulation of PARP was enhanced by nicotinamide. Nicotinamide thus regulated RA- or D3-induced differentiation and G0 arrest, causing a transient delay in certain early aspects of the progression to terminal differentiation but ultimately accelerating the occurrence of terminally, functionally differentiated G0 cells.

**La nicotinamide collabora con acido retinoico e con l'1,25-diidrossivitamina D (3) per regolare la differenziazione cellulare e l'arresto del ciclo cellulare di cellule umane di leucemia mieloblastica.**

Nicotinamide, amido derivato della vitamina B (3), collabora con l'acido retinoico (RA), una forma di vitamina A, e di 1,25-diidrossivitamina D (3) (D3), a regolare la differenziazione e proliferazione cellulare umana di leucemia mieloblastica cellule. In cellule umane di leucemia mieloblastica, AR o D3 sono noti per causare MAPK segnalazione che portano alla differenziazione mieloide o monocitica e G0 del ciclo cellulare arresto. In questo processo, AR o D3 induce l'espressione

precoce di CD38, un recettore che provoca ERK di segnalazione e di differenziazione spinge oltre. Il nostro studio dimostra che nicotinamide, in combinazione con AR o D3 colpiti ha indotto livelli di espressione di CD38, CD11b e CD14, suggerendo una funzione cooperativa di nicotinamide e RA o D3. Nicotinamide transitoriamente ritardato l'iniziale o RA-D3-espressione indotta di CD38, che successivamente ha raggiunto la stessa espressione di quasi il 100%. Nicotinamide indotta da attivazione ERK e ulteriormente rafforzato l'attivazione RA-indotta ERK, ma l'attivazione D3-indotta ERK è stato diminuito dalla nicotinamide, anche se i livelli ancora superiori a quelle indotte da RA, suggerendo risposte nicotinamide lineage-specifiche. Nicotinamide esaltata sia RA-D3 e indotta espressione CD11b, inducibile metabolismo ossidativo, e la cella arresto G0 del ciclo, accelerando la loro presenza ha indotto in tutti i casi. Coerentemente con questo, la RA-D3-o down-regulation indotto di PARP è stata rafforzata dalla nicotinamide. Nicotinamide così regolamentato RA-D3 o differenziazione, indotta e l'arresto G0, causando un ritardo transitorio in alcuni aspetti iniziali della progressione a differenziazione terminale, ma in ultima analisi, accelerando la comparsa di terminali, le cellule G0 funzionalmente differenziate.

262: Saramäki A, Diermeier S, Kellner R, Laitinen H, Väisänen S, Carlberg C.

### **Cyclical chromatin looping and transcription factor association on the regulatory regions of the p21 (CDKN1A) gene in response to 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3.**

J Biol Chem. 2009 Mar 20;284(12):8073-82.

The nuclear receptor vitamin D receptor (VDR) is known to associate with three vitamin D response element (VDRE)-containing regions within the CDKN1A (p21) gene region. Here we show in MDA-MB453 breast cancer cells that the natural VDR ligand 1alpha,25-dihydroxyvitamin D(3) causes cyclical transcription factor binding and chromatin looping of distal VDREs to the transcription start site (TSS) of the p21 gene, leading to cyclical accumulation of the p21 mRNA. At the chromatin level, association of the mediator protein MED1 precedes both the peaks of VDR binding to VDREs and phosphorylated RNA polymerase (p-Pol II) to the TSS. The loss of co-repressor NCoR1-histone deacetylase (HDAC) 3 complex and inhibitory chromatin looping from VDREs to the TSS are also initial events followed by increased acetylation of histone 3 at lysine 9 at the TSS prior to initiation of transcription. Simultaneous to VDR and p-Pol II peaks, chromatin loops between VDREs and the TSS are formed, and the lysine demethylase LSD1 and the histone acetyltransferase CBP are enriched in both regions. This is followed by a moderate peak in p21 transcript accumulation, repeated in cycles of 45-60 min. The transcript accumulation pattern is disturbed by siRNA inhibition of the mediator protein MED1, LSD1, NCoR1, or various HDACs, whereas CBP appears unnecessary for the response. Inhibition of MED1, HDAC4, or LSD1 by siRNA also attenuates ligand-induced chromatin looping. In conclusion, 1alpha,25-dihydroxyvitamin D(3) regulates p21 transcription by inducing cyclical chromatin looping that depends on both histone deacetylation and demethylation.

### **Associazione tra il loop della cromatina e il fattore di trascrizione sulla regione regolatoria del gene p21 (CDKN1A) in risposta a 1alfa,25-diidrossivitamina D3.**

Il recettore nucleare del recettore della vitamina D (VDR) è noto per associare con tre elementi di risposta vitamina D (VDREs) contenenti le regioni entro il (p21), gene CDKN1A regione. Qui vi mostriamo in cellule del seno MDA-MB453 cancro che il naturale ligando VDR 1alfa ,25-diidrossivitamina D (3) fattori ciclici cromatina fattore di trascrizione vincolante e loop di VDREs distale al sito di inizio della trascrizione (TSS) del gene p21, con conseguente accumulo ciclica del p21 mRNA. A livello della cromatina, l'associazione della proteina mediatrice MED1 precede sia i picchi di VDR legame VDREs e fosforilato polimerasi RNA (p-Pol II) del TSS. La perdita di deacetilasi co-repressore NCoR1-deacetilasi (HDAC) 3 complessi e cromatina inibitoria looping da

VDREs al TSS sono anche gli eventi iniziale seguita da acetilazione degli istoni aumentato di 3 a lisina 9 al TSS prima di iniziare la trascrizione. Contestualmente al VDR e p-Pol picchi II, loop cromatina tra VDREs e la TSS si formano, e la demetilasi LSD1 lisina e la istone acetiltransferasi CBP sono arricchiti nelle due regioni. Questo è seguito da un picco moderato accumulo di trascrizione p21, ripetuto in cicli di 45-60 min. Il modello di accumulazione trascrizione è disturbato da siRNA inibizione della proteina mediatrice MED1, LSD1, NCoR1, o HDACs vari, mentre il CBP appare superfluo per la risposta. L'inibizione della MED1, HDAC4, o LSD1 da siRNA attenua anche ligando indotta looping cromatina. In conclusione, 1alfa ,25-diidrossivitamina D (3) regola la p21 trascrizione inducendo ciclo congiunturale cromatina che dipende sia deacetilazione degli istoni e demetilazione.

263: Yin Y, Ni J, Chen M, Guo Y, Yeh S.

**RRR-alpha-vitamin E succinate potentiates the antitumor effect of calcitriol in prostate cancer without overt side effects.**

Clin Cancer Res. 2009 Jan 1;15(1):190-200.

**PURPOSE:** To determine the antitumor efficacy of using calcitriol combined with RRR-alpha-vitamin E succinate (VES) on prostate cancer.

**EXPERIMENTAL DESIGN:** The effects of VES or VES in combination with calcitriol on the calcitriol target genes were evaluated by Western blot and real-time PCR. The antiproliferation effect of the combination in prostate cancer cells was evaluated by the combination index method. The role of the vitamin D(3) receptor (VDR) in the enhanced antitumor effects of the combination was confirmed by small interfering RNA knockdown strategy. Xenograft-bearing mice were used to reaffirm the antitumor efficacy of this combination. Pathohistology analyses and expressions of VDR and its target genes were analyzed in untreated and treated tumors.

**RESULTS:** VES selectively increased VDR protein in different prostate cancer cells. Low doses of calcitriol combined with VES were significantly superior to the additive effect of individual treatments against prostate cancer cell proliferation. The expression of VDR target genes involved in antiproliferation were further sensitized in the presence of VES. Knockdown of VDR expression abolished the combination benefits in LNCaP and PC3 cells. Consistently, in prostate cancer xenograft models, VES enhanced the therapeutic efficacy of a tolerated dose of calcitriol yet without overt evidence of systemic toxicity and hypercalcemia. This notable in vivo effect was also accompanied by up-regulation of VDR target genes.

**CONCLUSIONS:** Low-dose calcitriol combined with vitamin E analogue could be a solution to the calcemic side effect. The demonstration of superior antitumor activity of low-dose calcitriol plus VES provides the preclinical basis for developing a useful therapeutic strategy for prostate cancer.

**RRR-alfa-vitamina E succinato potenzia l'effetto antitumorale del calcitriolo nel cancro prostatico senza effetti collaterali.**

**SCOPO:** Per per determinare l'efficacia antitumorale di utilizzare in combinazione con calcitriolo E succinato RRR-alfa-vitamina E (VES) sul cancro alla prostata.

**DISEGNO SPERIMENTALE:** Gli effetti della VES VES o in combinazione con calcitriolo sui geni bersaglio calcitriolo è stata valutata mediante Western blot e PCR in tempo reale. L'effetto antiproliferation della combinazione di cellule tumorali della prostata è stata valutata con il metodo indice combinazione. Il ruolo della vitamina D (3) recettore (VDR) in effetti antitumorali maggiore della combinazione è stata confermata da piccoli RNA interferenti strategia colpo. topi dello xenotrapianto-cuscinetto sono stati utilizzati per riaffermare l'efficacia antitumorale di questa

combinazione. analisi Pathohistology ed espressioni di VDR e dei suoi geni bersaglio sono stati analizzati nei tumori non trattati e trattati. RISULTATI: VES aumentata VDR selettivamente proteine nelle diverse cellule del cancro alla prostata. Basse dosi di calcitriolo combinato con VES erano significativamente superiori ai effetto additivo di trattamenti individuali contro la proliferazione delle cellule di cancro alla prostata. L'espressione di geni bersaglio coinvolti nella VDR antiproliferazione sono stati ulteriormente sensibilizzati, in presenza di VES. Colpo di espressione VDR abolito i benefici combinazione in cellule PC3 e LNCaP. Coerentemente, in modelli di tumore della prostata xenotrapianto, VES migliorato l'efficacia terapeutica di una dose tollerata di calcitriolo ancora senza prove evidenti di tossicità sistemica e ipercalcemia. Questo notevole effetto in vivo è stata anche accompagnata da up-regolazione di geni bersaglio VDR. CONCLUSIONI: calcitriolo a basse dosi in combinazione con analogo della vitamina E potrebbe essere una soluzione per l'effetto collaterale calcemico. La dimostrazione di attività antitumorale superiore di calcitriolo a basse dosi più VES fornisce la base per lo sviluppo preclinico un'utile strategia terapeutica per il cancro alla prostata.

265: Deng C, Ueda E, Chen KE, Bula C, Norman AW, Luben RA, Walker AM.

**Prolactin blocks nuclear translocation of VDR by regulating its interaction with BRCA1 in osteosarcoma cells.**

Mol Endocrinol. 2009 Feb;23(2):226-36.

Based on their content of prolactin receptors, osteosarcoma cells were predicted to be responsive to prolactin (PRL), but whether PRL would be beneficial or contribute to pathogenesis was unclear. 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D<sub>3</sub> [1α,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>] has antiproliferative effects on osteosarcoma cells, and a complex interregulatory situation exists between PRL and 1α,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. Using osteosarcoma cells, Western blot, real time RT-PCR, and promoter-luciferase assays, we have examined the interaction between PRL and 1α,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> and demonstrated that physiological concentrations of PRL block increased osteocalcin and vitamin D receptor (VDR) expression in response to 1α,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. This blockade was shown to be the result of lack of nuclear accumulation of the VDR in response to 1α,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. Although inhibition of proteasomic degradation with MG132 had no effect on the VDR itself in a 30-min time frame, it relieved the blockade by PRL. Analysis of ubiquitinated proteins brought down by immunoprecipitation with anti-VDR showed PRL regulation of a 250-kDa protein-VDR complex. P250 was identified as the breast cancer tumor suppressor gene product, BRCA1, by Western blot of the VDR immunoprecipitate and confirmed by immunoprecipitation with anti-BRCA1 and blotting for the VDR in the absence and presence of PRL. Knockdown of BRCA1 inhibited nuclear translocation of the VDR and the ability of 1α,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> to induce the VDR. This, to our knowledge, is the first demonstration of a role for BRCA1 in nuclear accumulation of a steroid hormone and the first demonstration that PRL has the potential to affect the cell cycle through effects on BRCA1.

**Prolattina blocca la traslocazione nucleare di VDR regolando la sua interazione con BRCA1 nelle cellule con osteosarcoma.**

Sulla base delle loro contenuto di recettori per la prolattina, le cellule di osteosarcoma sembravano destinate a rispondere alle prolattina (PRL), ma se PRL sarebbe utile o contribuire alla patogenesi non è chiara. 1,25 (OH) (2) vitamina D (3) [1alfa, 25 (OH) (2) D (3)], ha effetti antiproliferativi sulle cellule di osteosarcoma, e una situazione complessa interregulatory esiste tra PRL e 1alfa, 25 (OH) (2) D (3). Utilizzando cellule di osteosarcoma, Western Blot, real time RT-PCR, saggi e

promotore-luciferasi, abbiamo esaminato l'interazione tra PRL e 1alfa, 25 (OH) (2) D (3) e ha dimostrato che concentrazioni fisiologiche di blocco PRL aumentato osteocalcina e recettore della vitamina D (VDR) espressione in risposta alla 1alfa, 25 (OH) (2) D (3.) è stato dimostrato che questo blocco di essere il risultato della mancanza di accumulo nucleare della VDR in risposta alla 1alfa, 25 (OH) (2) D (3). Sebbene l'inibizione della degradazione proteasomica con MG132 non ha avuto effetto sullo stesso VDR in un arco di tempo di 30 minuti, è sollevato il blocco di PRL. Analisi di proteine ubiquitinate abbattuto da immunoprecipitazione con anti-VDR ha mostrato regolamento PRL di un complesso di 250 kDa proteina-VDR. P250 è stato identificato come il prodotto del gene cancro al seno oncosoppressori, BRCA1, tramite Western blot della immunoprecipitato VDR e confermata da immunoprecipitazione con anti-BRCA1 e blotting per la VDR, in assenza e presenza di PRL. Colpo di BRCA1 inibito traslocazione nucleare del VDR e la capacità di 1alfa, 25 (OH) (2) D (3) per indurre la VDR. Questa, a nostra conoscenza, è la prima dimostrazione di un ruolo di BRCA1 in accumulo nucleare di un ormone steroide e la prima dimostrazione che PRL ha il potenziale per influenzare il ciclo cellulare attraverso gli effetti su BRCA1.

267: Wang J, Zhao Y, Kauss MA, Spindel S, Lian H.

### **Akt regulates vitamin D3-induced leukemia cell functional differentiation via Raf/MEK/ERK MAPK signaling.**

Eur J Cell Biol. 2009 Feb;88(2):103-15.

1,25-dihydroxyvitamin D3 (vitamin D3) induces differentiation of HL-60 human myeloid leukemia cells; however, the signaling mechanism governing these effects is not fully clear. Here, we show that vitamin D3 induced functional differentiation by Akt through Raf/MEK/ERK MAPK signaling. Vitamin D3 downregulated Akt, weakened Akt-Raf1 interaction, and subsequently activated the Raf/MEK/ERK MAPK pathway. Pharmacological inhibition of MEK/ERK crippled differentiation in response to vitamin D3. Ectopic overexpression of Akt inhibited MAPK signaling, downregulated cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitors p21(Wip1/Cip1) and p27(Kip1) and blunted differentiation in response to vitamin D3 while knockdown of Akt by RNA interference gave reverse effects. Furthermore, knockdown of the CDK inhibitors by siRNA crippled the recruitment of retinoblastoma protein (Rb) from the Raf1-Rb complex and Rb hypophosphorylation, and abolished differentiation in response to vitamin D3. Vitamin D3-induced MAPK signaling mediated upregulation of the CDK inhibitors and Rb, disassociation of Raf1 and Rb, and dephosphorylation of Rb, resulting in Rb binding to transcription factor E2F1 and subsequent differentiation. Finally, knockdown of Rb by siRNA prevented vitamin D3-induced differentiation. Mutating Rb at Ser795 evokes its association with E2F1, indicating the critical role of Rb Ser795 in regulating cell differentiation. Taken together, our data suggest that vitamin D3-triggered differentiation of human myeloid leukemia cells depends on downregulation of Akt, which dissociates from Raf1 and activates MAPK signaling leading to CDK inhibitor upregulation, Raf1 disassociation from Rb, and Rb upregulation and hypophosphorylation coupled to E2F1 binding.

### **Akt regola la differenziazione funzionale delle cellule leucemiche indotta dalla vitamina D3 tramite la via di segnale Raf/MEK/ERK MAPK.**

1,25-diidrossivitaminina D3 (vitamina D3) induce la differenziazione delle cellule HL-60 umana leucemia mieloide, tuttavia, il meccanismo di segnalazione che regolano questi effetti non è del tutto chiara. Qui mostriamo che la vitamina D3 indotto differenziazione funzionale di Akt attraverso Raf / MEK / ERK MAPK segnalazione. La vitamina D3 downregulated Akt, indebolito interazione Akt-Raf1, e successivamente attivato il / Raf MEK / ERK MAPK. l'inibizione farmacologica di

MEK / ERK differenziazione paralizzato in risposta alla vitamina D3. sovraespressione ectopica di Akt inibito segnalazione MAPK, downregulated chinasi ciclina-dipendente (CDK) inibitori p21 (Wip1/Cip1) e p27 (Kip1) e la differenziazione smussati, in risposta alla vitamina D3, mentre colpo di Akt di interferenza del RNA ha dato effetti inverso. Inoltre, colpo degli inibitori CDK da siRNA paralizzato l'assunzione di proteina retinoblastoma (Rb) dal complesso Raf1-Rb e ipofosforilazione Rb, e abolita la differenziazione in risposta alla vitamina D3. La vitamina D3-indotta MAPK sovraregolazione segnalazione mediata degli inibitori CDK e Rb, dissociazione di Raf1 e Rb, e defosforilazione di Rb, con conseguente legame a Rb fattore di trascrizione E2F1 e differenziazione successive. Infine, colpo di Rb da siRNA impedito vitamina D3 differenziazione, indotta. Mutazione Rb a Ser795 evoca la sua associazione con E2F1, indicando il ruolo critico di Rb Ser795 nel regolare la differenziazione cellulare. Nel loro insieme, i nostri dati suggeriscono che la vitamina D3-triggered differenziazione di cellule umane di leucemia mieloide dipende da down-regulation di Akt, che si dissocia da Raf1 e attiva MAPK segnalazione che porta a upregulation inibitori CDK, dissociazione Raf1 da Rb, Rb e upregulation e ipofosforilazione accoppiati a E2F1 vincolanti.

271: Maier S, Daroqui MC, Scherer S, Roepcke S, Velcich A, Shenoy SM, Singer RH, Augenlicht LH.

**Butyrate and vitamin D3 induce transcriptional attenuation at the cyclin D1 locus in colonic carcinoma cells.**

J Cell Physiol. 2009 Mar;218(3):638-42.

In stimulating maturation of colonic carcinoma cells, the short chain fatty acid butyrate, and 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D(3), were shown to attenuate transcription of the cyclin D1 gene, giving rise to truncated transcripts of this locus. Moreover, a sequence which is highly conserved in the human, mouse, rat, and dog genome was found in the 4 kb long intron 3 of the human cyclin D1 gene, and is capable of forming a hairpin structure similar to that of microRNA precursors. The expression of this sequence is also decreased by the attenuation. Thus, the transcriptional attenuation at the cyclin D1 locus not only down-regulates the expression of this key gene in mucosal cell maturation and tumorigenesis, but may also abrogate the generation of a molecule that encompasses this conserved sequence in cyclin D1 intron 3.

**Butirato e vitamina D3 inducono l'attenuazione trascrizionale al locus della ciclina D1 nelle cellule del colon cancerose.**

Nello stimolare la maturazione delle cellule di carcinoma del colon, il butirato di grassi a corta catena di acido, e 1 $\alpha$ ,25-diidrossivitamina D (3), sono stati mostrati per attenuare la trascrizione del gene ciclina D1, dando luogo a trascrizioni troncato di questo locus. Inoltre, una sequenza che è altamente conservata nel umana, topo, ratto, cane e del genoma è stato trovato nel introne 4 KB lungo 3 del gene della ciclina D1 umano, ed è in grado di formare una struttura a forcina simile a quella dei precursori microRNA. L'espressione di questa sequenza è anche diminuito di attenuazione. Così, l'attenuazione della trascrizione presso la ciclina D1 locus non solo down-regola l'espressione di questo gene chiave nella maturazione delle cellule della mucosa e tumorigenesi, ma può anche abrogare la generazione di una molecola che comprende questa sequenza conservata in ciclina D1 introne 3.

273: Kotsa K, Yavropoulou MP, Anastasiou O, Yovos JG.

**Role of vitamin D treatment in glucose metabolism in polycystic ovary syndrome.**

Fertil Steril. 2009Sep;92(3):1053-8.

**OBJECTIVE:** To determine the effect of treatment with vitamin D(3) analogue in the parameters of glucose metabolism in obese women with polycystic ovary syndrome (PCOS).

**DESIGN:** Observational study.

**SETTING:** Obese women with PCOS in an academic research environment.

**PATIENT(S):** Fifteen obese women (mean age 28 +/- 1.3 years, mean body mass index 32.55 +/- 0.43) with documented chronic anovulation and hyperandrogenism were recruited into the study.

**INTERVENTION(S):** Alphacalcidol (1-alpha-hydroxyvitamin D(3)) was administered orally 1 microg/day for 3 months. All subjects underwent a frequently sampled IV glucose tolerance test after a 10- to 12-hour overnight fast during a spontaneous bleeding episode before and after treatment with alphacalcidol.

**MAIN OUTCOME MEASURE(S):** Peripheral insulin resistance and insulin effectiveness were estimated with minimal model.

**RESULT(S):** The first phase of insulin secretion was significantly increased after treatment with alphacalcidol. A favorable statistically significant change also was observed in the lipid profile.

**CONCLUSION(S):** Treatment with the vitamin D(3) analogue (alphacalcidol) could be of value in the management of PCOS.

**Ruolo del trattamento con vitamina D nel metabolismo del glucosio nella sindrome da ovaio policistico.**

**OBIETTIVO:** Per determinare l'effetto del trattamento con vitamina D (3) analogica nei parametri del metabolismo del glucosio nelle donne obese con sindrome dell'ovaio policistico (PCOS).

**DESIGN:** studio osservazionale.

**REGOLAZIONE:** Le donne obese con sindrome dell'ovaio policistico in un ambiente di ricerca accademica.

**PAZIENTE (S):** Quindici donne obese (età media 28 +/- 1,3 anni, indice di massa corporea 32,55 +/- 0,43) con documentata anovulazione cronica e iperandrogenismo sono stati reclutati nello studio.

**INTERVENTO (S):** Alphacalcidol (1-alfa-idrossivitamina D (3)) è stato somministrato per via orale 1 microg / die per 3 mesi. Tutti i soggetti sottoposti a frequenti test del glucosio nel campione IV tolleranza dopo un 10 - a 12 ore di digiuno notturno durante un episodio di sanguinamento spontaneo, prima e dopo il trattamento con alphacalcidol.

**MISURA PRINCIPALE DI RISULTATO (S):** la resistenza periferica all'insulina e l'efficacia di

insulina sono stati stimati con il modello minimo. Risultato (i): La prima fase di secrezione insulinica è risultata significativamente aumentata dopo il trattamento con alphacalcidol. Un cambiamento favorevole statisticamente significativa è stata osservata anche nel profilo lipidico. CONCLUSIONE (S): il trattamento con la vitamina D (3) analogico (alphacalcidol) potrebbe essere utile nella gestione della PCOS.

274: Bikle D.

### **Nonclassic actions of vitamin D.**

J Clin Endocrinol Metab. 2009Jan;94(1):26-34.

**CONTEXT:** Vitamin D receptors are found in most tissues, not just those participating in the classic actions of vitamin D such as bone, gut, and kidney. These nonclassic tissues are therefore potential targets for the active metabolite of vitamin D, 1,25(OH)(2)D. Furthermore, many of these tissues also contain the enzyme CYP27B1 capable of producing 1,25(OH)(2)D from the circulating form of vitamin D. This review was intended to highlight the actions of 1,25(OH)(2)D in several of these tissues but starts with a review of vitamin D production, metabolism, and molecular mechanism.

**EVIDENCE ACQUISITION:** Medline was searched for articles describing actions of 1,25(OH)(2)D on parathyroid hormone and insulin secretion, immune responses, keratinocytes, and cancer.

**EVIDENCE SYNTHESIS:** Vitamin D production in the skin provides an efficient source of vitamin D. Subsequent metabolism to 1,25(OH)(2)D within nonrenal tissues differs from that in the kidney. Although vitamin D receptor mediates the actions of 1,25(OH)(2)D, regulation of transcriptional activity is cell specific. 1,25(OH)(2)D inhibits PTH secretion but promotes insulin secretion, inhibits adaptive immunity but promotes innate immunity, and inhibits cell proliferation but stimulates their differentiation.

**CONCLUSIONS:** The nonclassic actions of vitamin D are cell specific and provide a number of potential new clinical applications for 1,25(OH)(2)D(3) and its analogs. However, the use of vitamin D metabolites and analogs for these applications remains limited by the classic actions of vitamin D leading to hypercalcemia and hypercalcuria.

### **Azioni nonclassiche della vitamina D.**

CONTESTO: La vitamina D recettori si trovano nella maggior parte dei tessuti, non solo quelli che partecipano alle azioni classiche di vitamina D come le ossa, intestino e reni. Questi tessuti nonclassic sono quindi potenziali bersagli per il metabolita attivo della vitamina D, 1,25 (OH) (2) D. Inoltre, molti di questi tessuti contengono anche l'enzima CYP27B1 in grado di produrre 1,25 (OH) (2) D dalla forma circolante della vitamina D. Questa recensione è stata destinata per evidenziare le azioni di 1,25 (OH) (2) D in alcuni di questi tessuti, ma inizia con una revisione della produzione di vitamina D, il metabolismo, e il meccanismo molecolare. PROVE DI ACQUISIZIONE: Medline è stato cercato per articoli che descrivono le azioni di 1,25 (OH) (2) D con ormone paratiroideo e la secrezione di insulina, le risposte immunitarie, i cheratinociti, e il cancro. PROVE DI SINTESI: la produzione di vitamina D nella pelle fornisce una fonte efficiente del

metabolismo della vitamina D. Dopo 1,25 (OH) (2) D all'interno dei tessuti non renali è diversa da quella del rene. Anche se recettore della vitamina D media l'azione di 1,25 (OH) (2) D, la regolamentazione di attività trascrizionale è cellulari specifici. 1,25 (OH) (2) D inibisce la secrezione di PTH, ma promuove la secrezione di insulina, inibisce l'immunità adattativa, ma stimola l'immunità innata, e inibisce la proliferazione cellulare, ma stimola la loro differenziazione. CONCLUSIONI: Le azioni nonclassic di vitamina D sono cellule specifiche e fornire un numero di potenziali nuove applicazioni cliniche di 1,25 (OH) (2) D (3) e suoi analoghi. Tuttavia, l'utilizzo di metaboliti della vitamina D e analoghi per queste applicazioni resta limitata dalle azioni classiche di vitamina D porta a ipercalcemia e ipercalciuria.

275: Rohan TE, Negassa A, Chlebowski RT, Ceria-Ulep CD, Cochrane BB, Lane DS, Ginsberg M, Wassertheil-Smoller S, Page DL.

### **A randomized controlled trial of calcium plus vitamin D supplementation and risk of benign proliferative breast disease.**

Breast Cancer Res Treat. 2009 Jul;116(2):339-50.

Experimental evidence provides strong support for anti-carcinogenic effects of calcium and vitamin D with respect to breast cancer. Observational epidemiologic data also provide some support for inverse associations with risk. We tested the effect of calcium plus vitamin D supplementation on risk of benign proliferative breast disease, a condition which is associated with increased risk of breast cancer. We used the Women's Health Initiative randomized controlled trial. The 36,282 participants were randomized either to 500 mg of elemental calcium as calcium carbonate plus 200 IU of vitamin D(3) (GlaxoSmithKline) twice daily (n = 18,176) or to placebo (n = 18,106). Regular mammograms and clinical breast exams were performed. We identified women who had had a biopsy for benign breast disease and subjected histologic sections from the biopsies to standardized review. After an average follow-up period of 6.8 years, 915 incident cases of benign proliferative breast disease had been ascertained, with 450 in the intervention group and 465 in the placebo group. Calcium plus vitamin D supplementation was not associated with altered risk of benign proliferative breast disease overall (hazard ratio = 0.99, 95% confidence interval = 0.86-1.13), or by histologic subtype. Risk varied significantly by levels of age at baseline, but not by levels of other variables. Daily use of 1,000 mg of elemental calcium as calcium carbonate plus 400 IU of vitamin D(3) for almost 7 years by postmenopausal women did not alter the overall risk of benign proliferative breast disease.

### **Un trial controllato randomizzato di calcio e un supplemento di vitamina D e rischio di sviluppo di patologie proliferative benigne al seno.**

Evidenze sperimentali fornisce un forte sostegno per gli effetti anti-cancerogeni di calcio e vitamina D in relazione al cancro al seno. dati epidemiologici osservazionali anche fornire qualche supporto per le associazioni inversa con il rischio. Abbiamo testato l'effetto di calcio più vitamina D sul rischio di patologie mammarie benigne proliferative, una condizione che è associata ad un aumentato rischio di cancro al seno. Abbiamo usato il Women's Health Initiative randomizzato e controllato. I 36.282 partecipanti sono stati randomizzati a 500 mg di calcio elementare come carbonato di calcio e 200 UI di vitamina D (3) (GlaxoSmithKline) due volte al giorno (n = 18.176) o placebo (n = 18.106). mammografie periodiche e gli esami clinico del seno sono stati effettuati. Abbiamo identificato le donne che avevano avuto una biopsia per la malattia benigna del seno e

sottoposte sezioni istologiche da biopsie di rivedere standardizzati. Dopo un periodo medio di follow-up di 6,8 anni, 915 casi incidenti di patologia mammaria benigna proliferativa era stata accertata, con 450 nel gruppo di intervento e 465 nel gruppo placebo. Calcio più vitamina D non è stato associato con il rischio alterato di patologie mammarie benigne proliferative globale (hazard ratio = 0,99, intervallo di confidenza 95% = 0,86-1,13), o da sottotipo istologico. Rischio varia in modo significativo i livelli di età al basale, ma non per i livelli di altre variabili. L'uso quotidiano di 1.000 mg di calcio elementare come carbonato di calcio maggiorato di 400 UI di vitamina D (3) per quasi 7 anni da parte delle donne dopo la menopausa non ha alterato il rischio globale di malattia benigna della mammella proliferativa.

278: Schwartz GG.

### **Vitamin D and intervention trials in prostate cancer: from theory to therapy.**

Ann Epidemiol. 2009 Feb;19(2):96-102.

Studies of vitamin D and prostate cancer have advanced rapidly from the hypothesis that vitamin D deficiency increases the risk of prostate cancer to intervention trials of vitamin D administration in clinical cancer. The hormonal form of vitamin D, 1,25(OH)(2)D, exerts prodifferentiating, antiproliferative, anti-invasive, and antimetastatic effects on prostate cells. Moreover, normal prostate cells synthesize 1,25(OH)(2)D from serum levels of the prohormone, 25-hydroxyvitamin D. The autocrine synthesis of 1,25(OH)(2)D by prostatic cells provides a biochemical mechanism whereby vitamin D may prevent prostate cancer. Many prostate cancer cells have lost the ability to synthesize 1,25(OH)(2)D but still possess 1,25(OH)(2)D receptors. This suggests that whereas vitamin D (e.g., cholecalciferol) might prevent prostate cancer, existing prostate tumors likely would require treatment with 1,25(OH)(2)D and/or its analogs. The major obstacle to the use of 1,25(OH)(2)D in patients therapeutically is the risk of hypercalcemia. Several maneuvers to reduce this risk, including pulse dosing and the use of less calcemic 1,25(OH)(2)D analogs, have been explored in Phase I-III clinical trials. Once merely a promise, vitamin D-based therapies for prostate cancer may soon be medical practice.

### **Vitamina D e trials nel cancro prostatico: dalla teoria alla terapia.**

Studi di vitamina D e cancro alla prostata sono avanzati rapidamente dall'ipotesi che il deficit di vitamina D aumenta il rischio di cancro alla prostata a prove intervento somministrazione di vitamina D nel cancro clinica. La forma ormonale della vitamina D, 1,25 (OH) (2) D, esercita prodifferentiating, antiproliferativa, effetti anti-invasive, antimetastatica e sulle cellule della prostata. Inoltre, le cellule della prostata normale sintesi di 1,25 (OH) (2) D da livelli sierici della pro, 25-idrossivitamina D. La sintesi autocrina di 1,25 (OH) (2) D da parte delle cellule prostatiche fornisce un meccanismo biochimico con cui vitamina D può prevenire il cancro alla prostata. Molte cellule tumorali della prostata hanno perso la capacità di sintetizzare 1,25 (OH) (2) D ma ancora in possesso di 1,25 (OH) (2) recettori D. Questo suggerisce che mentre la vitamina D (per esempio, colecalciferolo) può prevenire il cancro alla prostata, i tumori della prostata già esistenti probabilmente avrebbe richiesto un trattamento con 1,25 (OH) (2) D e / o di suoi analoghi. L'ostacolo principale per l'utilizzo del 1,25 (OH) (2) D nei pazienti è terapeuticamente il rischio di ipercalcemia. Alcune manovre per ridurre questo rischio, tra cui il dosaggio del polso e l'uso di

meno calcemici 1,25 (OH) (2) D analoghi, sono stati esplorati in fase I-III degli studi clinici. Una volta che una semplice promessa, terapie a base di vitamina D per il cancro alla prostata potrebbe essere presto la pratica medica.

280: Bläuer M, Rovio PH, Ylikomi T, Heinonen PK.

**Vitamin D inhibits myometrial and leiomyoma cell proliferation in vitro.**

Fertil Steril. 2009 May;91(5):1919-25.

**OBJECTIVE:** To determine the effect of 1,25(OH)(2)D(3) and 25(OH)D(3) vitamin D derivatives on the growth of leiomyoma and myometrial cells in vitro.

**DESIGN:** In vitro study.

**SETTING:** Cell biology research laboratory.

**PATIENT(S):** Six premenopausal women with uterine leiomyomas undergoing hysterectomy.

**INTERVENTION(S):** Samples of leiomyomas and normal myometrial tissue were obtained, and paired cultures were established.

**MAIN OUTCOME MEASURE(S):** A colorimetric crystal violet assay to determine the effect of 1,25(OH)(2)D(3) and 25(OH)D(3) on cell growth.

**RESULT(S):** In both myometrial and leiomyoma cells, 0.1 nM physiologic level of 1,25(OH)(2)D(3) inhibited growth by 12% when compared with controls. The growth inhibition was concentration dependent; the highest concentration of 1,25(OH)(2)D(3) (100 nM) inhibited growth by 62% in both cell types. All the differences were statistically significant. A slight stimulation (<4%) of cell proliferation was observed with the lowest 25(OH)(2)D(3) concentrations. When treated with either a 500 nM or 1000 nM concentration of the compound, the growth of both cell types fell to approximately 50% of that of the control cultures, and the level of inhibition with the latter concentration was statistically significant.

**CONCLUSION(S):** Both myometrial and leiomyoma cell growth in vitro was effectively inhibited by 1,25(OH)(2)D(3). Vitamin D may play a role in the growth of uterine leiomyomas.

**Vitamina D inibisce la proliferazione in vitro delle cellule con leiomioma e miometriali**

**OBIETTIVO:** Per determinare l'effetto della 1,25 (OH) (2) D (3) e 25 (OH) D (3) derivati della vitamina D sulla crescita delle cellule del leiomioma e miometriale in vitro.

**DISEGNO:** Studio in vitro.

**REGOLAZIONE:** Cell Research laboratorio di biologia.

**PAZIENTE (S):** sei donne in premenopausa con miomi uterini in fase di isterectomia.

**INTERVENTO (S):** I campioni di leiomiomi e normale tessuto miometriale sono stati ottenuti, e le culture appaiati sono stati stabiliti.

**MISURA PRINCIPALE DI RISULTATO (S):** un saggio colorimetrico viola di cristallo per determinare l'effetto della 1,25 (OH) (2) D (3) e 25 (OH) D (3) sulla crescita cellulare.

**Risultato (i):** in entrambe le cellule myometrial e leiomioma, 0.1 livello fisiologico nM di 1,25 (OH) (2) D (3) ha inibito la crescita del 12% rispetto ai controlli. L'inibizione della crescita era

dipendente dalla concentrazione, la più alta concentrazione di 1,25 (OH) (2) D (3) (100 nM) ha inibito la crescita del 62% in entrambi i tipi di cellule. Tutte le differenze erano statisticamente significative. Una stimolazione lieve (<4%) della proliferazione cellulare è stato osservato con il più basso 25 (OH) (2) D (3) concentrazioni. Quando trattati con una 500 o 1000 nM nM concentrazione del composto, la crescita di entrambi i tipi cellulari è scesa al 50% circa di quello delle colture di controllo, e il livello di inibizione con la concentrazione di quest'ultima è stata statisticamente significativa.

CONCLUSIONE (S): Sia myometrial leiomioma e la crescita delle cellule in vitro è stato effettivamente inibita dalla 1,25 (OH) (2) D (3). La vitamina D può avere un ruolo nella crescita dei leiomiomi uterini.

281: Peng X, Hawthorne M, Vaishnav A, St-Arnaud R, Mehta RG.

**25-Hydroxyvitamin D3 is a natural chemopreventive agent against carcinogen induced precancerous lesions in mouse mammary gland organ culture.**

Breast Cancer Res Treat. 2009Jan;113(1):31-41.

Despite the role of vitamin D(3) endocrine system in prevention of mammary gland transformation in animal models, use of 1,25(OH)(2)D(3) in clinical settings is precluded due to its toxicity in vivo. Therefore much effort has been placed in developing relatively non-toxic vitamin D analogs. Recently, with the discovery of the expression of 25-hydroxy vitamin D(3) 1alpha-hydroxylase (CYP27B1) in multiple extrarenal organs, the functional role of prohormone, 25-hydroxyvitamin D(3) [25(OH)D(3)], has been redefined. Since 25(OH)D(3) does not cause hypercalcemia and maintains relative high concentration in serum, it is possible that the prohormone can be converted to active hormone in mammary epithelial cells to provide chemopreventive effects. In the present study, we evaluated its functional significance using mouse mammary organ culture (MMOC) system. We first showed that 25(OH)D(3) 1alpha-hydroxylase is extensively expressed in mammary ductal epithelial cells at both protein and mRNA levels, which is a prerequisite for 25(OH)D(3) to function in an autocrine/paracrine manner. However, we also observed that clotrimazol (1alpha-hydroxylase inhibitor) enhanced 25(OH)D(3) -induced CYP24 expression in breast cancer cells. In mammary glands derived from 1alpha-hydroxylase knockout mice, 25(OH)D(3) treatment in organ culture significantly induced CYP24 expression, indicating a potential direct effect of 25(OH)D(3). In MMOC, 100-250 nM 25(OH)D(3) suppressed both ovarian hormone-dependent and -independent mammary precancerous lesions (induced by DMBA) by more than 50%, while the active hormone 1,25(OH)(2)D(3) (positive control) at 100 nM suppressed alveolar lesions by more than 80%. The inactive vitamin D(3) (negative control) at 100 nM suppressed alveolar lesions by only 20% (P>0.05). We found that 25(OH)D(3) inhibits DMBA-induced mammary alveolar lesions (MAL) in a stage-specific manner: 25(OH)D(3) mainly inhibits the promotion stage of lesion formation. We conclude that 25(OH)D(3) could serve as a non-toxic natural chemopreventive agent for further development for breast cancer prevention.

**25-idrossivitamina D3 è un agente chemiopreventivo naturale contro i cancerogeni che inducono lesioni precancerose nelle ghiandole mammarie di topo in coltura.**

Nonostante il ruolo della vitamina D (3) sistema endocrino nella prevenzione di trasformazione della ghiandola mammaria in modelli animali, l'uso di 1,25 (OH) (2) D (3) in ambito clinico è preclusa a causa della sua tossicità in vivo. Perciò molti sforzi sono stati collocati in via di sviluppo relativamente non tossico analoghi della vitamina D. Recentemente, con la scoperta di espressione di 25-idrossi vitamina D (3) 1alfa-idrossilasi (CYP27B1) in vari organi extrarenale, il ruolo funzionale di prohormone, 25-idrossivitamina D (3) [25 (OH) D (3) ], è stato ridefinito. Dal 25

(OH) D (3) non provoca ipercalcemia e mantiene relativamente alta concentrazione nel siero, è possibile che il pro-ormoni possono essere convertiti in ormone attivo in cellule epiteliali mammarie per fornire effetti di chemioprevenzione. Nel presente studio, abbiamo valutato il suo significato funzionale utilizzando mammaria mouse organo cultura (MMOC) del sistema. In primo luogo abbiamo dimostrato che il 25 (OH) D (3) 1alfa-idrossilasi è ampiamente espresso in cellule duttali mammarie epiteliali, sia a livello di proteine e mRNA, che è un prerequisito per 25 (OH) D (3) per funzionare in modo autocrino / paracrino modo. Tuttavia, abbiamo anche osservato che clotrimazol (inibitore 1alfa-idrossilasi) ha migliorato di 25 (OH) D (3)-indotta espressione di CYP24 nelle cellule di cancro al seno. In ghiandole mammarie derivati da topi knockout per 1alfa-idrossilasi, 25 (OH) D (3) il trattamento in coltura d'organo in modo significativo indotto espressione CYP24, indicando un potenziale effetto diretto di 25 (OH) D (3). In MMOC, 100-250 nM 25 (OH) D (3) sia soppresso ovarica ormone-dipendenti lesioni mammarie e indipendente precancerose (indotta da DMBA) di oltre il 50%, mentre l'ormone attivo 1,25 (OH) (2 ) D (3) (controllo positivo) a 100 nM soppressa lesioni alveolari di oltre il 80%. Il inattivo vitamina D (3) (controllo negativo) a 100 nM soppressa lesioni alveolari solo del 20% ( $p > 0,05$ ). Abbiamo trovato che 25 (OH) D (3) inibisce DMBA indotta lesioni mammarie alveolare (MAL), in modo specifico stadio: 25 (OH) D (3) inibisce soprattutto nella fase di promozione della formazione di lesione. Concludiamo che 25 (OH) D (3) potrebbe servire come un non-tossico agente naturale chemopreventive per un ulteriore sviluppo per la prevenzione del cancro al seno.

Peppone LJ, Huston AJ, Reid ME, Rosier RN, Zakharia Y, Trump DL, Mustian KM, Janelins MC, Purnell JQ, Morrow GR.

### **The effect of various vitamin D supplementation regimens in breast cancer patients.**

Breast Cancer Res Treat. 2011 Mar 8. [Epub ahead of print]

Department of Radiation Oncology, University of Rochester Medical Center, 601 Elmwood Ave, Box 704, Rochester, NY, 14642, USA, luke\_peppone@urmc.rochester.edu.

Vitamin D deficiency in the patients treated for breast cancer is associated with numerous adverse effects (bone loss, arthralgia, and falls). The first aim of this study was to assess vitamin D status, determined by 25-OH vitamin D levels, among women diagnosed with breast cancer according to demographic/clinical variables and bone mineral density (BMD). The second aim of this study was to evaluate the effect of daily low-dose and weekly high-dose vitamin D supplementation on 25-OH vitamin D levels. This retrospective study included 224 women diagnosed with stage 0-III breast cancer who received treatment at the James P. Wilmot Cancer Center at the University of Rochester Medical Center. Total 25-OH vitamin D levels (D(2) + D(3)) were determined at baseline for all participants. Vitamin D deficiency was defined as a 25-OH vitamin D level < 20 ng/ml, insufficiency as 20-31 ng/ml, and sufficiency as  $\geq 32$  ng/ml. BMD was assessed during the period between 3 months before and 6 months following the baseline vitamin D assessment. Based on the participants' baseline levels, they received either no supplementation, low-dose supplementation (1,000 IU/day), or high-dose supplementation ( $\geq 50,000$  IU/week), and 25-OH vitamin D was reassessed in the following 8-16 weeks. Approximately 66.5% had deficient/insufficient vitamin D levels at baseline. Deficiency/insufficiency was more common among non-Caucasians, women with later-stage disease, and those who had previously received radiation therapy ( $P < 0.05$ ). Breast cancer patients with deficient/insufficient 25-OH vitamin D levels had significantly lower lumbar BMD ( $P = 0.03$ ). Compared to the no-supplementation group, weekly high-dose supplementation significantly increased 25-OH vitamin D levels, while daily low-dose supplementation did not significantly increase levels. Vitamin D deficiency and insufficiency were common among women with breast cancer and associated with reduced BMD in the spine. Clinicians should carefully consider vitamin D supplementation regimens when treating vitamin D deficiency/insufficiency in breast cancer patients.

### **L'effetto di diversi regimi alimentari di vitamina D nei pazienti con tumore al seno.**

La carenza di vitamina D nei pazienti trattati per tumore al seno è associato a numerosi effetti collaterali (perdita di tessuto osseo, artralgia, e cade). Il primo obiettivo di questo studio era di

valutare lo stato della vitamina D, determinata dai livelli di 25-OH vitamina D, tra le donne con diagnosi di cancro al seno secondo demografici / variabili cliniche e la densità minerale ossea (BMD). Il secondo obiettivo di questo studio era di valutare l'effetto di basse dosi giornaliere e settimanali di alte dosi di vitamina D sui livelli di supplementazione di vitamina D 25-OH. Questo studio retrospettivo incluso 224 donne con diagnosi di cancro al seno stadio 0-III che hanno ricevuto un trattamento presso il James P. Wilmot Cancer Center presso l'University of Rochester Medical Center. Totale 25-OH livelli di vitamina D (D (2) + D (3)) sono stati determinati al basale per tutti i partecipanti. La carenza di vitamina D è stata definita come una vitamina livello di 25-OH D <20 ng / ml, come insufficienza 20-31 ng / ml, e la sufficienza come  $\geq 32$  ng / ml. BMD è stata valutata nel periodo compreso tra 3 mesi prima e 6 mesi dopo la valutazione di base di vitamina D. Sulla base di livelli di base dei partecipanti, hanno ricevuto o no l'integrazione, integrazione a basso dosaggio (1.000 UI / die), o supplementazione ad alto dosaggio ( $\geq 50.000$  UI / settimana), e 25-OH vitamina D è stato rivalutato i seguenti 8 -16 settimane. Circa il 66,5% ha deficit / insufficienti livelli di vitamina D al basale. Carenza / insufficienza era più comune tra i non caucasici, le donne con malattia in seguito allo stadio, e quelli che avevano precedentemente ricevuto terapia radiante (P <0,05). Pazienti con tumore mammario con deficit / livello insufficiente di 25-OH vitamina D era significativamente più bassa BMD lombare (P = 0,03). Rispetto al gruppo non-integrazione, settimanali supplementazione ad alto dosaggio significativamente aumentato di 25-OH livelli di vitamina D, mentre la supplementazione giornaliera a basso dosaggio non aumentava significativamente i livelli. La carenza di vitamina D e insufficienza erano comuni tra le donne con cancro al seno e associato a ridotta densità minerale ossea nella colonna vertebrale. I medici dovrebbero valutare attentamente i regimi supplementazione di vitamina D nel trattamento di deficit di vitamina D / insufficienza in pazienti con cancro al seno.

Sinha A, Avery P, Turner S, Bailey S, Cheetham T

**Vitamin D status in paediatric patients with cancer.**

Pediatr Blood Cancer. 2011 Feb 3.

Department of Paediatric Endocrinology, Great North Children's Hospital, Newcastle upon Tyne, UK.

**BACKGROUND:** Children with malignant disease are at increased risk of bone disorders and cardiovascular disease. Vitamin D status may influence this risk and so we assessed vitamin D levels in children with malignant disease undergoing active treatment or surveillance post-therapy.

**PROCEDURE:** This was an outpatient-based cross-sectional study of 61 children with a history of malignancy (median age 11.1 years; range 1.5-24.4 years) and 60 control subjects (median age 8.4 years; range 0.2-18.0 years) attending hospital for the management of non-malignant disorders. Serum vitamin D (25-OH-D), parathormone levels and bone biochemistry were determined. Vitamin D status and its relationship to age, sex, ethnicity, time of sampling and presence of malignant disease was determined.

**RESULTS:** Vitamin D status was suboptimal in 62% of cases (25-OH-D < 50 nmol/L [20 ng/ml]).

Vitamin D deficiency (25-OH-D < 25 nmol/L [10 ng/ml]) was more common in children with malignant disease than controls (21.3% vs. 3.3%;  $P=0.013$ ). Month of sampling ( $P<0.001$ ), ethnicity ( $P<0.001$ ), older age ( $P=0.011$ ), and history of malignancy ( $P=0.012$ ) were associated with a poorer vitamin D status.

**CONCLUSIONS:** Vitamin D levels [25-OH-D] are lower in survivors of childhood cancer in comparison to control children with the majority either insufficient or deficient. Assessment and adequate replacement of vitamin D status may be of particular value in this group of children.

Pediatr Blood Cancer © 2011 Wiley-Liss, Inc.

Copyright © 2011 Wiley-Liss, Inc.

**Lo stato della vitamina D in pazienti pediatriche affetti da tumore.**

**BACKGROUND:** I bambini con malattia maligna sono ad aumentato rischio di malattie delle ossa e malattie cardiovascolari. Lo stato della vitamina D può influenzare questo rischio e quindi abbiamo

valutato i livelli di vitamina D nei bambini con patologia maligna in trattamento attivo o di sorveglianza post-terapia.

**PROCEDURA:** Questo è stato uno studio ambulatoriale a base della sezione trasversale di 61 bambini con una storia di tumore maligno (età media 11,1 anni, range 1,5-24,4 anni) e 60 soggetti di controllo (età media 8,4 anni, range 0,2-18,0 anni) partecipanti ospedale per la gestione delle patologie non maligne. Siero di vitamina D (25-OH-D), i livelli di paratormone e la biochimica delle ossa sono stati determinati. Lo stato della vitamina D e la sua relazione a età, sesso, etnia, il tempo di campionamento e di presenza di malattia maligna è stata determinata.

**RISULTATI:** La vitamina D è stato non ottimale nel 62% dei casi (25-OH-D <50 nmol / l [20 ng / ml]). La carenza di vitamina D (25-OH-D <25 nmol / l [10 ng / ml]) è risultata più comune nei bambini con patologia maligna rispetto ai controlli (21,3% vs 3,3%, P = 0,013). Mese del campionamento (P <0,001), l'etnia (P <0,001), età avanzata (p = 0,011), e la storia di malignità (P = 0.012) erano associati ad uno stato di vitamina D più poveri.

**CONCLUSIONI:** i livelli di vitamina D [25-OH-D] sono più bassi nelle donne sopravvissute al cancro di infanzia a confronto per controllare i bambini con la maggioranza sia insufficiente o carente. Valutazione e sostituzione adeguata di vitamina D possono essere di particolare valore in questo gruppo di bambini.

Clinckspoor I, Verlinden L, Overbergh L, Korch C, Bouillon R, Mathieu C, Verstuyf A, Decallonne B.

### **1,25-Dihydroxyvitamin D(3) and a superagonistic analog in combination with paclitaxel or suberoylanilide hydroxamic acid have potent antiproliferative effects on anaplastic thyroid cancer.**

J Steroid Biochem Mol Biol. 2011 Mar;124(1-2):1-9. Epub 2010 Dec 21.

Laboratorium voor experimentele geneeskunde en endocrinologie (LEGENDO), Faculty of Medicine, Catholic University Leuven, Herestraat 49, bus 902, 3000 Leuven, Belgium.

Anaplastic thyroid cancer represents one of the most aggressive cancers. The active form of vitamin D, 1,25-dihydroxyvitamin D(3) (1,25(OH)(2)D(3)), has been shown to have antiproliferative and/or redifferentiating properties in several malignancies, including thyroid cancer. The objective of this study was to investigate the effects of 1,25(OH)(2)D(3) and the superagonistic analog CD578 in anaplastic thyroid cancer, alone or in combination with paclitaxel, a taxane, and suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA), a potent histone deacetylase inhibitor with promising effects in undifferentiated thyroid cancer. Four human thyroid cancer cell lines (FTC-133, C643, 8505C and HTh74) were treated with 1,25(OH)(2)D(3) or CD578, alone or in combination with paclitaxel or SAHA. Effects on cell growth and differentiation were evaluated. Clear effects on growth arrest were observed in a clonogenic assay, and absolute cell counts demonstrated a 24-36% reduction in all cell lines after 72h treatment with 1,25(OH)(2)D(3) (10(-6)M) and a 60% inhibition after 120h in the most sensitive cell line HTh74. A similar growth inhibition was shown after treatment with a 1000-fold lower concentration of analog CD578. This growth arrest was explained by antiproliferative effects, further supported by an increased % of cells in the G(0)-G(1) phase of the cell cycle and by a decreased transcription factor E2F1 mRNA expression. Combination treatments of 1,25(OH)(2)D(3) or CD578 with paclitaxel or SAHA resulted in an additive and in some conditions a synergistic effect on the inhibition of proliferation. Redifferentiation analysis revealed only a modest increase in sodium iodide symporter and thyroglobulin mRNA expression after treatment with 1,25(OH)(2)D(3), without additive effect after combination treatment. No effects were observed on TSH-receptor or thyroid peroxidase mRNA expression. Our in vitro findings

demonstrate that the superagonistic vitamin D analog CD578 holds promise as adjuvant antiproliferative therapy of anaplastic thyroid cancer, especially in combination with other drugs such as paclitaxel or SAHA.

**L'1,25-diidrossivitamina D (3) e un analogo superagonistico in combinazione con paclitaxel o suberoylanilide acido idrossamico hanno potenti effetti antiproliferativi sui tumori della tiroide anaplastico.**

Carcinoma anaplastico della tiroide rappresenta uno dei tumori più aggressivi. La forma attiva della vitamina D, 1,25-diidrossivitamina D (3) (1,25 (OH) (2) D (3)), ha dimostrato di avere antiproliferativa e / o redifferentiating immobili a tumori maligni, tra cui il cancro alla tiroide . L'obiettivo di questo studio era di indagare gli effetti di 1,25 (OH) (2) D (3) e il CD578 superagonistic analogico in anaplastico carcinoma della tiroide, da solo o in combinazione con paclitaxel, un taxano, e suberoylanilide acido idrossamico (SAHA ), un potente inibitore dell'istone deacetilasi con promettenti effetti in indifferenziata cancro alla tiroide. Quattro linee di cellule umane del cancro della tiroide (FTC-133, C643, 8505C e HTh74) sono stati trattati con 1,25 (OH) (2) D (3) o CD578, da soli o in combinazione con paclitaxel o Saha. Effetti sulla crescita e la differenziazione cellulare sono stati valutati. Chiari effetti sulla arresto della crescita sono stati osservati in un saggio clonogenico, e conta assoluta delle cellule ha dimostrato una riduzione del 24-36% in tutte le linee cellulari dopo 72h di trattamento con 1,25 (OH) (2) D (3) (10 (-6) M) e una inibizione del 60% dopo 120 ore in cella HTh74 più sensibili line. Una inibizione della crescita analoga è stata mostrata dopo il trattamento con una concentrazione di 1000 volte inferiore del CD578 analogico. Questo arresto della crescita è stata spiegata da effetti antiproliferativi, ulteriormente supportata da una maggiore% di cellule nel G (0)-G (1) fase del ciclo cellulare e da una ridotta espressione di mRNA fattore di trascrizione E2F1.

Trattamenti combinati di 1,25 (OH) (2) D (3) o CD578 con paclitaxel o SAHA provocato un additivo, e in alcune condizioni un effetto sinergico sulla inibizione della proliferazione. Analisi ridifferenziazione rivelato soltanto un modesto aumento symporter ioduro di sodio e di espressione di mRNA della tireoglobulina dopo il trattamento con 1,25 (OH) (2) D (3), senza effetto additivo dopo il trattamento di combinazione. Non hanno evidenziato effetti sulla TSH-recettore o della tiroide espressione dell'mRNA perossidasi. I nostri risultati in vitro dimostrano che la vitamina D superagonistic CD578 analogico mantiene la promessa come terapia adiuvante antiproliferativa di cancro alla tiroide anaplastico, soprattutto in combinazione con altri farmaci come il paclitaxel o Saha.

Lee MS, Huang YC, Wahlqvist ML, Wu TY, Chou YC, Wu MH, Yu JC, Sun CA.

**Vitamin d decreases risk of breast cancer in premenopausal women of normal weight in subtropical taiwan.**

J Epidemiol. 2011 Mar 5;21(2):87-94.

School of Public Health, National Defense Medical Center.

Background: Evidence for an association between vitamin D status and breast cancer is now more convincing, but is uncertain in subtropical areas like Taiwan. This hospital-based case-control study examined the relationship of breast cancer with vitamin D intake and sunlight exposure. Methods: A total of 200 incident breast cancer cases in a Taipei hospital were matched with 200 controls by date of interview and menopausal status. Information on risk factors for breast cancer was collected in face-to-face interviews and assessed with reference to vitamin D intake (foods and nutrients) and sunlight exposure. Vitamin D intake was divided into quartiles, and threshold effect was evaluated by comparing Q2-Q4 with Q1. Results: After controlling for age, education, parity, hormone replacement therapy, body mass index (BMI), energy intake, menopausal status, and daily sunlight exposure, the risk of breast cancer in participants with a dietary vitamin D intake greater than 5 µg per day was significantly lower (odds ratio [OR], 0.48; 95% confidence interval [CI], 0.24-0.97) than that of participants with an intake less than 2 µg per day. In analysis stratified by menopausal status and BMI, both dietary vitamin D and total vitamin D intakes were associated with a protective effect among premenopausal women. There was a significant linear trend for breast cancer risk and dietary vitamin D intake in premenopausal women (P = 0.02). In participants with a BMI lower than 24 kg/m<sup>2</sup> (ie, normal weight), dietary vitamin D intake was inversely related to breast cancer risk (P for trend = 0.002), and a threshold effect was apparent (Q2-Q4 vs Q1: OR, 0.46; 95% CI, 0.23-0.90). Conclusions: Vitamin D had a protective effect against breast cancer in premenopausal women of normal weight in subtropical Taiwan, especially an intake greater than 5 µg per day.

**La vitamina D riduce il rischio di cancro al seno nelle donne in premenopausa di peso normale in taiwan subtropicale.**

Background: Prove di una associazione tra stato di vitamina D e cancro al seno ora è più convincente, ma è incerto nelle zone subtropicali, come Taiwan. Questo studio ospedale caso-controllo ha esaminato la relazione tra cancro al seno con l'assunzione di vitamina D e

exposure. Methods luce del sole: un totale di 200 casi di cancro al seno incidente in un ospedale di Taipei sono stati appaiati con 200 controlli in base alla data del colloquio e lo stato di menopausa. Informazioni sui fattori di rischio per il cancro al seno è stata raccolta durante le interviste faccia-a-faccia e valutati con riferimento alla vitamina D (alimenti e nutrienti) e l'esposizione alla luce solare. Assunzione di vitamina D è stato diviso in quartili, e l'effetto soglia è stata valutata confrontando Q2-Q4 con Q1. Results: Dopo aggiustamento per età, l'istruzione, la parità, la terapia ormonale sostitutiva, indice di massa corporea (BMI), l'assunzione di energia, lo stato menopausale, e esposizione al sole al giorno, il rischio di carcinoma mammario in soggetti con un apporto dietetico di vitamina D superiore a 5 mg al giorno è risultata significativamente inferiore (odds ratio [OR], 0.48, 95% intervallo di confidenza [CI], 0,24-0,97) rispetto a quella di i partecipanti con un apporto inferiore a 2 mg al giorno. In analisi stratificata per stato menopausale e BMI, sia dietetico di vitamina D e totale assunzione di vitamina D sono state associate con un effetto protettivo nelle donne in premenopausa. C'è stata una significativa tendenza lineare per il rischio di cancro al seno e dieta assunzione di vitamina D nelle donne in premenopausa ( $P = 0,02$ ). In partecipanti con un kg BMI inferiore a 24 / m (2) (vale a dire, di peso normale), l'assunzione di vitamina D nella dieta era inversamente correlata al rischio di cancro al seno ( $p$  per trend = 0,002), e un effetto soglia è stata evidente (Q2-Q4 vs Q1: OR 0,46, IC 95%, 0,23-0,90). Conclusioni: la vitamina D ha un effetto protettivo contro il cancro al seno nelle donne in premenopausa di peso normale subtropicale in Taiwan, in particolare un apporto maggiore di 5 mg al giorno.

Srinivasan M, Parwani AV, Hershberger PA, Lenzner DE, Weissfeld JL.

### **Nuclear vitamin D receptor expression is associated with improved survival in non-small cell lung cancer.**

J Steroid Biochem Mol Biol. 2011 Jan;123(1-2):30-6.

Department of Epidemiology, University of Pittsburgh Graduate School of Public Health, Pittsburgh, PA 15261, USA. [dalias@tasmc.health.gov.il](mailto:dalias@tasmc.health.gov.il)

Vitamin D has been shown to have anti-proliferative effects in a wide variety of cancers including lung cancer. The anticancer effects of vitamin D are mediated primarily by its active metabolite, 1,25-dihydroxyvitamin D (calcitriol), through vitamin D receptor (VDR) signaling. However, thus far there have been no studies evaluating the association between VDR expression and survival outcome in lung cancer. Using immunohistochemical analysis, we evaluated VDR expression, separately in the nucleus and cytoplasm, in lung cancer samples from 73 non-small cell lung carcinoma (NSCLC) patients with no prior therapy, and investigated the association between VDR expression and overall survival (OS). Cox proportional hazard models were used for our primary analyses. There were 44 deaths during a median follow-up of 51 months (range 13-93 months). High nuclear VDR expression was associated with improved OS after adjusting for age, gender, stage, smoking status, and histology (adjusted hazard ratio, 0.36; 95% confidence interval, 0.17-0.79). There was no association between cytoplasmic VDR expression and OS. Our results suggest that nuclear VDR status may be a prognostic marker in NSCLC. Future large studies to replicate our findings and to assess the impact of VDR gene polymorphisms on VDR expression are required as therapies targeting the vitamin D signaling pathway may be influenced by VDR status in the target lung cancer tissue.

**L'espressione nucleare del recettore della vitamina D è associata ad un miglioramento della sopravvivenza nel carcinoma non a piccole cellule del polmone.**

La vitamina D ha dimostrato di avere effetti anti-proliferativo in un'ampia varietà di tumori tra cui il cancro del polmone. Gli effetti antitumorali della vitamina D sono mediate principalmente dal suo metabolita attivo, 1,25-diidrossivitamina D (calcitriolo), attraverso il recettore della vitamina D (VDR) di segnalazione. Tuttavia, finora non ci sono stati studi che hanno valutato l'associazione tra l'espressione di VDR e l'esito di sopravvivenza nel tumore del polmone. Usando l'analisi immunoistochimica, abbiamo valutato l'espressione di VDR, separatamente nel nucleo e nel citoplasma, nei campioni di cancro al polmone da 73 carcinoma non a piccole cellule (NSCLC) pazienti senza una precedente terapia, e indagato l'associazione tra l'espressione di VDR e la sopravvivenza globale (OS). Modelli di rischio proporzionale di Cox sono stati utilizzati per le nostre analisi primarie. Ci sono stati 44 decessi nel corso di un follow-up mediano di 51 mesi (range 13-93 mesi). Espressione di VDR Alta nucleare è stata associata con una migliore OS dopo aggiustamento per età, sesso, fase, stato di fumatore, e istologia (hazard ratio aggiustato, 0,36, intervallo di confidenza 95%, 0,17-0,79). Non c'è stata associazione tra l'espressione di VDR citoplasmatica e sistema operativo. I nostri risultati suggeriscono che lo stato VDR nucleare può essere un marcatore prognostico nel NSCLC. Future grandi studi di replicare i nostri risultati e di valutare l'impatto dei polimorfismi del gene VDR sul espressione di VDR sono necessarie terapie come targeting la via di segnalazione di vitamina D può essere influenzato da status VDR nel tessuto del cancro del polmone bersaglio.

Krishnan AV, Feldman D.

### **Mechanisms of the anti-cancer and anti-inflammatory actions of vitamin D.**

Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2011 Feb 10;51:311-36.

Department of Medicine, Stanford University School of Medicine, California 94305, USA.

Calcitriol, the hormonally active form of vitamin D, is being evaluated in clinical trials as an anti-cancer agent. Calcitriol exerts multiple anti-proliferative, pro-apoptotic, and pro-differentiating actions on various malignant cells and retards tumor growth in animal models of cancer. Calcitriol also exhibits several anti-inflammatory effects including suppression of prostaglandin (PG) action, inhibition of p38 stress kinase signaling, and the subsequent production of pro-inflammatory cytokines and inhibition of NF- $\kappa$ B signaling. Calcitriol also decreases the expression of aromatase, the enzyme that catalyzes estrogen synthesis in breast cancer, both by a direct transcriptional repression and indirectly by reducing PGs, which are major stimulators of aromatase transcription. Other important effects include the suppression of tumor angiogenesis, invasion, and metastasis. These calcitriol actions provide a basis for its potential use in cancer therapy and chemoprevention. We summarize the status of trials involving calcitriol and its analogs, used alone or in combination with known anti-cancer agents.

### **Meccanismi delle azioni anti-cancro e anti-infiammatorie della vitamina D.**

Calcitriolo, la forma ormonale attiva della vitamina D, è stata valutata in studi clinici come agente anti-cancro. Calcitriolo esercita più anti-proliferativa, pro-apoptotici e pro-differenziare le azioni su varie cellule maligne e ritarda la crescita tumorale in modelli animali di cancro. Calcitriol espone anche alcuni effetti anti-infiammatori tra cui la soppressione di prostaglandine (PG) azione, l'inibizione della p38 chinasi stress di segnalazione, e la successiva produzione di citochine pro-infiammatorie e l'inibizione di NF- $\kappa$ B segnalazione. Calcitriol diminuisce anche l'espressione delle aromatasi, l'enzima che catalizza la sintesi degli estrogeni nel cancro della mammella, sia da una repressione trascrizionale diretta e indiretta, con riduzione dei PG, che sono importanti stimolatori di trascrizione aromatasi. Altri effetti importanti includono la soppressione di angiogenesi tumorale, invasione e metastasi. Queste azioni calcitriolo fornire una base per il suo potenziale utilizzo nella

terapia del cancro e la chemioprevenzione. Si riassumono lo stato delle sperimentazioni che coinvolgono calcitriolo e suoi analoghi, utilizzati da soli o in combinazione con noti agenti anti-cancro.

Lieblich M, Altarescu G, Zimran A, Elstein D.

**Vitamin D Receptor (VDR) polymorphic variants in patients with cancer and Gaucher disease.**

Blood Cells Mol Dis. 2011 Jan 15;46(1):92-4.

Gaucher Clinic, Shaare Zedek Medical Center, Jerusalem, Israel.

**BACKGROUND:** An increased risk has been reported in Gaucher disease genotype N370S/N370S for multiple myeloma, hematologic and other malignancies, as well as skeletal involvement. The purpose of this study is to ascertain whether VDR genotype which is involved in the risk for many cancers including multiple myeloma is also correlated with cancers in patients with Gaucher disease.

**METHODS:** VDR polymorphisms (ApaI, TaqI, BsmI, FokI) were analyzed by standard methods from 29 Gaucher patients (some on enzyme therapy) with various cancers and from 70 healthy Ashkenazi Jews. Associations between VDR and categorical variables were analyzed by chi-square and Fisher's exact tests; associations with quantitative variables used ANOVA and Scheffe post-hoc tests. Non-parametric Kruskal-Wallis ANOVA was used when one category was small. IRB Committee approval was received for this study.

**FINDINGS:** There was a trend for statistical significance ( $p=0.04$ ) between patients and controls for the ApaI aa genotype. There were no correlations between VDR polymorphic genotypes and disease severity, need for ERT, splenectomy, or bone disease except a trend associating TaqI TT genotype with Zimran's severity score ( $p=0.06$ ).

**CONCLUSION:** This survey highlights the possibility that Gaucher disease in itself may not be the only important risk factor for cancers (other than multiple myeloma) and that other modifiers may affect cancer morbidity in Gaucher disease.

Copyright © 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Vitamin D Receptor (VDR): varianti polimorfiche nei pazienti con cancro e malattia di Gaucher.**

**BACKGROUND:** un aumento del rischio è stato segnalato in N370S/N370S malattia di Gaucher genotipo per il mieloma multiplo, ematologiche e altri tumori maligni, così come coinvolgimento scheletrico. Lo scopo di questo studio è quello di verificare se il genotipo VDR, che si occupa di rischio per molti tipi di cancro compreso il mieloma multiplo è anche correlata con tumori in

pazienti con malattia di Gaucher. METODI: polimorfismi di VDR (ApaI, TaqI, BSMI, FokI) sono stati analizzati con i metodi standard da 29 pazienti Gaucher (alcuni in terapia enzimatica) con vari tipi di cancro e da 70 ebrei Ashkenazi sani. Le associazioni tra VDR e variabili categoriche sono state analizzate mediante test chi-quadro esatto e Fisher, associazioni con le variabili quantitative utilizzato test ANOVA e Scheffé post-hoc. Non parametrico di Kruskal-Wallis ANOVA è stato utilizzato quando una categoria era piccola. IRB approvazione del Comitato è stato ricevuto per questo studio. RISULTATI: C'è stata una tendenza per la significatività statistica ( $p = 0,04$ ) tra pazienti e controlli per il genotipo aa ApaI. Non ci sono state correlazioni tra i genotipi VDR polimorfi e gravità della malattia, il bisogno di ERT, splenectomia, o malattia ossea ad eccezione di una tendenza che associa TaqI genotipo TT con punteggio di gravità Zimran's ( $p = 0,06$ ). CONCLUSIONE: L'indagine evidenzia la possibilità che la malattia di Gaucher di per sé non può essere l'unico fattore di rischio importante per tumori (diversi mieloma multiplo) e che altri modificatori possono influenzare la morbilità del cancro nella malattia di Gaucher. Breast Cancer Res Treat. 2011 Feb;125(3):869-78. Epub 2010 Jul 28.

