

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

**Dottorato di ricerca in
Farmacologia e Tossicologia Sperimentali**

XXII Ciclo

**Acidi grassi polinsaturi omega 3:
modulazione del metabolismo del colesterolo**

**Tesi di dottorato di:
CHIARA DEGIROLAMO**

**Coordinatore del Dottorato:
Chiar.ma Prof. ssa
Elisabetta Barocelli**

**Tutore:
Chiar.mo Prof.
Franco Bernini**

Triennio accademico: 2006-2009

*Alla mia famiglia
per la pazienza e l'amore infiniti
Ai miei amici
per aver reso colorati i miei giorni
di studio*

*“The greatest obstacle to knowledge is the illusion of knowledge”
Barry Marshall, Nobel Prize 2005 per la scoperta del batterio Helicobacter pylori*

INDICE

1. INTRODUZIONE.....	5
1.1 Premessa.....	6
1.2 Metabolismo delle lipoproteine aterogene: VLDL e LDL.....	11
<i>Sintesi e assemblaggio delle VLDL.....</i>	<i>16</i>
<i>Metabolismo plasmatico delle lipoproteine contenenti apoB.....</i>	<i>17</i>
<i>Catabolismo delle lipoproteine contenenti apoB.....</i>	<i>19</i>
1.3 L'importanza del fegato nel metabolismo del colesterolo e degli acidi grassi a lunga catena.....	21
<i>Metabolismo del colesterolo.....</i>	<i>22</i>
<i>Metabolismo degli acidi grassi a lunga catena.....</i>	<i>26</i>
1.4 Regolazione del metabolismo del colesterolo: il ruolo della dieta.....	31
<i>Acidi grassi e lipoproteine plasmatiche.....</i>	<i>33</i>
<i>Acidi grassi monoinsaturi vs polinsaturi: l'eterno dibattito.....</i>	<i>34</i>
1.5 Acidi grassi polinsaturi omega 3.....	38
<i>Omega 3 e cardioprotezione: studi nell'uomo.....</i>	<i>42</i>
<i>Proprieta' ipolipidemizzanti degli acidi grassi omega 3: studi in modelli animali.....</i>	<i>44</i>
1.6 Acido alfa-linolenico (ALA).....	47
 2. SCOPO DELLA RICERCA.....	 50
 3. MATERIALI E METODI.....	 53
3.1 Formulazione delle diete sperimentali.....	54
3.2 Disegno sperimentale: animali, tempi di trattamento, raccolta organi.....	55
3.3 Analisi del profilo lipidico e lipoproteico: plasma e fegato.....	56
3.4 Isolamento e caratterizzazione delle lipoproteine plasmatiche.....	57
3.5 Valutazione della composizione in acidi grassi dei lipidi.....	57
3.6 Quantificazione dell'aterosclerosi.....	58

3.7 Real-Time PCR.....	58
3.8 Analisi statistica.....	59
 4. RISULTATI.....	 60
4.1 Studio I: Valutazione dell'ipocolesterolemia e arricchimento in acidi grassi omega-3 indotti dall'acido alfa-linolenico in condizioni di ridotto contenuto di colesterolo nella dieta.....	61
4.2 Studio II: Valutazione dell'ipocolesterolemia e arricchimento in acidi grassi omega-3 indotti dall'acido alfa-linolenico in condizioni di un elevato contenuto di colesterolo nella dieta.....	67
4.3 Studio III: Valutazione del potenziale ateroprotettivo dell'acido alfa-linolenico.....	70
 5. DISCUSSIONE.....	 79
 ABBREVIAZIONI.....	 86
BIBLIOGRAFIA.....	88

Introduzione

1.1 Premessa

L'aterosclerosi e' una condizione patologica progressiva che interessa principalmente le medie e grandi arterie ed e' responsabile dell'insorgenza dei piu' comuni eventi avversi del sistema cardiovascolare quali infarto del miocardio e ictus. La malattia aterosclerotica e' caratterizzata da un ispessimento e indurimento della parete arteriosa con conseguente perdita di elasticita', dalla formazione di depositi ateromatosi e da fibrosi nello strato piu' interno della parete arteriosa.

Le specifiche conseguenze dei cambiamenti patologici della malattia aterosclerotica dipendono, in parte, dalla dimensione del vaso interessato. Infatti, le larghe arterie elastiche, inclusa l'aorta e le arterie iliache, generalmente sono soggette alla distruzione della parete con conseguente aneurisma, mentre le medie e piccole arterie muscolari, quali coronarica, carotidea, vertebrale, femorale e tibiale, presentano lesioni occlusive che contribuiscono allo sviluppo di disturbi di natura ischemica [1]. Il carattere multifattoriale attribuito alla malattia aterosclerotica deriva dall'osservazione che molteplici fattori di rischio contribuiscono non solo all'insorgenza ma anche alla progressione dell'aterosclerosi.

I fattori di rischio sono suddivisi in due categorie principali:

- fattori di rischio genetici: elevati livelli di lipoproteine a bassa o molto bassa densita' (LDL e VLDL), ridotti livelli di lipoproteine ad alta densita' (HDL), elevati livelli di lipoproteina Lp(a), ipertensione arteriosa, iperomocisteinemia, diabete, elevati livelli di fattori ematici, sesso, infiammazione sistemica;
- fattori di rischio ambientali: dieta ad alto contenuto di grassi saturi e colesterolo, fumo di sigaretta, ridotto esercizio fisico, ridotti livelli di antiossidanti, agenti infettivi (es. Chlamydia pneumoniae) [2,3,4].

Le lesioni aterosclerotiche originano nell'intima e la loro formazione e' caratterizzata da

- accumulo di macrofagi e cellule muscolari lisce nell'intima;
- proliferazione delle cellule muscolari lisce dell'intima;

- produzione e accumulo di diverse quantità degli elementi della matrice extracellulare quali collagene, elastina e proteoglicani;
- accumulo di lipidi in forma di colesterolo estere e libero sia a livello cellulare che del tessuto connettivo extracellulare. [1,4].

La prima manifestazione morfologica della malattia aterosclerotica è rappresentata dalla stria lipidica (fatty streak) che appare a livello aortico in età pediatrica per poi comparire a livello coronarico in età adulta. Le strie lipidiche sono caratterizzate dalla presenza di depositi intracellulari di colesterolo estere e libero a livello del citoplasma di macrofagi i quali assumono il caratteristico aspetto di cellule schiumose (foam cells). Le strie lipidiche possono poi progredire verso lesioni di maggiore gravità assumendo i fenotipi propri delle placche avanzate che sono associate a calcificazione e necrosi oltre che essere suscettibili alla rottura. La rottura della placca è ora riconosciuta essere determinante per eventi coronarici acuti nell'uomo quali angina instabile, infarto acuto del miocardio e morte improvvisa [5,6].

Studi clinici [6,7,8] hanno mostrato che l'aterosclerosi inizia con l'adesione di monociti e linfociti alle cellule endoteliali attivate dell'intima; tale osservazione ha contribuito alla definizione, tuttora vigente, dell'aterosclerosi come patologia infiammatoria cronica. Questa definizione è limitativa ed esclude la reale origine del danno vascolare focale che, osservazioni condotte sia nell'animale da laboratorio che nell'uomo, hanno identificato nella dislipidemia. Alterazioni del metabolismo lipidico e lipoproteico le quali si manifestano con un aumento (iperlipoproteinemia) o una riduzione (ipolipoproteinemia) della concentrazione delle lipoproteine plasmatiche e/o con una loro alterazione qualitativa sono positivamente associate all'insorgenza e alla progressione delle lesioni aterosclerotiche.

L'evento iniziante primario nell'aterosclerosi è l'accumulo di lipoproteine LDL nello spazio sub-endoteliale del vaso arterioso. L'accumulo è maggiore quando i livelli circolanti di LDL sono elevati e sia il trasporto che la ritenzione delle LDL risultano aumentati nei siti preferenziali per la formazione delle lesioni [1]. Le LDL diffondono passivamente attraverso le giunzioni endoteliali e vengono ritenute nella parete del vaso. La ritenzione delle LDL

e' mediata dalle interazioni ioniche tra i domini carichi positivamente (residui 3148-3158 e 3359-3369) dell'apolipoproteina apoB-100 delle LDL e i domini carichi negativamente (gruppi solfato SO_4^{2-}) di componenti della matrice extracellulare quali proteoglicani, collagene e fibronectina [9,10, 11].

Le LDL allo stato nativo non sono soggette facilmente all'up-take selettivo da parte dei macrofagi della parete arteriosa. E' stato osservato che le LDL infiltrate nella parete arteriosa vanno incontro a modificazioni quali ossidazione, lipolisi, proteolisi; le LDL cosi' modificate vengono internalizzate dai macrofagi attraverso la via dei recettori scavenger (recettori non sottoposti a feedback negativo) [1].

L'accumulo di LDL modificate (generalmente ossidate, OxLDL) induce le cellule endoteliali e le cellule muscolari lisce ad esercitare un'attivita' chemotattica nei confronti dei monociti. La differenziazione dei monociti in macrofagi e successivamente in cellule schiumose stimola:

- il rilascio di citochine pro-infiammatorie e di molecole di adesione;
- la chemotassi e la trasformazione delle cellule muscolari dal fenotipo contrattile a quello proliferativo;
- un'incrementata sintesi di proteoglicani [1,4]. (figura 1)

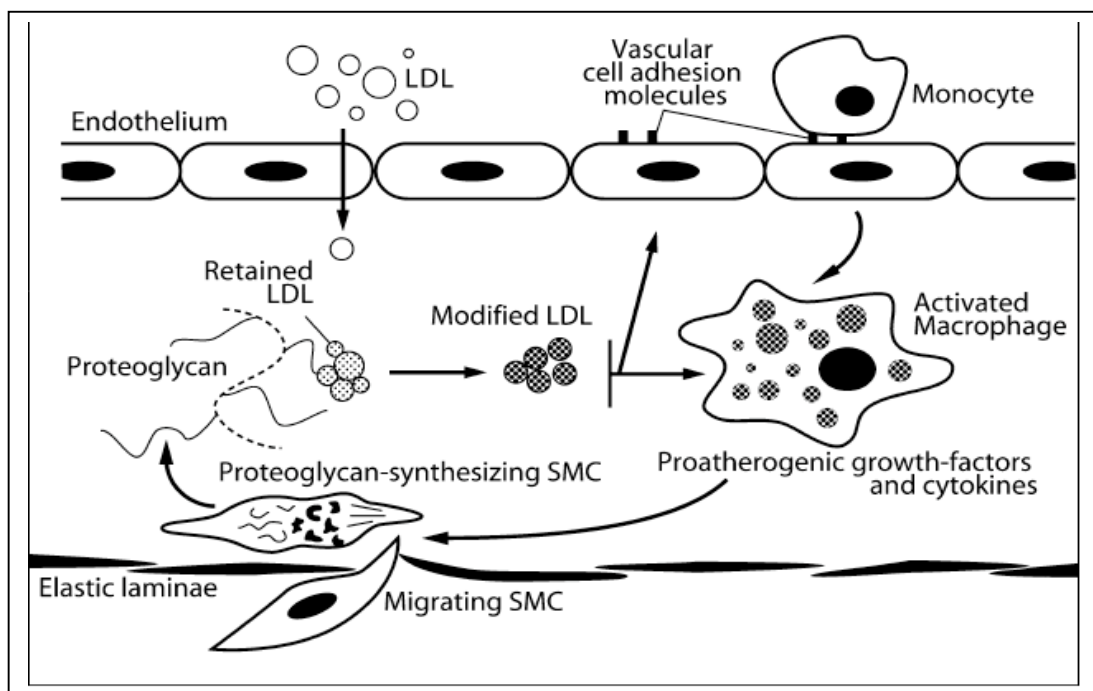


Figura 1. Risposta cellulare alla ritenzione di lipoproteine LDL nella parete del vaso.
(da Olofsson et al. J Intern Med 2005)

Nel 1995 Williams e Tabas formularono l'ipotesi (denominata "response-to-retention hypothesis") che l'aterogenicità delle lipoproteine contenenti apoB dipendesse da quattro fattori:

- concentrazione plasmatica delle lipoproteine aterogene;
- differenza tra l'influsso e l'efflusso di lipoproteine aterogene a livello della parete arteriosa (cioè la ritenzione delle lipoproteine aterogene);
- modificazione delle porzioni proteica e lipidica delle lipoproteine ritenute nella parete;
- risposta infiammatoria alle lipoproteine modificate [12].

A sostegno di tale ipotesi, studi epidemiologici hanno dimostrato che elevati livelli di lipoproteine contenenti apoB sono richiesti nell'uomo perché ci sia un'incrementata incidenza della malattia cardiovascolare. Altri fattori di rischio cardiovascolare possono accelerare il processo aterosclerotico ma in assenza di dislipidemia il loro contributo all'aterogenesi è minimo [11].

Non sono noti al momento modelli animali in cui l'aterosclerosi possa essere indotta senza alterare i profili lipoproteici.

Agli inizi del secolo scorso gli studi condotti da Ignatowski e Anitschkov dimostrarono che l'aterosclerosi poteva essere indotta sperimentalmente nutrendo i conigli da laboratorio con una dieta ricca in colesterolo e grassi saturi [13,14]. In seguito, la scoperta del recettore per le LDL (LDLr), che valse il premio Nobel a Goldstein and Brown nel 1985, e la definizione del suo ruolo nell'eziopatogenesi dell'ipercolesterolemia familiare fornì la prima indicazione che un difetto genetico a livello di una proteina cruciale per la clearance delle LDL dal torrente circolatorio potesse essere la causa di una delle più severe forme di coronaropatia di natura aterosclerotica [15]. La creazione di modelli murini di aterosclerosi, quali topi knockout per l'apolipoproteina E o per il recettore delle LDL (LDLr) che sviluppano lesioni aterosclerotiche spontaneamente, hanno fornito un'ulteriore evidenza che alterazioni a livello del metabolismo del colesterolo e delle lipoproteine sono cruciali per lo sviluppo e la progressione delle lesioni aterosclerotiche [16,17].

Studi epidemiologici hanno evidenziato che riduzioni, anche modeste, nelle concentrazioni plasmatiche di colesterolo e lipoproteine contenenti apoB (VLDL e LDL) sono associate ad un significativo miglioramento del rischio cardiovascolare [18].

Data la correlazione lineare tra rischio cardiovascolare e livelli circolanti di lipoproteine plasmatiche, la comprensione del metabolismo lipidico e lipoproteico e' di cruciale importanza al fine di individuare i processi cellulari che possono costituire efficaci target di intervento terapeutico nella gestione delle patologie cardiovascolari di natura aterosclerotica.

Dal momento che il focus del presente lavoro e' la regolazione del metabolismo del colesterolo e delle lipoproteine contenenti apoB da parte degli acidi grassi polinsaturi omega 3, maggiore spazio sara' riservato alle lipoproteine aterogene VLDL e LDL.

1.2 Metabolismo delle lipoproteine aterogene: VLDL e LDL

I lipidi, a causa della loro scarsa idro-solubilità, necessitano di un sistema di trasporto che ne garantisca la possibilità di circolare nel torrente circolatorio e tale sistema è costituito dalle lipoproteine. Le lipoproteine sono particelle di forma globulare costituite da un nucleo centrale apolare, ricco in trigliceridi ed esteri del colesterolo, e da un involucro esterno polare, formato da fosfolipidi, apolipoproteine e piccole quantità di colesterolo libero. Le lipoproteine differiscono tra loro per densità, composizione lipidica e natura della componente apolipoproteica. Le apolipoproteine giocano un ruolo fondamentale nel destino metabolico delle lipoproteine in quanto agiscono da elementi strutturali, cofattori per enzimi e ligandi per le interazioni con specifici recettori cellulari.