Prieto-Alhambra D, Javid MK, Servitja S, Arden NK, Martinez-García M, Diez-Perez A, Albanell J, Tusquets I, Nogues X.

### **Vitamin D threshold to prevent aromatase inhibitor-induced arthralgia: a prospective cohort study.**

Department of Internal Medicine, URFOA IMIM-Hospital del Mar, Parc de Salut Mar, Autonomous University of Barcelona, Barcelona, Spain. dprieto@camfic.org

Aromatase inhibitor (AI)-associated arthralgia limits adherence to therapy in breast cancer. The pathophysiology may involve vitamin D status. We wished to establish the optimal concentration of 25(OH)D that prevents or minimizes arthralgia. We used a prospective cohort of 290 women starting AI in whom baseline vitamin D was measured. All received daily vitamin D(3) (800 IU) with calcium. Women with baseline 25(OH)D concentration  $<30$  ng/ml also received 16,000 IU of D(3) orally every 2 weeks. The primary outcome was incident or worsening joint pain derived from baseline and 3-month visual analogic scale (VAS) for joint pain. Regression models were used to analyse the association between vitamin D concentrations at 3 months and pain adjusting for age, BMI, season when the sample was drawn, aromatase inhibitor (exemestane vs. letrozole/anastrozole), prior tamoxifen therapy, baseline NTX, and previous fracture. 90% of women had a 25(OH)D  $<30$  ng/ml at baseline. After supplementation (daily 800 IU and additional 16,000 IU every 2 weeks), 50% of them still failed to reach adequate concentrations at 3 months. In the whole cohort, there was an increase in joint pain (mean 1.16 points SD 2.66;  $P < 0.001$ ) and the increase was significantly ( $P = 0.02$ ) attenuated in those that reached concentrations of 25(OH)D of  $\geq 40$  ng/ml, with a lower risk of incident arthralgia (OR 0.12 \*\* [0.03 to 0.40]). A target concentration of 40 ng/ml 25OHD may prevent development of AI arthralgia but higher loading doses are required to attain this level in women with deficiency at baseline.

### **La soglia di vitamina D per prevenire l'artralgia indotta dagli inibitori dall'aromatasi: uno studio prospettico di coorte.**

Inibitore dell'aromatasi (AI)-associata artralgia limiti di aderenza alla terapia nel carcinoma mammario. La fisiopatologia può comportare lo stato della vitamina D. Abbiamo voluto stabilire la concentrazione ottimale di 25 (OH) D che impedisce o riduce al minimo artralgia. Abbiamo utilizzato una coorte di 290 donne a partire AI in cui la vitamina D al basale è stata misurata. Tutti hanno ricevuto vitamina D (3) (800 UI) con il calcio. Le donne con base 25 (OH) D concentrazione  $<30$  ng / ml anche ricevuto 16.000 UI di D (3) per os ogni 2 settimane. L'outcome primario era incidente o peggioramento di dolori articolari derivati dal basale e 3 mesi di scala analogica visiva

(VAS) per i dolori articolari. Modelli di regressione sono stati utilizzati per analizzare l'associazione tra le concentrazioni di vitamina D a 3 mesi e il dolore aggiustato per età, BMI, stagione in cui il campione è stato disegnato, inibitore dell'aromatasi (letrozolo vs Exemestane / anastrozolo), prima della terapia con tamoxifene, NTX basale, e precedenti frattura. 90% delle donne ha avuto un 25 (OH) D <30 ng / ml al basale. Dopo l'integrazione (800 UI al giorno e ulteriori 16.000 UI ogni 2 settimane), il 50% di loro ancora non è riuscito a raggiungere concentrazioni adeguate a 3 mesi. In tutta la coorte, c'è stato un aumento del dolore articolare (media 1,16 punti SD 2,66, p <0,001) e la crescita è stata significativamente (P = 0,02) attenuata in quelle che hanno raggiunto le concentrazioni di 25 (OH) D di  $\geq 40$  ng / ml, con un minor rischio di incidente artralgia (OR 0,12 \*\* [0,03-0,40]). Una concentrazione target di 40 ng / ml 25OHD possono prevenire lo sviluppo di artralgia AI, ma dosi di carico più elevati sono necessari per ottenere questo livello in donne con deficit al basale.

Jacobs E, Martinez ME, Buckmeier J, Lance P, May M, Jurutka P.

**Circulating fibroblast growth factor-23 is associated with increased risk for metachronous colorectal adenoma.**

J Carcinog. 2011 Feb 12;10:3.

Epidemiology and Biostatistics, Mel and Enid Zuckerman College of Public Health, Arizona Cancer Center, University of Arizona, P.O. Box 245024, Tucson, AZ 85724-5024, USA.

**BACKGROUND:** Fibroblast growth factor-23 (FGF-23) is a phosphaturic peptide and a key component of an endocrine feedback loop along with the hormonal vitamin D metabolite 1,25(OH)(2)D. Vitamin D has been shown to be inversely related to colorectal neoplasia; therefore, we hypothesized that the effect of FGF-23 on vitamin D metabolite concentrations could have implications for the risk of colorectal neoplasia.

**MATERIALS AND METHODS:** The purpose of this study was to prospectively evaluate the association between circulating concentrations of FGF-23 and the risk of metachronous (recurrent) colorectal adenomas. FGF-23 levels were assessed in 100 male and female participants from the Ursodeoxycholic Acid Trial, 50 of whom had a metachronous colorectal adenoma and 50 who did not.

**RESULTS:** Compared to the lowest tertile of FGF-23, the adjusted odds ratios (95% CIs) for the second and third tertiles were 2.80 (0.94 to 8.31) and 3.41 (1.09 to 10.67), respectively (P-trend=.03). In a linear regression model, there was also a statistically significant inverse relationship between FGF-23 and 1,25(OH)(2)D ( $\beta$ -coefficient=-1.2; P=.001). In contrast, no statistically significant trend was observed between FGF-23 and 25(OH)D concentrations ( $\beta$ -coefficient=0.55; P=.10).

**CONCLUSIONS:** The current work presents novel preliminary evidence of a relationship between FGF-23 and the risk for colorectal neoplasia. FGF-23 activity may be mediated through biologic effects on individual serum and colonic 1,25(OH)(2)D levels, or it may be independent from the vitamin D pathway. Further studies in larger populations are necessary for confirmation and expansion of these hypothesis-generating results.

**Il fattore di crescita dei fibroblasti-23 circolante è associato ad un aumentato del rischio di adenoma coloretale metacroni.**

**BACKGROUND:** il fattore di crescita del fibroblasto-23 (FGF-23) è un peptide phosphaturic e una componente fondamentale di un circuito di feedback endocrino insieme alla vitamina D ormonale metabolita 1,25 (OH) (2) D. La vitamina D è stato dimostrato essere inversamente proporzionale alla neoplasia coloretale, di conseguenza, abbiamo ipotizzato che l'effetto di FGF-23 in metabolita concentrazioni di vitamina D potrebbe avere implicazioni per il rischio di neoplasia coloretale.

**MATERIALI E METODI:** Lo scopo di questo studio era di valutare in modo prospettico l'associazione tra le concentrazioni circolanti di FGF-23 e il rischio di metacroni (ricorrenti) adenomi colrettali. FGF-23 sono stati valutati i livelli in 100 partecipanti uomini e donne dal Acido Ursodesossicolico Trial, 50 dei quali aveva un adenoma coloretale metacrono e 50 che non hanno.

**RISULTATI:** Rispetto al più basso terzile di FGF-23, l'odds ratio (IC 95%) per la terzili secondo e il terzo sono stati 2,80 (0,94-8,31) e 3,41 (1,09-10,67), rispettivamente ( $P = .03$ -trend). In un modello di regressione lineare, ci fu anche una relazione statisticamente significativa inversa tra FGF-23 e 1,25 (OH) (2) D ( $\beta$ -coefficiente = -1,2,  $p = .001$ ). Al contrario, nessun trend statisticamente significativa è stata osservata tra FGF-23 e 25 (OH) le concentrazioni di D ( $\beta$ -coefficiente = 0.55,  $p = .10$ ).

**CONCLUSIONI:** Il lavoro attuale presenta nuove prove preliminari di un rapporto tra FGF-23 e il rischio di neoplasia coloretale. FGF-23 attività può essere mediata da effetti biologici sul siero individuale colon e 1,25 (OH) (2) livelli di D, o può essere indipendente dal pathway di vitamina D. Ulteriori studi in grandi popolazioni sono necessari per la conferma e l'espansione di questi risultati ipotesi generatrice.

Kota BP, Allen JD, Roufogalis BD.

### **The Effect of Vitamin D3 and Ketoconazole Combination on VDR-mediated P-gp Expression and Function in Human Colon Adenocarcinoma Cells: Implications in Drug Disposition and Resistance.**

Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2011 Mar 7.

Faculty of Pharmacy, University of Sydney, Camperdown, NSW 2006, Australia. Centenary Institute of Cancer Medicine and Cell Biology, Newtown, NSW 2042, Australia.

The Vitamin D3 metabolite 1,25-dihydroxycholecalciferol (DHC) and analogues derived from it are being investigated as potential agents for the treatment of cancer. Combining ketoconazole (KTZ) with DHC has been recommended to enhance the anticancer activity of DHC. DHC exerts its biological activities through the vitamin D receptor (VDR). VDR is recognized to be a regulator of P-glycoprotein (P-gp), a member of the ABC transporter family well known for its role in multidrug resistance in cancer chemotherapy. We have investigated the effect of DHC and adding KTZ together with DHC on P-gp and VDR expression and the functional consequences of P-gp induction in intestinal human colonic adenocarcinoma cells LS174T cells. DHC increased P-gp expression by 2-fold and the addition of KTZ further increased the expression to 4-fold. The combination of DHC+KTZ also significantly increased VDR expression, consistent with the enhanced increase in P-gp expression by this combination. The increase in P-gp expression was accompanied by increased P-gp function, as measured by decreased Rh123 accumulation in the LS174T cells. In addition, DHC significantly decreased colchicine cytotoxicity in a dose-sensitive manner, and the addition of KTZ further decreased the colchicine cytotoxicity, indicating the chemo-protective effect of DHC is enhanced by KTZ, consistent with the enhanced expression of P-gp. The results of this study raise the possibility that DHC and the addition of KTZ to DHC treatment may decrease the effectiveness of cancer chemotherapy by promoting P-gp-mediated drug resistance.

## **Effetto della combinazione della vitamina D3 e chetoconazole sulla espressione e sulla funzione di P-gp mediata da VDR nelle cellule con adenocarcinoma: implicazione nell'uso dei farmaci e nella resistenza**

La vitamina D3 metabolita 1,25-diidrossicolecalciferolo (DHC) e analoghi che ne derivano sono indagati come potenziali agenti per il trattamento del cancro. Combinando ketoconazolo (KTZ) con DHC è stato raccomandato di aumentare l'attività antitumorale di DHC. DHC esercita la sua attività biologica attraverso il recettore della vitamina D (VDR). VDR è riconosciuto per essere un regolatore della glicoproteina-P (P-gp), un membro della famiglia ABC trasportatore ben noto per il suo ruolo nella resistenza multidrug nella chemioterapia del cancro. Abbiamo studiato l'effetto di DHC e aggiungendo KTZ insieme DHC su P-gp e di espressione VDR e le conseguenze funzionali di induzione P-gp in cellule intestinali umane del colon LS174T cellule di adenocarcinoma. DHC aumento dell'espressione della P-gp di 2 volte e l'aggiunta di KTZ ulteriormente aumentato l'espressione di 4 volte. La combinazione di DHC + KTZ anche significativamente aumentata espressione di VDR, coerente con l'aumento maggiore espressione della P-gp da questa combinazione. L'aumento dell'espressione della P-gp è stata accompagnata da una maggiore funzione di P-gp, come misurato dalla diminuzione Rh123 accumulo nelle cellule LS174T. Inoltre, DHC significativamente diminuito citotossicità colchicina in modo dose-sensibili, e l'aggiunta di KTZ ulteriormente diminuita la citotossicità colchicina, indicando l'effetto chemio-protettivo di DHC è arricchita da KTZ, coerente con l'espressione di P-gp. I risultati di questo studio suggeriscono la possibilità che DHC e l'aggiunta di KTZ al trattamento DHC può diminuire l'efficacia della chemioterapia per il cancro attraverso la promozione di resistenza ai farmaci P-gp-mediata.

Garland CF, French CB, Baggerly LL, Heaney RP.

**Vitamin d supplement doses and serum 25-hydroxyvitamin d in the range associated with cancer prevention.**

Anticancer Res. 2011 Feb;31(2):607-11.

Creighton University Medical Center, 601 North 30th Street - Suite 4841, Omaha, NE 68131, U.S.A. rheaney@creighton.edu.

**BACKGROUND:** Studies indicate that intake of vitamin D in the range from 1,100 to 4,000 IU/d and a serum 25-hydroxyvitamin D concentration [25(OH)D] from 60-80 ng/ml may be needed to reduce cancer risk. Few community-based studies allow estimation of the dose-response relationship between oral intake of vitamin D and corresponding serum 25(OH)D in the range above 1,000 IU/d.

**MATERIALS AND METHODS:** A descriptive study of serum 25(OH)D concentration and self-reported vitamin D intake in a community-based cohort (n=3,667, mean age 51.3±13.4 y).

**RESULTS:** Serum 25(OH)D rose as a function of self-reported vitamin D supplement ingestion in a curvilinear fashion, with no intakes of 10,000 IU/d or lower producing 25(OH)D values above the lower-bound of the zone of potential toxicity (200 ng/ml). Unsupplemented all-source input was estimated at 3,300 IU/d. The supplemental dose ensuring that 97.5% of this population achieved a serum 25(OH)D of at least 40 ng/ml was 9,600 IU/d.

**CONCLUSION:** Universal intake of up to 40,000 IU vitamin D per day is unlikely to result in vitamin D toxicity.

**Dosi supplementari di vitamina D e livelli sierici di 25-idrossivitamina d associati alla prevenzione tumorale**

**BACKGROUND:** Gli studi indicano che l'assunzione di vitamina D nella gamma da 1.100 a 4.000 UI / die e una concentrazione di 25-idrossivitamina D nel siero [25 (OH) D], 60-80 ng / ml possono essere necessari per ridurre il rischio di cancro. Pochi studi basati sulla comunità permettono di valutare la relazione dose-risposta tra l'assunzione orale di vitamina D nel siero e corrispondente di 25 (OH) D nella gamma superiore a 1.000 UI / d.

**MATERIALI E METODI:** Uno studio descrittivo di siero 25 (OH) D di concentrazione e di auto-riferito l'assunzione di vitamina D in una coorte basata sulla comunità (n = 3.667, età media 51,3 ± 13,4 y).

**RISULTATI:** il siero 25 (OH) D rosa come una funzione di auto-segnalata l'ingestione di vitamina

D integrare in modo curvilineo, senza l'assunzione di 10.000 UI / die o più bassa produzione di 25 (OH) D di sopra dei valori più bassi il legato della zona di potenziale tossicità (200 ng / ml). Non arricchito tutti fonte di ingresso è stata stimata a 3.300 UI / d. La dose supplementare garantire che il 97,5% di questa popolazione ha raggiunto un siero 25 (OH) D di almeno 40 ng / ml è stata del 9.600 UI / d.

CONCLUSIONE: aspirazione universale dei fino a 40.000 UI di vitamina D al giorno è improbabile che a causare tossicità da vitamina D.

Touvier M, Chan DS, Lau R, Aune D, Vieira R, Greenwood DC, Kampman E, Riboli E, Hercberg S, Norat T.

### **Meta-analyses of vitamin D intake, 25-hydroxyvitamin D status, vitamin D receptor polymorphisms and colorectal cancer risk.**

Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2011 Mar 11.

1Department of Epidemiology and Biostatistics, School of public health, Imperial College London, United Kingdom.

**BACKGROUND:** Our objective was to conduct a systematic review and meta-analysis of prospective studies on colorectal cancer and vitamin D intake and 25-hydroxyvitamin D status, as part of the World Cancer Research Fund Continuous Update Project. We also aimed at conducting meta-analysis of all studies on colorectal cancer and vitamin D receptor (VDR) single-nucleotide polymorphisms.

**METHODS:** Relevant studies were identified in PubMed (up until June 2010). Inclusion criteria were original, peer-reviewed publications, with a prospective design (for studies on vitamin D intake or status). Random effects dose-response meta-analyses were performed on cancer incidence.

**RESULTS:** We observed inverse associations of colorectal cancer risk with dietary vitamin D (summary RR per 100 IU/day=0.95 95%CI: (0.93-0.98); 10 studies; range of intake (midpoints) = 39-719 IU/day) and serum/plasma 25-hydroxyvitamin D (RR per 100 IU/l=0.96 (0.94-0.97); 6 studies; range=200-1800 IU/l), but not with total vitamin D (5 studies). Supplemental (2 studies; range=0-600 IU/day) and total (4 studies; range=79-732 IU/day) vitamin D intake and 25-hydroxyvitamin D status (6 studies; range=200-1800 IU/l) were inversely associated with colon cancer risk. We did not observe statistically significant associations between FokI, PolyA, TaqI, Cdx2 and ApaI VDR polymorphisms and colorectal cancer risk. The BsmI polymorphism was associated with a lower colorectal cancer risk (RR=0.57 (0.36-0.89) for BB vs. bb, 8 studies).

**CONCLUSIONS:** These meta-analyses support the evidence of an inverse association between vitamin D intake, 25-hydroxyvitamin D status and the BsmI VDR polymorphism and colorectal cancer risk. Impact: Improving vitamin D status could be potentially beneficial against colorectal cancer incidence.

### **Meta-analisi su assunzioni di vitamina D, 25-idrossivitamina D, polimorfismi del recettore della vitamina D e rischio di cancro colonrettale**

**BACKGROUND:** Il nostro obiettivo era quello di condurre una revisione sistematica ed una meta-analisi di studi prospettici sul tumore del colon-retto e vitamina D e di 25-idrossivitamina D Stato, come parte del World Cancer Research Fund Aggiornamento continuo del progetto. Abbiamo anche l'obiettivo di arrivare ad effettuare la meta-analisi di tutti gli studi sul cancro del colon-retto e del recettore della vitamina D (VDR) polimorfismi a singolo nucleotide.

**METODI:** gli studi rilevanti sono stati identificati in PubMed (fino al giugno 2010). I criteri di inclusione erano originali, pubblicazioni peer-reviewed, con un disegno prospettico (per gli studi sulla vitamina D o di stato). Alcuni effetti dose-risposta meta-analisi sono state eseguite sull'incidenza del cancro.

**RISULTATI:** Abbiamo osservato associazioni inverse del rischio di cancro del colon-retto con vitamina D (RR sintesi per 100 UI / die = 0,95 95% CI: (,93-,98), 10 studi; gamma di aspirazione (punti medi) = 39-719 UI / die ) e siero / plasma 25-idrossivitamina D (RR per 100 UI / l = 0,96 (0,94-0,97), 6 studi; range = 200-1.800 UI / l), ma non con la vitamina D totale (5 studi). Supplementare (2 studi; range = 000-600 UI / die) e totale (4 studi; range = 79-732 UI / die), vitamina D e di 25-idrossivitamina D Stato (6 studi; range = 200-1.800 UI / l ) erano inversamente associati al rischio di cancro del colon. Non abbiamo osservato statisticamente significative associazioni tra FokI, Polya, TaqI, Cdx2 e Apai polimorfismi VDR e rischio di cancro coloretale. Il polimorfismo BsmI è stato associato ad un minor rischio cancro del colon-retto (RR = 0,57 (0,36-0,89) per i BB vs bb, 8 studi).

**CONCLUSIONI:** Questi meta-analisi sostenere la prova di una associazione inversa tra assunzione di vitamina D, 25-idrossivitamina D status e il polimorfismo BsmI VDR e risk.Impact cancro coloretale: Migliorare lo stato della vitamina D potrebbe essere potenzialmente utile contro l'incidenza del cancro del colon-retto.

Field S, Newton-Bishop JA.

### **Melanoma and vitamin D.**

Mol Oncol. 2011 Feb 3. [Epub ahead of print]

Section of Epidemiology and Biostatistics, Leeds Institute of Molecular Medicine, University of Leeds, Leeds LS97TF, UK.

Vitamin D is a fat-soluble steroid hormone, which is essential to health and for which epidemiological studies suggest a role in autoimmune disease, infections, cardiovascular disease and cancer. It is ingested in foods such as oily fish and supplements, so that average levels vary between countries, but most individuals worldwide make most of their vitamin D as a result of the effects of sun exposure on the skin. Many studies in different populations around the world have in recent years shown that sub-optimal levels of vitamin D (<70 nmol/L) are common. A series of epidemiological studies have suggested that low vitamin D levels increase the risk of cancers, particularly of the breast and gastrointestinal tracts, so that there has been much interest in understanding the effects of vitamin D on cancer cells. Vitamin D binds to the vitamin D receptor (VDR) resulting in transcription of a number of genes playing a role in inhibition of MAPK signalling, induction of apoptosis and cell-cycle inhibition, and therefore vitamin D has anti-proliferative and pro-apoptotic effects in cells of many lineages. It also has suppressive effects on adaptive immunity and is reported to promote innate immunity. Here we review data on vitamin D and melanoma. There are in vitro data, which suggest that vitamin D has the same anti-proliferative effects on melanoma cells as have been demonstrated in other cells. We have reported data to suggest that vitamin D levels at diagnosis have a role in determining outcome for melanoma patients. There is a curious relationship between melanoma risk and sun exposure where sunburn is causal but occupational sun exposure is not (at least in temperate climates). Seeking to understand this, we discuss data, which suggest (but by no means prove) that vitamin D might also have a role in susceptibility to melanoma. In conclusion, much remains unknown about vitamin D in general and certainly about vitamin D and melanoma. However, the effects of avoidance of suboptimal vitamin D levels on cancer cell proliferation are likely to be beneficial to the melanoma patient. The possible results of high vitamin D levels on the immune system remain unclear however and a source of some concern, but the data support the view that serum levels in the range 70-100 nmol/L might be a reasonable target for melanoma patients as much as for other members of the population.

## **Melanoma e vitamina D.**

La vitamina D è un ormone steroide liposolubili, che è essenziale per la salute e per la quale gli studi epidemiologici suggeriscono un ruolo nelle malattie autoimmuni, infezioni, malattie cardiovascolari e il cancro. E' ingeriti in alimenti come pesce azzurro e integrazioni, in modo che i livelli medi variano tra i paesi, ma maggior parte degli individui in tutto il mondo fanno la maggior parte della loro vitamina D a seguito degli effetti della esposizione al sole sulla pelle. Molti studi in popolazioni diverse parti del mondo negli ultimi anni hanno dimostrato che i livelli sub-ottimali di vitamina D (<70 nmol / L) sono comuni. Una serie di studi epidemiologici hanno suggerito che bassi livelli di vitamina D aumentano il rischio di tumori, in particolare del tratto gastrointestinale e del seno, in modo che vi sia stata molto interesse per la comprensione degli effetti della vitamina D sulle cellule tumorali. La vitamina D si lega al recettore della vitamina D (VDR) con conseguente trascrizione di un numero di geni che svolgono un ruolo di inibizione della segnalazione MAPK, l'induzione di apoptosi e l'inibizione del ciclo cellulare, e quindi di vitamina D ha un effetto anti-proliferativo e pro-apoptotici nelle cellule di molti lignaggi. Inoltre ha effetti soppressivi sul immunità adattativa e si dice di promuovere l'immunità innata. Qui passiamo in rassegna i dati sulla vitamina D e il melanoma. Non ci sono dati in vitro, che suggeriscono che la vitamina D ha gli stessi effetti anti-proliferativo su cellule di melanoma, come è stato dimostrato in altre cellule. Abbiamo riportato i dati che suggeriscono che i livelli di vitamina D al momento della diagnosi hanno un ruolo nel determinare esiti per i pazienti con melanoma. C'è una curiosa relazione tra rischio di melanoma e esposizione al sole dove eritema solare è l'esposizione al sole causale, ma professionale non è (almeno in climi temperati). Cercando di capire questo, si discute dei dati, che suggeriscono (ma non dimostrare) che la vitamina D potrebbe anche avere un ruolo nella suscettibilità al melanoma. In conclusione, molto resta ancora sconosciuto sulla vitamina D in generale, e certamente sulla vitamina D e il melanoma. Tuttavia, gli effetti di evasione di livelli subottimali di vitamina D sulla proliferazione delle cellule tumorali possono essere di beneficio per il paziente melanoma. I possibili risultati di alti livelli di vitamina D sul sistema immunitario, rimangono poco chiari e comunque una fonte di qualche preoccupazione, ma i dati confermano l'opinione che i livelli sierici nel range 70-100 nmol / L potrebbe essere un obiettivo ragionevole per pazienti affetti da melanoma il più come per gli altri membri della popolazione.

Orlow I, Roy P, Reiner AS, Yoo S, Patel H, Paine S, Armstrong BK, Krickler A, Marrett LD, Millikan RC, Thomas NE, Gruber SB, Anton-Culver H, Rosso S, Gallagher RP, Dwyer T, Kanetsky PA, Busam K, From L, Begg CB, Berwick M; for the GEM Study Group.

### **Vitamin D receptor polymorphisms in patients with cutaneous melanoma.**

Int J Cancer. 2011 Mar 1.

Department of Epidemiology and Biostatistics, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center. New York, NY, U.S.A.. orlowi@mskcc.org.

The vitamin D receptor (VDR) gene has been associated with cancer risk, but only a few polymorphisms have been studied in relation to melanoma risk and the results have been inconsistent. We examined 38 VDR gene SNPs in a large international multi-center population-based case-control study of melanoma. Buccal DNAs were obtained from 1207 people with incident multiple primary melanoma and 2469 with incident single primary melanoma. SNPs with known or suspected impact on VDR activity, htSNPs with  $\geq 10\%$  MAF in Caucasians, and SNPs reported as significant in other association studies were examined. Logistic regression was used to calculate the relative risks conferred by the individual SNP. Eight of 38 SNPs in the promoter, coding, and 3' gene regions were individually significantly associated with multiple primary melanoma after adjusting for covariates. The estimated increase in risk for individuals who were homozygous for the minor allele ranged from 25% to 33% for 6 polymorphisms: rs10875712 (OR 1.28; 95%CI, 1.01-1.62), rs4760674 (OR 1.33; 95% CI, 1.06-1.67), rs7139166 (OR 1.26; 95%CI, 1.02-1.56), rs4516035 (OR 1.25; 95%CI, 1.01-1.55), rs11168287 (OR 1.27; 95%CI, 1.03-1.57), rs1544410 (OR 1.30; 95%CI, 1.04-1.63); for 2 polymorphisms, homozygous carriers had a decreased risk: rs7305032 (OR 0.81; 95%CI 0.65-1.02), rs7965281 (OR, 0.78; 95%CI, 0.62-0.99). We recognize the potential false positive findings due to multiple comparisons; however the 8 significant SNPs in this study outnumbered the 2 significant tests expected to occur by chance. The vitamin D receptor may play a role in melanomagenesis.

### **Polimorfismi del recettore della vitamina D nei pazienti con melanoma cutaneo**

Il recettore della vitamina D (VDR) del gene è stata associata a rischio di cancro, ma solo alcuni polimorfismi sono stati studiati in relazione al rischio melanoma ed i risultati sono stati contraddittori. Abbiamo esaminato 38 SNPs gene VDR in un grande studio internazionale multicentrico di popolazione caso-controllo di melanoma. Buccale DNA sono state ottenute da 1.207 persone con melanoma multiplo incidente primaria e 2.469 con melanoma solo incidente

primario. SNP con nota o sospetta impatto sull'attività VDR, htSNPs con  $\geq 10\%$  MAF in caucasici, e SNP segnalati come significativi in studi di associazione di altri sono stati esaminati. Regressione logistica è stata utilizzata per calcolare il rischio relativo conferito dal singolo SNP. Otto di 38 SNPs nel promotore, il codice e 3 'le regioni del gene erano individualmente significativamente associati con più melanoma primario dopo aggiustamento per le covariate. L'aumento stimato del rischio per gli individui che erano omozigoti per l'allele minore variava dal 25% al 33% per 6 polimorfismi: rs10875712 (OR 1,28, IC 95%, 1,01-1,62), rs4760674 (OR 1,33, 95% CI, 1,06-1,67), rs7139166 (OR 1,26, IC 95%, 1,02-1,56), rs4516035 (OR 1,25, IC 95%, 1,01-1,55), rs11168287 (OR 1,27, IC 95%, 1,03-1,57), rs1544410 (OR 1,30; 95% CI, 1,04-1,63), per 2 polimorfismi, portatori omozigoti hanno un rischio diminuito: rs7305032 (OR 0,81, IC 95% 0,65-1,02), rs7965281 (OR, 0,78; 95% CI, 0,62-0,99). Noi riconosciamo il potenziale risultati falsi positivi a causa di confronti multipli, ma gli 8 SNPs significativo in questo studio in inferiorità numerica le 2 prove significative improbabile che possa verificarsi per caso. Il recettore della vitamina D può avere un ruolo nella melanomagenesis.

Pierrot-Deseilligny C, Souberbielle JC.

### **Widespread vitamin D insufficiency: A new challenge for primary prevention, with particular reference to multiple sclerosis.**

Presse Med. 2011 Feb 17.

Université Pierre-et-Marie-Curie (Paris VI), Assistance publique-Hôpitaux de Paris, hôpital de la Salpêtrière, service de neurologie 1, 75643 Paris cedex 13, France.

In the past 10years, our knowledge of vitamin D has been revolutionized on two main points. Firstly, this vitamin is not only crucial for bone and calcium metabolism but also exerts major hormonal actions via its active metabolite (calcitriol) and specific receptors in almost all organs. The diverse non-classical actions of vitamin D-i.e. anti-inflammatory, immunomodulatory, antiproliferative and as a neurotransmitter-could have protective and preventive effects for a wide variety of pathologies, such as autoimmune diseases, cancer, infections and cardiovascular affections. Secondly, daily vitamin D requirements have been redefined thanks to many recent metabolic and pathological studies and are about 10 times higher than the amount considered sufficient until a few years ago. The fact that sunshine is the essential natural source of vitamin D and is limited in temperate and Nordic countries, coupled with the fact that modern lifestyle increasingly removes people from exposure to the sun, could explain why a great majority of the general population in these countries are in a state of vitamin D insufficiency. A lack of vitamin D can therefore also be observed in all pathologies but it may play a pathogenic role only in some of them. The incrimination of hypovitaminosis D as a risk factor is a reasonable assumption when several different research approaches used in a given pathology have consistently concluded that vitamin D is likely involved in that pathology. In multiple sclerosis, taken here as a prime example, there is a substantial rationale for vitamin D involvement, based on the findings of different experimental, epidemiological, genetic and immunological studies. Possible curative effects of vitamin D, in addition to a preventive action, are currently being tested but have not yet been demonstrated in most pathologies. However, these two questions appear to be clearly distinct and may involve notably different mechanisms. Lastly, since vitamin D insufficiency exists in most people living in mid- or high-latitude countries, vitamin D could exert multiple major preventive actions, simple supplementation is both safe and inexpensive and, for a vitamin-hormone, supplementation seems obligatory from a general preventive medical point of view alone, it follows that vitamin D supplementation should be organized in these countries to treat all those currently in a state of insufficiency, patients and 'normal' subjects alike, without further delay.

## **Insufficienza di vitamina D generalizzata: una nuova sfida per la prevenzione primaria, con riferimento alla sclerosi multipla**

In 10 anni passati, la nostra conoscenza di vitamina D è stato rivoluzionato su due punti principali. In primo luogo, questa vitamina non solo è fondamentale per il metabolismo osseo e di calcio, ma esercita anche importanti azioni ormonali attraverso il suo metabolita attivo (calcitriolo) e recettori specifici in quasi tutti gli organi. Le diverse azioni non classica di vitamina D, e. anti-infiammatorie, immunomodulanti, antiproliferativa e come neurotrasmettitore-potrebbe avere effetti di protezione e prevenzione per una vasta gamma di patologie, come le malattie autoimmuni, tumori, infezioni e affezioni cardiovascolari. In secondo luogo, quotidiano fabbisogno di vitamina D sono state ridefinite grazie a molti recenti studi metabolici e patologici e sono circa 10 volte superiore alla dose considerata sufficiente fino a pochi anni fa. Il fatto che il sole è la fonte essenziale naturale di vitamina D ed è limitato nei paesi temperati e nordici, insieme al fatto che il moderno stile di vita toglie sempre più persone dall'esposizione al sole, potrebbe spiegare perché la stragrande maggioranza della popolazione generale in questi paesi sono in uno stato di insufficienza di vitamina D. Una mancanza di vitamina D può dunque essere rispettato anche in tutte le patologie, ma può giocare un ruolo patogenetico solo in alcuni di essi. L'incriminazione di ipovitaminosi D come fattore di rischio è un'ipotesi ragionevole quando diversi di ricerca differenti approcci utilizzati in una determinata patologia hanno costantemente concluso che la vitamina D è probabile che intervengono in tale patologia. Nella sclerosi multipla, qui assunta come un primo esempio, c'è una logica sostanziale per la vitamina D coinvolgimento, sulla base dei risultati di diversi studi sperimentali, epidemiologici, genetici e immunologici. Possibili effetti curativi di vitamina D, oltre ad una azione preventiva, sono attualmente in fase di test ma non sono ancora stati dimostrati, nella maggior parte delle patologie. Tuttavia, queste due domande sembrano essere chiaramente distinta e può coinvolgere meccanismi notevolmente diversi. Infine, poiché l'insufficienza di vitamina D esiste nella maggior parte delle persone che vivono a metà o in paesi ad alta latitudine, la vitamina D potrebbe esercitare più importanti azioni di prevenzione, l'integrazione semplice è sicuro e poco costoso e, per un ormone-vitamina, l'integrazione sembra obbligatorio da un generale preventiva punto di vista medico da solo, ne consegue che la supplementazione di vitamina D dovrebbe essere organizzato in questi paesi per il trattamento di tutte quelle attualmente in uno stato di insufficienza, dei pazienti e 'normale' sudditi, senza ulteriori ritardi.

Yin L, Grandi N, Raum E, Haug U, Arndt V, Brenner H.

**Meta-analysis: Circulating vitamin D and ovarian cancer risk.**

Gynecol Oncol. 2011 Feb 14.

**OBJECTIVE:** To review and summarize evidence from longitudinal studies on the association between circulating 25 hydroxyvitamin D (25(OH)D) and the risk of ovarian cancer (OC).

**METHODS:** Relevant prospective cohort studies and nested case-control studies were identified by systematically searching Ovid Medline, EMBASE, and ISI Web of Knowledge databases and by cross-referencing. The following data were extracted in a standardized manner from eligible studies: first author, publication year, country, study design, characteristics of the study population, duration of follow-up, OC incidence according to circulating vitamin D status and the respective relative risks, and covariates adjusted for in the analysis. Due to the heterogeneity of studies in categorizing circulating vitamin D levels, all results were recalculated for an increase of circulating 25(OH)D by 20ng/ml. Summary relative risks (RRs) were calculated using meta-analysis methods.

**RESULTS:** Overall, ten individual-level studies were included that reported on the association between circulating vitamin D levels and OC incidence. Meta-analysis of studies on OC incidence resulted in a summary RR (95% confidence interval, CI) of 0.83 (0.63-1.08) for an increase of 25(OH)D by 20ng/ml (P=0.160). No indication for heterogeneity and publication bias was found.

**CONCLUSIONS:** A tentative inverse association of circulating 25(OH)D with OC incidence was found, which did not reach statistical significance but which requires clarification by additional studies due to potentially high clinical and public health impact.

**Meta-analisi: vitamina D circolante e rischio di cancro ovarico**

**OBIETTIVO:** Per rivedere e riassumere dati provenienti da studi longitudinali sulla associazione tra circolante 25 idrossivitamina D (25 (OH) D) e il rischio di cancro ovarico (OC).

**METODI:** studi di coorte prospettici rilevanti e nidificati studi caso-controllo sono stati identificati dalla fine di ricercare Ovidio Medline, EMBASE e banche dati ISI Web of Knowledge e di riferimenti incrociati. I seguenti dati sono stati estratti in maniera standardizzata da studi ammissibili: primo autore, anno di pubblicazione, paese, disegno dello studio, le caratteristiche della popolazione di studio, durata del follow-up, l'incidenza OC secondo circolanti di vitamina D e relativi rischi relativi, covariate e corretto per l'analisi. A causa della eterogeneità degli studi nella categorizzazione circolanti livelli di vitamina D, tutti i risultati sono stati ricalcolati per un aumento di circolazione di 25 (OH) D di 20 ng / ml. Sintesi dei rischi relativi (RR) sono stati calcolati utilizzando metodi meta-analisi.

**RISULTATI:** Complessivamente, dieci studi a livello individuale sono stati inclusi che ha segnalato l'associazione tra livelli circolanti di vitamina D e di incidenza OC. La meta-analisi di studi sulla incidenza OC portato ad un RR di sintesi (95% intervallo di confidenza, CI) di 0,83 (0,63-1,08) per un aumento di 25 (OH) D di 20 ng / ml (P = 0,160). Nessuna indicazione per la eterogeneità e bias di pubblicazione è stato trovato.

**CONCLUSIONI:** L'associazione inversa tentativo di far circolare 25 (OH) D con incidenza OC è stato trovato, che non ha raggiunto la significatività statistica, ma che necessita di un chiarimento da altri studi a causa potenzialmente ad alto impatto clinico e sanitario.

Davis CD, Milner JA.

### **Vitamin D and colon cancer.**

Expert Rev Gastroenterol Hepatol. 2011 Feb;5(1):67-81.

Nutritional Sciences Research Group, Division of Cancer Prevention, National Cancer Institute, 6130 Executive Blvd, Suite 3159, MSC 7328, Rockville, MD 20892-7328, USA. davisci@mail.nih.gov

A wealth of scientific evidence supports a role for vitamin D in decreasing colorectal cancer incidence, and possibly mortality. This reduction in risk is related to inhibition of cellular proliferation and stimulation of differentiation. The minimal amount and duration needed to bring about these effects necessitate additional studies. Furthermore, a critical evaluation of physiologically relevant biomarkers of vitamin D status, including 25-hydroxyvitamin D, is needed. Several dietary components and the balance between energy intake and expenditure influence vitamin D metabolism. Scientists need to identify confounders and modifiers of the biological response to vitamin D, including dietary factors, lifestyle factors such as exercise, race or ethnicity, and genetic background.

### **Vitamina D e cancro al colon**

Un patrimonio di conoscenze scientifiche sostiene un ruolo della vitamina D nel ridurre l'incidenza del cancro del colon-retto, e forse la mortalità. Questa riduzione di rischio è legato alla inibizione della proliferazione cellulare e la stimolazione della differenziazione. L'importo minimo e la durata necessarie per realizzare questi effetti richiedono ulteriori studi. Inoltre, una valutazione critica dei biomarcatori fisiologicamente rilevanti di vitamina D, tra cui 25-idrossivitamina D, è necessaria. Diversi componenti della dieta e l'equilibrio tra l'assunzione di energia e di influenzare la spesa metabolismo della vitamina D. Gli scienziati hanno bisogno di identificare fattori di confondimento e modificatori della risposta biologica della vitamina D, compresi i fattori dietetici, fattori di stile di vita come l'esercizio fisico, la razza o etnia e background genetico.

Hsu JW, Yasmin-Karim S, King MR, Wojciechowski JC, Mickelsen D, Blair ML, Ting HJ, Ma WL, Lee YF.

**Suppression of prostate cancer cell rolling and adhesion to endothelium by 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D3.**

Am J Pathol. 2011 Feb;178(2):872-80.

Department of Urology and Pathology and Laboratory Medicine, University of Rochester Medical Center, Rochester, New York, USA.

Adhesion of circulating prostate cancer (PCa) cells to the microvascular endothelium is a critical step during cancer metastasis. To study PCa cell rolling and adhesion behavior, we developed a dynamic flow-based microtube system to mimic the microvascular environment. We found that PCa cell rolling capacity is mediated by E-selectin and can be enhanced by stromal cell-derived factor-1 under different wall shear stresses. Using this device, we tested if the chemopreventive agent, vitamin D, could interfere with PCa cell adhesion. We found that 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D(3) (1,25-VD), the bioactive form of vitamin D, reduced PCa cell rolling numbers and increased rolling velocities resulting in a significant decreased number of PCa cells adhering to the microtube. The inhibitory effects of 1,25-VD on PCa cell heterotypic adhesion were further confirmed using microvascular endothelial cells in a static condition. Furthermore, we demonstrated that 1,25-VD can increase E-cadherin expression in PCa cells and promote the homotypic cell-cell aggregation, which can then hinder PCa cell adhesion to the endothelium. Blocking E-cadherin with a neutralizing antibody can reverse 1,25-VD-mediated suppression of PCa cell adhesion to the endothelium. Taken together, our data revealed that 1,25-VD promoted PCa cell aggregation by increasing E-cadherin expression, thus interfering with circulating PCa cell adhesion to microvascular endothelial cells and potentially reducing their metastatic potential.

**Soppressione delle cellule cancerose prostatiche e adesione all'endotelio da parte della 1 $\alpha$ ,25-diidrossivitamina D3.**

Adesione di far circolare il cancro alla prostata (PCa) le cellule dell'endotelio microvascolare è un passaggio fondamentale durante la metastasi del cancro. Per studiare il comportamento di rotolamento e adesione delle cellule APC, abbiamo sviluppato un sistema dinamico provetta basato sul flusso, per imitare l'ambiente microvascolari. Abbiamo scoperto che la capacità delle cellule PCa rotolamento è mediata da E-selectina e può essere arricchita da stromal cell-derived factor-1

sotto diverse sollecitazioni di taglio a parete. Utilizzando questo dispositivo, abbiamo testato se l'agente chemiopreventivo, vitamina D, può interferire con l'adesione cellulare PCa. Abbiamo scoperto che 1 $\alpha$ ,25-diidrossivitamin D (3) (1,25-VD), la forma bioattiva della vitamina D, ridotto numero di cellule PCa rotolamento e una maggiore velocità di rotolamento dovuto in un numero significativo diminuzione di cellule aderenti al PCa della provetta. Gli effetti inibitori della 1,25-VD sulla adesione cellulare PCa eterotipica sono stati ulteriormente confermati utilizzando cellule endoteliali in una condizione statica. Inoltre, abbiamo dimostrato che la 1,25-VD possono aumentare l'espressione E-caderina in cellule PCa e promuovere l'aggregazione omotipica cellula-cellula, che possono ostacolare l'adesione delle cellule PCA per l'endotelio. Blocco E-caderina, con un anticorpo neutralizzante può invertire la soppressione 1,25-VD-mediato di adesione delle cellule PCA per l'endotelio. Nel loro insieme, i nostri dati hanno rivelato che la 1,25-VD promosso l'aggregazione delle cellule PCa aumentando l'espressione E-caderina, interferendo così con l'adesione delle cellule circolanti PCA per cellule endoteliali e, potenzialmente, ridurre il loro potenziale metastatico.

Bulathsinghala P, Syrigos KN, Saif MW.

### **Role of vitamin d in the prevention of pancreatic cancer.**

J Nutr Metab. 2010;2010:721365. Epub 2011 Jan 9.

Department of Internal Medicine, Danbury Hospital, 24 Hospital Avenue, Danbury, CT 06810, USA.

Pancreatic cancer is a malignancy of poor prognosis which is mostly diagnosed at advanced stages. Current treatment modalities are very limited creating great interest for novel preventive and therapeutic options. Vitamin D seems to have a protective effect against pancreatic cancer by participating in numerous proapoptotic, antiangiogenic, anti-inflammatory, prodifferentiating, and immunomodulating mechanisms. 25-hydroxyvitamin D [25(OH)D] serum concentrations are currently the best indicator of vitamin D status. There are three main sources of vitamin D: sun exposure, diet, and dietary supplements. Sun exposure has been associated with lower incidence of pancreatic cancer in ecological studies. Increased vitamin D levels seem to protect against pancreatic cancer, but caution is needed as excessive dietary intake may have opposite results. Future studies will verify the role of vitamin D in the prevention and therapy of pancreatic cancer and will lead to guidelines on adequate sun exposure and vitamin D dietary intake.

### **Ruolo della vitamina d nella prevenzione del cancro pancreatico**

Il tumore al pancreas è una neoplasia maligna di prognosi sfavorevole, che è per lo più diagnosticata in fase avanzata. Modalità di trattamento attuali sono molto limitati creando grande interesse per il romanzo opzioni preventive e terapeutiche. La vitamina D sembra avere un effetto protettivo contro il cancro del pancreas partecipando a numerosi proapoptotica, antiangiogenica, anti-infiammatori, prodifferentiating, e meccanismi immunomodulatori. 25-idrossivitamin D [25(OH) D], le concentrazioni sieriche sono attualmente il migliore indicatore della vitamina D. Ci sono tre fonti principali di vitamina D: l'esposizione al sole, la dieta e integratori alimentari. L'esposizione al sole è stata associata ad una minore incidenza di cancro al pancreas in studi ecologici. Aumento dei livelli di vitamina D sembra proteggere contro il cancro al pancreas, ma la cautela è necessaria in quanto eccessiva assunzione con la dieta può avere risultati opposti. Studi futuri verificare il ruolo della vitamina D nella prevenzione e terapia del cancro al pancreas e porteranno a orientamenti in materia di esposizione al sole e vitamina D nella dieta.

## VITAMINA E

3: Selvaduray KR, Radhakrishnan AK, Kutty MK, Nesaretnam K.

### **Palm tocotrienols inhibit proliferation of murine mammary cancer cells and induce expression of interleukin-24 mRNA.**

J Interferon Cytokine Res. 2010 Dec;30(12):909-16. PubMedPMID: 21121862.

Several mechanisms have been postulated for the anticancer effects of tocotrienols. In this study, for the first time, the anticancer effect of tocotrienols is linked to increased expression of interleukin-24 (IL-24) mRNA, a cytokine reported to have antitumor effects in many cancer models. Tocotrienol isomers ( $\alpha$ -T3,  $\gamma$ -T3, and  $\delta$ -T3) and tocotrienol-rich fraction (TRF) inhibited the growth of the 4T1 murine mammary cancer cells ( $P < 0.05$ ), with  $IC_{50}$  values 8.99, 4.79, 3.73, and 8.63  $\mu\text{g/mL}$ , respectively. Tumor incidence and tumor load in TRF-supplemented BALB/c mice was decreased by 57.1% and 93.6% ( $P < 0.05$ ), respectively. The induction of the IL-24 mRNA in the 4T1 cells by vitamin E decreased in the following order:  $\delta$ -T3  $>$   $\gamma$ -T3  $>$  TRF  $>$   $\alpha$ -T3  $>$   $\alpha$ -T, which was similar to their antiproliferative effects. The IL-24 mRNA levels in tumor tissues of BALB/c mice supplemented with TRF increased 2-fold when compared with control mice. Increased levels of IL-24 have been associated with inhibition of tumor growth and angiogenesis. Treatment of 4T1 cells with TRF and  $\delta$ -T3 significantly decreased IL-8 and vascular endothelial growth factor mRNA levels. Hence, we report that tocotrienols have potent antiangiogenic and antitumor effects that is associated with increased levels of IL-24 mRNA.

### **Palm tocotrienoli inibiscono la proliferazione delle cellule di cancro mammario murino e inducono l'espressione di interleuchina-24 mRNA.**

Diversi meccanismi sono stati postulati per spiegare gli effetti antitumorali di tocotrienoli. In questo studio, per la prima volta, l'effetto antitumorale di tocotrienoli è legato alla aumentata espressione di interleuchina-24 (IL-24) mRNA, una citochina segnalata per avere effetti antitumorali in molti modelli di cancro. Isomeri Tocotrienolo ( $\alpha$ -T3,  $\gamma$ -T3, e  $\delta$ -T3) frazione e tocotrienolo (TRF) hanno inibito la crescita delle cellule 4T1 del tumore murino mammario (P

<0,05), con valori IC<sub>50</sub> 8,99, 4,79, 3,73, e 8,63 mg / ml, rispettivamente. L'incidenza di tumori e il carico tumorale in TRF-integrato topi BALB / c sono diminuite del 57,1% e 93,6% (P <0,05), rispettivamente. L'induzione di mRNA di IL-24 nelle cellule 4T1 attraverso la vitamina E è diminuita nel seguente ordine: δ-T3> γ-T3> FR> α-T3> α-T, che era simile alla loro effetti antiproliferativi. I livelli di mRNA di IL-24 nei tessuti tumorali di topi BALB / c integrata con TRF sono aumentati di 2 volte rispetto ai topi di controllo. L'aumento dei livelli di IL-24 è stato associato con l'inibizione della crescita tumorale e dell'angiogenesi. Il trattamento di cellule con 4T1 TRF e δ-T3 ha portato a un significativo decremento dei livelli di mRNA di IL-8 e del fattore di crescita endoteliale e vascolare. Quindi, si segnala che i tocotrienoli hanno potenti effetti antiangiogenici e antitumorali che sono associati con un aumento dei livelli di mRNA di IL-24.

4: van Lee L, Heyworth J, McNaughton S, Iacopetta B, Clayforth C, Fritschi L.

#### **Selected Dietary Micronutrients and the Risk of Right- and Left-Sided Colorectal Cancers: A Case-Control Study in Western Australia.**

Ann Epidemiol. 2010 Nov 23.[Epub ahead of print] PubMed PMID: 21109455.

**PURPOSE:** Contradictory results about the role of dietary factors in the causation of colorectal cancer (CRC) may partly be due to failure to discriminate between left- and right-sided CRC.

**METHODS:** We undertook a population-based case-control study comparing 577 cases of left-sided CRC and 277 cases of right-sided CRC (n = 277) with 958 age- and sex-matched controls. Dietary exposure was measured using a food frequency questionnaire. Odds ratios (OR) were calculated across quintiles of dietary intakes of micronutrients, adjusting for potential confounders.

**RESULTS:** Compared to those in the lowest quartiles of intake, we found a protective role of phosphorus on CRC particularly for right-sided cancers (Q5 OR = 0.66, 95% confidence interval [CI]: 0.52-1.02) and protective associations for iron and zinc were observed with left-sided cancers (Q5 OR = 0.78, 95% CI: 0.56-1.09 and Q5 OR = 0.65, 95% CI: 0.46-0.92, respectively). An increased risk of left-sided cancer, was observed for vitamin E (Q5 OR = 1.37, 95% CI: 0.97-1.96).

**CONCLUSIONS:** An increased risk of CRC was observed for vitamin E and decreased risks were seen for phosphorus, iron, and zinc. Differences in the risk of developing CRC according to subsite were observed for phosphorus and vitamin E.

#### **Dieta e rischio di contrarre cancro colon-rettale della parte destra e sinistra: uno studio caso-controllo nell'ovest dell'Australia**

**SCOPO:** Risultati contraddittori sul ruolo della dieta nello sviluppo del cancro colonrettale (CRC) possono essere parzialmente dovuti alla mancanza di discriminazione tra CRC della parte sinistra o destra.

**METODI:** Abbiamo eseguito uno studio di popolazione caso-controllo che confronta 577 casi di CRC di sinistra e 277 casi di CRC di destra con 958 controlli della stessa età e dello stesso sesso. Le informazioni relative alla dieta sono state ottenute tramite l'uso di un questionario. L'odd ratio è stato calcolato attraverso quintili di assunzioni di micronutrienti, aggiustati con potenziali fattori di confondimento.

**RISULTATI:** Confrontando le assunzioni più basse di nutrienti abbiamo osservato un ruolo protettivo del fosforo su CRC in particolare per il cancro della parte destra (Q5 OR = 0.66, 95% confidence interval [CI]: 0.52-1.02) e una associazione protettiva del ferro e dello zinco è stata osservata nel cancro della parte sinistra (Q5 OR = 0.78, 95% CI: 0.56-1.09 and Q5 OR = 0.65, 95% CI: 0.46-0.92, respectively). Un aumento del rischio di cancro della parte sinistra è stato osservato per l'assunzione di vitamina E (Q5 OR = 1.37, 95% CI: 0.97-1.96).

**CONCLUSIONI:** Un aumentato rischio di CRC è stato osservato per l'assunzione di vitamina E e una diminuzione del rischio per l'assunzione di fosforo, ferro e zinco. Sono state osservate differenze nel rischio di sviluppare CRC a seconda dei sottotipi nel caso di assunzione di fosforo e di vitamina E.

8: Dong LF, Jameson VJ, Tilly D, Cerny J, Mahdavian E, Marín-Hernández A, Hernández-Esquivel L, Rodríguez-Enríquez S, Stursa J, Witting PK, Stantic B, Rohlena J, Truksa J, Kluckova K, Dyason JC, Ledvina M, Salvatore BA, Moreno-Sánchez R, Coster MJ, Ralph SJ, Smith RA, Neuzil J.

**Mitochondrial targeting of vitamin E succinate enhances its pro-apoptotic and anti-cancer activity.**

J Biol Chem. 2010 Nov 8. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 21059645.

Mitochondrial complex II (CII) has been recently identified as a novel target for anti-cancer drugs. Mitochondrially targeted vitamin E succinate (MitoVES) is modified so that it is preferentially localized to mitochondria, greatly enhancing its pro-apoptotic and anti-cancer activity. Using genetically manipulated cells, MitoVES caused apoptosis and generation of reactive oxygen species (ROS) in CII-proficient malignant cells but not their CII-dysfunctional counterparts. MitoVES inhibited the succinate dehydrogenase (SDH) activity of CII with IC<sub>50</sub> of 80 μM, while the electron transfer from CII to CIII was inhibited with IC<sub>50</sub> of 1.5 μM. The agent had no effect either on the enzymatic activity of CI or on electron transfer from CI to CIII. Over 24 h, MitoVES caused stabilization of the oxygen-dependent destruction domain of HIF1α fused to GFP, indicating promotion of the state of pseudohypoxia. Molecular modeling predicted the succinyl group anchored into the proximal CII ubiquinone (UbQ)-binding site, and successively reduced interaction energies for serially shorter phytyl chain homologs of MitoVES correlated with their reduced effects on apoptosis induction, ROS generation and SDH activity. Mutation of the UbQ-binding Ser68 within the proximal site of the CII SDHC subunit (S68A or S68L) suppressed both ROS generation and apoptosis induction by MitoVES. In vivo studies indicated that MitoVES also acts by causing pseudohypoxia in the context of tumor suppression. We propose that mitochondrial targeting of VES with an 11-carbon chain localizes the agent into an ideal position across the interface of the mitochondrial inner membrane and matrix optimising its biological effects as an anti-cancer drug.

**Bersaglio mitocondriale della succinato vitamina E aumenta la sua attività pro-apoptica e anti-cancro**

Il complesso mitocondriale (CII) è stato identificato di recente come nuovo target per i farmaci anti-cancro. La succinato vitamina E (MitoVES), target mitocondriale, è stata modificata in modo che sia localizzata preferenzialmente nei mitocondri, in modo da aumentare la sua azione pro-apoptica e anti-cancro. Usando cellule modificate geneticamente, MitoVES causa apoptosi e genera specie reattive dell'ossigeno (ROS) nelle cellule maligne CII-provette ma non nelle controparti CII-disfunzionali. MitoVES inibisce l'attività della succinato deidrogenasi (SDH) di CII con IC50 di 80 uM mentre il trasferimento di elettroni da CII a CIII è inibito con IC50 di 1.5 uM. L'agente non ha effetto né sull'attività enzimatica di CI né sul trasferimento di elettroni da CI a CIII. In 24 ore, MitoVES causa la stabilizzazione del dominio di distruzione ossigeno-dipendente di HIF1a fuso a GFP, questo indica la promozione dello stato di pseudoipossia. Modelli molecolari predicono che il gruppo succinilico sia ancorato nel sito di legame vicino a CII ubiquinone (UbQ) e successivamente riducono le energie di interazione tra gli omologhi delle catene fitil più corte di MitoVES che sono correlate agli effetti riduttivi di induzione dell'apoptosi, della generazione di ROS e dell'attività di SDH. Mutazioni di UbQ-binding Ser68 entro il sito prossimale della subunità (S68A or S68L) di CII SDHC sopprimono la generazione di ROS e l'induzione dell'apoptosi da parte di MitoVES. Studi in vivo indicano che MitoVES agisce causando pseudoipossia nel contesto di soppressione tumorale. Abbiamo proposto che il target mitocondriale VES con una catena 11-carbonilica localizzi l'agente in una posizione ideale attraverso l'interfaccia della membrana mitocondriale e la matrice, ottimizzando i suoi effetti biologici come farmaco anti-cancro.

10: Hsieh TC, Elangovan S, Wu JM.

**Differential suppression of proliferation in MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells exposed to alpha-, gamma- and delta-tocotrienols is accompanied by altered expression of oxidative stress modulatory enzymes.**

Anticancer Res. 2010 Oct;30(10):4169-76. PubMed PMID:21036737.

Tocotrienols belong to the vitamin E family of chemicals known to have potent anti-proliferative and apoptotic activities against a variety of cancer cells with little to no comparable influence on the normal cells. Whether tocotrienols control the expression of phase II antioxidant enzymes in the context of their anti-carcinogenic mechanisms has not been investigated. The present studies were performed to test whether the differential growth inhibition resulting from exposure to  $\alpha$ -,  $\gamma$ - and  $\delta$ -tocotrienols in estrogen receptor-positive human MCF-7 and estrogen receptor-negative MDA-MB-231 breast cancer cells might be accompanied by changes in phase II antioxidant enzymes. Cell proliferation and clonogenicity in both cell lines were significantly inhibited by  $\gamma$ - and  $\delta$ -tocotrienols with little affect when cells were similarly exposed to  $\alpha$ -tocotrienol, at doses up to 10  $\mu$ M. The expression and activity of several antioxidant enzymes in 10  $\mu$ M tocotrienol-treated cells were determined by Western blot and biochemical assays. In MDA-MB-231 cells,  $\delta$ - was more active than  $\alpha$ - or  $\gamma$ -tocotrienols in up-regulating glutathione peroxidase; however, the three tocotrienols had comparable activity in inducing thioredoxin. In MCF-7 cells, expression of quinone reductase 2 and thioredoxin was increased by  $\gamma$ - and  $\delta$ -tocotrienols, whereas quinone reductase 1 was unaffected by exposure to the tocotrienols. The tocotrienols also did not affect the expression and activity of superoxide dismutase in both MCF-7 and MDA-MB-231 cells, but increased catalase activity concomitant with slight reduction in the catalase expression. In MDA-MB-231 cells, treatment by tocotrienols led to several fold increase of NRF2 expression marked by corresponding decrease in KEAP1 levels. By contrast, no significant change in NRF2 and KEAP1 levels was observed in MCF-7 cells. These studies demonstrate that different tocotrienols show distinct and selective activity in regulating the NRF2-KEAP1, in coordination with the induced expression of cytoprotective oxidative stress modulatory genes and regulation of proliferation in breast cancer cells.

**La soppressione differenziale della proliferazione nelle cellule cancerose mammary MCF-7 e MDA-MB-231 esposte ai tocotrienoli  $\alpha$ -,  $\gamma$ - e  $\delta$ - è accompagnata dall'espressione alterata degli enzimi che modulano lo stress ossidativo.**

I tocotrienoli appartengono alla famiglia della vitamina E nota per avere azioni anti-proliferative e apoptotiche verso molte cellule cancerose e nessuna influenza sulle cellule normali. Non è ancora stato dimostrato se i tocotrienoli, tramite i meccanismi anti-carcinogenici, siano in grado di controllare l'espressione degli enzimi antiossidanti di fase II. Questo studio è stato eseguito per testare se nelle cellule MCF-7 positive per il recettore degli estrogeni e nelle cellule tumorali mammarie MDA-MB-231 negative per il recettore degli estrogeni l'inibizione differenziale della crescita dovuta all'esposizione ai tocotrienoli  $\alpha$ -,  $\gamma$ - e  $\delta$ - può portare a cambiamenti negli enzimi antiossidanti di fase II. La proliferazione cellulare e la clonogenicità in entrambe le linee cellulari è inibita dai tocotrienoli  $\gamma$ - e  $\delta$ - con debole influenza quando le cellule vengono esposte a  $\alpha$ -tocotrienolo, a dosi superiori a 10  $\mu$ M. L'espressione e l'attività di molti enzimi antiossidanti nelle cellule trattate con tocotrienolo a 10  $\mu$ M sono state determinate dal Western blot e saggi biochimici. Nelle cellule MDA-MB-231  $\delta$ - è più attivo che  $\alpha$ - o  $\gamma$ -tocotrienolo nella regolazione positiva della glutatione perossidasi; tuttavia, i tre tocotrienoli, nell'indurre la tioredoxina, hanno un'attività simile. Nelle cellule MCF-7 l'espressione della chinone reduttasi 2 e della tioredoxina sono aumentate dai tocotrienoli  $\gamma$ - e  $\delta$ -, mentre la chinone reduttasi 1 non è influenzata dall'esposizione ai tocotrienoli. I tocotrienoli in entrambe le cellule MCF-7 and MDA-MB-231 non influenzano né l'espressione né l'attività della superossido dismutasi, ma l'aumento dell'attività delle catalasi è concomitante alla riduzione dell'espressione delle catalasi. Nelle cellule MDA-MB-231 il trattamento con tocotrienoli porta ad un aumento dell'espressione di NRF2 associato alla diminuzione dei livelli di KEAP1. Nelle cellule MCF-7 non ci sono cambiamenti significativi nei livelli di NRF2 and KEAP1. Questi studi dimostrano che tocotrienoli diversi hanno un'attività distinta e selettiva nella regolazione di NRF2-KEAP1, che, nelle cellule cancerose mammarie, è coordinata all'espressione dei geni che modulano lo stress ossidativo e alla regolazione della proliferazione.

12: Jensen JD, Wing GJ, Dellavalle RP.

**Nutrition and melanoma prevention.**

ClinDermatol. 2010 Nov-Dec;28(6):644-9. PubMed PMID: 21034988.

Melanoma has continued to rise in incidence despite public efforts to promote sun protection behaviors. Because sunscreen use does not completely prevent skin cancer induced by ultraviolet radiation, additional chemopreventive methods for protecting against and reversing the effects of ultraviolet photodamage need evaluation. Recent years have brought increased interest in dietary factors, such as natural botanicals and vitamins, for the prevention of melanoma. This contribution provides a narrative review of the relevant, nutrition-related literature found by searching the keywords "melanoma chemoprevention," "nutrition and melanoma," "dietary botanicals and melanoma prevention," "green tea and melanoma," "vitamin D and melanoma," and "vitamin E and melanoma" in the PubMed database. Although randomized controlled trials of humans are lacking, basic science and epidemiologic studies show promising benefits of many natural products in chemoprevention for melanoma. Future studies, hopefully, will yield concrete answers and clarify the role of commonly available dietary nutrients in melanoma chemoprevention.

**Nutrizione e prevenzione del melanoma**

Nonostante gli sforzi pubblici per promuovere la protezione solare l'incidenza del melanoma è continuata a crescere. Siccome la protezione solare non previene completamente il cancro alla pelle indotto dalle radiazioni ultraviolette, sono stati valutati metodi preventivi per proteggere e per sovvertire gli effetti fotodannosi degli ultravioletti. Negli anni recenti per la prevenzione del melanoma anche la dieta ha assunto importanza con prodotti come le vitamine e gli elementi naturali. Questo contributo fornisce una review degli elementi della dieta rilevanti trovati cercando in Pubmed parole come "melanoma chemoprevention," "nutrition and melanoma," "dietary botanicals and melanoma prevention," "green tea and melanoma," "vitamin D and melanoma," and "vitamin E and melanoma". Sebbene mancano studi randomizzati la scienza di base e studi epidemiologici mostrano i benefici di molti prodotti naturali nella prevenzione del melanoma. Studi

futuri porteranno ad avere risposte concrete e chiare sul ruolo che i nutrienti comuni presenti nella dieta possano avere nella prevenzione del melanoma.

13: Torricelli P, Ricci P, Provenzano B, Lentini A, Tabolacci C.

**Synergic effect of  $\alpha$ -tocopherol and naringenin in transglutaminase-induced differentiation of human prostate cancer cells.**

Amino Acids. 2010 Oct 28. [Epub ahead of print]PubMed PMID: 20981458.

Prostate cancer is the second most common cancer in men worldwide. Its prevention and treatment remain a challenge to clinicians. Thus, there is an urgent need to discover novel, less toxic, and more effective therapies for patients. Many vitamins and related chemicals, including vitamin E, (tocopherols) have shown their anti-cancer activities as anti-oxidants, activators of transcription factors or factors influencing epigenetic events. Although laboratory tests including the use of animal models showed that this vitamin may have anticancer properties, whether it can effectively prevent the development and/or progression of prostate cancer in humans remains to be intensively studied. This review provides up-to-date information regarding the recent outcomes of laboratory, epidemiology and/or clinical trials on the effects of tocopherols on prostate cancer development, along with our last observations on a combined treatment of a prostate cancer cell line (PC-3) with two natural antineoplastic compounds, naringenin (NG) and  $\alpha$ -tocopherol ( $\alpha$ -TOC). We report the synergic effect of  $\alpha$ -TOC and NG in transglutaminase-induced differentiation of human PC-3 prostate cancer cells. While our results are based on one histological class of tumor, the most significant implication of this observation is that establishes a new way in the screening for detecting new differentiative antineoplastic agents

**Effetti sinergici di  $\alpha$ -tocoferolo e naringenina nella differenziazione indotta dalla transglutaminasi nelle cellule cancerose prostatiche**

Il cancro prostatico è il secondo tipo di cancro più comune al mondo. La prevenzione e il trattamento rimane una sfida per i clinici. C'è un bisogno urgente di scoprire nuove terapie meno tossiche e più efficaci. Molte vitamine e molecole affini, come la vitamina E, (tocoferolo) hanno mostrato la loro azione anti-tumorale come antiossidanti, attivatori dei fattori di trascrizione o dei

fattori che influenzano gli effetti epigenetici. Sebbene i test di laboratorio che includono l'uso di modelli animali mostrano che queste vitamine possono avere proprietà anti-tumorali, se possono effettivamente prevenire lo sviluppo e/o progressione del cancro prostatico è ancora oggetto di studio. Questa review fornisce informazioni aggiornate che riguardano i recenti traguardi dei trials di laboratorio, epidemiologici e/o clinici sugli effetti dei tocoferoli nello sviluppo del cancro prostatico, con le nostre ultime osservazioni su un trattamento combinato effettuato in una linea cellulare cancerosa prostatica (PC-3) con due composti naturali antineoplastici, la naringenina (NG) e l'  $\alpha$ -tocopherol ( $\alpha$ -TOC). Nelle cellule cancerose prostatiche PC-3 abbiamo osservato l'effetto sinergico di  $\alpha$ -TOC e NG nella differenziazione indotta dalla transglutaminasi. Mentre i nostri risultati si basano su una classe istologica, questa osservazione stabilisce un nuovo modo di agire nella selezione di agenti antineoplastici differenziativi.

14: Li J, Yu W, Tiwary R, Park SK, Xiong A, Sanders BG, Kline K.

**$\alpha$ -TEA-induced death receptor dependent apoptosis involves activation of acid sphingomyelinase and elevated ceramide-enriched cell surface membranes.**

Cancer Cell Int. 2010 Oct 25;10:40. PubMed PMID: 20974006; PubMed Central PMCID: PMC2976739.

**BACKGROUND:** Alpha-tocopherol ether-linked acetic acid ( $\alpha$ -TEA), an analog of vitamin E (RRR-alpha-tocopherol), is a potent and selective apoptosis-inducing agent for human cancer cells in vivo and in vitro.  $\alpha$ -TEA induces apoptosis via activation of extrinsic death receptors Fas (CD95) and DR5, JNK/p73/Noxa pathways, and suppression of anti-apoptotic mediators Akt, ERK, c-FLIP and survivin in breast, ovarian and prostate cancer cells.

**RESULTS:** In this study, we demonstrate that  $\alpha$ -TEA induces the accumulation of cell surface membrane ceramide, leading to co-localization with Fas, DR5, and FADD, followed by activation of caspases-8 and -9 and apoptosis in human MDA-MB-231 breast cancer cells.  $\alpha$ -TEA treatment leads to increased acid sphingomyelinase (ASMase) activity by 30 min, peaking at 4 hrs, which is correlated with ASMase translocation from cytosol to the cell surface membrane. Functional knockdown of ASMase with either the chemical inhibitor, desipramine, or siRNA markedly reduces  $\alpha$ -TEA-induced cell surface membrane accumulation of ceramide and its co-localization with Fas, DR5, and FADD, cleavage of caspases-8 and -9 and apoptosis, suggesting an early and critical role for ASMase in  $\alpha$ -TEA-induced apoptosis. Consistent with cell culture data, immunohistochemical analyses of tumor tissues taken from  $\alpha$ -TEA treated nude mice bearing MDA-MB-231 xenografts show increased levels of cell surface membrane ceramide in comparison to tumor tissues from control animals.

**CONCLUSION:** Taken together, these studies demonstrate that ASMase activation and membrane ceramide accumulation are early events contributing to  $\alpha$ -TEA-induced apoptosis in vitro and perhaps in vivo.

## **L'apoptosi dipendente dal recettore indotto da $\alpha$ -TEA coinvolge l'attivazione dell'acido sfingomielinasi e l'accumulo di ceramide sulle membrane di superficie cellulare.**

BACKGROUND: L'alfa-tocoferolo associato all'acido acetico ( $\alpha$ -TEA), un analogo della vitamina E (RRR-alpha-tocopherol), è un' agente potente e selettivo che induce l'apoptosi nelle cellule cancerose sia in vivo che in vitro. Nelle cellule cancerose prostatiche, ovarie e mammarie  $\alpha$ -TEA induce l'apoptosi tramite l'attivazione dei recettori estrinseci come Fas (CD95) e DR5, la via JNK/p73/Noxa e la soppressione dei mediatori anti-apoptotici Akt, ERK, c-FLIP e la survivina.

RISULTATI: In questo studio, abbiamo dimostrato che nelle cellule cancerose mammarie MDA-MB-231  $\alpha$ -TEA induce l'accumulo di ceramide sulla superficie cellulare di membrana, portando a una co-localizzazione con Fas, DR5, e FADD, seguita dall'attivazione delle caspasi 8 e 9 e da apoptosi. Il trattamento con  $\alpha$ -TEA porta a un aumento dell'attività dell'acido sfingomielinasi (ASMase) in 30 minuti, con un picco a 4 ore, che è correlato alla traslocazione ASMase dal citosol alla superficie di membrana. L'abbassamento funzionale di ASMase insieme all'inibitore chimico, la desipramina, o siRNA riduce l'accumulo di ceramide sulla superficie cellulare di membrana indotto da  $\alpha$ -TEA e la sua co-localizzazione con Fas, DR5, and FADD sfaldando le caspasi 8 e 9 e diminuendo l'apoptosi, questo suggerisce un ruolo di ASMase nell'apoptosi indotta da  $\alpha$ -TEA. Analisi immunostochimiche dei tessuti tumorali eseguite in topi nudi trattati con  $\alpha$ -TEA che erano stati trapiantati con MDA-MB-231 ha mostrato un aumento nei livelli di ceramide sulla superficie cellulare di membrana se confrontati ai tessuti tumorali degli animali di controllo.

CONCLUSIONI: Questi studi dimostrano che l'attivazione di ASMase e l'accumulo di ceramide di membrana contribuiscono in vitro all'apoptosi indotta da  $\alpha$ -TEA e forse anche in vivo.

16: Behery FA, Elnagar AY, Akl MR, Wali VB, Abuasal B, Kaddoumi A, Sylvester PW, El Sayed KA.

## **Redox-silent tocotrienol esters as breast cancer proliferation and migration inhibitors.**

Bioorg Med Chem. 2010 Nov 15;18(22):8066-75. Epub 2010 Sep 19. PubMed PMID: 20943398.

Tocotrienols are vitamin E members with potent antiproliferative activity against preneoplastic and neoplastic mammary epithelial cells with little or no effect on normal cell growth or functions. However, physicochemical and pharmacokinetic properties greatly limit their use as therapeutic agents. Tocotrienols' chemical instability, poor water solubility, NPC1L1-mediated transport, and rapid metabolism are examples of such obstacles which hinder the therapeutic use of these valuable natural products. Vitamin E esters like  $\alpha$ -tocopheryl succinate were prepared to significantly improve chemical and metabolic stability, water solubility, and potency. Thus, 12 semisynthetic tocotrienol ester analogues 4-15 were prepared by direct esterification of natural tocotrienol isomers with various acid anhydrides or chlorides. Esters 4-15 were evaluated for their ability to inhibit the proliferation and migration of the mammary tumor cells +SA and MDA-MB-231, respectively. Esters 5, 9, and 11 effectively inhibited the proliferation of the highly metastatic +SA rodent mammary epithelial cells with IC(50) values of 0.62, 0.51, and 0.86 $\mu$ M, respectively, at doses that had no effect on immortalized normal mouse CL-S1 mammary epithelial cells. Esters 4, 6, 8-10, and 13 inhibited 50% of the migration of the human metastatic MDA-MB-231 breast cancer cells at a single 5 $\mu$ M dose in wound-healing assay. The most active ester 9 was 1000-fold more water-soluble and chemically stable versus its parent  $\alpha$ -tocotrienol (1). These findings strongly suggest that redox-silent tocotrienol esters may provide superior therapeutic forms of tocotrienols for the control of metastatic breast cancer.

## **Esteri riducenti del tocotrienolo come inibitori della migrazione e proliferazione nel cancro al seno.**

I tocotrienoli sono membri della famiglia della vitamina E con una potente attività antiproliferativa verso le cellule epiteliali mammarie neoplastiche e con pochi effetti sulla crescita delle cellule normali. Tuttavia, le loro proprietà psicochimiche e farmacocinetiche ne limitano l'uso come agenti terapeutici. L'instabilità chimica dei tocotrienoli, la solubilità limitata in acqua, il trasporto mediato da NPC1L1 e il metabolismo rapido sono esempi degli ostacoli che si possono incontrare nell'uso di questi prodotti naturali. Gli esteri della vitamina E come  $\alpha$ -tocopheryl succinate vengono sottoposti a prove di stabilità chimiche e metaboliche, di solubilità e di potenza. 12 analoghi 4-15 agli esteri tocotrienoli semisintetici sono stati preparati tramite l'esterificazione diretta di isomeri tocotrienoli naturali con diversi acidi anidridici o cloridrici. Gli esteri 4-15 sono stati valutati per la loro abilità di inibire la proliferazione e la migrazione delle cellule tumorali mammarie +SA e MDA-MB-231, rispettivamente. Gli esteri 5, 9, e 11 inibiscono la proliferazione di cellule epiteliali mammarie metastatiche +SA con IC(50) a valori di 62, 0.51, and 0.86 $\mu$ M, rispettivamente, a dosi che non hanno effetto sulle cellule epiteliali mammarie immortalizzate di topoCL-S1. Gli esteri 4, 6, 8-10, and 13 inibiscono al 50% la migrazione delle cellule cancerose mammarie metastatiche MDA-MB-231 a una dose di 5 $\mu$ M. L'estere 9 è il più attivo, è 1000 volte più solubile in acqua e chimicamente stabile in confronto all'  $\alpha$ -tocotrienolo (1). Queste scoperte suggeriscono che gli esteri riducenti del tocotrienolo possono fornire una terapia per il controllo del cancro mammario metastatico.

18: Kottschade LA, Sloan JA, Mazurczak MA, Johnson DB, Murphy BP, Rowland KM, Smith DA, Berg AR, Stella PJ, Loprinzi CL.

**The use of vitamin E for the prevention of chemotherapy-induced peripheral neuropathy: results of a randomized phase III clinical trial.**

Support Care Cancer. 2010 Oct 9. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 20936417.

**BACKGROUND:** Chemotherapy-induced peripheral neuropathy (CIPN) continues to be a substantial problem for many cancer patients. Pursuant to promising appearing pilot data, the current study evaluated the use of vitamin E for the prevention of CIPN.

**METHODS:** A phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled study was conducted in patients undergoing therapy with neurotoxic chemotherapy, utilizing twice daily dosing of vitamin E (400 mg)/placebo. The primary endpoint was the incidence of grade 2+ sensory neuropathy (SN) toxicity (CTCAE v 3.0) in each treatment arm, analyzed by chi-square testing. Planned sample size was 100 patients per arm to provide 80% power to detect a difference in incidence of grade 2+ SN toxicity from 25% in the placebo group to 10% in the vitamin E group.

**RESULTS:** Two-hundred seven patients were enrolled between December 1, 2006 and December 14, 2007, producing 189 evaluable cases for analysis. Cytotoxic agents included taxanes (109), cisplatin (8), carboplatin (2), oxaliplatin (50), or combination (20). There was no difference in the incidence of grade 2+ SN between the two arms (34%-vitamin E, 29%-placebo; P=0.43). There were no significant differences between treatment arms for time to onset of neuropathy (P=0.58), for chemotherapy dose reductions due to neuropathy (P=0.21), or for secondary endpoints derived from patient-reported neuropathy symptom assessments. The treatment was well tolerated overall.

**CONCLUSIONS:** Vitamin E did not appear to reduce the incidence of sensory neuropathy in the studied group of patients receiving neurotoxic chemotherapy.

### **L'uso della vitamina E nella prevenzione della neuropatia periferica indotta dalla chemioterapia: risultati di uno studio clinico randomizzato di fase III.**

**BACKGROUND:** La neuropatia periferica indotta dalla chemioterapia (CIPN) continua ad essere un problema sostanziale per molti pazienti malati di tumore. Questo studio valuta l'uso della vitamina E per la prevenzione di CIPN.

**METODI:** Uno studio di fase III, randomizzato, in doppio-cieco, placebo-controllo è stato condotto in pazienti in fase di chemioterapia neurotossica, utilizzando 2 volte al giorno vitamina E (400 mg)/placebo. L'obiettivo primario era valutare l'incidenza della tossicità neuropatica sensoriale di grado 2+ in ogni trattamento, analizzandola tramite il test del chi-quadro. La dimensione del campione era di 100 pazienti per gruppo e veniva valutata la differenza nell'incidenza della tossicità di grado 2+ SN dal 25% nel gruppo placebo al 10% nel gruppo della vitamina E.

**RISULTATI:** Tra il 1 dicembre 2006 e il 14 dicembre 2007, 207 pazienti sono stati arruolati, di cui 189 casi erano valutabili. Gli agenti citotossici includono taxani(109), cisplatino (8), carboplatino (2), oxaliplatino (50), o combinazioni (20). Non ci sono differenze nell'incidenza del grado 2+ SN tra i due gruppi (34%-vitamin E, 29%-placebo;  $P=0.43$ ). Non ci sono differenze significative tra i due trattamenti nel periodo di inizio della neuropatia ( $P=0.58$ ), nella riduzione delle dosi chemioterapiche dovute alla neuropatia ( $P=0.21$ ), o negli obiettivi secondari derivati dalle valutazioni dei sintomi neuropatia riportati dai pazienti. Il trattamento è ben tollerato da tutti.

**CONCLUSIONI:** Nel gruppo dei pazienti che ricevono la chemioterapia neurotossica la vitamina E non sembra ridurre l'incidenza della neuropatia.

19: Dunn BK, Richmond ES, Minasian LM, Ryan AM, Ford LG.

### **A nutrient approach to prostate cancer prevention: The Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT).**

Nutr Cancer. 2010 Oct;62(7):896-918. PubMed PMID: 20924966.

The Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT) randomized 35,533 healthy men, >55 yr old (>50 yr if African American), with normal digital rectal exams and prostate specific antigens <4 ng/ml to 1) 200 µg/day l-selenomethionine, 2) 400 IU/day all-rac-alpha-tocopheryl acetate (vitamin E), 3) both supplements, or 4) placebo for 7 to 12 yr. The hypotheses underlying SELECT, that selenium and vitamin E individually and together decrease prostate cancer incidence, derived from epidemiologic and laboratory evidence and significant secondary endpoints in the Nutritional Prevention of Cancer (selenium) and Alpha-Tocopherol Beta-Carotene (vitamin E) trials. In SELECT, prostate cancer incidence did not differ among the 4 arms: hazard ratios [99% confidence intervals (CIs)] for prostate cancer were 1.13 (99% CI = 0.95-1.35,  $P = 0.06$ ;  $n = 473$ ) for vitamin E, 1.04 (99% CI = 0.87-1.24,  $P = 0.62$ ;  $n = 432$ ) for selenium, and 1.05 (99% CI = 0.88-1.25,  $P = 0.52$ ;  $n = 437$ ) for selenium + vitamin E vs. 1.00 ( $n = 416$ ) for placebo. Statistically nonsignificant increased risks of prostate cancer with vitamin E alone [relative risk (RR) = 1.13,  $P = 0.06$ ] and newly diagnosed Type 2 diabetes mellitus with selenium alone (RR = 1.07,  $P = 0.16$ ) were observed. SELECT data show that neither selenium nor vitamin E, alone or together, in the doses and formulations used, prevented prostate cancer in this heterogeneous population of healthy men.

### **Un approccio alla prevenzione del cancro prostatico: il Trial di Selenio e di Vitamina E per la prevenzione del cancro (SELECT).**

Lo studio randomizzato per la prevenzione del cancro con selenio e vitamina E (SELECT) prevedeva la partecipazione di 35.533 uomini sani, con un'età >55 anni (>50 yr if African American), con esami rettali e antigeni prostatici specifici con valori normali <4 ng/ml a cui sono stati somministrati: 1) 200 µg/day l-selenometionina, 2) 400 IU/day all-rac-alfa-tocoferil acetato (vitamin E), 3) entrambi o 4) placebo per 7-12 giorni. Le ipotesi che il selenio e la vitamina E diminuiscano l'incidenza del cancro prostatico deriva da evidenze epidemiologiche e di laboratorio. In SELECT, l'incidenza del cancro prostatico non differisce tra i 4 gruppi: la percentuale del cancro prostatico era di 1.13 (99% CI = 0.95-1.35, P = 0.06; n = 473) per la vitamina E, 1.04 (99% CI = 0.87-1.24, P = 0.62; n = 432) per il selenio, e di 1.05 (99% CI = 0.88-1.25, P = 0.52; n = 437) per selenio + vitamina E vs. 1.00 (n = 416) per placebo. Statisticamente non è stato osservato un incremento del rischio significativo di cancro prostatico somministrando la vitamina E da sola [relative risk (RR) = 1.13, P = 0.06 con la sola vitamina E [relative risk (RR) = 1.13, P = 0.06] e somministrando il selenio da solo (RR = 1.07, P = 0.16) sono stati diagnosticati nuovi casi di diabete mellito di tipo 2. Questi dati mostrano che in questa popolazione eterogenea di uomini sani né il selenio né la vitamina E, da soli o insieme, prevengono il cancro prostatico nelle dosi e nella formula usati.

20. Yu W, Tiwary R, Li J, Park SK, Jia L, Xiong A, Simmons-Menchaca M, Sanders BG, Kline K.

**$\alpha$ -TEA induces apoptosis of human breast cancer cells via activation of TRAIL/DR5 death receptor pathway.**

Mol Carcinog. 2010 Nov;49(11):964-73.

Vitamin E derivative RRR- $\alpha$ -tocopherol ether-linked acetic acid analog ( $\alpha$ -TEA) induces apoptosis in MCF-7 and HCC-1954 human breast cancer cells in a dose- and time-dependent manner.  $\alpha$ -TEA induces increased levels of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and death receptor-5 (DR5) and decreased levels of antiapoptotic factor, cellular FLICE-like inhibitory protein (c-FLIP L). DR5/TRAIL induced apoptosis involves downregulation of c-FLIP (L), caspase-8 activation, activated proapoptotic mediators tBid and Bax, mitochondrial permeability transition, and activation of caspase-9. siRNA knockdown of either DR5 or TRAIL blocks the ability of  $\alpha$ -TEA to enhance DR5 protein levels, downregulate c-FLIP(L) protein levels and induce apoptosis. Combination of  $\alpha$ -TEA+TRAIL acts cooperatively to induce apoptosis, and increase DR5 and decrease c-FLIP (L) protein levels. siRNA knockdown of c-FLIP produces a low level of spontaneous apoptosis and enhances  $\alpha$ -TEA- and TRAIL-induced apoptosis. Taken together, these studies show that  $\alpha$ -TEA induces TRAIL/DR5 mitochondria-dependent apoptosis in human breast cancer cells, and that TRAIL/DR5-dependent increases in DR5 and decreases in c-FLIP expression are triggered by TRAIL or  $\alpha$ -TEA treatments.

**$\alpha$ -TEA induce l'apoptosi di cellule umane di cancro al seno attraverso l'attivazione della via dei recettori della morte TRAIL/DR5.**

L'RRR- $\alpha$ -tocoferolo derivato della vitamina E e l'analogo correlato etere acido acetico ( $\alpha$ -TEA) inducono l'apoptosi nelle cellule MCF-7 e nelle HCC-1954 cellule umane di cancro al seno in modo dose-tempo-dipendente.  $\alpha$ -TEA induce un aumento dei livelli del fattore di necrosi tumorale-correlato che inducono apoptosi ligando-recettore (TRAIL) e la morte (DR5) e diminuiti livelli di fattore antiapoptotici cellulari proteina FLICE-come inibitorio (c-FLIP L). Apoptosi indotta DR5/TRAIL comporta una bassa regolazione di c-FLIP (L), l'attivazione di caspasi-8, che attiva i mediatori proapoptotici tBid e Bax, transizione di permeabilità mitocondriale e l'attivazione della caspasi-9. colpo di siRNA o DR5 o blocchi TRAIL la capacità di  $\alpha$ -TEA di innalzare i livelli della proteina DR5, downregulate c-FLIP (L) livelli di proteine e di indurre apoptosi. La combinazione di  $\alpha$ -TEA + TRAIL atti cooperativo di indurre l'apoptosi, e DR5 aumentare e diminuire di c-FLIP (L) livelli di proteine. siRNA colpo di c-FLIP produce un basso livello di apoptosi spontanea e migliora  $\alpha$ -TEA-e-apoptosi indotta da TRAIL. Presi insieme, questi studi dimostrano che  $\alpha$ -TEA induce l'apoptosi TRAIL/DR5 mitocondri-dipendente in cellule umane di cancro al seno, e che aumenta in TRAIL/DR5-dependent DR5 e diminuisce in espressione di c-FLIP sono innescati da TRAIL o trattamenti  $\alpha$ -TEA .

22: Satapathy SK, Sanyal AJ.

### **Novel treatment modalities for nonalcoholic steatohepatitis.**

Trends Endocrinol Metab. 2010 Nov;21(11):668-75.

Division of Gastroenterology, Long Island Jewish Medical Center, North Shore University-Long Island Jewish Health System, 270-05 76th Avenue, New Hyde Park, NY 11040, USA. Nonalcoholic steatohepatitis (NASH) is the most common cause of chronic liver disease in the Western world. It can lead to cirrhosis and hepatocellular cancer, and is independently associated with an increased risk of death due to cardiovascular and liver diseases. Over the past 5 years, numerous advances in understanding its pathogenesis have been made, providing a rationale for translation of this information into clinical trials. Although the optimum therapy is still awaited, there is strong evidence to support the use of vitamin E in selected subjects. Many other potential therapeutic options are now available. In this paper, we review the status of both current and emerging therapeutic strategies for patients with NASH.

### **Nuove modalità di trattamento per la steatoepatite non alcolica.**

Trends Endocrinol Metab. 2010 Nov;21(11):668-75.

La steatoepatite non alcolica (NASH) è la più comune causa di malattia cronica del fegato nel mondo occidentale. Può portare a cirrosi e cancro epatico, ed è indipendentemente associata ad un aumentato rischio di morte per malattie cardiovascolari e del fegato. Negli ultimi 5 anni, sono stati fatti numerosi progressi nel comprendere la patogenesi e fornire una giustificazione per la traduzione di tali informazioni in studi clinici. Anche se la terapia ottimale è ancora in attesa, ci

sono forti evidenze per sostenere l'uso della vitamina E in soggetti selezionati. Molte altre opzioni e potenzialità terapeutiche sono ora disponibili. In questo lavoro, si vuole verificare lo stato di entrambe le strategie terapeutiche attuali ed emergenti per pazienti affetti da NASH.

23: Kunnumakkara AB, Sung B, Ravindran J, Diagaradjane P, Deorukhkar A, Dey S, Koca C, Yadav VR, Tong Z, Gelovani JG, Guha S, Krishnan S, Aggarwal BB.

**{Gamma}-tocotrienol inhibits pancreatic tumors and sensitizes them to gemcitabine treatment by modulating the inflammatory microenvironment.**

Cancer Res. 2010 Nov1;70(21):8695-705.

Pancreatic cancers generally respond poorly to chemotherapy, prompting a need to identify agents that could sensitize tumors to treatment. In this study, we investigated the response of human pancreatic cells to  $\gamma$ -tocotrienol ( $\gamma$ -T3), a novel, unsaturated form of vitamin E found in palm oil and rice bran oil, to determine whether it could potentiate the effects of gemcitabine, a standard of care in clinical treatment of pancreatic cancer.  $\gamma$ -T3 inhibited the in vitro proliferation of pancreatic cancer cell lines with variable p53 status and potentiated gemcitabine-induced apoptosis. These effects correlated with an inhibition of NF- $\kappa$ B activation by  $\gamma$ -T3 and a suppression of key cellular regulators including cyclin D1, c-Myc, cyclooxygenase-2 (COX-2), Bcl-2, cellular inhibitor of apoptosis protein, survivin, vascular endothelial growth factor (VEGF), ICAM-1, and CXCR4. In an orthotopic nude mouse model of human pancreatic cancer, p.o. administration of  $\gamma$ -T3 inhibited tumor growth and enhanced the antitumor properties of gemcitabine. Immunohistochemical analysis indicated a correlation between tumor growth inhibition and reduced expression of Ki-67, COX-2, matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), NF- $\kappa$ B p65, and VEGF in the tissue. Combination treatment also downregulated NF- $\kappa$ B activity along with the NF- $\kappa$ B-regulated gene products, such as cyclin D1, c-Myc, VEGF, MMP-9, and CXCR4. Consistent with an enhancement of tumor apoptosis, caspase activation was observed in tumor tissues. Overall, our findings suggest that  $\gamma$ -T3

can inhibit the growth of human pancreatic tumors and sensitize them to gemcitabine by suppressing NF- $\kappa$ B-mediated inflammatory pathways linked to tumorigenesis.

### **Il Gamma-tocotrienolo inibisce i tumori del pancreas e li sensibilizza al trattamento con gemcitabina modulando il microambiente infiammatorio.**

Cancer Res. 2010 Nov1;70(21):8695-705.

I tumori pancreatici generalmente rispondono poco alla chemioterapia, questo spinge la necessità di identificare gli agenti che potrebbero sensibilizzare i tumori al trattamento. In questo studio, abbiamo studiato la risposta delle cellule pancreatiche per  $\gamma$ -tocotrienolo ( $\gamma$ -T3), una forma di vitamina E che si trova nell'olio di palma e olio di crusca di riso, per determinare se possa potenziare gli effetti della gemcitabina, uno standard di cura nel trattamento clinico di cancro al pancreas. Il  $\gamma$ -T3 inibisce la proliferazione in vitro di linee di cellule di cancro al pancreas con lo status di p53 variabile e potenziato gemcitabina apoptosi indotta. Questi effetti sono correlati con l'inibizione di attivazione di NF- $\kappa$ B da  $\gamma$ -T3 e la soppressione di importanti regolatori cellulari compresi ciclina D1, c-Myc, cicloossigenasi-2 (COX-2), Bcl-2, inibitore della proteina cellulare di apoptosi, survivin, fattore di crescita vascolare endoteliale (VEGF), ICAM-1, e CXCR4. In topi nudi sono stati somministrati per bocca del  $\gamma$ -T3 tale terapia ha inibito la crescita tumorale e valorizzato le proprietà antitumorali di gemcitabina.

L'analisi immunoistochimica ha indicato una correlazione tra l'inibizione della crescita tumorale e la ridotta espressione di Ki-67, COX-2, matrix metalloproteinasi-9 (MMP-9), NF- $\kappa$ B p65, e VEGF nei tessuti. E' stato effettuata una combinazione di trattamento anche con i prodotti del gene NF- $\kappa$ B-regolamentati, come la ciclina D1, c-Myc, VEGF, MMP-9 e CXCR4. Coerentemente con un aumento di apoptosi tumorale, l'attivazione delle caspasi è stato osservato nei tessuti tumorali. Nel complesso, i nostri risultati suggeriscono che  $\gamma$ -T3 possono inibire la crescita dei tumori pancreatici umani e sensibilizzarli alla gemcitabina sopprimendo percorsi infiammatori NF- $\kappa$ B mediata legato alla tumorigenesi.

26: Sylvester PW, Kaddoumi A, Nazzal S, El Sayed KA.  
J Am Coll Nutr. 2010 Jun;29(3 Suppl):324S-333S.

### **The value of tocotrienols in the prevention and treatment of cancer.**

Tocopherols and tocotrienols represent the 2 subgroups that make up the vitamin E family of compounds, but only tocotrienols display potent anticancer activity. Although in vitro experimental evidence has been very promising, oral supplementation of tocotrienols in animal and human studies has produced inconsistent results. However, recent studies have now clarified the reasons for these discrepancies observed between in vitro and in vivo studies. Oral absorption of tocotrienols into the circulation is mediated in large part by carrier transporter systems that display saturation and apparently down-regulation when exposed to high concentrations of tocotrienols. To circumvent these limitations in oral absorption of tocotrienols, investigators have developed novel prodrug derivatives and nanoparticle delivery systems that greatly enhance tocotrienol bioavailability and therapeutic responsiveness. Additional studies have also demonstrated that combined treatment of tocotrienols with other traditional chemotherapeutic agents results in a synergistic anticancer response, and this synergistic response was further enhanced when these agents were encapsulated in a nanoparticle delivery system. Taken together, these findings clarify the limitations of oral tocotrienol administration and provide novel alternative drug-delivery systems that circumvent these limitations and greatly enhance the therapeutic effectiveness of tocotrienols in the prevention and treatment of cancer.

### **Il valore di tocotrienoli nella prevenzione e nel trattamento del cancro.**

J Am Coll Nutr. 2010 Jun;29(3Suppl):324S-333S.

I tocoferoli e tocotrienoli rappresentano i 2 sottogruppi che compongono la famiglia di composti di vitamina E, ma solo per i tocotrienoli è stata visualizzata una potente attività antitumorale. Anche se nella prova sperimentale in vitro è stata molto promettente, la supplementazione orale di tocotrienoli in studi su animali e umani ha prodotto risultati inconsistenti. Tuttavia, studi recenti hanno chiarito le ragioni di tali discrepanze osservate tra dati in vitro e in vivo. L'assorbimento orale dei tocotrienoli nella circolazione è mediato in larga parte da sistemi di carrier trasportatori che visualizzano la saturazione e apparentemente sotto regolano quando esposti ad alte concentrazioni di tocotrienoli. Per aggirare queste limitazioni di assorbimento orale di tocotrienoli, i ricercatori hanno sviluppato nuovi derivati profarmaco e sistemi di consegna di nanoparticelle che valorizzano la biodisponibilità di tocotrienolo e la risposta terapeutica. Ulteriori studi hanno inoltre dimostrato che il trattamento combinato di tocotrienoli con altri agenti chemioterapici tradizionali risultati in una risposta antitumorale sinergica, e questa risposta sinergica è stata ulteriormente rafforzata quando questi farmaci sono stati incapsulati in un sistema di consegna delle nanoparticelle. Presi insieme, questi risultati chiariscono i limiti della somministrazione orale di tocotrienolo e forniscono nuovi sistemi alternativi di somministrazione dei farmaci che aggirano queste limitazioni e migliorano notevolmente l'efficacia terapeutica di tocotrienoli nella prevenzione e nel trattamento del cancro.

30: Park Y, Spiegelman D, Hunter DJ, Albanes D, Bergkvist L, Buring JE, Freudenheim JL, Giovannucci E, Goldbohm RA, Harnack L, Kato I, Krogh V, Leitzmann MF, Limburg PJ, Marshall JR, McCullough ML, Miller AB, Rohan TE, Schatzkin A, Shore R, Sieri S, Stampfer MJ, Virtamo J, Weijenberg M, Willett WC, Wolk A, Zhang SM, Smith-Warner SA.

**Intakes of vitamins A, C, and E and use of multiple vitamin supplements and risk of colon cancer: a pooled analysis of prospective cohort studies.**

Clin Trials. 2010;7(6):744-8.

**OBJECTIVE:** To evaluate the associations between intakes of vitamins A, C, and E and risk of colon cancer.

**METHODS:** Using the primary data from 13 cohort studies, we estimated study- and sex-specific relative risks (RR) with Cox proportional hazards models and subsequently pooled RRs using a random effects model.

**RESULTS:** Among 676,141 men and women, 5,454 colon cancer cases were identified (7-20 years of follow-up across studies). Vitamin A, C, and E intakes from food only were not associated with colon cancer risk. For intakes from food and supplements (total), the pooled multivariate RRs (95% CI) were 0.88 (0.76-1.02, >4,000 vs. ≤ 1,000 µg/day) for vitamin A, 0.81 (0.71-0.92, >600 vs. ≤ 100 mg/day) for vitamin C, and 0.78 (0.66-0.92, > 200 vs. ≤ 6 mg/day) for vitamin E. Adjustment for total folate intake attenuated these associations, but the inverse associations with vitamins C and E remained significant. Multivitamin use was significantly inversely associated with colon cancer risk (RR = 0.88, 95% CI: 0.81-0.96).

**CONCLUSIONS:** Modest inverse associations with vitamin C and E intakes may be due to high correlations with folate intake, which had a similar inverse association with colon cancer. An inverse association with multivitamin use, a major source of folate and other vitamins, deserves further study.

**L'apporto di vitamine A, C ed E, l'uso di integratori vitaminici e il rischio di tumore del colon: una analisi di studi prospettici di coorte.**

Clin Trials. 2010;7(6):744-8.

**OBIETTIVO:** Per valutare l'associazione tra assunzione di vitamine A, C ed E e rischio di tumore del colon.

**METODI:** Usando i dati primari da 13 studi di coorte, abbiamo stimato studio e relativi rischi specifici per sesso (RR) con modelli di rischio proporzionale di Cox e successivamente messe in comune con un modello a effetti casuali.

**RISULTATI:** Tra i 676.141 uomini e donne, 5.454 casi di tumore del colon sono state identificate (7-20 anni di follow-up tra gli studi). Assunzione di vitamine A, C ed E dal cibo solo non sono stati associati a rischio di cancro del colon. Per le assunzioni da alimenti e integratori (totale), il RR multivariato pool (95% CI) sono stati 0,88 (0,76-1,02, > 4.000 vs  $\leq$  1.000 mg / die) per la vitamina A, 0,81 (0,71-0,92, > 600 vs  $\leq$  100 mg / die) per la vitamina C, e 0,78 (0,66-0,92, > 200 vs  $\leq$  6 mg / die) per la vitamina E. L' adeguamento per assunzione di folato totale attenua queste associazioni, ma le associazioni inverse con le vitamine C ed E sono rimaste significative. L'uso multivitaminico

era significativamente e inversamente associato al rischio di cancro del colon (RR = 0,88, 95% CI: 0,81-0,96).

**CONCLUSIONI:** Possono essere evidenziate modeste associazioni inverse con vitamina C ed E a causa di elevate correlazioni con assunzione di folato, che ha una associazione inversa simile con il cancro del colon. Un'associazione inversa con l'utilizzo multivitaminici, una grande fonte di folato e di altre vitamine, merita ulteriori approfondimenti.

33: Kannappan R, Ravindran J, Prasad S, Sung B, Yadav VR, Reuter S, Chaturvedi MM, Aggarwal BB.

**Gamma-tocotrienol promotes TRAIL-induced apoptosis through reactive oxygen species/extracellular signal-regulated kinase/p53-mediated upregulation of death receptors.**

J Biol Chem. 2010 Oct 22;285(43):33520-8.

Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), a member of the tumor necrosis factor superfamily, is in clinical trials for cancer therapy, but its anticancer potential is limited by the development of resistance. We investigated the ability of tocotrienol (T3), an unsaturated vitamin E present in palm oil, rice bran, barley, oats, and wheat germ, to sensitize tumor cells to TRAIL. Results from esterase staining, colony formation, caspase activation, and sub-G(1) cell cycle arrest revealed that gamma-T3 can sensitize human colon cancer cells to TRAIL. When examined for the mechanism, we found that gamma-T3 significantly downregulated the expression of antiapoptotic proteins (c-IAP2 and Bcl-xL). We also found that gamma-T3, but not tocopherol, induced the expression of the TRAIL receptors death receptor (DR)-4 and DR5. This induction was not cell type specific, as upregulation was also found in pancreatic, kidney, and leukemic cells. Upregulation of DRs by gamma-T3 required the production of reactive oxygen species (ROS), and sequestering of ROS abolished both upregulation of the receptors and potentiation of TRAIL-induced apoptosis. Induction of DRs by gamma-T3 also required activation of extracellular signal-regulated kinase 1 (ERK1), as silencing of ERK1 by specific siRNA abrogated the upregulation of TRAIL receptors. Further, induction of DRs by gamma-T3 required the expression of p53 and Bax, as no induction of the receptors was found in colon cancer cells with deletion of these genes.

Overall, our results show that gamma-T3 sensitizes tumor cells to TRAIL by upregulating DRs through the ROS/ERK/p53 pathway and by downregulating cell survival proteins.

**Gamma tocotrienolo promuove apoptosi indotta da TRAIL attraverso up-regolazione mediata da p53/chinase regolate da segnali extracellulari/specie reattive dell'ossigeno dei recettori di morte**

J Biol Chem. 2010 Oct 22;285(43):33520-8.

Il legante che induce l'apoptosi correlato al fattore di necrosi del tumore (TRAIL), è in test clinici per la terapia del cancro, ma il suo potenziale antitumorale è limitato dallo sviluppo di resistenza.

Abbiamo studiato la capacità di tocotrienolo (T3), vitamina E presenti in olio di palma, crusca di riso, orzo, avena e germe di grano, per sensibilizzare le cellule tumorali a TRAIL. I risultati dopo colorazione, la formazione di colonie, l'attivazione delle caspasi, e sub-G (1) e l'arresto del ciclo cellulare hanno rivelato che gamma-T3 può sensibilizzare cellule umane di cancro del colon a TRAIL. Dopo essere state esaminate per il meccanismo, abbiamo scoperto che gamma-T3 hanno significativamente inibito l'espressione delle proteine antiapoptotiche (c-IAP2 e Bcl-XL). Abbiamo anche trovato che la gamma-T3, ma non tocoferolo, ha indotto l'espressione del recettore TRAIL e la morte dei recettori (DR) -4 e DR5. Questa induzione non è cellulo-specifica, ma la sua sovraespressione è stata trovata anche nel pancreas, reni, e nelle cellule leucemiche. La sovraespressione di DRs da gamma-T3 richiede la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), e il sequestro di ROS abolisce sovraregolazione dei recettori e il potenziamento di TRAIL-indotta. Induzione di DRs da Gamma-T3 richiede anche l'attivazione di chinasi extracellulare segnale-regolato 1 (ERK1), come il silenziamento di ERK1 da parte di siRNA specifici che annullano la sovra regolazione dei recettori di TRAIL.

Inoltre, l'induzione di DRs da gamma-T3 richiede l'espressione di p53 e Bax, induzione dei recettori è stato trovato in cellule di cancro del colon con la soppressione di questi geni. Nel complesso, i nostri risultati mostrano che gamma-T3 sensibilizza le cellule tumorali a TRAIL da sovra regolazione di DRs attraverso la via ROS/ERK/p53 e attraverso una bassa-regolazione di proteine della sopravvivenza cellulare.

34: Yang CS, Lu G, Ju J, Li GX

**Inhibition of inflammation and carcinogenesis in the lung and colon by tocopherols.**

Ann N Y Acad Sci. 2010 Aug;1203:29-34.

Tocopherols, which exist in alpha, beta, gamma, and delta forms, are antioxidative nutrients also known as vitamin E. Although alpha-tocopherol (alpha-T) is the major form of vitamin E found in the blood and tissues, gamma- and delta-T have been suggested to have stronger anti-inflammatory activities. In the present study, using a tocopherol mixture that is rich in gamma-T (gamma-TmT, which contains 57%gamma-T), we demonstrated the inhibition of inflammation as well as of cancer formation and growth in the lung and colon in animal models. When given in the diet at 0.3%, gamma-TmT inhibited chemically induced lung tumorigenesis in the A/J mice as well as the growth of human lung cancer cell H1299 xenograft tumors. gamma-TmT also decreased the levels of 8-hydroxydeoxyguanosine, gamma-H2AX, and nitrotyrosine in tumors. More evident anti-inflammatory and cancer preventive activities of dietary gamma-TmT were demonstrated in mice treated with azoxymethane and dextran sulfate sodium. These results demonstrate the antioxidative, anti-inflammatory, and anticarcinogenic activities of tocopherols.

**L'inibizione dell'infiammazione e nella carcinogenesi del polmone e del colon da tocoferoli**

Ann N Y Acad Sci. 2010 Aug;1203:29-34.

Forme di tocoferoli, che esistono in alfa, beta, gamma e delta, sono nutrienti antiossidanti, noti anche come vitamina E. Anche se l'alfa-tocoferolo (alfa-T) è la forma principale della vitamina E

nel sangue e nei tessuti, gamma-e delta-T sono state suggerite per avere più forte attività anti-infiammatoria. Nel presente studio, utilizzando una miscela di tocoferolo che è ricco di gamma-T (gamma-TMT, che contiene il 57% di gamma-T), abbiamo dimostrato l'inibizione di infiammazione così come della formazione e della crescita del cancro del polmone e del colon in modelli animali. Quando somministrato con il cibo al 0,3%, gamma-TMT inibito indotto chimicamente tumorigenesi polmone in A / J topi così come la crescita di tumori umani del polmone H1299 xenotrapianto di cellule di cancro. gamma-TMT ha anche diminuito i livelli di 8-hydroxydeoxyguanosine, gamma-H2AX, nitrotirosina e nei tumori. Più evidente attività anti-infiammatorie e di prevenzione del cancro nella dieta con gamma-TMT sono stati dimostrati in topi trattati con sodio azoxymethane e destrano solfato. Questi risultati dimostrano l'attività antiossidante, anti-infiammatori, e anticancerogeno di tocoferoli.

39: Aggarwal BB, Sundaram C, Prasad S, Kannappan R.

**Tocotrienols, the vitamin E of the 21st century: its potential against cancer and other chronic diseases.**

Biochem Pharmacol. 2010 Dec 1;80(11):1613-31.

Initially discovered in 1938 as a "fertility factor," vitamin E now refers to eight different isoforms that belong to two categories, four saturated analogues ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , and  $\delta$ ) called tocopherols and four unsaturated analogues referred to as tocotrienols. While the tocopherols have been investigated extensively, little is known about the tocotrienols. Very limited studies suggest that both the molecular and therapeutic targets of the tocotrienols are distinct from those of the tocopherols. For instance, suppression of inflammatory transcription factor NF- $\kappa$ B, which is closely linked to tumorigenesis and inhibition of HMG-CoA reductase, mammalian DNA polymerases and certain protein tyrosine kinases, is unique to the tocotrienols. This review examines in detail the molecular targets of the tocotrienols and their roles in cancer, bone resorption, diabetes, and cardiovascular and neurological diseases at both preclinical and clinical levels. As disappointment with the therapeutic value of the tocopherols grows, the potential of these novel vitamin E analogues awaits further investigation.

**Tocotrienoli, la vitamina E del 21 ° secolo: il suo potenziale contro il cancro e altre malattie croniche.**

Biochem Pharmacol. 2010 Dec 1;80(11):1613-31.

Inizialmente scoperto nel 1938 come un "fattore di fertilità", la vitamina E ora si riferisce a otto diverse isoforme che appartengono a due categorie, quattro analoghi saturi ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ ) chiamati tocoferoli e quattro analoghi insaturi denominato tocotrienoli. Mentre i tocoferoli sono stati studiati estesamente, poco si sa circa la tocotrienoli. Studi molto limitati suggeriscono che sia i bersagli molecolari e terapeutici dei tocotrienoli sono distinti da quelli dei tocoferoli. Per esempio, la soppressione del fattore di trascrizione infiammatorio NF-kB, che è strettamente legato alla genesi dei tumori e l'inibizione della HMG-CoA reduttasi, DNA polimerasi dei mammiferi e alcune proteine tirosin chinasi, è unico al tocotrienoli. Il rapporto esamina in dettaglio i bersagli molecolari dei tocotrienoli e il loro ruolo nel cancro, riassorbimento osseo, il diabete e le malattie cardiovascolari e neurologiche, sia a livello preclinico e clinico. Come disappunto per il valore terapeutico del tocoferoli cresce, le potenzialità di questi nuovi analoghi della vitamina E e attende ulteriori indagini.

44) Beilby J, Ambrosini GL, Rossi E, de Klerk NH, Musk AW.

**Serum levels of folate, lycopene,  $\beta$ -carotene, retinol and vitamin E and prostate cancer risk.**

J Clin Nutr. 2010 Oct;64(10):1235-8.

Previous studies relating increased serum levels of folate and fat-soluble vitamins to prostate cancer risk have variously shown null associations or to either decrease or increase the risk of developing prostate cancer. Prospective studies of serum folate levels have been reported to show a null association and increased serum levels to either decrease or increase the risk of subsequently developing prostate cancer. Similarly, serum  $\beta$ -carotene and lycopene levels have either been reported to be inversely correlated or not associated with prostate cancer risk. Using a prospective nested case-control study design, which minimized the possibility of disease effects on serum-vitamin concentrations, we report null associations for serum concentrations of folate, lycopene,  $\beta$ -carotene, vitamin A and vitamin E, and subsequent development of prostate cancer.

**Livelli sierici di folato, licopene,  $\beta$ -carotene, retinoidi e vitamina E e il rischio di cancro alla prostata.**

J Clin Nutr. 2010 Oct;64(10):1235-8.

Studi precedenti in materia sull'aumento dei livelli sierici di folati e di vitamine liposolubili in relazione al rischio di cancro alla prostata hanno variamente dimostrato un'associazione per

diminuire o aumentare il rischio di sviluppare cancro alla prostata. Studi prospettici dei livelli di folati sierici sono stati riportati a mostrare una associazione nulla e livelli sierici aumentati per diminuire o aumentare sia il rischio di sviluppare successivamente il cancro alla prostata. Allo stesso modo, i livelli sierici di  $\beta$ -carotene e licopene sono stati segnalati per essere inversamente correlati o non associati a rischio di cancro alla prostata. Utilizzando uno studio prospettico controllato della progettazione, che ha minimizzato la possibilità di effetti malattia sulla concentrazione sierica di vitamina A, si segnala un'associazione nulla per le concentrazioni sieriche di acido folico, il licopene,  $\beta$ -carotene, vitamina A e vitamina E, e il successivo sviluppo della prostata cancro.

50: Barve A, Khor TO, Reuhl K, Reddy B, Newmark H, Kong AN.

**Mixed tocotrienols inhibit prostate carcinogenesis in TRAMP mice.**

Nutr Cancer. 2010 Aug;62(6):789-94.

The biological activities of tocotrienols are receiving increasing attention. Herein, we report the efficacy of a mixed-tocotrienol diet against prostate tumorigenesis in the transgenic adenocarcinoma mouse prostate (TRAMP) mouse model. Male TRAMP mice, 8 wk old, were fed 0.1%, 0.3%, or 1% mixed tocotrienols in AIN-76A diet up to 24 wk old. Likewise, a positive control group consisting of male TRAMP mice and a negative control group consisting of wild-type nontransgenic mice were fed regular AIN-76A diet up to 24 wk old. Our results show that mixed-tocotrienol-fed groups had a lower incidence of tumor formation along with a significant reduction in the average wet weight of genitourinary apparatus. Furthermore, mixed tocotrienols significantly reduced the levels of high-grade neoplastic lesions as compared to the positive controls. This decrease in levels of high-grade neoplastic lesions was found to be associated with increased expression of proapoptotic proteins BAD (Bcl(2) antagonist of cell death) and cleaved caspase-3 and cell cycle regulatory proteins cyclin dependent kinase inhibitors p21 and p27. In contrast, the expression of cyclins A and E were found to be decreased in mixed-tocotrienol groups. Taken together, our results show that by modulating cell cycle regulatory proteins and increasing expression of proapoptotic proteins, mixed tocotrienols suppress prostate tumorigenesis in the TRAMP mice.

## **Un mix di Tocotrienoli inibisce la carcinogenesi della prostata in topi TRAMP.**

L'attività biologica di tocotrienoli sta ricevendo una crescente attenzione. Qui, si segnala l'efficacia di una dieta mista di tocotrienolo contro la tumorigenesi della prostata in un modello di topo transgenico con adenocarcinoma della prostata (TRAMP). Topi maschi TRAMP, vecchi di 8 settimane, sono stati alimentati 0,1%, 0,3% o 1% tocotrienoli misti nella dieta AIN-76A fino a 24 settimane di età. Allo stesso modo, un gruppo di controllo positivo costituito da topi maschi TRAMP e di un gruppo di controllo negativo costituito da topi wild-type non transgenici sono stati alimentati con dieta regolare AIN-76A fino a 24 settimane di età. I nostri risultati hanno dimostrato che i gruppi misti alimentati con tocotrienolo avevano una minore incidenza di formazione del tumore insieme ad una significativa riduzione del peso medio bagnato degli apparati genito-urinario. Inoltre, i tocotrienoli hanno ridotto significativamente i livelli di lesioni neoplastiche di alto grado, rispetto ai controlli positivi. Questa diminuzione dei livelli di lesioni neoplastiche di alto grado può essere associata ad aumentata espressione di proteine proapoptotiche BAD (Bcl (2) antagonista di morte cellulare), frammenti di caspasi-3, e gli inibitori p21 e p27 inibitori delle chinasi dipendenti dalle cicline che regolano il ciclo cellulare,. Al contrario, l'espressione di cicline A ed E è risultata essere diminuita in gruppi misti-tocotrienolo. Nel loro insieme, i nostri risultati mostrano che, modulando le proteine che regolano il ciclo cellulare e aumentando l'espressione di proteine proapoptotica, il mix di tocotrienoli sopprime la tumorigenesi della prostata nei topi TRAMP.

51: Jiang L, Yang KH, Tian JH, Guan QL, Yao N, Cao N, Mi DH, Wu J, Ma B, Yang SH.

## **Efficacy of antioxidant vitamins and selenium supplement in prostate cancer prevention: a meta-analysis of randomized controlled trials.**

Nutr Cancer. 2010Aug;62(6):719-27.

Several studies have evaluated the possible association between antioxidants vitamins or selenium supplement and the risk of prostate cancer, but the evidence is still inconsistent. We systematically searched PubMed, EMBASE, the Cochrane Library, Science Citation Index Expanded, Chinese biomedicine literature database, and bibliographies of retrieved articles up to January 2009. We included 9 randomized controlled trials with 165,056 participants; methodological quality of included trials was generally high. Meta-analysis showed that no significant effects of supplementation with beta-carotene (RR 0.97, 95% CI 0.90-1.05) (3 trials), vitamin C (RR 0.98, 95% CI 0.91-1.06) (2 trials), vitamin E (RR 0.96, 95% CI 0.85-1.08) (5 trials), and selenium (RR 0.78, 95% CI 0.41-1.48) (2 trials) versus placebo on prostate cancer incidence. The mortality of prostate cancer did not differ significantly by supplement of beta-carotene (RR 1.19, 95% CI 0.87 - 1.65) (1 trial), vitamin C (RR 1.45, 95%CI 0.92-2.29) (1 trial), vitamin E (RR 0.85, 95%CI 0.58-1.24) (2 trials), and selenium (RR 2.98, 95% CI 0.12-73.16) (1 trial). Our findings indicate that antioxidant vitamins and selenium supplement did not reduce the incidence and mortality of prostate cancer, these data provide no support for the use of these supplements for the prevention of prostate cancer.

## **L'efficacia di vitamine antiossidanti e integratori di selenio nella prevenzione del carcinoma prostatico: una meta-analisi di studi randomizzati controllati.**

Diversi studi hanno valutato la possibile associazione tra le vitamine antiossidanti, l'integratore di selenio e il rischio di cancro alla prostata, ma l'evidenza è ancora incoerente. Abbiamo cercato sistematicamente PubMed, EMBASE, la Cochrane Library, Science Citation Index Expanded, cinese database letteratura biomedicina, e bibliografie di articoli recuperati fino a gennaio 2009. Sono stati inclusi 9 studi randomizzati e controllati con 165.056 partecipanti; qualità metodologica degli studi inclusi è generalmente elevata. La meta-analisi ha mostrato che nessun significativo effetto della supplementazione con beta-carotene (RR 0,97, 95% CI 0,90-1,05) (3 studi), la vitamina C (RR 0,98, IC 95% 0,91-1,06), vitamina E (2 prove), (RR 0,96, 95% CI 0,85-1,08) (5 studi), e selenio (RR 0,78, 95% CI 0,41-1,48) (2 prove) rispetto al placebo sulla incidenza del cancro alla prostata. La mortalità del tumore della prostata non differiva significativamente dal supplemento di beta-carotene (RR 1,19, IC 95% 0,87 -1,65) (1 studio), la vitamina C (RR 1,45, 95% CI 0,92-2,29) (1 studio), la vitamina E (RR 0,85, 95% CI 0,58-1,24) (2 prove), e selenio (RR 2,98, IC 95% 0,12-73,16) (1 studio). I nostri risultati indicano che le vitamine antiossidanti e integrare il selenio non ha ridotto l'incidenza e la mortalità del tumore della prostata, questi dati forniscono alcun supporto per l'uso di questi integratori per la prevenzione del cancro alla prostata.

55: Cook MB, Dawsey SM, Diaw L, Blaser MJ, Perez-Perez GI, Abnet CC, Taylor PR, Albanes D, Virtamo J, Kamangar F.

## **Serum pepsinogens and Helicobacter pylori in relation to the risk of esophageal squamous cell carcinoma in the alpha-tocopherol, beta-carotene cancer prevention study.**

Epub 2010 Jul 20. PubMed PMID: 20647397;PubMed Central PMCID: PMC2919643.

**BACKGROUND:** Helicobacter pylori can induce gastric atrophy in humans, which in turn increases gastric cancer risk. Whether H. pylori and gastric atrophy also affect the risk of esophageal squamous cell carcinoma (ESCC), however, remains unresolved.

**METHODS:** We performed a nested case-control study within the prospective Alpha-Tocopherol, Beta-Carotene Cancer Prevention Study to assess these relationships. The Alpha-Tocopherol, Beta-Carotene Cancer Prevention Study is composed of 29,133 Finnish male smokers, ages 50 to 69 years, who were recruited during 1985-1988. Using baseline sera, we assessed H. pylori status (via immunoglobulin G antibodies against whole-cell and CagA antigens) and gastric atrophy status [via the biomarkers pepsinogen I (PGI) and pepsinogen II (PGII)] in 79 ESCC cases and 94 controls. Logistic regression with adjustment for age, date of blood draw, education, cigarette smoking,

alcohol, body mass index, and fruit and vegetable intake was used to estimate odds ratios (OR) and 95% confidence intervals (95% CI).

**RESULTS:** Gastric atrophy (PGI/PGII <4) was associated with ESCC (OR, 4.58; 95% CI, 2.00-10.48). There was no evidence for an association between H. pylori and ESCC (OR, 0.94; 95% CI, 0.40-2.24).

**CONCLUSIONS:** These results could be explained by misclassification of H. pylori status due to serologic amnesia, ESCC risk being dependent on the functional consequences or interactions of H. pylori rather than the infection per se, gastric atrophy having a different histogenesis in ESCC without being primarily dependent on H. pylori acquisition, or a lack of statistical power to detect an effect.

**IMPACT:** Validation of these results may warrant mechanistic studies to determine the route of association between gastric atrophy and ESCC.

### **Studio di prevenzione del cancro: Siero pepsinogeno ed Helicobacter pylori in relazione con il rischio di carcinoma a cellule squamose dell'esofago con alfa-tocoferolo e beta-carotene.**

**BACKGROUND:** Helicobacter pylori può indurre atrofia gastrica negli esseri umani, che a sua volta aumenta il rischio di cancro gastrico. Rimane tuttavia irrisolto se H. pylori e atrofia gastrica possano anche influenzare il rischio di carcinoma a cellule squamose dell'esofago (ESCC). **METODI:** Abbiamo condotto uno studio sulla prevenzione del cancro per valutare le relazioni presenti tra alfa-tocoferolo, beta-Carotene e cancro. L'alfa-tocoferolo, beta-Carotene Cancer Prevention Study è composta da 29.133 fumatori finlandese maschile di età compresa tra 50 ai 69 anni, reclutati nel corso 1985-1988. Utilizzando dei sieri di riferimento, abbiamo valutato H. pylori (tramite anticorpi immunoglobulina G contro whole-cell e antigeni CagA) e atrofia gastrica status [tramite il pepsinogeno I biomarcatori (IGP) e Pepsinogeno II (PGII)] in 79 casi e 94 controlli

ESCC . La regressione logistica con aggiustamento per età, data del prelievo di sangue, l'educazione, fumo di sigaretta, alcol, indice di massa corporea, e frutta e verdura è stato utilizzato per stimare le quote (OR) e gli intervalli di confidenza al 95% (95% CI).

**RISULTATI:** atrofia gastrica (IGP / PGII <4) è stata associata con ESCC (OR 4,58, IC 95%, 2,00-10,48). Non ci sono evidenze di un'associazione tra H. pylori e ESCC (OR, 0,94; 95% CI, 0,40-2,24).

**CONCLUSIONI:** Questi risultati potrebbero essere spiegati da errori di classificazione di H. pylori causa di amnesia sierologica, rischio ESCC essere dipendenti sulle conseguenze funzionali o le interazioni di H. pylori, piuttosto che l'infezione di per sé, atrofia gastrica con una istogenesi diversa ESCC senza essere dipende in primo luogo l'acquisizione da H. pylori, o una mancanza di potenza statistica per rilevare un effetto.

**IMPATTO:** Con la validazione di questi risultati si può procedere a studi meccanicistici per determinare il percorso di associazione tra l'atrofia gastrica e ESCC.

59: Ezzedine K, Latreille J, Kesse-Guyot E, Galan P, Hercberg S, Guinot C, Malvy D.

**Incidence of skin cancers during 5-year follow-up after stopping antioxidant vitamins and mineral supplementation.**

Eur J Cancer. 2010 Dec;46(18):3316-22.

**CONTEXT:** In the SU.VI.MAX study, antioxidant supplementation for 7.5 years was found to increase skin cancer risk in women but not in men.

**OBJECTIVE:** To investigate the potential residual or delayed effect of antioxidant supplementation on skin cancer incidence after a 5-year post-intervention follow-up.

**DESIGN, SETTING AND PARTICIPANTS:** Assessment of skin cancer including melanoma and non-melanoma during the post-intervention follow-up (September 2002-August 2007). The SU.VI.MAX study was a double-blind, placebo-controlled, randomised trial, in which 12,741 French adults (7713 women aged 35-60 years and 5028 men aged 45-60 years) received daily a placebo or a combination of ascorbic acid (120 mg), vitamin E (30 mg),  $\beta$ -carotene (6 mg), selenium (100  $\mu$ g) and zinc (20mg), from inclusion in 1994 to September 2002.

**MAIN OUTCOME MEASURES:** Total skin cancer incidence, including melanoma, squamous cell carcinoma and basal cell carcinoma.

**RESULTS:** During the post-intervention period, 10 melanomas appeared in women and 9 in men (26 and 18, respectively, for the total period of supplementation+post-supplementation). Six squamous cell carcinomas were found in women and 15 in men (10 and 25, respectively, for the total period). Finally, 40 basal cell carcinomas appeared in women and 36 in men (98 and 94, respectively, for the total period). Regarding potential residual or delayed effects of supplementation in women, no increased risk of melanoma was observed during the post-intervention follow-up period. No delayed effects, either on melanoma or non-melanoma skin cancers, were observed for either gender.

**CONCLUSIONS:** The risk of skin cancers associated with antioxidant intake declines following interruption of supplementation. This supports a causative role for antioxidants in the evolution of skin cancers.

### **Incidenza di tumori della pelle nel corso di 5 anni di follow-up dopo la sospensione di vitamine antiossidanti e integratori minerali.**

**CONTESTO:** Nello studio SU.VI.MAX, la supplementazione di antiossidanti per 7,5 anni è stata trovata per aumentare il rischio di cancro della pelle in donne ma non negli uomini.

**OBIETTIVO:** Per studiare l'effetto potenziale residuo o ritardato della supplementazione di antiossidanti sull'incidenza del cancro della pelle dopo 5 anni post-intervento di follow-up.

**DISEGNO, REGOLAZIONE E PARTECIPANTI:** Valutazione di cancro della pelle tra cui il melanoma e non-melanoma nel corso del-intervento follow-up post (settembre 2002-agosto 2007). Lo studio SU.VI.MAX è stato un double-blind, placebo-controllato, randomizzato, in cui 12.741 adulti francesi (7.713 donne di età 35-60 anni e 5.028 uomini di età 45-60 anni) hanno ricevuto un placebo al giorno o una combinazione di acido ascorbico (120 mg), vitamina E (30 mg),  $\beta$ -carotene

(6 mg), selenio (100 mg) e zinco (20mg), dall'inclusione nel 1994 a Settembre 2002.

**MISURE PRINCIPALI DI RISULTATO:** In totale l'incidenza del cancro della pelle, tra cui melanoma, carcinoma a cellule squamose e di carcinoma basocellulare.

**RISULTATI:** Durante il periodo post-intervento, 10 melanomi apparso nelle donne e 9 uomini (26 e 18, rispettivamente, per il periodo complessivo di integrazione + post-integrazione). Sei carcinomi a cellule squamose sono stati trovati nelle donne e 15 negli uomini (10 e 25, rispettivamente, per il periodo totale). Infine, il 40 carcinomi a cellule basali è apparso nelle donne e 36 negli uomini (98 e 94, rispettivamente, per il periodo totale). Per quanto riguarda i potenziali effetti residuali o ritardata integrazione delle donne, nessun aumento del rischio di melanoma è stato osservato durante il follow post-intervento-up. Nessun effetto ritardato, su tumori della pelle o melanoma non-melanoma, sono stati osservati per entrambi i sessi.

**CONCLUSIONI:** Il rischio di tumori cutanei associati con apporto di antiossidanti diminuisce in seguito ad interruzione della supplementazione. Questo sostiene un ruolo causale per gli antiossidanti per l'evoluzione dei tumori della pelle.

60: Cooper K, Squires H, Carroll C, Papaioannou D, Booth A, Logan RF, Maguire C, Hind D, Tappenden P.

**Chemoprevention of colorectal cancer: systematic review and economic evaluation.**

Health Technol Assess. 2010 Jun;14(32):1-206.

**BACKGROUND:** Colorectal cancer (CRC) is the third most common cancer in the UK: incidence increases with age, median age at diagnosis being over 70 years. Approximately 25% of cases occur in individuals with a family history of CRC, including 5% caused by familial adenomatous polyposis (FAP) or hereditary non-polyposis CRC (HNPCC). Most develop from adenomatous polyps arising from the intestine lining. Individuals with these polyps undergo polypectomy and are invited for endoscopic surveillance. Screening via faecal occult blood testing has been rolled out across the UK.

**OBJECTIVES:** To evaluate the clinical effectiveness and cost-effectiveness of drug and micronutrient interventions for the prevention of CRC and/or adenomatous polyps. Interventions considered include: non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), including aspirin and cyclo-

oxygenase-2 (COX-2) inhibitors; folic acid; calcium; vitamin D and antioxidants (including vitamin A, vitamin C, vitamin E, selenium and beta-carotene). Chemoprevention was assessed in the general population, in individuals at increased risk of CRC, and in individuals with FAP or HNPCC.

**DATA SOURCES:** A systematic review identified randomised controlled trials (RCTs) assessing drug and nutritional agents for the prevention of CRC or adenomatous polyps. A separate search identified qualitative studies relating to individuals' views, attitudes and beliefs about chemoprevention. MEDLINE, MEDLINE In-Process & Other Non-Indexed Citations, EMBASE, CINAHL, the Cochrane Database of Systematic Reviews, Cochrane CENTRAL Register of Controlled Trials, DARE, NHS-EED (NHS Economic Evaluation Database), HTA database, Science Citation Index, BIOSIS previews and the Current Controlled Trials research register were searched in June 2008. Data were extracted by one reviewer and checked by a second.

**REVIEW METHODS:** The synthesis methods used were systematic review and meta-analysis for RCTs and qualitative framework synthesis for qualitative studies. A health economic model was developed to assess the cost-effectiveness of chemoprevention for two populations with different levels of risk of developing CRC: the general population and an intermediate-risk population.

**RESULTS:** The search identified 44 relevant RCTs and six ongoing studies. A small study of aspirin in FAP patients produced no statistically significant reduction in polyp number but a possible reduction in polyp size. There was a statistically significant 21% reduction in risk of adenoma recurrence [relative risk (RR) 0.79, 95% confidence interval (CI) 0.68 to 0.92] in an analysis of aspirin versus no aspirin in individuals with a history of adenomas or CRC. In the general population, a significant 26% reduction in CRC incidence was demonstrated in studies with a 23-year follow-up (RR 0.74, 95% CI 0.57 to 0.97). Non-aspirin NSAID use in FAP individuals produced a non-statistically significant reduction in adenoma incidence after 4 years of treatment and follow-up and reductions in polyp number and size. In individuals with a history of adenomas there was a statistically significant 34% reduction in adenoma recurrence risk (RR 0.66, 95% CI 0.60 to 0.72) and a statistically significant 55% reduction in advanced adenoma incidence (RR 0.45, 95% CI 0.35 to 0.58). No studies assessed the effect of non-aspirin NSAIDs in the general population. There were no studies of folic acid in individuals with FAP or HNPCC. There was no

significant effect of folic acid versus placebo on adenoma recurrence (RR 1.16, 95% CI 0.97 to 1.39) or advanced adenoma incidence in individuals with a history of adenomas. In the general population there was no significant effect of folic acid on risk of CRC (RR 1.13, 95% CI 0.77 to 1.64), although studies were of relatively short duration. Calcium use by FAP patients produced no significant reduction in polyp number or disease progression. In individuals with a history of adenomas there was a statistically significant 18% reduction in risk of adenoma recurrence (RR 0.82, 95% CI 0.69 to 0.98) and a non-significant reduction in risk of advanced adenomas (RR 0.77, 95% CI 0.50 to 1.17). In the general population there was no significant effect of calcium on risk of CRC (RR 1.08, 95% CI 0.87 to 1.34), although studies were of relatively short duration. There were no studies of antioxidant use in individuals with FAP or HNPCC, and in individuals with a history of adenomas no statistically significant differences in relative risk of adenoma recurrence were found. In the general population there was no difference in incidence of CRC (RR 1.00, 95% CI 0.88 to 1.13) with antioxidant use compared with no antioxidant use. Twenty studies reported qualitative findings concerning chemoprevention. People are more likely to use NSAIDs if there is a strong perceived need. Perceptions of risk and benefit also influence decision-making and use. People have fewer concerns about using antioxidants or other supplements, but their perception of the benefits of these agents is less well-defined. The model analysis suggested that the most cost-

effective age-range policy in the general population would be to provide chemoprevention to all individuals within the general population from age 50 to 60 years. The use of aspirin in addition to screening within the general population is likely to result in a discounted cost per life-year gained of around 10,000 pounds and a discounted cost per quality-adjusted life-year (QALY) gained of around 23,000 pounds compared with screening alone. In the intermediate-risk group the most economically viable age-range policy would be to provide chemoprevention to individuals following polypectomy aged 61 to 70 years. Calcium is likely to have a discounted cost per QALY gained of around 8000 pounds compared with screening alone. Although aspirin in addition to screening should be more effective and less costly than screening alone, under the current assumptions of benefits to harms of aspirin and calcium, aspirin is expected to be extendedly dominated by calcium.

**LIMITATIONS:** Whilst a number of studies were included in the review, the duration of follow-up was generally insufficient to detect an effect on cancer incidence. Given the uncertainties and ambiguities in the evidence base, the results of the health economic analysis should be interpreted with caution.

**CONCLUSIONS:** Aspirin and celecoxib may reduce recurrence of adenomas and incidence of advanced adenomas in individuals with an increased risk of CRC and calcium may reduce recurrence of adenomas in this group. COX-2 inhibitors may decrease polyp number in patients with FAP. There is some evidence for aspirin reducing the incidence of CRC in the general population. Both aspirin and NSAIDs are associated with adverse effects so it will be important to consider the risk-benefit ratio before recommending these agents for chemoprevention. The economic analysis suggests that chemoprevention has the potential to represent a cost-effective intervention, particularly when targeted at intermediate-risk populations following polypectomy.

### **Chemioprevenzione del tumore colon-retto: una revisione sistematica e una valutazione economica.**

**BACKGROUND:** il cancro del colon-retto (CRC) è il terzo tumore più comune nel Regno Unito: l'incidenza aumenta con l'età, l'età mediana alla diagnosi è di oltre 70 anni. Circa il 25% dei casi si verifica in soggetti con una storia familiare di CRC, di cui 5% causato da poliposi adenomatosa

familiare (FAP) o ereditario non-poliposi CRC (HNPCC). La maggior parte si sviluppano da polipi adenomatosi derivanti dal rivestimento dell'intestino. Gli individui con questi polipi e sottoposti a polipectomia sono invitati per la sorveglianza endoscopica. Lo screening tramite test del sangue occulto fecale è stato esteso a tutto il Regno Unito. **OBIETTIVI:** Valutare l'efficacia clinica e di costo-efficacia del farmaco e dei micronutrienti interventi per la prevenzione del CRC e / o di polipi adenomatosi. Gli interventi presi in considerazione comprendono: farmaci anti-infiammatori non steroidei (FANS), tra cui l'aspirina e la ciclo-ossigenasi-2 (COX-2 inibitori), acido folico, calcio, vitamina D e di antiossidanti (tra cui la vitamina A, vitamina C, vitamina E, selenio e beta-carotene). Chemioprevenzione è stata valutata nella popolazione generale, in soggetti ad aumentato rischio di CRC, ed in individui con FAP o HNPCC.

**FONTE DEI DATI:** Una revisione sistematica ha individuato studi randomizzati e controllati (RCT) la valutazione della droga e gli agenti nutrizionali per la prevenzione del CRC o di polipi adenomatosi. Una ricerca separata individuato gli studi qualitativi relativi al punto di vista gli individui', atteggiamenti e credenze sulla chemioprevenzione. MEDLINE, MEDLINE In-Process & Altro Citazioni non indicizzati, EMBASE, CINAHL, il Cochrane Database of Systematic

Recensioni, CENTRALE Cochrane Controlled Trials Register of, DARE, NHS-EED (NHS Economic Evaluation Database), database HTA, Science Citation Index, Antepime BIOSIS e la corrente Controlled Trials registro di ricerca sono stati perquisiti nel giugno 2008. I dati sono stati estratti da un critico e controllato da un secondo.

**RASSEGNA METODI:** La sintesi dei metodi utilizzati sono stati revisione sistematica ed una meta-analisi di RCT e di sintesi quadro qualitativo per studi qualitativi. Un modello di salute economica è stato sviluppato per valutare il rapporto costo-efficacia della chemioprevenzione per due popolazioni con differenti livelli di rischio di sviluppare CRC: la popolazione e con una popolazione a rischio intermedio.

**RISULTATI:** La ricerca ha identificato 44 studi randomizzati rilevanti e sei studi in corso. Un piccolo studio di aspirina in pazienti FAP non ha prodotto una riduzione statisticamente significativa nel numero di polipi, ma una possibile riduzione delle dimensioni dei polipi. C'è stata una riduzione statisticamente significativa del 21% nel rischio di recidiva adenoma [rischio relativo (RR) 0,79, intervallo di confidenza al 95% (CI) 0,68-,92] in una analisi di aspirina versus aspirina non in individui con una storia di adenomi o CRC. Nella popolazione generale, una riduzione significativa del 26% dell'incidenza di CRC è stata dimostrata in studi con un 23-year follow-up (RR 0,74, IC 95% 0,57-0,97). FANS non-Aspirina uso in soggetti FAP prodotto una riduzione statisticamente non significativa nell'incidenza di adenoma dopo 4 anni di trattamento e follow-up e la riduzione in numero e dimensioni dei polipi. Negli individui con una storia di adenomi c'è stata una riduzione statisticamente significativa del 34% nel rischio di adenoma recidive (RR 0,66, IC 95% 0,60-0,72) e una riduzione statisticamente significativa del 55% nell'incidenza di adenoma avanzato (RR 0,45, IC 95% da 0,35 a 0,58). Nessuno studio ha valutato l'effetto dei FANS non-Aspirina nella popolazione generale.

Non ci sono stati studi di acido folico in individui con FAP o HNPCC. Non c'era alcun effetto significativo di acido folico rispetto al placebo sulla reiterazione adenoma (RR 1,16, IC 95% 0,97-1,39) o di adenoma avanzato incidenza nei soggetti con storia di adenomi. Nella popolazione generale, non vi è stato alcun effetto significativo di acido folico sul rischio di CRC (RR 1,13, 95% CI 0,77-1,64), anche se studi sono stati di durata relativamente breve. Utilizzo di calcio da parte dei pazienti FAP non ha prodotto una significativa riduzione nel numero polipo o la progressione della

malattia. Negli individui con una storia di adenomi c'è stata una riduzione statisticamente significativa del 18% nel rischio di recidiva adenoma (RR 0,82, IC 95% da 0,69-0,98) e una riduzione non significativa del rischio di adenomi avanzati (RR 0,77, IC 95%: 0,50 a 1,17). Nella popolazione generale non vi era alcun effetto significativo di calcio sul rischio di CRC (RR 1,08, 95% CI 0,87-1,34), anche se studi sono stati di durata relativamente breve. Non ci sono state le ricerche sull'uso dei antiossidante in soggetti con FAP o HNPCC, e in individui con una storia di adenomi differenze statisticamente significative nel rischio relativo di recidiva adenoma sono stati trovati. Nella popolazione generale non vi era alcuna differenza nell'incidenza di CRC (RR 1,00, IC 95% 0,88-1,13), con utilizzo antiossidanti rispetto al non uso antiossidante. Venti studi hanno riportato risultati qualitativi in materia di chemioprevenzione.

Le persone sono più propensi a usare i FANS se vi è un forte bisogno percepito. Percezione del rischio e beneficio anche influenzare i processi decisionali e l'uso. Le persone hanno meno preoccupazioni antiossidanti utilizzando o altri integratori, ma la loro percezione dei benefici di questi farmaci è meno ben definita. Il modello di analisi suggerisce che la politica più conveniente età compresa nella popolazione generale sarebbe quello di fornire chemioprevenzione a tutti gli

individui all'interno della popolazione generale dai 50 anni ai 60 anni. L'uso di aspirina in aggiunta a screening nella popolazione generale è suscettibile di provocare un costo scontato per anno di vita guadagnato di circa 10.000 sterline e un costo scontato per adeguamento della qualità, anno di vita (QALY) acquisita di circa 23.000 sterline a confronto con screening da solo. Nel gruppo a rischio intermedio la politica più economicamente sostenibile età compresa sarebbe quello di fornire ai singoli chemioprevenzione seguente polipectomia 61 anni a 70 anni. Il calcio può avere un costo scontato per QALY guadagnato di circa 8000 sterline a confronto con lo screening solo. Anche se l'aspirina in aggiunta a screening dovrebbe essere più efficace e meno costoso di screening da solo, sotto le ipotesi attuali di benefici per danni di aspirina e calcio, l'aspirina dovrebbe essere extendedly dominato dal calcio.

LIMITAZIONI: mentre un certo numero di studi sono stati inclusi nella revisione, la durata del follow-up era generalmente insufficiente per rilevare un effetto sull'incidenza del cancro. Date le incertezze e le ambiguità della base dati, i risultati delle analisi di salute economica devono essere interpretati con cautela.