I principali cinque tipi di lipoproteine plasmatiche furono originariamente identificati in base alla loro differente solubilità:

- chilomicroni;
- lipoproteine a densità molto bassa (very low density lipoproteins, VLDL);
- lipoproteine a densità intermedia (intermediate density lipoproteins, IDL);
- lipoproteine a bassa densità (low density lipoproteins, LDL);
- lipoproteine ad alta densità (high density lipoproteins, HDL);

La densità delle lipoproteine è proporzionale al contenuto proteico ed è inversamente proporzionale al contenuto lipidico. Generalmente, le dimensioni delle lipoproteine aumentano proporzionalmente al contenuto in trigliceridi ed esteri del colesterolo. La forma globulare delle lipoproteine, caratterizzata da un elevato rapporto volume/superficie, riduce al minimo l'interazione delle particelle lipoproteiche con l'ambiente acquoso esterno, ne favorisce la solubilizzazione nel plasma e ne garantisce al contempo un'elevata capacità di trasporto dei lipidi.

Le apolipoproteine sono classificate in 3 categorie in base alle analogie strutturali e ai geni che le codificano:

- gruppo I: apolipoproteine solubili che si legano reversibilmente con le superfici lipidiche e che sono scambiabili tra diverse lipoproteine quali apoA-I, apoA-II, apoA-IV, apoA-V, apoC-I, apoC-II, apoC-III, apoE;

- gruppo II: apoproteine apo B-100 e apoB-48 che non sono scambiabili tra le diverse lipoproteine, sono molto grandi (550000 Da) e sono costituenti essenziali delle lipoproteine ricche in trigliceridi;
- gruppo III: apolipoproteine apo D e apo (a) che non condividono caratteristiche strutturali o funzionali con le altre apolipoproteine [19,20].

Il gene dell'apoB, situato sul cromosoma 2, codifica per una proteina di 4563 aminoacidi da cui, per rimozione di un frammento N-terminale di 27 aminoacidi, ha origine l'apoB-100. Rispetto alle altre apolipoproteine, apoB e' piu' idrofoba e malgrado le sue enormi dimensioni possiede un solo sito di legame per il suo recettore; tale sito e' localizzato in prossimita' della porzione C-terminale della proteina in una regione ricca di aminoacidi basici. L'apoB-100 e' sintetizzata quasi esclusivamente nel fegato ed e' richiesta per la sintesi e l'assemblaggio delle VLDL; inoltre l'apoB-100 serve da ligando per la clearance delle LDL tramite il recettore LDLr. L'apoB-48 consiste del residuo N-terminale di 2152 aminoacidi dell'apoB-100 ed e' essenziale per la formazione di chilomicroni e l'assorbimento dei grassi introdotti con la dieta a livello dell'intestino [21].

Il gene che codifica sia per l'apoB-100 che l'apoB-48 viene trascritto principalmente nell'intestino e nel fegato dando origine ad un comune RNA messaggero. Nell'intestino umano, ma non nel fegato, un complesso enzimatico chiamato APOBEC-1 (apoB converting enzyme-1) converte a livello del codone 2153 una citosina (C) in un uracile (U); ne segue che nel fegato il codone 2153 viene letto come CAA e tradotto in glutamina mentre nell'intestino viene letto come UAA che e' un segnale di interruzione della traduzione. Quando questo modificato RNA messaggero viene traslato nell'intestino, si forma una proteina, apoB-48, che manca della porzione C-terminale della molecola apoB originale ed e' priva del sito di legame per il recettore delle LDL; ne consegue che i chilomicroni e i chilomicroni residui, che possiedono apoB-48 ma non apoB-100, devono utilizzare l'apolipoproteina E affinche' possano essere rimossi dal torrente circolatorio mediante il recettore delle LDL (LDLr) o LRP (LDLr-related protein). Nell'uomo la subunita' catalitica APOBEC-1 e' espresso principalmente a livello intestinale e pressoché assente nel fegato; di conseguenza l'apoB

prodotta nell'intestino e' apoB-48 mentre quella sintetizzata nel fegato e' apoB-100. In alcuni mammiferi, quali topi e ratti, APOBEC-1 e' espressa anche nel fegato e tali specie producono apoB-48 sia nell'intestino che nel fegato [22].

L'apoB e' essenziale per l'assemblaggio intracellulare delle VLDL (nel fegato) e dei chilomicroni (nell'intestino). L'assemblaggio di queste lipoproteine avviene nell'apparato secretorio della cellula (epatica o enterica). L'apoB, una volta sintetizzata sui ribosomi attaccati alla superficie del reticolo endoplasmatico (ER) ruvido, trasloca nel lume dell'ER dove va incontro a folding grazie all'intervento di proteine chaperon quali Hsp110 al fine di acquisire la corretta struttura terziaria. Se tale folding avviene correttamente l'apoB viene lipidata a livello del lume dell'ER dalla proteina MTP (microsomal triglyceride transfer protein) per formare le VLDL. Se la struttura terziaria non viene raggiunta o se non c'e' sufficiente disponibilita' di lipidi, l'apoB viene trattenuta nell'ER e successivamente ritraslocata nel citosol e indirizzata verso processi degradativi a livello dei proteosomi grazie all'intervento di proteine chaperone quali Hsp70 e Hsp90 [11].

Elevati livelli plasmatici di apoB, elemento chiave strutturale di tutte le lipoproteine considerate aterogene (LDL, IDL, VLDL, chilomicroni, chilomicroni residui) sono forti predittori di un incrementato rischio cardiovascolare [23].

I **chilomicroni** sono le particelle lipoproteiche di maggiori dimensioni (circa 1000 nm) e sono costituiti per il 98% da lipidi (trigliceridi ed esteri del colesterolo) e per l'1-2% da proteine quali apoB48, apoC, apoE, apoA-I, apoA-II. Sono sintetizzati dalle cellule epiteliali dell'intestino tenue e vengono rilasciati nel torrente circolatorio attraverso le vie linfatiche (vasi chiliferi e dotto toracico). Si caratterizzano per una densita' molto bassa (<0.95 g/ml) che e' responsabile del fenomeno della flottazione (galleggiamento spontaneo se il siero viene lasciato sedimentare per qualche ora) e per l'immobilita' elettroforetica dovuta alle grandi dimensioni e alla debole carica elettrica di queste lipoproteine. I chilomicroni trasportano i trigliceridi di origine alimentare ai tessuti periferici (tessuti muscolare e adiposo) per il mantenimento dei depositi o per le loro necessita' energetiche. Il colesterolo

introdotto con la dieta viene trasportato dai chilomicroni nella linfa e successivamente nel torrente circolatorio per essere veicolato al fegato dove viene secreto, come colesterolo libero, nella bile per la sua eliminazione nelle feci o incorporato, come colesterolo estere, nelle nascenti VLDL secrete dal tessuto epatico. Nell'endotelio vascolare l'apoCII presente sulla superficie dei chilomicroni attiva la lipasi lipoproteica (LPL) che favorisce la lipolisi dei triacilgliceroli e la loro successiva rimozione dai chilomicroni che a questo punto diventati **chilomicroni residui** sono rilasciati nel torrente circolatorio. Essi scambiano attivamente apoproteine con le altre lipoproteine plasmatiche e sono arricchiti in esteri del colesterolo, apoB-48 e apoE. I chilomicroni residui possono essere captati dal fegato tramite processi di endocitosi mediata da recettori o tramite recettori specifici presenti sulla superficie degli epatociti [24].

Le **VLDL (lipoproteine a densita' molto bassa)** sono una classe di lipoproteine molto eterogenea costituite per il 60% da trigliceridi, per il 10% da colesterolo e fosfolipidi e 10% da proteine (apoB-100, apoE, apoC). In soggetti normolipidemicici ci sono almeno due specie di VLDL: larghe VLDL (VLDL-1) che sono meno dense e ricche in trigliceridi, piccole VLDL (VLDL-2) che sono piu' ricche in esteri di colesterolo e meno in trigliceridi. La loro funzione biologica e' quella di trasportare i lipidi di sintesi endogena.

Le **IDL (lipoproteine a densita' intermedia)** sono particelle di diametro compreso tra 25-35 nm e costituite per il 20-40% di colesterolo, 15-25% di fosfolipidi e per il 20-50% di trigliceridi. Le apoproteine strutturali sono apoB-100, apoE e apoC. Le IDL hanno una densita' compresa tra 1.006 e 1.019 g/ml e migrano in regione pre- β in un gel di elettroforesi.

Le **LDL (lipoproteine a bassa densita')** sono particelle con un diametro medio di 18-22 nm e hanno una densita' media di 1.019-1.063 g/ml; sono costituite per il 40-50% da colesterolo, 20-25% da fosfolipidi, 5-15% da trigliceridi. L'apoproteina strutturale principale e' l'apoB-100.

Distinte sottopopolazioni di VLDL, IDL e LDL sono state identificate e definite in base alla loro densita', dimensione, carica, contenuto in lipidi e apoproteine [25]. Le proprieta' chimico-fisiche delle sottopopolazioni di lipoproteine contenenti apoB sono riassunte in tabella 1.

	Peak S _T	Density Peak (gm/ml)	Diameter (Å)	%PR	%CE	%UC	%TG	%PL
VLDL (4)								
VLDL-1	60-400	<1.006	330-700	11	8	6	58	17
VLDL-2	20-60	1.006-1.010	300-330	18	24	9	29	22
IDL (4)								
IDL 1	12-20	1.008-1.022	285-300	17	35	10	16	21
IDL 2	10-16	1.013-1.019	272-285	17	37	11	13	21
LDL (11, 12, 127)								
LDL-I	7-12	1.019-1.023	272-285	18	43	9	7	22
LDL-II	5-7	1.023-1.028	265-272	19	45	10	4	23
		1.028-1.034	256-265	21	45	9	3	22
LDL-III	3-5	1.034-1.041	247-256	22	46	8	3	21
		1.041-1.044	242-247	24	44	7	3	21
LDL-IV	0-3	1.044-1.051	233-242	26	42	7	5	19
		1.051-1.06	220-233	29	40	7	6	18

PR, protein; TG, triglycerides; CE, cholesteryl ester; PL, phospholipids; UC, unesterified cholesterol.

Tabella 1. Caratteristiche chimico-fisiche delle lipoproteine contenenti apoB. (da Berneis KK Et al., JLR 2002).

Sintesi e assemblaggio delle VLDL

L'assemblaggio delle VLDL ha luogo in due compartimenti cellulari: reticolo endoplasmatico ruvido e l'apparato di Golgi e coinvolge tre differenti particelle quali pre-VLDL, VLDL2, VLDL1. Questo processo ha inizio nel reticolo endoplasmatico ruvido durante la biosintesi dell'apoB-100 e come avviene per altre proteine secretorie, l'apoB-100 appena sintetizzata entra nel lume dell'ER attraverso un canale proteico. Inizialmente una modesta quantità di trigliceridi interagisce con l'apoB-100 durante la traslocazione della proteina attraverso un canale proteico della membrana del ER ruvido; tale interazione necessita MTP. Questa fase è seguita dall'acquisizione da parte del complesso trigliceridi-apoB di un rivestimento o monostrato di fosfolipidi che incapsula i trigliceridi e porta alla formazione di una particella primordiale, parzialmente lipidata chiamata pre-VLDL. Tale particella primordiale può essere ulteriormente lipidata per diventare VLDL2 oppure essere soggetta a degradazione [11]. La particella VLDL2 viene convertita in VLDL1 grazie alla fusione con altro materiale lipidico (trigliceridi e colesterolo estere) e questa conversione necessita della proteina ARF-1 (ADP-ribosilation factor-1) (figura 2). È importante notare che la formazione della particella VLDL1 ha luogo nell'apparato di Golgi e che la proteina ARF-1 è richiesta per il trasporto anterogrado dall'ERGIC (ER-Golgi intermediate compartment) al *cis*-Golgi. Questo significa che l'assemblaggio delle VLDL1 richiede due passaggi:

- formazione di pre-VLDL e la sua conversione in VLDL2;
- trasferimento all'apparato di Golgi dove la maggior parte dei trigliceridi viene incorporata.

Studi di turnover condotti nell'uomo hanno recentemente dimostrato che c'è un intervallo di circa 15 minuti tra la secrezione di apoB di nuova sintesi e la secrezione di trigliceridi sottoforma di VLDL fornendo un'ulteriore evidenza che l'assemblaggio delle VLDL si articola in due passaggi [26,27].

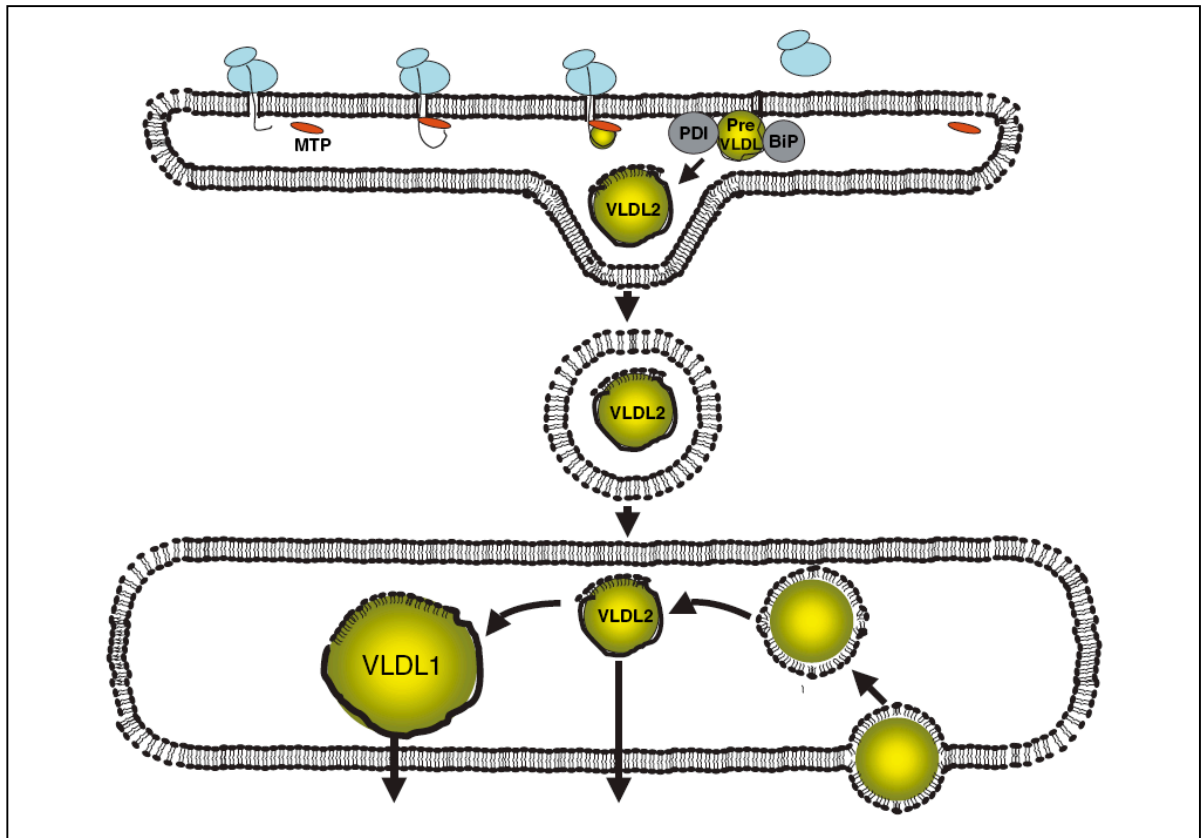


Figura 2. Assemblaggio delle lipoproteine a densita' molto bassa (VLDL). (da Oloffson et al. J Intern Med 2005;)

Metabolismo plasmatico delle lipoproteine contenenti apoB

Il primo passaggio del metabolismo lipoproteico consiste nella secrezione di VLDL mature dagli epatociti nello spazio extracellulare che e' particolarmente ricco in proteoglicani e in recettori aventi elevata affinita' per queste lipoproteine. Cio' potrebbe portare ad una ricaptazione delle neo-secrete VLDL da parte dei sinusoidi epatici con conseguente steatosi epatica. La probabilita' che questo accada e' resa minima grazie alla presenza di diversi fattori:

- inabilita' conformazionale dell'apoE nel legarsi ai suoi recettori dal momento che sia il dominio legante l'eparina che quello di legame con il recettore sono nascosti nella curvatura lipidica;
- arricchimento delle VLDL nascenti in apoC-III che e' un inibitore della LPL;
- ridotta concentrazione di LPL nei capillari epatici.

Grazie a questi "ostacoli", le nascenti VLDL possono lasciare lo spazio di Disse e raggiungere il torrente circolatorio evitando un significativo re-uptake da parte degli epatociti [28].

Gli enzimi coinvolti nell'idrolisi delle lipoproteine plasmatiche includono LPL, lipasi epatica (HL) e lipasi endoteliale (EL). LPL e' legata ai proteoglicani dell'endotelio capillare del muscolo scheletrico e del tessuto adiposo e la sua interazione con le lipoproteine contenenti apoB e' significativamente influenzata dall'apoE. A seguito di una sostanziale rimozione di trigliceridi indotta dalla proteina LPL, le lipoproteine contenenti apoB, ora diventate residue (remnants), acquisiscono gradualmente la capacita' di essere riconosciute da recettori (LDLr e LRP) deputati alla loro internalizzazione presenti a livello epatico.

E' importante ricordare che la principale funzione biologica delle lipoproteine plasmatiche e' quella di distribuire i trigliceridi dal fegato e dall'intestino ai siti di accumulo (tessuto adiposo) o di utilizzo (muscolo scheletrico) e rapidamente scomparire al fine di evitare indesiderati accumuli nel derma o nelle arterie.

E' generalmente riconosciuto che prima che le lipoproteine si leghino a LDLr o LRP, un'ulteriore idrolisi da parte della lipasi epatica (HL) sia necessaria. La HL e' presente esclusivamente nell'endotelio capillare epatico ed e' responsabile dell'idrolisi di trigliceridi e fosfolipidi dalla particella residua (remnant) al fine di creare una particella che esponga la porzione di apoE destinata al legame con i recettori epatici; questo processo idrolitico stimola una efficiente ricaptazione delle lipoproteine da parte del fegato.

La ricaptazione epatica e' altamente efficiente per i remnants originati da particelle contenenti apoB-48. Le particelle remnant originate da lipoproteine contenenti apoB-48 non contribuiscono alla formazione delle LDL mentre quelle originate da lipoproteine contenenti apoB-100 possono andare incontro a ricaptazione epatica o diventare LDL. Circa la meta' delle VLDL remnant vengono rimosse dalla circolazione tramite LDLr, mentre le rimanenti possono andare incontro ad un'ulteriore idrolisi del core di trigliceridi da parte della LPL. Tale passaggio determina la formazione delle IDL (lipoproteine a densita' intermedia) che contengono apoE e possono essere rimosse dal torrente circolatorio grazie all'interazione con LDLr. Una porzione delle IDL va incontro ad un'ulteriore idrolisi dei trigliceridi mediata dalla lipasi epatica (HL) e a questo punto l'apoE si dissocia. La particella risultante contiene solo apoB-100, e' ricca in esteri del colesterolo e viene chiamata LDL [11].

Nel compartimento plasmatico hanno luogo reazioni di trasferimento e rimodellamento lipoproteico che vedono come protagonisti proteine quali CETP

(cholesteryl ester transfer protein) e PLTP (phospholipid transfer protein). La proteina CETP trasferisce esteri del colesterolo dalle HDL alle lipoproteine contenenti apoB ma promuove anche il trasferimento di trigliceridi alle HDL e LDL. La proteina PLTP favorisce lo scambio tra lipoproteine di fosfolipidi, sfingolipidi e digliceridi nonché il trasporto inverso del colesterolo; non a caso le HDL rappresentano il principale target della sua attività di trasferimento e rimodellamento.

Non solo le componenti lipidiche delle lipoproteine vanno incontro a trasferimento ma anche le componenti proteiche: scambio di apoE, apoC-II e apoC-III ha luogo ad esempio tra HDL e VLDL e tra HDL e chilomicroni.

Catabolismo delle lipoproteine contenenti apoB

La clearance plasmatica delle lipoproteine è funzione della composizione molecolare delle lipoproteine e di quella della superficie cellulare con cui le lipoproteine vengono a contatto. Alcune lipoproteine sono rimosse dal circolo, come particelle intatte, in seguito all'interazione di ligandi lipoproteici con recettori cellulari di superficie, mentre altre sono captate dalle cellule per interazione aspecifica non recettore-mediata. Inoltre le lipoproteine possono cedere parte delle molecole polari che le costituiscono (apoproteine, colesterolo, acidi grassi liberi) con un meccanismo spontaneo di "desorbimento" nella fase acquosa che le circonda. Una via importante di rimozione delle lipoproteine dal plasma prevede l'interazione di queste con i recettori cellulari capaci di riconoscere specifici ligandi lipoproteici e di favorire l'endocitosi delle lipoproteine. Il trasporto recettore-mediato consente l'internalizzazione simultanea di molecole lipidiche e proteiche.

Il recettore per le LDL (LDLr) è ad oggi il recettore meglio caratterizzato da un punto di vista biochimico-strutturale. Le LDL, contenenti una sola molecola di apoB-100, interagiscono con il recettore LDLr localizzato all'interno di micro-invaginazioni della membrana cellulare e in questa sede si realizza l'interazione recettore-ligando. La endo-vescicolazione delle micro-invaginazioni porta alla formazioni di endosomi capaci di dissociarsi in endosomi contenenti LDL ed

endosomi contenenti i recettori LDLr. Questi ultimi vengono riciclati andando a formare nuove micro-vescicolazioni, mentre gli endosomi contenenti le LDL vengono convertiti in lisosomi, all'interno dei quali esterasi acide e proteasi idrolizzano i componenti lipidici e proteici delle lipoproteine. Il colesterolo rilasciato dall'idrolisi delle LDL, se in eccesso nello spazio intracellulare, viene rapidamente esterificato dall'enzima ACAT (acyl-cholesterol:acyltransferase). Elevati livelli intracellulari di colesterolo promuovono la down-regolazione della sintesi del LDLr e una inibizione dell'attività dell'enzima chiave della sintesi endogena del colesterolo, HMG-CoA-reduttasi. Al contrario un inadeguato contenuto intracellulare di colesterolo stimola la sintesi e il trasferimento dei LDLr sulla superficie cellulare.

I meccanismi di clearance dei chilomicroni remnants sono meno chiari. I chilomicroni remnants sono relativamente più ricchi di colesterolo, esteri del colesterolo, fosfolipidi, apoB-48 e apoE rispetto ai chilomicroni nascenti. Grazie all'azione lipolitica della LPL, le dimensioni dei remnants si riducono permettendo a tali particelle di attraversare le fenestrazioni della superficie endoteliale e di raggiungere lo spazio di Disse. Nello spazio di Disse alcuni remnants si legano transitoriamente ai proteoglicani per mezzo dell'apoE, mentre altri sono sequestrati dalla lipasi epatica per interazione con l'apoE. In entrambi i casi, i remnants dei chilomicroni sono trasferiti dalle sedi di sequestro al recettore LDL, oppure acquisiscono molecole aggiuntive dell'apoE di derivazione epatica, allo scopo di accelerare il catabolismo mediato dal recettore LRP.

Il recettore delle VLDL (VLDLr), capace di legare lipoproteine contenenti apoE, consiste di 5 domini funzionali strutturalmente simili a quelli del recettore delle LDL. I due recettori condividono un'elevata analogia sia nella struttura dei geni che li codificano che nell'organizzazione spaziale molecolare. Nonostante in entrambi i geni siano presenti sequenze sterolo-regolatrici, la trascrizione del gene del VLDLr non subisce la down-regolazione mediata da steroli [29,30].

1.3 L'importanza del fegato nel metabolismo del colesterolo e degli acidi grassi a lunga catena

Nel 2001 in una lettura in memoria di Dr Lyman Duff, i Dr Davis e Hui hanno proposto il fegato come target terapeutico primario per l'aterosclerosi da loro definita come "a liver disease of the heart" [31]. Nei mammiferi il fegato gioca un ruolo chiave nel mantenimento dell'omeostasi dei lipidi governandone la sintesi, l'ossidazione, il trasporto e l'eliminazione. Il fegato e' il *sito primario* per numerosi processi cellulari quali:

- clearance plasmatica delle lipoproteine LDL;
- sintesi endogena del colesterolo;
- conversione del colesterolo in acidi biliari;
- sintesi endogena degli acidi grassi e dei trigliceridi;
- catabolismo e clearance di lipoproteine remnants.

Alterazioni a livello di ciascuno dei sopraelencati processi cellulari producono cambiamenti nei livelli circolanti delle lipoproteine plasmatiche e influenzano di conseguenza il rischio cardiovascolare.

Sebbene il lobulo epatico sia considerato l'unita' base del fegato, da un punto di vista funzionale il lobulo dovrebbe essere interpretato come un acino con il suo centro nello spazio portale (che contiene le ramificazioni intra-epatiche dei dotti biliari, dell'arteria epatica e della vena porta) [32]. Questo concetto tiene conto dei gradienti funzionali all'interno del lobulo, infatti le concentrazioni ematiche di ossigeno, fattori nutritivi e ormoni sono piu' elevate negli spazi portali e diminuiscono progressivamente quando il sangue scorre nei sinusoidi verso la vena centrolobulare. L'eterogeneita' funzionale del lobulo epatico puo' essere espressa in termini di zone funzionali concentriche intorno agli spazi portali (liver zonation). All'interno di ciascun acino epatico si possono distinguere due aree funzionalmente distinte: area afferente periportale e area efferente pericentrolobulare. Le zone periportali sono dedicate alla gluconeogenesi mentre quelle pericentrolobulari sono il sito preferenziale per la glicolisi e la sintesi dei lipidi [32].

Il citoplasma degli epatociti è ricco in organelli e mostra un abbondante reticolo endoplasmatico liscio (sede della sintesi del colesterolo e dei fosfolipidi) e ruvido (dove ha luogo la sintesi dell'apolipoproteina B), mitocondri e perossisomi (siti della β -ossidazione degli acidi grassi) e lisosomi. La notevole eterogeneità degli organelli presenti a livello degli epatociti dimostra la molteplicità dei processi cellulari che hanno luogo a livello epatico.

Metabolismo del colesterolo

Il colesterolo è un importante componente delle membrane cellulari nelle quali si inserisce con il suo asse perpendicolarmente al piano della membrana; il gruppo ossidrilico in posizione 3β forma un legame idrogeno con il gruppo carbonilico della testa polare dei fosfolipidi mentre la catena idrocarburica si adagia nella porzione apolare del doppio strato lipidico. Tale modalità di alloggiamento delle molecole di colesterolo nel doppio strato lipidico influenza la fluidità della membrana riducendola [30]. Il colesterolo è il precursore degli ormoni steroidei (androgeni, estrogeni, progesterone, mineral- e gluco-corticoidi), della vitamina D e dei sali biliari.

Il fegato governa sia il flusso di colesterolo esogeno (introdotto con la dieta o internalizzato dai recettori LDLr o VLDLr durante la clearance delle lipoproteine plasmatiche) che quello del colesterolo endogeno sintetizzato a livello del reticolo endoplasmatico degli epatociti. L'assunzione giornaliera di colesterolo è stimata nell'uomo pari a circa 200-500 mg mentre la sintesi endogena di colesterolo è approssimativamente pari a 10 mg/kg/die. Il fegato è il sito primario per la rimozione delle LDL dal plasma in tutte le specie ma l'entità della clearance epatica delle LDL nell'uomo è pari a 12 ml/kg/die contro i 500ml/kg/die nel topo. Di conseguenza le concentrazioni di LDL allo steady state nel topo sono pari a 7-10 mg/dL mentre nell'uomo superano i 100 mg/dL. Nonostante tali differenze la maggior parte dei mammiferi elimina il colesterolo nelle feci in proporzioni uguali come steroli (colesterolo e coprostanolo) e acidi biliari [33,34].

Il fegato e il cervello sono gli organi che producono le maggiori quantità di colesterolo. La sintesi endogena di colesterolo ha luogo a livello del reticolo

endoplasmico liscio negli epatociti e può essere suddivisa in diversi passaggi:

- a) formazione dell'HMG-CoA a partire dall'aceto-acetil-CoA e acetil-CoA;
- b) conversione dell'HMG-CoA in mevalonato ad opera dell'HMG-CoA-reduttasi;
- c) conversione del mevalonato in 3-isopentenil pirofosfato tramite tre reazioni consecutive a cui partecipa l'ATP;
- d) sintesi dello squalene a partire da sei molecole di 3-isopentenil pirofosfato;
- e) conversione dello squalene in colesterolo tramite reazioni di ciclizzazione e riduzione [35].

La velocità della biosintesi è altamente sensibile ai livelli di colesterolo cellulare e tale regolazione (feedback negativo) è mediata da modificazioni dell'attività dell'HMG-CoA-reduttasi. Questo enzima è sottoposto ad meccanismi di regolazione sia a breve (effetti allosterici e alterazioni dello stato di fosforilazione) che a lungo termine (alterazioni nella velocità di sintesi e degradazione). Il colesterolo di origine esogena (alimentare o tramite clearance plasmatica delle lipoproteine) raggiunge il fegato e inibisce l'HMG-CoA-reduttasi limitando la sintesi endogena; questo effetto è mediato da un aumento del colesterolo libero intracellulare.

Incrementati livelli di colesterolo libero (FC) stimolano la sintesi di colesterolo estere in quanto FC induce l'enzima esterificante ACAT, possono attivare i recettori nucleari LXR (liver X receptor) e i loro geni target (ad esempio le proteine ABCA1 e ABCG5/G8) e inibiscono i fattori di trascrizione SREBP (sterol regulatory element-binding protein).

I fattori di trascrizione SREBP controllano la trascrizione di geni coinvolti nella sintesi degli steroli e degli acidi grassi. I fattori di trascrizione SREBP (SREBP-1a, SREBP-1b, SREBP-1c, SREBP-2) sono caratterizzati dal motivo strutturale helix-loop-helix/leucine zipper e sono sintetizzati come precursori inattivi nel reticolo endoplasmico, dove restano ancorati grazie a domini proteici transmembrana. L'accumulo di colesterolo diminuisce il rilascio proteolitico di SREBP dal precursore legato alla membrana. Viceversa, quando c'è richiesta di colesterolo da parte della cellula, il precursore di SREBP (sia SREBP-1 che SREBP-2) va incontro a taglio proteolitico ad opera delle proteasi S1P e S2P e rilascia la porzione N-terminale che

raggiunge successivamente il nucleo dove attiva la trascrizione di geni. Il fattore di trascrizione SREBP-2 attiva in via preferenziale i geni coinvolti nella biosintesi del colesterolo mentre le isoforme SREBP-1a e SREBP-1c attivano geni coinvolti nella biosintesi degli acidi grassi o nel metabolismo dei carboidrati [36,37,38]. Se la sintesi endogena di colesterolo a livello epatico e il colesterolo proveniente dall'intestino si riducono a tal punto che i livelli intracellulari epatici di colesterolo sono estremamente ridotti, l'espressione dei recettori delle LDL (LDLr) viene indotta. L'up-regulation del LDLr promuove l'estrazione di lipoproteine LDL dal torrente circolatorio riducendone i livelli circolanti. Questo è il meccanismo finale condiviso da diversi farmaci quali resine sequestranti gli acidi biliari, ezetimibe, statine e inibitori della squalene-sintasi che sono efficaci nel ridurre il colesterolo sierico incrementando il catabolismo delle LDL [39].

Il colesterolo epatico, proveniente dall'intestino o sintetizzato endogenamente può avere diversi destini metabolici.

Il colesterolo libero può essere esterificato dall'enzima epatico microsomiale ACAT2 e, come colesterolo estere, può essere o accumulato (insieme a trigliceridi) nei depositi citoplasmatici chiamati "lipid droplets" oppure essere incorporato nelle VLDL per essere secreto nel torrente circolatorio. Il colesterolo libero come tale può essere secreto nella bile e successivamente nell'intestino per la finale eliminazione nelle feci o essere substrato dell'enzima epatico colesterolo-7- α -idrossilasi (CYP7A1) per essere convertito in acidi biliari.