CONCLUSIONI: Aspirina e celecoxib possono ridurre le recidive di adenomi e l'incidenza di adenomi avanzati nei soggetti con un aumentato rischio di CRC e di calcio possono ridurre le recidive di adenomi in questo gruppo. COX-2 inibitori possono diminuire il numero dei polipi in pazienti con FAP. Ci sono alcune prove per l'aspirina ridurre l'incidenza di CRC nella popolazione generale. Sia l'aspirina ei FANS sono associati ad effetti avversi, quindi sarà importante considerare il rapporto rischio-beneficio prima di consigliare questi agenti per la chemioprevenzione. L'analisi economica suggerisce che la chemioprevenzione ha le potenzialità per rappresentare un intervento costo-efficace, soprattutto se destinato alle popolazioni a rischio intermedio dopo polipectomia.

65: Yang YJ, Hwang SH, Kim HJ, Nam SJ, Kong G, Kim MK.

**Dietary intake of nitrate relative to antioxidant vitamin in relation to breast cancer risk: a case-control study.**

Nutr Cancer. 2010 Jul;62(5):555-66.

Nitrate is a precursor in the endogenous formation of N-nitroso compounds, which are potent animal carcinogens, whereas antioxidant vitamins have been suggested to protect against carcinogenesis. Interestingly, nitrate and antioxidant vitamins stem from the same dietary sources. We investigated whether the intake of nitrate relative to antioxidant vitamins is associated with the risk of breast cancer. A total of 362 breast cancer cases were matched to the 362 controls by age and menopausal status. Dietary intake was assessed using a quantitative food frequency questionnaire with 121 food items by trained interviewers. The nitrate to antioxidant vitamin consumption ratio was then calculated. Conditional logistic regression analysis was used to obtain odds ratios (ORs) and corresponding 95% confidence intervals (CI). Mean intakes of nitrate for cases and controls were 421 mg/day and 424 mg/day, respectively. Intakes of nitrate, nitrate/beta-carotene, nitrate/vitamin C, and nitrate/vitamin E were not associated with breast cancer risk. However,

higher breast cancer risk was observed with higher intake of nitrate/folate (OR = 2.03, 95% CI = 1.16-3.54, P for trend = 0.052). Our results suggest that lowering the ratio of nitrate to folate intake may be effective in reducing breast cancer risk.

### **L'assunzione di nitrati rispetto alla vitamina antiossidante in relazione al rischio del cancro della mammella: uno studio caso-controllo.**

Il nitrato è un precursore nella formazione endogena di N-nitroso composti, che sono potenti cancerogeni di origine animale, mentre le vitamine antiossidanti sono state proposte per la protezione contro la carcinogenesi. È interessante notare che, vitamine e antiossidanti nitrati derivano dalle stesse fonti alimentari. Abbiamo studiato se l'assunzione di nitrati rispetto alle vitamine antiossidanti è associata con il rischio di cancro al seno. Un totale di casi di cancro al seno 362 sono stati abbinati ai 362 controlli per età e stato menopausale. Assunzione alimentare è stata valutata utilizzando un questionario di frequenza alimentare quantitativa con 121 prodotti alimentari da intervistatori addestrati. Il nitrato di rapporto tra consumo di vitamine antiossidanti è stato quindi calcolato. Analisi di regressione logistica condizionale è stato utilizzato per ottenere odds ratio (OR) e corrispondenti intervalli di confidenza al 95% (CI). L'assunzione media di nitrati in casi e controlli sono stati 421 mg / die e 424 mg / die, rispettivamente. L'assunzione di nitrati, nitrato / beta-carotene, nitrati e vitamina C, e nitrati e vitamina E non sono stati associati al rischio di cancro al seno. Tuttavia, la maggiore rischio di carcinoma mammario è stata osservata con una maggiore assunzione di nitrato / folato (OR = 2.03, 95% CI = 1,16-3,54, p per trend = 0.052). I nostri risultati suggeriscono che la riduzione del rapporto tra assunzione di nitrati di folato può essere efficace nel ridurre il rischio di cancro al seno.

71 : Bitew T, Sveen CE, Heyne B, Zaremborg V.

### **Vitamin E prevents lipid raft modifications induced by an anti-cancer lysophospholipid and abolishes a Yap1-mediated stress response in yeast.**

J Biol Chem. 2010 Aug13;285(33):25731-42.

We have previously established that the anti-cancer lysophospholipid edelfosine (1-O-octadecyl-2-O-methyl-rac-glycero-3-phosphocholine, Et-18-OCH(3)) induces cell death in yeast by selective modification of lipid raft composition at the plasma membrane. In this study we determined that alpha-tocopherol protects cells from the edelfosine cytotoxic effect, preventing the internalization of sterols and the plasma membrane proton pump ATPase, Pma1p. Two non-mutually exclusive hypotheses were considered to explain the protective effect of alpha-tocopherol: (i) its classical antioxidant activity is necessary to break progression of lipid peroxidation, despite the fact *Saccharomyces cerevisiae* does not possess polyunsaturated fatty acids and (ii) due to its complementary cone shape, insertion of alpha-tocopherol could correct membrane curvature stress imposed by edelfosine (inverted cone shape). We then developed tools to distinguish between these

two hypotheses and dissect the structural requirements that confer alpha-tocopherol its protective effect. Our results indicated its lipophilic nature and the H donating hydroxyl group from the chromanol ring are both required to counteract the cytotoxic effect of edelfosine, suggesting edelfosine induces oxidation of membrane components. To further support this finding and learn more about the early cellular response to edelfosine we investigated the role that known oxidative stress signaling pathways play in modulating sensitivity to the lipid drug. Our results indicate the transcription factors Yap1 and Skn7 as well as the major peroxiredoxin, Tsa1, mediate a response to edelfosine. Interestingly, the pathway differed from the one triggered by hydrogen peroxide and its activation (measured as Yap1 translocation to the nucleus) was abolished by co-treatment of the cells with alpha-tocopherol.

**La vitamina E previene modifiche della componente lipidica indotte da un lisofosfolipide anti-cancro e abolisce una risposta di stress Yap1-mediata nel lievito.**

Abbiamo già stabilito che la lysophospholipid anti-cancro edelfosine (1-O-ottadecil-2-O-metil-rac-glicero-3-fosfocolina, Et-18-OCH (3)) induce la morte delle cellule in lievito di modificazione selettiva di composizione lipidica zattera a livello della membrana plasmatica. In questo studio abbiamo determinato che l'alfa-tocoferolo protegge le cellule dagli effetti citotossici edelfosine, impedendo l'interiorizzazione di steroli e la membrana plasmatica pompa protonica ATPasi, Pma1p. Due ipotesi non si escludono a vicenda sono stati considerati per spiegare l'effetto protettivo di alfa-tocoferolo: (i) la sua attività antiossidante classica è necessario rompere la progressione della perossidazione lipidica, nonostante il *Saccharomyces cerevisiae* fatto non possiede gli acidi grassi polinsaturi e (ii) a causa alla sua forma a cono complementari, inserimento di alfa-tocoferolo potrebbe correggere la curvatura della membrana stress imposto dal edelfosine (a forma di cono rovesciato).

Abbiamo quindi sviluppato strumenti per distinguere tra queste due ipotesi e sezionare i requisiti strutturali che conferiscono alfa-tocoferolo suo effetto protettivo. I nostri risultati hanno indicato la sua natura lipofila e la H donando gruppo ossidrilico dal ring cromanolico sono entrambe necessarie per contrastare gli effetti citotossici di edelfosine, suggerendo edelfosine induce l'ossidazione dei

componenti della membrana. Per sostenere ulteriormente tale conclusione e imparare di più circa la risposta cellulare ai primi edelfosine abbiamo studiato il ruolo che le note vie di stress ossidativo segnalazione giocare nel modulare la sensibilità al farmaco dei lipidi. I nostri risultati indicano che i fattori di trascrizione e Yap1 Skn7 nonché le principali perossiredossina, Tsa1, mediate una risposta a edelfosine. È interessante notare che il sentiero diverso da quello innescato da perossido di idrogeno e la sua attivazione (misurata come Yap1 traslocazione al nucleo) è stato abolito dal co-trattamento delle cellule con l'alfa-tocoferolo.

72: Wilhelm Filho D, Avila S Jr, Possamai FP, Parisotto EB, Moratelli AM, Garlet TR, Inácio DB, Torres MA, Colepicolo P, Dal-Pizzol F.

**Antioxidant therapy attenuates oxidative stress in the blood of subjects exposed to occupational airborne contamination from coal mining extraction and incineration of hospital residues.**

Ecotoxicology. 2010 Oct;19(7):1193-200.

Coal mining and incineration of solid residues of health services (SRHS) generate several contaminants that are delivered into the environment, such as heavy metals and dioxins. These xenobiotics can lead to oxidative stress overgeneration in organisms and cause different kinds of pathologies, including cancer. In the present study the concentrations of heavy metals such as lead, copper, iron, manganese and zinc in the urine, as well as several enzymatic and non-enzymatic biomarkers of oxidative stress in the blood (contents of lipoperoxidation = TBARS, protein carbonyls = PC, protein thiols = PT,  $\alpha$ -tocopherol = AT, reduced glutathione = GSH, and the activities of glutathione S-transferase = GST, glutathione reductase = GR, glutathione peroxidase = GPx, catalase = CAT and superoxide dismutase = SOD), in the blood of six different groups (n = 20

each) of subjects exposed to airborne contamination related to coal mining as well as incineration of solid residues of health services (SRHS) after vitamin E (800 mg/day) and vitamin C (500 mg/day) supplementation during 6 months, which were compared to the situation before the antioxidant intervention (Ávila et al., *Ecotoxicology* 18:1150-1157, 2009; Possamai et al., *Ecotoxicology* 18:1158-1164, 2009). Except for the decreased manganese contents, heavy metal concentrations were elevated in all groups exposed to both sources of airborne contamination when compared to controls. TBARS and PC concentrations, which were elevated before the antioxidant intervention decreased after the antioxidant supplementation. Similarly, the contents of PC, AT and GSH, which were decreased before the antioxidant intervention, reached values near those found in controls, GPx activity was reestablished in underground miners, and SOD, CAT and GST activities were reestablished in all groups. The results showed that the oxidative stress condition detected previously to the antioxidant supplementation in both directly and indirectly subjects exposed to the airborne contamination from coal dusts and SRHS incineration, was attenuated after the antioxidant intervention.

### **La terapia antiossidante attenua lo stress ossidativo nel sangue dei soggetti esposti a contaminazioni durante il lavoro: nell'estrazione del carbone e nell'incenerimento dei residui ospedalieri.**

Estrazione del carbone e l'incenerimento di residui solidi dei servizi sanitari (SRHS) generano diversi contaminanti che vengono consegnati nell'ambiente, come i metalli pesanti e diossine. Queste xenobiotici possono portare a overgeneration stress ossidativo in organismi e causa diversi tipi di patologie, tra cui il cancro. Nel presente studio le concentrazioni di metalli pesanti come piombo, rame, ferro, manganese e zinco nelle urine, così come diversi biomarcatori enzimatici e non enzimatici di stress ossidativo nel sangue (contenuto di lipoperossidazione = TBARS, carbonili proteici = PC, tioli delle proteine = PT,  $\alpha$ -tocoferolo = AT, glutazione ridotto = GSH, e le attività della glutazione S-transferasi = GST, GR = glutazione reduttasi, glutazione perossidasi = GPx, CAT = catalasi e superossido dismutasi = SOD), in il sangue di sei diversi gruppi (n = 20 ciascuna) di soggetti esposti alla contaminazione aerea relativi al settore del carbone così come l'incenerimento dei residui solidi dei servizi sanitari (SRHS) dopo la vitamina E (800 mg / die) e vitamina C (500 mg / giorno) durante la supplementazione di 6 mesi, che sono stati confrontati con la situazione prima dell'intervento antiossidante (Avila et al, *ecotossicologia* 18:1150-1157, 2009;. Possamai et, *Ecotossicologia* 18:1158-1164, 2009).

Fatta eccezione per il contenuto di manganese è diminuito, le concentrazioni di metalli pesanti sono stati elevati in tutti i gruppi esposti a entrambe le fonti di contaminazione aerea rispetto ai controlli. TBARS e le concentrazioni di PC, che sono stati elevati prima dell'intervento antiossidanti sono diminuite dopo l'integrazione di antiossidanti. Allo stesso modo, il contenuto del PC, AT e GSH, che sono diminuiti prima dell'intervento antiossidanti, hanno raggiunto valori vicino a quelli trovati nei controlli, l'attività GPx è stata ristabilita nel minatori della metropolitana, e le attività di SOD, CAT e GST sono stati ristabiliti in tutti i gruppi. I risultati hanno dimostrato che la condizione di stress ossidativo rilevato in precedenza per la supplementazione di antiossidanti in modo diretto e indiretto i soggetti esposti alla contaminazione da polveri di carbone e incenerimento SRHS, è stata attenuata dopo l'intervento antiossidante.

75: Cervi D, Pak B, Venier NA, Sugar LM, Nam RK, Fleshner NE, Klotz LH, Venkateswaran V.

**Micronutrients attenuate progression of prostate cancer by elevating the endogenous inhibitor of angiogenesis, platelet factor-4.**

Cancer. 2010 Jun 4;10:258.

**BACKGROUND:** Longstanding evidence implicates an inadequate diet as a key factor in the onset and progression of prostate cancer. The purpose herein was to discover, validate and characterize functional biomarkers of dietary supplementation capable of suppressing the course of prostate cancer in vivo.

**METHODS:** The Lady transgenic mouse model that spontaneously develops prostate cancer received a diet supplemented with a micronutrient cocktail of vitamin E, selenium and lycopene ad libitum. A proteomic analysis was conducted to screen for serum biomarkers of this dietary supplementation. Candidate peptides were validated and identified by sequencing and analyzed for their presence within the prostates of all mice by immunohistochemistry.

**RESULTS:** Dietary supplementation with the combined micronutrients significantly induced the expression of the megakaryocyte-specific inhibitor of angiogenesis, platelet factor-4 (P = 0.0025).

This observation was made predominantly in mice lacking tumors and any manifestations associated with progressive disease beyond 37 weeks of life, at which time no survivors remained in the control group ( $P < 0.0001$ ). While prostates of mice receiving standard chow were enlarged and burdened with poorly differentiated carcinoma, those of mice on the supplemented diet appeared normal. Immunohistochemical analysis revealed marked amplifications of both platelet binding and platelet factor-4 within the blood vessels of prostates from mice receiving micronutrients only.

**CONCLUSION:** We present unprecedented data whereby these combined micronutrients effectively promotes tumor dormancy in early prostate cancer, following initiation mutations that may drive the angiogenesis-dependent response of the tumor, by inducing platelet factor-4 expression and concentrating it at the tumor endothelium through enhanced platelet binding.

### **I micronutrienti attenuano la progressione del cancro alla prostata elevando l'inibitore endogeno dell'angiogenesi il fattore piastrinico-4.**

**BACKGROUND:** la prova di lunga data implica una dieta inadeguata come un fattore chiave per l'insorgenza e la progressione del cancro alla prostata. Lo scopo qui è stato quello di scoprire, convalidare e caratterizzare biomarcatori funzionale dell'integrazione alimentare in grado di sopprimere il corso di carcinoma della prostata in vivo.

**METODI:** Il modello di topo transgenico Lady, che si sviluppa spontaneamente il cancro alla prostata ha ricevuto una dieta integrata con un cocktail di micronutrienti di vitamina E, selenio e ad libitum licopene. Una analisi proteomica è stata condotta per individuare i biomarcatori sierici di questa integrazione alimentare. Peptidi candidati sono stati convalidati e identificati mediante sequenziamento e analizzati per la loro presenza all'interno della prostata di tutti i mouse di immunostochimica.

**RISULTATI:** la supplementazione dietetica con i micronutrienti combinati in modo significativo indotto l'espressione dei megacariociti inibitore specifico di angiogenesi, fattore piastrinico-4 ( $p = 0,0025$ ). Questa osservazione è stata fatta prevalentemente in topi privi di tumori e le manifestazioni associate a progressione della malattia oltre 37 settimane di vita, momento in cui superstiti sono rimasti nel gruppo di controllo ( $P < 0,0001$ ). Mentre prostate di topi che avevano ricevuto chow standard sono state ingrandite e gravate da carcinoma scarsamente differenziato, quelle dei topi a dieta integrata appariva normale. L'analisi immunostochimica ha rivelato segnato amplificazioni di piastrine, sia vincolante e fattore piastrinico-4 all'interno dei vasi sanguigni di prostate di topi che avevano ricevuto solo micronutrienti.

**CONCLUSIONE:** Presentiamo i dati senza precedenti, per cui questi micronutrienti combinato promuove efficacemente dormienza tumorale nel carcinoma prostatico precoce, a seguito di mutazioni iniziazione che possono guidare la risposta angiogenesi-dipendente del tumore, inducendo fattore piastrinico 4-espressione e concentrandolo in dell'endotelio tumorale attraverso una più piastrinica vincolanti.

76: Glauert HP, Calfee-Mason K, Stemm DN, Tharappel JC, Spear BT

### **Dietary antioxidants in the prevention of hepatocarcinogenesis: a review.**

Mol Nutr FoodRes. 2010 Jul;54(7):875-96.

In this review, the role of dietary antioxidants in the prevention of hepatocarcinogenesis is examined. Both human and animal models are discussed. Vitamin C, vitamin E, and selenium are antioxidants that are essential in the human diet. A number of non-essential chemicals also contain antioxidant activity and are consumed in the human diet, mainly as plants or as supplements, including beta-carotene, ellagic acid, curcumin, lycopene, coenzyme Q(10), epigallocatechin gallate, N-acetyl cysteine, and resveratrol. Although some human and animal studies show

protection against carcinogenesis with the consumption of higher amounts of antioxidants, many studies show no effect or an enhancement of carcinogenesis. Because of the conflicting results from these studies, it is difficult to make dietary recommendations as to whether consuming higher amounts of specific antioxidants will decrease the risk of developing hepatocellular carcinoma.

### **Antiossidanti alimentari nella prevenzione dell'epatocarcinogenesi: una review.**

In questa review, viene esaminato il ruolo degli antiossidanti alimentari nella prevenzione di epatocarcinogenesi. Entrambi i modelli umani e animali sono discussi. La vitamina C, vitamina E e selenio sono antiossidanti che sono essenziali nella dieta umana. Un certo numero di sostanze chimiche non essenziali contengono anche l'attività antiossidante e sono consumati nella dieta umana, soprattutto come piante o come supplementi, tra cui beta-carotene, l'acido ellagico, la curcumina, il licopene, il coenzima Q (10), gallato di epigallocatechina, N-acetil cisteina, e il resveratrolo. Anche se alcuni studi umani e animali indicano la protezione contro la carcinogenesi con il consumo di una maggiore quantità di antiossidanti, molti studi dimostrano alcun effetto o un aumento della cancerogenesi. A causa dei risultati contrastanti di questi studi, è difficile fare raccomandazioni dietetiche se consumano maggiori quantità di antiossidanti specifici diminuisce il rischio di sviluppare carcinoma epatocellulare.

80: Melichar B, Plísek J, Hyspler R, Kalábová H, Kasparová M, Krcmová L, Studentová H, Solichová D.

### **Erythrocyte alpha-tocopherol in breast cancer patients treated with letrozol.**

J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo). 2010;56(2):98-103.

In an earlier study, we have observed an increase of alpha-tocopherol in breast cancer patients treated with third-generation aromatase inhibitors that was related to tamoxifen withdrawal. We report here the results of measurement of alpha-tocopherol in erythrocytes and alpha-tocopherol/cholesterol ratios in patients treated with letrozol. Alpha-tocopherol in lipoprotein fractions and erythrocytes was determined by high-performance liquid chromatography in 124 post-menopausal women with breast cancer treated with letrozol immediately before the start of treatment as well as 2 and 4 mo later. After a transient decrease after 2 mo of letrozol therapy, erythrocyte alpha-tocopherol concentrations returned to pre-treatment levels 4 mo after the start of treatment. Apart from lower cholesterol in patients pre-treated with tamoxifen, no significant differences were observed at baseline between patients previously treated with tamoxifen and patients who had no prior tamoxifen in any of the other parameters investigated, but the transient

decrease of erythrocyte alpha-tocopherol was observed only in patients previously treated with tamoxifen. Alpha-tocopherol content of lipoprotein fractions was significantly increased 4 mo after the start of therapy, but this increase was evident mostly in patients not treated earlier with tamoxifen. In conclusion, only minor changes of alpha-tocopherol, including a transient decrease of alpha-tocopherol in erythrocyte membranes, and an increase of alpha-tocopherol in lipoprotein fractions were observed during the first 4 mo of letrozol therapy.

### **Eritrociti alfa-tocoferolo in pazienti con carcinoma mammario trattate con letrozol.**

In uno studio precedente, abbiamo osservato un aumento di alfa-tocoferolo nei pazienti con carcinoma mammario trattate con inibitori dell'aromatasi di terza generazione che è stato collegato al tamoxifene ritiro. Segnaliamo qui i risultati delle misurazioni di alfa-tocoferolo negli eritrociti e rapporti alpha-tocopherol/cholesterol nei pazienti trattati con letrozol. Alfa-tocoferolo in frazioni lipoproteiche ed eritrociti è stata determinata da alte prestazioni cromatografia liquida in 124 donne in post-menopausa con carcinoma mammario trattate con letrozol immediatamente prima dell'inizio del trattamento, nonché 2 e 4 mo più tardi. Dopo una diminuzione transitoria dopo 2 mesi di terapia letrozol, eritrociti concentrazioni di alfa-tocoferolo sono tornati ai livelli pre-trattamento di 4 mo dopo l'inizio del trattamento. Oltre a ridurre il colesterolo in pazienti pre-trattati con Tamoxifene, senza differenze significative sono state osservate al basale tra i pazienti precedentemente trattati con Tamoxifene e pazienti che non avevano tamoxifene prima in uno qualsiasi dei parametri di altri indagati, ma la diminuzione transitoria di eritrociti alfa-tocoferolo è stato osservati solo nei pazienti precedentemente trattati con Tamoxifene. Contenuto di alfa-tocoferolo frazioni lipoproteiche è risultato significativamente aumentato 4 Mo dopo l'inizio della terapia, ma questo aumento è stato evidente soprattutto nei pazienti non trattati in precedenza con Tamoxifene.

Contenuto di alfa-tocoferolo frazioni lipoproteiche è risultato significativamente aumentato 4 Mo dopo l'inizio della terapia, ma questo aumento è stato evidente soprattutto nei pazienti non trattati in precedenza con Tamoxifene. In conclusione, solo piccole modifiche di alfa-tocoferolo, tra cui una diminuzione transitoria di alfa-tocoferolo nelle membrane degli eritrociti, e un aumento di alfa-tocoferolo in frazioni lipoproteiche sono stati osservati durante le prime 4 mo di terapia letrozol.

81: Shibata A, Nakagawa K, Sookwong P, Tsuduki T, Asai A, Miyazawa T.

### **alpha-Tocopherol attenuates the cytotoxic effect of delta-tocotrienol in human colorectal adenocarcinoma cells.**

Biochem Biophys Res Commun. 2010 Jun25;397(2):214-9.

Recent studies have demonstrated that tocotrienol (T3) is superior to tocopherol (Toc) for cancer chemoprevention. However, there is little information on whether Toc influences the anticancer property of T3. In this study, we investigated the influence of Toc on the cytotoxic effects of delta-T3 in DLD-1 human colorectal adenocarcinoma cells. Toc, especially alpha-Toc, attenuated delta-T3-induced cytotoxicity and apoptosis in DLD-1 cells, whereas Toc alone did not exhibit any cytotoxic effect. delta-T3-induced cell cycle arrest and proapoptotic gene/protein expression (e.g., p21, p27, and caspases) were abrogated by alpha-Toc. Furthermore, coadministration of alpha-Toc decreased delta-T3 uptake into DLD-1 cells in a dose-dependent manner. These results indicate that alpha-Toc is not only less cytotoxic to cancer cells, but it also reduces the cytotoxicity of delta-T3 by inhibiting its cellular uptake

## **L'alfa-tocoferolo attenua l'effetto citotossico dei delta-tocotrienoli in cellule umane di adenocarcinoma del colon-retto.**

Laboratorio di Chimica alimentare e Biodinamica, Scuola di Dottorato di Scienze Agrarie, Università di Tohoku, Sendai 981-8555, Giappone.

Recenti studi hanno dimostrato che tocotrienolo (T3) è superiore a tocoferolo (Toc) per la chemioprevenzione del cancro. Tuttavia, ci sono poche informazioni su se Toc influenza le proprietà anticancro di T3. In questo studio, abbiamo studiato l'influenza del Toc sugli effetti citotossici delle cellule umane delta-T3 in DLD-1 adenocarcinoma del colon-retto. Toc, in particolare alfa-Toc, attenuato delta-T3-indotta citotossicità e l'apoptosi in cellule DLD-1, mentre Toc solo non mostra alcun effetto citotossico. delta-T3-indotta arresto del ciclo cellulare e genica proapoptotici / espressione di proteine (es. caspasi, p21, p27, e) sono state abrogate da alfa-Toc. Inoltre, la somministrazione concomitante di alfa-Toc diminuito assorbimento di delta-T3 in DLD-1 le cellule in modo dose-dipendente. Questi risultati indicano che alfa-Toc non è solo meno citotossico per le cellule del cancro, ma riduce anche la citotossicità del delta-T3, inibendo il suo assorbimento cellulare.

83: Fulda S.

### **Modulation of apoptosis by natural products for cancer therapy.**

Planta Med. 2010 Aug;76(11):1075-9.

Children's Hospital, Ulm University, Ulm, Germany. [simone.fulda@uniklinik-ulm.de](mailto:simone.fulda@uniklinik-ulm.de)

Natural products can exhibit many beneficial effects on human health. As far as cancer is concerned, naturally occurring compounds have been reported to prevent tumorigenesis and also to suppress the growth of established tumors. As cancer cells have evolved multiple mechanisms to resist the induction of programmed cell death (apoptosis), the modulation of apoptosis signaling pathways by natural compounds has been demonstrated to constitute a key event in these antitumor activities. This review presents some examples of how apoptosis pathways are targeted by selected naturally occurring agents and how these events can be exploited for cancer therapy.

### **Modulazione dell'apoptosi attraverso prodotti naturali per la terapia del cancro.**

I prodotti naturali possono presentare numerosi effetti benefici sulla salute umana. Per quanto riguarda il cancro è interessato, naturalmente composti presenti sono stati segnalati per evitare tumorigenesi e anche di sopprimere la crescita dei tumori stabilito. Come le cellule tumorali si sono evoluti meccanismi multipli per resistere l'induzione della morte cellulare programmata (apoptosi), la modulazione di apoptosi vie di segnalazione da composti naturali ha dimostrato di costituire un evento chiave in queste attività antitumorale. Questa rassegna presenta alcuni esempi di come percorsi di apoptosi sono i destinatari di selezionati agenti presenti in natura e come questi eventi possano essere sfruttati per la terapia del cancro.

85: Wright ME, Groshong SD, Husgafvel-Pursiainen K, Genova E, Lucia MS, Wolff H, Virtamo J, Albanes D

**Effects of beta-carotene supplementation on molecular markers of lung carcinogenesis in male smokers.**

Cancer Prev Res (Phila). 2010Jun;3(6):745-52.

Two primary prevention trials unexpectedly showed adverse effects of supplemental beta-carotene on lung cancer incidence in cigarette smokers. To elucidate the molecular mechanisms that might underlie these effects, we studied the immunohistochemical expression of cytochrome P450 1A1, 1A2, and 2E1, retinoic acid receptor beta, activated protein-1 elements, cyclin D1, and Ki67 in lung tumors and, when available, adjacent normal tissues obtained from incident cases in the Alpha-Tocopherol, Beta-Carotene Cancer Prevention Study. Archival lung tissue was available from 52 men randomized to receive 20 mg of beta-carotene per day and 30 men randomized to the placebo arm, all of whom were diagnosed with incident non-small-cell lung carcinoma during the course of the trial and subsequently underwent radical pulmonary resection. In normal-appearing bronchial

epithelium, positive staining for cyclin D1 was observed in 23% of cases in the beta-carotene group and 0% of cases in the placebo group (based on only 3 of 13 versus 0 of 11 cases staining positively, however;  $P = 0.04$ ), with no differences in expression noted in lung tumor tissue ( $P = 0.48$ ). There were no statistically significant differences in Ki67 expression in normal or cancerous lung tissue between intervention groups, although a small increase in staining in tumors was noted among cases in the beta-carotene versus placebo group (88% versus 71% of cases stained positive, respectively;  $P = 0.13$ ). Contrary to expectation, beta-carotene supplementation had no apparent effect on retinoic acid receptor-beta expression. These findings suggest that male smokers supplemented with beta-carotene may have had an increased risk of lung cancer due to aberrant cell growth, although our results are based on a relatively small number of cases and require confirmation in other completed trials of beta-carotene supplementation.

### **Effetti della supplementazione di beta-carotene sui marcatori molecolari di carcinogenesi del polmone nei fumatori di sesso maschile.**

Due studi di prevenzione primaria inaspettatamente ha mostrato effetti avversi dei supplementari beta-carotene sull'incidenza del cancro del polmone nei fumatori di sigarette. Per chiarire i meccanismi molecolari che potrebbero essere alla base di questi effetti, abbiamo studiato l'espressione immunohistochimica del citocromo P450 1A1, 1A2 e 2E1, beta recettore dell'acido retinoico, attivata proteina-1 elementi, ciclina D1, Ki67 e nei tumori del polmone e, se disponibile, adiacenti tessuti normali ottenuti da casi incidenti nel-alfa-tocoferolo, beta-Carotene Cancer Prevention Study. Tessuto polmonare archivio messo a disposizione 52 uomini randomizzati a ricevere 20 mg di beta-carotene al giorno e 30 uomini randomizzato nel braccio placebo, i quali sono stati diagnosticati con incidente carcinoma polmonare non a piccole cellule nel corso del processo e successivamente sottoposti a resezione polmonare radicale. In aspetto normale dell'epitelio bronchiale, colorazione positiva per la ciclina D1 è stata osservata nel 23% dei casi nel gruppo di beta-carotene e 0% dei casi nel gruppo placebo (basato su solo 3 di 13 contro 0 di 11 casi di colorazione positiva, però  $P = 0,04$ ), senza differenze di espressione osservato nel tessuto polmonare del tumore ( $P = 0,48$ ).

Non ci sono state differenze statisticamente significative in Ki67 espressione nel tessuto polmonare normale o tumorale tra i gruppi di intervento, anche se un piccolo aumento di colorazione nei tumori è stata osservata tra i casi in beta carotene-versus gruppo placebo (88% versus 71% dei casi macchiato positivi, rispettivamente,  $p = 0,13$ ). Contrariamente alle aspettative, la supplementazione di beta-carotene non ha avuto effetti evidenti sulla espressione del recettore dell'acido retinoico-beta. Questi risultati suggeriscono che i fumatori di sesso maschile integrato con beta-carotene può avere avuto un aumento del rischio di cancro al polmone a causa della crescita delle cellule aberranti, anche se i nostri risultati sono basati su un numero relativamente limitato di casi e richiedono la conferma in altri studi completati della supplementazione di beta-carotene .

91: Huang X, Zhang Z, Jia L, Zhao Y, Zhang X, Wu K.

**Endoplasmic reticulum stress contributes to vitamin E succinate-induced apoptosis in human gastric cancer SGC-7901 cells.**

Cancer Lett. 2010 Oct 1;296(1):123-31.

Vitamin E succinate (RRR- $\alpha$ -tocopheryl succinate, VES), an efficient inducer of apoptosis, acts as a potent agent for cancer therapy. However, the mechanism by which VES mediates the effects are not yet fully understood. Here we studied the effect of endoplasmic reticulum (ER) stress and unfolded protein response (UPR) on VES-induced apoptosis of SGC-7901 human gastric cancer cells. VES caused cytological changes typical of apoptosis, increased ER dilation and cytosolic Ca<sup>2+</sup> concentration. And endogenous ER stress markers, GRP78 and GRP94 were transcriptionally and translationally altered. In response to VES, induction of CHOP, activation of caspase-4 and JNK were observed. Furthermore, VES also triggered activation of UPR components, including RNA-dependent protein kinase (PKR)-like ER kinase (PERK), activating transcription

factor 6 (ATF6), X-box-binding protein 1 (XBP1), and ATF4 in a concentration- and time-dependent manner. Consequently, our results suggest that VES-induced apoptosis is coupled to ER stress and UPR activation in SGC-7901 human gastric cancer cells.

### **Stress del reticolo endoplasmatico contribuisce con la vitamina E succinato l'induzione dell'apoptosi nelle cellule SGC-7901 di cancro gastrico umano.**

Succinato Vitamina E (succinato RRR-alfa-tocoferolo, VES), un induttore di apoptosi efficace, agisce come un potente agente per la terapia del cancro. Tuttavia, il meccanismo con cui VES media gli effetti non sono ancora pienamente compreso. Qui abbiamo studiato l'effetto del reticolo endoplasmatico (ER), lo stress e la risposta spiegata della proteina (UPR), sulla VES apoptosi indotta della SGC-7901 cellule umane di cancro gastrico. VES causato cambiamenti citologici tipici di apoptosi, una maggiore dilatazione ER e citosolica di Ca (2 +) di concentrazione. Ed endogena marker di stress ER, GRP78 e GRP94 erano trascrizionalmente e traslazionalmente alterato. In risposta alla VES, l'induzione di CHOP, attivazione della caspasi-4 e JNK sono stati osservati. Inoltre, VES anche innescato l'attivazione di componenti UPR, tra RNA-dipendente della proteina kinase (PKR) ER-like chinasi (PERK), l'attivazione di fattore di trascrizione 6 (ATF6), proteina X-box-binding 1 (XBP1), e in un ATF4 concentrazione-e modo tempo-dipendente. Di conseguenza, i nostri risultati suggeriscono che la VES apoptosi indotta è abbinato ad ER stress e l'attivazione UPR in SGC-7901 cellule umane di cancro gastrico.

93: Colombo ML.

### **An update on vitamin E, tocopherol and tocotrienol-perspectives.**

2010 Mar 24;15(4):2103-13. Review. PubMed PMID: 20428030.

Vitamin E, like tocotrienols and tocopherols, is constituted of compounds essential for animal cells. Vitamin E is exclusively synthesized by photosynthetic eukaryotes and other oxygenic photosynthetic organisms such as cyanobacteria. In order to prevent lipid oxidation, the plants mainly accumulate tocochromanols in oily seeds and fruits or in young tissues undergoing active cell divisions. From a health point of view, at the moment there is a great interest in the natural forms of tocochromanols, because they are considered promising compounds able to maintain a healthy cardiovascular system and satisfactory blood cholesterol levels. Some evidence suggests that the potency of the antioxidant effects may differ between natural or synthetic source of tocochromanols (vitamin E).

### **Un aggiornamento sulla vitamina E, tocoferoli e tocotrienoli: prospettive.**

La vitamina E, come tocotrienoli e tocoferoli, è costituito di composti essenziali per cellule animali. La vitamina E è esclusivamente sintetizzata da eucarioti fotosintetici ed altri organismi fotosintetici ossigenica come cianobatteri. Al fine di prevenire l'ossidazione dei lipidi, le piante si accumulano principalmente tocopherols in semi oleosi e frutta o nei tessuti giovani in divisioni cella attiva. Da un punto di vista sanitario, al momento c'è un grande interesse per le forme naturali di tocopherols, perché sono considerati promettenti composti in grado di mantenere un sano sistema cardiovascolare e soddisfacenti livelli di colesterolo nel sangue. Alcune evidenze suggeriscono che la potenza degli effetti antiossidanti possono differire tra la fonte naturale o sintetica di tocopherols (vitamina E).

100: Granados-Principal S, Quiles JL, Ramirez-Tortosa CL, Sanchez-Rovira P, Ramirez-Tortosa MC.

**New advances in molecular mechanisms and the prevention of adriamycin toxicity by antioxidant nutrients.**

Food Chem Toxicol. 2010  
Jun;48(6):1425-38. Epub 2010 Apr 10.

Anthracyclines (doxorubicin, daunorubicin, epirubicin, and idarubicin) are currently the most effective group of anti-neoplastic drugs used in clinical practice. Of these, doxorubicin (also called adriamycin) is a key chemotherapeutic agent in cancer treatment, although its use is limited as a consequence of the chronic and acute toxicity associated with this drug. The molecular mechanisms of doxorubicin account for both the anti-cancer and the toxic side effects. Many antioxidants have been assayed, with positive or negative results, to prevent the toxicity of doxorubicin. The present review has two main goals: (1) to report the latest findings regarding the molecular mechanisms of

doxorubicin toxicity; (2) to update our understanding of the role of natural antioxidants in preventive therapy against doxorubicin-induced toxicity. This review provides new evidence for the chemoprevention of doxorubicin toxicity, making use of natural antioxidants - in particular vitamin E, vitamin C, coenzyme Q, carotenoids, vitamin A, flavonoids, polyphenol, resveratrol, antioxidant from virgin olive oil and selenium - and offers new insights into the molecular mechanisms of doxorubicin toxicity with respect to DNA damage, free radicals and other parameters.

### **Nuovi progressi nei meccanismi molecolari e prevenzione della tossicità dell' adriamicina attraverso nutrienti antiossidanti.**

Antracicline (doxorubicina, daunorubicina, epirubicina, e idarubicina) sono attualmente il gruppo più efficace di farmaci anti-neoplastici utilizzati nella pratica clinica. Di questi, doxorubicina (detta anche adriamicina) è un agente chemioterapico chiave nel trattamento del cancro, sebbene il suo uso è limitato a causa della tossicità cronica e acuta associati a questo farmaco. I meccanismi molecolari di conto doxorubicina sia per l'anti-cancro e gli effetti collaterali tossici. Antiossidanti Molti sono stati analizzati con esito positivo o negativo, per evitare la tossicità della doxorubicina. La presente revisione ha due obiettivi principali: (1) per segnalare le più recenti scoperte riguardanti i meccanismi molecolari di tossicità da doxorubicina, (2) per aggiornare la nostra comprensione del ruolo di antiossidanti naturali nella terapia preventiva contro la tossicità indotta doxorubicina. Questa revisione fornisce nuove prove per la chemioprevenzione di tossicità doxorubicina, facendo uso di antiossidanti naturali - in particolare la vitamina E, vitamina C, coenzima Q, carotenoidi, vitamina A, flavonoidi, polifenoli, resveratrolo, antiossidante di olio di oliva vergine e selenio - e offre nuove conoscenze sui meccanismi molecolari di tossicità doxorubicina rispetto al danno al DNA, i radicali liberi e altri parametri.

101: Yap WN, Zaiden N, Luk SY, Lee DT, Ling MT, Wong YC, Yap YL.

### **In vivo evidence of gamma-tocotrienol as a chemosensitizer in the treatment of hormone-refractory prostate cancer.**

Pharmacology. 2010;85(4):248-58.

gamma-Tocotrienol (gammaT3) is known to selectively kill prostate cancer (PCa) cells and to sensitize the cells to docetaxel (DTX)-induced apoptosis. In the present study, the pharmacokinetics of gammaT3 and the in vivo cytotoxic response of androgen-independent prostate cancer (AIPCa) tumor following gammaT3 treatment were investigated. Here, we investigated these antitumor effects for PCa tumors in vivo. The pharmacokinetic and tissue distribution of gammaT3 after exogenous gammaT3 supplementation were examined. Meanwhile, the response of the tumor to gammaT3 alone or in combination with DTX were studied by real-time in vivo bioluminescent imaging and by examination of biomarkers associated with cell proliferation and apoptosis. After intraperitoneal injection, gammaT3 rapidly disappeared from the serum and was selectively deposited in the AIPCa tumor cells. Administration of gammaT3 alone for 2 weeks resulted in a

significant shrinkage of the AIPCa tumors. Meanwhile, further inhibition of the AIPCa tumor growth was achieved by combined treatment of gammaT3 and DTX ( $p < 0.002$ ). The in vivo cytotoxic antitumor effects induced by gammaT3 seem to be associated with a decrease in expression of cell proliferation markers (proliferating cell nuclear antigen, Ki-67 and Id1) and an increase in the rate of cancer cell apoptosis [cleaved caspase 3 and poly(ADP-ribose) polymerase]. Additionally, the combined agents may be more effective at suppressing the invasiveness of AIPCa. Overall, our results indicate that gammaT3, either alone or in combination with DTX, may provide a treatment strategy that can improve therapeutic efficacy against AIPCa while reducing the toxicity often seen in patients treated with DTX.

### **Evidenza in vivo di gamma-tocotrienoli come chemo sensibilizzatore nel trattamento del cancro alla prostata ormone-refrattario.**

I gamma-Tocotrienolo (gammaT3) è noto per uccidere selettivamente il cancro alla prostata (PCa) cellule e di sensibilizzare le cellule a docetaxel (DTX)-apoptosi indotta. Nel presente studio, la farmacocinetica di gammaT3 e in vivo risposta citotossica di carcinoma della prostata androgeno-indipendente (AIPCa) del tumore dopo trattamento gammaT3 sono stati studiati. Qui, abbiamo studiato questi effetti antitumorali per i tumori PCa in vivo. La distribuzione di farmacocinetica e di tessuti di gammaT3 dopo esogeni gammaT3 integrazione sono stati esaminati. Nel frattempo, la risposta del tumore al gammaT3 da solo o in combinazione con DTX sono stati studiati da real-time imaging in vivo bioluminescenti e con l'esame di biomarkers associati a proliferazione cellulare e apoptosi. Dopo l'iniezione intraperitoneale, gammaT3 scomparve rapidamente dal siero ed è stato depositato selettivamente nelle cellule tumorali il AIPCa. La somministrazione di gammaT3 solo per 2 settimane ha prodotto una contrazione significativa dei tumori AIPCa. Nel frattempo, una ulteriore inibizione della crescita tumorale AIPCa è stata realizzata mediante trattamento combinato di gammaT3 e DTX ( $p < 0,002$ ).

In vivo degli effetti antitumorali citotossici indotti da gammaT3 sembrano essere associati con una diminuzione della espressione di marcatori di proliferazione cellulare (antigene nucleare delle cellule proliferanti, Ki-67 e ID1) e un aumento del tasso di apoptosi di cellule di cancro [spaccati caspasi 3 e poli (ADP-ribosio) polimerasi]. Inoltre, gli agenti combinata può essere più efficace nel sopprimere l'invasività di AIPCa. Nel complesso, i nostri risultati indicano che gammaT3, da solo o in combinazione con DTX, può fornire una strategia di trattamento che può migliorare l'efficacia terapeutica contro AIPCa riducendo la tossicità spesso osservati nei pazienti trattati con DTX.

103: Arain MA, Abdul Qadeer A.

### **Systematic review on "vitamin E and prevention of colorectal cancer".**

Pak J Pharm Sci. 2010 Apr;23(2):125-30.

Colorectal cancers (CRC) are highly prevalent cancer all over the world and need appropriate and timely prevention and treatment. Since years it has been argued that antioxidant vitamins have a potential role in the prevention of several neoplasm including colorectal cancer though the answer remained controversial. Most of the observational studies in past have shown that Vitamin E has some protective effect in the primary prevention of colorectal cancer, however its exact role is not yet established. On the other hand recently conducted experimental studies have shown variable results regarding the role of vitamin E in preventing colorectal cancers. Thus this review was conducted to study the role of vitamin E in preventing colorectal neoplasm. This review study was conducted from September 2008 to February 2009. We searched multiple electronic sources including (PUBMED) MEDLINE, Cochrane Database for identifying existing Systematic Reviews,

OVID data base and other library sources to identify relevant studies for this review. Data was collected using data extraction form. Meta analysis was performed in Review Manager version 4.3. We identified four trials on vitamin E role for primary prevention of CRC, includes 94069 participants (47029 in vitamin E Vs 47040 in placebo), aged 40 years or above, who were randomized to vitamin E supplement versus placebo. The outcome measure in our review was incidence of colorectal cancer in the follow up period of 7 to 10 years. We found no sufficient evidence of vitamin E role for decreasing risk of CRC incidence (RR: 0.89, CI: 0.76, 1.05; p-value = 0.18). It has been identified in the review that Vitamin E does not have protective role in the prevention of colorectal cancer. Further studies on diverse population are required to determine the role vitamin E for the primary prevention of colorectal cancer.

### **Revisione sistematica di "vitamina E e prevenzione del tumore del colon-retto".**

Tumori del colon-retto (CRC) sono tumori molto diffusi in tutto il mondo e la necessità di prevenzione adeguate e tempestive e di trattamento. Da anni si è sostenuto che le vitamine antiossidanti hanno un ruolo potenziale nella prevenzione della neoplasia diversi tra cui il cancro del colon-retto se la risposta è rimasta controversa. La maggior parte degli studi osservazionali in passato hanno dimostrato che la vitamina E ha un effetto protettivo nella prevenzione primaria del cancro coloretale, tuttavia il suo ruolo esatto non è ancora stabilita. D'altra parte recentemente condotto studi sperimentali hanno mostrato risultati variabili per quanto riguarda il ruolo della vitamina E nel prevenire i tumori del colon-retto. Così questa recensione è stata condotta per studiare il ruolo della vitamina E nella prevenzione tumore colon-retto. Questo studio è stato condotto recensione da settembre 2008 a febbraio 2009. Abbiamo cercato più fonti elettroniche, comprensiva di (PubMed) MEDLINE, Cochrane Database per identificare revisioni sistematiche esistenti, Ovidio base di dati e fonti altra libreria per identificare gli studi rilevanti per questa recensione.

I dati sono stati raccolti con l'estrazione dei dati del modulo. Meta analisi è stata eseguita in versione Review Manager 4.3. Abbiamo identificato quattro studi sul ruolo della vitamina E per la prevenzione primaria della CRC, comprende 94.069 partecipanti (47.029 in vitamina E vs placebo in 47.040), di 40 anni o superiore, che sono stati randomizzati a integrare la vitamina E rispetto al placebo. La misura di outcome nella nostra recensione è stata l'incidenza di tumore del colon-retto nel periodo di follow up di 7 a 10 anni. Non abbiamo trovato prove sufficienti del ruolo di vitamina E per ridurre il rischio di incidenza di CRC (RR: 0.89, CI: 0,76, 1,05, p-value = 0,18). E 'stato rilevato con la revisione che la vitamina E non ha ruolo protettivo nella prevenzione del cancro coloretale. Ulteriori studi sulla diversità della popolazione sono necessari per determinare il ruolo della vitamina E nella prevenzione primaria del cancro del colon-retto.

105: Sakhi AK, Bøhn SK, Smeland S, Thoresen M, Smedshaug GB, Tausjø J, Svilaas A, Karlsen A, Russnes KM, Svilaas T, Blomhoff R.

### **Postradiotherapy plasma lutein, alpha-carotene, and beta-carotene are positively associated with survival in patients with head and neck squamous cell carcinoma.**

Nutr Cancer. 2010Apr;62(3):322-8.

The aim of our study was to compare plasma carotenoids (i.e., biomarkers of fruits and vegetables intake) and tocopherols in 29 head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) patients with 51 healthy controls and to explore the possibility whether these plasma antioxidants could be related to outcome among patients. The patients' blood samples were taken at the end of radiotherapy. We observed that plasma lutein, zeaxanthin, alpha-carotene, beta-carotene, lycopene, and total carotenoids were significantly lower in HNSCC patients than controls. Among the patients, 18 died

and 11 were still alive during median follow-up of 55 mo for survivors. We found a significant positive association between postradiotherapy plasma carotenoids (lutein, alpha-carotene, and beta-carotene) and progression-free survival in these patients. This study indicates that increasing postradiotherapy plasma carotenoid concentration may reduce risk of premature death or recurrence of tumor in HNSCC patients. Increasing plasma carotenoid concentration should be done by increasing intake of carotenoid-rich fruits and vegetables, as other studies have shown either no or negative effects due to use of carotenoid supplements.

**La plasma luteina postradiotherapy, alfa-carotene, e beta-carotene sono positivamente associate con la sopravvivenza nei pazienti con carcinoma a cellule squamose della testa e del collo.**

Lo scopo del nostro studio è stato quello di confrontare i carotenoidi nel plasma (cioè, biomarcatori di assunzione di frutta e verdura) e tocoferoli in 29 testa e collo, carcinoma a cellule squamose (HNSCC) pazienti con 51 controlli sani e di esplorare la possibilità che questi antiossidanti nel plasma potrebbe essere collegato di risultato tra i pazienti. Campioni di sangue dei pazienti sono stati presi alla fine della radioterapia. Abbiamo osservato che la luteina plasma, zeaxantina, alfa-carotene, beta-carotene, licopene e carotenoidi totali erano significativamente più bassi nei pazienti HNSCC rispetto ai controlli. Tra i pazienti, 18 sono morti e 11 erano ancora in vita durante il follow-up mediano di 55 mo per i sopravvissuti. Abbiamo trovato una significativa associazione positiva tra carotenoidi nel plasma postradiotherapy (luteina, alfa-carotene, e beta-carotene) e la sopravvivenza libera da progressione in questi pazienti. Questo studio indica che l'aumento delle concentrazioni plasmatiche carotenoidi postradiotherapy può ridurre il rischio di morte prematura o di reiterazione del tumore nei pazienti HNSCC. La maggiore concentrazione di carotenoidi nel plasma dovrebbe essere fatto da presa crescente di frutta ricca di carotenoidi e verdura, come altri studi hanno dimostrato che nessun o gli effetti negativi dovuti all'uso di integratori di carotenoidi.

107: Kataja-Tuomola MK, Kontto JP, Männistö S, Albanes D, Virtamo JR.

**Effect of alpha-tocopherol and beta-carotene supplementation on macrovascular complications and total mortality from diabetes: results of the ATBC Study.**

Ann Med. 2010Apr;42(3):178-86. PubMed PMID: 20350251.

AIM: To determine whether alpha-tocopherol or beta-carotene supplementation affects diabetic macrovascular complications and total mortality.

METHODS: This study was carried out as part of the Alpha-Tocopherol, Beta-Carotene Cancer Prevention Study, a double-blind, randomized trial with a 2x2 factorial design. A total of 29,133 middle-aged male smokers received either vitamin E 50 mg/day or beta-carotene 20 mg/day, or both, or placebo for a median of 6.1 years. At base-line, 1700 men had type 2 diabetes. Of these men, 662 were diagnosed with first-ever macrovascular complication, and 1142 died during the 19-year follow-up.

RESULTS: Neither supplementation affected the risk of macrovascular complication or total mortality during the intervention period. For the alpha-tocopherol-supplemented versus no alpha-tocopherol-supplemented, and beta-carotene-supplemented versus no beta-carotene-supplemented

we found relative risk (RR) 0.84 (95% confidence interval (CI) 0.65-1.10) and RR 1.15 (95% CI 0.89-1.50) for macrovascular complication, respectively, and RR 1.00 (95% CI 0.80-1.25) and RR 1.06 (95% CI 0.85-1.33) for total mortality, respectively. No essential changes were found in these effects when the follow-up was extended up to 19 years.

**CONCLUSION:** Alpha-tocopherol or beta-carotene supplementation has no protective effect on macrovascular outcomes or total mortality of diabetic male smokers.

### **Effetto della supplementazione di alfa-tocoferolo e beta-carotene sulle complicanze macrovascolari e mortalità totale dal diabete: risultati dello Studio ATBC.**

**OBIETTIVO:** Per determinare se una supplementazione con alfa-Tocoferolo o il beta-carotene colpisce complicanze macrovascolari e della mortalità totale. **Metodi:** Lo studio è stato condotto come parte del-alfa tocoferolo, Beta-Carotene Cancer Prevention Study, una in doppio cieco, randomizzato con un disegno fattoriale 2x2. Un totale di 29.133 fumatori di mezza età hanno ricevuto vitamina E 50 mg / die o di beta-carotene 20 mg / die, o entrambi, o placebo per un periodo mediano di 6,1 anni. Alla linea di base, 1700 uomini avevano diabete di tipo 2. Di questi uomini, 662 sono stati diagnosticati con la prima mai complicazione macrovascolari, e 1142 morti durante i 19 anni di follow-up. **RISULTATI:** Né supplementazione influenzato il rischio di complicanze macrovascolari e della mortalità totale durante il periodo di intervento. Per l'alfa-tocoferolo integrato rispetto al "non-alfa-tocoferolo integrazioni, e beta-carotene integrato versus nessun beta-carotene integrato abbiamo trovato rischio relativo (RR) 0,84 (intervallo di confidenza al 95% (CI) 0,65-1,10) e RR 1.15 (95% CI 0,89-1,50) per complicanze macrovascolari, rispettivamente, e RR 1.00 (95% CI 0,80-1,25) e RR 1.06 (95% CI 0,85-1,33) per la mortalità totale, rispettivamente. Nessuna modifica essenziale sono stati trovati in questi effetti quando il follow-up è stato esteso fino a 19 anni. **CONCLUSIONE:** La supplementazione di alfa-tocoferolo o beta-carotene non ha alcun effetto protettivo sui risultati macrovascolari o la mortalità totale di diabetici fumatori di sesso maschile.

110: Polaniak R, Bułdak RJ, Karoń M, Birkner K, Kukla M, Zwirska-Korczala K, Birkner E.

### **Influence of an extremely low frequency magnetic field (ELF-EMF) on antioxidative vitamin E properties in AT478 murine squamous cell carcinoma culture in vitro.**

Int J Toxicol. 2010 Mar-Apr;29(2):221-30.

This study examines the effects of vitamin E and an extremely low frequency electromagnetic field (ELF-EMF) and their combination in different time intervals of exposure of vitamin E (tocopherol) on the AT478 murine squamous cell carcinoma line. This study provides insight into the influence of correlations between ELF-EMF and vitamin E supplementation on antioxidant enzyme activity in malignant cells in vitro. Following vitamin E treatment, activity of the antioxidant enzymes is increased in an exposure-dependent manner compared with the untreated group. Application of ELF-EMF alone or with vitamin E increases both superoxide dismutase isoenzymes and glutathione peroxidase activities in comparison to the control group. The results suggest that ELF-EMF alters antioxidative activities of vitamin E in AT478 tumor cells. This study confirms the role of vitamin E in decreasing susceptibility to lipid peroxidation in AT478 tumor cells.

**L'influenza di un campo magnetico a frequenza estremamente bassa (ELF-EMF) sulle proprietà antiossidanti della vitamina E in una cultura di cellule squamose murine AT478 in vitro.**

Questo studio esamina gli effetti della vitamina E e un campo elettromagnetico a frequenza estremamente bassa (ELF-EMF) e la loro combinazione in diversi intervalli di tempo di esposizione di vitamina E (tocoferolo) sulla linea AT478 carcinoma squamoso delle cellule murine. Questo studio permette di comprendere l'influenza delle correlazioni tra ELF-EMF e vitamina E sulle attività di enzimi antiossidanti nelle cellule maligne in vitro. Dopo il trattamento con vitamina E, l'attività degli enzimi antiossidanti è aumentata in maniera esposizione-dipendente rispetto al gruppo non trattato. Applicazione di ELF-EMF da solo o con la vitamina E aumenta sia isoenzimi superossido dismutasi e glutatione perossidasi attività in confronto al gruppo di controllo. I risultati suggeriscono che ELF-EMF altera attività antiossidante della vitamina E nel AT478 cellule tumorali. Questo studio conferma il ruolo della vitamina E nel ridurre la suscettibilità alla perossidazione lipidica in AT478 cellule tumorali.

111: Tomasetti M, Strafella E, Staffolani S, Santarelli L, Neuzil J, Guerrieri R.

**alpha-Tocopheryl succinate promotes selective cell death induced by vitamin K3 in combination with ascorbate.**

Br J Cancer. 2010 Apr 13;102(8):1224-34.

**BACKGROUND:** A strategy to reduce the secondary effects of anti-cancer agents is to potentiate the therapeutic effect by their combination. A combination of vitamin K3 (VK3) and ascorbic acid (AA) exhibited an anti-cancer synergistic effect, associated with extracellular production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> that promoted cell death.

**METHODS:** The redox-silent vitamin E analogue alpha-tocopheryl succinate (alpha-TOS) was used in combination with VK3 and AA to evaluate their effect on prostate cancer cells.

**RESULTS:** Prostate cancer cells were sensitive to alpha-TOS and VK3 treatment, but resistant to AA upto 3.2 mM. When combined, a synergistic effect was found for VK3-AA, whereas alpha-TOS-VK3 and alpha-TOS-AA combination showed an antagonist and additive effect, respectively. However, sub-lethal doses of AA-VK3 combination combined with a sub-toxic dose of alpha-TOS showed to induce efficient cell death that resembles autophagy. Associated with this cell demise,

lipid peroxidation, DNA damage, cytoskeleton alteration, lysosomal-mitochondrial perturbation, and release of cytochrome c without caspase activation were observed. Inhibition of lysosomal proteases did not attenuate cell death induced by the combined agents. Furthermore, cell deaths by apoptosis and autschizis were detected.

**CONCLUSION:** These finding support the emerging idea that synergistic combinations of some agents can overcome toxicity and other side-effects associated with high doses of single drugs creating the opportunity for therapeutically relevant selectivity.

### **Succinato alfa-tocoferile promuove la morte selettiva delle cellule indotta da vitamina K3 in combinazione con l'ascorbato.**

**BACKGROUND:** Una strategia per ridurre gli effetti secondari di farmaci anti-cancro è di potenziare l'effetto terapeutico per la loro combinazione. Una combinazione di vitamina K3 (VK3) e acido ascorbico (AA) ha esibito un anti-cancro effetto sinergico, associati alla produzione extracellulare di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> che la morte cellulare promosso. **METODI:** I redox-silent vitamina E succinato analogico alfa-tocoferolo (alfa-TOS) è stato utilizzato in combinazione con VK3 e AA per valutare il loro effetto sulle cellule di cancro alla prostata.

**RISULTATI:** le cellule tumorali della prostata sono stati sensibili alle alfa-TOS e di trattamento VK3, ma resistente agli AA fino a 3,2 mM. Quando combinati, un effetto sinergico è stato trovato per VK3-AA, mentre l'alfa-TOS-VK3 e la combinazione di alfa-TOS-AA ha mostrato un effetto additivo e antagonista, rispettivamente. Tuttavia, le dosi sub-letali di combinazione AA-VK3 combinato con una dose sub-tossiche di alfa-TOS ha dimostrato di indurre la morte cellulare efficiente che somiglia autschizis. Associata a questa morte cellulare, perossidazione lipidica, danni al DNA, alterazioni del citoscheletro, perturbazione lisosomiale-mitochondriale, e il rilascio di

citocromo c, senza l'attivazione delle caspasi sono stati osservati. L'inibizione della proteasi lisosomiali non attenuare la morte cellulare indotta da agenti combinati. Inoltre, le morti cellulare per apoptosi e autschizis sono stati rilevati.

**CONCLUSIONE:** Questi sostegno trovare l'idea emergente che combinazioni sinergiche di alcuni agenti in grado di superare la tossicità e altri effetti collaterali associati con alte dosi di farmaci solo creando le opportunità per la selettività terapeuticamente rilevanti.

115: Tu HK, Pan KF, Zhang Y, Li WQ, Zhang L, Ma JL, Li JY, You WC.

**Manganese superoxide dismutase polymorphism and risk of gastric lesions, and its effects on chemoprevention in a Chinese population.**

Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2010Apr;19(4):1089-97.

**BACKGROUND:** Manganese superoxide dismutase is the primary antioxidant enzyme in the mitochondria and is involved in carcinogenesis. To investigate the association between MnSOD Val(16)Ala polymorphism and risk of advanced gastric lesions, and its effects on chemoprevention, a population-based study was conducted in Linqiu, a high-risk area of gastric cancer in China.

**METHODS:** Genotypes were determined by PCR-RFLP analysis in 3,355 subjects with the baseline histopathologic diagnosis in 1994, and 2,758 of these subjects received subsequent three interventions including vitamin supplementation for 7.3 years. Odds ratios (OR) and 95% confidence intervals (CI) were estimated by unconditional logistic regression model.

**RESULTS:** We found an increased risk of dysplasia in subjects with the Val/Ala+Ala/Ala genotype (OR, 1.31; 95% CI, 1.02-1.68) compared with the Val/Val genotype. Stratified analysis indicated that a significantly elevated risk of intestinal metaplasia (OR, 3.40; 95% CI, 2.64-4.38) or dysplasia (OR, 4.01; 95% CI, 2.79-5.74) was found in subjects carrying the Val/Ala+Ala/Ala genotype and

Helicobacter pylori infection, and an interaction between this genotype and a high serum H. pylori IgG titer (>2.94) on the risk of dysplasia was observed (P(interaction) = 0.01). Furthermore, an elevated chance for regression of gastric lesions was observed in subjects with the Val/Ala+Ala/Ala genotype and high IgG titer in an intervention trial with vitamin supplementation (OR, 2.45; 95% CI, 1.37-4.38).

CONCLUSIONS: These findings suggest that Val(16)Ala polymorphism may play an important role in development of advanced gastric lesions and modify the effect of vitamin supplementation on the evolution of gastric lesions.

IMPACT: Val(16)Ala polymorphism is related to gastric cancer development.

### **Manganese superossido dismutasi, polimorfismo e rischio di lesioni gastriche, e i suoi effetti sulla chemioprevenzione in una popolazione cinese.**

BACKGROUND: la superossido dismutasi manganese è il principale enzima antiossidante nei mitocondri ed è coinvolto nella carcinogenesi. Per studiare l'associazione tra MnSOD Val (16) polimorfismo Ala e il rischio di lesioni gastriche avanzate, e i suoi effetti sulla chemioprevenzione, uno studio basato sulla popolazione è stato condotto in Linqu, una zona ad alto rischio di cancro gastrico in Cina.

METODI: I genotipi sono stati determinati mediante analisi PCR-RFLP in 3.355 soggetti con la diagnosi istopatologica di base nel 1994, e 2.758 di questi soggetti hanno ricevuto successive tre interventi tra cui vitamina per 7,3 anni. Gli odds ratio (OR) e intervalli di confidenza al 95% (CI) sono stati stimati mediante un modello di regressione logistica.

RISULTATI: Abbiamo trovato un aumento del rischio di displasia nei soggetti con la Val / Ala + Ala / Ala genotipo (OR 1,31, IC 95%, 1,02-1,68) rispetto al / genotipo Val Val. L'analisi stratificata ha indicato che un rischio significativamente elevato di metaplasia intestinale (OR 3,40, IC 95%, 2,64-4,38) o displasia (OR, 4,01; 95% CI, 2,79-5,74) è stato trovato nei soggetti che trasportano la Val / Ala Ala + / genotipo Ala e infezione da Helicobacter pylori, e una interazione tra genotipo e questo un siero ad alta H. pylori titolo di IgG (> 2,94) sul rischio di displasia è stato osservato (P (interazione) = 0,01).

Inoltre, una elevata probabilità di regressione delle lesioni gastriche è stata osservata nei soggetti con la Val / Ala + Ala / Ala genotipo e titolo di IgG ad alto contenuto di uno studio di intervento con supplementi vitaminici (OR 2,45, IC 95%, 1,37-4,38).

CONCLUSIONI: Questi risultati suggeriscono che la Val (16) Ala polimorfismo può giocare un ruolo importante nello sviluppo di tecnologie avanzate lesioni gastriche e modificare l'effetto della supplementazione di vitamina sull'evoluzione delle lesioni gastriche.

IMPATTO: Val (16) Ala polimorfismo è legato allo sviluppo del cancro gastrico.

118: Anbharasi V, Cao N, Feng SS.

### **Doxorubicin conjugated to D-alpha-tocopheryl polyethylene glycol succinate and folic acid as a prodrug for targeted chemotherapy.**

J Biomed Mater Res A. 2010 Sep 1;94(3):730-43. PubMed PMID:20225211.

This research developed a prodrug strategy to conjugate doxorubicin (DOX) to D-alpha-tocopheryl polyethylene glycol succinate (TPGS) and folic acid (FOL) for targeted chemotherapy to enhance the therapeutic effects and reduce the side effects of the drug. We synthesized two conjugates, TPGS-DOX and TPGS-DOX-FOL, to quantitatively evaluate the advantages of TPGS conjugation and FOL conjugation through passive and active targeting effects. The successful conjugation was confirmed by <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance spectroscopy and Fourier transform infrared spectroscopy. The in vitro drug release was found pH dependent, which is in favor of cancer

treatment. The in vitro cellular uptake and cytotoxicity were evaluated with MCF-7 breast cancer cells. It was found that the cellular uptake of DOX increased 15.2% by TPGS conjugation and further 6.3% by FOL conjugation after 0.5-h cell culture. The IC(50) after 24-h cell culture with MCF-7 cancer cells showed that TPGS-DOX conjugate could be 1.19-fold effective versus DOX and that TPGS-DOX-FOL could be 38.6-fold effective than TPGS-DOX and thus 45.0-fold more effective versus DOX. In vivo experiment showed that the half-life of TPGS-DOX and TPGS-DOX-FOL were increased 3.79- and 3.9-fold than the free DOX, and the area under the curve were increased 19.2- and 14.5-fold than the DOX, respectively. The biodistribution data showed that TPGS-DOX and TPGS-DOX-FOL significantly lowered drug accumulation in the heart, thereby reducing the cardiotoxicity, which is the main side effect of the DOX. Furthermore, TPGS-DOX can limit, and TPGS-DOX-FOL can further deduce, the gastrointestinal side effect of the drug.

### **Doxorubicina coniugata a D-alfa-tocoferil polietilene glicol succinato e acido folico come pro farmaci chemioterapici**

Questa ricerca ha sviluppato una strategia per coniugare profarmaco doxorubicina (DOX) a succinato polietilene D-alfa-tocoferile glicole (TPGS) e acido folico (FOL) per la chemioterapia mirata a potenziare gli effetti terapeutici e ridurre gli effetti collaterali del farmaco.

Abbiamo sintetizzato due coniugati, TPGS-DOX e TPGS-DOX-FOL, per valutare quantitativamente i vantaggi di coniugazione e la coniugazione TPGS FOL attraverso effetti di targeting passivo ed attivo. La coniugazione di successo è stato confermato da (1) H spettroscopia di risonanza magnetica nucleare e spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier.

Il rilascio in vitro di droga è stato trovato dipende dal pH, che è a favore del trattamento del cancro. L'assorbimento in vitro e la citotossicità cellulare sono state valutate con cellule del seno MCF-7 il cancro. Si è constatato che l'assorbimento cellulare di DOX aumentato del 15,2% per coniugazione TPGS e ulteriore 6,3% da coniugazione FOL dopo coltura cellulare 0.5-h. L'IC (50) dopo una coltura cellulare di 24 h con MCF-7 ha dimostrato che le cellule tumorali coniugato TPGS-DOX potrebbe essere 1,19 volte efficace contro DOX e che TPGS-DOX-FOL potrebbe essere 38,6 volte efficace rispetto TPGS-DOX e quindi 45,0 volte più efficace rispetto DOX.

In esperimenti in vivo hanno dimostrato che l'emivita di TPGS-DOX e TPGS-DOX-FOL-sono stati aumentati 3,79 e 3,9 volte rispetto alla DOX libero, e l'area sotto la curva sono stati aumentati 19,2 e 14,5 volte più DOX, rispettivamente. I dati hanno mostrato che biodistribuzione TPGS-DOX e TPGS-DOX-FOL significativamente ridotto accumulo del farmaco nel cuore, riducendo così la cardiotossicità, che è il principale effetto collaterale della DOX. Inoltre, TPGS-DOX può limitare, e TPGS-DOX-FOL può ulteriormente dedurre, l'effetto gastrointestinali collaterali del farmaco.

119: Zhao Y, Lee MJ, Cheung C, Ju JH, Chen YK, Liu B, Hu LQ, Yang CS.

### **Analysis of multiple metabolites of tocopherols and tocotrienols in mice and humans.**

J Agric Food Chem. 2010 Apr 28;58(8):4844-52.

Tocopherols and tocotrienols, collectively known as vitamin E, are essential antioxidant nutrients. The biological fates and metabolite profiles of the different forms are not clearly understood. The objective of this study is to simultaneously analyze the metabolites of different tocopherols and tocotrienols in mouse and human samples. Using HPLC/electrochemical detection and mass spectrometry, 18 tocopherol-derived and 24 tocotrienol-derived side-chain degradation metabolites were identified in fecal samples. Short-chain degradation metabolites, in particular gamma- and delta-carboxyethyl hydroxychromans (CEHCs) and carboxymethylbutyl hydroxychromans (CMBHCs) were detected in urine, serum, and liver samples, with tocopherols additionally detected in serum and liver samples. The metabolite profiles of tocotrienols and tocopherols were similar, but new tocotrienol metabolites with double bonds were identified. This is the first comprehensive

report describing simultaneous analysis of different side-chain metabolites of tocopherols and tocotrienols in mice and humans. Urinary metabolites may serve as useful biomarkers for the nutritional assessment of vitamin E.

### **Analisi di metaboliti multipli di tocoferoli e tocotrienoli nei topi e nell'uomo**

Tocoferoli e tocotrienoli, noti collettivamente come la vitamina E, antiossidanti sono nutrienti essenziali. I destini biologici e dei profili metabolita delle diverse forme non sono ancora chiaramente definiti. L'obiettivo di questo studio è di analizzare simultaneamente i metaboliti di tocoferoli e tocotrienoli diversi nel topo e di campioni umani. Mediante HPLC e rilevazione di elettrochimica e spettrometria di massa, 18 tocoferolo derivati e 24 tocotrienolo derivati dei metaboliti di degradazione della catena laterale sono stati identificati in campioni di feci. Metaboliti di degradazione a catena corta, in particolare hydroxychromans gamma-e delta-carbossietil (CEHCs) e hydroxychromans carboxymethylbutyl (CMBHCs) sono stati rilevati nelle urine, nel siero e campioni di fegato, con tocoferoli inoltre rilevati nei campioni di siero e del fegato. I profili di metabolita di tocotrienoli e tocoferoli erano simili, ma i nuovi metaboliti tocotrienolo con doppi legami sono stati identificati. Questo è il primo rapporto completo che descrive l'analisi simultanea di diversi metaboliti catena laterale di tocoferoli e tocotrienoli nei topi e nell'uomo. Metaboliti urinari possono servire come biomarcatori utili per la valutazione nutrizionale di vitamina E.