La conversione di colesterolo in acidi biliari produce sufficienti quantità di detergenti (acidi biliari) necessarie per la digestione e l'assorbimento di nutrienti (trigliceridi e vitamine liposolubili) e rappresenta la principale via di eliminazione del colesterolo in eccesso dall'organismo. Questi due processi biologici, apparentemente disconnessi, mettono in collegamento l'acquisizione di nutrienti esogeni con il metabolismo endogeno.

La CYP7A1 è un enzima specifico del fegato ed è l'unico enzima in grado di dare inizio ad una via biosintetica (via classica) che coinvolge diversi organelli cellulari (ER, microsomi, mitocondri, perossisomi). A livello del

reticolo endoplasmatico (ER) la CYP7A1 posiziona un gruppo ossidrilico in posizione 7α sulla molecola del colesterolo e il risultante 7α -idrossi-colesterolo può essere idrossilato in posizione 12α mediante l'enzima microsomiale colesterol-12-alfa-idrossilasi (CYP8B1). Successivamente la catena laterale alifatica viene idrossilata in posizione 27 mediante l'enzima mitocondriale P450 colesterol-27-idrossilasi (CYP27) e in posizione 24 dalla proteina multifunzionale 2 a livello dei perossisomi. A seguito di una rimozione ossidativa della catena laterale, la posizione C24 viene convertita in gruppo carbonilico [40]. Gli acidi biliari sintetizzati dal fegato vengono secreti come amidi coniugate a taurina o glicina; la formazione di tali amidi riduce il pK_a degli acidi biliari da 5 a valori inferiori a 3 e ne facilita la loro solubilità nel lume dell'intestino.

L'espressione della CYP7A1 è indotta durante lo sviluppo, in seguito a somministrazione di resine sequestranti gli acidi biliari e dopo ingestione di un pasto ricco in colesterolo. L'espressione del RNA messaggero della CYP7A1 è regolata sia a livello trascrizionale che post-trascrizionale (il turnover del mRNA della CYP7A1 è inferiore a 5 minuti).

La CYP7A1 è regolata dagli acidi biliari a livello trascrizionale tramite un meccanismo di feedback negativo. Numerosi studi sia *in vitro* che *in vivo* hanno chiarito il ruolo del recettore nucleare FXR (farnesoid X receptor) quale regolatore negativo della CYP7A1: gli acidi biliari sono ligandi del recettore FXR che a sua volta induce la trascrizione di SHP (nuclear receptor factor short heterodimer partner) che, invece di legarsi al DNA, forma eterodimeri con numerosi fattori di trascrizione (quali CPF e l'omologo murino LRH-1) bloccandone la capacità di attivare la trascrizione [40]. La scoperta che topi FXR knockout nutriti con acidi biliari non mostravano né la down-regulation della CYP7A1 né l'induzione dell'espressione epatica di SHP ha dimostrato il ruolo di FXR e SHP nella regolazione a feedback negativo della CYP7A1 indotta dagli acidi biliari [41,42]. È importante tener presente che l'espressione della CYP7A1 esibisce un ritmo circadiano con il suo picco nel periodo antecedente i pasti; tale ritmo si associa ad una maggiore espressione nelle cellule epatiche che si estendono dalla vena centrolobulare alla regione periportale [43]. Il ritmo circadiano dell'espressione della

CYP7A1 e' coincidente con quello circadiano di altri geni cruciali per il metabolismo del colesterolo, quali HMG-CoA-reduttasi, LDLr, CYP27 [44]. Oltre alla via classica, gli acidi biliari possono essere sintetizzati attraverso una via alternativa in cui diversi ossisteroli (25- e 27-idrossicolesterolo) vengono idrossilati in posizione 7α dall'enzima ossisterol- 7α -idrossilasi (CYP7B1); la via alternativa, al contrario di quella classica, non e' regolata positivamente ne' dal colesterolo ne' dal trattamento con colestiramina [45]. Mentre nel topo la via alternativa contribuisce per il 45% alla produzione totale di acidi biliari, nell'uomo tale processo biosintetico contribuisce per meno del 10% [46,47]. Nell'uomo i principali acidi biliari sono rappresentati dall'acido colico e chenodeossicolico mentre nel topo vengono prodotte quantita' discrete di acidi biliari idrossilati in posizione 6β , quali acido β -muricolico e murideossicolico.

Gli acidi biliari sintetizzati nel fegato, secreti nel duodeno, ritornano al fegato attraverso la vena porta grazie ad un processo di riassorbimento che ha luogo nell'ileo intestinale; tale circolazione entero-epatica contribuisce alla regolazione a feedback negativo della sintesi degli acidi biliari. Solamente una minima porzione (<5%) del pool di acidi biliari viene persa nelle feci e prontamente sostituita da discrete quantita' di nuova sintesi. La dimensione e la composizione del pool degli acidi biliari sono cruciali per l'omeostasi del colesterolo in tutto l'organismo poiche' determinano l'efficienza di assorbimento del colesterolo sia di origine alimentare che biliare [45].

Metabolismo degli acidi grassi a lunga catena

Gli acidi grassi a lunga catena (LCFA) sono costituiti da uno scheletro carbonioso (piu' di 16 atomi di carbonio) con un gruppo metilico e un gruppo carbossilico alle due estremita'. Gli LCFA sono importanti per la cellula come fonti di energia metabolica e come substrati per la biogenesi delle membrane (fosfolipidi) e riserva di energia metabolica (esteri del colesterolo e trigliceridi). Evidenze sperimentali recenti suggeriscono che gli LCFA e i loro

CoA-derivati direttamente e indirettamente regolano l'attività di recettori di membrana, enzimi, canali ionici, e influenzano il differenziamento, la proliferazione cellulare e l'espressione genica. Gli LCFA, attraverso i loro metaboliti quali prostaglandine, leucotrieni, trombossani, PAF (platelet activating factor) servono da molecole di segnale intracellulare [48,49]. In condizioni normali le concentrazioni sieriche di acidi grassi liberi (NEFA, non esterified fatty acid) sono circa 200-600 μ M ma possono aumentare fino a 4 volte in presenza di diabete, obesità, cancro e sepsi [32]. Gli acidi grassi hanno una bassa solubilità in ambiente acquoso e, a pH fisiologico, si trovano in forma anionica. Gli LCFA possono trovarsi inoltre complessati con l'albumina (nel plasma), con i sali biliari (nel lume intestinale) o associati alle membrane, alle goccioline lipidiche citoplasmatiche "lipid droplets" e ai ribosomi [49].

Il fegato è esposto a fonti esogene ed endogene di LCFA.

Le fonti esogene sono rappresentate dai chilomicroni remnants che trasportano gli LCFA di origine alimentare e dagli acidi grassi liberi che vengono rilasciati dal tessuto adiposo per azione della lipasi ormono-sensibile (HSL, hormone-sensitive lipase). Il rilascio di acidi grassi al fegato da fonti esogene richiede la dissociazione dal complesso con l'albumina (la maggior parte degli acidi grassi nel siero sono complessati con albumina) e tale dissociazione è una tappa limitante (rate-limiting) per l'uptake di LCFA da parte del fegato [49]. Successivamente ha luogo l'attraversamento del doppio strato lipidico durante il quale il pK_a degli acidi grassi passa da 5 a 9 così che più del 50% degli LCFA legati al doppio strato lipidico sono nella forma protonata. Infine la traslocazione attraverso la membrana plasmatica di tipo diffusionale o proteino-mediata, e l'intervento di proteine specializzate chiamate FABP (fatty acid binding protein) conducono gli LCFA a livello del citosol dove gli LCFA verranno incanalati verso processi biosintetici o degradativi. La fonte endogena è rappresentata dalla biosintesi degli acidi grassi a partire dal glucosio. In seguito ad un pasto, una larga porzione del glucosio assorbito dall'intestino tenue è immediatamente captata dalle cellule epatiche (mediante il trasportatore GLUT2) per la sua conversione in

glicogeno. Quando il fegato è saturato di glicogeno (>5% della massa epatica) il surplus di glucosio viene captato dagli epatociti per diventare substrato dell'enzima glucochinasi (GK, glucokinase) ed essere convertito in piruvato (Glicolisi). Il piruvato è successivamente convertito in acetil-CoA a livello dei mitocondri dal complesso della piruvico-deidrogenasi; il trasferimento dell'acetil-CoA dai mitocondri al citosol (sito primario della biosintesi degli acidi grassi) viene realizzato grazie all'intervento del citrato che trasporta i gruppi acile attraverso la membrana mitocondriale interna. Il citrato si forma nella matrice mitocondriale dalla condensazione dell'acetil-CoA con l'ossalacetato; quando presente in alte concentrazioni, il citrato viene trasportato nel citosol dove viene scisso dall'enzima ATP-citrato-liasi in acetil-CoA e ossalacetato. L'acetil-CoA così rilasciato diventa il substrato iniziale della sintesi degli acidi grassi che ha inizio con la sintesi di malonil-CoA ad opera dell'acetil-CoA-carbossilasi (ACC, acetyl-CoA-carboxylase) [32,35] (figura 3).

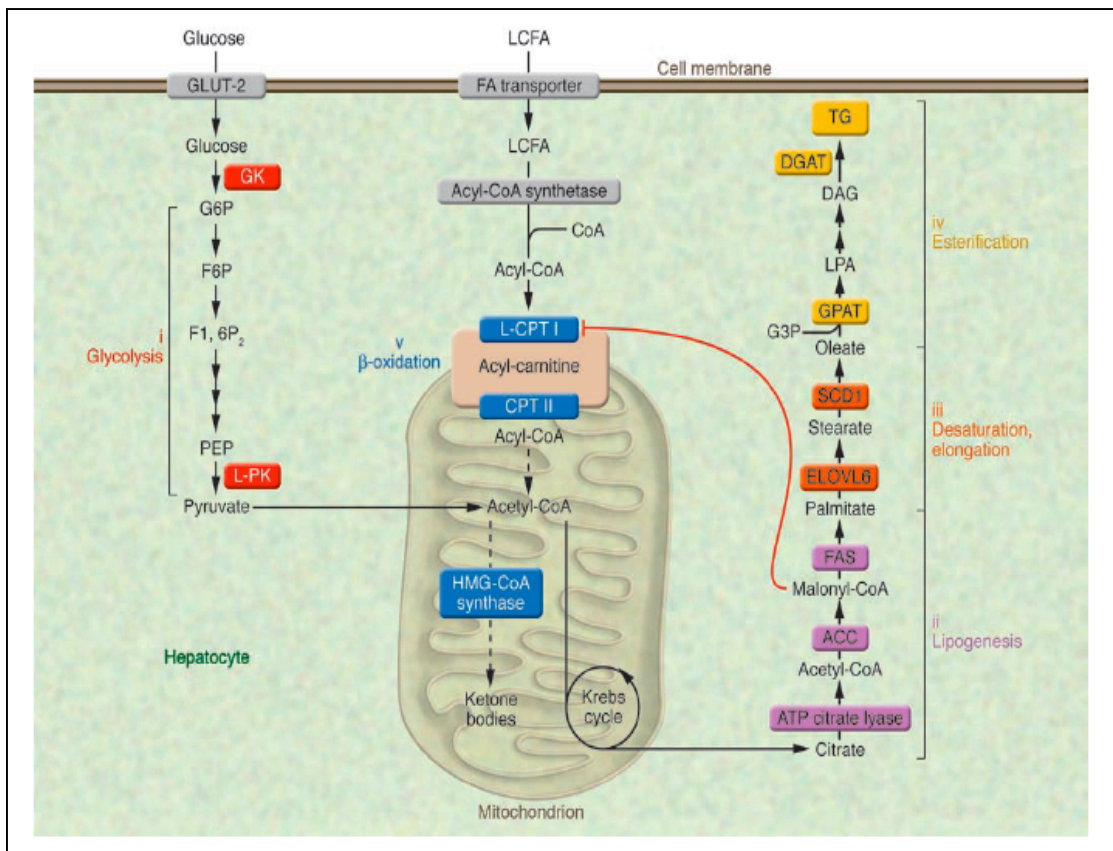


Figura 3. Sintesi degli acidi grassi e dei trigliceridi nel fegato (da Postic C et al., J Clin Invest 2008)

L'enzima ACC è presente in due isoforme: ACC1 e ACC2. ACC1 è citosolica, partecipa alla de novo lipogenesi ed è espressa ad alti livelli nel fegato e nel tessuto adiposo; ACC2 è mitocondriale, maggiormente espressa a livello cardiaco e del muscolo scheletrico e si pensa sia coinvolta nella regolazione negativa della β -ossidazione mitocondriale modulando i livelli locali di malonil-CoA (inibitore dell'enzima carnitina-aciltransferasi I (CPT-I)). Il malonil-CoA sintetizzato dall'ACC2 non ha accesso al complesso dell'acido grasso-sintasi (FAS, fatty acid synthase) a causa della rigida compartimentalizzazione mitocondriale dei metaboliti destinati alla regolazione dei processi ossidativi [50]. Il malonil-CoA sintetizzato dall'ACC1 accede al complesso della FAS e viene convertito a palmitato che a sua volta mediante l'azione degli enzimi elongasi-6 e stearoil-CoA desaturasi 1 (ELOVL6 e SCD1) viene trasformato in acido oleico. L'acido oleico può essere incorporato in trigliceridi (dove rappresenta circa il 60-70% degli acidi grassi totali), negli esteri del colesterolo (~40-50% degli acidi grassi totali) e nella posizione sn-1 dei fosfolipidi (~10-15% degli acidi grassi totali). Gli acidi grassi di nuova sintesi devono essere convertiti in acil-CoA (ad esempio oleoil-CoA) ad opera degli enzimi acil-CoA sintetasi (ACSL, long chain acyl-CoA synthase) prima di essere incanalati verso processi biosintetici o degradativi.

La degradazione degli acidi grassi, comunemente denominata β -ossidazione, ha luogo a livello della matrice mitocondriale e vede come attore principale il sistema della carnitina-aciltransferasi I (CPT-1). L'enzima CPT-1 catalizza la sintesi di O-acilcarnitina da una molecola di carnitina e una di acil-CoA; l'O-acilcarnitina viene trasferita nella matrice mitocondriale dove il gruppo acile viene nuovamente trasferito al CoA dalla carnitina-aciltransferasi II (CPT-2). L'acil-CoA formato va incontro a 4 reazioni di ossidazione durante le quali vengono prodotti un FADH₂, un NADH, un acetil-CoA e un acil-CoA più corto di un'unità carboniosa rispetto all'acil-CoA di partenza [35].

La sintesi e la degradazione degli acidi grassi a lunga catena sono due processi distinti per compartimentazione e sono regolati rispettivamente dalle

proteine SREBP-1c e PPAR α (peroxisome-proliferator activated receptor alpha) [51] (figura 4). PPAR α e' un fattore di trascrizione della famiglia dei recettori nucleari ed e' maggiormente espresso negli organi che utilizzano gli acidi grassi a scopi energetici quali tessuto adiposo bruno, fegato, cuore e la mucosa gastro-intestinale. PPAR α e' richiesto per l'induzione dei geni responsabili dell'ossidazione degli acidi grassi e la biosintesi dei corpi chetonici. Gli acidi grassi saturi e insaturi agiscono da ligandi per il recettore PPAR α con K_d nanomolari sebbene effetti piu' robusti sono stati misurati con gli acidi grassi polinsaturi rispetto a quelli saturi e monoinsaturi.

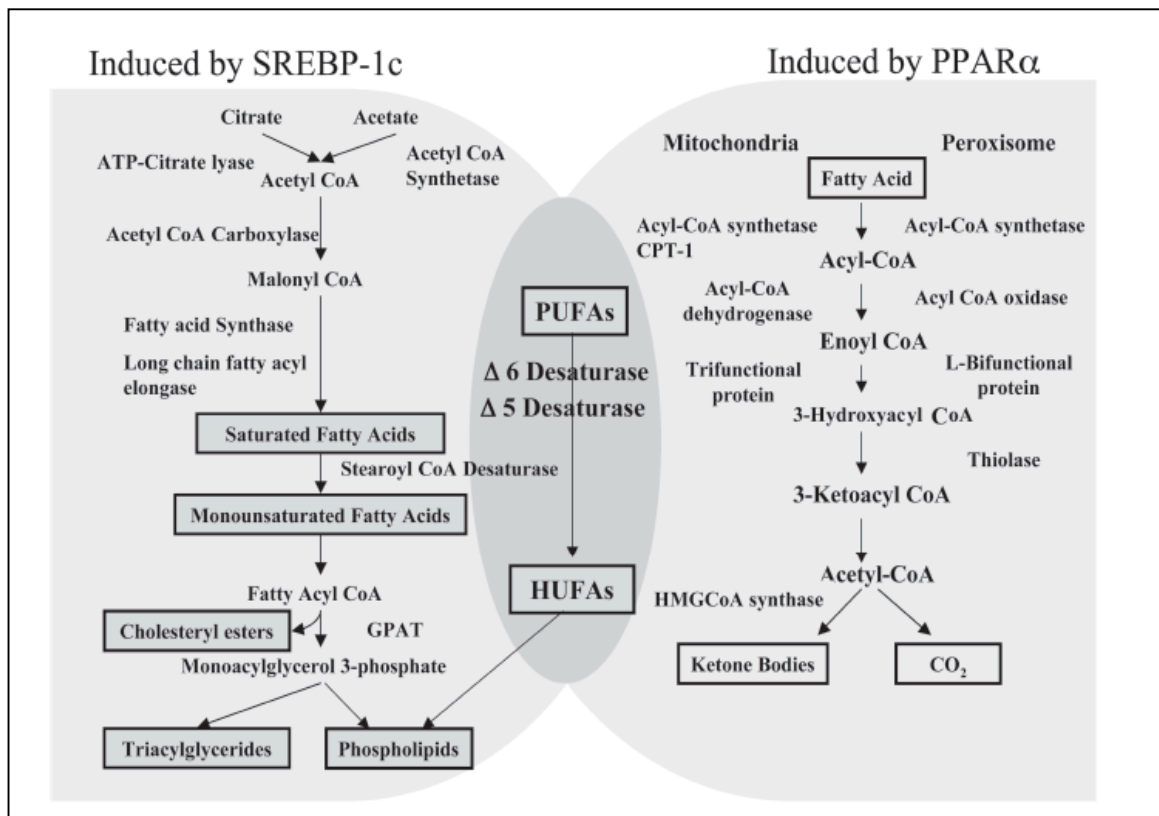


Figura 4. Regolazione genica della sintesi e degradazione degli acidi grassi (da Nakamura et al., Lipids 2004)

1.4 Regolazione del metabolismo del colesterolo: il ruolo della dieta

La relazione tra malattia cardiovascolare e dieta e' stata oggetto di indagine per piu' di 100 anni, essenzialmente da quando e' stato osservato per la prima volta che diete ricche in colesterolo e grassi favorivano l'aterosclerosi nei conigli da laboratorio [13,14,52]. Studi epidemiologici hanno dimostrato che diete ricche in acidi grassi saturi e/o colesterolo aumentavano le concentrazioni sieriche di colesterolo e il rischio di sviluppare disturbi cardiovascolari. Correlazioni tra dieta e incidenza della malattia cardiovascolare sono state anche osservate in diverse aree geografiche e tra differenti popolazioni. Tali osservazioni hanno condotto alla formulazione dell'ipotesi denominata "diet-heart hypothesis" la quale suggerisce che acidi grassi saturi e colesterolo sono i maggiori responsabili della malattia cardiovascolare e aterosclerotica nell'uomo [53]. I grassi della dieta svolgono un ruolo cruciale nell'eziologia della malattia cardiovascolare, ma non si puo' trascurare che vi siano altri nutrienti quali fibre, antiossidanti, acido folico, calcio, carboidrati che hanno un profondo impatto sull'aterosclerosi [52].

Obiettivo di questo capitolo e' fornire una descrizione degli effetti degli acidi grassi, comunemente presenti nella dieta (tabella 2), sul metabolismo del colesterolo.

Ridurre la quantita' totale degli acidi grassi assunta con la dieta e' stata per molto tempo una delle strategie adottate per ridurre il rischio cardiovascolare. Negli anni '50 numerosi studi iniziarono a suggerire che il tipo di grasso fosse piu' importante della quantita' di grasso introdotta giornalmente nell'organismo [54]. Studi successivi dimostrarono che quando gli acidi grassi saturi SFA (principalmente acido palmitico C16:0 e stearico C18:0) venivano sostituiti con quelli insaturi (USFA) i livelli di colesterolo totale nel plasma si riducevano [55,56]. I benefici associati ad una ridotta assunzione di acidi grassi saturi vennero poi ulteriormente confermati dallo studio Seven Countries Study in cui l'assunzione giornaliera di SFA era fortemente correlata alla mortalita' cardiovascolare [57]. Tra le 7 coorti esaminate, quella

greca mostro' la piu' bassa incidenza della malattia cardiovascolare e un'analisi della dieta adottata (oggi comunemente chiamata dieta mediterranea) rivelo' un'assunzione ridotta di SFA ma elevata in acidi grassi monoinsaturi (MUFA). Questa osservazione propose i MUFA come alternativi agli SFA nella dieta sebbene gli studi di Keys e Hegsted indicarono che i MUFA avevano un effetto neutrale sulle concentrazioni plasmatiche del colesterolo [58,59]. Nello stesso periodo lo studio Western Electric Study fornì l'indicazione che gli acidi grassi polinsaturi (PUFA) erano inversamente associati al rischio cardiovascolare [60].

Fatty acid	Formula	Common food sources
Saturated		
Lauric	12:0	Coconut oil, palm kernel oil
Myristic	14:0	Coconut oil, palm kernel oil, dairy products
Palmitic	16:0	Dairy products, meat, palm o
Stearic	18:0	Cocoa butter, meat
MUFA		
Oleic	<i>Cis</i> -18:1	Olive oil, rapeseed oil, meat
Elaidic	<i>Trans</i> -18:1	Hydrogenated fats
PUFA		
Linoleic	18:2 <i>n</i> -6	Sunflower, maize and safflow oils
α -Linolenic	18:3 <i>n</i> -3	Linseed oil, soyabean oil, vegetables
EPA	20:5 <i>n</i> -3	Fish, marine mammals
DHA	22:6 <i>n</i> -3	Fish, marine mammals

Tabella 2: Acidi grassi comunemente presenti nella dieta (da Woodside JV et al, Proc Nutr Soc. 2005)

Acidi grassi e lipoproteine plasmatiche

Negli anni '60 Keys e Hegsted, per strade diverse, svilupparono equazioni predittive per quantificare gli effetti degli acidi grassi e del colesterolo introdotti con la dieta sulle concentrazioni plasmatiche del colesterolo [58,59]. Questi studi, insieme a successive meta-analisi, indicarono che le concentrazioni di colesterolo totale e del LDL-c erano incrementate dagli SFA e ridotte dai PUFA [61].

Gli acidi grassi in base al loro grado di insaturazione esercitano effetti diversi sulle lipoproteine plasmatiche.

Gli **acidi grassi saturi SFA** incrementano il colesterolo totale plasmatico (TPC) e LDL-c riducendo la clearance mediata dal LDLr [62]. Questo effetto tuttavia non è comune a tutti gli SFA. Ad esempio, l'acido stearico (C18:0) esercita un effetto modesto sul TPC poiché è facilmente convertito dall'organismo in acido oleico (C18:1). Gli effetti sul colesterolo HDL (HDL-c) sono dipendenti, invece, dalla lunghezza della catena idrocarburica: l'acido laurico (C12:0) aumenta l'HDL-c mentre quello palmitico (C16:0) e stearico non hanno alcun effetto [63].

Gli **acidi grassi monoinsaturi MUFA** possono essere in configurazione *cis* o *trans*. I MUFA sono neutrali in relazione ai loro effetti sulle concentrazioni plasmatiche di LDL-c e HDL-c quando presenti in configurazione *cis* [63,64,65]. I MUFA in configurazione *trans* invece incrementano LDL-c e riducono HDL-c oltre che aumentare i livelli di lipoproteina Lp(a) e dei trigliceridi plasmatici [66,67].

Gli **acidi grassi polinsaturi PUFA** vengono classificati in **omega-6** o **omega-3** a seconda della posizione del primo doppio legame carbonio-carbonio rispetto al gruppo metilico terminale della catena idrocarburica. Numerosi studi metabolici hanno mostrato che l'acido linoleico (LA) che appartiene alla famiglia degli omega-6 è efficace nel ridurre i livelli di TPC e LDL-c [68,69]. Per gli effetti ipolipidemici dei PUFA omega-3 si rimanda al capitolo successivo (1.5 Acidi grassi polinsaturi omega-3).

Studi di turnover nell'uomo e numerosi studi in animali da laboratorio (topi, ratti, cani, conigli e scimmie) hanno proposto diversi meccanismi attraverso i quali gli acidi grassi esercitano effetti iper- o ipo-lipidemici:

- alterazione della clearance epatica delle lipoproteine [62,70,71];
- alterazione della sintesi epatica di colesterolo estere (CE) e sua secrezione nelle lipoproteine [70,72,73];
- alterazione della sintesi dell'apolipoproteina AI e delle HDL [74,75];
- alterazione dell'assorbimento del colesterolo [76,77].

Acidi grassi monoinsaturi vs. polinsaturi: l'eterno dibattito

L'osservazione che diete ricche in SFA e colesterolo erano associate ad un incrementato rischio cardiovascolare diede l'avvio ad un numero estremamente elevato di studi volti all'identificazione del regime dietetico che offrisse la maggiore cardioprotezione [58,59].

Lo studio metabolico di Mattson e Grundy in cui 20 pazienti ipertrigliceridemici consumavano per 4 settimane tre diete liquide arricchite rispettivamente in SFA, MUFA e PUFA (omega-6) offrì la prima evidenza sperimentale che fosse meglio sostituire gli SFA con i MUFA piuttosto che con i PUFA [78]. Mattson e Grundy osservarono che sia i MUFA che i PUFA riducevano i livelli di LDL-c ma i PUFA, a differenza dei MUFA, riducevano anche i livelli plasmatici di HDL-c. Questo studio e altri successivi [79,80,81,82] hanno contribuito alla diffusione dell'idea che i MUFA siano la giusta alternativa agli SFA e alla divulgazione di linee guida contenenti la raccomandazione di incrementare il consumo di MUFA da parte di organismi istituzionali quali FDA (Food and Drug Administration) e l'AHA (American Heart Association).

E' importante sottolineare che tale raccomandazione non si basa su dati in cui l'aterosclerosi e l'associata malattia cardiovascolare sono direttamente esaminate ma su dati in cui marker surrogati sono usati per predire il rischio cardiovascolare [83]. Una misura diretta degli effetti degli acidi grassi sullo sviluppo dell'aterosclerosi e' di difficile realizzazione nell'uomo per motivi economici ed etici. Il principale vantaggio nell'usare modelli animali per studiare gli effetti degli acidi grassi consiste nel fatto che l'aterosclerosi, di per se', puo' essere quantificata direttamente al termine del periodo di studio. Quando topi privi del recettore LDLr vennero nutriti con diete ricche in SFA, MUFA e PUFA, l'entita' delle lesioni aterosclerotiche fu maggiore in quelli nutriti con i MUFA [84]; tale effetto fu successivamente confermato da studi condotti in topi e primati [72,85,86,87,88].

Rudel e collaboratori nutrono primati con diete ricche in SFA, MUFA e PUFA (omega-6) per 5 anni e al termine dei quali l'aterosclerosi fu quantificata sia morfologicamente che chimicamente. La dieta ricca in MUFA, pur assicurando, in accordo con i dati di Mattson e Grundy, un profilo plasmatico favorevole (riduzione del LDL-c e incremento del HDLc) rispetto a quelle ricche in SFA o PUFA, risulto' essere la piu' aterogena. L'aterosclerosi misurata nei primati nutriti con la dieta ricca in MUFA era associata con:

- elevati livelli di lipoproteine LDL aventi un core ricco in colesterolo estere che ne aumentava le dimensioni;
- accumulo di colesterolo estere a livello epatico;
- aumentati livelli plasmatici di colesterolo estere (principalmente colesterolo-oleato).

La figura 5 illustra il meccanismo proposto per spiegare il potenziale aterogenico degli acidi grassi monoinsaturi osservato negli studi condotti da Rudel e collaboratori.

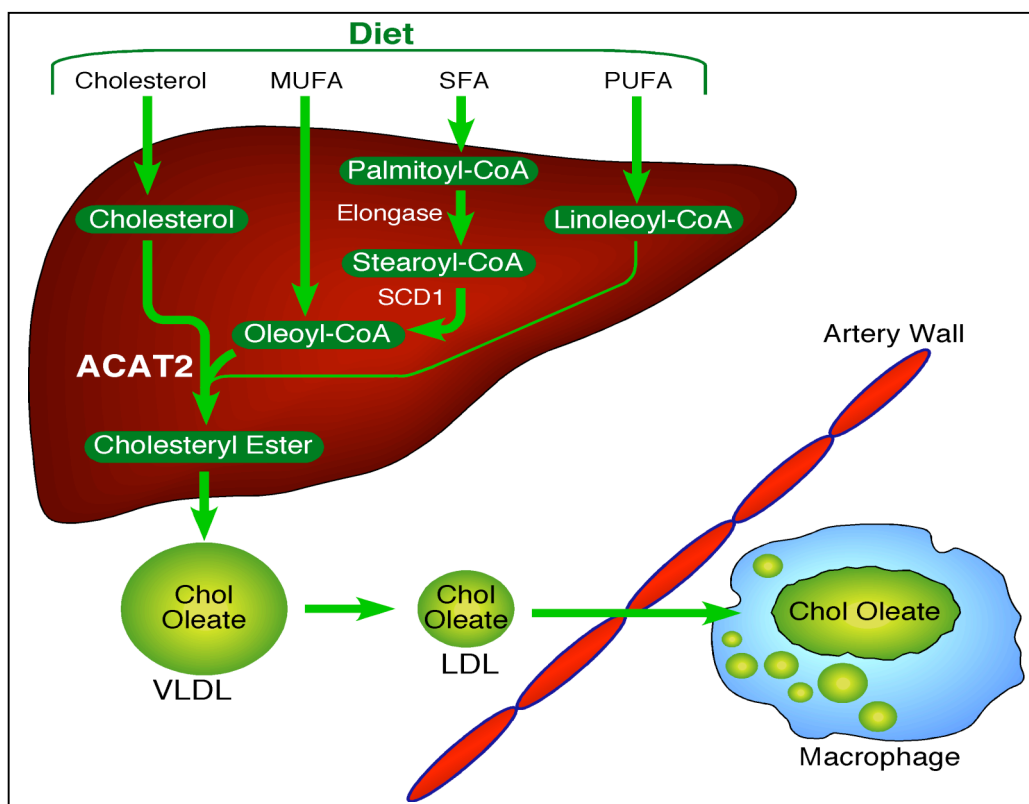


Figura 5. Potenziale aterogenico degli acidi grassi MUFA: meccanismo proposto (da Degirolamo et al. JLR. 2009)

Gli acidi grassi MUFA introdotti con la dieta (principalmente acido oleico) vengono convertiti in oleoil-CoA a livello epatico; tale oleoil-CoA può anche essere sintetizzato per via endogena a partire dagli SFA alimentari grazie all'enzima SCD1. L'oleoil-CoA viene usato come substrato preferenziale dall'enzima ACAT2 per esterificare il colesterolo di origine alimentare (freccie in grassetto). Il colesterolo estere così formato (colesterolo-oleato) viene incorporato e secreto nel compartimento plasmatico sotto forma di VLDL nascenti e successivamente trattenuto nel core delle LDL circolanti. Le LDL ricche in colesterolo-oleate sono più grandi del normale e sembrano essere più predisposte a legarsi ai proteoglicani della parete arteriosa [89]. Al contrario, i PUFA introdotti con la dieta sono convertiti in acil-CoA (ad esempio linoleoil-CoA) che non vengono efficientemente incorporati nelle molecole di colesterolo estere sintetizzate dall'enzima ACAT2 (freccie sottili) e pertanto non promuovono la formazione dell'aterogenico colesterolo-oleato.