121: Prochazka L, Dong LF, Valis K, Freeman R, Ralph SJ, Turanek J, Neuzil J.

### **alpha-Tocopheryl succinate causes mitochondrial permeabilization by preferential formation of Bak channels.**

Apoptosis. 2010 Jul;15(7):782-94. PubMed PMID:20217235.

Mitocans are drugs selectively killing cancer cells by destabilizing mitochondria and many induce apoptosis via generation of reactive oxygen species (ROS). However, the molecular events by which ROS production leads to apoptosis has not been clearly defined. In this study with the mitocan alpha-tocopheryl succinate (alpha-TOS) the role of the Bcl-2 family proteins in the mechanism of malignant cell apoptosis has been determined. Exposure of several different cancer cell lines to alpha-TOS increased expression of the Noxa protein, but none of the other proteins of the Bcl-2 family, an event that was independent of the cellular p53 status. alpha-TOS caused a profound conformational change in the pro-apoptotic protein, Bak, involving oligomerization in all cell types, and this also applied to the Bax protein, but only in non-small cell lung cancer cells. Immunoprecipitation studies indicated that alpha-TOS activates the two BH1-3 proteins, Bak or Bax, to form high molecular weight complexes in the mitochondria. RNAi knockdown revealed that Noxa and Bak are required for alpha-TOS-induced apoptosis, and the role of Bak was confirmed using Bak- and/or Bax-deficient cells. We conclude that the major events induced by alpha-TOS in

cancer cells downstream of ROS production leading to mitochondrial apoptosis involve the Noxa-Bak axis. It is proposed that this represents a common mechanism for mitochondrial destabilization activated by a variety of mitocans that induce accumulation of ROS in the early phases of apoptosis.

**L'alfa-tocoferil succinato causa la permeabilizzazione mitocondriale tramite la formazione preferenziale dei canali di Bak.**

Mitocans sono farmaci selettivamente uccidere le cellule tumorali da parte dei mitocondri destabilizzante e molti indurre apoptosi attraverso la generazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS). Tuttavia, gli eventi molecolari attraverso i quali la produzione di ROS porta ad apoptosi non è stato chiaramente definito. In questo studio con il succinato mitocan alfa-tocoferolo (alfa-TOS) il ruolo delle proteine della famiglia Bcl-2 nel meccanismo di apoptosi delle cellule maligne è stata determinata. L'esposizione di numerose linee tumorali diverse cellule di alfa-TOS aumento dell'espressione della proteina noxa, ma nessuna delle altre proteine della famiglia Bcl-2, un evento che è indipendente dallo stato cellulare p53. alfa-TOS causato un profondo cambiamento conformazionale della proteina pro-apoptotica, Bak, coinvolgendo oligomerizzazione in tutti i tipi di cellule, e questo anche applicato alla proteina Bax, ma solo nelle cellule del polmone non a piccole cellule di cancro. Studi di immunoprecipitazione hanno indicato che l'alfa-TOS attiva le due BH1-3 proteine, Bak o Bax, per formare complessi alto peso molecolare, nei mitocondri. Atterramento di RNAi ha rivelato che noxa e Bak sono necessari per l'alfa-TOS-apoptosi indotta, e il ruolo di Bak è stato confermato con Bak-e / o cellule Bax-carenti. Concludiamo che i grandi eventi indotti da alfa-TOS nelle cellule tumorali a valle della produzione di ROS che porta all'apoptosi mitocondriale coinvolge l'asse noxa-Bak. Si propone che questo rappresenti un meccanismo comune di destabilizzazione mitocondriale attivato da una varietà di mitocans che inducono accumulo di ROS nelle prime fasi di apoptosi.

123: Bachawal SV, Wali VB, Sylvester PW.

**Enhanced antiproliferative and apoptotic response to combined treatment of gamma-tocotrienol with erlotinib or gefitinib in mammary tumor cells.**

BMC Cancer. 2010 Mar 8;10:84.

**BACKGROUND:** Aberrant ErbB receptor signaling is associated with various types of malignancies. gamma-Tocotrienol is a member of the vitamin E family of compounds that displays potent anticancer activity that is associated with suppression in ErbB receptor phosphorylation and mitogenic signaling. Erlotinib and gefitinib are tyrosine kinase inhibitors that block ErbB1 receptor activation, whereas trastuzumab is a monoclonal antibody that has been designed to specifically inhibit ErbB2 receptor activation. However, the clinical effectiveness of these agents have been disappointing because of cooperation between different ErbB family members that can rescue cancer cells from agents directed against a single ErbB receptor subtype. It was hypothesized that targeting multiple ErbB receptor subtypes with combined treatment of gamma-tocotrienol and ErbB receptor inhibitors would provide greater anticancer effects than monotherapy targeting only a single ErbB receptor subtype.

**METHODS:** Highly malignant mouse +SA mammary epithelial cells were maintained in culture on serum-free defined media containing 10 ng/ml EGF as a mitogen. Cell viability was determined

by MTT assay, whereas Western blot and immunofluorescent staining was used to determine treatment effects on ErbB receptor subtype level and activation. Treatment-induced apoptosis was determined using annexin V staining and Western blot analysis of cleaved caspase-3 and PARP levels.

**RESULTS:** Treatment with 3.5 microM gamma-tocotrienol, 0.5 microM erlotinib or 1.0 microM gefitinib alone, significantly inhibited +SA tumor cell growth. Combined treatment with subeffective doses of erlotinib (0.25 microM) or gefitinib (0.5 microM) with subeffective doses of gamma-tocotrienol (0.5-3.0 microM) significantly inhibited the growth and induced apoptosis in a dose-responsive manner. Trastuzumab treatment alone or in combination had no effect on +SA cell growth and viability. Combined treatment of gamma-tocotrienol with erlotinib or gefitinib also cause a large decrease in ErbB3, ErbB4, and to a lesser extent ErbB2 receptor levels, and EGF-dependent ErbB2-4 tyrosine phosphorylation (activation), but had no effect on ErbB1 receptor levels or activation.

**CONCLUSION:** Combination treatment of gamma-tocotrienol with specific ErbB receptor inhibitors is more effective in reducing mammary tumor cell growth and viability than high dose monotherapy, suggesting that targeting multiple ErbB receptors with combination therapy may significantly improve the therapeutic response in breast cancer patients.

### **Aumento della risposta antiproliferativa e apoptotica a un trattamento combinato di gamma-tocotrienolo con erlotinib o gefitinib in cellule tumorali mammarie.**

**BACKGROUND:** La segnalazione aberrante dei recettori ErbB è associata a diversi tipi di neoplasie. gamma-Tocotrienolo è un membro della famiglia di vitamina E di composti che visualizza l'attività antitumorale potente che è associato con la soppressione della fosforilazione del recettore ErbB e mitogenico segnalazione. Erlotinib e gefitinib sono inibitori della tirosin-chinasi che bloccano ErbB1 attivazione del recettore, mentre trastuzumab è un anticorpo monoclonale che è stato progettato specificamente per inibire l'attivazione del recettore ErbB2. Tuttavia, l'efficacia clinica di questi agenti sono stati deludenti a causa di cooperazione tra i diversi membri della

famiglia ErbB in grado di sottrarre alle cellule tumorali di agenti nei confronti di un singolo sottotipo recettoriale ErbB. E 'stato ipotizzato che il targeting più sottotipi di recettori ErbB con il trattamento combinato di inibitori del recettore gamma-tocotrienoli e ErbB fornirebbe effetti antitumorali maggiore rispetto alla monoterapia solo a scapito di un singolo sottotipo recettoriale ErbB.

**METODI:** altamente maligno mouse + cellule epiteliali mammarie SA sono state mantenute in coltura in media definito privo di siero contenente 10 ng / ml di EGF come un mitogeno. Wase vitalità cellulare determinati mediante test MTT, mentre Western blot e immunofluorescenza è stato utilizzato per determinare gli effetti del trattamento a livello di sottotipo recettoriale ErbB e l'attivazione. Trattamento apoptosi indotta è stata determinata utilizzando annessina blot V colorazione e occidentali di spaccati caspasi-3 e livelli di PARP.

**RISULTATI:** Il trattamento con 3,5 microM gamma-tocotrienoli, 0,5 o 1,0 microM erlotinib gefitinib microM da solo, ha inibito significativamente la crescita tumorale + SA cellulare. Il trattamento combinato con dosi subeffective di erlotinib (0,25 microM) o gefitinib (0,5 microM) con dosi subeffective di gamma-tocotrienoli (0,5-3,0 microM) ha inibito significativamente la crescita e l'apoptosi indotto in modo dose-risposta. Trattamento Trastuzumab solo o in combinazione avuto alcun effetto sulla crescita cellulare + SA e vitalità. Il trattamento combinato di gamma-tocotrienoli con erlotinib o gefitinib anche causare una forte diminuzione ErbB3, ErbB4, e

di A levels in misura minore del recettore ErbB2, e EGF-dipendente ErbB2-4 fosforilazione della tirosina (attivazione), ma non ha avuto effetto sulla ErbB1 livelli di recettori o attivazione.

**CONCLUSIONE:** Il trattamento di combinazione di gamma-tocotrienoli con specifici inibitori del recettore ErbB è più efficace nel ridurre la crescita delle cellule del tumore mammario e la vitalità rispetto alla monoterapia ad alto dosaggio, suggerendo che il targeting molteplici recettori ErbB con terapia combinata può migliorare in modo significativo la risposta terapeutica nei pazienti con tumore al seno.

136: Negis Y, Zingg JM, Libinaki R, Meydani M, Azzi A.

**Vitamin E and cancer.**

NutrCancer. 2009 Nov;61(6):875-8. PubMed PMID: 20155629.

Protection by vitamin E against free radical-induced DNA mutations appears not to be an effective occurrence. On the other hand, in vitro evidence that different tocopherols slow down cell proliferation is an accepted observation. However, such an event may not be sufficient to result in beneficial clinical outcomes. Tocopheryl phosphate, a more active, natural derivative of tocopherol, endowed with prevention and therapeutic potential, represents a possible key to the understanding of the present conflict between laboratory and clinical results.

**Vitamin E e cancro.**

Protezione con la vitamina E contro i radicali liberi mutazioni del DNA indotte non sembra essere un evento efficace. D'altra parte, evidenze in vitro che tocoferoli diverse rallentare la proliferazione cellulare è un'osservazione accettata. Tuttavia, un tale evento non può essere sufficiente per portare

a benefici risultati clinici. Fosfato Tocopheryl, un ruolo più attivo, derivato naturale del tocoferolo, dotato di prevenzione e potenziale terapeutico, rappresenta una possibile chiave per la comprensione del presente conflitto tra laboratorio e risultati clinici.

142: Ali H, Shirode AB, Sylvester PW, Nazzal S.

**Preparation, characterization, and anticancer effects of simvastatin-tocotrienol lipid nanoparticles.**

Int JPharm. 2010 Apr 15;389(1-2):223-31. Epub 2010 Feb 1. PubMed PMID: 20123009.

Previously it was shown that combined low dose treatment of tocotrienols and statins synergistically inhibited the growth of highly malignant +SA mammary epithelial cells in culture. Therefore, the objective of the present work was to prepare and characterize lipid nanoparticles that combined simvastatin and tocotrienol rich fraction (TRF) as potential anticancer therapy. The entrapment of simvastatin in the oily nanocompartments, which were formed by TRF inclusion into the solid matrix of the nanoparticles, was verified by its high entrapment efficiency and the absence of endothermic or crystalline peaks when blends were analyzed by DSC and PXRD, respectively. The release of simvastatin from the nanoparticles in sink conditions was characterized by an initial burst release of approximately 20% in 10h followed by a plateau. No significant change in particle size (approximately 100 nm) was observed after storage for six months. The anticancer activity of the nanoparticles was verified in vitro by observing their antiproliferative effects on malignant +SA

mammary epithelial cells. The IC(50) of the reference alpha-tocopherol nanoparticles was 17.7 microM whereas the IC(50) of the simvastatin/TRF nanoparticles was 0.52 microM, which confirmed the potency of the combined treatment and its potential in cancer therapy.

### **Preparazione, caratterizzazione e effetti anticancro delle nanoparticelle lipidiche di simvastatina-tocotrienolo**

In precedenza è stato dimostrato che il trattamento combinato a basso dosaggio di tocotrienoli e statine sinergicamente inibito la crescita di + altamente maligno delle cellule epiteliali mammarie SA nella cultura. Pertanto, l'obiettivo del presente lavoro è stato quello di preparare e caratterizzare le nanoparticelle lipidiche che la simvastatina combinato e tocotrienolo frazione ricca (TRF) come terapia antitumorale potenziale. L'intrappolamento della simvastatina nel nanocompartments oleosa, che si sono formate attraverso l'inclusione della Fondazione nella matrice solida delle nanoparticelle, è stata verificata dalla sua efficienza intrappolamento elevato e l'assenza di picchi endotermici o cristallina quando miscele sono stati analizzati mediante DSC e PXRD, rispettivamente. Il rilascio della simvastatina da nanoparticelle in condizioni lavandino è stato caratterizzato da un rilascio scoppio iniziale di circa il 20% in 10h seguita da un plateau. Nessun cambiamento significativo nella dimensione delle particelle (circa 100 nm) è stata osservata dopo uno stoccaggio di sei mesi. L'attività antitumorale delle nanoparticelle è stata verificata in vitro, osservando i loro effetti antiproliferativi su maligne + SA cellule epiteliali mammarie. L'IC (50) delle nanoparticelle di riferimento alfa-tocoferolo è stato del 17,7 microM considerando che l'IC (50) della simvastatina / nanoparticelle TRF è stato di 0,52 microM, che ha confermato l'efficacia del trattamento combinato e il suo potenziale nella terapia del cancro.

148: Kim J, Kim MK, Lee JK, Kim JH, Son SK, Song ES, Lee KB, Lee JP, Lee JM, Yun YM.

### **Intakes of vitamin A, C, and E, and beta-carotene are associated with risk of cervical cancer: a case-control study in Korea.**

Nutr Cancer. 2010;62(2):181-9.PubMed PMID: 20099192.

Cervical cancer is one of the most common gynecological malignancies in Korea, although the incidence has been declining in recent years. This study explored whether antioxidant vitamin intakes influenced the risk of cervical cancer. The association between antioxidant vitamin intakes and cervical cancer risk was calculated for 144 cervical cancer cases and 288 age-matched, hospital-based controls using unconditional logistic regression models. Cases reported statistically lower mean dietary intakes of vitamin A, beta -carotene, and vitamin C than did controls. Total intakes of vitamins A and E, which included both dietary and supplement intake, were also lower in cases. Those patients in the highest quartiles of dietary vitamin A, beta -carotene, and vitamin C intakes had statistically significantly lower cervical cancer risks than those in the lowest quartiles for vitamin A, beta -carotene, and vitamin C: odds ratio (OR) = 0.36 [95% confidence interval (CI) = 0.19-0.69], OR = 0.48 (CI = 0.26-0.88), and OR = 0.36 (CI = 0.18-0.69), respectively. Total intakes of vitamins A, C, and E were strongly inversely associated with cervical cancer risk: OR =

0.35 (CI = 0.19-0.65), OR = 0.35 (CI = 0.19-0.66), and OR = 0.53 (CI = 0.28-0.99), respectively. The findings support a role for increased antioxidant vitamin intake in decreasing the risk of cervical cancer. These associations need to be assessed in large prospective studies with long-term follow-up.

**L'assunzione di vitamina A, C, e E, e beta-carotene è associate al rischio di cancro cervicale: uno studio caso-controllo in Korea.**

Il cancro cervicale è una delle neoplasie più frequenti ginecologiche in Corea, anche se l'incidenza è in calo negli ultimi anni. Questo studio ha esaminato se l'assunzione di vitamine antiossidanti influenzato il rischio di cancro cervicale. L'associazione tra assunzione di vitamine antiossidanti e rischio di cancro del collo dell'utero è stato calcolato per 144 casi di cancro del collo dell'utero e 288 di pari età, i controlli su base ospedaliera utilizzando incondizionato modelli di regressione logistica. I casi segnalati statisticamente più bassa media di assunzione di vitamina A, beta-carotene e vitamina C rispetto ai controlli. Totale assunzioni delle vitamine A ed E, che includeva sia assunzione con la dieta e integrare, erano minori nei casi. I pazienti nel più alto quartile di vitamina A nella dieta, beta-carotene, vitamina C e le prese erano significativamente più bassi rischi di cancro del collo dell'utero rispetto a quelli nel più basso quartile di vitamina A, beta-carotene e vitamina C: odds ratio (OR) = 0,36 [95% intervallo di confidenza (CI) = 0,19-0,69], OR = 0.48 (IC = 0,26-0,88), e OR = 0.36 (IC = 0,18-0,69), rispettivamente. Assunzioni totali di vitamine A, C ed E sono stati fortemente inversamente associata al rischio di cancro del collo dell'utero: OR = 0.35 (IC = 0,19-0,65), OR = 0.35 (IC = 0,19-0,66), e OR = 0.53 (IC = 0.28-0,99), rispettivamente. I risultati confermano un ruolo per una maggiore assunzione di vitamina antiossidante nel diminuire il rischio di cancro cervicale. Queste associazioni devono essere valutate in ampi studi prospettici di lungo periodo di follow-up.

149: Lu G, Xiao H, Li GX, Picinich SC, Chen YK, Liu A, Lee MJ, Loy S, Yang CS.

**A gamma-tocopherol-rich mixture of tocopherols inhibits chemically induced lung tumorigenesis in A/J mice and xenograft tumor growth.**

Carcinogenesis. 2010Apr;31(4):687-94. Epub 2010 Jan 22. PubMed PMID: 20097733; PubMed Central PMCID: PMC2847088.

The present study investigated the effects of a preparation of a gamma-tocopherol-rich mixture of tocopherols (gamma-TmT) on chemically induced lung tumorigenesis in female A/J mice and the growth of H1299 human lung cancer cell xenograft tumors. In the A/J mouse model, the lung tumors were induced by either 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK; intraperitoneal injections with 100 and 75 mg/kg on Week 1 and 2, respectively) or NNK plus benzo[a]pyrene (B[a]P) (8 weekly gavages of 2 mumole each from Week 1 to 8). The NNK plus B[a]P treatment induced 21 tumors per lung on Week 19; dietary 0.3% gamma-TmT treatment during the entire experimental period significantly lowered tumor multiplicity, tumor volume and tumor burden (by 30, 50 and 55%, respectively;  $P < 0.05$ ). For three groups of mice treated with NNK alone, the gamma-TmT diet was given during the initiation stage (Week 0 to 3), post-initiation stage (Week 3 to 19) or the entire experimental period, and the tumor multiplicity was reduced by 17.8, 19.7 or 29.3%, respectively ( $P < 0.05$ ). gamma-TmT treatment during the tumor

initiation stage or throughout the entire period of the experiment also significantly reduced tumor burden (by 36 or 43%, respectively). In the xenograft tumor model of human lung cancer H1299 cells in NCr-nu/nu mice, 0.3% dietary gamma-TmT treatment significantly reduced tumor volume and tumor weight by 56 and 47%, respectively ( $P < 0.05$ ). In both the carcinogenesis and tumor growth models, the inhibitory action of gamma-TmT was associated with enhanced apoptosis and lowered levels of 8-hydroxydeoxyguanine, gamma-H2AX and nitrotyrosine in the tumors of the gamma-TmT-treated mice. In cell culture, the growth of H1299 cells was inhibited by tocopherols with their effectiveness following the order of delta-T > gamma-TmT > gamma-T, whereas alpha-T was not effective. These results demonstrate the inhibitory effect of gamma-TmT against lung tumorigenesis and the growth of xenograft tumors of human lung cancer cells. The inhibitory activity may be due mainly to the actions of delta-T and gamma-T.

### **Una miscela di gamma-tocoferol-ricca di tocoferoli inibisce chimicamente la tumorigenesi indotta dal polmone in topi A/J e la crescita di tumori da xenotrapianto**

Il presente studio ha investigato gli effetti di una preparazione di una miscela di gamma-tocoferolo ricco di tocoferoli (gamma-TMT) sulla genesi dei tumori al polmone indotta chimicamente in femmine A / J topi e la crescita di tumori delle cellule umane H1299 cancro polmonare xenotrapianto. Nella / mouse modello A J, i tumori del polmone sono stati indotti da una delle 4 - (methylnitrosamino) -1 - (3-pyridyl)-1-butanone (NNK; iniezioni intraperitoneale con 100 e 75 mg / kg sulla Settimana 1 e 2, rispettivamente) o NNK più benzo [a] pirene (B [a] P) (8 gavage settimanale di 2 mg ogni settimana da 1 a 8). Il NNK plus B [a] P indotta trattamento per i tumori del polmone 21 relativa alla settimana 19; trattamento dietetico 0,3% gamma-TMT durante l'intero periodo di sperimentazione ha fortemente ridotto la molteplicità del tumore, il volume del tumore e la massa tumorale (da 30, 50 e 55% rispettivamente,  $P < 0,05$ ). Per i tre gruppi di topi trattati con NNK solo, la dieta gamma-TMT è stato dato durante la fase di iniziazione (settimana 0 a 3), la fase post-apertura (Settimana 3 a 19) o l'intero periodo sperimentale, e la molteplicità del tumore è stato ridotto del 17,8, 19,7 o 29,3%, rispettivamente ( $P < 0,05$ ). trattamento gamma-TMT durante la fase di avvio del tumore o per tutta la durata dell'esperimento anche significativamente

ridotto l'onere del tumore (da 36 o 43%, rispettivamente). Nel modello di tumore xenotrapianto di cellule umane del cancro polmonare nei topi NCr-nu/nu H1299, 0,3% il trattamento dietetico gamma-TMT ha ridotto significativamente il volume del tumore e il peso del tumore del 56 e del 47%, rispettivamente ( $P < 0,05$ ). In entrambi i modelli di crescita e carcinogenesi del tumore, l'azione inibitoria di gamma-TMT è stato associato ad una maggiore apoptosi e riduce i livelli di 8-hydroxydeoxyguanine, gamma-H2AX nitrotirosina e nei tumori dei topi gamma-TMT-trattati. In colture cellulari, la crescita delle cellule H1299 è stato inibito da tocoferoli con la loro efficacia in base all'ordine di delta-T > gamma-TMT > gamma-T, mentre l'alfa-T non è stato efficace. Questi risultati dimostrano l'effetto inibitorio di gamma-TMT contro tumorigenesi del polmone e la crescita dei tumori xenotrapianto di cellule umane di cancro del polmone. L'attività inibitoria può essere dovuto principalmente alle azioni di delta-T e gamma-T.

156: Wirtitsch M, Roth E, Bachleitner-Hofmann T, Wessner B, Sturlan S.

**Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids enhance arsenic trioxide efficacy in arsenic trioxide-resistant leukemic and solid tumor cells.**

Oncol Res.2009;18(2-3):83-94. PubMed PMID: 20066898.

Recently we showed that the polyunsaturated fatty acid (PUFA) docosahexaenoic acid (DHA) sensitizes arsenic trioxide (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)-resistant tumor cells to a clinically achievable concentration (1 microM) of As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> via a reactive oxygen species (ROS)-dependent mechanism. The aim of the present study was to evaluate, whether this combined effect of As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and DHA is also applicable to other PUFAs [i.e., eicosapentaenoic acid (EPA), arachidonic acid (AA), and gamma-linolenic acid (GLA)]. Fourteen tumor cell lines were incubated with As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (1 microM), PUFA (25-100 microM), or the combination thereof (+/- vitamin E). Cell viability (colorimetric), apoptosis (bivariate annexin V/propidium iodide staining, detection of hypodiploid DNA), and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) were evaluated. Twelve of 14 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-resistant cell lines tested were resistant to PUFA monotherapy. However, combined treatment with As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and either PUFA significantly reduced cell viability in a dose-dependent manner with AA being the most potent As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> enhancer. The combined cytotoxic effect of As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/AA treatment was due to induction of

apoptosis, preceded by increased intracellular TBARS and was abolished by the antioxidant vitamin E. Importantly, the combined effect of As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and AA was selectively toxic for malignant cells because no cytotoxic effect was observed in normal skin fibroblasts and human microvascular endothelial cells. In conclusion, our study shows that also other PUFAs than DHA-and in particular the omega-6-PUFA AA--can be used as effective modulators of tumor cell chemosensitivity to clinically achievable concentrations of As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Enhanced lipid peroxidation most likely constitutes the key mechanism for the combined effect.

### **Gli acidi grassi poli insaturi omega-3 e omega-6 aumentano l'efficacia dell'arsenico triossido nelle leucemie resistenti al triossido e nelle cellule di tumori solidi.**

Recentemente abbiamo dimostrato che l'acido grassi polinsaturi (PUFA), acido docosaesaenoico (DHA) sensibilizza triossido di arsenico (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) le cellule tumorali resistenti ad una concentrazione clinicamente realizzabile (1 microM) di As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> tramite una specie reattive dell'ossigeno (ROS) meccanismo-dipendente. Lo scopo del presente studio era di valutare, se questo effetto combinato di As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> e DHA è applicabile anche ai PUFA altri [cioè, l'acido eicosapentaenoico (EPA), acido arachidonico (AA) e acido gamma-linolenico (GLA)]. Quattordici le linee di cellule tumorali sono stati incubati con As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (1 microM), PUFA (25-100 microM), o la loro combinazione (+ / - vitamina E). La vitalità cellulare (colorimetrico), l'apoptosi (bivariato annessina V / propidio ioduro di colorazione, la rilevazione del DNA hypodiploid), e sostanze reattive all'acido tiobarbiturico (TBARS) sono stati valutati. Dodici di 14 linee cellulari resistenti As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> testati sono risultati resistenti alla monoterapia con PUFA. Tuttavia, il trattamento combinato con As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> e sia PUFA ha ridotto significativamente la vitalità cellulare in modo dose-dipendente con AA è il più potente enhancer As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. L'effetto combinato del trattamento citotossico As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/AA è dovuta all'induzione di apoptosi, preceduto da un aumento TBARS intracellulare ed è stato abolito dalla vitamina antiossidante E. È importante sottolineare che l'effetto combinato di As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> e AA è stato selettivamente tossica per le cellule maligne a causa alcun effetto citotossico è stato osservato

nei fibroblasti cutanei umani normali e cellule endoteliali microvascolari. In conclusione, il nostro studio dimostra che anche PUFA diversi DHA-e in particolare gli omega-6-PUFA AA - possono essere utilizzati come modulatori efficace di chemiosensibilità delle cellule tumorali a concentrazioni clinicamente realizzabile di As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Perossidazione lipidica Enhanced probabilmente costituisce il meccanismo chiave per l'effetto combinato.

162: Maillard V, Kuriki K, Lefebvre B, Boutron-Ruault MC, Lenoir GM, Joulin V, Clavel-Chapelon F, Chajès V.

### **Serum carotenoid, tocopherol and retinol concentrations and breast cancer risk in the E3N-EPIC study.**

Int J Cancer. 2010Sep 1;127(5):1188-96.

Evidence of a protective effect of fruit and vegetable intake on breast cancer risk is inconsistent. Epidemiologic cohort studies based on blood carotenoid intakes as biomarkers of consumption of fruits and vegetable in individuals are still scarce and findings are discrepant. The study population included women in the E3N Study, the large French component of the European Prospective

Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). During an average of 7 years follow-up, 366 cases of incident invasive breast cancer (84 premenopausal women and 282 postmenopausal women) among 19,934 women who completed a dietary questionnaire and had available blood samples at baseline (1995-1998) were included in the study. Controls were randomly matched on age, menopausal status at blood collection, fasting status at blood collection, date and collection center. Serum carotenoids, tocopherols and retinol concentrations were assessed by high pressure liquid chromatography. Odds ratios for breast cancer risk adjusted for established breast cancer risk factors were calculated by quintile of serum micronutrient concentrations. No significant associations between breast cancer risk and serum carotenoids (highest versus lowest quintile, odds ratio (OR) = 0.74, 95% confidence interval (CI) = 0.47-1.16, p for trend 0.38), tocopherols (OR = 0.68, 95% CI = 0.41-1.10, p for trend 0.26) and retinol (OR = 0.85, 95% CI = 0.53-1.35, p for trend 0.34) were found. Our findings did not support the hypothesis that lipophilic antioxidant micronutrients found in fruits and vegetables protect against breast cancer, at least in postmenopausal women.

### **Concentrazioni sieriche di carotenoidi, tocofeolo e retinolo e rischio di cancro al seno nello studio E3N-EPIC**

La prova di un effetto protettivo di frutta e verdura sul rischio di cancro al seno è incoerente. Gli studi epidemiologici di coorte basati sui consumi di sangue di carotenoidi come biomarcatori di consumo di frutta e verdura in individui sono ancora spaventare ed i risultati sono discrepanti. La popolazione dello studio comprendeva donne nello studio E3N, la grande componente francese della Studio prospettico europeo sul cancro e nutrizione (EPIC). Durante una media di 7 anni di follow-up, 366 casi di carcinoma mammario invasivo incidente (84 donne in premenopausa e 282 donne in postmenopausa) tra le 19.934 donne che hanno completato un questionario dietetico e aveva a disposizione campioni di sangue al basale (1995-1998) sono stati inclusi nello studio. I controlli sono stati abbinati in modo casuale su età, stato menopausale alla raccolta del sangue, a digiuno di stato nella raccolta del sangue, data e centro di raccolta. Siero carotenoidi, tocoferoli e le concentrazioni di retinolo sono stati valutati mediante cromatografia liquida ad alta pressione. Odds

ratio per il rischio di cancro al seno aggiustato per fattori di rischio di cancro al seno stabiliti sono stati calcolati per quintile delle concentrazioni sieriche di micronutrienti. Nessuna associazione significativa tra rischio di cancro al seno carotenoidi e siero (quintile più alto versus più basso, odds ratio (OR) = 0,74, intervallo di confidenza al 95% (CI) = 0,47-1,16, p per trend 0,38), tocoferoli (OR = 0,68, 95% CI = 0,41-1,10, p per trend 0,26) e retinolo (OR = 0,85, 95% CI = 0,53-1,35, p per trend 0,34) sono stati trovati. I nostri risultati non supportano l'ipotesi che micronutrienti antiossidanti lipofili presenti nella frutta e verdura proteggono dal cancro al seno, almeno nelle donne in postmenopausa.

164: Melichar B, Kalábová H, Krcmová L, Kasparová M, Malírová E, Melicharová K, Pecka M, Hyspler R, Solichová D.

**Serum homocysteine, cholesterol, retinol, alpha-tocopherol, glycosylated hemoglobin and inflammatory response during therapy with bevacizumab, oxaliplatin, 5-fluorouracil and leucovorin.**

Anticancer Res. 2009 Nov;29(11):4813-20.

**BACKGROUND:** Targeted agents present with a new spectrum of side-effects, including toxicities that negatively impact the risk of atherosclerosis. The aim of the present study was to evaluate the effect of the combination of targeted therapy and chemotherapy on serum homocysteine and other laboratory parameters of cardiovascular risk in patients with metastatic colorectal carcinoma.

**PATIENTS AND METHODS:** Thirty-one patients with metastatic colorectal carcinoma treated with the combination of bevacizumab, oxaliplatin, 5-fluorouracil and leucovorin were studied before and during the therapy.

**RESULTS:** Serum homocysteine decreased significantly throughout the course of treatment. Total cholesterol and low-density lipoprotein cholesterol also decreased significantly during the first month of therapy. In contrast, serum retinol significantly increased during the second and third

months of treatment. A significant increase in glycosylated hemoglobin was also observed. After an initial rise, serum C-reactive protein (CRP) and carcinoembryonic antigen (CEA) were significantly lower compared to baseline throughout the course of treatment. Serum ferritin increased throughout most of the course of treatment. A significant correlation was observed between CRP and high-density lipoprotein cholesterol, retinol, ferritin, and CEA. CEA correlated with hemoglobin, retinol, and ferritin. Retinol correlated significantly with hemoglobin.

**CONCLUSION:** Tumor control, reflected in lower CEA, resulted in suppression of the acute phase response and generally in favorable effects on laboratory parameters indicative of risk factors of atherosclerosis, including lower homocysteine concentrations, and lower total and LDL cholesterol.

**Li velli sierici di omocisteina, colesterolo, retinolo, alfa-tocoferolo, glicosilato emoglobina e risposta infiammatoria durante la terapia con bevacizumab, oxaliplatino, 5-fluoruracile e leucovorin.**

**BACKGROUND:** agenti mirati presente con un nuovo spettro di effetti collaterali, tra cui tossicità che incidono negativamente il rischio di aterosclerosi. Lo scopo del presente studio era di valutare l'effetto della combinazione di terapia mirata e chemioterapia in omocisteina nel siero e altri parametri di laboratorio del rischio cardiovascolare nei pazienti con carcinoma coloretale metastatico.

**PAZIENTI E METODI:** Trentuno pazienti con carcinoma coloretale metastatico trattati con la combinazione di bevacizumab, oxaliplatino, 5-fluorouracile e LV sono stati studiati prima e durante la terapia.

**RISULTATI:** omocisteina nel siero è diminuito significativamente durante il corso del trattamento. Colesterolo totale e delle lipoproteine a bassa densità di colesterolo è diminuito in maniera significativa durante il primo mese di terapia. Al contrario, retinolo nel siero aumento significativo durante il secondo e il terzo mese di trattamento. Un aumento significativo dei livelli di emoglobina glicosilata è stata osservata anche. Dopo un aumento iniziale, proteina C-reattiva (CRP) e l'antigene carcinoembrionario (CEA) sono risultati significativamente più bassi rispetto al basale per tutto il corso del trattamento. Ferritina sierica aumentata in quasi tutta la durata del trattamento. Una

correlazione significativa è stata osservata tra CRP e lipoproteine ad alta densità di colesterolo, retinolo, ferritina, e CEA. CEA correlata con l'emoglobina, retinolo, e la ferritina. Retinolo correlato significativamente con l'emoglobina.

**CONCLUSIONE:** il controllo del tumore, che si riflette nella bassa CEA, ha comportato la soppressione della risposta di fase acuta e in generale in effetti favorevoli sui parametri di laboratorio indicativi di fattori di rischio di aterosclerosi, tra cui minori concentrazioni di omocisteina, e di abbassare il colesterolo totale e LDL.

174: Yap WN, Zaiden N, Tan YL, Ngoh CP, Zhang XW, Wong YC, Ling MT, Yap YL.

**Id1, inhibitor of differentiation, is a key protein mediating anti-tumor responses of gamma-tocotrienol in breast cancer cells.**

Cancer Lett. 2010 May 28;291(2):187-99.

Gamma-tocotrienol has demonstrated anti-proliferative effect on breast cancer (BCa) cells, but mechanisms involved are largely unknown. This study aimed at deciphering the molecular pathways responsible for its activity. Our results showed that treatment of BCa cells with gamma-tocotrienol resulted in induction of apoptosis as evidenced by activation of pro-caspases, accumulation of sub-G1 cells and DNA fragmentations. Examination of the pro-survival genes revealed that the gamma-tocotrienol-induced cell death was associated with suppression of Id1 and NF-kappaB through modulation of their upstream regulators (Src, Smad1/5/8, Fak and LOX). Meanwhile, gamma-tocotrienol treatment also resulted in the induction of JNK signaling pathway and inhibition of JNK activity by specific inhibitor partially blocked the effect of gamma-tocotrienol. Furthermore, synergistic effect was observed when cells were co-treated with gamma-tocotrienol and Docetaxel. Interestingly, in cells that treated with gamma-tocotrienol, alpha-

tocopherol or beta-aminopropionitrile were found to partially restore Id1 expression. Meanwhile, this restoration of Id1 was found to protect the cells from gamma-tocotrienol induced apoptosis. Consistent outcome was observed in cells ectopically transfected with the Id-1 gene. Our results suggested that the anti-proliferative and chemosensitization effect of gamma-tocotrienol on BCa cells may be mediated through downregulation of Id1 protein.

**Id1, inibitore della differenziazione, è una proteina chiave che media la risposta antitumorale del gamma-tocotrienolo nelle cellule cancerose mammarie.**

Gamma-tocotrienolo ha dimostrato effetto anti-proliferativo sul cancro al seno (BCA), le cellule, ma i meccanismi coinvolti sono in gran parte sconosciuti. Questo studio è volto a decifrare i meccanismi molecolari responsabili della sua attività. I nostri risultati hanno mostrato che il trattamento delle cellule con BCA gamma-tocotrienoli portato a induzione di apoptosi come dimostrato mediante l'attivazione della pro-caspasi, accumulo di sub-G1 cellule e frammentazione del DNA. L'esame dei geni pro-sopravvivenza rivelato che la morte cellulare gamma-tocotrienoli-indotta è stata associata con la soppressione di Id1 e NF-kB mediante la modulazione dei loro regolatori a monte (Src, Smad1/5/8, Fak e LOX). Intanto, il trattamento gamma-tocotrienoli ha comportato anche l'induzione della via JNK segnalazione e inibizione dell'attività di JNK da inibitore specifico parzialmente bloccato l'effetto di gamma-tocotrienoli. Inoltre, l'effetto sinergico è stata osservata quando le cellule sono state co-trattati con gamma-tocotrienoli e Docetaxel. È interessante notare che, in cellule che trattate con gamma-tocotrienoli, alfa-tocoferolo o beta-aminopropionitrile sono stati trovati per ripristinare parzialmente espressione Id1. Nel frattempo, il restauro di Id1 è stato trovato per proteggere le cellule da apoptosi indotta gamma-tocotrienoli. Risultato consistente è stata osservata nelle cellule ectopicamente transfettate con il gene Id-1. I nostri risultati suggeriscono che l'effetto anti-proliferativo e chemosensitization di gamma-tocotrienoli sulle cellule BCA possono essere mediati attraverso la down-regulation di Id1 proteine.

175: Samant GV, Wali VB, Sylvester PW.

**Anti-proliferative effects of gamma-tocotrienol on mammary tumour cells are associated with suppression of cell cycle progression.**

Cell Prolif. 2010 Feb;43(1):77-83.

**OBJECTIVES:** Previous studies have shown that gamma-tocotrienol induces potent anti-proliferative effects on +SA mammary tumour cells in culture; here, investigations have been conducted to determine its effects on intracellular signalling proteins involved in regulating cell cycle progression.

**MATERIALS AND METHODS:** +SA cells were maintained in mitogen-free defined media containing 0 or 4 micromgamma-tocotrienol, for 48 h to synchronize cell cycle in G(0) phase, and then they were exposed to 100 ng/ml EGF to initiate cell cycle progression. Whole cell lysates were collected at various time points from each treatment group and were prepared for Western blot analysis.

**RESULTS AND CONCLUSIONS:** Treatment with 4 micromgamma-tocotrienol significantly inhibited +SA cell proliferation over a 4-day culture period. Moreover, this treatment resulted in a relatively large reduction in cyclin D1, cyclin dependent kinase (CDK)4, CDK2 and CDK6 levels, between 4 and 24 h after EGF exposure. Tocotrienol treatment also resulted in a relatively large increase in CDK inhibitor (CKI) p27, prior to and after EGF exposure, but had little effect on levels of CKIs, p21 and p15. Tocotrienol treatment also induced a large relative reduction in retinoblastoma (Rb) protein phosphorylation at ser780 and ser807/811. These findings strongly suggest that anti-proliferative effects of gamma-tocotrienol are associated with reduction in cell cycle progression from G(1) to S, as evidenced by increased p27 levels, and a corresponding decrease in cyclin D1, CDK2, CDK4, CDK6 and phosphorylated Rb levels.

**Gli effetti anti-proliferativi di gamma-tocotrienolo sulle cellule tumorali mammarie sono associati alla soppressione della progressione del ciclo cellulare.**

**OBIETTIVI:** Gli studi precedenti hanno dimostrato che il gamma-tocotrienoli induce potenti effetti anti-proliferativo su cellule mammarie tumorali + SA in cultura, qui, le indagini sono stati condotti per determinare i suoi effetti su proteine di segnalazione intracellulare coinvolte nella regolazione della progressione del ciclo cellulare.

**MATERIALI E METODI:** + cellule SA sono state mantenute in media definito mitogeno-free contenenti 0 o 4 micromgamma-tocotrienolo, per 48 ore per la sincronizzazione del ciclo cellulare in G (0) di fase, e poi sono stati esposti a 100 ng / ml di EGF per iniziare progressione del ciclo cellulare. Lisati cellulari totali sono stati raccolti a vari intervalli di tempo da ciascun gruppo di trattamento e sono stati preparati per l'analisi di Western Blot.

**RISULTATI E CONCLUSIONI:** Il trattamento con 4 micromgamma-tocotrienolo significativamente inibito la proliferazione delle cellule + SA per un periodo di coltura per 4 giorni. Inoltre, questo trattamento ha comportato una riduzione relativamente grande in ciclina D1, ciclina chinasi dipendenti (CDK) 4, CDK2 e CDK6 livelli, tra il 4 e 24 h dopo l'esposizione del FEG. Trattamento Tocotrienolo anche comportato un aumento relativamente consistente delle CDK inibitori (CKI) p27, prima e dopo l'esposizione del FEG, ma ha avuto poco effetto sui livelli di CKIs, p21 e p15. Trattamento Tocotrienolo anche indotto una forte riduzione relativa nel retinoblastoma (Rb) fosforilazione proteica a ser780 e ser807/811. Questi risultati suggeriscono fortemente che gli effetti anti-proliferativo di gamma-tocotrienoli sono associati a riduzione della progressione del ciclo cellulare da G (1) a S, come evidenziato da un aumento dei livelli di p27, e una corrispondente diminuzione di ciclina D1, CDK2, CDK4, CDK6 e fosforilata Rb livelli.

178: Jenab M, Salvini S, van Gils CH, Brustad M, Shakya-Shrestha S, Buijsse B, Verhagen H, Touvier M, Biessy C, Wallström P, Bouckaert K, Lund E, Waaseth M, Roswall N, Joensen AM, Linseisen J, Boeing H, Vasilopoulou E, Dilis V, Sieri S, Sacerdote C, Ferrari P, Manjer J, Nilsson S, Welch AA, Travis R, Boutron-Ruault MC, Niravong M, Bueno-de-Mesquita HB, van der Schouw YT, Tormo MJ, Barricarte A, Riboli E, Bingham S, Slimani N.

**Dietary intakes of retinol, beta-carotene, vitamin D and vitamin E in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition cohort.**

Eur J Clin Nutr. 2009 Nov;63 Suppl 4:S150-78.

**OBJECTIVES:** To describe the intake of the fat-soluble nutrients retinol, beta-carotene, vitamin E and vitamin D and their food sources among 27 redefined centres in 10 countries participating in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study.

**METHODS:** Between 1995 and 2000, 36,034 subjects (age range: 35-74 years) completed a single standardized 24-h dietary recall using a computerized interview software program (EPIC-SOFT). Intakes of the fat-soluble nutrients were estimated using the standardized EPIC Nutrient Database.

**RESULTS:** For all the nutrients, in most centres, men had a higher level of intake than did women, even after adjustments for total energy intake and anthropometric confounders. Distinct regional gradients from northern to southern European countries were observed for all nutrients. The level intake of beta-carotene and vitamin E also showed some differences by level of education, smoking status and physical activity. No meaningful differences in the nutrient intake were observed by age range.

**CONCLUSIONS:** These results show differences by study centre, gender, age and various lifestyle variables in the intake of retinol, beta-carotene, vitamin E and vitamin D between 10 European countries.

### **L'assunzione di retinolo, beta-carotene, vitamina D e vitamina E nello studio European Prospective Investigation into Cancer e Nutrition cohort.**

**OBIETTIVI:** Per descrivere l'apporto dei nutrienti liposolubili retinolo, beta-carotene, vitamina E e vitamina D e le loro fonti di cibo tra i 27 centri ridefinito in 10 paesi che partecipano alla Studio prospettico europeo sul cancro e nutrizione (EPIC) di studio.

**METODI:** Tra il 1995 e il 2000, 36.034 soggetti (età: 35-74 anni) ha completato un unico standardizzato nelle 24-h dietetici utilizzando un programma software informatici dell'intervista (EPIC-SOFT). L'assunzione di sostanze nutrienti liposolubili sono stati stimati utilizzando il standardizzato EPIC nutrienti database.

**RISULTATI:** Per tutti i nutrienti, nella maggior parte dei centri, gli uomini avevano un più alto livello di assunzione di fatto le donne, anche dopo gli aggiustamenti per l'assunzione totale di energia e di fattori confondenti antropometrici. Gradienti distinti regionali dal nord al sud i paesi europei sono stati osservati per tutte le sostanze nutritive. Il livello di assunzione di beta-carotene e la vitamina E ha anche mostrato alcune differenze per livello di istruzione, abitudine al fumo e attività fisica. Nessuna differenza significativa nella assunzione di nutrienti sono stati osservati per fasce di età.

**CONCLUSIONI:** Questi risultati mostrano differenze da centro di studio, sesso, età e le variabili in diversi stili di vita per l'assunzione di retinolo, beta-carotene, vitamina E e vitamina D tra 10 paesi europei.

179: Kontek R, Drozda R, Sliwiński M, Grzegorzczak K.

### **Genotoxicity of irinotecan and its modulation by vitamins A, C and E in human lymphocytes from healthy individuals and cancer patients.**

Toxicol In Vitro. 2010 Mar;24(2):417-24.

Many patients being treated for cancer use dietary supplements, particularly antioxidants, in the hope of reducing the toxicity of chemotherapy or radiotherapy. However, clinicians should advise their patients against using antioxidant dietary supplements during chemotherapy. Irinotecan (CPT-11) is a common chemotherapeutic agent, but it causes side effects, including genotoxicity with damages the DNA of blood cells. The aim of this work was to evaluate the modulating effect of A, C and E vitamins on genotoxic activity of irinotecan (CPT-11) and to analyse the efficacy of DNA repair in lymphocytes of both patients with diagnosed colorectal carcinoma and healthy individuals

in vitro. In healthy donors' cells CPT-11 did not exert a strong, genotoxic effect, both in the presence of vitamins and without them. In turn, a statistically significant increase of DNA migration in the comet tails was noted in patients' lymphocytes. The presence of vitamins A, C and E in incubation solutions acted synergistically, increasing the level of DNA lesions in cells caused by the exposure of the material on tested irinotecan concentrations. Analysis of the efficacy of DNA repair, performed after 2h of postincubation, showed the decrease of DNA percentage in comet tails in all experimental samples.

### **Genotossicità di irinotecan e la sua modulazione da parte delle vitamine A, C e E nei linfociti umani in individui sani e pazienti con cancro**

Molti pazienti in trattamento per uso integratori alimentari il cancro, in particolare antiossidanti, nella speranza di ridurre la tossicità della chemioterapia o radioterapia. Tuttavia, i medici dovrebbero consigliare ai loro pazienti di non usare gli integratori alimentari antiossidanti durante la chemioterapia. Irinotecan (CPT-11) è un agente chemioterapico comune, ma che provoca effetti collaterali, tra cui genotossicità con danni al DNA delle cellule del sangue. Lo scopo di questo lavoro è stato quello di valutare l'effetto di modulazione di A, vitamine C ed E su attività genotossica di irinotecan (CPT-11) e di analizzare l'efficacia della riparazione del DNA in linfociti di entrambi i pazienti con diagnosi di carcinoma del colon-retto e di individui sani in vitro . Nelle cellule donatori sani 'CPT-11 non hanno esercitato un forte effetto genotossico, sia in presenza di vitamine e senza di loro. A sua volta, un aumento statisticamente significativo della migrazione del DNA nella coda della cometa è stata osservata nei linfociti dei pazienti. La presenza di vitamine A, C ed E nelle soluzioni di incubazione ha agito in sinergia, aumentando il livello di lesioni del DNA nelle cellule causati dalla esposizione del materiale sulle concentrazioni di irinotecan testati. Analisi dell'efficacia della riparazione del DNA, effettuato dopo 2h di postincubation, ha mostrato la diminuzione della percentuale di DNA nella coda della cometa in tutti i campioni sperimentali.

181: Yu W, Jia L, Park SK, Li J, Gopalan A, Simmons-Menchaca M, Sanders BG, Kline K.

### **Anticancer actions of natural and synthetic vitamin E forms:RRR-alpha-tocopherol blocks the anticancer actions of gamma-tocopherol.**

Mol Nutr Food Res. 2009 Dec;53(12):1573-81.

Two naturally occurring dietary sources of vitamin E (i.e. RRR-alpha-tocopherol (alphaT) and RRR-gamma-tocopherol (gammaT)), the manufactured synthetic form of vitamin E, all-racemic-alpha-tocopherol (all-rac-alphaT), as well as a potent antitumor analog of vitamin E, RRR-alpha-tocopherol ether-linked acetic acid analog (alpha-TEA), were assessed for anticancer actions. Data showed that gammaT, all-rac-alphaT, and alpha-TEA but not alphaT or alphaT+gammaT significantly inhibited tumor burden of human MDA-MB-231 cells in nude mice.

Immunohistochemical analyses of tumor tissue showed that all-rac-alphaT and alpha-TEA increased apoptosis and decreased proliferation in tumor cells while gammaT was associated with increased tumor cell apoptosis only. In vitro data showed alpha-TEA and gammaT but not all-rac-alphaT or alphaT to inhibit colony formation and induce apoptosis. Anticancer actions of alpha-TEA and gammaT involved death receptor 5 protein upregulation, Survivin protein downregulation and poly (ADP-ribose) polymerase cleavage, all of which were blocked by co-treatment with alphaT. In summary, both gammaT and alpha-TEA exhibited promising anticancer properties in vivo and in vitro, whereas all-rac-alphaT exhibited promising anticancer properties in vivo only. Importantly, alphaT not only failed to exhibit anticancer properties but it also reduced anticancer actions of gammaT in vivo and gammaT and alpha-TEA in vitro.

**Azione anticancro delle forme di vitamina E sintetica e naturale:RRR-alfa-tocoferolo blocca l'azione anti-cancro del gamma-tocoferolo.**

Due naturali fonti alimentari di vitamina E (ad esempio RRR-alfa-tocoferolo (alphaT) e RRR-gamma-tocoferolo (gammaT)), la forma prodotto sintetico della vitamina E, tutto-racemico-alfa-tocoferolo (all-RAC-alphaT ), così come un analogo potente antitumorale della vitamina E, RRR-alfa-tocoferolo etere analogico-linked acido acetico (alfa-TEA), sono stati valutati per le azioni antitumorali. I dati hanno mostrato che gammaT, tutto-rac-alphaT e alfa-TEA, ma non alphaT o alphaT + gammaT inibito significativamente massa tumorale di umano MDA-MB-231 cellule in topi nudi. Analisi immunoistochimica del tessuto tumorale ha mostrato che tutti-rac-alphaT e alfa-TEA aumentata apoptosi e la riduzione della proliferazione delle cellule tumorali, mentre gammaT era associato ad un aumento dell'apoptosi delle cellule tumorali solo. I dati in vitro hanno mostrato alfa-TEA e gammaT ma non tutti-rac-alphaT o alphaT per inibire la formazione di colonie e di indurre apoptosi. Azioni anticancro di alfa-TEA e gammaT recettore morte ha coinvolto 5 upregulation proteine, down-regulation della proteina Survivin e di poli (ADP-ribosio) polimerasi scissione, che sono stati tutti bloccati da co-trattamento con alphaT. In sintesi, sia gammaT e alfa-TEA esposto promettenti proprietà anticancro in vivo e in vitro, mentre tutti-rac-alphaT esposto promettenti proprietà anticancro in vivo solo. Importante, non solo non alphaT presentano proprietà anticancro, ma riduce anche le azioni di gammaT antitumorale in vivo e gammaT e alfa-TEA in vitro.

182: Campbell SE, Musich PR, Whaley SG, Stimmel JB, Leesnitzer LM, Dessus-Babus S, Duffourc M, Stone W, Newman RA, Yang P, Krishnan K.

**Gamma tocopherol upregulates the expression of 15-S-HETE and induces growth arrest through a PPAR gamma-dependent mechanism in PC-3 human prostate cancer cells.**

Nutr Cancer.2009;61(5):649-62.

Chronic inflammation and dietary fat consumption correlates with an increase in prostate cancer. Our previous studies in the colon have demonstrated that gamma-tocopherol treatment could upregulate the expression of peroxisome proliferator-activated preceptors (PPAR) gamma, a nuclear receptor involved in fatty acid metabolism as well modulation of cell proliferation and differentiation. In this study, we explored the possibility that gamma-tocopherol could induce growth arrest in PC-3 prostate cancer cells through the regulation of fatty acid metabolism. Growth arrest (40%) and PPAR gamma mRNA and protein upregulation was achieved with gamma-tocopherol within 6 h. gamma-Tocopherol-mediated growth arrest was demonstrated to be PPAR

gamma dependent using the agonist GW9662 and a PPAR gamma dominant negative vector. gamma-tocopherol was shown not to be a direct PPAR gamma ligand, but rather 15-S-HETE (an endogenous PPAR gamma ligand) was upregulated by gamma-tocopherol treatment. 15-Lipoxygenase-2, a tumor suppressor and the enzyme that converts arachidonic acid to 15-S-HETE, was upregulated at 3 h following gamma-tocopherol treatment. Expression of proteins downstream of the PPAR gamma pathway were examined. Cyclin D1, cyclin D3, bcl-2, and NFkappa B proteins were found to be downregulated following gamma-tocopherol treatment. These data demonstrate that the growth arrest mediated by gamma-tocopherol follows a PPAR-gamma-dependent mechanism.

### **Gamma tocoferolo regola positivamente l'espressione di 15-S-HETE e induce l'arresto della crescita tramite un meccanismo PPAR gamma-dipendente nelle cellule umane di cancro prostatico PC-3**

L'infiammazione cronica e il consumo di grassi alimentari si correla con un aumento del cancro alla prostata. I nostri studi precedenti nel colon hanno dimostrato che il trattamento gamma-tocoferolo potrebbe aumentare l'espressione dei perossisomi precettori proliferator-activated (PPAR) gamma, un recettore nucleare coinvolto nel metabolismo degli acidi grassi e modulazione della proliferazione e differenziazione cellulare. In questo studio, abbiamo esplorato la possibilità che il gamma-tocoferolo può indurre arresto della crescita in PC-3 cellule tumorali della prostata attraverso la regolazione del metabolismo degli acidi grassi. Arresto della crescita (40%) e mRNA PPAR-gamma e upregulation proteina è stata ottenuta con gamma-tocoferolo entro 6 ore arresto della crescita gamma-Tocoferolo-mediata ha dimostrato di essere dipendente PPAR-gamma con il GW9662 agonista PPAR-gamma e di un vettore dominante negativo. gamma-tocoferolo ha dimostrato di non essere una diretta ligando PPAR-gamma, ma 15-S-HETE (un ligando endogeno PPAR-gamma), è stato up-regolato dal trattamento gamma-tocoferolo. 15-lipossigenasi-2, un soppressore del tumore e l'enzima che converte l'acido arachidonico a 15-S-HETE, è up-regolato a 3 ore dopo il trattamento gamma-tocoferolo. Espressione di proteine a valle della filiera di PPAR-gamma sono stati esaminati. Ciclina D1, ciclina D3, Bcl-2 e B NFkappa proteine sono risultate essere inibiti in seguito a trattamento gamma-tocoferolo. Questi dati dimostrano che l'arresto della crescita mediata dalla gamma-tocoferolo segue un meccanismo di PPAR-gamma-dipendente.

184: Kanai K, Kikuchi E, Mikami S, Suzuki E, Uchida Y, Kodaira K, Miyajima A, Ohigashi T, Nakashima J, Oya M.

### **Vitamin E succinate induced apoptosis and enhanced chemosensitivity to paclitaxel in human bladder cancer cells in vitro and in vivo.**

Cancer Sci. 2010 Jan;101(1):216-23.

There have been several studies on the antitumor activities of vitamin E succinate (alpha-TOS) as complementary and alternative medicine. In the present study, we investigated the cytotoxic effect of alpha-TOS and the enhancement of chemosensitivity to paclitaxel by alpha-TOS in bladder cancer. KU-19-19 and 5637 bladder cancer cell lines were cultured in alpha-TOS and/or paclitaxel in vitro. Cell viability, flow cytometric analysis, and nuclear factor-kappa B (NF-kappaB) activity were analyzed. For in vivo therapeutic experiments, pre-established KU-19-19 tumors were treated with alpha-TOS and/or paclitaxel. In KU-19-19 and 5637 cells, the combination treatment resulted in a significantly higher level of growth inhibition, and apoptosis was significantly induced by the combination treatment. NF-kappaB was activated by paclitaxel; however, the activation of NF-

kappaB was inhibited by alpha-TOS. Also, the combination treatment significantly inhibited tumor growth in mice. In the immunostaining of the tumors, apoptosis was induced and proliferation was inhibited by the combination treatment. Combination treatment of alpha-TOS and paclitaxel showed promising anticancer effects in terms of inhibiting bladder cancer cell growth and viability in vitro and in vivo. One of the potential mechanisms by which the combination therapy has synergistic cytotoxic effects against bladder cancer may be that alpha-TOS inhibits NF-kappaB induced by chemotherapeutic agents.

### **Vitamina E succinato induce apoptosi e aumenta la chemiosensibilità al paclitaxel nelle cellule del sangue in vitro and in vivo.**

Ci sono stati diversi studi sulle attività antitumorale della vitamina E succinato (alfa-TOS) come medicina complementare e alternativa. Nel presente studio, abbiamo studiato l'effetto citotossico di alfa-TOS e la valorizzazione di chemiosensibilità al paclitaxel da alfa-TOS nel carcinoma della vescica. KU-19-19 e 5.637 linee di cellule di cancro della vescica sono stati coltivati in alfa-TOS e / o paclitaxel in vitro. Attività di vitalità cellulare, mediante citometria a flusso, e il fattore nucleare-kappa B (NF-kB) sono stati analizzati. Per gli esperimenti in vivo terapeutici, pre-stabilito KU-19-19 i tumori sono stati trattati con alfa-TOS e / o paclitaxel. In KU-19-19 e 5.637 cellule, il trattamento combinato ha portato ad un livello significativamente più alto di inibizione della crescita, e l'apoptosi è stata significativamente indotta dal trattamento di combinazione. NF-kB è stato attivato da paclitaxel, tuttavia, l'attivazione di NF-kB è stata inibita da alfa-TOS. Inoltre, il trattamento combinato ha inibito significativamente la crescita tumorale nei topi. Nel immunocolorazione dei tumori, è stato indotto apoptosi e la proliferazione è stato inibito dal trattamento di combinazione. Il trattamento di combinazione di alfa-TOS e paclitaxel ha mostrato promettenti effetti antitumorali in termini di inibire la crescita delle cellule del cancro della vescica e la vitalità in vitro e in vivo. Uno dei possibili meccanismi con cui la terapia di combinazione ha sinergici effetti citotossici contro il cancro della vescica può essere che l'alfa-TOS inibisce NF-kB indotta da agenti chemioterapici.

190: Franke JC, Plötz M, Prokop A, Geilen CC, Schmalz HG, Eberle J.

### **New caspase-independent but ROS-dependent apoptosis pathways are targeted in melanoma cells by an iron-containing cytosine analogue.**

Biochem Pharmacol. 2010 Feb 15;79(4):575-86.

Chemotherapy resistance and related defects in apoptotic signaling are crucial for the high mortality of melanoma. Effective drugs are lacking, also due to the fact that apoptosis regulation in this tumor is essentially not understood. The cytosine analogue ferropoptoside (N69), which contains an iron carbonyl complex, resulted in strong induction of apoptosis in melanoma cells starting already after 2h, whereas cytotoxicity remained at a low level. Surprisingly, there was no indication for any caspase activation at early times, although cytochrome c was released from mitochondria. Indicative for new proapoptotic pathways was the production of reactive oxygen species (ROS) as an early effect, and the inhibition of apoptosis by the antioxidant vitamin E. Apoptosis was also blocked by exogenous Bcl-2 overexpression and by the pan-protease inhibitor zVAD. However, only zVAD also prevented ROS production, for which Bcl-2 remained without an effect. Thus, new proapoptotic pathways are described here for melanoma cells clearly related to ROS production. A

cascade enclosing enhanced levels of intracellular iron, which lead to enhanced ROS production in a Fenton reaction, appears as suggestive. Whereas off-target effects of zVAD appear as upstream, Bcl-2 may exert its inhibitory activity downstream of ROS. New proapoptotic pathways are of particular interest for melanoma as they may open new options for targeting this highly therapy-refractory tumor.

### **Le vie di apoptosi indipendenti dalle caspasi ma ROS-dipendenti sono gli obiettivi nelle cellule di melanoma tramite un analogo della citosina contenente ferro**

Resistenza alla chemioterapia e difetti relativi a segnalamento apoptotico sono cruciali per l'elevata mortalità del melanoma. Farmaci efficaci sono carenti, anche a causa del fatto che la regolazione dell'apoptosi in questo tumore è essenzialmente non capito. Il ferropoptoside analogico citosina (N69), che contiene un complesso di ferro carbonile, ha provocato una forte induzione di apoptosi in cellule di melanoma che iniziano già dopo 2h, mentre citotossicità è rimasto ad un livello basso. Sorprendentemente, non vi era alcuna indicazione per ogni attivazione delle caspasi, a volte presto, anche se è stato rilasciato il citocromo c dai mitocondri. Indicativo per nuovi percorsi proapoptotici era la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) come un effetto precoce, e l'inibizione della apoptosi da parte della vitamina antiossidante E. L'apoptosi è stata anche bloccata da esogeni sovraespressione di Bcl-2 e dalla l'inibitore della proteasi pan-zVAD. Tuttavia, solo zVAD anche impedito la produzione di ROS, per i quali Bcl-2 è rimasto senza effetto. Di conseguenza, nuovi percorsi proapoptotici sono descritti qui per cellule di melanoma chiaramente legata alla produzione di ROS. Una cascata di inclusione di migliorare il livello di ferro intracellulare, che portano ad una maggiore produzione di ROS in una reazione di Fenton, appare come suggestivo. Considerando che off-target effetti di zVAD appaiono come a monte, Bcl-2 può esercitare la sua attività inibitoria a valle del ROS. Nuovi percorsi proapoptotica sono di particolare interesse per il melanoma in quanto potrebbero aprire nuove opzioni per il targeting questo tumore altamente refrattario alla terapia.

191: Dong YH, Guo YH, Gu XB.

### **[Anticancer mechanisms of vitamin E succinate].**

AiZheng. 2009 Oct;28(10):1114-8. Chinese.

Vitamin E succinate (RRR-alpha-tocopheryl succinate, VES) is an ester derivative of vitamin E. Roles of vitamin E (alpha-tocopherol) family in cancer prevention and therapy have been investigated since 1960s'. Experimental evidences indicated that VES is one of the most effective anticancer compounds of the vitamin E family. VES can effectively inhibit many kinds of tumors without toxic effects on normal cells and tissues. This article reviewed the anticancer mechanisms of VES in the following four aspects: 1) the molecular structure, chemical property and carrier of VES. 2) the mechanisms of VES in inhibiting cancer cell proliferation. 3) the mechanisms of VES-induced apoptosis of cancer cells. 4) the mechanisms of VES in preventing tumor metastasis. Investigation on the anticancer mechanisms of VES would help find new targets and develop new effective and safe drugs for cancer prevention and treatment.

### **[Meccanismi antitumorali della vitamina E succinato].**

La vitamina E succinato (succinato RRR-alfa-tocoferolo, VES) è un estere derivato della vitamina E. I ruoli di vitamina E (alfa-tocoferolo) della famiglia nella prevenzione del cancro e la terapia sono stati indagati dal 1960 '. Evidenze sperimentali indicano che VES è uno dei composti antitumorali più efficaci per la famiglia della vitamina. VES può inibire in modo efficace molti tipi di tumori senza effetti tossici sulle cellule normali e tessuti. Questo articolo in rassegna i meccanismi antitumorali della VES nei seguenti quattro aspetti: 1) la struttura molecolare, proprietà chimiche e portatore di VES. 2) i meccanismi della VES nella proliferazione delle cellule tumorali inibendo. 3) i meccanismi della VES apoptosi indotta delle cellule tumorali. 4) i meccanismi della VES nel prevenire le metastasi del tumore. Indagine sui meccanismi antitumorali della VES potrebbe aiutare a trovare nuovi obiettivi e di sviluppare nuovi farmaci efficaci e sicuri per la prevenzione e il trattamento del cancro.

192: Badraoui R, Blouin S, Moreau MF, Gallois Y, Rebai T, Sahnoun Z, Baslé M, Chappard D.

### **Effect of alpha tocopherol acetate in Walker 256/B cells-induced oxidative damage in a rat model of breast cancer skeletal metastases.**

Chem BiolInteract. 2009 Dec 10;182(2-3):98-105.

The pathophysiological changes and the oxidative-antioxidative status were evaluated in the bone microenvironment of rat inoculated with Walker 256/B mammary gland carcinoma cells, and used alpha-tocopherol acetate (ATA) as a countermeasure. Walker 256/B cells were injected into the right femora of aged male rats. Animals were randomized into three groups: 12 rats were injected with saline (control group); 14 rats were injected with Walker 256/B cells ( $5 \times 10^4$ ) in the medullar cavity (W256 group); 14 rats were inoculated with Walker 256/B cells and treated with ATA (45mg/kg BW) (W256+ATA group). After 20 days, rats were euthanized and the femurs were radiographed. Micro architectural parameters were measured by microcomputed tomography and

histology. Serum, bone and bone marrow were evaluated for oxidative damage. In parallel, cell cultures were done in the presence of ATA and ROS were measured by fluorescence; apoptotic cells were determined in parallel. W256 groups had osteolytic damages with marked resorption of cortical and trabecular bone. W256+ATA animals presented marked osteosclerotic areas associated with tumor necrosis areas inside the bone cavity. Levels of lipid peroxidation and protein oxidation were found to increase in W256 rats; a significant reduction in SOD and GSH-p activities was also observed. W256+ATA group had significantly reduced oxidative damage, but not reversed back to the control levels. The present study shows that Walker 256/B cells induce skeletal metastases associated with oxidative damage in the bone microenvironment. ATA reduced the oxidative stress damage, enhanced osteosclerosis and tumor cell apoptosis both in vitro and in vivo.

### **Effetti di alfa tocoferolo acetato nelle cellule Walker 256/B che inducono danno ossidativo in un modello di ratto con metastasi scheletriche di cancro al seno**

Le alterazioni fisiopatologiche e lo stato ossidativo-antiossidanti sono stati valutati nel microambiente osseo di topo inoculato con Walker 256 / B mammaria cellule di carcinoma della ghiandola, e utilizzati acetato di alfa-tocoferolo (ATA) come contromisura. Walker 256 / B cellule sono state iniettate nel femore destro di età compresa tra ratti maschi. Gli animali sono stati randomizzati in tre gruppi: 12 ratti sono stati iniettati con soluzione fisiologica (gruppo di controllo), 14 topi sono stati iniettati con Walker 256 / cellule B ( $5 \times 10^4$ ) nella cavità midollare (gruppo W256), 14 topi sono stati inoculati con Walker 256 / B e le cellule trattate con ATA (45mg/kg di peso corporeo) (W256 + gruppo ATA). Dopo 20 giorni, i ratti sono stati sottoposti ad eutanasia e il femore sono stati radiografati. Micro parametri architetonici sono stati misurati mediante tomografia microcomputata e istologia. Siero, ossa e midollo osseo sono state valutate per il danno ossidativo. In parallelo, le colture cellulari sono stati fatti in presenza di ATA e ROS sono stati misurati mediante fluorescenza; cellule apoptotiche sono state determinate in parallelo. Gruppi W256 danni dovuti osteolitiche con marcato riassorbimento dell'osso corticale e trabecolare. Animali W256 + ATA presentato zone segnalate, osteoaddensanti associati con aree di necrosi del tumore all'interno della cavità ossea. I livelli di perossidazione lipidica e l'ossidazione delle proteine sono risultate in aumento W256 ratti; una riduzione significativa della SOD e le attività di GSH-p è stata inoltre osservata. Gruppo W256 + ATA ha ridotto significativamente i danni ossidativi, ma

non invertire di nuovo i livelli di controllo. Il presente studio dimostra che Walker 256 / cellule B indurre metastasi scheletriche associate a danno ossidativo nel microambiente osseo. ATA ridotto i danni dello stress ossidativo, osteosclerosi avanzata e l'apoptosi delle cellule tumorali sia in vitro che in vivo.

195: Wali VB, Bachawal SV, Sylvester PW.

### **Endoplasmic reticulum stress mediates gamma-tocotrienol-induced apoptosis in mammary tumor cells.**

Apoptosis. 2009Nov;14(11):1366-77.

gamma-Tocotrienol, a member of the vitamin E family of compounds, induces apoptosis in a variety of cancer cell types. However, previous studies have clearly demonstrated that gamma-tocotrienol-induced apoptosis in neoplastic mouse +SA mammary epithelial cells is not mediated

through mitochondrial stress or death receptor apoptotic signaling. Therefore, studies were conducted to determine the role of endoplasmic reticulum (ER) stress in mediating gamma-tocotrienol-induced apoptosis in +SA mammary tumor cells. Treatment with 15-40 microM gamma-tocotrienol induced +SA cell death in a dose-responsive manner, and these effects were associated with a corresponding increase in poly (ADP-ribose) polymerase (PARP)-cleavage and activation of protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase/eukaryotic translational initiation factor/activating transcription factor 4 (PERK/eIF2alpha/ATF-4) pathway, a marker of ER stress response. These treatments also caused a large increase in C/EBP homologous protein (CHOP) levels, a key component of ER stress mediated apoptosis that increases expression of tribbles 3 (TRB3). Knockdown of CHOP by specific siRNAs attenuated gamma-tocotrienol-induced PARP-cleavage, CHOP and TRB3 expression. gamma-Tocotrienol treatment also reduced full-length caspase-12 levels, an indication of caspase-12 cleavage and activation. Intracellular levels of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMGCoA) reductase, an ER-transmembrane enzyme catalyzing the synthesis of mevalonate, decreased following gamma-tocotrienol treatment, but combined treatment with mevalonate did not reverse gamma-tocotrienol-induced apoptosis, suggesting that a decrease in HMGCoA reductase activity is not required for gamma-tocotrienol induced apoptosis. These results demonstrate that ER stress apoptotic signaling is associated with gamma-tocotrienol-induced apoptosis in +SA mammary tumor cells.