Recentemente sono stati pubblicati diversi studi nell'uomo che supportano l'ipotesi che i MUFA siano aterogenici tanto quanto lo sono gli SFA [90,91,92]. Tali studi indicano il colesterol-oleato nel plasma come biomarker per la diagnosi e la prevenzione della malattia aterosclerotica come suggerito di recente in un editoriale di Sprecher [93]

L'osservazione, non sempre consistente, che i PUFA riducono i livelli plasmatici di HDL-c e che LDL arricchite in PUFA esibiscono una maggiore suscettibilità all'ossidazione rispetto a quelle arricchite in MUFA [94] ha ostacolato per lungo tempo l'ipotesi che i PUFA fossero maggiormente ateroprotettivi rispetto ai MUFA. E' importante tener presente che la riduzione nei livelli di HDL-c, quando misurata, non ha interferito negativamente sulla cardioprotezione offerta dai PUFA [85]. Dato il ruolo importante delle LDL ossidate (OxLDL) nell'insorgenza dell'aterosclerosi, la suscettibilità all'ossidazione, che aumenta all'aumentare dei doppi legami nello scheletro carbonioso, viene spesso acquisita come parametro per valutare il potenziale ateroprotettivo degli acidi grassi. Le evidenze sperimentali che i PUFA siano più soggetti ad ossidazione provengono da studi in vitro dove l'ossidazione viene misurata usando ioni rame; tuttavia non vi è alcuna evidenza che tale meccanismo abbia luogo in vivo [95].

La candidatura dei PUFA, in particolare gli omega-3, come sostituti degli SFA è supportata da un vasto numero di studi condotti in modelli animali e nell'uomo [96,97,98,99].

1.5 Acidi grassi polinsaturi omega 3

Negli ultimi trenta anni, l'interesse della comunità scientifica nei confronti degli acidi grassi polinsaturi omega 3 (n-3 PUFA) è cresciuto in virtù della constatazione epidemiologica della bassa incidenza di eventi cardiovascolari in popolazioni che consumano grandi quantità di pesce [99,100,101]. In particolare fu notato che tra gli eschimesi dell'Alaska e della Groenlandia (Inuit) e i nipponici residenti nelle zone costiere del Giappone l'incidenza della cardiopatia ischemica era inferiore a quella osservata tra gli eschimesi emigrati in paesi industrializzati e a quella dei nipponici che vivevano nell'entroterra del Giappone. Dal confronto della mortalità tra gli Inuit della Groenlandia e la popolazione danese emerse che il rischio cardiovascolare tra i primi era 10 volte inferiore che tra i secondi e che i primi consumavano una dieta 5 volte più ricca in n-3 PUFA. Successivi studi epidemiologici e di intervento hanno dimostrato che gli acidi grassi n-3 PUFA sono ateroprotettivi e che un'assunzione giornaliera di 200-500 mg di omega 3 (corrispondente a circa 30g di pesce al giorno) fornisce cardioprotezione [102,103,104,105,106,107] (figura 6).

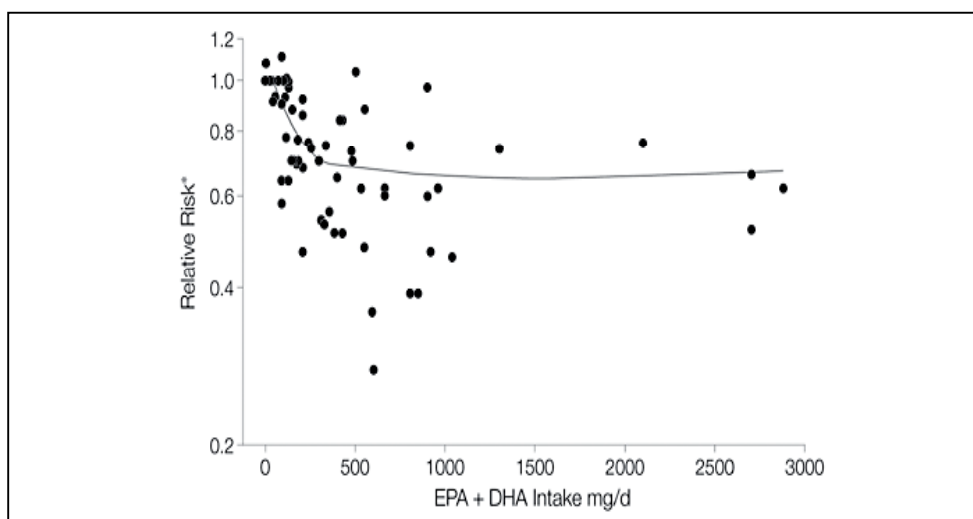


Figura 6. Relazione tra consumo di pesce o olio di pesce e rischio relativo di morte cardiovascolare in studi di coorte prospettici e trial clinici randomizzati. (da Mozaffarian D et al. JAMA 2006).

Il precursore degli n-3 PUFA e' l'acido alfa-linolenico (ALA) che, assieme all'acido linoleico omega 6 (LA) e' definito essenziale in quanto non puo' essere sintetizzato dall'organismo e deve essere introdotto con la dieta.

Le fonti di ALA sono vegetali a foglia verde (spinaci), legumi, frutta secca, oli vegetali quali l'olio di lino (flaxseed oil) e l'olio di soia (soybean oil).

La biosintesi endogena degli acidi grassi omega 3 a lunga catena quali EPA (acido eicosapentenoico) e DHA (acido docosaesaenoico) ha luogo principalmente a livello epatico e cerebrale ed e' mediata da reazioni enzimatiche che hanno luogo a livello dell'ER e dei perossisomi.

La via biosintetica degli acidi grassi omega 3 si articola in 7 passaggi:

- a) L'enzima $\Delta 6$ -desaturasi converte l'ALA (C18:3) in acido stearidonico (SDA);
- b) L'enzima Elongasi-5 converte l'acido SDA (C18:4) in acido eicosatetraenoico;
- c) L'enzima $\Delta 5$ -desaturasi converte l'acido eicosatetraenoico (C20:4) in acido eicosapentenoico (EPA);
- d) L'EPA (C20:5) viene convertito in acido docosapentenoico (DPA) ad opera dell'enzima Elongasi -2;
- e) Il DPA (C22:5) viene convertito in acido tetracosapentenoico dall'enzima Elongasi-2
- f) L'acido tetracosapentenoico (C24:5) viene convertito in acido tetracosaesaenoico dall'enzima $\Delta 6$ -desaturasi;
- g) L'acido tetracosaesaenoico (C24:6) viene accorciato di due unita' carboniose ad opera dell'enzima retroconvertasi che e' localizzato nei perossisomi. Da tale reazione si forma l'acido docosaesaenoico (DHA, C22:6).

Il passaggio a) e' una tappa limitante di tale via biosintetica. L'enzima $\Delta 6$ -desaturasi e' oggetto di competizione tra gli omega 3 e gli omega 6 in quanto converte l'ALA in SDA e l'LA in acido γ -linoleico (GLA). L'attivita' enzimatica della $\Delta 6$ -desaturasi e' inibita da grassi saturi, iperglicemia, alcool, adrenalina, radiazioni ionizzanti e glucocorticoidi. La competizione per lo stesso sistema enzimatico e la variabile disponibilita' di acidi grassi polinsaturi omega 3 e omega 6 influenzano la tipologia dei metaboliti prodotti dall'attivita' dell'enzima $\Delta 6$ -desaturasi. Se l'assunzione di acidi grassi omega 6 e' maggiore di quella di omega 3, maggiore sara' la produzione di metaboliti dell'acido linoleico (LA) (quali acido arachidonico, ARA) e minore quella dei metaboliti dell'ALA (quali EPA e DHA). Cio' ha importanti implicazioni pratiche se si considera che i metaboliti derivati da LA e ALA hanno effetti biologici profondamente diversi. L'ARA e' il precursore delle prostaglandine della serie 1, dei trombossani della serie 2 e dei leucotrieni della serie 4 che producono vasocostrizione, broncocostrizione, attivazione dei leucociti polimorfonucleati e aumento della permeabilita' vascolare. L'EPA e DHA sono i precursori di prostaglandine della serie 3 e dei leucotrieni della serie 5 che favoriscono la vasodilatazione e riducono la broncocostrizione. Nei paesi occidentali industrializzati il rapporto omega 6:omega 3 e' ad oggi pari a 15:1. I motivi di questo rapporto sbilanciato sono ascrivibili a:

- aumentato consumo di oli vegetali ricchi in omega 6;
- limitato consumo di pesce;
- minor presenza degli omega 3 nel pesce di allevamento rispetto a quello pescato;
- scarso apporto dell'ALA con le carni provenienti da bovini alimentati con mangimi poveri di acidi grassi omega 3.

L'efficienza della conversione endogena di ALA in EPA e DHA e' limitata dalla presenza di elevati livelli di omega 6 nella dieta occidentale; di conseguenza maggiori benefici a livello cardiovascolare sono raggiunti quando EPA e DHA vengono forniti preformati con la dieta (pesce) o sottoforma di supplementi. Le fonti dietetiche dell' EPA e del DHA sono pesci

grassi quali salmone, tonno, sardine, acciughe, sgombri, aringhe. Gli n-3 PUFA contenuti nei supplementi sono sottoforma di trigliceridi, di etil-esteri, o di acidi grassi liberi. Attualmente sono presenti sul mercato svariate formulazioni contenenti 1 g di EPA+DHA e che sono indicate per il trattamento dell'ipertrigliceridemia (trigliceridi plasmatici superiori a 5.65 mmol/L). Nel 2002 la FDA e l'AHA hanno raccomandato per la prima volta l'uso di supplementi per la prevenzione cardiovascolare secondo i seguenti criteri:

- Soggetti senza una documentata patologia cardiovascolare: 2 porzioni di pesce a settimana (equivalenti a circa 400-500mg di EPA e DHA);
- Soggetti con documentata patologia cardiovascolare: 1 g di EPA+DHA al giorno;
- Soggetti iper-trigliceridemici: 2-4g/die sotto supervisione medica [106].

Gli acidi grassi omega 3 svolgono sia funzioni strutturali che di regolazione metabolica:

Funzioni strutturali: gli omega 3 partecipano alla sintesi dei fosfolipidi di membrana e sono presenti nelle membrane citoplasmatiche esterne, nelle membrane dell'ER, dei mitocondri e dei lisosomi. Gli omega 3 partecipano alla strutturazione delle varie frazioni lipidiche quali CE, TG e PL e ne influenzano il metabolismo. Ad esempio, le lecitine e il colesterolo che contengono n-3 PUFA sono utilizzati e catabolizzati con maggiore rapidità rispetto alle rispettive molecole esterificate soprattutto con acidi grassi saturi e monoinsaturi. La lipolisi di trigliceridi esterificati con omega 3 è più rapida di quella dei trigliceridi contenenti acidi grassi saturi. Il DHA ha soprattutto funzioni strutturali essendo presente nei fosfolipidi dei sinaptosomi cerebrali, nella retina e nei fosfolipidi dei canali di membrana del sodio. Il DHA svolge un ruolo importante nella maturazione cerebrale e nello sviluppo dell'apparato riproduttivo e retinico [108].

Funzioni di regolazione metabolica: gli omega 3 influenzano la fluidità e la permeabilità delle membrane e svolgono un ruolo importante nella regolazione degli scambi cellulari. Gli omega 3 sono componenti essenziali di numerosi enzimi (ATPasi, nucleotidasi, lipossidasi), contraggono rapporti con fattori vitaminici (vitamine A, E, B6) e intervengono nella regolazione degli

scambi emo-tissutali, del trofismo e della funzione delle pareti vasali. Sono precursori di prostaglandine e leucotrieni ad azione vaso-dilatatrice e anti-aggregante piastrinica (LTB₅, PGI₃).

Omega 3 e cardioprotezione: studi nell'uomo

A partire dall'osservazione epidemiologica condotta da Dyerberg tra le popolazioni Inuit della Groenlandia, numerosi studi epidemiologici hanno confermato la cardioprotezione offerta dal consumo di pesce e dell'olio di pesce.

Il *Chicago Western Electric Study* dimostro' che rispetto ai soggetti che non consumavano pesce, quelli che ne consumavano almeno 35g al giorno avevano una mortalità' cardiovascolare piu' bassa del 40% [101].

Il *Nurses Health Study* dimostro' come all'aumentare del consumo di pesce da meno di una porzione al mese fino a 5 volte la settimana il rischio di coronaropatie si riduceva fino al 34% [102].

Nel *Physicians' Health Study* fu trovato che il consumo degli acidi grassi omega 3 era associato ad una significativa riduzione del rischio di morte improvvisa coronarica [109].

I dati piu' convincenti che gli omega 3 sono in grado di ridurre la mortalita' totale e soprattutto il rischio di morte improvvisa provengono da trials clinici randomizzati quali:

Diet Reinfarction Trial (DART): 2000 pazienti sopravvissuti all'infarto del miocardio vennero assegnati a tre regimi dietetici. Il gruppo trattato per due anni con 200-400g di pesce o 500g/die di omega 3 mostro' una riduzione del 29% della mortalita' per tutte le cause rispetto a quelli trattati con fibre o diete a basso contenuto calorico [103];

GISSI-Prevenzione: 11323 pazienti sopravvissuti all'infarto del miocardio ricevettero una miscela di esteri etilici di EPA e DHA (1g/die) in rapporto 0.9/1.5 per 42 mesi. La somministrazione degli omega 3 determino' una riduzione del 45% della morte improvvisa e del 28% della mortalita' totale. Sebbene inficiato dall'impiego di un "usual care group" come gruppo controllo invece che di un gruppo placebo, lo studio GISSI ribadì fortemente che la

terapia con acidi grassi omega 3 era efficace nel ridurre la mortalita' totale in pazienti con infarto del miocardio recente e che gia' assumevano una terapia anti-ischemica ottimale (uso di statine) [104];

JELIS Study: 18645 pazienti ipercolesterolemici (uomini e donne) vennero assegnati a due gruppi di trattamento: statina (10 mg pravastatina o 5mg simvastatina) o statina+ 1.8g/die di EPA. Al termine dei 5 anni di trattamento nel gruppo trattato con la combinazione statina+omega 3 fu riscontrata una riduzione del 19% degli eventi coronarici [107].

Gli effetti ateroprotettivi degli acidi grassi omega 3 sul rischio cardiovascolare sono molteplici:

- modulazione del metabolismo delle lipoproteine ricche in trigliceridi. In soggetti ipertrigliceridemici e normolipidemici gli omega 3 riducono la trigliceridemia post-prandiale e favoriscono la clearance epatica delle lipoproteine ricche in TG;
- regolazione della pressione arteriosa. Gli acidi grassi omega 3 sembrano esercitare un modesto effetto ipotensivo dose-dipendente che diventa piu' evidente in pazienti ipertesi. L'effetto ipotensivo e' riconducibile alla capacita' degli omega 3 di promuovere la sintesi endoteliale di agenti vasodilatanti quali ossido nitrico e prostaciclina [110];
- modulazione della bilancia emostatica. L'EPA e' il precursore di prostanoidi ad azione vasodilatante, anti-aggregante e anti-infiammatoria (es PGI_3). Inoltre gli acidi grassi omega 3 riducono la produzione di citochine infiammatorie quali $TNF-\alpha$, IL-6, IL-1 β [111]. Tali effetti, insieme al potenziamento della fibrinolisi, alla riduzione della sintesi di fibrinogeno, del fattore VII rendono ragione dell'azione anti-trombotica e anti-infiammatoria degli omega 3 [112].
- effetti favorevoli sulla stabilita' elettrica del miocardio. La proprieta' antiaritmica degli omega 3 consiste in una lieve iperpolarizzazione delle membrane plasmatiche dei miociti cardiaci; l'iperpolarizzazione determina un aumento della differenza del potenziale diastolico transmembrana e spostamento della soglia di apertura dei canali del sodio verso valori piu' positivi. E' stato osservato che gli omega 3 sono capaci di prolungare di

circa 3 volte il periodo refrattario della cellula muscolare cardiaca; ne consegue una maggiore resistenza del miocardio alla comparsa delle aritmie letali quali la fibrillazione ventricolare. L'azione di stabilizzazione elettrica sembra essere legata alla capacità degli omega 3 di inibire i canali L del calcio e ridurre così la liberazione del calcio dal reticolo sarcoplasmatico prevenendo i post-potenziamenti aritmogeni [113,114].

Proprietà ipolipemizzanti degli acidi grassi omega 3: studi in modelli animali

Studi condotti in diversi animali da laboratorio (topi, ratti, cani e primati) hanno descritto i meccanismi tramite i quali gli acidi grassi omega 3 agiscono sul metabolismo dei trigliceridi e del colesterolo.

L'**effetto ipotrigliceridemizzante** degli omega 3 è stato oggetto di una più vasta investigazione, rispetto a quello ipocolesterolemico, in virtù della sua riproducibilità sia nell'animale che nell'uomo. La riduzione della trigliceridemia è il risultato di due meccanismi distinti ma correlati:

-Riduzione della secrezione epatica delle lipoproteine VLDL. Gli acidi grassi omega 3 sono regolatori negativi della lipogenesi (sistema SREBP-1c) e positivi dell'ossidazione degli acidi grassi (sistema PPAR α). I geni coinvolti nella lipogenesi quali FAS, SCD1, Δ 6-desaturasi presentano nella regione del promotore una sequenza responsiva agli omega 3 ed è a tale sequenza che si lega il fattore di trascrizione SREBP-1c [115,116]. Gli omega 3 esercitano il loro effetto anti-lipogenico contrastando l'attivazione di SREBP-1c e dei suoi geni target. Ciò si realizza sia mediante una limitata attivazione proteolitica di SREBP-1c che ridotti livelli di RNA messaggero. Tali effetti si traducono in una ridotta sintesi degli acidi grassi e di trigliceridi a cui segue la mancata formazione delle VLDL nascenti per i motivi esposti nel capitolo 1.2. La ridotta disponibilità di trigliceridi deriva anche dall'attivazione, da parte degli omega 3, del recettore PPAR α che induce la trascrizione dei geni coinvolti nella β -ossidazione [51].

-Incrementata clearance delle lipoproteine ricche in TG . Le frazioni TG e CE dei chilomicroni e delle VLDL, arricchite in EPA e DHA, sono piu' facilmente idrolizzabili da parte della lipoproteina lipasi LPL. All'effetto ipotrigliceridemizzante contribuisce anche la saturazione delle membrane degli eritrociti con EPA e DHA in quanto influenza l'attivita' della lipasi endoteliale la quale partecipa alla clearance delle lipoproteine contenenti TG.

L'effetto ipocolesterolemico degli omega 3 ha ricevuto una minore attenzione da parte di coloro che studiano la relazione tra gli acidi grassi omega 3 e rischio cardiovascolare. I motivi di tale "disinteresse" possono essere vari:

- Nell'uomo la somministrazione di omega 3 non riduce i livelli plasmatici delle lipoproteine aterogene LDL;
- In pazienti ipertrigliceridemicici gli omega 3 usati ad alte dosi producono un aumento delle dimensioni delle LDL;
- L'effetto ipocolesterolemico osservato in alcuni modelli animali (es. primati, ratti, topi transgenici LDLr knockout) non e' riprodotto in altri (es. topi apoE knockout, PPAR α knockout);

Il meccanismo responsabile dell'effetto ipocolesterolemico misurato nella maggior parte degli studi finora condotti non e' stato ancora chiarito nonostante molteplici siano i meccanismi proposti. (tabella 3).

Meccanismo proposto	Referenze
Riduzione dei livelli circolanti di lipoproteine aterogene VLDL e LDL	[70,72,73]
Riduzione dei livelli di colesterolo oleato	[73,83,85,86,87,88,117]
Stimolazione del trasporto inverso del colesterolo (RCT)	[118]
Ridotta sintesi endogena del colesterolo	[70,119]
Ridotto assorbimento intestinale del colesterolo	[76,77]
Incrementata clearance epatica delle LDL indipendente dal LDLr	[70]

Tabella 3. Meccanismi proposti per l'effetto ipocolesterolemico degli acidi grassi omega 3.

Le proprietà ateroprotettive degli omega 3 a lunga catena, EPA e DHA, sono state ampiamente documentate. Il costo e la scarsa disponibilità di pesce e di olio di pesce, fonti principali di EPA e DHA, ne limitano il consumo in alcuni Paesi nei quali l'apporto con la dieta di questi composti è particolarmente scarso.

È necessario quindi identificare fonti alternative di EPA e DHA che siano in grado di fornire quantità sufficienti di EPA e DHA per ottenere la dose giornaliera raccomandata (250-500mg). L'acido alfa-linolenico, precursore metabolico dell'EPA e del DHA, può servire da fonte alternativa sebbene il suo potenziale cardioprotettivo sia in dubbio.

1.6 Acido alfa-linolenico (ALA)

L'acido alfa-linolenico (ALA) e' l'acido grasso omega 3 piu' abbondante nella dieta dei paesi occidentali con un'assunzione giornaliera pari a 1.7g contro quella pari a 135 mg degli acidi grassi EPA e DHA [120]. L'acido alfa-linolenico puo' essere convertito in EPA e DHA mediante reazioni di elongazione e desaturazione. Studi nell'uomo hanno mostrato che l'entita' e l'efficienza di tale conversione sono estremamente basse e sono influenzate da fattori dietetici (colesterolo, acidi grassi omega 6) e ormonali (estrogeni) [121].

Interesse nel ruolo cardioprotettivo dell'ALA fu suscitato dallo studio Lyon Heart Study [122]. Lo studio Lyon mostro' che in pazienti sopravvissuti ad infarto del miocardio il consumo di una dieta ricca in olio di oliva e in ALA forniva una riduzione del 55% della mortalita' per tutte le cause. Studi successivi di prevenzione secondaria [123,124] hanno riportato un'associazione inversa tra assunzione di ALA e infarto acuto del miocardio. Altri studi hanno mostrato che la supplementazione con ALA incrementava i livelli plasmatici di EPA, DPA ma non di DHA; cio' si traduceva in un modesto o nessun effetto cardioprotettivo [125,126].

Studi nell'animale da laboratorio non hanno ad oggi fornito evidenze convincenti che l'acido alfa-linolenico sia ateroprotettivo. La maggior parte degli studi condotti negli animali da laboratorio (conigli, ratti e topi transgenici) hanno utilizzato come fonte di ALA i semi di lino (flaxseed). La supplementazione della dieta chow o di una dieta aterogena (in cui il 40% delle calorie proviene dai grassi) con semi di lino si e' dimostrata efficace nel ridurre i livelli plasmatici di colesterolo e l'entita' delle lesioni aterosclerotiche [127,128,129,130]. I semi di lino contengono non solo ALA ma anche fibre e fitoestrogeni (lignan) che, limitando l'assorbimento del colesterolo, potrebbero contribuire all'effetto ipercolesterolemico dei semi di lino. In un recente review Prasad sottolinea che il potenziale ipocolesterolemico dei semi di lino proviene unicamente dai fito-estrogeni in essi contenuti e non dall'ALA [131]. Per tale ragione l'impiego di una fonte vegetale che contenga

unicamente l'ALA, come l'olio di semi di lino (flaxseed oil) e' necessaria se si vuole valutare il potenziale ateroprotettivo dell'ALA (vedi tabella 4).

	Fat (g)	ALA (g)	Protein (g)	CHO (g)	Dietary fibre (g)	Lignan (mg)
Whole flaxseed	41	22.8	20	28.9	27.8	82-2600
Ground flaxseed	40.8	23.1	20	29.2	27.7	82-2600
Flaxseed oil	100	57	0	0	0	0

Tabella 4. Differenze composizionali tra diverse fonti di ALA (Bassett CM et al. Appl Physiol Nutr Metab 2009)

Un'ulteriore limitazione degli studi precedentemente condotti e' legata all'uso della dieta chow come dieta di base a cui i semi di lino venivano aggiunti. La dieta chow contiene una discreta quantita' di steroli vegetali (sitosterolo e campesterolo, 37-39mg/100g di dieta) e ha come acido grasso principale l'acido linoleico (~40% degli acidi grassi totali) [Degirolamo, dati non pubblicati]. La supplementazione dei semi di lino ad una dieta che per composizione e' ipocolesterolemica non rappresenta quindi la migliore condizione sperimentale in cui valutare il potenziale ipocolesterolemico dell'ALA di per se'. Sia gli studi nell'uomo che quelli nell'animale non chiariscono se il consumo di ALA di per se' apporti benefici in prevenzione cardiovascolare.

Diverse sono le domande di cui non sono note le risposte:

- l'ALA di per se' esercita un effetto ipocolesterolemico nel plasma e nel fegato?
- L'ALA di per se' viene convertito in EPA e DHA e, se si, in quali frazioni lipidiche si accumula preferenzialmente?
- L'EPA e il DHA sintetizzati a partire dall'ALA assicurano un grado di ateroprotezione comparabile a quello ottenuto con l'EPA e il DHA forniti con l'olio di pesce?
- Il potenziale ateroprotettivo dell'ALA e' di tipo dose-dipendente?

Per le ragioni finora descritte, studi volti alla definizione del potenziale ateroprotettivo dell'ALA sono necessari e potrebbero contribuire ad una migliore comprensione della potenzialità terapeutica di questo acido grasso omega 3 nella gestione del rischio cardiovascolare.

Scopo della ricerca

Elevati livelli plasmatici di colesterolo sono un importante fattore di rischio per la malattia cardiovascolare. Studi epidemiologici e trials clinici hanno mostrato che riduzioni, anche moderate, del colesterolo circolante nelle lipoproteine aterogene (VLDL e LDL) contribuiscono in modo significativo alla riduzione del rischio cardiovascolare.

La modulazione farmacologica e nutrizionale dell'omeostasi del colesterolo e del metabolismo delle lipoproteine VLDL e LDL rappresenta quindi un importante target terapeutico nella prevenzione cardiovascolare.

Le proprietà cardioprotettive degli acidi grassi polinsaturi omega 3, EPA e DHA, sono ampiamente documentate sia nell'uomo che nell'animale da laboratorio [99-109]. Le fonti principali di EPA e DHA sono il pesce e l'olio di pesce e la quantità giornaliera raccomandata per la cardioprotezione è stata definita pari a 250-500 mg [106]. Nei paesi industrializzati tuttavia il consumo di pesce è limitato e non garantisce l'ottenimento delle dosi giornaliere di EPA e DHA raccomandate. EPA e DHA possono essere sintetizzati per via endogena a partire dall'acido alfa-linolenico. Oli vegetali, quali olio di semi di lino (flaxseed oil) e olio di soia (soybean oil), essendo particolarmente ricchi in acido alfa-linolenico (ALA), possono servire da fonti alternative di EPA e DHA.

Ad oggi il potenziale ateroprotettivo dell'ALA non è stato chiarito e documentato con certezza né nell'uomo né in modelli animali di aterosclerosi. Data l'elevata disponibilità di ALA da fonti vegetali rispetto a quella limitata ed esauribile di EPA e DHA da fonti animali (pesce), la dimostrazione che un'incrementata assunzione di ALA sia cardioprotettiva potrebbe avere un profondo impatto sulla gestione di tipo nutrizionale del rischio cardiovascolare.

Questo lavoro di ricerca è stato mirato allo studio del potenziale ipocolesterolemico e ateroprotettivo dell'acido alfa-linolenico in un modello murino di aterosclerosi.

Nella prima parte del lavoro (Studio I e II) l'abilita' dell'acido alfa-linolenico nel limitare l'accumulo epatico di colesterolo estere e' stata misurata e confrontata a quella dell'acido oleico, acido grasso monoinsaturo. Tale indagine e' stata condotta scegliendo due condizioni sperimentali: diete a basso e ad alto contenuto in colesterolo. L'analisi e' stata condotta in topi privi del recettore delle LDL (LDLr) ed esprimenti solo l'apolipoproteina B-100. Questo modello murino si caratterizza per un profilo plasmatico lipoproteico simile a quello umano e per una predisposizione a sviluppare aterosclerosi quando nutrito con diete a moderato contenuto di grassi [132,133].

Nella seconda parte del lavoro (Studio III) il potenziale ateroprotettivo dell'ALA e' stato studiato con un esperimento dose-risposta e confrontato con quello dell'acido oleico e quello degli acidi grassi polinsaturi omega 3, EPA e DHA. Lo scopo dello Studio III e' quello di investigare se l'EPA e il DHA sintetizzati endogenamente dall'acido alfa-linolenico offrano lo stesso grado di ateroprotezione dell'EPA e DHA contenuti nell'olio di pesce (fish oil).

Gli studi presentati in questo lavoro di ricerca si propongono di offrire un'ampia documentazione della capacita' dell'ALA di modulare il metabolismo plasmatico ed epatico del colesterolo.

Data la costante ricerca di nuove strategie nutrizionali per la gestione del rischio cardiovascolare, gli studi volti alla definitiva dimostrazione del potenziale cardioprotettivo dell'ALA acquisiscono una particolare rilevanza .

Materiali e Metodi

3.1 Formulazione delle diete sperimentali

Le diete impiegate negli studi presentati in questo lavoro di ricerca sono state formulate e preparate dal Diet Lab della Wake Forest University (North Carolina, USA). Nelle diete usate il 12% (Studio I&II) o 20% (Studio III) delle calorie provengono dai grassi; sono bilanciate per tutti gli ingredienti così che l'unica variabile è la composizione in acidi grassi. Le diete sono state formulate in modo tale che il contributo proveniente dalle diverse classi di acidi grassi fosse simile eccetto che per l'acido grasso che le caratterizza. Le fonti utilizzate per gli acidi grassi sono le seguenti:

- ALA: Flaxseed oil (Bioriginal Food&Science Corp., Saskatoon Canada);
- Acido oleico: Cis-monounsaturated Fat Blend (AC HUMKO, Memphis, TN 38101);
- EPA e DHA: Fish oil (Omega Protein Inc. Houston, TX 77042).

Tutte le diete contengono quantità sufficienti di antiossidanti.

Le tabelle 5&6 illustrano la composizione in acidi grassi delle diete impiegate.

Tabella 5
Composizione in acidi grassi delle diete usate negli Studi I&II

Acido grasso (%)	Cis-monounsaturated fat	Flaxseed oil
14:0	0.32	0.48
16:0	16.78	24.65
16:1	0.50	0.50
18:0	5.31	4.02
18:1 n-9 cis	55.95	27.68
18:2 n-6 (linoleico)	16.15	16.23
18:3 n-3 (alfa-linolenico)	0.90	23.02
20:5 n-3 (eicosapentenoico)	0.53	0.48
22:6 n-3 (docosaesaenoico)	0.40	0.37

Tabella 6: Composizione in acidi grassi delle diete usate nello Studio III

	Acidi grassi (% w/w)				
	SAT	MUFA	N-6 PUFA	ALA	N-3 PUFA
<i>Cis-mono</i>	42.2	42.9	13.1	0.8	0.5
Mod. Flaxseed oil	41.9	32.3	13.7	11.5	0
High Flaxseed oil	34.6	28.2	14.4	22.1	0
Fish oil	43.6	34.2	10.1	0.9	9

3.2 Disegno sperimentale: animali, tempi di trattamento, raccolta organi

Gli animali impiegati negli Studi I, II e III sono stati creati dal Dr Stephen Young (Gladstone Institute, California, USA; [132,133]) e sono topi femmine prive del recettore delle LDL ed esprimenti unicamente l'apolipoproteina B-100 (ApoB^{100/100} LDLr^{-/-}). Tale modello murino e' caratterizzato da un background genetico misto (~75% C57BL/6 e ~25% 129Sv/Jae). Gli animali sono stati scelti di sesso femminile in quanto e' stato osservato che gli estrogeni favoriscono positivamente la conversione endogena dell'ALA in EPA e DHA [121]. Gli animali sono stati nutriti giornalmente con 10g di dieta e hanno avuto libero accesso all'acqua. Per gli Studi I&II l'eta' degli animali all'inizio del trattamento e' di 3 settimane (al termine dello svezzamento), mentre per lo Studio III l'eta' degli animali all'inizio delle diete e' di 7 settimane.