### **Lo stress del reticolo endoplasmico media l'apoptosi indotta dal gamma-tocotrienolo nelle cellule tumorali mammarie**

gamma-Tocotrienolo, un membro della famiglia di vitamina E di composti, induce apoptosi in una varietà di tipi di cellule tumorali. Tuttavia, studi precedenti hanno dimostrato chiaramente che il gamma-tocotrienolo induce apoptosi nel topo neoplastico + cellule mammarie epiteliali SA non è mediata da recettori stress mitocondriale o morte apoptotica di segnalazione. Pertanto, gli studi sono stati condotti per determinare il ruolo del reticolo endoplasmatico (ER) stress nella mediazione gamma-tocotrienolo indotta apoptosi nelle cellule tumorali + SA mammarie. Il trattamento con 15-40 microM gamma-tocotrienolo induce morte cellulare indotta + SA in modo dose-risposta, e questi effetti sono stati associati con un aumento corrispondente della poli (ADP-ribosio) polimerasi (PARP)-scissione e l'attivazione della proteina chinasi-simile reticolo endoplasmatico chinasi / eucariotiche fattore di iniziazione traslazionale / attivazione di fattore di trascrizione 4 (PERK/eIF2alpha/ATF-4) percorso, un marker di risposta allo stress ER. Questi trattamenti anche causato un forte aumento di

C / EBP proteina omologa (CHOP) i livelli, un componente chiave di apoptosi mediata da ER stress che aumenta l'espressione di triboli 3 (TRB3). Colpo di Chop di siRNA specifici attenuato gamma-tocotrienolo indotta PARP-scissione, CHOP e di espressione TRB3. trattamento gamma-Tocotrienolo ridotto anche full-length caspasi-12 livelli, l'indicazione della caspasi-12 e la scissione di attivazione. Livelli intracellulari di 3-idrossi-3-metilglutaril-coenzima A (HMGCoA) reductasi, un enzima ER-transmembrana catalizza la sintesi di mevalonato, è diminuito in seguito al trattamento gamma-tocotrienolo, ma il trattamento combinato con mevalonato non ha invertito l'apoptosi gamma-tocotrienolo indotta, Suggestendo che una diminuzione dell'attività HMG-CoA reductasi non è richiesta per l'apoptosi indotta gamma-tocotrienolo. Questi risultati dimostrano che lo stress ER apoptotico segnalazione è associata con l'apoptosi gamma-tocotrienolo + indotta in cellule mammarie tumorali SA.

200: Ju J, Picinich SC, Yang Z, Zhao Y, Suh N, Kong AN, Yang CS.

**Cancer-preventive activities of tocopherols and tocotrienols.**

Carcinogenesis.2010 Apr;31(4):533-42.

The cancer-preventive activity of vitamin E has been studied. Whereas some epidemiological studies have suggested a protective effect of vitamin E against cancer formation, many large-scale intervention studies with alpha-tocopherol (usually large doses) have not demonstrated a cancer-preventive effect. Studies on alpha-tocopherol in animal models also have not demonstrated robust cancer prevention effects. One possible explanation for the lack of demonstrable cancer-preventive effects is that high doses of alpha-tocopherol decrease the blood and tissue levels of delta-tocopherols. It has been suggested that gamma-tocopherol, due to its strong anti-inflammatory and other activities, may be the more effective form of vitamin E in cancer prevention. Our recent

results have demonstrated that a gamma-tocopherol-rich mixture of tocopherols inhibits colon, prostate, mammary and lung tumorigenesis in animal models, suggesting that this mixture may have a high potential for applications in the prevention of human cancer. In this review, we discuss biochemical properties of tocopherols, results of possible cancer-preventive effects in humans and animal models and possible mechanisms involved in the inhibition of carcinogenesis. Based on this information, we propose that a gamma-tocopherol-rich mixture of tocopherols is a very promising cancer-preventive agent and warrants extensive future research.

### **Attività che prevengono il cancro di tocoferoli e tocotrienoli.**

L'attività di prevenzione del cancro della vitamina E è stata studiata. Considerando che alcuni studi epidemiologici hanno suggerito un effetto protettivo della vitamina E contro la formazione del cancro, molti studi di intervento su larga scala con l'alfa-tocopherolo (di solito grandi dosi) non hanno dimostrato un effetto di prevenzione del cancro. Studi su alfa-tocopherolo in modelli animali, inoltre, non hanno dimostrato effetti robusto prevenzione del cancro. Una possibile spiegazione per l'assenza di dimostrabili effetti di prevenzione del cancro è che alte dosi di alfa-tocopherolo diminuire i livelli nel sangue e nei tessuti di delta-tocopheroli. È stato suggerito che il gamma-tocopherolo, grazie alla sua forte attività anti-infiammatorie e di altri, può essere la forma più efficace della vitamina E nella prevenzione del cancro. I nostri risultati recenti hanno dimostrato che una miscela di gamma-tocopherolo, ricca di tocoferoli inibisce colon, prostata, mammella e polmone tumorigenesis in modelli animali, suggerendo che questa miscela potrebbe avere un alto potenziale per le applicazioni nella prevenzione del cancro umano. In questa revisione, discuteremo le proprietà biochimiche di tocoferoli, i risultati di eventuali effetti di prevenzione del cancro negli esseri umani e su modelli animali e possibili meccanismi coinvolti nella inibizione della carcinogenesi. Sulla base di queste informazioni, proponiamo che una miscela di gamma-tocopherolo ricca di tocoferoli è un agente molto promettente cancro-preventivi e garantisce un'ampia ricerca futura.

205: Ueda N, Suzuki Y, Rino Y, Takahashi T, Imada T, Takanashi Y, Kuroiwa Y.

### **Correlation between neurological dysfunction with vitamin E deficiency and gastrectomy.**

J Neurol Sci. 2009 Dec 15;287(1-2):216-20.

**OBJECTIVE:** We previously reported on vitamin E malabsorption after gastrectomy. In this study, we focused on neurological dysfunction due to serum vitamin E decrease during the postgastrectomy period in larger number of patients.

**METHODS:** We examined the type of gastrectomy, type of reconstruction, serum vitamin E level, and neurological status for 96 gastrectomy patients.

**RESULTS:** Low serum vitamin E levels were observed in 20 patients, and 10 of those patients suffered some neurological symptoms, i.e., peripheral neuropathy, limb or truncal ataxia. Vitamin E

levels tended to decrease with time after gastrectomy, and the number of patients with low serum vitamin E levels increased at about 50 months after gastrectomy. This relationship was stronger in total gastrectomy patients than in subtotal gastrectomy patients. Ten patients were given oral vitamin E, and serum vitamin E levels normalized in 9 of the patients and neurological abnormalities improved in 8 patients. An oral intake of 300 mg or more of vitamin E was necessary for normalization of vitamin E levels.

**CONCLUSIONS:** Gastrectomy should be considered a risk for vitamin E deficiency and neurological disturbance over the long-term clinical course. An oral vitamin E supply can improve serum vitamin E levels and neurological symptoms.

### **Correlazione tra disfunzioni neurologiche e carenza di vitamina E e gastrectomia**

**OBIETTIVO:** Abbiamo precedentemente riportato da malassorbimento di vitamina E dopo gastrectomia. In questo studio, ci siamo concentrati sulla disfunzione neurologica a causa della diminuzione di vitamina E nel siero durante il periodo postgastrectomy in lager numero di pazienti.

**METODI:** Abbiamo esaminato il tipo di gastrectomia, il tipo di ricostruzione, livelli sierici di vitamina E, e lo stato neurologico per 96 pazienti gastrectomia.

**RISULTATI:** Basso livelli sierici di vitamina E sono state osservate in 20 pazienti e 10 di questi pazienti ha sofferto di alcuni sintomi neurologici, cioè, neuropatia periferica, atassia degli arti o del tronco. Livelli di vitamina E tendono a diminuire con il tempo dopo gastrectomia, e il numero di pazienti con bassi livelli sierici di vitamina E aumentato a circa 50 mesi dopo gastrectomia. Questo rapporto è stato più forte nei pazienti gastrectomia totale rispetto ai pazienti di gastrectomia subtotale. Dieci pazienti hanno ricevuto per via orale di vitamina E, e livelli sierici di vitamina E normalizzati in 9 dei pazienti e di anomalie neurologiche migliorati in 8 pazienti. Una assunzione orale di 300 mg o più di vitamina E era necessaria per la normalizzazione dei livelli di vitamina.

**CONCLUSIONI:** Gastrectomia deve essere considerato un rischio per la carenza di vitamina E e disturbi neurologici nel corso clinico a lungo termine. Un alimentazione orale di vitamina E può migliorare i livelli sierici di vitamina E e sintomi neurologici.

206: Fu JY, Blatchford DR, Tetley L, Dufès C.

### **Tumor regression after systemic administration of tocotrienol entrapped in tumor-targeted vesicles.**

J ControlRelease. 2009 Dec 3;140(2):95-9.

The therapeutic potential of tocotrienol, an extract of vitamin E with anti-cancer properties, is hampered by its failure to specifically reach tumors after intravenous administration, without secondary effects on normal tissues. We hypothesize that the encapsulation of tocotrienol-rich fraction (TRF) within vesicles bearing transferrin, whose receptors are overexpressed on many cancer cells, could result in a selective delivery to tumors after intravenous administration. The objectives of this study are therefore to prepare and characterize transferrin-targeted vesicles encapsulating TRF, and to evaluate their therapeutic efficacy in vitro and in vivo. The entrapment of TRF in transferrin-bearing vesicles led to a 3-fold higher TRF uptake and more than 100-fold improved cytotoxicity in A431 (epidermoid carcinoma), T98G (glioblastoma) and A2780 (ovarian

carcinoma) cell lines compared to TRF solution. The intravenous administration of TRF encapsulated in transferrin-bearing vesicles led to tumor regression and improvement of animal survival in a murine xenograft model, contrary to that observed with controls. The treatment was well tolerated by the animals. This work corresponds to the first preparation of a tumor-targeted delivery system able to encapsulate tocotrienol. Our findings show that TRF encapsulated in transferrin-bearing vesicles is a highly promising therapeutic system, leading to tumor regression after intravenous administration without visible toxicity.

### **Regressione del tumore dopo somministrazione sistemica di tocotrienolo intrappolato in vescicole.**

Il potenziale terapeutico di tocotrienolo, un estratto di vitamina E con proprietà anti-cancro, è ostacolata dalla sua incapacità di raggiungere in particolare i tumori dopo somministrazione per via endovenosa, senza effetti secondari su tessuti normali. Noi ipotizziamo che l'incapsulamento della frazione tocotrienolo ricchi (FR) entro vescicole transferrina cuscinetto, i cui recettori sono sovraespressi su molte cellule cancerose, potrebbe portare a una consegna selettivo ai tumori dopo somministrazione endovenosa. Gli obiettivi di questo studio sono quindi di preparare e caratterizzare vescicole transferrina mirati incapsulante TRF, e di valutare la loro efficacia terapeutica in vitro e in vivo. L'intrappolamento del TRF in vescicole transferrina-cuscinetto ha portato ad un assorbimento di 3 volte superiore TRF e più di citotossicità 100 volte migliore in A431 (carcinoma epidermoide), T98G (glioblastoma) e A2780 (carcinoma ovarico) le linee di cellule rispetto alla soluzione Fondazione. La somministrazione endovenosa di TRF incapsulati in vescicole transferrina-cuscinetto ha portato alla regressione del tumore e il miglioramento della sopravvivenza degli animali in un modello murino xenotrapianto, contrariamente a quanto osservato con i controlli. Il trattamento è stato ben tollerato dagli animali. Questo lavoro corrisponde alla prima preparazione di un sistema di consegna tumore mirati in grado di incapsulare tocotrienolo. I nostri risultati mostrano che TRF incapsulati in vescicole transferrina-che porta è un sistema terapeutico molto promettente, che porta alla regressione del tumore dopo somministrazione per via endovenosa, senza tossicità visibile.

207: Wang D, Chuang HC, Weng SC, Huang PH, Hsieh HY, Kulp SK, Chen CS.

### **alpha-Tocopheryl succinate as a scaffold to develop potent inhibitors of breast cancer cell adhesion.**

J Med Chem. 2009 Sep 24;52(18):5642-8.

This study is aimed at the pharmacological exploitation of alpha-tocopheryl succinate (1) to develop potent antiadhesion agents. Considering the structural cooperativity between the phytyl chain and the carboxylic terminus in determining the antiadhesion activity, our structural optimization led to compound 5 ([2-(4,8-dimethyl-non-1-enyl)-2,5,7,8-tetramethyl-chroman-6-yloxy]-acetic acid), which exhibited an-order-of-magnitude higher potency than 1 in blocking the adhesion of 4T1 metastatic breast cancer cells to extracellular matrix proteins (IC(50), 0.6 microM versus 10 microM). Evidence indicates that the ability of compound 5 to block cell adhesion and migration was attributable to its effect on disrupting focal adhesion and actin cytoskeletal integrity by

facilitating the degradation of focal adhesion kinase. Interactions between tumor cells and the ECM in the tumor microenvironment have been increasingly recognized as critical modulators of the metastatic potential of tumor cells. Consequently, the ability of compound 5 to block such interactions provides a unique pharmacological tool to shed light onto mechanisms that govern cell adhesion and tumor metastasis.

### **Alfa-tocoferile succinato come “impalcatura” per sviluppare potenti inibitori di adesione delle cellule del cancro al seno.**

Questo studio è finalizzato alla valorizzazione farmacologica di alfa-tocoferolo succinato (1) sviluppare agenti antiaderenza potente. Considerando la cooperatività strutturale tra la catena phytyl e il capolinea carbossilici nel determinare l'attività di antiaderenza, la nostra ottimizzazione strutturale ha portato a composti 5 ([2 - (4,8-dimetil-non-1-enil) -2,5,7,8 -acido tetrametil-chroman-6-ilossi]-acetico), che ha mostrato una potenza e-ordine di grandezza superiore a 1 nel bloccare l'adesione delle cellule del seno 4T1 carcinoma metastatico del colon per proteine della matrice extracellulare (IC (50), 0,6 microM contro 10 microM). Le prove indicano che la capacità del composto da 5 a bloccare l'adesione cellulare e la migrazione era imputabile a interrompere il suo effetto sulla adesione focale e l'integrità del citoscheletro di actina, facilitando la degradazione di adesione chinasi focale. Le interazioni tra cellule tumorali e l'ECM nel microambiente tumorale sono state sempre più riconosciuto come modulatori critico del potenziale metastatico delle cellule tumorali. Di conseguenza, la capacità di composto da 5 a bloccare tali interazioni fornisce uno strumento unico farmacologico per far luce su meccanismi che regolano l'adesione cellulare e la metastasi tumorale.

208: Tong SY, Lee JM, Song ES, Lee KB, Kim MK, Yun YM, Lee JK, Son SK, Lee JP, Kim JH, Hur SY, Kwon YI.

### **The effects of polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR), methionine synthase (MTR), and methionine synthase reductase (MTRR) on the risk of cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer in Korean women.**

Gynecol Oncol. 2009 Nov;115(2):272-6.

The purpose of the study was to investigate the association between cervical cancer risk and single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in three one-carbon metabolism genes, methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR), methionine synthase (MTR), and methionine synthase reductase (MTRR) in Korean women. Twelve SNPs were identified in MTHFR, MTR, and MTRR in the 927 case-control samples, which included 165 cervical intraepithelial neoplasia 1

(CIN1), 167 cervical intraepithelial neoplasia 2 and 3 (CIN2/3), 155 cervical cancer patients, and 440 normal controls. The frequencies of the genotypes and haplotypes were assessed in the controls, CINs, and cervical cancers. Individual carriers of the variant allele C of MTHFR A1298C (rs1801131) had a 0.64-fold [95% confidence interval (CI): 0.42-0.98] decreased risk for CIN2/3 compared with common homozygotes. However, no significant association was found between most other variants and cervical cancer risk. The results also identified an increased CIN1 risk in carriers with at least one copy of haplotype 3 in the MTHFR gene (odds ratio, 1.88; 95% CI: 1.03-3.42). In conclusion, there was no significant association between most SNPs in MTHFR, MTR, or MTRR and the risk of CIN and cervical cancer in Korean women. In addition, there was no significant association of MTHFR haplotypes with risk of CIN2/3 and cervical cancer.

**Gli effetti di polimorfismi in metilene-tetraidrofolato reduttasi (MTHFR), metionina sintetasi (MTR), e metionina sintetasi reduttasi (MTRR) sul rischio di neoplasia intraepiteliale cervicale e il cancro del collo dell'utero nelle donne coreane.**

Lo scopo dello studio era di esaminare l'associazione tra rischio di cancro del collo dell'utero e di polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) in geni del metabolismo tre uno di carbonio, metilene-tetraidrofolato reduttasi (MTHFR), metionina sintetasi (MTR), e metionina sintetasi reduttasi (MTRR) in Donne coreane. Dodici SNP sono stati identificati in MTHFR, MTR, e MTRR in 927 campioni di caso-controllo, che includeva 165 neoplasia intraepiteliale cervicale di 1 (CIN1), 167 neoplasia intraepiteliale cervicale di 2 e 3 (CIN2 / 3), 155 pazienti con cancro del collo dell'utero, e 440 controlli normali. Le frequenze dei genotipi e aplotipi sono stati valutati nei controlli, CINS, e carcinomi del collo dell'utero. Singoli vettori della variante C allele di MTHFR A1298C (rs1801131) aveva un 0,64 volte [intervallo di confidenza al 95% (CI): 0,42-0,98], una diminuzione del rischio di CIN2 / 3 rispetto a omozigoti comune. Tuttavia, nessuna associazione significativa è stata trovata tra più altre varianti e rischio di cancro cervicale. I risultati hanno anche identificato un rischio aumentato CIN1 di vettori con almeno una copia di aplotipo 3 nel gene MTHFR (odds ratio, 1,88; 95% CI: 1,03-3,42). In conclusione, non vi era alcuna significativa associazione tra più SNPs in MTHFR, MTR, o MTRR e il rischio di CIN e cancro del collo dell'utero nelle donne coreane. Inoltre, non vi era alcuna significativa associazione di aplotipi MTHFR con il rischio di CIN2 / 3 e cancro del collo dell'utero.

228: Yang Z, Xiao H, Jin H, Koo PT, Tsang DJ, Yang CS.

**Synergistic actions of atorvastatin with gamma-tocotrienol and celecoxib against human colon cancer HT29 and HCT116 cells.**

Int J Cancer. 2010 Feb 15;126(4):852-63.

The synergistic actions of atorvastatin (ATST) with gamma-tocotrienol (gamma-TT) and celecoxib (CXIB) were studied in human colon cancer cell lines HT29 and HCT116. The synergistic inhibition of cell growth by ATST and gamma-TT was demonstrated by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay and isobologram analysis. delta-TT exhibited a similar inhibitory action when combined with ATST. Mevalonate and geranylgeranyl pyrophosphate eliminated most of the growth inhibitory effect of ATST, but only marginally

decreased that of gamma-TT; whereas farnesyl pyrophosphate and squalene exhibited little effect on the inhibitory action of ATST and gamma-TT, indicating protein geranylgeranylation, but not farnesylation are involved in the inhibition of colon cancer cell growth. Both mevalonate and squalene restored the cellular cholesterol level that was reduced by ATST treatment, but only mevalonate eliminated the cell growth inhibitory effect, suggesting that the cholesterol level in cells does not play an essential role in inhibiting cancer cell growth. Protein level of HMG-CoA reductase increased after ATST treatment, and the presence of gamma-TT attenuated the elevated level of HMG-CoA reductase. ATST also decreased membrane-bound RhoA, possibly due to a reduced level of protein geranylgeranylation; addition of gamma-TT enhanced this effect. The mediation of HMG-CoA reductase and RhoA provides a possible mechanism for the synergistic action of ATST and gamma-TT. The triple combination of ATST, gamma-TT and CXIB showed a synergistic inhibition of cancer cell growth in MTT assays. The synergistic action of these three compounds was also illustrated by their induction of G(0)/G(1) phase cell cycle arrest and apoptosis.

### **Azioni sinergiche di atorvastatina con gamma-tocotrienoli e celecoxib contro cellule HT29 e HCT116 di cancro del colon.**

L'azione sinergica di atorvastatina (ATST) con gamma-tocotrienoli (gamma-TT) e celecoxib (CXIB) sono state studiate in cellule umane del colon HT29 cancro linee e HCT116. L'inibizione della crescita cellulare sinergica da parte ATST e gamma-TT è stata dimostrata da 3 - (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromuro (MTT), test e analisi isobologram. delta-TT mostrato una simile azione inibitoria quando combinato con ATST. Mevalonato e pirofosfato geranylgeranyl eliminato la maggior parte degli effetti di inibizione della crescita ATST, ma solo marginalmente diminuito quello dei gamma-TT; che farnesil pirofosfato e squalene esposto poco effetto sulla azione inibitoria di ATST e gamma TT, indicando geranylgeranylation proteine, ma non farnesylation sono coinvolti nella inibizione della crescita delle cellule tumorali del colon. Sia mevalonato e squalene ripristinato il livello di colesterolo cellulare che è stata ridotta dal trattamento ATST, ma solo mevalonato eliminato l'effetto di inibizione della crescita cellulare, suggerendo che il livello di colesterolo nelle cellule non svolgono un ruolo essenziale nella crescita delle cellule tumorali inibendo. Livello di proteina della HMG-CoA reductasi è aumentato dopo trattamento ATST, e la presenza di gamma-TT attenuato l'elevato livello della HMG-CoA reductasi. ATST diminuito anche legata alla membrana RhoA, probabilmente a causa di un ridotto livello di

geranylgeranylation proteine; aggiunta di gamma-TT potenziato questo effetto. La mediazione di HMG-CoA reductasi e RhoA fornisce un possibile meccanismo per l'azione sinergica di ATST e gamma-TT.

La tripla combinazione di ATST, gamma-TT e CXIB ha mostrato una inibizione della crescita sinergica delle cellule di cancro nei test MTT. L'azione sinergica di questi tre composti è stato illustrato anche dalla loro induzione di G (0) / G (1) arresto fase del ciclo cellulare e apoptosi.

231: Krcmová L, Urbánek L, Solichová D, Kasparová M, Vlcková H, Melichar B, Sobotka L, Solich P.

**HPLC method for simultaneous determination of retinoids and tocopherols in human serum for monitoring of anticancer therapy.**

J Sep Sci. 2009 Aug;32(15-16):2804-11.

A simple and rapid HPLC method requiring small volumes (250 microL) of human serum after C18 SPE sample preparation was developed using monolithic technology for simultaneous determination of all-trans-retinoic acid, 13-cis-retinoic acid, retinol, gamma- and alpha-tocopherol. The monolithic column, Chromolith Performance RP-18e (100x4.6 mm), was operated at ambient temperature. The mobile phase consisted of a mixture of acetonitrile (ACN) and 1% ammonium acetate in water (AMC) at pH 7.0. The mobile phase started at 98:2 (v/v) ACN/AMC (column pre-treatment) at a flow rate of 2 mL/min, then changed to 95:5 (v/v) ACN/AMC for 4 min at a flow

rate of 1.5 mL/min and a further 3 min at a flow rate of 3.2 mL/min. Detection and identification were performed using a photodiode array detector. Retinol, 13-cis- and all-trans-retinoic acid were monitored at 325 nm. Both alpha- and gamma-tocopherol were detected at 295 nm. The total analysis time was 7.2 min. Tocol (synthesized tocopherol, not occurring in humans) was used as internal standard. The method was linear in the range of 0.125-10.00 micromol/L for all-trans-retinoic acid, 0.125-5.00 micromol/L for 13-cis-retinoic acid, 0.25-10.00 micromol/L for retinol, 0.5-50.00 micromol/L for gamma-tocopherol, and 0.5-50.00 micromol/L for alpha-tocopherol. The present method may be useful for monitoring of retinoids and tocopherols in clinical studies.

### **Metodo HPLC per la determinazione simultanea di retinoidi e tocoferoli nel siero umano per il monitoraggio della terapia antitumorale.**

Un metodo semplice e rapido HPLC richiedono piccoli volumi (250 microL) di siero umano, dopo la preparazione del campione SPE C18 è stata sviluppata utilizzando la tecnologia monolitica per la determinazione simultanea di acido all-trans retinoico, acido 13-cis-retinoico, retinolo, alfa e gamma-tocopherolo. La colonna monolitica, Chromolith Performance RP-18e (100x4.6 mm), è stato operato a temperatura ambiente. La fase mobile costituita da una miscela di acetonitrile (ACN) e acetato di ammonio 1% in acqua (AMC) a pH 7.0. La fase mobile iniziato a 98:2 (v / v) ACN / AMC (colonna di pre-trattamento), con un flusso di 2 ml / min, poi cambiato in 95:5 (v / v) ACN / AMC per 4 min a una portata di 1,5 ml / min e di un ulteriore 3 min con un flusso di 3,2 mL / min. Rilevazione e l'identificazione sono stati eseguiti utilizzando un rivelatore fotodiode array. Retinolo, 13-cis-e tutto-trans retinoico sono stati monitorati a 325 nm. Sia alfa e gamma-tocopherolo sono stati rilevati a 295 nm. Il tempo di analisi totale è stato di 7.2 min. Tocollo (tocopherolo di sintesi, non riscontrabili nell'uomo) è stato utilizzato come standard interno. Il metodo è stato lineare nel range di,125-10,00 micromol / L per l'acido all-trans retinoico, 0,125-5,00 micromol / L per l'acido 13-cis-retinoico, 0,25-10,00 micromol / L per il retinolo, 0,5-50,00 micromol / L per il gamma-tocopherolo, e 0,5-50,00 micromol / L per l'alfa-tocopherolo. Il presente metodo può essere utile per il monitoraggio dei retinoidi e tocoferoli negli studi clinici.

232: Ma H, Das T, Pereira S, Yang Z, Zhao M, Mukerji P, Hoffman RM.

### **Efficacy of dietary antioxidants combined with a chemotherapeutic agent on human colon cancer progression in a fluorescent orthotopic mouse model.**

Anticancer Res. 2009Jul;29(7):2421-6.

We report here the efficacy of dietary antioxidants in combination with chemotherapy on tumor growth in the orthotopic COLO-205-green fluorescent protein (GFP) human colon cancer mouse model. The orthotopically-transplanted nude mice used for the study were randomly divided into 5 groups (A-E) after surgical orthotopic implantation (SOI) of tumor tissue. The following diets were given: Diet A, modified AIN-93M mature rodent diet with 4% fish oil; Diet B, modified AIN-93M which contains added antioxidants vitamin A, vitamin E, and selenium at levels present in the standard AIN-93M diet; Diet C, Diet A without added antioxidants vitamin A, vitamin E, or

selenium; Diet D, Diet A with 5 times the amount of added antioxidants vitamin A, vitamin E, and selenium present in Diet B. Cisplatin, 7 mg/kg, was administered intraperitoneally on day 16 after SOI. Throughout the course of treatment, noninvasive whole-body imaging, based on the GFP expression of the tumor, permitted visualization of tumor progression. At sacrifice, the mean tumor weights showed significant statistical differences in all of the treated groups compared to the negative control (no cisplatin treatment) ( $p < 0.001$ ). The mean tumor weight showed a significant statistical difference between the Diet D combined with the cisplatin group compared to Diet B combined with cisplatin ( $p=0.038$ ). Thus, we have demonstrated that Diet D is effective against tumor growth in combination with cisplatin in the fluorescent mouse model of colon cancer COLO-205 GFP. The results of the present study therefore indicate enhancement of cisplatin efficacy by high-dose antioxidants in combination with fish oil for colon cancer progression and suggests the design of clinical trials for this regimen.

### **L'efficacia di antiossidanti nella dieta combinata con un agente chemioterapico sulla progressione del tumore del colon umano in un modello di mouse fluorescente orto topica.**

Segnaliamo qui l'efficacia degli antiossidanti nella dieta in combinazione con la chemioterapia sulla crescita del tumore nel ortotopico proteina COLO-205-verde fluorescente (GFP) umane di cancro del colon modello di mouse. I topi trapiantati ortotopicamente-nude utilizzato per lo studio sono stati divisi in 5 gruppi (AE) dopo l'impianto chirurgico ortotopico (SOI), del tessuto tumorale. Le diete sono stati dati i seguenti: Dieta A, modificato AIN-93M dieta maturo roditori con olio di pesce 4%; dieta B, modificato AIN-93M, che contiene vitamina aggiunto antiossidanti A, vitamina E, selenio e gli attuali livelli nella norma AIN-93M dieta, dieta C, la dieta senza aggiunte di vitamine antiossidanti A, vitamina E, selenio o, D Diet, la dieta di una con 5 volte la quantità di vitamina aggiunto antiossidanti A, vitamina E, selenio e presente nella dieta B. Cisplatino, 7 mg / kg, è stato somministrato per via intraperitoneale il giorno 16 dopo SOI. Durante tutto il corso del trattamento, non invasivo del corpo intero, in base all'espressione di GFP del tumore, ha permesso la visualizzazione di progressione del tumore. Al sacrificio, il peso medio del tumore hanno mostrato differenze statisticamente significative in tutti i gruppi trattati rispetto al controllo negativo (nessun trattamento con cisplatino) ( $p < 0,001$ ). Il peso medio del tumore hanno mostrato una differenza statisticamente significativa tra il D dieta combinata con il gruppo di cisplatino rispetto alla dieta B

in combinazione con cisplatino ( $p = 0,038$ ). Quindi, abbiamo dimostrato che la dieta D è efficace contro la crescita tumorale in combinazione con cisplatino nel modello murino fluorescente di cancro del colon COLO-205 GFP. I risultati del presente studio indicano dunque la valorizzazione di efficacia cisplatino dagli antiossidanti ad alte dosi in combinazione con olio di pesce per la progressione del cancro al colon e propone la progettazione di test clinici per questo regime.

241: Lim SJ, Choi MK, Kim MJ, Kim JK.

**Alpha-tocopheryl succinate potentiates the paclitaxel-induced apoptosis through enforced caspase 8 activation in human H460 lung cancer cells.**

Exp Mol Med. 2009 Oct 31;41(10):737-45.

Paclitaxel is one of the chemotherapeutic drugs widely used for the treatment of nonsmall cell lung cancer (NSCLC) patients. Here, we tested the ability of alpha-tocopheryl succinate (TOS), another promising anticancer agent, to enhance the paclitaxel response in NSCLC cells. We found that sub-apoptotic doses of TOS greatly enhanced paclitaxel-induced growth suppression and apoptosis in the human H460 NSCLC cell lines. Our data revealed that this was accounted for primarily by an augmented cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) and enhanced activation of caspase-8. Pretreatment with z-VAD-FMK (a pan-caspase inhibitor) or z-IETD-FMK (a caspase-8 inhibitor) blocked TOS/paclitaxel cotreatment-induced PARP cleavage and apoptosis, suggesting that TOS

potentiates the paclitaxel-induced apoptosis through enforced caspase 8 activation in H460 cells. Furthermore, the growth suppression effect of TOS/paclitaxel combination on human H460, A549 and H358 NSCLC cell lines were synergistic. Our observations indicate that combination of paclitaxel and TOS may offer a novel therapeutic strategy for improving paclitaxel drug efficacy in NSCLC patient therapy as well as for potentially lowering the toxic side effects of paclitaxel through reduced drug dosage.

### **Il succinato alfa-tocoferile potenzia il paclitaxel inducendo apoptosi attraverso l'attivazione della caspasi 8 eseguita in cellule umane H460 di cancro al polmone.**

Paclitaxel è uno dei farmaci chemioterapici ampiamente usato per il trattamento del carcinoma polmonare a cellule non-small (NSCLC) pazienti. Qui, abbiamo testato la capacità di alfa-tocoferolo succinato (TOS), un altro agente antitumorale promettente, per migliorare la risposta paclitaxel in cellule NSCLC. Abbiamo scoperto che dosi sub-apoptotici di TOS notevolmente migliorata paclitaxel-indotta soppressione della crescita ed apoptosi nelle linee cellulari umane H460 NSCLC. I nostri dati hanno rivelato che questo era rappresentato principalmente da una scissione aumentata di poli (ADP-ribosio) polimerasi (PARP) e una maggiore attivazione della caspasi-8. Il pretrattamento con z-VAD-FMK (un inibitore pan-caspasi) o z-IETD-FMK (un inibitore della caspasi-8) TOS bloccato / cotrattamento paclitaxel-indotta scissione PARP e apoptosi, suggerendo che TOS potenzia l'apoptosi indotta da paclitaxel attraverso forzata attivazione di caspasi 8 nelle cellule H460. Inoltre, l'effetto di soppressione della crescita di TOS / combinazione di paclitaxel sulla H460 umana, A549 e H358 linee cellulari NSCLC sono sinergici. Le nostre osservazioni indicano che la combinazione di paclitaxel e TOS può offrire una nuova strategia terapeutica per il miglioramento dell'efficacia paclitaxel nella terapia dei pazienti affetti da NSCLC e per che potrà ridurre gli effetti collaterali tossici di paclitaxel attraverso dosaggio del farmaco ridotta.

242: Lambert JD, Lu G, Lee MJ, Hu J, Ju J, Yang CS.

### **Inhibition of lung cancer growth in mice by dietary mixed tocopherols.**

Mol Nutr Food Res. 2009Aug;53(8):1030-5.

Tocopherols are lipophilic antioxidants found in vegetable oils. Here, we examined the growth inhibitory effect of a gamma-tocopherol-enriched tocopherol mixture (gammaTmT) against CL13 murine lung cancer cells grown in culture and as subcutaneous tumors in A/J mice. We found gammaTmT had no effect after 2 days and weakly inhibited the growth of CL13 in culture after 5 days (28% growth inhibition at 80 microM). Dietary treatment with 0.1 and 0.3% gammaTmT for 50 days inhibited the growth of CL13 tumors in A/J mice by 53.9 and 80.5%, respectively. Histopathological analysis revealed an increase in tumor necrosis compared to control tumors (80 and 240% increase by 0.1 and 0.3% gammaTmT, respectively). Dietary treatment with gammaTmT

dose-dependently increased gamma- (10.0-37.6-fold) and delta-tocopherol (8.9-26.7-fold) in the tumors of treated mice compared to controls. Dietary treatment with gammaTmT also increased plasma gamma- (5.4-6.7-fold) and delta-tocopherol (5.5-7-fold). Whereas others have demonstrated the cancer preventive activity of gammaTmT against mammary and colon cancer, this is the first report of growth inhibitory activity against lung cancer. Further studies are needed to determine the underlying mechanisms for this anticancer activity, and to determine if such activity occurs in other models of cancer.

### **L'inibizione della crescita del cancro ai polmoni nei topi attraverso una dieta di tocoferoli misti.**

Tocoferoli sono antiossidanti lipofili trovano negli oli vegetali. Qui, abbiamo esaminato l'effetto inibitorio della crescita di una miscela di tocoferolo, gamma-tocoferolo arricchito (gammaTmT) contro le cellule del cancro polmonare murino CL13 crescere in coltura e come tumori sottocutanei in A / J topi. Abbiamo trovato gammaTmT non ha avuto effetto dopo 2 giorni e debolmente inibito la crescita della cultura in CL13 dopo 5 giorni (28% di inibizione della crescita a 80 microM). Trattamento dietetico con 0,1 e 0,3% gammaTmT per 50 giorni ha inibito la crescita dei tumori CL13 in A / J topi da 53,9 e 80,5%, rispettivamente. L'analisi istopatologica ha rivelato un aumento di necrosi tumorale rispetto al controllo dei tumori (80 e 240% di aumento dello 0,1 e dello 0,3% gammaTmT, rispettivamente). Dietetici trattamento con gammaTmT dose-dipendente aumento gamma-(10,0-37,6 volte) e delta-tocoferolo (8,9-26,7 volte) nei tumori dei topi trattati rispetto ai controlli. Trattamento dietetico con gammaTmT anche aumentato gamma al plasma (5,4-6,7 volte) e delta-tocoferolo (5,5-7 volte). Mentre altri hanno dimostrato l'attività di prevenzione contro il cancro del gammaTmT mammaria e del cancro del colon, questo è il primo rapporto di attività di inibizione della crescita contro il cancro al polmone. Sono necessari ulteriori studi per determinare i meccanismi alla base di questa attività antitumorale, e per determinare se tale attività si verifica in altri modelli di tumore.

245: Magnusson M, Höglund P, Johansson K, Jönsson C, Killander F, Malmström P, Weddig A, Kjellén E.

### **Pentoxifylline and vitamin E treatment for prevention of radiation-induced side-effects in women with breast cancer: a phase two, double-blind, placebo-controlled randomised clinical trial (Ptx-5).**

Eur J Cancer.2009 Sep;45(14):2488-95.

**BACKGROUND:** A previous study has shown that pentoxifylline in combination with vitamin E can reverse radiation-induced fibrosis. The aim of the present study is to investigate if the same drugs could prevent radiation-induced side-effects in women with breast cancer.

**PATIENTS AND METHODS:** A randomised, placebo-controlled, double-blind, parallel group trial was performed. Women with breast cancer were treated for 12 months with 400 mg pentoxifylline t.i.d. or placebo, in combination with 100 mg vitamin E t.i.d., starting 1-3 months after the completion of radiotherapy. The primary end-point was passive abduction of the shoulder, and the secondary end-point was difference in arm volumes. The trial is registered on the [ISRCTN.org](http://www.ISRCTN.org) website, number ISRCTN39143623.

**RESULTS:** 83 patients were included in the study; 42 in the pentoxifylline+vitamin E group and 41 in the placebo+vitamin E group. Both treatments were generally well tolerated. Seven patients were withdrawn from the treatment due to disease progression; four in the pentoxifylline group and three in the placebo group. At inclusion, patients had impaired passive abduction of the shoulder. During treatment, both the groups improved significantly. Median improvement from baseline was 3.7 degrees ( $p=0.0035$ ) on pentoxifylline and was 9.4 degrees ( $p=0.0041$ ) in the placebo group, but no difference between the groups was detected ( $p=0.20$ ). Arm volumes increased over time in the placebo group (1.04%), but not on pentoxifylline (0.50%), and differed significantly between the groups ( $p=0.0172$ ).

**CONCLUSIONS:** The combination of pentoxifylline and vitamin E was safe and may be used for the prevention of some radiation-induced side-effects.

### **Pentossifillina e il trattamento di vitamina E per la prevenzione della radiazione indotta da effetti collaterali nelle donne con tumore al seno: studio clinico placebo-controllato randomizzato (PTX-5).**

**BACKGROUND:** Uno studio precedente ha dimostrato che pentossifillina in combinazione con la vitamina E può invertire la fibrosi indotta da radiazioni. Lo scopo del presente studio è quello di indagare se gli stessi farmaci potrebbero impedire la radiazione indotta da effetti collaterali nelle donne con tumore al seno.

**PAZIENTI E METODI:** Uno studio randomizzato, controllato con placebo, in doppio cieco, a gruppi paralleli è stata effettuata. Le donne con cancro al seno sono stati trattati per 12 mesi con 400 mg TID pentossifillina o placebo, in combinazione con 100 mg di vitamina E tre volte al giorno, a partire da 1-3 mesi dopo il completamento della radioterapia. L'end-point primario era abduzione passiva della spalla, e l'endpoint secondario era differenza dei volumi braccio. Il processo è registrata sul sito [ISRCTN.org](http://www.ISRCTN.org), ISRCTN39143623 numero.

**RISULTATI:** 83 pazienti sono stati inclusi nello studio, 42 pentossifillina nel gruppo vitamina E + e

41 nel gruppo placebo + vitamina E. Entrambi i trattamenti sono stati generalmente ben tollerati. Sette pazienti sono stati ritirati dal trattamento a causa della progressione della malattia, quattro nel gruppo pentossifillina e tre nel gruppo placebo. Al momento dell'inclusione, i pazienti avevano una ridotta abduzione passiva della spalla. Durante il trattamento, entrambi i gruppi sono sensibilmente migliorate.

252 : de Medina P, Payré B, Boubekour N, Bertrand-Michel J, Tercé F, Silvente-Poirot S, Poirot M.

**Ligands of the antiestrogen-binding site induce active cell death and autophagy in human breast cancer cells through the modulation of cholesterol metabolism.**

Cell Death Differ. 2009 Oct;16(10):1372-84.

We have recently reported that cytostatic concentrations of the microsomal antiestrogen-binding site (AEBS) ligands, such as PBPE (N-pyrrolidino-(phenylmethoxy)-ethanamine,HCl) and tamoxifen, induced differentiation characteristics in breast cancer cells through the accumulation of post-lanosterol intermediates of cholesterol biosynthesis. We show here that exposure of MCF-7

(human breast adenocarcinoma cell line) cells to higher concentrations of AEBS ligands triggered active cell death and macroautophagy. Apoptosis was characterized by Annexin V binding, chromatin condensation, DNA laddering and disruption of the mitochondrial functions. We determined that cell death was sterol- and reactive oxygen species-dependent and was prevented by the antioxidant vitamin E. Macroautophagy was characterized by the accumulation of autophagic vacuoles, an increase in the expression of Beclin-1 and the stimulation of autophagic flux. We established that macroautophagy was sterol- and Beclin-1-dependent and was associated with cell survival rather than with cytotoxicity, as blockage of macroautophagy sensitized cells to AEBS ligands. These results show that the accumulation of sterols by AEBS ligands in MCF-7 cells induces apoptosis and macroautophagy. Collectively, these data support a therapeutic potential for selective AEBS ligands in breast cancer management and shows a mechanism that explains the induction of autophagy in MCF-7 cells by tamoxifen and other selective estrogen receptor modulators.

### **Ligandi del sito antiestrogeno-vincolante inducono la morte cellulare e attiva l'autofagia nelle cellule umane di cancro al seno attraverso la modulazione del metabolismo del colesterolo.**

Abbiamo recentemente riportato che le concentrazioni citostatici del sito microsomiale antiestrogeno vincolanti (AEBS) ligandi, come PBPE (N-pyrrolidino-(phenylmethoxy)-ethanamine, HCl) e tamoxifene, hanno indotto caratteristiche di differenziazione in cellule di cancro al seno attraverso l'accumulo di post -lanosterolo intermedi della biosintesi del colesterolo. Mostriamo qui che l'esposizione di MCF-7 (adenocarcinoma umano della mammella linea cellulare) delle cellule a concentrazioni più elevate di AEBS ligandi innescato la morte delle cellule attive e all'autofagia. L'apoptosi è stata caratterizzata da Annexin vincolanti V, la condensazione della cromatina, laddering DNA e la perturbazione delle funzioni mitocondriali. Abbiamo determinato che la morte cellulare è stata steroli e le specie reattive dell'ossigeno-dipendente ed è stata impedita dalla vitamina antiossidante E. all'autofagia è stata caratterizzata da un accumulo di vacuoli autofagici, un aumento della espressione di Beclin-1 e la stimolazione del flusso autophagic. Abbiamo stabilito che era all'autofagia steroli e Beclin-1-dipendente ed è stata associata con la sopravvivenza delle cellule, piuttosto che con la citotossicità, come il blocco dei all'autofagia cellule sensibilizzate ai ligandi AEBS. Questi risultati mostrano che l'accumulo di steroli mediante ligandi AEBS in cellule MCF-7 induce l'apoptosi e all'autofagia. Nell'insieme, questi dati supportano un potenziale terapeutico per ligandi selettivi AEBS nella gestione del cancro della mammella e mostra un meccanismo che spiega l'induzione di autofagia in cellule MCF-7 con il tamoxifene e altri modulatori selettivi dei recettori degli estrogeni.

259: Comitato R, Nesaretnam K, Leoni G, Ambra R, Canali R, Bolli A, Marino M, Virgili F.

### **A novel mechanism of natural vitamin E tocotrienol activity: involvement of ERbeta signal transduction.**

Am J Physiol Endocrinol Metab. 2009Aug;297(2):E427-37.

Vitamin E is a generic term used to indicate all tocopherol (TOC) and tocotrienol (TT) derivatives. In the last few years, several papers have shown that a TT-rich fraction (TTRF) extracted from palm oil inhibits proliferation and induces apoptosis in a large number of cancer cells. However, the

molecular mechanism(s) involved in TT action is still unclear. In the present study, we proposed for the first time a novel mechanism for TT activity that involves estrogen receptor (ER) signaling. In silico simulations and in vitro binding analyses indicated a high affinity of TTs for ERbeta but not for ERalpha. In addition, in ERbeta-containing MDA-MB-231 breast cancer cells, we demonstrated that TTs increase the ERbeta translocation into the nucleus, which in turn activates estrogen-responsive genes (MIC-1, EGR-1 and cathepsin D), as demonstrated by cell preincubation with the ER inhibitor ICI-182,780. Finally, we observed that TT treatment is associated with alteration of cell morphology, DNA fragmentation, and caspase-3 activation. Altogether, these experiments elucidated the molecular mechanism underlying gamma- and delta-TT effects.

### **Un nuovo meccanismo di attività di vitamina E naturale tocotrienolo: coinvolgimento di trasduzione del segnale ERbeta.**

La vitamina E è un termine generico usato per indicare tutti tocoferolo (TOC) e tocotrienolo (TT) derivati. Negli ultimi anni, diversi studi hanno dimostrato che una frazione TT-ricchi (TTRF) estratto da olio di palma inibisce la proliferazione e induce l'apoptosi in un gran numero di cellule tumorali. Tuttavia, il meccanismo molecolare (s) coinvolto in una azione TT è ancora chiaro. Nel presente studio, abbiamo proposto per la prima volta un nuovo meccanismo per l'attività di TT che coinvolge recettore dell'estrogeno (ER) di segnalazione. Nelle simulazioni in silico e in vitro le analisi hanno indicato un legame ad alta affinità di TTS per ERbeta ma non per ERalfa. Inoltre, in ERbeta contenenti MDA-MB-231 cellule di cancro al seno, abbiamo dimostrato che TTs aumentare la traslocazione ERbeta nel nucleo, che a sua volta attiva i geni estrogeno-sensibili (MIC-1, EGR-1 e catepsina D), come dimostrato da una preincubazione delle cellule con l'inibitore ER ICI-182,780. Infine, abbiamo osservato che il trattamento TT è associata con alterazione della morfologia cellulare, la frammentazione del DNA, e caspasi-3 di attivazione. Complessivamente, questi esperimenti chiarito il meccanismo molecolare subalterno effetti e gamma-delta-TT.

265: Wang S, Wang F, Shi X, Dai J, Peng Y, Guo X, Wang X, Shen H, Hu Z.

### **Association between manganese superoxide dismutase (MnSOD) Val-9Ala polymorphism and cancer risk - A meta-analysis.**

Eur J Cancer. 2009 Nov;45(16):2874-81.

A growing body of evidence suggests that reactive oxygen species (ROS) play an important role in human cancers. Manganese superoxide dismutase (MnSOD) is the major antioxidant in the mitochondria, catalysing the dismutation of superoxide radicals to form hydrogen peroxide. Since the identification of a well-characterised functional polymorphism, Val-9Ala of MnSOD, a number

of molecular epidemiological studies have evaluated the association between Val-9Ala and cancer risk. However, the results remain conflicting rather than conclusive. This meta-analysis on 15,320 cancer cases and 19,534 controls from 34 published case-control studies shows no significant overall main effect of MnSOD Val-9Ala on cancer risk. However, we found that the MnSOD 9Ala allele was associated with an increased prostate cancer risk (Val/Ala versus Val/Val: odds ratio (OR)=1.1; 95% confidence intervals (CI): 1.0-1.3; Ala/Ala versus Val/Val: OR=1.3; 95% CI: 1.0-1.6; Val/Ala+Ala/Ala versus Val/Val: OR=1.2; 95% CI, 1.0-1.3). In addition, we found that the MnSOD Ala-9Ala genotype contributed to an increased breast cancer risk in premenopausal women who had low consumption of antioxidants (Ala/Ala versus Val/Ala+Val/Val: OR=2.6, 95% CI: 1.0-6.4 with low vitamin C consumption; OR=2.1, 95%CI: 1.3-3.4 with low vitamin E consumption and OR=2.9, 95%CI: 1.5-5.7 with low carotenoid consumption). These results suggest that the MnSOD Val-9Ala polymorphism may contribute to cancer development through a disturbed antioxidant balance.

### **Associazione tra superossido dismutasi manganese (MnSOD) polimorfismo Val-9Ala e rischio di cancro - Una meta-analisi.**

Un corpo di evidenza suggerisce che le specie reattive dell'ossigeno (ROS) giocano un ruolo importante nei tumori umani. Superossido dismutasi manganese (MnSOD) è il principale antiossidante nei mitocondri, catalizza la dismutazione di radicali superossido a formare perossido di idrogeno. Dal momento che l'identificazione di un polimorfismo funzionale ben caratterizzati, Val-9Ala di MnSOD, un certo numero di studi epidemiologici molecolari hanno valutato l'associazione tra rischio di Val-9Ala e il cancro. Tuttavia, i risultati restano in conflitto piuttosto che conclusivi. Questa meta-analisi su 15.320 casi di cancro e 19.534 controlli dal 34 pubblicato studi caso-controllo non mostra alcun significativo effetto globale principale di MnSOD Val-9Ala sul rischio di cancro. Tuttavia, abbiamo trovato che l'allele MnSOD 9Ala era associata ad un aumentato rischio di cancro della prostata (Val / Ala versus Val / Val: odds ratio (OR) = 1.1, 95% intervallo di confidenza (CI): 1,0-1,3; Ala / Ala contro Val / Val: OR = 1,3, IC 95%: 1,0-1,6; Val / Ala + Ala / Ala versus Val / Val: OR = 1.2; 95% CI, 1,0-1,3). Inoltre, abbiamo trovato che il genotipo MnSOD Ala-9Ala contribuito ad un aumento del rischio cancro al seno nelle donne in premenopausa che avevano un basso consumo di antiossidanti (Ala / Ala versus Val / Ala + Val / Val: OR = 2.6, 95% CI: 1.0 -6,4 a basso consumo di vitamina C, OR = 2.1, 95% CI: 1,3-3,4 a basso consumo di vitamina E e OR = 2,9, IC 95%: 1,5-5,7 a basso consumo di carotenoidi).

270: Wells SR, Jennings MH, Rome C, Hadjivassiliou V, Papas KA, Alexander JS.

### **Alpha-, gamma- and delta-tocopherols reduce inflammatory angiogenesis in human microvascular endothelial cells.**

J Nutr Biochem. 2010 Jul;21(7):589-97.

Vitamin E, a micronutrient (comprising alpha-, beta-, gamma- and delta-tocopherols, alpha-, beta-, gamma- and delta-tocotrienols), has documented antioxidant and non-antioxidant effects, some of which inhibit inflammation and angiogenesis. We compared the abilities of alpha-, gamma- and delta-tocopherols to regulate human blood cytotoxicity (BEC) and lymphatic endothelial

cytotoxicity (LEC), proliferation, invasiveness, permeability, capillary formation and suppression of TNF-alpha-induced VCAM-1 as in vitro models of inflammatory angiogenesis. alpha-, gamma- and delta-tocopherols were not toxic to either cell type up to 40 microM. In BEC, confluent cell density was decreased by all concentrations of delta- and gamma-tocopherol (10-40 microM) but not by alpha-tocopherol. LEC showed no change in cell density in response to tocopherols. delta-Tocopherol (40 microM), but not other isomers, decreased BEC invasiveness. In LEC, all doses of gamma-tocopherol, as well as the highest dose of alpha-tocopherol (40 microM), decreased cell invasiveness. delta-Tocopherol had no effect on LEC invasiveness at any molarity. delta-Tocopherol dose dependently increased cell permeability at 48 h in BEC and LEC; alpha- and gamma-tocopherols showed slight effects. Capillary tube formation was decreased by high dose (40 microM) concentrations of alpha-, gamma- and delta-tocopherol, but showed no effects with smaller doses (10-20 microM) in BEC. gamma-Tocopherol (10-20 microM) and alpha-tocopherol (10 microM), but not delta-tocopherol, increased LEC capillary tube formation. Lastly, in BEC, alpha-, gamma- and delta-tocopherol each dose-dependently reduced TNF-alpha-induced expression of VCAM-1. In LEC, there was no significant change to TNF-alpha-induced VCAM-1 expression with any concentration of alpha-, gamma- or delta-tocopherol. These data demonstrate that physiological levels (0-40 microM) of alpha-, gamma- and delta-tocopherols are nontoxic and dietary tocopherols, especially delta-tocopherol, can limit several BEC and LEC endothelial behaviors associated with angiogenesis. Tocopherols may therefore represent important nutrient-signals that limit cell behaviors related to inflammation/angiogenesis, which when deficient, may predispose individuals to risks associated with elevated angiogenesis such as inflammation and cancer; further differences seen from the tocopherols may be due to their blood or lymphatic cell origin.

#### **Alpha-, gamma-e delta-tocoferoli riducono l'angiogenesi infiammatoria in cellule endoteliali microvascolari.**

La vitamina E, un micronutriente (comprendente alfa, beta, gamma e delta-tocoferoli, alfa, beta, gamma e delta-tocotrienoli), ha documentato gli effetti antiossidanti e non antiossidante, alcuni dei quali inibiscono l'infiammazione e angiogenesi. Abbiamo confrontato la capacità di alfa-, gamma-e delta-tocoferoli di regolamentare citotossicità sangue umano (BEC) e linfatica citotossicità endoteliale (LEC), proliferazione, invasività, la permeabilità, la formazione di capillari e la soppressione del TNF-alfa-indotta VCAM-1 come modelli in vitro di angiogenesi infiammatoria. alfa, gamma e delta-tocoferoli non erano tossiche per entrambi i tipi di cellule fino a 40 microM. In BEC, la densità delle cellule confluenti era diminuita tutte le concentrazioni di delta-e gamma-tocoferolo (10-40 microM), ma non di alfa-tocoferolo. LEC non ha mostrato alcun cambiamento

nella densità delle cellule in risposta a tocoferoli. delta-tocoferolo (40 microM), ma non altri isomeri, diminuzione invasività BEC. In LEC, tutti i dosaggi di gamma-tocoferolo, così come la più alta dose di alfa-tocoferolo (40 microM), diminuzione della invasività delle cellule. delta-tocoferolo non ha effetto sulla invasività LEC in qualsiasi molarità. dose delta-tocoferolo dipendente maggior permeabilità cellulare a 48 h in BEC e LEC, alfa e gamma-tocoferoli hanno mostrato effetti lievi.

La Formazione del tubo capillare e Stata Ridotta da alte Dosi (40 microM) le concentrazioni di alfa-, gamma-delta e-tocoferolo, ma non Hanno mostrato Dosi Effetti con Più Piccole (10-20 microM) in BEC. gamma-Tocoferolo (10-20 microM) alfa e-tocoferolo (10 microM), ma non delta-tocoferolo, ONU aumento della Formazione capillare LEC. INFINE, NEL BEC, alfa-, gamma-e delta-tocoferolo OGNI MODO dose-dipendente Ridotto TNF-alfa-indotto l'Espressione di VCAM-1. In LEC, non vi e alcun Stato change significativo al TNF-alfa-indotta Espressione di VCAM-1 con

qualsiasi Concentrazione di alfa-, gamma-o delta-tocoferolo. Questi Dati dimostrano Che i Livelli fisiologici (0-40 microM) di alfa-, gamma-e delta-tocoferoli tocoferoli SONO atossici e Alimentari, in Particolare Il delta-tocoferolo, puo limitare alcuni comportamenti BEC e con Associata LEC endoteliale l'angiogenesi. Tocoferoli possono quindi rappresentare importanti nutrienti Segnali Che limitano i comportamenti delle Cellule legato ad infiammazione / angiogenesi, carente quando il Che, possono predisporre Gli individui uno Rischio connessi con l'elevata angiogenesi, sono l'infiammazione e Cancro; ulteriori Differenze Visto Dal tocoferoli puo Essere dovuto al Loro Sangue o cellula di origine linfatica.

277: Combs GF Jr, Midthune DN, Patterson KY, Canfield WK, Hill AD, Levander OA, Taylor PR, Moler JE, Patterson BH

**Effects of selenomethionine supplementation on selenium status and thyroid hormone concentrations in healthy adults.**

Am J ClinNutr. 2009 Jun;89(6):1808-14.

**BACKGROUND:** Selenium, a potential cancer prevention agent currently being tested against prostate cancer in the Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT), plays an

integral role in thyroid metabolism. The effects of long-term selenium supplementation on thyroid hormone concentrations are unknown.

**OBJECTIVE:** The objective was to investigate the effects of long-term selenium supplementation on thyroid hormone concentrations.

**DESIGN:** Twenty-eight healthy adults took 200 microg selenomethionine/d for 28 mo. The thyroid hormones triiodothyronine (T3), thyroxine (T4), and thyrotropin (TSH) were measured in plasma for 4 mo before supplementation and quarterly during supplementation. The assay methods were changed midstudy; the results of the 2 methods were not comparable. Therefore, one analysis was conducted based on the results of the first method, and a second analysis was based on all of the data, adjusted for the change. Serial data collection permitted a test for trends rather than simply a difference between initial and final values.

**RESULTS:** By 9 mo, mean (+/-SEM) plasma selenium concentrations had increased from 1.78 +/- 0.07 micromol/L at baseline to 2.85 +/- 0.11 micromol/L for men and from 1.64 +/- 0.04 to 3.32 +/- 0.12 micromol/L for women. T3 concentrations in men increased 5% per year (P = 0.01). T4 and TSH concentrations were unchanged.

**CONCLUSIONS:** Selenium supplementation produced no clinically significant changes in thyroid hormone concentrations. A small but statistically significant increase in T3 concentrations was noted in men, with no corresponding decreases in TSH. A subset of SELECT subjects might be monitored periodically for changes during long-term selenium supplementation.

### **Effetti della supplementazione selenometionina sullo stato di selenio e le concentrazioni di ormoni tiroidei in soggetti adulti sani.**

**BACKGROUND:** selenio, un potenziale agente di prevenzione del cancro in fase di sperimentazione contro il cancro alla prostata nel Selenio e Vitamina E Cancer Prevention Trial (SELECT), gioca un ruolo fondamentale nel metabolismo della tiroide. Gli effetti della supplementazione di selenio a lungo termine sulla concentrazione degli ormoni tiroidei sono sconosciuti.

**OBIETTIVO:** L'obiettivo era quello di indagare gli effetti della supplementazione di selenio a lungo termine sulla concentrazione degli ormoni tiroidei.

**DESIGN:** Ventotto adulti sani hanno selenometionina 200 microg / die per 28 mesi. Gli ormoni tiroidei triiodotironina (T3), tiroxina (T4), e la tireotropina (TSH) sono stati misurati nel plasma per 4 mo prima di supplementazione e trimestrali durante supplementazione. I metodi di prova sono stati cambiati midstudy, i risultati dei due metodi non sono comparabili. Pertanto, una analisi è stata effettuata sulla base dei risultati del primo metodo, e una seconda analisi si è basata su tutti i dati, corretti per il cambiamento. Serial raccolta dei dati consentito un test per le tendenze, piuttosto che una semplice differenza tra i valori iniziali e finali. **RISULTATI:** Al 9 MO, media (+/-SEM), le concentrazioni plasmatiche di selenio era aumentato da 1.78 +/- 0,07 micromol / L al basale a 2,85 +/- 0,11 micromol / L per gli uomini e da 1,64 +/- 0,04-3,32 +/- 0.1.2 micromol / L per le donne. Concentrazioni di T3 negli uomini un aumento del 5% per anno (P = 0,01). Le concentrazioni di T4 e TSH sono rimasti invariati.

**CONCLUSIONI:** La supplementazione di selenio non ha prodotto variazioni clinicamente significative delle concentrazioni di ormone tiroideo. Un aumento modesto ma statisticamente significativo delle concentrazioni di T3 è stato osservato negli uomini, senza corrispondenti diminuzioni di TSH. Un sottogruppo di soggetti SELECT potrebbe essere monitorata periodicamente le eventuali modifiche durante integrazione di selenio a lungo termine.

281: Watters JL, Gail MH, Weinstein SJ, Virtamo J, Albanes D.

**Associations between alpha-tocopherol, beta-carotene, and retinol and prostate cancer survival.**

Cancer Res. 2009 May 1;69(9):3833-41.

Previous studies suggest that carotenoids and tocopherols (vitamin E compounds) may be inversely associated with prostate cancer risk, yet little is known about how they affect prostate cancer progression and survival. We investigated whether serum alpha-tocopherol, beta-carotene, and retinol concentrations, or the alpha-tocopherol and beta-carotene trial supplementation, affected

survival of men diagnosed with prostate cancer during the alpha-Tocopherol, beta-Carotene Cancer Prevention Study, a randomized, double-blind, placebo-controlled primary prevention trial testing the effects of beta-carotene and alpha-tocopherol supplements on cancer incidence in adult male smokers in southwestern Finland (n = 29,133). Prostate cancer survival was examined using the Kaplan-Meier method with deaths from other causes treated as censoring, and using Cox proportional hazards regression models with hazard ratios (HR) and 95% confidence intervals (CI) adjusted for family history of prostate cancer, age at randomization, benign prostatic hyperplasia, age and stage at diagnosis, height, body mass index, and serum cholesterol. As of April 2005, 1,891 men were diagnosed with prostate cancer and 395 died of their disease. Higher serum alpha-tocopherol at baseline was associated with improved prostate cancer survival (HR, 0.67; 95% CI, 0.45-1.00), especially among cases who had received the alpha-tocopherol intervention of the trial and who were in the highest quintile of alpha-tocopherol at baseline (HR, 0.51; 95% CI, 0.20-0.90) or at the 3-year follow-up measurement (HR, 0.26; 95% CI, 0.09-0.71). Serum beta-carotene, serum retinol, and supplemental beta-carotene had no apparent effects on survival. These findings suggest that higher alpha-tocopherol (and not beta-carotene or retinol) status increases overall prostate cancer survival. Further investigations, possibly including randomized studies, are needed to confirm this observation.

### **Associazioni tra retinolo alfa-tocoferolo e beta-carotene, e sopravvivenza del cancro alla prostata.**

Precedenti studi suggeriscono che i carotenoidi e tocoferoli (composti di vitamina E) possono essere inversamente associati al rischio di cancro alla prostata, ancora poco si sa su come influenzano la progressione del cancro alla prostata e sopravvivenza. Abbiamo studiato se sierici di alfa-tocoferolo, beta-carotene, e le concentrazioni di retinolo, o la supplementazione di prova di alfa-tocoferolo e beta-carotene, la sopravvivenza degli uomini colpiti con diagnosi di cancro alla prostata durante l'alfa tocoferolo, beta-Carotene Cancer Prevention Study, un randomizzato, in doppio cieco, controllato con placebo, di prevenzione primaria verificano gli effetti del beta-carotene e supplementi di alfa-tocoferolo sull'incidenza del cancro nei fumatori maschi adulti nel sud ovest della Finlandia (n = 29.133). Sopravvivenza cancro alla prostata è stata esaminata con il metodo di Kaplan-Meier con morti per altre cause trattate come la censura, e l'utilizzo di modelli di regressione proporzionale di Cox pericoli con hazard ratio (HR) ed intervalli di confidenza al 95% (CI) aggiustato per storia familiare di cancro alla prostata, l'età al momento della randomizzazione, iperplasia prostatica benigna, l'età e stadio alla diagnosi, l'altezza, indice di massa corporea, e colesterolemia. A partire da aprile 2005, 1.891 uomini sono stati diagnosticati con cancro alla

prostata e 395 morti della loro malattia. Superiore alfa-tocoferolo siero al basale era associato ad un miglioramento della sopravvivenza cancro alla prostata (HR, 0,67; 95% CI, 0,45-1,00), soprattutto tra i casi che avevano ricevuto l'intervento di alfa-tocoferolo del processo e che erano nel più alto quintile di alfa-tocoferolo al basale (HR, 0,51; 95% CI, 0,20-0,90) o di 3 anni di follow-up di misura (HR, 0,26; 95% CI, 0,09-0,71). Siero beta-carotene, retinolo nel siero, e supplementari beta-carotene non ha avuto effetti evidenti sulla sopravvivenza. Questi risultati suggeriscono che l'aumento alfa-tocoferolo (e non di beta-carotene o retinolo) stato un incremento generale di sopravvivenza cancro alla prostata. Ulteriori indagini, eventualmente compresi gli studi randomizzati sono necessari per confermare questa osservazione.

288: Wali VB, Bachawal SV, Sylvester PW.

**Combined treatment of gamma-tocotrienol with statins induce mammary tumor cell cycle arrest in G1.**

Exp Biol Med(Maywood). 2009 Jun;234(6):639-50.

Statins and gamma-tocotrienol (a rare isoform of vitamin E) both inhibit 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMGCoA) reductase activity and display anticancer activity. However, clinical application of statins has been limited by high dose toxicity. Previous studies showed that combined statin and gamma-tocotrienol treatment synergistically inhibits growth of

highly malignant +SA mammary epithelial cells in culture. To investigate the mechanism mediating this growth inhibition, studies were conducted to determine the effect of combination low dose gamma-tocotrienol and statin treatment on +SA mammary tumor cell cycle progression. Treatment with 0.25 microM simvastatin, lovastatin, mevastatin, 10 microM pravastatin or 2.0 microM gamma-tocotrienol alone had no effect, while combined treatment of individual statins with gamma-tocotrienol significantly inhibited +SA cell proliferation during the 4-day culture period. Flow cytometric analysis demonstrated that combined treatment induced cell cycle arrest in G1. Additional studies showed that treatment with 0.25 microM simvastatin or 2 microM gamma-tocotrienol alone had no effect on the relative intracellular levels of cyclin D1, CDK2, CDK4 and CDK6, but combined treatment caused a large reduction in cyclin D1 and CDK2 levels. Combined treatments also caused a relatively large increase in p27, but had no effect on p21 and p15 levels, and resulted in a large reduction in retinoblastoma (Rb) protein phosphorylation at ser780 and ser807/811. Similar effects were observed following combined treatment of gamma-tocotrienol with low doses of lovastatin, mevastatin and pravastatin. These findings demonstrate that combination low dose statin and gamma-tocotrienol treatment induced mammary tumor cell cycle arrest at G1, resulting from an increase in p27 expression, and a corresponding decrease in cyclin D1, CDK2, and hypophosphorylation of Rb protein. These findings suggest that combined treatment of statins with gamma-tocotrienol may provide significant health benefits in the treatment of breast cancer in women, while avoiding myotoxicity associated with high dose statin monotherapy.

### **Il trattamento combinato di gamma-tocotrienoli con le statine induce l'arresto delle cellule tumorali mammarie ciclo in G1.**

Statine e gamma-tocotrienolo (una isoforma rara di vitamina E) entrambi inibiscono 3-idrossi-3-metilglutaril-coenzima A (HMGCoA) reductasi e attività antitumorale di attività di visualizzazione. Tuttavia, l'applicazione clinica delle statine è stato limitato dalla tossicità dose elevata. Studi precedenti hanno mostrato che le statine ed il trattamento combinato di gamma-tocotrienoli inibisce la crescita sinergica del altamente maligno + cellule epiteliali mammarie SA nella cultura. Per studiare il meccanismo di mediare questa inibizione della crescita, gli studi sono stati condotti per determinare l'effetto di bassa gamma combinazione a dose-tocotrienolo e trattamento con statine sul + SA cella la progressione del tumore mammario ciclo. Il trattamento con simvastatina 0,25 microM, lovastatina, mevastatin, 10 microM pravastatina o 2.0 microM gamma-tocotrienoli da solo

non ha avuto effetto, mentre il trattamento combinato di statine individuali con gamma-tocotrienoli + significativamente inibito la proliferazione delle cellule SA durante il periodo di coltura per 4 giorni. Citometria a flusso ha dimostrato che il trattamento combinato ha indotto arresto del ciclo cellulare in G1. Ulteriori studi hanno mostrato che il trattamento con simvastatina 0,25 microM o 2 microM gamma-tocotrienoli da solo non ha avuto effetto sui livelli relativi intracellulare di ciclina D1, CDK2, CDK4 e CDK6, ma il trattamento combinato ha causato una forte riduzione della ciclina D1 e livelli CDK2. Trattamenti combinati anche causato un aumento relativamente consistente delle p27, ma non ha avuto effetto sulla p21 e p15 livelli, ed ha prodotto una forte riduzione retinoblastoma (Rb) fosforilazione proteica a ser780 e ser807/811. Effetti simili sono stati osservati dopo trattamento combinato di gamma-tocotrienoli con basse dosi di lovastatina, pravastatina e mevastatin. Questi risultati dimostrano che le statine dose combinazione basso e il trattamento gamma-tocotrienoli mammaria indotta delle cellule tumorali arresto del ciclo in G1,

risultante da un aumento di p27 espressione, e una corrispondente diminuzione di ciclina D1, CDK2 e ipofosforilazione della proteina Rb. Questi risultati suggeriscono che il trattamento combinato di statine con gamma-tocotrienoli possono fornire benefici significativi nel trattamento del carcinoma mammario nelle donne, evitando miotossicità associata a monoterapia con alte dosi di statine.

293: Hussein D, Mo H.

**d-Delta-tocotrienol-mediated suppression of the proliferation of human PANC-1, MIA PaCa-2, and BxPC-3 pancreatic carcinoma cells.**

Pancreas. 2009 May;38(4):e124-36.

**OBJECTIVE:** The rate-limiting activity of the mevalonate pathway, 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG CoA) reductase, provides intermediates essential for growth. Competitive inhibitors of HMG CoA reductase, such as the statins, and down-regulators of reductase, such as the tocotrienols, suppress tumor growth. We evaluated the impact of d-delta-tocotrienol, the most

potent vitamin E isomer, on human MIA PaCa-2 and PANC-1 pancreatic carcinoma cells and BxPC-3 pancreatic ductal adenocarcinoma cells.

**METHODS:** Cell proliferation was measured by using CellTiter 96 Aqueous One Solution (Promega, Madison, Wis). Cell cycle distribution was determined by flow cytometry. Apoptosis was evaluated by Annexin V staining and fluorescence microscopy after dual staining with acridine orange and ethidium bromide.

**RESULTS:** d-delta-Tocotrienol induced concentration-dependent suppression of cell proliferation with 50% inhibitory concentrations of 28 (6) micromol/L (MIA PaCa-2), 35 (7) micromol/L (PANC-1), and 35 (8) microL (BxPC-3), respectively. These effects are attributable to cell cycle arrest at the G1 phase and apoptosis. Mevalonate attenuated d-delta-tocotrienol-mediated growth inhibition. A physiologically attainable blend of d-delta-tocotrienol and lovastatin synergistically suppressed the proliferation of MIA PaCa-2 cells.

**CONCLUSIONS:** Suppression of mevalonate pathway activities, be it by modulators of HMG CoA reductase (statins, tocotrienols, and farnesol), farnesyl transferase (farnesyl transferase inhibitors), and/or mevalonate pyrophosphate decarboxylase (phenylacetate) activity, may have a potential in pancreatic cancer chemotherapy.

### **Soppressione d-Delta-tocotrienolo-mediata della proliferazione di umano PANC-1, MIA PaCa-2, e cellule BxPC-3 di carcinoma pancreatico.**

**OBIETTIVO:** il tasso-di limitazione di attività della via mevalonato, 3-idrossi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) reductasi, prevede intermedi essenziali per la crescita. Gli inibitori competitivi della HMG CoA reductasi, come ad esempio le statine, e giù-regolatori di reductasi, come la tocotrienoli, sopprimere la crescita tumorale. Abbiamo valutato l'impatto della d-delta-tocotrienoli, l'isomero più potente della vitamina E, sulla salute umana MIA PaCa-2 e PANC-1 cellule di carcinoma pancreatico e BxPC-3 cellule pancreatiche adenocarcinoma duttale.

**METODI:** la proliferazione cellulare è stata misurata utilizzando CellTiter 96 acquosa One Solution (Promega, Madison, Sag). Distribuzione del ciclo cellulare è stata determinata mediante citometria a flusso. L'apoptosi è stata valutata mediante colorazione annessina V e microscopia a fluorescenza dopo colorazione con doppio arancio di acridina e bromuro di etidio.

**RISULTATI:** d-delta-Tocotrienolo soppressione indotta concentrazione-dipendente della proliferazione cellulare con il 50% le concentrazioni di inibitori di 28 (6) micromol / L (MIA PaCa-2), 35 (7) micromol / L (PANC-1), e 35 (8) microL (BxPC-3), rispettivamente. Questi effetti sono attribuibili alle arresto del ciclo cellulare in fase G1 e apoptosi. Mevalonato attenuato inibizione della crescita d-delta-tocotrienolo-mediata. Un fisiologicamente raggiungibile miscela di d-delta-tocotrienoli e lovastatina sinergicamente soppresso la proliferazione di MIA PaCa-2.

**CONCLUSIONI:** soppressione di attività via mevalonato, sia da modulatori della HMG CoA reductasi (statine, tocotrienoli, e farnesolo), farnesil transferasi (inibitori della farnesil transferasi), e / o della decarbossilasi mevalonato pirofosfato (fenilacetato) attività possono avere un potenziale di pancreas cancro chemioterapia.

296: Foote JA, Ranger-Moore JR, Einspahr JG, Saboda K, Kenyon J, Warneke J, Miller RC, Goldman R, Xu MJ, Roe DJ, Alberts DS.

### **Chemoprevention of human actinic keratoses by topical DL-alpha-tocopherol.**

Cancer Prev Res (Phila). 2009Apr;2(4):394-400.

Prior research shows that topical application of free, nonfatty acid-conjugated vitamin E (DL-alpha-tocopherol) prevents skin cancer in mice, as well as immunosuppression induced by UVB radiation. This study investigated the chemopreventive potential of DL-alpha-tocopherol in humans through monitoring surrogate end point biomarkers in sun-damaged skin. Contralateral arms of healthy human volunteers with actinic keratoses (AK) were randomly assigned to receive either 12.5% DL-alpha-tocopherol or placebo in a crème base for 6 months. Changes in number of AKs, levels of p53 protein expression, proliferating cell nuclear antigen, and polyamines were assessed along with skin and systemic vitamin E levels. Following treatment, plasma concentration levels of DL-alpha-tocopherol were unchanged, but skin levels were highly elevated ( $P < 0.001$ ). Levels of p53 and proliferating cell nuclear antigen did not change significantly, whereas number of AKs declined insignificantly in both placebo and treatment arms. Regression models showed significant decreases in putrescine, spermidine, spermine, and total polyamine concentrations following treatment. Topically applied DL-alpha-tocopherol was substantially absorbed in skin, but the 6-month application did not significantly reduce numbers of preexisting AKs on moderately to severely sun-damaged forearms. Increases in polyamine synthesis are expected during tumor initiation and promotion; conversely, the significant reductions in polyamine levels resulting from the topical DL-alpha-tocopherol application are consistent with reductions in tumorigenesis potential. Topical tocopherol did not normalize established sun-induced lesions, but DL-alpha-tocopherol-induced reductions in polyamine metabolism are consistent with the inhibition of skin squamous cell carcinogenesis as seen in previous human trials and animal models

### **Chemioprevenzione della cheratosi attinica umani da parte di attualità DL-alfa-tocoferolo.**

Prima la ricerca mostra che l'applicazione topica di libero, vitamina E nonfatty acido coniugato (DL-alfa-tocoferolo) previene il cancro della pelle nei topi, così come l'immunosoppressione indotta dai raggi UVB. Questo studio ha studiato il potenziale chemiopreventivi di DL-alfa-tocoferolo negli esseri umani attraverso il monitoraggio end point surrogato biomarcatori in pelle danneggiata dal sole. Braccia controlaterale di volontari sani con cheratosi attiniche (AK) sono stati randomizzati a ricevere o il 12,5% di DL-alfa-tocoferolo o placebo in una base di crema per 6 mesi. Modifica del numero di cheratosi attinica, i livelli di espressione della proteina p53, antigene nucleare della proliferazione cellulare, e poliammine sono stati valutati con i livelli di vitamina della pelle e sistemica E. Dopo il trattamento, i livelli plasmatici concentrazione di DL-alfa-tocoferolo sono rimasti invariati, ma i livelli di pelle sono stati molto elevati ( $P < 0,001$ ). I livelli di antigene p53 e delle cellule di proliferazione nucleare non è cambiata significativamente, mentre è diminuito il numero di cheratosi attinica irrilevante in entrambi i gruppi placebo e trattamento. Modelli di regressione ha mostrato una significativa diminuzione degli putrescina, spermidina, spermina, e le concentrazioni di poliammine totale dopo il trattamento. Per uso topico DL-alfa-tocoferolo è stato

sostanzialmente assorbito nella pelle, ma l'applicazione di 6 mesi non riduce significativamente il numero di cheratosi attinica preesistente sul da moderatamente a gravemente avambracci danneggiata dal sole.

Aumenti nella sintesi di poliammine sono attesi durante la fase iniziale del tumore e di promozione e, per converso, le riduzioni significative dei livelli di poliammine risultante dalla applicazione topica di DL-alfa-tocoferolo sono coerenti con la riduzione del potenziale di tumorigenesi. Tocoferolo topici non normalizzare stabilito sole lesioni indotte, ma DL-alfa-tocoferolo indotto una riduzione nel metabolismo delle poliammine sono coerenti con l'inibizione della carcinogenesi cellule squamose della pelle come si è visto in precedenti esperimenti sugli esseri umani e modelli animali.

320: Kashiwagi K, Virgona N, Harada K, Kido W, Yano Y, Ando A, Hagiwara K, Yano T.

**A redox-silent analogue of tocotrienol acts as a potential cytotoxic agent against human mesothelioma cells.**

Life Sci. 2009 May 8;84(19-20):650-6.

**AIMS:** Malignant mesothelioma is an aggressive cancer with no effective treatment options. A redox-silent analogue of alpha-tocotrienol, 6-O-carboxypropyl-alpha-tocotrienol (T3E) is a new potential anti-carcinogenic agent with less toxic effect on non-tumorigenic cells. Here, we evaluated the effect of T3E on killing of chemoresistant mesothelioma cell (H28).

**MAIN METHODS:** The cytotoxic effect of T3E was evaluated by a WST-1 assay, and cell cycle and apoptosis analysis were done by FACS. Each signal molecule's activity was determined by protein array and immunoblot analysis.

**KEY FINDINGS:** T3E effectively inhibited H28 cell growth at practical pharmacological concentrations (10-20  $\mu$ M) without any effect on non-tumorigenic mesothelial cell (Met-5A). Inhibition of H28 cell growth by T3E mediated through G2/M arrest in cell cycle and induction of apoptosis. Protein array and immunoblot analyses revealed that T3E inhibited the activation of epidermal growth factor receptor (EGFR) via the inactivation of the Src family of protein tyrosine kinases (Src). However, the blockade of the EGFR signaling was not associated with the T3E-dependent H28 cell growth control. In addition to Src inactivation, T3E inhibited signal transduction and activation of transcription Stat3. A combination of an Src inhibitor, PP2, and a Stat3 inhibitor, AG490, induced G2/M arrest and enhanced apoptosis compared with PP2 alone. These results suggest that T3E suppresses H28 cell growth via the inhibition of Src activation and Src-independent Stat3 activation.

**SIGNIFICANCE:** T3E can be a new effective therapeutic agent against chemoresistant mesothelioma cells.

### **Un analogo del tocotrienolo come potenziale agente citotossico contro le cellule di mesotelioma umano.**

**OBIETTIVI:** Il mesotelioma maligno è un tumore aggressivo senza alcuna possibilità di trattamento efficace. Un analogo redox-silenziosa di alfa-tocotrienolo, 6-O-carboxypropyl-alfa-tocotrienolo (T3E) è un nuovo potenziale agente anti-cancerogeno con meno effetto tossico sulle cellule non tumorali. Qui, abbiamo valutato l'effetto del T3E sulla uccisione di cellule di mesotelioma chemioresistente (H28).

**PRINCIPALI METODI:** L'effetto citotossico del T3E è stata valutata mediante un test WST-1, e del ciclo cellulare e apoptosi analisi sono state realizzate da FACS. Ogni molecola segnale di attività è stato determinato dalla matrice proteica e analisi immunoblot.

**PRINCIPALI RISULTATI:** T3E H28 effettivamente inibiscono la crescita delle cellule in pratica concentrazioni farmacologiche (10-20  $\mu$ M) senza alcun effetto sul non-tumorali delle cellule mesoteliali (Met-5A). L'inibizione della crescita cellulare H28 da mediato attraverso G2 / M in arresto del ciclo cellulare e induzione di apoptosi T3E. Analisi di allineamento della proteina e immunoblot ha rivelato che T3E inibito l'attivazione del recettore del fattore di crescita epidermico

(EGFR) attraverso l'inattivazione della famiglia Src di proteine tirosin chinasi (Src). Tuttavia, il blocco del EGFR segnalazione non è stata associata con il T3E-dipendente il controllo della crescita cellulare H28. Oltre alla inattivazione Src, T3E inibito trasduzione del segnale e l'attivazione di STAT3 trascrizione. Una combinazione di un inibitore di Src, PP2, e un inibitore della Stat3, AG490, indotto G2 / M arresto e l'apoptosi aumentate rispetto PP2 solo.

Questi risultati suggeriscono che T3E H28 sopprime la crescita cellulare attraverso l'inibizione della attivazione di Src e SRC-indipendente attivazione Stat3.

**SIGNIFICATO:** T3E può essere un nuovo agente terapeutico efficace contro le cellule di mesotelioma chemioresistente.

326: Liu HK, Wang Q, Li Y, Sun WG, Liu JR, Yang YM, Xu WL, Sun XR, Chen BQ.

**Inhibitory effects of gamma-tocotrienol on invasion and metastasis of human gastric adenocarcinoma SGC-7901 cells.**

J Nutr Biochem. 2010 Mar;21(3):206-13.

Natural vitamin E is a mixture of two classes of compounds, tocopherols and tocotrienols. Recent research has revealed that tocotrienols, especially gamma-tocotrienol, exhibit not only the same antioxidant ability as tocopherols, but also remarkable anticancer capacity in cancer cell lines. In this study, the invasion and metastatic capacities of gastric adenocarcinoma SGC-7901 cells and the correlation with antimetastasis mechanisms induced by gamma-tocotrienol were explored. The results showed the inhibitory effects of gamma-tocotrienol at doses of 15, 30, 45 and 60  $\mu\text{mol/L}$  for 48 h on cell migration and cell matrigel invasion; activities of matrix metalloproteinase (MMPs) increased in SGC-7901 cells when compared to the control group ( $P < .05$  or  $P < .01$ ). An increasing trend in the chemotactic responses to fibronectin (FN) in SGC-7901 cells was found in the gamma-tocotrienol treatments. SGC-7901 cell attachment decreased in the gamma-tocotrienol-treated groups in comparison with the control group ( $P < .01$ ). The mRNA expressions of MMP-2 and MMP-9 showed that gamma-tocotrienol significantly reduced the matrigel invasion capability through down-regulation of the mRNA expressions of MMP-2 and MMP-9 ( $P < .01$ ), and up-regulation of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) and TIMP-2 in SGC-7901 cells by treatment with gamma-tocotrienol for 48 h ( $P < .05$ ). gamma-Tocotrienol also significantly increased the mRNA expression of nm23-H1 in SGC-7901 cells ( $P < .01$ ). These findings suggest a potential mechanism of gamma-tocotrienol-mediated antitumor metastasis activity and indicate the role of vitamin E as potential chemopreventative agents against gastric cancer.

#### **Effetti inibitori di gamma-tocotrienoli sulla invasione e metastasi di cellule SGC-7901 di adenocarcinoma gastrico umano**

Naturale di vitamina E è una miscela di due classi di composti, tocoferoli e tocotrienoli. Una recente ricerca ha rivelato che i tocotrienoli, specialmente gamma-tocotrienoli, mostra non solo la capacità antiossidante come i tocoferoli, ma anche capacità antitumorali notevoli nelle linee di cellule tumorali. In questo studio, l'invasione e la capacità di adenocarcinoma gastrico metastatico del SGC-7901 celle e la correlazione con i meccanismi antimetastasi indotta da gamma-tocotrienoli sono state esplorate. I risultati hanno dimostrato gli effetti inibitori di gamma-tocotrienoli a dosi di 15, 30, 45 e 60  $\mu\text{mol/L}$  per 48 ore sulla migrazione delle cellule e matrigel invasione delle cellule, le attività di metalloproteinasi della matrice (MMP) è aumentata in cellule SGC-7901 rispetto al il gruppo di controllo ( $P < .05$  o  $P < .01$ ). Una tendenza crescente nelle risposte chemiotattica di fibronectina (FN) in cellule SGC-7901 è stato trovato nei trattamenti gamma-tocotrienoli. SGC-7901 attaccamento cella è diminuita nei gruppi di gamma-tocotrienoli trattati rispetto al gruppo controllo ( $P < .01$ ). Una tendenza crescente nelle risposte chemiotattica di fibronectina (FN) in cellule SGC-7901 è stato trovato nei trattamenti gamma-tocotrienoli. SGC-7901 attaccamento cella è diminuita nei gruppi di gamma-tocotrienoli trattati rispetto al gruppo controllo ( $P < .01$ ). Le espressioni mRNA di MMP-2 e MMP-9 ha dimostrato che gamma-tocotrienoli ha ridotto significativamente la capacità matrigel invasione tramite down-regulation

delle espressioni mRNA di MMP-2 e MMP-9 ( $P < .01$ ), e up-regolazione di inibitore tissutale delle metalloproteasi-1 (TIMP-1) e TIMP-2 in cellule SGC-7901 mediante trattamento con gamma-tocotrienoli per 48 ore ( $P < .05$ ). gamma-Tocotrienolo anche aumentato significativamente l'espressione di mRNA di nm23-H1 in cellule SGC-7901 ( $P < .01$ ). Questi risultati suggeriscono un potenziale meccanismo di attività antitumorale gamma-tocotrienoli mediata metastasi e indicare il ruolo della vitamina E come potenziali agenti chemopreventative contro il cancro gastrico.

329: Ni J, Mai T, Pang ST, Haque I, Huang K, DiMaggio MA, Xie S, James NS, Kasi D, Chemler SR, Yeh S.

**In vitro and in vivo anticancer effects of the novel vitamin E ether analogue RRR-alpha-tocopheryloxybutyl sulfonic acid in prostate cancer.**

Clin Cancer Res. 2009 Feb 1;15(3):898-906.

**PURPOSE:** Among derivatives of alpha-vitamin E, alpha-vitamin E succinate (VES), has attracted much attention due to its potent anti-prostate cancer activity in vitro and in vivo. However, the in vivo antitumor activity of VES might be compromised if administered orally due to the VES hydrolysis by esterases in the gastrointestinal tract.

**EXPERIMENTAL DESIGN:** New nonhydrolyzable VES ether analogues were synthesized and their growth inhibition was screened by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide growth assay. Among them, RRR-alpha-tocopheryloxybutyl sulfonic acid (VEBSA) was further characterized by terminal deoxyribonucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling apoptosis assay, soft agar assay, and in vivo tumor formation.

**RESULTS:** VEBSA has potent antitumor ability, albeit to a lesser extent than VES, in in vitro cultured prostate cancer LNCaP and PC3 cells. Like VES, VEBSA induced apoptosis, repressed androgen receptor protein expression, and enhanced vitamin D receptor expression, suggesting that VEBSA can go through mechanisms similar to those used by VES to inhibit the growth of prostate cancer cells in vitro. However, 6 weeks of oral consumption of VEBSA, but not of VES, reduced the tumor burden in the xenografted prostate tumors in nude mice. Furthermore, oral intake of VEBSA for 20 weeks inhibited prostate tumor growth and progression more efficiently compared with VES in the prostate cancer tumor model of TRAMP mice.

**CONCLUSION:** Oral consumption of VEBSA allows a greater anticancer activity compared with VES. Chemoprevention prefers the oral consumption of agents; the advantage of VEBSA over VES to be administered orally will allow VEBSA to serve as an agent for both preventive and therapeutic purposes for prostate cancer.

### **In vitro e in vivo gli effetti antitumorali della vitamina E analoga all' etere acido RRR-alfa-tocopheryloxybutyl solfonico nel cancro alla prostata.**

**SCOPO:** Tra i derivati della vitamina E-alfa, alfa-vitamina E succinato (VES), ha attirato molta attenzione grazie alla sua potente attività anti-cancro della prostata in vitro e in vivo. Tuttavia, l'attività antitumorale in vivo di VES potrebbe essere compromessa se somministrato per via orale a causa della VES idrolisi dalle esterasi presenti nel tratto gastrointestinale.

**DISEGNO SPERIMENTALE:** New nonhydrolyzable analoghi etere VES sono stati sintetizzati e la loro inibizione della crescita è stato proiettato dal 3 - (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-bromuro diphenyltetrazolium saggio di crescita. Tra questi, RRR-alfa-tocopheryloxybutyl solfonico (VEBSA) è stata ulteriormente caratterizzata da terminale deoxyribonucleotidyl transferasi-mediata dUTP test end apoptosi nick etichettatura, test agar molle, e in formazione del tumore in vivo.

**RISULTATI:** VEBSA ha potenti capacità antitumorali, anche se in misura minore rispetto VES, in nel cancro prostatico LNCaP coltivate in vitro e cellule PC3. Come VES, VEBSA apoptosi indotta, represso l'espressione del recettore degli androgeni proteine, e una maggiore espressione del recettore della vitamina D, suggerendo che VEBSA possono passare attraverso meccanismi simili a

quelli utilizzati da VES per inibire la crescita delle cellule tumorali in vitro. Tuttavia, 6 settimane di consumo per via orale di VEBSA, ma non di VES, ha ridotto la massa tumorale nei tumori alla prostata trapiantati in topi nudi. Inoltre, l'assunzione orale di VEBSA per 20 settimane ha inibito la crescita del tumore della prostata e la progressione in modo più efficiente rispetto ai VES nel modello del tumore del cancro della prostata di topi TRAMP.

**CONCLUSIONE:** il consumo orale di VEBSA permette una attività antitumorale maggiore rispetto alle VES. La chemioprevenzione preferisce il consumo per via orale di agenti, il vantaggio di

VEBSA VES oltre ad essere amministrato oralmente VEBSA permetterà di servire come agente sia per scopi preventivi e terapeutici per il cancro alla prostata.

337: Ju J, Hao X, Lee MJ, Lambert JD, Lu G, Xiao H, Newmark HL, Yang CS

**A gamma-tocopherol-rich mixture of tocopherols inhibits colon inflammation and carcinogenesis in azoxymethane and dextran sulfate sodium-treated mice.**

We investigated the effects of a gamma-tocopherol-rich mixture of tocopherols (gamma-TmT, containing 57% gamma-T, 24% delta-T, and 13% alpha-T) on colon carcinogenesis in azoxymethane (AOM)/dextran sulfate sodium (DSS)-treated mice. In experiment 1, 6-week-old male CF-1 mice were given a dose of AOM (10 mg/kg body weight, i.p.), and 1 week later, 1.5% DSS in drinking water for 1 week. The mice were maintained on either a gamma-TmT (0.3%)-enriched or a standard AIN93M diet, starting 1 week before the AOM injection, until the termination of experiment. In the AOM/DSS-treated mice, dietary gamma-TmT treatment resulted in a significantly lower colon inflammation index (52% of the control) on day 7 and number of colon adenomas (9% of the control) on week 7. gamma-TmT treatment also resulted in higher apoptotic index in adenomas, lower prostaglandin E2, leukotriene B4, and nitrotyrosine levels in the colon, and lower prostaglandin E2, leukotriene B4, and 8-isoprostane levels in the plasma on week 7. Some of the decreases were observed even on day 7. In experiment 2 with AOM/DSS- treated mice sacrificed on week 21, dietary 0.17% or 0.3% gamma-TmT treatment, starting 1 week before the AOM injection, significantly inhibited adenocarcinoma and adenoma formation in the colon (to 17-33% of the control). Dietary 0.3% gamma-TmT that was initiated after DSS treatment also exhibited a similar inhibitory activity. The present study showed that gamma-TmT effectively inhibited colon carcinogenesis in AOM/DSS-treated mice, and the inhibition may be due to the apoptosis-inducing, anti-inflammatory, antioxidative, and reactive nitrogen species-trapping activities of tocopherols.

**Una miscela gamma-tocoferolo ricca di tocoferoli inibisce l'infiammazione del colon e carcinogenesi nel trattamento con azoxymethane e dextran nei topi.**

Abbiamo studiato gli effetti di una miscela gamma-tocoferolo ricco di tocoferoli (gamma-TMT, contenente 57% di gamma-T, il 24% di delta-T, e il 13% alfa-T), sulla carcinogenesi del colon in azoxymethane (AOM) / solfato di destrano di sodio (DSS) trattati con i topi. Nell'esperimento 1, 6 settimane di età maschile CF-1 nei topi è stata data una dose di OMA (10 mg / kg di peso corporeo, ip), e 1 settimana dopo, 1,5% DSS in acqua potabile per 1 settimana. I topi sono stati mantenuti sia su un gamma-TMT (0,3%), o una dieta arricchita AIN93M standard, a partire da 1 settimana prima iniezione AOM, fino al termine della sperimentazione. Nella / topi trattati con AOM DSS, il trattamento dietetico gamma-TMT ha ottenuto un indice notevolmente inferiore infiammazione del colon (52% del controllo) il giorno 7 e il numero di adenomi del colon (9% del controllo) in settimana 7. trattamento gamma-TMT ha portato anche a un più elevato indice apoptotico in adenomi, prostaglandina E2 inferiore, leucotriene B4, e livelli di nitrotirosina nel colon, e prostaglandina E2 inferiore, leucotriene B4, e livelli di 8-isoprostano nel plasma in settimana 7.

Alcune delle diminuzioni sono state osservate anche nel giorno 7. Nell'esperimento 2 con AOM/DSS- topi trattati immolato sulla settimana 21, dietetici 0,17% o 0,3% di trattamento gamma-TMT, a partire da 1 settimana prima iniezione AOM, ha inibito significativamente l'adenocarcinoma e la formazione di adenomi del colon (al 17-33% del il controllo). Dietary 0,3% gamma-TMT, che è stato avviato dopo il trattamento DSS hanno anche mostrato una simile attività inibitoria.

Il presente studio ha dimostrato che gamma-TMT efficacemente inibito la carcinogenesi del colon in AOM / DSS topi trattati, e l'inibizione può essere dovuto indurre l'apoptosi, specie di azoto antinfiammatori, antiossidanti, e reattivi-trapping attività di tocoferoli.

338: Takahashi S, Takeshita K, Seeni A, Sugiura S, Tang M, Sato SY, Kuriyama H, Nakadate M, Abe K, Maeno Y, Nagao M, Shirai T.

**Suppression of prostate cancer in a transgenic rat model via gamma-tocopherol activation of caspase signaling.**

Prostate. 2009 May 1;69(6):644-51.

**BACKGROUND:** Epidemiological data indicate that intake of one form of vitamin E, gamma-tocopherol, may reduce prostate cancer risk, and several in vitro studies have demonstrated that gamma-tocopherol can inhibit prostate cancer cell growth. The purpose of the present study was to confirm effects of gamma-tocopherol on prostate cancer in the transgenic rat for adenocarcinoma of prostate (TRAP) model established in our laboratory.

**METHODS:** In Experiment 1, heterozygous male TRAP rats 5 weeks of age received alpha-tocopherol at the concentration of 50 mg/kg in the diet, or gamma-tocopherol at 50 or 100 mg/kg for 10 weeks. In Experiment 2, TRAP rats of 3 weeks of age were given gamma-tocopherol at 50, 100, or 200 mg/kg diet for 7 weeks.

**RESULTS:** gamma-Tocopherol did not affect body weight gain, organ weights or serum levels of either testosterone or estradiol. However, quantitative evaluation of prostatic lesions demonstrated significantly suppression of sequential progression from PIN to adenocarcinoma in a dose-dependent manner, along with clear activation of caspases 3 and 7 in the ventral lobe in both experiments.

**CONCLUSIONS:** The present study clearly demonstrated that gamma-tocopherol suppresses prostate tumor progression in an in vivo TRAP model, and could be a candidate chemopreventive agent for human prostate cancer.

### **Soppressione del cancro alla prostata in un modello di topo transgenico, attraverso l'attivazione di gamma-tocoferolo della caspasi segnalazione.**

**BACKGROUND:** i dati epidemiologici indicano che l'assunzione di una forma di vitamina E, gamma-tocoferolo, può ridurre il rischio di cancro alla prostata, e alcuni studi in vitro hanno dimostrato che il gamma-tocoferolo può inibire la crescita del cancro della prostata di cellule. Lo scopo del presente studio è stato quello di confermare gli effetti di gamma-tocoferolo sul cancro alla prostata nei topi transgenici per l'adenocarcinoma della prostata (TRAP), modello che nel nostro laboratorio.

**METODI:** Nell'esperimento 1, eterozigoti ratti maschi TRAP 5 settimane di età hanno ricevuto l'alfa-tocoferolo alla concentrazione di 50 mg / kg nella dieta, o gamma-tocoferolo a 50 o 100 mg / kg per 10 settimane. Nell'esperimento 2, TRAP ratti di 3 settimane di età è stata data gamma-tocoferolo a 50, 100 o 200 mg / kg dieta per 7 settimane.

**RISULTATI:** gamma-tocoferolo non ha influenzato l'aumento di peso corporeo, peso degli organi o dei livelli sierici di testosterone sia o estradiolo. Tuttavia, la valutazione quantitativa delle lesioni della prostata ha dimostrato in maniera significativa soppressione della progressione sequenziale da PIN per adenocarcinoma in modo dose-dipendente, con l'attivazione delle caspasi chiara 3 e 7 nel lobo ventrale in entrambi gli esperimenti.

**CONCLUSIONI:** Il presente studio ha dimostrato chiaramente che il gamma-tocoferolo sopprime la progressione del tumore alla prostata in un modello in vivo TRAP, e potrebbe essere un candidato agente chemiopreventivo per il cancro alla prostata umano.

339: Husain K, Francois RA, Hutchinson SZ, Neuger AM, Lush R, Coppola D, Sebti S, Malafa MP.

### **Vitamin E delta-tocotrienol levels in tumor and pancreatic tissue of mice after oral administration.**

Pharmacology. 2009;83(3):157-63.

Tocotrienols are natural vitamin E compounds that are known to have a neuroprotective effect at nanomolar concentration and anti-carcinogenic effect at micromolar concentration. In this report, we investigated the pharmacokinetics, tumor and pancreatic tissue levels, and toxicity of delta-tocotrienol in mice because of its anti-tumor activity against pancreatic cancer. Following a single oral administration of delta-tocotrienol at 100 mg/kg, the peak plasma concentration (C(max)) was 57 +/- 5 micromol/l, the time required to reach peak plasma concentration (T(max)) was 2 h and plasma half-life (t(1/2)) was 3.5 h. The delta-tocotrienol was cleared from plasma and liver within 24 h, but delayed from the pancreas. When mice were fed delta-tocotrienol for 6 weeks, the concentration in tumor tissue was 41 +/- 3.5 nmol/g. This concentration was observed with the oral dose (100 mg/kg) of delta-tocotrienol which inhibited tumor growth by 80% in our previous studies. Interestingly, delta-tocotrienol was 10-fold more concentrated in the pancreas than in the tumor. We observed no toxicity due to delta-tocotrienol as mice gained normal weight with no histopathological changes in tissues. Our data suggest that bioactive levels of delta-tocotrienol can be achieved in the pancreas following oral administration and supports its clinical investigation in pancreatic cancer.

#### **Livelli di vitamina E delta-tocotrienolo in tumore e tessuto pancreatico di topi dopo somministrazione orale**

Tocotrienoli sono composti naturali di vitamina E che sono noti per avere un effetto neuroprotettivo in concentrazione nanomolari ed effetto anti-cancerogeni sul concentrazione micromolare. In questo rapporto, abbiamo studiato la farmacocinetica, tumore e dei livelli di tessuto pancreatico, e la tossicità del delta-tocotrienoli nei topi a causa della sua attività antitumorale contro il cancro al pancreas. A seguito di una singola somministrazione orale di delta-tocotrienoli a 100 mg / kg, la concentrazione plasmatica di picco (C (max)) era di 57 +/- 5 micromoli / l, il tempo necessario per raggiungere il picco di concentrazione plasmatica (T (max)) è stata 2 ore e emivita plasmatica (t (1 / 2)) è stata di 3,5 h. Il delta-tocotrienolo è stato allontanato dal plasma e nel fegato in 24 h, ma in ritardo da parte del pancreas. Quando i topi sono stati nutriti delta-tocotrienoli per 6 settimane, la concentrazione nel tessuto tumorale è stato di 41 +/- 3,5 nmol / g. Questa concentrazione è stata osservata con la dose per via orale (100 mg / kg) di delta-tocotrienoli che ha inibito la crescita tumorale del 80% nei nostri studi precedenti. È interessante notare che il delta-tocotrienoli è stato di 10 volte più concentrato nel pancreas che nel tumore. Non abbiamo osservato tossicità a causa di delta-tocotrienoli come i topi sono aumentati di peso normale con assenza di cambiamenti istopatologici nei tessuti. I nostri dati suggeriscono che i livelli bioattivi di delta-tocotrienoli possono essere realizzati nel pancreas in seguito a somministrazione orale e sostiene la sua indagine clinica nel cancro del pancreas

342: Xu WL, Liu JR, Liu HK, Qi GY, Sun XR, Sun WG, Chen BQ.

#### **Inhibition of proliferation and induction of apoptosis by gamma-tocotrienol in human colon carcinoma HT-29 cells.**

Nutrition. 2009 May;25(5):555-66.

**OBJECTIVE:** gamma-Tocotrienol is a major component of the tocotrienol-rich fraction of palm oil, but there is limited evidence that it has antitumor activity. In particular, the effects of gamma-tocotrienol on human colon carcinoma cells have not been reported. To investigate the chemopreventive effects of gamma-tocotrienol on colon cancer, we examined its capacity to inhibit proliferation and induce apoptosis in HT-29 cells and explored the mechanism underlying these effects.

**METHODS:** We cultured HT-29 cells in the presence of gamma-tocotrienol. The effect of gamma-tocotrienol on cell proliferation was investigated by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay, mitotic index, and colony formation. The cell-cycle distribution was investigated by flow cytometry. We measured apoptosis by nuclear staining, transmission electron microscopy, and DNA fragmentation. Apoptosis-related proteins and the nuclear factor-kappaB p65 protein were determined by western blotting and immunofluorescence.

**RESULTS:** gamma-Tocotrienol inhibited cell growth and arrested HT-29 cells in G(0)/G(1) phase. The 50% inhibitory concentration was 31.7 micromol/L (48 h). gamma-Tocotrienol-induced apoptosis in HT-29 cells was accompanied by downregulation of Bcl-2, upregulation of Bax, and activation of caspase-3. Furthermore, we found that gamma-tocotrienol reduced the expression level of total nuclear factor-kappaB p65 protein and inhibited its nuclear translocation.

**CONCLUSION:** The results indicated that gamma-tocotrienol inhibits cell proliferation and induces apoptosis in HT-29 cells in a time- and dose-dependent manner, and that this process is accompanied by cell-cycle arrest at G(0)/G(1), an increased Bax/Bcl-2 ratio, and activation of caspase-3. Our data also indicated that nuclear factor-kappaB p65 protein may be involved in these effects.

### **L'inibizione della proliferazione e induzione di apoptosi da parte di gamma-tocotrienoli nelle cellule HT-29 di carcinoma del colon umano.**

**OBIETTIVO:** gamma-Tocotrienolo è una componente importante della frazione tocotrienolo ricca di olio di palma, ma non vi sono prove limitate che ha attività antitumorale. In particolare, gli effetti di gamma-tocotrienoli sulle cellule umane di carcinoma del colon non sono stati segnalati. Per studiare gli effetti chemiopreventivo di gamma-tocotrienoli sul cancro al colon, abbiamo esaminato le sue capacità di inibire la proliferazione e induce apoptosi nelle cellule HT-29 ed esplorato il meccanismo alla base di questi effetti.

**METODI:** Abbiamo colto HT-29 cellule in presenza di gamma-tocotrienoli. L'effetto di gamma-tocotrienoli sulla proliferazione cellulare è stata esaminata dalla 3 - (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-bromuro diphenyltetrazolium test, indice mitotico, e la formazione di colonie. La distribuzione del ciclo cellulare è stata valutata mediante citometria a flusso. Abbiamo misurato l'apoptosi dalla colorazione nucleare, la microscopia elettronica a trasmissione, e la frammentazione del DNA. Proteine Apoptosis-correlate e il fattore nucleare-kB p65 proteina sono state determinate mediante western blotting e immunofluorescenza.

**RISULTATI:** gamma-Tocotrienolo inibito la crescita cellulare e hanno arrestato le cellule HT-29 in G (0) / G (1) di fase. La concentrazione inibitoria del 50% era di 31,7 micromol / L (48 h). gamma-tocotrienoli indotto apoptosi nelle cellule HT-29 è stato accompagnato da down-regulation di Bcl-2, l'aumento di Bax, e l'attivazione della caspasi-3. Inoltre, abbiamo riscontrato che gamma-tocotrienoli ridotto il livello di espressione di totale fattore nucleare-kB p65 proteina e inibito la sua traslocazione nucleare.

CONCLUSIONE: I risultati hanno indicato che gamma-tocotrienoli inibisce la proliferazione cellulare e induce apoptosi nelle cellule HT-29 in maniera tempo e dose-dipendente, e che questo processo è accompagnato da arresto del ciclo cellulare in G (0) / G (1 ), un migliore rapporto Bax/Bcl-2, e l'attivazione della caspasi-3. I nostri dati hanno anche indicato che il fattore nucleare-kB p65 proteina possono essere coinvolti in questi effetti.

343: Yin Y, Ni J, Chen M, Guo Y, Yeh S.

**RRR-alpha-vitamin E succinate potentiates the antitumor effect of calcitriol in prostate cancer without overt side effects.**

**PURPOSE:** To determine the antitumor efficacy of using calcitriol combined with RRR-alpha-vitamin E succinate (VES) on prostate cancer.

**EXPERIMENTAL DESIGN:** The effects of VES or VES in combination with calcitriol on the calcitriol target genes were evaluated by Western blot and real-time PCR. The antiproliferation effect of the combination in prostate cancer cells was evaluated by the combination index method. The role of the vitamin D(3) receptor (VDR) in the enhanced antitumor effects of the combination was confirmed by small interfering RNA knockdown strategy. Xenograft-bearing mice were used to reaffirm the antitumor efficacy of this combination. Pathohistology analyses and expressions of VDR and its target genes were analyzed in untreated and treated tumors.

**RESULTS:** VES selectively increased VDR protein in different prostate cancer cells. Low doses of calcitriol combined with VES were significantly superior to the additive effect of individual treatments against prostate cancer cell proliferation. The expression of VDR target genes involved in antiproliferation were further sensitized in the presence of VES. Knockdown of VDR expression abolished the combination benefits in LNCaP and PC3 cells. Consistently, in prostate cancer xenograft models, VES enhanced the therapeutic efficacy of a tolerated dose of calcitriol yet without overt evidence of systemic toxicity and hypercalcemia. This notable in vivo effect was also accompanied by up-regulation of VDR target genes.

**CONCLUSIONS:** Low-dose calcitriol combined with vitamin E analogue could be a solution to the calcemic side effect. The demonstration of superior antitumor activity of low-dose calcitriol plus VES provides the preclinical basis for developing a useful therapeutic strategy for prostate cancer.

### **E RRR-alfa-vitamina succinato potenzia l'effetto antitumorale del calcitriolo nel tumore alla prostata senza effetti collaterali palesi.**

**Obiettivo:** determinare l'efficacia antitumorale di utilizzare in combinazione con calcitriolo E succinato RRR-alfa-vitamina E (VES) sul cancro prostatico.

**DISEGNO SPERIMENTALE:** Gli effetti della VES o in combinazione con calcitriolo sui geni bersaglio calcitriolo è stata valutata mediante Western blot e PCR in tempo reale. L'effetto antiproliferazione della combinazione di cellule tumorali della prostata è stata valutata con il metodo indice combinazione. Il ruolo della vitamina D (3) recettore (VDR) in effetti antitumorali maggiore della combinazione è stata confermata da piccoli RNA interferenti strategia colpo. Topi dello xenotrapianto-cuscinetto sono stati utilizzati per riaffermare l'efficacia antitumorale di questa combinazione. Analisi Pathohistology ed espressioni di VDR e dei suoi geni bersaglio sono stati analizzati nei tumori non trattati e trattati.

**RISULTATI:** VES aumentata VDR selettivamente proteine nelle diverse cellule del cancro alla prostata. Basse dosi di calcitriolo combinato con VES erano significativamente superiori ai effetto additivo di trattamenti individuali contro la proliferazione delle cellule di cancro alla prostata. L'espressione di geni bersaglio coinvolti nella VDR antiproliferazione sono stati ulteriormente

sensibilizzati, in presenza di VES. Colpo di espressione VDR abolito i benefici combinazione in cellule PC3 e LNCaP. Coerentemente, in modelli di tumore della prostata xenotrapianto, VES migliorato l'efficacia terapeutica di una dose tollerata di calcitriolo ancora senza prove evidenti di tossicità sistemica e ipercalcemia. Questo notevole effetto in vivo è stata anche accompagnata da up-regolazione di geni bersaglio VDR.

CONCLUSIONI: calcitriolo a basse dosi in combinazione con analogo della vitamina E potrebbe essere una soluzione per l'effetto collaterale calcemico. La dimostrazione di attività antitumorale superiore di calcitriolo a basse dosi più VES fornisce la base per lo sviluppo preclinico un'utile strategia terapeutica per il cancro alla prostata.

344: Nikolic K, Agababa D

**Design and QSAR study of analogs of gamma-tocotrienol with enhanced antiproliferative activity against human breast cancer cells.**

J Mol Graph Model. 2009 Apr;27(7):777-83.

Quantitative structure-activity relationships (QSAR) study has been performed for two sets of the antitumor drugs against human breast cancer MCF-7 cell lines, alpha-tocopherol and cholesterol derivatives. Constitutional, geometrical, physico-chemical and electronic descriptors (using the density functional theory, B3LYP/6-31G (d,p) basis set) were computed and analyzed. The most relevant of these descriptors were grouped and multiple linear regressions have been carried out. Optimal QSAR models with three and four variables,  $R(2) > 0.95$  and cross-validation parameter  $q(\text{pre})(2) > 0.88$ , were selected. Based on the QSAR study, novel vitamin-E derivatives (compounds D-1 and D-2) were designed and their antiproliferative activities were evaluated using the proposed regression models. Calculated antiproliferative activities of the designed compounds, IC(50) (D-1): 3.09 microM and IC(50) (D-2): 3.54 microM, were significantly stronger than anticancer effect of the other analyzed compounds IC(50): 4-1461 microM.

**Progettazione e QSAR studio di analoghi di gamma-tocotrienoli con una maggiore attività antiproliferativa nei confronti delle cellule umane di cancro al seno.**

Relazioni quantitative struttura-attività (QSAR) sono stati effettuati studi per due serie di farmaci antitumorali contro il cancro al seno umano MCF-7 linee di cellule, alfa-tocoferolo e derivati del colesterolo. Costituzionale, geometrico, fisico-chimiche e descrittori elettronico (utilizzando la teoria funzionale della densità, B3LYP/6-31G (d, p) base set) sono stati calcolati e analizzati. Il più rilevante di questi descrittori sono stati raggruppati e multipla regressione lineare sono stati effettuati. Ottima modelli QSAR con tre e quattro variabili,  $R(2) > 0,95$  e il parametro di convalida incrociata  $q(\text{pre})(2) > 0,88$ , sono stati selezionati. Sulla base dello studio QSAR, nuovi derivati di vitamina E (Composti D-1 e D-2) sono stati progettati e le loro attività antiproliferativa sono stati valutati in base ai modelli di regressione proposto. Calcolato attività antiproliferativa dei composti progettati, IC (50) (D-1): 3,09 microM e IC (50) (D-2): 3,54 microM, sono stati significativamente più forte di effetto antitumorale dei composti analizzati altri IC (50): 4-1.461 microM.

347: Stolzenberg-Solomon RZ, Sheffler-Collins S, Weinstein S, Garabrant DH, Mannisto S, Taylor P, Virtamo J, Albanes D.

Am J Clin Nutr. 2009 Feb;89(2):584-91.

## **Vitamin E intake, alpha-tocopherol status, and pancreatic cancer in a cohort of male smokers.**

**BACKGROUND:** Evidence indicates that vitamin E has anticarcinogenic properties for gastrointestinal cancers; however, few studies have examined this with respect to exocrine pancreatic cancer.

**OBJECTIVE:** The objective was to examine whether vitamin E intake and serum alpha-tocopherol concentrations were prospectively associated with exocrine pancreatic cancer.

**DESIGN:** We conducted a cohort analysis of prediagnostic vitamin E intake (4 tocopherols, 4 tocotrienols), serum alpha-tocopherol concentrations, and pancreatic cancer in the Alpha-Tocopherol, Beta-Carotene Cancer Prevention (ATBC) Study of male Finnish smokers aged 50-69 y at baseline. During follow-up from 1985 to 2004 (maximum: 19.4 y; median: 16 y), 318 incident cases were diagnosed among cohort participants with complete serum samples (n = 29,092); 306 cases had complete dietary data (n = 27,111). Cox proportional hazards models adjusted for age, smoking history, history of diabetes mellitus, and/or serum cholesterol were used to calculate hazard ratios (HRs) and 95% CIs.

**RESULTS:** Higher alpha-tocopherol concentrations were associated with lower pancreatic cancer risk (highest compared with lowest quintile, HR: 0.52; 95% CI: 0.34, 0.80; P for trend = 0.03; continuous HR: 0.91; 95% CI: 0.84, 0.99). Polyunsaturated fat, a putative prooxidant nutrient, modified the association such that the inverse alpha-tocopherol association was most pronounced in subjects with a high polyunsaturated fat intake (ie, >9.9 g/d; highest compared with lowest quintile, HR: 0.38; 95% CI: 0.20, 0.70; P for trend = 0.03; continuous HR: 0.86; 95% CI: 0.75, 0.97; P for interaction = 0.05 and 0.02, respectively). No associations were observed for dietary tocopherols and tocotrienols.

**CONCLUSION:** Our results support the hypothesis that higher alpha-tocopherol concentrations may play a protective role in pancreatic carcinogenesis in male smokers

## **Assunzione di vitamina E, lo stato di alfa-tocoferolo, e il cancro del pancreas in una coorte di fumatori maschi.**

**BACKGROUND:** Le prove indicano che la vitamina E ha proprietà antitumorali per i tumori gastrointestinali, ma pochi studi hanno esaminato questo per quanto riguarda il cancro del pancreas esocrino.

**OBIETTIVO:** L'obiettivo era valutare se l'assunzione di vitamina E e le concentrazioni sieriche di alfa-tocoferolo sono stati prospettivamente esocrina associata a cancro del pancreas.

**DESIGN:** Abbiamo condotto un'analisi di coorte prediagnostici assunzione di vitamina E (4 tocoferoli, 4 tocotrienoli), le concentrazioni sieriche di alfa-tocoferolo, e il cancro al pancreas nell'Alpha Tocopherol, Beta-Carotene Cancer Prevention (ATBC) Studio di maschi fumatori finlandese di 50 anni -69 y al basale. Durante il follow-up 1985-2004 (massima: 19,4 y; mediana: 16 y), 318 casi incidenti sono stati diagnosticati tra i partecipanti alla coorte con campioni di siero completo (n = 29.092), 306 casi erano completare i dati dietetici (n = 27.111). Proporzionali di Cox modelli di rischio aggiustato per età, storia di fumo, storia di diabete mellito e / o colesterolo sierico sono stati utilizzati per calcolare gli hazard ratio (HR) e IC al 95%.

**RISULTATI:** Le concentrazioni più alte di alfa-tocoferolo sono stati associati con minore rischio di cancro pancreatico (più alto rispetto al quintile più basso, HR: 0,52, 95% CI: 0,34, 0,80, P per trend = 0,03; HR continuo: 0.91, 95% CI: 0.84, 0,99). Grassi polinsaturi, un nutriente proossidante putativo, modificato l'associazione in modo che l'associazione inversa alfa-tocoferolo è stato più pronunciato nei soggetti con un elevato apporto di grassi polinsaturi (cioè, > 9,9 g / d; più alto rispetto al quintile più basso, HR: 0,38; 95 % CI: 0,20, 0,70; P per trend = 0,03; HR continuo: 0.86, 95% CI: 0,75, 0,97, P per interazione = 0.05 e 0.02, rispettivamente). Nessuna associazione è stata osservata per i tocoferoli e tocotrienoli dietetici.

CONCLUSIONE: I nostri risultati supportano l'ipotesi che alte concentrazioni di alfa-tocoferolo può svolgere un ruolo protettivo nella carcinogenesi pancreatica nei maschi fumatori.

356: Miyazawa T, Shibata A, Sookwong P, Kawakami Y, Eitsuka T, Asai A, Oikawa S, Nakagawa K.

**Antiangiogenic and anticancer potential of unsaturated vitamin E (tocotrienol).**

Several lines of evidence support the beneficial effect of tocotrienol (T3; an unsaturated vitamin E) on inhibition of tumor development. Many factors, including decrease in oxidative stress and modulation of cell signaling pathways in tumor and endothelial cells, have been implicated in such anticancer action of T3, while the in vivo potency and exact intracellular mechanisms for the anticancer properties of T3 remain not fully understood. We have hypothesized that the inhibitory effect of T3 on cancer may be attributable to the antiangiogenic activity of T3, and we found that T3 acts as a potent regulator of growth-factor-dependent signaling in endothelial cells and as an antiangiogenic agent minimizing tumor growth. In this work, we review the history and biological action (i.e., anticancer) of vitamin E and describe current research on the antiangiogenic effects of T3 and its mechanisms.

### **Antiangiogenicità e potenziale antitumorale della vitamina E insatura (tocotrienoli).**

Diverse linee di evidenza sostenere l'effetto benefico di tocotrienolo (T3; una vitamina insaturi) sulla inibizione dello sviluppo tumorale. Molti fattori, tra cui riduzione dello stress ossidativo e la modulazione di vie di segnalazione delle cellule in cellule tumorali ed endoteliali, sono state implicate in tale azione antitumorale di T3, mentre la potenza in vivo e preciso dei meccanismi intracellulari per le proprietà antitumorali di T3 non rimanere pienamente compreso. Abbiamo ipotizzato che l'effetto inibitorio del T3 sul cancro possono essere attribuiti alle attività antiangiogenica di T3, e abbiamo scoperto che agisce T3 come un potente regolatore del fattore di crescita-dipendente di segnalazione nelle cellule endoteliali e come agente antiangiogenico riducendo al minimo la crescita tumorale. In questo lavoro, passiamo in rassegna la storia e l'azione biologica (cioè, antitumorale) di vitamina E e descrivere la ricerca in corso sugli effetti antiangiogenici di T3 e dei suoi meccanismi.

364: Wang Y, Zhang L, Moslehi R, Ma J, Pan K, Zhou T, Liu W, Brown LM, Hu Y, Pee D, Gail MH, You W

**Long-term garlic or micronutrient supplementation, but not anti-Helicobacter pylori therapy, increases serum folate or glutathione without affecting serum vitamin B-12 or homocysteine in a rural Chinese population.**

The effects of a 7.3-y supplementation with garlic and micronutrients and of anti-*Helicobacter pylori* treatment with amoxicillin (1 g twice daily) and omeprazole (20 mg twice daily) on serum folate, vitamin B-12, homocysteine, and glutathione concentrations were assessed in a rural Chinese population. A randomized, double-blind, placebo-controlled, factorial trial was conducted to compare the ability of 3 treatments to retard the development of precancerous gastric lesions in 3411 subjects. The treatments were: 1) anti-*H. pylori* treatment with amoxicillin and omeprazole; 2) 7.3-y supplementation with aged garlic and steam-distilled garlic oil; and 3) 7.3-y supplementation with vitamin C, vitamin E, and selenium. All 3 treatments were given in a 2(3) factorial design to subjects seropositive for *H. pylori* infection; only the garlic supplement and vitamin and selenium supplement were given in a 2(2) factorial design to the other subjects. Thirty-four subjects were randomly selected from each of the 12 treatment strata. Sera were analyzed after 7.3 y to measure effects on folate, vitamin B-12, homocysteine, and glutathione concentrations. Regression analyses adjusted for age, gender, and smoking indicated an increase of 10.2% (95%CI: 2.9-18.1%) in serum folate after garlic supplementation and an increase of 13.4% (95%CI: 5.3-22.2%) in serum glutathione after vitamin and selenium supplementation. The vitamin and selenium supplement did not affect other analytes and the amoxicillin and omeprazole therapy did not affect any of the variables tested. In this rural Chinese population, 7.3 y of garlic supplementation increased the serum folate concentration and the vitamin and selenium supplement increased that of glutathione, but neither affected serum concentrations of vitamin B-12 or homocysteine.

**Aglione o supplementazione di micronutrienti a lungo termine, ma non una terapia anti-*Helicobacter pylori*, aumenta la quantità di folato e di glutazione nel siero senza alterare la vitamina B-12 o l'omocisteina in una popolazione rurale cinese.**

Gli effetti di una supplementazione di 7.3-y con aglio e micronutrienti e di anti-*Helicobacter pylori* il trattamento con amoxicillina (1 g due volte al giorno) e le concentrazioni di omeprazolo (20 mg due volte al giorno) su folato nel siero, la vitamina B-12, omocisteina e glutazione sono stati valutati in una popolazione rurale cinese. Uno studio randomizzato, in doppio cieco, placebo-controllato, fattoriale è stato condotto per confrontare la capacità di 3 trattamenti per ritardare lo sviluppo di lesioni precancerose gastriche in 3.411 soggetti. I trattamenti sono stati: 1) anti-*H. pylori* il trattamento con amoxicillina e omeprazolo, 2) l'integrazione 7.3-y con aglio invecchiato e distillato a vapore l'olio d'aglio e 3) integrazione 7.3-y con la vitamina C, vitamina E e selenio. Tutti e 3 i trattamenti sono stati somministrati in una (3) 2 disegno fattoriale a soggetti sieropositivi per l'infezione da *H. pylori*, ma solo il supplemento aglio e vitamine e supplementi di selenio sono stati dati in un (2) 2 disegno fattoriale per gli altri soggetti. Trentaquattro soggetti sono stati selezionati casualmente da ciascuno dei 12 strati di trattamento. I sieri sono stati analizzati dopo 7,3 y per

misurare gli effetti sui folati, vitamina B-12, omocisteina, e le concentrazioni di glutazione. Analisi di regressione aggiustate per età, sesso e fumo previsto un aumento del 10,2% (IC 95%: 2,9-18,1%), di folato nel siero dopo la supplementazione di aglio e un incremento del 13,4% (IC 95%: 5,3-22,2%) nel siero glutazione dopo supplementazione di vitamina E e selenio. Il supplemento di Vitamina E e selenio non ha interessato Other analiti e la Terapia con amoxicillina e omeprazolo non influiscono in alcun modo le Variabili esaminate. In cinese rurale popolazione this, 7,3 y della supplementazione di aglio ha aumentato la Concentrazione di folato NEL siero e la Vitamina

A e completare il selenio Che Onu aumento di glutatione, ma le concentrazioni sieriche Né interessata di Vitamina B-12 o di omocisteina.

368: Freitas RA, Silva dos Santos GA, Gimenes Teixeira HL, Scheucher PS, Lucena-Araujo AR, Lima AS, Abreu e Lima RS, Garcia AB, Jordão AA Jr, Falcão RP, Vannucchi H, Rego EM.

**Apoptosis induction by (+)alpha-tocopheryl succinate in the absence or presence of all-trans retinoic acid and arsenic trioxide in NB4, NB4-R2 and primary APL cells.**

Leuk Res. 2009 Jul;33(7):958-63.

We analyzed the effect of (+)alpha-tocopheryl succinate (alpha-TOS) alone or associated with arsenic trioxide (ATO) or all-trans retinoid acid (ATRA) in acute promyelocytic leukemia (APL). alpha-TOS-induced apoptosis in APL clinical samples and in ATRA-sensitive (NB4) and ATRA-resistant (NB4-R2) APL cell lines. The effective dose 50% (ED-50) was calculated to be 71 and 58muM, for NB4 and NB4-R2, respectively. alpha-TOS neither induced nor modified ATRA-induced differentiation of APL cells, and did not affect the proliferation and differentiation of normal CD34(+) hematopoietic progenitors in methylcellulose assays. alpha-TOS exerted a moderate antagonistic effect to ATO-induced apoptosis when treatment was done simultaneously but when alpha-TOS was added 24h after ATO, an additive effect was observed. Our results support the concept of alpha-TOS as an anti-leukemic compound which spares normal hematopoiesis

### **Induzione di apoptosi da (+) alfa-tocoferile succinato in assenza o in presenza di acido all-trans retinoico e triossido di arsenico in NB4, NB4-R2 e cellule primarie di APL**

Abbiamo analizzato l'effetto di (+) alfa-tocoferile succinato (alfa-TOS) da solo o associato con triossido di arsenico (ATO) o di acido all-trans retinoidi (ATRA) nella leucemia promielocitica acuta (APL). alfa-TOS-apoptosi indotta in campioni clinici e in APL ATRA-sensibili (NB4) e ATRA-resistente (NB4-R2) le linee di cellule APL. La dose efficace 50% (DE-50) è stata calcolata in 71 e 58muM, per NB4 e NB4-R2, rispettivamente. alfa-TOS, né modificato né indotta ATRA indotto la differenziazione delle cellule APL, e non ha influenzato la proliferazione e la differenziazione delle cellule CD34 normale (+) progenitori ematopoietici nei test di metilcellulosa. alfa-TOS esercitato un moderato effetto antagonista ATO apoptosi indotta quando il trattamento è stato fatto contemporaneamente, ma quando l'alfa-TOS è stato aggiunto 24 ore dopo ATO, un effetto additivo è stato osservato. I nostri risultati supportano il concetto di alfa-TOS come un composto anti-leucemica che risparmia emopoiesi normale.

371: Greenlee H, Hershman DL, Jacobson JS.

### **Use of antioxidant supplements during breast cancer treatment: a comprehensive review.**

Breast Cancer Res Treat. 2009Jun;115(3):437-52.

**PURPOSE:** An estimated 45-80% of breast cancer patients use antioxidant supplements after diagnosis, and use of antioxidant supplements during breast cancer treatment is common. Dietary supplements with antioxidant effects include vitamins, minerals, phytonutrients, and other natural products. We conducted a comprehensive review of literature on the associations between antioxidant supplement use during breast cancer treatment and patient outcomes.

**METHODS:** Inclusion criteria were: two or more subjects; clinical trial or observational study design; use of antioxidant supplements (vitamin C, vitamin E, antioxidant combinations, multivitamins, glutamine, glutathione, melatonin, or soy isoflavones) during chemotherapy, radiation therapy, and/or hormonal therapy for breast cancer as exposures; treatment toxicities, tumor response, recurrence, or survival as outcomes.

**RESULTS:** We identified 22 articles that met those criteria. Their findings did not support any conclusions regarding the effects of individual antioxidant supplements during conventional breast cancer treatment on toxicities, tumor response, recurrence, or survival. A few studies suggested that antioxidant supplements might decrease side effects associated with treatment, including vitamin E for hot flashes due to hormonal therapy and glutamine for oral mucositis during chemotherapy. Underpowered trials suggest that melatonin may enhance tumor response during treatment.

**CONCLUSION:** The evidence is currently insufficient to inform clinician and patient guidelines on the use of antioxidant supplements during breast cancer treatment. Thus, well designed clinical trials and observational studies are needed to determine the short- and long-term effects of such agents.

### **L'uso di supplementi antiossidanti durante il trattamento del cancro della mammella: un esame completo.**

**SCOPO:** Si stima che 45-80% dei malati di cancro al seno utilizzare integratori antiossidanti dopo la diagnosi, e l'uso di supplementi antiossidanti durante il trattamento del cancro al seno è comune. Gli integratori alimentari con effetti antiossidanti includono vitamine, minerali, fitonutrienti, e altri prodotti naturali. Abbiamo condotto una revisione completa della letteratura sulle associazioni tra uso di integratori antiossidanti durante il trattamento del cancro al seno risultati e paziente.

**METODI:** I criteri di inclusione erano: due o più soggetti; studio clinico o disegno dello studio osservazionale, uso di supplementi antiossidanti (vitamina C, vitamina E, antiossidante combinazioni, multivitaminici, glutamina, glutathione, melatonina, o gli isoflavoni di soia) durante la chemioterapia, radioterapia, e / o la terapia ormonale per il tumore al seno a quello delle esposizioni; tossicità del trattamento, la risposta del tumore, recidiva, la sopravvivenza o come dei risultati.

**RISULTATI:** Abbiamo identificato 22 articoli che ha incontrato a tali criteri. Le loro scoperte non hanno sostenuto alcuna conclusione in merito agli effetti dei supplementi antiossidanti individuale durante il trattamento convenzionale del cancro al seno su tossicità, la risposta del tumore, recidiva, o la sopravvivenza. Alcuni studi suggerisce che supplementi antiossidanti potrebbero ridurre gli

effetti collaterali associati al trattamento, tra cui la vitamina E per vampate di calore dovuta alla terapia ormonale e glutamina per mucosite orale durante la chemioterapia. Sottodimensionato prove suggeriscono che la melatonina può migliorare la risposta del tumore durante il trattamento.

**CONCLUSIONE:** La prova è attualmente insufficiente a informare le linee guida medico e paziente l'uso di supplementi antiossidanti durante il trattamento del cancro della mammella. Così, ben disegnati studi clinici e studi osservazionali sono necessari per determinare gli effetti a breve ea lungo termine di tali agenti.

375: Similä ME, Valsta LM, Virtanen MJ, Hätönen KA, Virtamo J.

**Glycaemic index database for the epidemiological Alpha-Tocopherol, Beta-Carotene Cancer Prevention (ATBC) Study.**

Br J Nutr. 2009 May;101(9):1400-5.

Interest in the dietary glycaemic index (GI) and glycaemic load (GL) as risk factors for chronic diseases has grown in recent years but findings have been controversial. We describe the compilation of the GI database for the cohort studies within the Alpha-Tocopherol, Beta-Carotene Cancer Prevention (ATBC) Study and the main characteristics associating with diet GI and GL. The ATBC Study enrolled 29 133 male smokers aged 50-69 years who filled in a dietary history questionnaire upon study entry. The dietary data included 1097 foods, of which 195 foods with no or a negligible amount of available carbohydrates were assigned a GI of zero. Based on preset methodological criteria for published GI studies, the GI value of a similar food was available for 130 foods, and the GI of related food was assigned to 360 foods. The GI values of these foods served in the GI calculation of 412 composite foods. The median diet GI among the ATBC Study participants was 67.3 (interquartile range 64.8-70.0), and the median diet GL was 175 (interquartile range 158-192). The intakes of carbohydrates, protein and fat decreased, and the intake of fibre increased, with increasing GI. The GL showed a positive correlation with intakes of carbohydrates and dietary fibre and a negative correlation with intakes of protein and fat. The GI studies available that fulfilled the minimum methodological requirements cover a sufficient amount of foods to form a meaningful GI database for epidemiological study. This, however, requires the availability of GI values for relevant local carbohydrate-containing foods.

#### **Database dell'indice glicemico per lo studio epidemiologico di alfa-tocoferolo e beta-carotene nella prevenzione del cancro.**

L'interesse per l'indice dietetico glicemico (IG) e del carico glicemico (GL) come fattori di rischio per le malattie croniche è cresciuta negli ultimi anni, ma i risultati sono stati controversi. Descriviamo la compilazione del database GI per gli studi di coorte entro l'Alpha-Tocopherol, Beta-Carotene Cancer Prevention (ATBC) Studio e le principali caratteristiche che associano con la dieta GI e GL. Lo studio ATBC arruolati 29 133 fumatori di sesso maschile di età compresa tra 50-69 anni che hanno compilato un questionario sulla storia alimentare nello studio. I dati inclusi nella dieta alimenti 1.097, di cui sono stati assegnati 195 cibi con o senza una quantità trascurabile di carboidrati a disposizione un IG pari a zero. Sulla base di criteri metodologici per la preselezione pubblicato studi di GI, il valore di GI di un alimento simile era disponibile per 130 alimenti, e l'IG dei cibi legati è stato assegnato a 360 prodotti alimentari. I valori di indice glicemico di questi alimenti serviti nel calcolo GI di 412 alimenti composti. La dieta IG mediana tra le partecipanti allo studio era 67,3 ATBC (interquartile range 64,8-70,0), e la mediana dieta GL è stato 175 (interquartile range 158-192). L'apporto di carboidrati, proteine e grassi è diminuito, e l'assunzione di fibre aumentata, con l'aumento della GI. Il GL ha mostrato una correlazione positiva con l'apporto di carboidrati e fibra alimentare e una correlazione negativa con l'apporto di proteine e grassi. Gli studi disponibili GI che rispettasse i requisiti minimi metodologici coprire una quantità sufficiente di alimenti per formare una base di dati significativi per GI studio epidemiologico. Questo, tuttavia, richiede la disponibilità di valori rilevanti per GI cibi locali contenenti carboidrati.

378: Wu XX, Kakehi Y, Jin XH, Inui M, Sugimoto M

#### **Induction of apoptosis in human renal cell carcinoma cells by vitamin E succinate in caspase-independent manner.**

.Urology. 2009 Jan;73(1):193-9.

**OBJECTIVES:** Renal cell carcinoma (RCC) is one of the most drug-resistant malignancies, and an effective therapy is lacking for metastatic RCC. Vitamin E (VE) has been intensively studied as a chemopreventive agent for various cancer types. Preclinical investigations have suggested that VE succinate (VES) is the most effective analog of VE in cancer cells; however, no study of VES in RCC has been done. We investigated the anticancer activity of VES against RCC.

**METHODS:** Cytotoxicity was assessed using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay. Cell morphologic changes and cell viability were evaluated using phase-contrast microscopy and the trypan blue dye-exclusion test, respectively. Caspase activity was measured with a quantitative colorimetric assay.

**RESULTS:** VES exerted dose- and time-dependent cytotoxicities against ACHN, a human RCC cell line, but VE and VE acetate did not. The cytotoxic effect was also observed in 2 other RCC cell lines, Caki-1 and Caki-2, and in primary RCC cells derived from 8 patients. Hoechst 33258 staining and DNA ladder analysis demonstrated that VES induced apoptosis in RCC cells. However, VES did not affect activation of caspase-3, -6, -8, or -9. Furthermore, inhibitors specific to caspase-8, -9, -6, and -3 did not block VES cytotoxicity and neither did the general caspase inhibitor VAD.

**CONCLUSIONS:** VES might induce apoptosis and cytotoxicity against RCC cells in a caspase-independent manner and has potential in vivo applications in the treatment of drug-and/or immunotherapy-resistant RCC.

### **L'induzione di apoptosi in cellule umane di carcinoma renale di vitamina E succinato caspasi-indipendente**

**OBIETTIVI:** carcinoma a cellule renali (RCC) è una delle neoplasie più resistenti ai farmaci, e una terapia efficace che manca per carcinoma renale metastatico. La vitamina E (VE) è stata studiata come agente chemiopreventivo per i vari tipi di cancro. Accertamenti preclinici hanno suggerito che succinato VE (VES) è l'analogo più efficace di VE nelle cellule tumorali, tuttavia, nessuno studio di VES in RCC è stato fatto. Abbiamo studiato l'attività antitumorale di VES contro RCC.

**METODI:** citotossicità è stata valutata utilizzando il 3 - (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-bromuro diphenyltetrazolium test. Modificazioni morfologiche delle cellule e la vitalità cellulare sono stati valutati usando la microscopia a contrasto di fase e l'azzurro prova trypan dye-esclusione, rispettivamente. Attività Caspase è stata misurata con un dosaggio quantitativo colorimetrico.

**RISULTATI:** VES esercitata dose e citotossicità dipendente dal tempo contro ACHN, una linea cellulare umana RCC, ma VE e acetato di VE non ha fatto. L'effetto citotossico è stato osservato anche in altre due linee di cellule RCC, Caki-1 e Caki-2, e in cellule primarie di RCC derivate da 8 pazienti. Hoechst 33258 colorazione e scala di analisi del DNA ha dimostrato che VES indotto apoptosi nelle cellule di RCC. Tuttavia, VES non ha influenzato l'attivazione della caspasi-3, -6, -8, o -9. Inoltre, gli inibitori specifici per caspasi-8, -9, -6 e -3 non bloccare la citotossicità VES e nemmeno l'inibitore generale delle caspasi VAD.

**CONCLUSIONI:** VES potrebbe indurre l'apoptosi e la citotossicità contro le cellule RCC in maniera caspasi-indipendente e ha un potenziale in applicazioni in vivo nel trattamento di immunoterapia drug-and/or resistente RCC.

384: Sharma S, Haldar C.

### **Comparative effect of melatonin and vitamin E on phenylhydrazine-induced toxicity in the spleen of *Funambulus pennanti*.**

EnvironToxicol. 2009 Feb;24(1):1-9.

Phenylhydrazine (PHZ) oxidation resulting in free iron release followed by free radical generation has increased frequency of cancer. This study aims towards the dose-dependent response of PHZ and the role of melatonin in comparison with vitamin E following PHZ-induced toxicity within the lymphoid tissue (spleen) of Indian tropical seasonal breeder, *Funambulus pennanti*, during reproductively active phase. An increase in the damages in terms of lipid peroxidation (LPO), apoptosis percentage, and splenomegaly was observed following different doses of PHZ treatment, i.e., 0.025, 0.5, and 1 mg/100 g body weight (b.wt.), where dose of 1 mg/100 g b.wt. showed more significant damages. Both melatonin (0.5 mg/100 g b.wt.) and vitamin E (1 mg/100 g b.wt.) administration ameliorated oxidative damages of 1 mg/100 g b.wt. PHZ-treated group. Melatonin altered PHZ-induced responses significantly to a greater degree than vitamin E as evidenced by LPO status, SOD activity, and ABTS radical cation scavenging activity of antioxidants. Thus, melatonin might be able to restrict carcinogenic property of PHZ-induced oxidative stress by protecting macromolecules of the cell from harmful effects of PHZ and instead preserving cell viability.

### **Effetto comparativo di melatonina e della vitamina E sulla fenilidrazina, tossicità indotta nella milza di *Funambulus pennanti*.**

Fenilidrazina (PHZ) ossidazione con conseguente rilascio di ferro libero seguita dalla generazione di radicali liberi è aumentata frequenza di cancro. Questo studio mira verso la risposta dose-dipendente della PHZ e il ruolo della melatonina in confronto con la vitamina E dopo PHZ tossicità indotta all'interno del tessuto linfoide (milza) di Indian allevatore tropicale stagionale, *pennanti* *Funambulus*, durante la fase sessualmente attivi. Un aumento del risarcimento danni in termini di perossidazione lipidica (LPO), percentuale di apoptosi, e la splenomegalia è stata osservata dopo somministrazione di dosi diverse di trattamento PHZ, vale a dire, 0.025, 0,5, e 1 mg/100 g di peso corporeo (b.wt.), dove dose di 1 mg/100 g b.wt. hanno mostrato i danni più significativi. Sia la melatonina (0,5 mg/100 g b.wt.) e vitamina E (1 b.wt. mg/100 g) gestione migliorata danni ossidativi di 1 mg/100 g b.wt. Gruppo PHZ-trattati. Melatonina alterato PHZ-indotto risposte in modo significativo ad un grado maggiore di vitamina E come dimostra lo stato LPO, attività SOD, e catione radicale ABTS scavenging attività di antiossidanti. Così, la melatonina potrebbe essere in grado di limitare la proprietà cancerogene di PHZ stress ossidativo indotto da proteggere macromolecole della cellula dagli effetti nocivi delle PHZ e invece conservare la vitalità cellulare.

Dong LF, Jameson VJ, Tilly D, Prochazka L, Rohlena J, Valis K, Truksa J, Zobalova R, Mahdavian E, Kluckova K, Stantic M, Stursa J, Freeman R, Witting PK, Norberg E, Goodwin J, Salvatore BA, Novotna J, Turanek J, Ledvina M, Hozak P, Zhivotovsky B, Coster MJ, Ralph SJ, Smith RA, Neuzil J.

**Mitochondrial targeting of  $\alpha$ -tocopheryl succinate enhances its pro-apoptotic efficacy: A new paradigm of efficient cancer therapy.**

Free Radic Biol Med. 2011 Mar 11.

School of Medical Science, Griffith University, Southport, Qld, Australia.

Mitochondria are emerging as intriguing targets for anti-cancer agents. We tested here a novel approach, whereby the mitochondrially targeted delivery of anti-cancer drugs is enhanced by addition of a triphenylphosphonium group (TPP(+)). Mitochondrially targeted analog of vitamin E succinate (MitoVES), modified by tagging the parental compound with TPP(+), induced considerably more robust apoptosis in cancer cells with a 1-2 log gain in anti-cancer activity compared to the unmodified counterparts, whilst maintaining selectivity for malignant cells. This is because MitoVES associates with mitochondria and causes fast generation of reactive oxygen species that then trigger mitochondria-dependent apoptosis, involving transcriptional modulation of the Bcl-2 family proteins. MitoVES proved superior in suppression of experimental tumors when compared to the untargeted analog. We propose that mitochondrially targeted delivery of anti-cancer agents offers a new paradigm for increasing the efficacy of compounds with anti-cancer activity.

**Il target mitocondriale dell'  $\alpha$ -tocoferil succinato aumenta la sua efficacia pro-apoptica: un nuovo paradigma della terapia tumorale efficace**

I mitocondri sono emergendo come obiettivi intrigante per gli agenti anti-cancro. Abbiamo testato qui un nuovo approccio, in cui viene esaltata la consegna mitocondrially mirata di farmaci anti-cancro con l'aggiunta di un gruppo triphenylphosphonium (TPP (+)). Mitochondrially mirata analogico di succinato di vitamina E (MitoVES), modificato dal tagging il composto parentale con TPP (+), ha indotto apoptosi molto più robusto in cellule tumorali con un guadagno di 1-2 log in attività anti-cancro, rispetto alle controparti non modificato, mentre mantenimento di selettività per le cellule maligne. Questo perché associa MitoVES con mitocondri e provoca rapida generazione di specie reattive dell'ossigeno che poi innescare l'apoptosi mitocondri-dipendente, che coinvolge la modulazione trascrizionale del-2 proteine della famiglia Bcl. MitoVES dimostrato superiore della soppressione dei tumori sperimentali rispetto alla analogico non mirati. Proponiamo che la consegna mitocondrially mirata di agenti anti-cancro offre un nuovo paradigma per aumentare l'efficacia di composti con attività anti-cancro.

Mi Y, Liu Y, Feng SS.

**Formulation of Docetaxel by folic acid-conjugated d- $\alpha$ -tocopheryl polyethylene glycol succinate 2000 (Vitamin E TPGS(2k)) micelles for targeted and synergistic chemotherapy.**

Biomaterials. 2011 Jun;32(16):4058-66.

Department of Chemical & Biomolecular Engineering, National University of Singapore, Block E5, 02-11, 4 Engineering Drive 4, Singapore 117576, Singapore.

Although high efficacy has been showed, Paclitaxel and Docetaxel cause serious side effects due to the adjuvant used in their clinical formulation Taxol(®) and Taxotere(®). We developed a micelle system with a newly synthesized TPGS(2k) polymer, which shows lower CMC of 0.0219 mg/ml compared with 0.2 mg/ml for traditional micelles with TPGS involved, to achieve sustained and controlled drug delivery with Docetaxel used as a model anti-cancer drug. The TPGS(2k) micelles were further conjugated to folic acid (FA) for targeted drug delivery. The Docetaxel-loaded TPGS(2k) micelles with and without FA conjugation were found of desired size and size distribution, high drug encapsulation efficiency and favorable drug release. In vitro studies using MCF-7 cancer cells demonstrated significantly the higher cellular uptake of the formulated drug for TPGS(2k) micelle formulation than that for Taxotere(®). The targeting effects for the FA conjugated TPGS(2k) micelles are also demonstrated. The IC(50) value, which is the drug concentration needed for 50% cell viability in the designated time period, is 103.4, 1.280 and 0.1480 µg/ml for MCF-7 cancer cells after 24, 48, and 72 h treatment respectively, which is greatly decreased to be 0.526, 0.251 and 0.233 µg/ml, i.e. a 99.5%, 80.4% decrease and 57.5% increase for the TPGS(2k) micelle formulation, and further decreased to be 0.1780, 0.1520 and 0.1140 µg/ml, i.e. a 99.8%, 88.1% and 23.0% decrease for the folic acid conjugated micelles, respectively. A synergistic effect between TPGS(2k) and Docetaxel is also achieved. The present work represents a new concept in the design of drug delivery systems - the carrier materials of the drug delivery system can also have therapeutic effects, which either modulate the side effects of, or promote a synergistic interaction with the formulated drug.

### **Formulazione del Docetaxel da micelle di acido folico coniugato a d- $\alpha$ -tocoferil polietilene glicol succinato 2000 (Vitamin E TPGS(2k)) per la chemioterapia mirata e sinergica**

Nonostante l'alta efficacia è stato dimostrato, paclitaxel e docetaxel causare gravi effetti collaterali a causa della adiuvante utilizzato nel loro Taxol formulazione clinica (®) e Taxotere (®). Abbiamo sviluppato un sistema di micelle con un TPGS di nuova sintesi (2k) polimero, che mostra più bassa CMC di 0,0219 mila mg / ml rispetto a 0,2 mg / ml per micelle tradizionale con TPGS coinvolti, per realizzare sostenuta e controllata con la somministrazione di farmaci Docetaxel utilizzato come modello anti-cancro droga. La (2k) micelle TPGS sono stati ulteriormente coniugati con acido folico (FA) per la somministrazione di farmaci mirati. The TPGS Docetaxel-caricato (2k) micelle con e senza coniugazione FA sono stati trovati di dimensione desiderata e distribuzione delle dimensioni, alta efficienza di incapsulamento di droga e il rilascio di farmaci favorevole. Studi in vitro con cellule MCF-7 il cancro hanno dimostrato in maniera significativa l'assorbimento maggiore cellulare del farmaco formulato per TPGS (2k) formulazione micellare da quello per il Taxotere (®). Gli effetti di targeting per l'TPGS FA coniugata (2k) micelle sono inoltre dimostrati. La (50) IC valore, che è la concentrazione di farmaco necessario per la vitalità cellulare del 50% nel periodo di tempo indicato, è 103,4, 0,148 mila e 1,280 mg / ml per MCF-7 cellule di cancro dopo 24, 48 e 72 h di trattamento, rispettivamente, che è notevolmente diminuito da 0,526, 0,251 e 0,233 mg / ml, vale a dire un 99,5%, 80,4% e diminuire 57,5% di aumento per la (2k) formulazione TPGS micelle, e l'ulteriore riduzione da 0,178 mille, 0,152 mila e 0,1 mila centoquaranta mg / ml, vale a dire un 99,8%, 88,1% e 23,0% per ridurre l'acido folico micelle coniugato, rispettivamente. Un effetto sinergico tra TPGS (2k) e Docetaxel è raggiunto. Il presente lavoro rappresenta un nuovo concetto nella progettazione di sistemi di somministrazione dei farmaci - i materiali di supporto del sistema di rilascio di farmaci può avere anche effetti terapeutici, che sia modulare gli effetti collaterali, o promuovere una interazione sinergica con il farmaco formulato.

Li GX, Lee MJ, Liu AB, Yang Z, Lin Y, Shih WJ, Yang CS.

**{delta}-Tocopherol Is More Active than {alpha}- or {gamma}-Tocopherol in Inhibiting Lung Tumorigenesis In Vivo.**

Cancer Prev Res (Phila). 2011 Mar;4(3):404-13.

The State University of New Jersey 164 Frelinghuysen Road Piscataway, NJ 08854-8020.  
csyang@rci.rutgers.edu.

In contrast to strong epidemiologic, preclinical, and secondary clinical evidence for vitamin E (tocopherols) in reducing cancer risk, large-scale clinical cancer-prevention trials of  $\alpha$ -tocopherol have been negative. This vexing contrast helped spur substantial preclinical efforts to better understand and improve the antineoplastic activity of tocopherol through, for example, the study of different tocopherol forms. We previously showed that the  $\gamma$ -tocopherol-rich mixture ( $\gamma$ -TmT) effectively inhibited colon and lung carcinogenesis and the growth of transplanted lung-cancer cells in mice. We designed this study to determine the relative activities of different forms of tocopherol in a xenograft model, comparing the anticancer activities of  $\delta$ -tocopherol with those of  $\alpha$ - and  $\gamma$ -tocopherols. We subcutaneously injected human lung cancer H1299 cells into NCr nu/nu mice, which then received  $\alpha$ -,  $\gamma$ -, or  $\delta$ -tocopherol or  $\gamma$ -TmT in the diet (each at 0.17% and 0.3%) for 49 days.  $\delta$ -Tocopherol inhibited tumor growth most strongly.  $\gamma$ -Tocopherol and  $\gamma$ -TmT (at 0.3%) also inhibited growth significantly, but  $\alpha$ -tocopherol did not.  $\delta$ -Tocopherol also effectively decreased oxidative DNA damage and nitrotyrosine formation and enhanced apoptosis in tumor cells; again,  $\gamma$ -tocopherol also was active in these regards but less so, and  $\alpha$ -tocopherol was not. Each supplemented diet increased serum levels of its tocopherol - up to 45  $\mu\text{mol/L}$  for  $\alpha$ -tocopherol, 9.7  $\mu\text{mol/L}$  for  $\gamma$ -tocopherol, and 1.2  $\mu\text{mol/L}$  for  $\delta$ -tocopherol; dietary  $\gamma$ - or  $\delta$ -tocopherol, however, decreased serum  $\alpha$ -tocopherol levels, and dietary  $\alpha$ -tocopherol decreased serum levels of  $\gamma$ -tocopherol. Each dietary tocopherol also increased its corresponding side-chain-degradation metabolites, with concentrations of  $\delta$ -tocopherol metabolites greater than  $\gamma$ -tocopherol and far greater than  $\alpha$ -tocopherol metabolites in serum and tumors. This study is the first in vivo assessment of  $\delta$ -tocopherol in tumorigenesis and shows that  $\delta$ -tocopherol is more active than  $\alpha$ - or  $\gamma$ -tocopherol in inhibiting tumor growth, possibly through trapping reactive oxygen and nitrogen species and inducing apoptosis;  $\delta$ -tocopherol metabolites could contribute significantly to these results.

### **{delta}-Tocoferolo è più attivo di {alfa}- o {gamma}-Tocoferolo nella inibizione della genesi dei tumori del polmone in vivo**

In contrasto con epidemiologico forte, preclinici, e secondaria evidenza clinica di vitamina E (tocoferoli) nel ridurre il rischio di cancro, gli studi clinici su larga scala la prevenzione del cancro di  $\alpha$ -tocoferolo sono stati negativi. Questo contrasto fastidioso contribuito a stimolare notevoli sforzi preclinici per meglio comprendere e migliorare l'attività antineoplastica di tocoferolo attraverso, ad esempio, lo studio di forme diverse tocoferolo. Abbiamo precedentemente dimostrato che la miscela di  $\gamma$ -tocoferolo-ricchi ( $\gamma$ -TMT) effettivamente inibiscono la carcinogenesi del colon e del polmone e la crescita delle cellule trapiantate per cancro al polmone nel topo. Abbiamo progettato questo studio per determinare l'attività relativa delle diverse forme di tocoferolo in un modello di xenotrapianto, confrontare le attività antitumorale di  $\delta$ -tocoferolo con quelli di  $\alpha$ -e  $\gamma$ -tocoferolo. Noi per via sottocutanea umani del polmone le cellule tumorali in H1299 NCR nu / nu topi, che poi ha ricevuto  $\alpha$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$  o  $\gamma$ -tocoferolo o-TMT nella dieta (ciascuno al 0,17% e 0,3%) per 49 giorni.  $\delta$ -tocoferolo inibisce la crescita tumorale più fortemente.  $\gamma$ -tocoferolo e  $\gamma$ -TMT (al 0,3%) ha anche inibito la crescita in modo significativo, ma  $\alpha$ -tocoferolo non ha fatto.  $\delta$ -tocoferolo anche ridotto effettivamente il danno ossidativo del DNA e la formazione di nitrotirosina e l'apoptosi nelle cellule tumorali avanzate, di nuovo,  $\gamma$ -tocoferolo è stato attivo anche in questo campo, ma meno, e  $\alpha$ -tocoferolo non è stato. Ogni dieta integrata aumento dei livelli sierici del suo tocoferolo - fino a 45 micromol / L di  $\alpha$ -tocoferolo, 9.7 micromol / L per  $\gamma$ -tocoferolo, e 1,2 micromol / L per  $\delta$ -tocoferolo,  $\gamma$ -dietetiche o  $\delta$ -tocoferolo, tuttavia, diminuiti livelli sierici di  $\alpha$ -tocoferolo, e dietetiche dei livelli sierici di  $\alpha$ -tocoferolo è diminuito di  $\gamma$ -tocoferolo. Ogni tocoferolo alimentari è aumentato

anche dei suoi metaboliti corrispondente della catena laterale-degrado, con concentrazioni di metaboliti  $\delta$ -tocoferolo maggiore di  $\gamma$ -tocoferolo e di gran lunga maggiore di metaboliti  $\alpha$ -tocoferolo nel siero e tumori. Questo studio è il primo di valutazione in vivo del  $\delta$ -tocoferolo nella tumorigenesi e dimostra che  $\delta$ -tocoferolo è più attiva di  $\alpha$ -o  $\gamma$ -tocoferolo a inibire la crescita tumorale, possibilmente attraverso metodi di cattura delle specie reattive di ossigeno e di azoto e di indurre apoptosi,  $\delta$ -tocoferolo metaboliti possono contribuire in maniera significativa a tali risultati.

Chung CJ, Pu YS, Chen YT, Su CT, Wu CC, Shiue HS, Huang CY, Hsueh YM.

## **Protective effects of plasma alpha-tocopherols on the risk of inorganic arsenic-related urothelial carcinoma.**

Sci Total Environ. 2011 Feb 15;409(6):1039-45.

School of Public Health, College of Public Health and Nutrition, Taipei Medical University, Taipei, Taiwan.

Arsenic plays an important role in producing oxidative stress in cultured cells. To investigate the interaction between high oxidative stress and low arsenic methylation capacity on arsenic carcinogenesis, a case-control study was conducted to evaluate the relationship among the indices of oxidative stress, such as urinary 8-hydroxydeoxyguanine (8-OHdG), as well as plasma micronutrients and urinary arsenic profiles on urothelial carcinoma (UC) risk. Urinary 8-OHdG was measured using high-sensitivity enzyme-linked immunosorbent assay kits. The urinary arsenic species were analyzed using high-performance liquid chromatography and hydride generator-atomic absorption spectrometry. Plasma micronutrient levels were analyzed using reversed-phase high-performance liquid chromatography. The present study showed a significant protective effect of plasma alpha-tocopherol on UC risk. Plasma alpha-tocopherol levels were significantly inversely related to urinary total arsenic concentrations and inorganic arsenic percentage (InAs%), and significantly positively related to dimethylarsinic acid percentage (DMA%). There were no correlations between plasma micronutrients and urinary 8-OHdG. Study participants with lower alpha-tocopherol and higher urinary total arsenic, higher InAs%, higher MMA%, and lower DMA% had a higher UC risk than those with higher alpha-tocopherol and lower urinary total arsenic, lower InAs%, lower MMA%, and higher DMA%. These results suggest that plasma alpha-tocopherol might modify the risk of inorganic arsenic-related UC.

## **Effetti protettivi degli alfa-tocoferoli nel plasma nel rischio di carcinoma uroteliale legato all'arsenico inorganico**

Arsenico svolge un ruolo importante nella produzione di stress ossidativo nelle cellule in coltura. Per studiare l'interazione tra elevato stress ossidativo e la scarsa capacità di metilazione arsenico sulla carcinogenesi arsenico, uno studio caso-controllo è stato condotto per valutare la relazione tra gli indici di stress ossidativo, come urinaria 8-hydroxydeoxyguanine (8-OHdG), così come micronutrienti plasma e profili di arsenico urinario sul carcinoma uroteliali (UC) di rischio. Urinaria 8-OHdG è stata misurata utilizzando kit ad alta sensibilità enzima-collegata dell'immunosorbente. Le specie di arsenico urinario sono stati analizzati utilizzando alte prestazioni cromatografia liquida e la spettrometria di assorbimento idruro generatore atomico. I livelli plasmatici di micronutrienti sono stati analizzati utilizzando in fase inversa ad alte prestazioni cromatografia liquida. Il presente studio ha mostrato un significativo effetto protettivo del plasmatici di alfa-tocoferolo sul rischio di UC. I livelli plasmatici di alfa-tocoferolo sono risultati significativamente inversamente proporzionale alla concentrazione di arsenico urinario totale e la percentuale di arsenico inorganico (InAs%), e significativamente correlata positivamente alla percentuale di acido dimethylarsinic (% DMA). Non ci sono state le correlazioni tra micronutrienti plasma e delle vie urinarie 8-OHdG. I partecipanti allo studio con l'alfa-tocoferolo inferiori e superiori arsenico urinario totale, superiore InAs%, superiore% MMA, e inferiore% DMA avevano un rischio più elevato di quelli con UC superiore alfa-tocoferolo e inferiori arsenico urinario totale, inferiore InAs%, inferiore% MMA, e% DMA superiore. Questi risultati suggeriscono che plasmatici di alfa-tocoferolo potrebbe modificare il rischio di arsenico inorganico legati UC.

Suhail N, Bilal N, Khan HY, Hasan S, Sharma S, Khan F, Mansoor T, Banu N.

## **Effect of vitamins C and E on antioxidant status of breast-cancer patients undergoing chemotherapy.**

J Clin Pharm Ther. 2011 Jan 4.

Department of Biochemistry, Faculty of Life Sciences, A M University, Aligarh, UP, India  
Department of Biochemistry, Santosh Medical College, Santosh University, Ghaziabad, UP, India  
Department of Surgery, J.N. Medical College, A M University, Aligarh, UP, India.

Reactive oxygen/nitrogen species generated by What is known and Objective: antineoplastic agents are prime suspects for the toxic side-effects of acute or chronic chemotherapy. The present study was undertaken to test whether vitamins C and E (VCE) supplementation protect against some of the harmful effects of In a commonly used anticancer drugs in breast-cancer patients. Methods: randomized 5-month study, the activity of various antioxidant enzymes (superoxide dismutase, catalase, glutathione-S-transferase and glutathione reductase) and the levels of malondialdehyde and reduced glutathione were measured in forty untreated breast-cancer patients (stage II) and compared with those of healthy controls. The degree of DNA damage was also assessed in the peripheral lymphocytes of the patients by alkaline single cell gel electrophoresis. The untreated patients were then randomly assigned to either mg/m(2) i.v. day 1, treatment with chemotherapy alone (5-fluorouracil 500 mg/m(2) i.v. day 1, mg/m(2) i.v. day 1 and cyclophosphamide 500 doxorubicin 50 weeks for six cycles) or to the same chemotherapy regimen supplemented every 3 mg gelatin capsule). On mg tablet and vitamin E 400 with VCE (vitamin C 500 completion of the treatments, both the groups were studied again for the levels The of the markers measured prior to treatment. Results and Discussion: untreated group showed significantly lower levels of antioxidant enzymes (P< 0.001) and reduced glutathione (P <0.001), and more extensive lipid peroxidation (P<0.001) and DNA damage than healthy controls. Similar but less pronounced patterns were observed in the patients receiving chemotherapy alone. The group of patients receiving VCE supplementation had all the marker levels moving towards normal values. Activities of superoxide dismutase, catalase, glutathione-S-transferase and glutathione reductase, and the levels of reduced glutathione were significantly increased (P<0.01) while, the levels of malondialdehyde and DNA damage were significantly (P<0.01) reduced in the VCE supplemented group relative to those of patients receiving chemotherapy alone as well as relative to the pretreatment levels. What is new and Co-administration of VCE restored antioxidant status, lowered by Conclusion: the presence of breast-cancer and chemotherapy. DNA damage was also reduced by VCE. The results suggest that VCE should be useful in protecting against chemotherapy-related side-effects and a randomized control trial to evaluate the effectiveness of VCE in breast-cancer patients using clinical outcomes would be appropriate.

## **Effetto delle vitamine C ed E sullo stato antiossidante dei pazienti con cancro al seno sottoposti a chemioterapia**

Reattive dell'ossigeno / specie azoto generati da ciò che è conosciuto e Obiettivo: agenti antineoplastici sono i principali sospettati per l'tossici gli effetti collaterali della chemioterapia acuta o cronica. Il presente studio è stato intrapreso per verificare se le vitamine C ed E (VCE) supplementazione di protezione contro alcuni degli effetti nocivi dei farmaci antitumorali in un comunemente utilizzati nei pazienti di cancro al seno. Metodi: studio randomizzato di 5 mesi, l'attività di diversi enzimi antiossidanti (superossido dismutasi, la catalasi, glutatione-S-transferasi e glutatione riduttasi) ed i livelli di malondialdeide e di glutatione ridotto sono stati misurati in quaranta pazienti non trattati di tumori al seno (fase II) e confrontati con quelli dei controlli sani. Il grado di danno al DNA è stata valutata anche in linfociti periferici di pazienti con singolo gel elettroforesi alcalina delle cellule. I pazienti non trattati sono stati poi assegnati in modo casuale a uno / mg m (2) iv giorno 1, il trattamento con la sola chemioterapia (5-fluorouracile 500 mg / m (2)

IV giorno 1, mg / m (2) IV giorno 1 e ciclofosfamide 500 doxorubicina 50 settimane per sei cicli) o al regime chemioterapico stesso completata ogni 3 mg capsule di gelatina). Su mg compressa e vitamina E 400 con VCE (vitamina C 500 completamento dei trattamenti, entrambi i gruppi sono stati studiati anche per i livelli di la marker misurati prima del trattamento Risultati e discussione:. Gruppo non trattato ha mostrato livelli significativamente più bassi di enzimi antiossidanti ( P <0 • 001) e del glutatione ridotto (p <0 • 001), e più estesa della perossidazione lipidica (P <0 • 001) e danni al DNA rispetto ai controlli sani. schemi simili, ma meno pronunciati sono stati osservati nei pazienti trattati con sola chemioterapia. Il gruppo dei pazienti trattati con supplementazione VCE aveva tutti i livelli di marker verso valori normali. Le attività della superossido dismutasi, la catalasi, glutatione-S-transferasi e glutatione reduttasi, ed i livelli di glutatione ridotto sono aumentate significativamente (P <0 • 01), mentre , i livelli di malondialdeide e di danni al DNA sono stati significativamente (P <0 • 01) ridotto nel gruppo VCE integrato rispetto a quelli dei pazienti trattati con sola chemioterapia come pure rispetto ai livelli di pretrattamento. Ciò che è nuovo e co-somministrazione di VCE restaurato status antiossidante, abbassato di Conclusione:. la presenza di tumore al seno e la chemioterapia danno al DNA è stato ridotto da VCE I risultati suggeriscono che VCE dovrebbero essere utili nella protezione contro legata alla chemioterapia gli effetti collaterali e una prova di controllo randomizzato per valutare l'efficacia. di VCE in pazienti con cancro al seno con gli esiti clinici sarebbe opportuno.

Fernandes NV, Guntipalli PK, Mo H.

**d- $\delta$ -Tocotrienol-mediated cell cycle arrest and apoptosis in human melanoma cells.**

Anticancer Res. 2010 Dec;30(12):4937-44.

Department of Nutrition and Food Sciences, Texas Woman's University, PO Box 425888, Denton, TX 76204, USA.

**BACKGROUND:** The rate-limiting enzyme of the mevalonate pathway, 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG CoA) reductase, provides essential intermediates for the prenylation or dolichylation of growth-related proteins. d- $\delta$ -tocotrienol, a post-transcriptional down-regulator of HMG CoA reductase, suppresses the proliferation of murine B16 melanoma cells. Dietary d- $\delta$ -tocotrienol suppresses the growth of implanted B16 melanomas without toxicity to host mice.

**MATERIALS AND METHODS:** The proliferation of human A2058 and A375 melanoma cells following a 72 h incubation in 96-well plates was measured by CellTiter 96® Aqueous One Solution. Cell cycle distribution was determined by flow cytometry. Fluorescence microscopy following acridine orange and ethidium bromide dual staining and procaspase-3 cleavage were used to detect apoptosis. Western-blot was employed to measure protein expression.

**RESULTS:** d- $\delta$ -Tocotrienol induced dose-dependent suppression of cell proliferation with 50% inhibitory concentrations (IC(50)) of  $37.5 \pm 1.4$  (A2058) and  $22.3 \pm 1.8$  (A375)  $\mu\text{mol/l}$ , respectively (data are reported as mean  $\pm$  standard deviation). d- $\delta$ -Tocotrienol-mediated cell cycle arrest at the G(1) phase was accompanied by reduced expression of cyclin-dependent kinase 4. Concomitantly, d- $\delta$ -tocotrienol induced caspase-3 activation and apoptosis. The impact of d- $\delta$ -tocotrienol on A2058 cell proliferation was potentiated by lovastatin (IC(50)= $3.1 \pm 0.5$   $\mu\text{mol/l}$ ), a competitive inhibitor of HMG CoA reductase.

**CONCLUSION:** d- $\delta$ -Tocotrienol may have potential application in melanoma chemoprevention and/or therapy.

### **d- $\delta$ -Tocotrienolo media l'arresto del ciclo cellulare e l'apoptosi nelle cellule di melanoma umano**

**BACKGROUND:** L'enzima limitante la velocità del percorso mevalonato, 3-idrossi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) reduttasi, prevede intermedi essenziali per la prenilazione o dolichylation di proteine alla crescita. d- $\delta$ -tocotrienolo, un post-trascrizionale down-regolazione della HMG CoA reduttasi, sopprime la proliferazione delle cellule di melanoma murino B16. Dietary d-sopprime  $\delta$ -tocotrienolo la crescita del melanoma B16 impiantati senza tossicità per topi host.

**MATERIALI E METODI:** La proliferazione delle A2058 umane e cellule di melanoma A375 a seguito di una 72 ore di incubazione in piastre da 96 pozzetti è stata misurata mediante CellTiter 96® acquosa una soluzione. Distribuzione del ciclo cellulare è stata determinata mediante citometria a flusso. Microscopia a fluorescenza seguenti arancio di acridina e bromuro di etidio doppia colorazione e procaspasi-3 scissione sono stati utilizzati per rilevare l'apoptosi. Western-blot è stato impiegato per misurare l'espressione della proteina.

**RISULTATI:** d- $\delta$ -Tocotrienolo soppressione indotta dose-dipendente della proliferazione cellulare con il 50% le concentrazioni di inibitori (IC (50)) di  $37,5 \pm 1,4$  (A2058) e  $22.3 \pm 1.8$  (A375) micromol / l, rispettivamente (dati sono segnalati come media  $\pm$  deviazione standard). d- $\delta$ -Tocotrienolo-mediato arresto del ciclo cellulare a (1) G fase è stata accompagnata da ridotta espressione delle chinasi ciclina-dipendente 4. In concomitanza, d- $\delta$ -tocotrienolo indotto l'attivazione della caspasi-3 e l'apoptosi. L'impatto della d- $\delta$ -tocotrienolo su A2058 proliferazione cellulare è stato potenziato da lovastatina (IC (50) =  $3.1 \pm 0.5$  mmol / l), un inibitore competitivo della HMG CoA reduttasi.

**CONCLUSIONE:** d- $\delta$ -Tocotrienolo potrebbe avere potenziali applicazioni nella chemioprevenzione del melanoma e / o terapia.

Yang H, Fang J, Jia X, Han C, Chen X, Yang CS, Li N.

## **Chemopreventive effects of early-stage and late-stage supplementation of vitamin E and selenium on esophageal carcinogenesis in rats maintained on a low vitamin E/selenium diet.**

Carcinogenesis. 2011 Mar;32(3):381-8.

Department of Food Toxicology, Institute of Nutrition and Food Safety, Chinese Center for Disease Control and Prevention, 7 Panjiayuan Nanli, Beijing 100021, China.

Low vitamin E and selenium (Ve/Se) nutritional status is known to be associated with increased risk of esophageal squamous cell carcinoma (ESCC). A previous human intervention trial demonstrated that Ve/Se supplementation decreased the occurrence of esophageal cancer death among younger participants but not among older ones. In this study, we intended to mimic this human nutritional status to determine the chemopreventive effects of Ve/Se supplementation at the early or late stage of esophageal carcinogenesis in rats maintained on a low Ve/Se diet. ESCC was induced in F344 rats with N-nitrosomethylbenzylamine (NMBzA) (0.35 mg/kg body wt, subcutaneously, three times per week for 5 weeks). The rats were maintained on a modified AIN-93M diet with low levels of Ve/Se or supplementation to the normal level by using the AIN-93M diet. At Week 25, the numbers of visible tumors and ESCC were significantly lower in rats on AIN-93M diet during the entire experimental period (Group D) or during the early stage (Group B) but not during the late stage (Group C). Ve/Se supplementation (switching from the low Ve/Se diet to the AIN-93M diet) also decreased cell proliferation, angiogenesis, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, biosynthesis of prostaglandin E2 and leukotriene B4, expression of cyclooxygenase 2 and 5-lipoxygenase in the esophagus. Our results demonstrated that Ve/Se supplementation inhibited NMBzA-induced esophageal carcinogenesis in rats on low Ve/Se diet, and supplementation during the early stage is more effective than during the late stage of carcinogenesis.

### **Effetti chemiopreventivi di un supplemento di vitamina E e selenio nella carcinogenesi dei ratti mantenuti con una dieta con basso apporto di vitamina E e selenio**

Vitamina E e selenio Basso (Ve / Se) lo stato nutrizionale è noto per essere associato ad un aumentato rischio di carcinoma a cellule squamose dell'esofago (ESCC). Uno studio precedente ha dimostrato che l'intervento umano Ve / SE supplementazione diminuito il verificarsi di morte per cancro esofageo tra i partecipanti più giovani ma non tra quelle più vecchie. In questo studio, abbiamo destinato a imitare questo status umano nutrizionale per determinare gli effetti di chemioprevenzione del Ve / supplementazione Se nella fase precoce o tardiva della carcinogenesi esofagea nei ratti mantenuti a / dieta a basso contenuto Ve Se. ESCC è stata indotta in ratti F344 con N-nitrosomethylbenzylamine (NMBzA) (0,35 mg / kg di peso corporeo, per via sottocutanea, tre volte alla settimana per 5 settimane). I ratti sono stati mantenuti in una dieta modificata AIN-93M con bassi livelli di VE / SE o integrazione al livello normale con la dieta AIN-93M. Alla settimana 25, il numero di tumori visibili e ESCC erano significativamente inferiori nei ratti a dieta AIN-93M durante l'intero periodo di sperimentazione (gruppo D) o durante la fase iniziale (Gruppo B), ma non durante la fase tardiva (Gruppo C). Ve / supplementazione Se (il passaggio dal basso Ve / dieta selenio nella dieta AIN-93M) è diminuita la proliferazione cellulare, l'angiogenesi, l'8-idrossi-2'-deossiguanosina, biosintesi di prostaglandine E2 e leucotriene B4, espressione della cicloossigenasi 2 e 5 -lipossigenasi nell'esofago. I nostri risultati hanno dimostrato che Ve / supplementazione Se inibito NMBzA carcinogenesi indotta esofageo in ratti a bassa Ve / dieta selenio, e l'integrazione durante la fase precoce è più efficace durante la fase tardiva della carcinogenesi.

Dong LF, Jameson VJ, Tilly D, Cerny J, Mahdavian E, Marín-Hernández A, Hernández-Esquivel L, Rodríguez-Enríquez S, Stursa J, Witting PK, Stantic B, Rohlena J, Truksa J, Kluckova K, Dyason JC, Ledvina M, Salvatore BA, Moreno-Sánchez R, Coster MJ, Ralph SJ, Smith RA, Neuzil J.

## **Mitochondrial targeting of vitamin E succinate enhances its pro-apoptotic and anti-cancer activity via mitochondrial complex II.**

J Biol Chem. 2011 Feb 4;286(5):3717-28.

School of Medical Science, Griffith University, Southport 4222, Queensland, Australia.

Mitochondrial complex II (CII) has been recently identified as a novel target for anti-cancer drugs. Mitochondrially targeted vitamin E succinate (MitoVES) is modified so that it is preferentially localized to mitochondria, greatly enhancing its pro-apoptotic and anti-cancer activity. Using genetically manipulated cells, MitoVES caused apoptosis and generation of reactive oxygen species (ROS) in CII-proficient malignant cells but not their CII-dysfunctional counterparts. MitoVES inhibited the succinate dehydrogenase (SDH) activity of CII with IC(50) of 80  $\mu$ M, whereas the electron transfer from CII to CIII was inhibited with IC(50) of 1.5  $\mu$ M. The agent had no effect either on the enzymatic activity of CI or on electron transfer from CI to CIII. Over 24 h, MitoVES caused stabilization of the oxygen-dependent destruction domain of HIF1 $\alpha$  fused to GFP, indicating promotion of the state of pseudohypoxia. Molecular modeling predicted the succinyl group anchored into the proximal CII ubiquinone (UbQ)-binding site and successively reduced interaction energies for serially shorter phytyl chain homologs of MitoVES correlated with their lower effects on apoptosis induction, ROS generation, and SDH activity. Mutation of the UbQ-binding Ser(68) within the proximal site of the CII SDHC subunit (S68A or S68L) suppressed both ROS generation and apoptosis induction by MitoVES. In vivo studies indicated that MitoVES also acts by causing pseudohypoxia in the context of tumor suppression. We propose that mitochondrial targeting of VES with an 11-carbon chain localizes the agent into an ideal position across the interface of the mitochondrial inner membrane and matrix, optimizing its biological effects as an anti-cancer drug.

## **Il target mitocondriale della vitamina E succinato aumenta l'attività proapoptotica e anti-tumorale tramite il complesso mitocondriale II**

Complesso mitocondriale II (CII) è stato recentemente identificato come un nuovo bersaglio per i farmaci anti-cancro. Mitochondrially mirati succinato vitamina E (MitoVES) viene modificata in modo che sia preferenzialmente localizzato ai mitocondri, migliorando notevolmente la sua attività pro-apoptotica e anti-cancro. Utilizzo di cellule geneticamente manipolate, MitoVES causato l'apoptosi e la generazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) in cellule maligne CII-abile, ma non le loro controparti CII-disfunzionale. MitoVES inibito la succinato deidrogenasi (SDH) l'attività delle infrastrutture critiche informatizzate con IC (50) di 80 micron, mentre il trasferimento di elettroni da CII alla CIII è stata inibita con IC (50) di 1,5 micron. L'agente non ha avuto effetto sia sulla attività enzimatica della CI, o sul trasferimento di elettroni da CI a C III. Nel corso di 24 h, MitoVES causato la stabilizzazione del dominio di distruzione di ossigeno-dipendente di HIF1 $\alpha$  fusa alla GFP, indicando la promozione dello stato di pseudohypoxia. Modellistica molecolare predetto gruppo succinil ancorato nella ubiquinone prossimale CII sito (UbQ) vincolanti e successivamente ridotti energie di interazione per la serie più breve omologhi catena phytyl di MitoVES correlato con i loro effetti inferiori a induzione di apoptosi, la generazione di ROS, e l'attività SDH. Mutazione del UbQ vincolanti Ser (68) all'interno del sito prossimale della subunità CII SDHC (S68A o S68L) ha soppresso sia la produzione di ROS e induzione di apoptosi da MitoVES. Gli studi in vivo hanno indicato che MitoVES agisce anche provocando pseudohypoxia nel contesto di soppressione tumorale. Proponiamo che il targeting mitocondriale di VES con una catena di 11-carbonio localizza l'agente in una posizione ideale attraverso l'interfaccia della membrana mitocondriale interna e la matrice, ottimizzando i suoi effetti biologici di un farmaco anti-cancro.

Kim MK, Ahn SH, Son BH, Sung MK.

**Plasma antioxidant concentration, not superoxide dismutase polymorphism, is associated with breast cancer risk in Korean women.**

Nutr Res. 2010 Oct;30(10):705-13.

Cancer Epidemiology Branch, Division of Cancer Epidemiology and Management, Research Institute, National Cancer Center, Goyang-si Gyeonggi-do, 410-769, Republic of Korea.

Disturbances in redox regulation are suggested to be involved in the development of breast cancer. We conducted a hospital-based case-control study to examine the hypothesis that lower plasma antioxidant concentration is related to higher risk of breast cancer and that genetic polymorphism of manganese superoxide dismutase (SOD2) modifies the relationship between breast cancer risk and plasma antioxidant. Genotyping for SOD2 Val16Ala polymorphism was performed by a 5' exonuclease assay, and plasma concentrations of retinol, carotenoids, and tocopherols were determined by high-performance liquid chromatography. Unconditional logistic regression models were used to estimate crude and multivariate odds ratios with a 95% confidence interval. The variant allele frequencies of SOD2 Val16Ala (TC or CC type) were 26% for the control subjects and 23% for the breast cancer patients, and the variant genotype was not a risk factor for breast cancer. Higher plasma retinol concentration was associated with a lower risk, whereas higher plasma  $\beta$ -carotene,  $\alpha$ -tocopherol, or  $\gamma$ -tocopherol concentrations were associated with a higher risk of breast cancer. SOD2 TC or CC genotype was associated with lower risk (odds ratio, 0.53; 95% confidence interval, 0.30-0.93; P for interaction = .025) in subjects with low plasma  $\gamma$ -tocopherol concentration. Our findings suggest that the SOD2 Val16Ala variant is not related to the risk of breast cancer in Korean women; however, it may affect the association between plasma  $\gamma$ -tocopherol levels and the risk of breast cancer.

**Nelle donne coreane la concentrazione di antiossidanti plasmatica, e non il polimorfismo della superossido dismutasi, è associata al rischio di cancro al seno**

Disturbi della regolazione redox si suggerisce di essere coinvolti nello sviluppo del cancro al seno. Abbiamo condotto uno studio su base ospedaliera caso-controllo per esaminare l'ipotesi che la minore concentrazione di antiossidanti nel plasma è legato a un rischio maggiore di tumore al seno e che il polimorfismo genetico della superossido dismutasi manganese (SOD2) modifica la relazione tra rischio di cancro al seno e antiossidante del plasma. Genotipizzazione per il polimorfismo SOD2 Val16Ala stato eseguito da un 5 'saggio exonuclease, e le concentrazioni plasmatiche di retinolo, carotenoidi e tocoferoli sono stati determinati da prestazioni elevate cromatografia liquida. Unconditional modelli di regressione logistica sono stati utilizzati per stimare grezzo e odds ratio multivariato con un intervallo di confidenza del 95%. Le frequenze alleliche variante di SOD2 Val16Ala (TC o tipo CC) sono stati il 26% per i soggetti di controllo e il 23% per i pazienti affetti da tumore al seno, e il genotipo variante non è stato un fattore di rischio per cancro al seno. Maggiore concentrazione di retinolo nel plasma è stato associato con un rischio inferiore, mentre maggiore plasma  $\beta$ -carotene,  $\alpha$ -tocoferolo, o concentrazioni  $\gamma$ -tocoferolo sono stati associati con un rischio maggiore di cancro al seno. SOD2 TC o genotipo CC era associato a più bassi rischi (odds ratio, 0,53; intervallo di confidenza 95% 0,30-0,93, p per interazione = 0,025) nei soggetti con bassa concentrazione plasmatica  $\gamma$ -tocoferolo. I nostri risultati suggeriscono che la variante SOD2 Val16Ala non è correlato al rischio di cancro al seno nelle donne coreane, tuttavia, può pregiudicare l'associazione tra livelli plasmatici di  $\gamma$ -tocoferolo e il rischio di cancro al seno.

Mondul AM, Weinstein SJ, Männistö S, Snyder K, Horst RL, Virtamo J, Albanes D.

### **Serum vitamin D and risk of bladder cancer.**

Cancer Res. 2010 Nov 15;70(22):9218-23.

Nutritional Epidemiology Branch, Division of Cancer Epidemiology and Genetics, National Cancer Institute, NIH, Department of Health and Human Services, Bethesda, Maryland, USA.  
mundulam@mail.nih.gov

Vitamin D may protect against several cancers, but data about the association between circulating vitamin D and bladder cancer are limited. Within the Alpha-Tocopherol, Beta-Carotene Cancer Prevention Study, a randomized controlled trial conducted to determine the effects of  $\alpha$ -tocopherol and  $\beta$ -carotene supplements on cancer incidence in male smokers, 250 bladder cancer cases were randomly sampled by month of blood collection. Controls were matched 1:1 to cases on age at randomization and date of blood collection. Conditional logistic regression was used to estimate odds ratios (OR) and 95% confidence intervals (CI) of bladder cancer by a priori categories of baseline serum 25-hydroxyvitamin D [25(OH)D; i.e., <25, 25 to <37.5, 37.5 to <50,  $\geq$ 50 nmol/L] and by season-specific quartiles. After multivariable adjustment, we found that lower 25(OH)D was associated with a statistically significantly increased risk of bladder cancer (versus  $\geq$ 50 nmol/L; <25 nmol/L: OR, 1.73; 95% CI, 1.03-2.91; 25 to <37.5 nmol/L: OR, 1.81; 95% CI, 1.05-3.14; 37.5 to <50 nmol/L: OR, 1.76; 95% CI, 1.02-3.02; P trend=0.04). Similarly, increased risks for the lowest vitamin D category were observed when season-specific quartiles were used (Q1 versus Q4: OR, 1.63; 95% CI, 0.96-2.75; P trend=0.03). In this prospective study of male smokers, lower serum 25(OH)D was associated with an increased risk of bladder cancer. Future studies should examine the association in other populations, especially nonsmokers and women.

### **La vitamina D nel siero e rischio di cancro alla vescica**

La vitamina D può proteggere contro i tumori diversi, ma i dati circa l'associazione tra vitamina D in circolo e il cancro della vescica sono limitati. All'interno del-alfa-tocoferolo, beta-Carotene Cancer Prevention Study, un trial randomizzato e controllato condotto per determinare gli effetti dei supplementi di  $\alpha$ -tocoferolo e  $\beta$ -carotene sull'incidenza del cancro nei fumatori di sesso maschile, 250 casi di cancro della vescica sono state scelte casualmente dal mese di raccolta del sangue. I controlli sono stati abbinati 1:1 a casi l'età alla randomizzazione e la data di raccolta del sangue. Regressione logistica condizionale è stato utilizzato per stimare gli odds ratio (OR) e intervalli di confidenza al 95% (CI) di cancro alla vescica da categorie a priori di siero basale 25-idrossivitamin D [25 (OH) D, cioè, <25, da 25 a <37,5, 37,5 a <50,  $\geq$  50 nmol / L] e da quartili stagione-specific. Dopo aggiustamento multivariato, abbiamo trovato che minore di 25 (OH) D è stata associata ad un rischio significativamente aumentato di cancro della vescica (contro  $\geq$  50 nmol / L; <25 nmol / L: OR 1,73, IC 95%, 1,03-2,91; 25 a <37,5 nmol / L: OR 1,81, IC 95%, 1,05-3,14; 37,5 a <50 nmol / L: OR 1,76, IC 95%, 1,02-3,02; trend P = 0,04). Allo stesso modo, l'aumento dei rischi per le tariffe più vitamina categoria D sono stati osservati quando quartili stagione-specifici sono stati utilizzati (Q1 contro Q4: OR 1,63, IC 95%, 0,96-2,75; trend P = 0,03). In questo studio prospettico di fumatori maschi, inferiore siero 25 (OH) D è stata associata ad un aumentato rischio di cancro alla vescica. Studi futuri dovrebbero esaminare l'associazione in altre popolazioni, soprattutto i non fumatori e le donne.

Kaileh M, Sen R.

### **Role of NF-kappaB in the anti-inflammatory effects of tocotrienols.**

J Am Coll Nutr. 2010 Jun;29(3 Suppl):334S-339S.

Laboratory of Cellular and Molecular Biology, National Institute on Aging, Baltimore, MD 21224, USA.

The NF-kappaB family of transcription factors regulates genes that are critical for inflammation and immunity. In most cells, NF-kappaB function is induced upon activation of cells by various stimuli. However, constitutive NF-kappaB activity is an equally important aspect of NF-kappaB function that is particularly relevant to chronic inflammation and cancer. Here, we provide a brief overview of NF-kappaB biology and discuss the role of NF-kappaB in mediating the anti-inflammatory effects of tocotrienols. The NF-kappaB family of transcription factors is a central player in the regulation of inflammation and immune responses. Consequently, NF-kappaB dysregulation has been implicated in diverse human pathologies ranging from autoimmune diseases to cancers. Additionally, there is considerable interest in the contribution of NF-kappaB-mediated chronic inflammation in aging. Because NF-kappaB-dependent gene regulation is important in virtually all mammalian cell types, it is critical to keep in mind some basic features of its functions when considering interventional therapeutics.

### **Ruolo di NF-kappaB negli effetti anti infiammatori dei tocotrienoli**

La famiglia di NF-kB di fattori di trascrizione regola i geni che sono critici per l'infiammazione e l'immunità. Nella maggior parte delle cellule, la funzione di NF-kB è indotta al momento dell'attivazione delle cellule da stimoli diversi. Tuttavia, l'attività costitutiva di NF-kB è un aspetto altrettanto importante della funzione di NF-kB, che è particolarmente rilevante per l'infiammazione cronica e il cancro. Qui, forniamo una breve panoramica della biologia NF-kB e discutere il ruolo di NF-kappaB nel mediare gli effetti anti-infiammatori di tocotrienoli. La famiglia di NF-kB di fattori di trascrizione è un giocatore centrale nella regolazione dell'infiammazione e delle risposte immunitarie. Di conseguenza, disregolazione di NF-kB è stata implicata in diverse patologie umane che vanno dai tumori alle malattie autoimmuni. Inoltre, esiste un notevole interesse nel contributo di NF-kB mediata da infiammazione cronica in invecchiamento. Perché regolazione dei geni NF-kB-dipendente è importante in praticamente tutti i tipi di cellule di mammifero, è fondamentale tenere a mente alcune caratteristiche di base delle sue funzioni quando si considerano terapie interventistiche.

Morley S, Thakur V, Danielpour D, Parker R, Arai H, Atkinson J, Barnholtz-Sloan J, Klein E, Manor D.

**Tocopherol transfer protein sensitizes prostate cancer cells to vitamin E.**  
J Biol Chem. 2010 Nov 12;285(46):35578-89. Epub 2010 Sep 8.

Department of Nutrition, Case Western Reserve University, Cleveland, Ohio 44106, USA.

Prostate cancer is a major cause of mortality in men in developed countries. It has been reported that the naturally occurring antioxidant  $\alpha$ -tocopherol (vitamin E) attenuates prostate cancer cell proliferation in cultured cells and mouse models. We hypothesized that overexpression of the tocopherol transfer protein (TTP), a vitamin E-binding protein that regulates tocopherol status, will sensitize prostate cancer cells to the anti-proliferative actions of the vitamin. To test this notion, we manipulated the expression levels of TTP in cultured prostate cells (LNCaP, PC3, DU145, and RWPE-1) using overexpression and knockdown approaches. Treatment of cells with tocopherol caused a time- and dose-dependent inhibition of cell proliferation. Overexpression of TTP dramatically sensitized the cells to the apoptotic effects of  $\alpha$ -tocopherol, whereas reduction ("knockdown") of TTP expression resulted in resistance to the vitamin. TTP levels also augmented the inhibitory effects of vitamin E on proliferation in semi-solid medium. The sensitizing effects of TTP were paralleled by changes in the intracellular accumulation of a fluorescent analog of vitamin E and by a reduction in intracellular levels of reactive oxygen species and were not observed when a naturally occurring, ligand binding-defective mutant of TTP was used. We conclude that TTP sensitizes prostate cancer cells to the anti-proliferative effects of vitamin E and that this activity stems from the ability of protein to increase the intracellular accumulation of the antioxidant. These observations support the notion that individual changes in the expression level or activity of TTP may determine the responsiveness of prostate cancer patients to intervention strategies that utilize vitamin E.

### **La proteina di trasferimento del tocoferolo sensibilizza le cellule cancerose della prostata alla vitamina E**

Il cancro della prostata è una delle principali cause di mortalità negli uomini nei paesi sviluppati. È stato riportato che la naturale antiossidante  $\alpha$ -tocoferolo (vitamina E) attenua la proliferazione del cancro della prostata di cellule in coltura e modelli di mouse. Abbiamo ipotizzato che la sovraespressione della proteina di trasferimento tocoferolo (TTP), una proteina vitamina E-vincolante che regola lo status tocoferolo, sarà sensibilizzare le cellule tumorali della prostata alle azioni anti-proliferativo di questa vitamina. Per verificare questa idea, abbiamo manipolato i livelli di espressione di TTP in coltura cellule della prostata (LNCaP, PC3, DU145 e RWPE-1) utilizzando approcci sovraespressione e abbattimento. Il trattamento delle cellule con tocoferolo causato un tempo e l'inibizione dose-dipendente della proliferazione cellulare. La sovraespressione di TTP drammaticamente sensibilizzate le cellule agli effetti apoptotici di  $\alpha$ -tocoferolo, mentre la riduzione ("colpo") di espressione TTP portato resistenza alla vitamina. Livelli di TTP anche aumentato gli effetti inibitori della vitamina E sulla proliferazione in mezzo semi-solido. Gli effetti sensibilizzanti di TTP erano di pari passo con i cambiamenti in accumulo intracellulare di un analogo fluorescente di vitamina E e da una riduzione dei livelli intracellulari di specie reattive dell'ossigeno e non sono stati osservati quando la natura, legame del ligando-difettoso mutante di TTP è stato utilizzato. Concludiamo che TTP sensibilizza le cellule tumorali della prostata agli effetti anti-proliferativo di vitamina E e che questa attività deriva dalla capacità di proteine per aumentare l'accumulo intracellulare di antiossidanti. Queste osservazioni supportano l'idea che le variazioni individuali nel livello di espressione o l'attività di TTP può determinare la capacità di risposta dei pazienti con cancro alla prostata a strategie di intervento che utilizzano la vitamina E.

Zaiden N, Yap WN, Ong S, Xu CH, Teo VH, Chang CP, Zhang XW, Nesaretnam K, Shiba S, Yap YL.

### **Gamma delta tocotrienols reduce hepatic triglyceride synthesis and VLDL secretion.**

J Atheroscler Thromb. 2010 Oct 27;17(10):1019-32.

Davos Life Science Pte Ltd, Cardiovascular Research Laboratory Singapore, 16 Tuas South Street 5, Singapore.

**AIM:** Present study aimed to elucidate the suppression of serum lipids by gamma- and delta-tocotrienol ( $\gamma\delta T3$ ).

**METHODS:** The lipid-lowering effects of  $\gamma\delta T3$  were investigated using HepG2 liver cell line, hypercholesterolemic mice and borderline-high cholesterol patients.

**RESULTS:** In-vitro results demonstrated two modes of action. First,  $\gamma\delta T3$  suppressed the upstream regulators of lipid homeostasis genes (DGAT2, APOB100, SREBP1/2 and HMGCR) leading to the suppression of triglycerides, cholesterol and VLDL biosyntheses. Second,  $\gamma\delta T3$  enhanced LDL efflux through induction of LDL receptor (LDLr) expression. Treatment of LDLr-deficient mice with 1 mg/day (50 mg/kg/day)  $\gamma\delta T3$  for one-month showed 28%, 19% reduction in cholesterol and triglyceride levels respectively, whereas HDL level was unaltered. The lipid-lowering effects were not affected by alpha-tocopherol ( $\alpha TP$ ). In a placebo-controlled human trial using 120 mg/day  $\gamma\delta T3$ , only serum triglycerides were lowered by 28% followed by concomitant reduction in the triglyceride-rich VLDL and chylomicrons. In contrast, total cholesterol, LDL and HDL remained unchanged in treated and placebo groups. The discrepancies between in-vitro, in-vivo and human studies may be attributed to the differential rates of post-absorptive  $\gamma\delta T3$  degradation and LDL metabolism.

**CONCLUSION:** Reduction in triglycerides synthesis and transport may be the primary benefit caused by ingesting  $\gamma\delta T3$  in human.

### **Gamma delta tocotrienoli riducono la sintesi dei trigliceridi epatici e la secrezione di VLDL**

**OBIETTIVO:** studio era finalizzato a chiarire la soppressione dei lipidi del siero di gamma-e delta-tocotrienoli ( $\gamma\delta T3$ ).

**METODI:** Gli effetti ipolipemizzanti di  $\gamma\delta T3$  sono stati studiati usando HepG2 linea di cellule del fegato, i topi con ipercolesterolemia ed i pazienti borderline il colesterolo alto.

**RISULTATI:** In vitro hanno dimostrato i risultati di due modalità di azione. In primo luogo,  $\gamma\delta T3$  soppressi i regolatori a monte di geni omeostasi lipidica (DGAT2, APOB100, SREBP1 / 2 e HMGCR) che porta alla soppressione di trigliceridi, biosintesi del colesterolo e VLDL. In secondo luogo,  $\gamma\delta T3$  efflusso di colesterolo LDL maggiore attraverso l'induzione del recettore LDL (LDLR) espressione. Il trattamento dei topi con deficit di LDLR con 1 mg / die (50 mg / kg / die)  $\gamma\delta T3$  per un mese ha mostrato il 28%, riduzione del 19% nei livelli di colesterolo e trigliceridi, rispettivamente, considerando che il livello di HDL è rimasta inalterata. Gli effetti ipolipemizzanti non sono stati colpiti da alfa-tocoferolo ( $\alpha TP$ ). In uno studio controllato con placebo umano per mezzo di 120 mg /  $\gamma\delta T3$  giorno, solo livelli sierici di trigliceridi sono stati ridotti del 28%, seguita da concomitante riduzione delle ricche in trigliceridi VLDL e chilomicroni. Al contrario, il colesterolo totale, LDL e HDL è rimasto invariato nei gruppi trattati e placebo. Le discrepanze tra in-vitro, studi in-vivo e umano possono essere attribuiti alle aliquote differenziate di post-assorbimento e il metabolismo di degradazione  $\gamma\delta T3$  LDL.

**CONCLUSIONE:** riduzione della sintesi di trigliceridi e di trasporto può essere il vantaggio principale causata dall'ingestione di  $\gamma\delta T3$  nell'uomo.

Drabsch Y, Robert RG, Gonda TJ.

### **MYB suppresses differentiation and apoptosis of human breast cancer cells.**

Breast Cancer Res. 2010;12(4):R55.

University of Queensland Diamantina Institute, University of Queensland, Ipswich Road, Brisbane, Queensland, 4102, Australia.

**INTRODUCTION:** MYB is highly expressed in estrogen receptor positive (ER + ve) breast tumours and tumour cell lines. We recently demonstrated that MYB is essential for the proliferation of ER + ve breast cancer cells, and have now investigated its role in mammary epithelial differentiation.

**METHODS:** MCF-7 breast cancer cells were treated with sodium butyrate, vitamin E succinate or 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate to induce differentiation as measured by Nile Red staining of lipid droplets and  $\beta$ -casein expression. The non-tumorigenic murine mammary epithelial cell (MEC) line, HC11, was induced to differentiate with lactogenic hormones. MYB levels were manipulated by inducible lentiviral shRNA-mediated knockdown and retroviral overexpression.

**RESULTS:** We found that MYB expression decreases following chemically-induced differentiation of the human breast cancer cell line MCF-7, and hormonally-induced differentiation of a non-tumorigenic murine mammary epithelial cell (MEC) line, HC11. We also found that shRNA-mediated MYB knockdown initiated differentiation of breast cancer cells, and greatly sensitised them to the differentiative and pro-apoptotic effects of differentiation-inducing agents (DIAs). Sensitisation to the pro-apoptotic effects DIAs is mediated by decreased expression of BCL2, which we show here is a direct MYB target in breast cancer cells. Conversely, enforced expression of MYB resulted in the cells remaining in an undifferentiated state, with concomitant suppression of apoptosis, in the presence of DIAs.

**CONCLUSIONS:** Taken together, these data imply that MYB function is critical in regulating the balance between proliferation, differentiation, and apoptosis in MECs. Moreover, our findings suggest MYB may be a viable therapeutic target in breast cancer and suggest specific approaches for exploiting this possibility.

### **MYB sopprime la differenziazione e l'apoptosi delle cellule cancerose mammarie umane**

**INTRODUZIONE:** MYB è altamente espressa nel recettore per gli estrogeni positivi (ER + ve), i tumori della mammella e linee di cellule tumorali. Abbiamo recentemente dimostrato che MYB è essenziale per la proliferazione di ER + ve le cellule di cancro al seno, e hanno ora esaminato il suo ruolo nella differenziazione epiteliale mammaria.

**METODI:** MCF-7 cellule di cancro al seno sono state trattate con butirrato di sodio, vitamina E succinato o 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetato di indurre il differenziamento misurato dal Nilo macchie rosse gocce lipidiche e di espressione  $\beta$ -caseina. Le cellule non-tumorali mammarie murine epiteliali (MEC) linea, HC11, fu indotto a differenziare con ormoni lattogenico. Livelli MYB sono stati manipolati da inducibile knockdown lentivirale shRNA-mediata e sovraespressione retrovirali.

**RISULTATI:** Abbiamo trovato che l'espressione MYB diminuisce seguente differenziazione indotta chimicamente dell'essere umano linea di cellule di carcinoma mammario MCF-7, e ormonale indotta da una differenziazione di una cellula di topo non-tumorali epiteliali mammarie (MEC) linea, HC11. Abbiamo anche trovato che shRNA mediata atterramento MYB avviato la differenziazione delle cellule del cancro al seno, e molto li sensibilizzati agli effetti differenziativi e pro-apoptotici di differenziazione agenti induttori (DIA). Sensibilizzazione agli effetti pro-apoptotici Dias è mediata dalla diminuita espressione di BCL2, che vi mostriamo qui è un bersaglio diretto MYB in cellule di cancro al seno. Al contrario, l'espressione forzata di MYB portato nelle celle rimanenti in uno stato indifferenziato, con la soppressione concomitante di apoptosi, in presenza di Dias.

**CONCLUSIONI:** Presi insieme, questi dati implicano che la funzione MYB è un fattore critico nel regolare l'equilibrio tra proliferazione, differenziazione e apoptosi in cateteri. Inoltre, i nostri

risultati suggeriscono MYB può essere un obiettivo vitale terapeutico nel cancro al seno e suggerire approcci specifici per sfruttare questa possibilità.

Luk SU, Yap WN, Chiu YT, Lee DT, Ma S, Lee TK, Vasireddy RS, Wong YC, Ching YP, Nelson C, Yap YL, Ling MT.

**Gamma-tocotrienol as an effective agent in targeting prostate cancer stem cell-like population.**

Int J Cancer. 2011 May 1;128(9):2182-91.

Department of Anatomy, Faculty of Medicine, the University of Hong Kong, Hong Kong, SAR, China.

Emerging evidence supports that prostate cancer originates from a rare subpopulation of cells, namely prostate cancer stem cells (CSCs). Conventional therapies for prostate cancer are believed to mainly target the majority of differentiated tumor cells but spare CSCs, which may account for the subsequent disease relapse after treatment. Therefore, successful elimination of CSCs may be an effective strategy to achieve complete remission from this disease. Gamma-tocotrienols ( $\gamma$ -T3) is one of the vitamin-E constituents, which have been shown to have anticancer effects against a wide range of human cancers. Recently, we have reported that  $\gamma$ -T3 treatment not only inhibits prostate cancer cell invasion but also sensitizes the cells to docetaxel-induced apoptosis, suggesting that  $\gamma$ -T3 may be an effective therapeutic agent against advanced stage prostate cancer. Here, we demonstrate for the first time that  $\gamma$ -T3 can downregulate the expression of prostate CSC markers (CD133/CD44) in androgen-independent prostate cancer cell lines (PC-3 and DU145), as evident from Western blotting analysis. Meanwhile, the spheroid formation ability of the prostate cancer cells was significantly hampered by  $\gamma$ -T3 treatment. In addition, pretreatment of PC-3 cells with  $\gamma$ -T3 was found to suppress tumor initiation ability of the cells. More importantly, although CD133-enriched PC-3 cells were highly resistant to docetaxel treatment, these cells were as sensitive to  $\gamma$ -T3 treatment as the CD133-depleted population. Our data suggest that  $\gamma$ -T3 may be an effective agent in targeting prostate CSCs, which may account for its anticancer and chemosensitizing effects reported in previous studies.

### **Gamma-tocotrienolo come agente bersaglio effettivo nella popolazione di cellule staminali cancerose prostatiche**

Evidenze crescenti sostiene che il cancro alla prostata origina da una sottopopolazione di cellule rare, vale a dire il cancro alla prostata di cellule staminali (CSC). Terapie convenzionali per il cancro alla prostata si crede target principalmente la maggior parte delle cellule tumorali differenziate ma CSC di ricambio, il che può spiegare la ripresa di malattia dopo il trattamento successivo. Pertanto, l'eliminazione di successo di CSC può essere una strategia efficace per raggiungere la remissione completa da questa malattia. Gamma-tocotrienoli ( $\gamma$ -T3) è uno dei componenti di vitamina E, che hanno dimostrato di avere effetti antitumorali contro una vasta gamma di tumori umani. Recentemente, abbiamo segnalato che il trattamento  $\gamma$ -T3 non solo inibisce il cancro alla prostata invasione cellulare, ma anche sensibilizza le cellule a docetaxel indotto apoptosi, suggerendo che il  $\gamma$ -T3 può essere un efficace agente terapeutico contro il cancro avanzato alla prostata stadio. Qui, abbiamo dimostrato per la prima volta che  $\gamma$ -T3 può downregulate l'espressione di marcatori di prostata CSC (CD133/CD44) in linee di carcinoma prostatico androgeno-indipendente cell (PC-3 e DU145), come evidente dalla analisi di Western blotting. Nel frattempo, la capacità sferoide formazione di cellule tumorali della prostata è stato rallentato in modo significativo dal trattamento  $\gamma$ -T3. Inoltre, il pretrattamento di PC-3 celle con  $\gamma$ -T3 è stato trovato per sopprimere l'inizio capacità delle cellule tumorali. Ancora più importante, anche se CD133 arricchita di cellule PC-3 sono stati altamente resistente alla terapia con docetaxel, queste cellule erano sensibili al trattamento  $\gamma$ -T3 come il CD133-popolazione impoverito. I nostri dati suggeriscono che  $\gamma$ -T3 può essere un efficace agente di targeting CSCs prostata, che può spiegare i suoi effetti anticancro e chemosensitizing riportati negli studi precedenti.

Black HS.

**Interaction of ascorbic acid and tocopherol on beta-carotene modulated carcinogenesis.**  
Hemoglobin. 2010 Jun;34(3):284-90.

Department of Dermatology, Baylor College of Medicine, Houston, Texas, USA.  
hblack@bcm.tmc.edu

Epidemiological studies suggested that above average intake of beta-carotene (betaC) might reduce cancer risks. However, clinical trials found that betaC supplementation did not reduce the occurrence of non-melanoma skin cancer and that smokers suffered a significant increase in lung cancer incidence. Further, supplementing semi-defined diets with betaC failed to provide photoprotection as reported earlier for closed-formula rations, but actually exacerbated carcinogenesis. A redox mechanism, based upon one-electron transfer rate constants, proposed interactions between tocopherol, betaC and ascorbic acid in which the carotenoid radical cation, a strongly oxidizing radical, would be repaired by ascorbic acid. If the carotenoid radical cation remained unrepaired, this strongly oxidizing species could account for the pro-carcinogenic activity of betaC. Data from nutritional studies supported an interaction of tocopherol and betaC but not with ascorbic acid. The repair of the betaC radical cation must be dependent on factors other than ascorbic acid, e.g., other carotenoids or unidentified phytochemical(s).

### **Interazione dell'acido ascorbico e del tocoferolo sulla carcinogenesi modulata dal beta-carotene**

Gli studi epidemiologici ha suggerito che l'assunzione media di sopra di beta-carotene (betaC) possa ridurre i rischi di cancro. Tuttavia, le prove cliniche ha constatato che betaC supplementazione non ha ridotto l'insorgenza di tumore cutaneo non-melanoma e che i fumatori ha subito un significativo aumento dell'incidenza di cancro polmonare. Inoltre, integrare le diete semi-definita con betaC omesso di fornire fotoprotezione come riportato in precedenza per le razioni chiuso formula, ma hanno addirittura peggiorato la carcinogenesi. Un meccanismo redox, sulla base di costanti di trasferimento di un elettrone tasso, le interazioni tra le proposte tocoferolo, acido ascorbico e betaC in cui il catione carotenoidi radicali, fortemente ossidanti radicali, sarebbe riparato da acido ascorbico. Se il catione radicale carotenoide rimasto riparato, questa specie fortemente ossidanti potrebbe spiegare l'attività di pro-cancerogeni di betaC. Dati provenienti da studi nutrizionali sostenuto una interazione di tocoferolo e betaC ma non con l'acido ascorbico. La riparazione del catione betaC radicale deve dipendere da altri fattori, oltre l'acido ascorbico, ad esempio, altri carotenoidi non identificati o fitochimici (s).

Basu HS, Mahlum A, Mehraein-Ghomi F, Kegel SJ, Guo S, Peters NR, Wilding G.

### **Pretreatment with anti-oxidants sensitizes oxidatively stressed human cancer cells to growth inhibitory effect of suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA).**

Cancer Chemother Pharmacol. 2011 Mar;67(3):705-15.

Wisconsin Institutes for Medical Research, University of Wisconsin Carbone Comprehensive Cancer Center, Madison, WI 53705, USA. hsb@medicine.wisc.edu

**PURPOSE:** Most prostate, colon and breast cancer cells are resistant to growth inhibitory effects of suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA). We have examined whether the high oxidative stress in these cells causes a loss of SAHA activity and if so, whether pretreatment with an anti-oxidant can sensitize these cells to SAHA.

**METHODS:** A DNA-Hoechst dye fluorescence measured cell growth and dichlorofluorescein-diacetate (DCF-DA) dye fluorescence measured reactive oxygen species (ROS). Growth inhibitory and ROS-generating activities of SAHA in androgen-treated or untreated LNCaP cells and PC-3 prostate cancer cells, HT-29 and HCT-115 colon cancer cells, MDA-MB231 breast cancer cells and A549 and NCI-H460 lung cancer cells with or without pretreatment with an anti-oxidant Vitamin E was determined. SAHA activity against LNCaP cells treated with another anti-oxidant N-acetyl cysteine (NAC) was also determined. Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) was used to determine intracellular SAHA level.

**RESULTS:** SAHA treatment markedly inhibits LNCaP cell growth, when the cells are at a low ROS level. SAHA is, however, inactive against the same cell line, when the cells are at a high ROS level. A significant decrease in SAHA level was observed in LNCaP cells with high ROS after 24- and 72-h treatment when compared to cells with low ROS. Vitamin E pretreatment that reduces cellular ROS, synergistically sensitizes oxidatively stressed LNCaP, PC-3, HT-29, HCT-115 and MDA-MB231 cells, but not the A-549 and NCI-H460 cells with low ROS to SAHA. NAC treatment also sensitized androgen-treated LNCaP cells to the growth inhibitory effects of SAHA.

**CONCLUSION:** Response to SAHA could be improved by combining anti-oxidants such as Vitamin E with SAHA for the treatment of oxidatively stressed human malignancies that are otherwise resistant to SAHA.

### **Il pretrattamento con anti-ossidanti sensibilizza ossidativamente le cellule cancerose umane stressate all'effetto inibitorio della crescita sull'acido idrossamico suberolanilide (SAHA).**

**SCOPO:** La maggior parte della prostata, del colon e le cellule di cancro al seno sono resistenti agli effetti inibitori della crescita di suberoylanilide acido idrossamico (SAHA). Abbiamo esaminato se l'elevato stress ossidativo in queste cellule provoca una perdita di attività Saha e in caso affermativo, se il pretrattamento con un antiossidante in grado di sensibilizzare a queste cellule di Saha.

**METODI:** Un colorante DNA-Hoechst fluorescenza misurata la crescita cellulare e dichlorofluorescein-diacetato (DCF-DA) fluorescenza colorante misurato specie reattive dell'ossigeno (ROS). Inibizione della crescita e ROS attività generatrici di SAHA in androgeno-trattati o non trattati cellule LNCaP e PC-3 cellule tumorali della prostata, HT-29 e HCT-115 cellule di cancro al colon, MDA-MB231 cellule del cancro della mammella e del polmone e A549 NCI-H460 cancro cellule con o senza pretrattamento con un anti-ossidante della vitamina E è stata determinata. SAHA attività contro le cellule LNCaP trattati con un altro cisteina antiossidante N-acetil (NAC) è stata anche determinata. Cromatografia liquida-spettrometria di massa (LC-MS) è stato utilizzato per determinare il livello intracellulare Saha.

**RISULTATI:** trattamento SAHA inibisce significativamente la crescita delle cellule LNCaP, quando le cellule sono a un livello basso ROS. SAHA, tuttavia, è inattivo contro la linea stessa cella, quando le cellule sono a un livello elevato ROS. Una diminuzione significativa del livello SAHA è stata osservata nelle cellule LNCaP con ROS alto dopo 24 - e il trattamento per 72 ore, rispetto alle cellule con ROS basso. La vitamina E pretrattamento che riduce il ROS cellulare, sensibilizza sinergicamente ossidatively sottolineato LNCaP, PC-3, HT-29, HCT-115 e le cellule MDA-MB231, ma non l'A-549 e le cellule NCI-H460 con ROS basso a Saha. Trattamento NAC inoltre sensibilizzati androgeno-trattati con cellule LNCaP di effetti inibitori della crescita di Saha.

CONCLUSIONE: Risposta a SAHA potrebbe essere migliorata combinando antiossidanti come la vitamina E con SAHA per il trattamento di ossidazione sottolineato neoplasie umane che altrimenti sarebbero resistenti a Saha.