Studio I: Gli animali (n=7 per ciascuna dieta) sono stati nutriti con diete arricchite rispettivamente in ALA (Flaxseed oil diet) e acido oleico (Cis-mono diet) e contenenti 0.02% colesterolo (w/w) per 2,4,8 settimane.

Studio II: Gli animali (n=7 per ciascuna dieta) sono stati nutriti con diete arricchite rispettivamente in ALA e acido oleico e contenenti 0.2% colesterolo per 6 settimane. Al termine delle 6 settimane il contenuto in colesterolo viene ridotto da 0.2% a 0.02% e gli animali vengono nutriti con le stesse diete per ulteriori 2,4,8 e 16 settimane.

Per gli Studi I e II a ciascun time-point un set di animali (n=7 per ciascuna dieta) e' stato sacrificato dopo 4 ore di digiuno via iniezione sottocutanea di una miscela di ketamina (50mg/kg) e xilazina (10mg/kg). Il sangue viene raccolto dal cuore e posto in una provetta contenente un cocktail a base di EDTA (5%), NaN₃ (5%) e una miscela di inibitori delle proteasi (Sigma Aldrich). Il plasma viene separato dopo centrifugazione a 12,500 g per 15 minuti a 4°C e successivamente conservato in un freezer a -80°C. La carcassa viene poi perfusa con una soluzione salina (0.9% NaCl) e il fegato viene raccolto, congelato in azoto liquido e conservato in un freezer a -80°C.

Studio III: Gli animali (n=12 per ciascuna dieta) sono stati assegnati a 4 diete arricchite rispettivamente in ALA (Moderate e High Flaxseed oil), acido oleico (Cis Mono diet) e EPA e DHA (Fish oil diet) e nutriti per 16 settimane. Le diete contengono 0.02% colesterolo (w/w). Prelievi di sangue (a livello della vena sottomandibolare) sono stati compiuti a 0-2-4-8-16 settimane di dieta e il plasma separato come prima descritto. Al termine delle 16 settimane, gli animali vengono sacrificati come precedentemente descritto e la carcassa viene perfusa con una soluzione salina e il fegato raccolto, congelato in azoto liquido e conservato in freezer a -80°C. Il cuore con l'aorta attaccata (partendo dal sinus aortico fino al termine della biforcazione iliaca) viene rimosso e conservato in una soluzione contenente 10% formalina.

3.3 Analisi del profilo lipidico e lipoproteico: plasma e fegato

Per gli Studi I&II la determinazione dei livelli di colesterolo plasmatici ed epatici e' stata condotta usando la gas-cromatografia (GLC). I campioni di plasma (25µl) e di fegato (~ 80 mg) vengono estratti in una miscela cloroformio:metanolo secondo il metodo Bligh e Dyer [134]. 5-alfa-colestanone viene usato come standard interno. Colesterolo libero (FC) e totale (TC) vengono misurati tramite GLC mentre il colesterolo estere (CE) viene ottenuto dalla seguente formula $(TC-FC)*1.67$. Le concentrazioni di trigliceridi plasmatici ed epatici sono misurate usando saggi enzimatici come

precedentemente descritto [135]. Il contenuto epatico di fosfolipidi e' stato misurato secondo il metodo di Fiske e Subbarow mentre quello proteico secondo il metodo di Lowry [136,137]. Per lo Studio III, le concentrazioni plasmatiche ed epatiche di colesterolo sono invece misurate usando saggi enzimatici (Roche Diagnostics).

Le concentrazioni di colesterolo nelle lipoproteine VLDL, LDL e HDL sono state misurate dopo separazione di campioni singoli tramite gel-filtrazione su una colonna Superose 6 (fast performance liquid chromatography, FPLC, Amersham Pharmacia Biotech) a 0.5 mL/min, in un tampone fosfato contenente EDTA 0.1 mM e sodio azide 0.02%. [88].

3.4 Isolamento e caratterizzazione delle lipoproteine plasmatiche

Le lipoproteine LDL sono state isolate da campioni di plasma fresco raccolti da singoli topi aggiustando la densita' a 1.225g/mL con il KBr. I campioni di plasma sono poi centrifugati per 4 ore a 100000 g in un'ultra-centrifuga (rotore TLA 120.2) Optima MAX-E (Beckman Instruments). Le lipoproteine LDL si raccolgono nella porzione sovrastante della soluzione centrifugata, vengono trasferite con una pipetta e iniettate su una colonna cromatografica Superose 6. Le frazioni contenenti LDL sono raccolte e unite secondo il tempo di ritenzione come precedentemente descritto [88]. Le LDL isolate vengono misurate per il loro contenuto in colesterolo e trigliceridi usando saggi enzimatici; il PL viene misurato secondo il metodo del fosforo [136] e le proteine con un saggio di Lowry modificato (micro-Lowry). Le dimensioni delle LDL sono misurate usando Zetasizer nano S (Malvern Instruments, United Kingdom).

3.5 Valutazione della composizione in acidi grassi dei lipidi

La composizione in acidi grassi e' stata valutata con l'ausilio della gas-cromatografia. I campioni plasmatici ed epatici vengono estratti con una miscela cloroformio:metanolo e le frazioni lipidiche vengono separate via

cromatografia a strato sottile (TLC). Le bande corrispondenti a CE, TG e PL vengono isolate, raccolte in tubi in vetro e trattate con 1 ml di 0.5N NaOH in metanolo e 1 ml di BH_3 per metilare la porzione carbossilica degli acidi grassi. Dopo incubazione per 5 minuti a 100°C , le frazioni lipidiche così metilate vengono estratte usando esano e acqua distillata (3:1), risospese in isooctano e quantificate come metil-esteri degli acidi grassi tramite GLC. La composizione in acidi grassi è espressa in percentuali [87,88].

3.6 Quantificazione dell'aterosclerosi

L'aterosclerosi è stata misurata quantificando l'accumulo di colesterolo estere nell'intera aorta (dal cuore fino alla ramificazione iliaca) secondo metodi precedentemente descritti [138]. Brevemente, l'aorta viene pulita rimuovendo i tessuti adiposo e connettivo aderenti e i lipidi vengono estratti in una miscela cloroformio:metanolo usando 5-alfa-colestane come standard interno. Il FC e TC vengono misurati via GLC e il CE aortico viene calcolato usando la formula $[(\text{TC}-\text{FC}) \times 1.67]$. Il contenuto proteico dell'aorta viene misurato usando il saggio di Lowry. L'aterosclerosi viene quindi espressa come mg di CE nell'aorta/g proteina.

3.7 Real Time-PCR

L'RNA totale viene estratto da circa 80 mg di fegato con Trizol (Invitrogen Life Technologies) adottando il protocollo fornito dal produttore. L'RNA viene risospeso in 300 μl di acqua DEPC (diethyl pyrocarbonate) e un μg di RNA viene retrotrascritto a cDNA usando Omniscript trascrittasi inversa (Qiagen) secondo le seguenti condizioni: 37°C per 1 ora e 93°C per 5 minuti. Il cDNA viene diluito 1:10 usando acqua DEPC e l'analisi real-time PCR viene condotta in triplicati usando 5 μl di cDNA, 12.5 μl di SYBN GREEN PCR master mix (Applied Biosystems), 5.5 μl di acqua DEPC e 1 μl di forward e reverse primer (20 pmol) per un volume finale di 25 μl . I campioni vengono sottoposti a 40 cicli di amplificazione nell'ABI Prism (Applied Biosystem). I

valori ottenuti vengono normalizzati contro il gene di riferimento ciclofillina [139].

3.8 Analisi statistica

I risultati degli Studi I&II sono espressi come medie ($\pm$ errore standard della media). I dati sono stati analizzati con un unpaired t-test quando le diete Flaxseed oil e Cis-mono sono state confrontate direttamente. Two-way ANOVA e' stata usata per analizzare i cambiamenti indotti dalle diete durante il tempo di trattamento usando come fattori "tempo" e "dieta". Quando l'interazione era significativa, un post test Bonferroni e' stato condotto. Le differenze sono considerate significative quando $p < 0.05$.

I risultati dello Studio III sono espressi come medie ($\pm$ errore standard della media). I dati sono stati analizzati con One-way ANOVA seguita da Tukey post test. Differenze sono considerate significative quando $p < 0.05$.

Tutte le analisi statistiche sono state condotte con il Software Graph Pad Prism (versione 4).

Risultati

4.1 Studio I:

Valutazione dell'ipocolesterolemia e arricchimento in acidi grassi omega 3 indotti dall'acido alfa-linolenico in condizioni di ridotto contenuto di colesterolo nella dieta.

Il potenziale ipocolesterolemico dell'acido alfa-linolenico (ALA) e' stato inizialmente valutato in topi femmine ApoB^{100/100} LDLr^{-/-} testando l'ipotesi che una dieta ricca in ALA (Flaxseed oil) limiti l'accumulo di colesterolo estere (CE) a livello epatico. Ridotti livelli epatici di CE comporterebbero una minore incorporazione di colesterolo nelle nascenti VLDL contribuendo cosi' ad una riduzione dei livelli circolanti di CE. Particolare enfasi e' stata data al fegato a causa del suo ruolo centrale sia nella secrezione di colesterolo nelle lipoproteine che nella biosintesi degli acidi grassi omega 3.

Gli animali impiegati sono stati arruolati per lo studio il giorno del loro svezzamento (3 settimane di eta'). La dieta ricca in ALA (Flaxseed oil) e' stata confrontata con una dieta ricca in acido oleico (Cis-mono). Entrambe le diete si caratterizzano per un ridotto contenuto di colesterolo (0.02% w/w). Un gruppo di topi e' stato sacrificato il giorno del loro svezzamento e rappresenta il gruppo baseline (0 settimane di dieta). Il profilo lipidico plasmatico ed epatico del gruppo baseline e' illustrato nella tabella 7.

Tabella 7
 Profilo lipidico plasmatico ed epatico (gruppo baseline)

Plasma (mg/dL)	
TC	425.2±12.5
FC	124.1±1.7
CE	502.7±18.2
TG	133.3±21.1
VLDL-cholesterol	37.94±2.4
LDL-cholesterol	348.7±3.7
HDL-cholesterol	39.23±4.5
Liver (mg/g protein)	
TC	28.1±1.1
FC	19±2.1
CE	15±1.8
TG	34±13
PL	158.2±10.2
I dati sono presentati come medie±SEM. (n=10 topi)	

I topi, dopo essere stati assegnati ai due regimi dietetici, sono stati nutriti per 2-4-8 settimane. A sole 2 settimane di dieta, la dieta ricca in acido oleico (Cis-mono) ha promosso un incremento del colesterolo totale plasmatico (TPC), del colesterolo libero FC e del colesterolo estere CE rispetto al gruppo baseline. I topi nutriti con la dieta ricca in ALA non hanno mostrato, a nessuno dei time point esaminati, alcuna differenza rispetto al gruppo baseline (figura 7A). L'effetto ipocolesterolemico della dieta ricca in ALA persiste anche dopo 4 e 8 settimane di trattamento. L'effetto benefico dell'acido alfa-linolenico viene osservato anche a livello epatico dove le concentrazioni di TC e CE sono inferiori rispetto quelle misurate dopo trattamento con la dieta ricca in acido oleico (figura 7B).

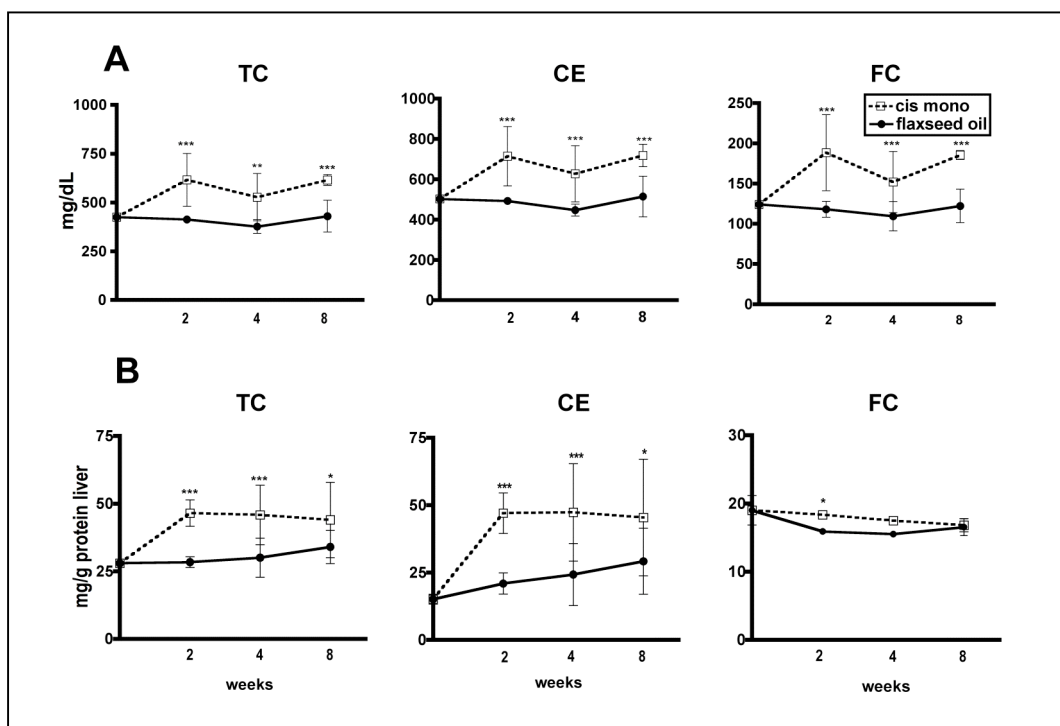


Figura 7. Concentrazioni plasmatiche (A) ed epatiche (B) di colesterolo misurate dopo 2, 4 e 8 settimane di trattamento in topi nutriti con diete ricche in ALA (flaxseed oil) o acido oleico (cis-mono). I dati sono espressi come medie ($\pm$ SEM) per $n=7$ topi/dieta e analizzati con Two-way ANOVA. *** $p<0.001$, ** $p<0.01$, * $p<0.05$.

Studi precedenti hanno evidenziato che gli acidi grassi introdotti con la dieta possono modificare la composizione dei lipidi epatici [87]. Analisi successive sono state condotte allo scopo di delineare la composizione in acidi grassi dei lipidi epatici e i dati ottenuti dopo 4 settimane di trattamento sono mostrati in tabella 8. Le frazioni colesterolo estere CE e trigliceridi TG sono arricchite principalmente in acidi grassi saturi e monoinsaturi indipendentemente dal tipo di acido grasso nella dieta. La percentuale di acidi grassi omega 6 è di circa il 5% sia in CE che TG. Nei topi nutriti con la dieta ricca in ALA le frazioni CE e TG sono arricchite in omega 3 (n-3 PUFA) (7.5% e 11.5%, rispettivamente) rispetto a quelle isolate da topi nutriti con l'acido oleico (circa 1%). La frazione fosfolipidica isolata dai fegati di topi nutriti con la dieta ricca in ALA presenta un maggiore arricchimento in n-3 PUFA (26.8% vs. 17.5%) rispetto a quella isolata dai topi nutriti con la dieta cis-mono.

Tabella 8
Composizione in acidi grassi dei lipidi epatici in topi nutriti per 4 settimane (Studio I)

Lipidi	Cis-mono	Flaxseed oil
<u>Colesterolo estere</u>		
% SFA	15±2.3	20.5±3
% MUFA	79.5±7.8	66.5±11.2
% n-6 PUFA	4.5±0.9	5.5±0.4
% n-3 PUFA	1±0.2 ^a	7.5±2.7 ^b
<u>Trigliceridi</u>		
% SFA	19.5±5.2	23.5±4.7
% MUFA	74.5±9	59.5±2.3
% n-6 PUFA	5.2±1.6	5.5±1.2
% n-3 PUFA	0.8±0.1 ^a	11.5±0.9 ^b
<u>Fosfolipidi</u>		
% SFA	34.2±2.9	37.8±3.5
% MUFA	20.5±0.7	16.2±3.9
% n-6 PUFA	27.8±5.2	19.2±2.8
% n-3 PUFA	17.5±4.2 ^a	26.8±1.9 ^b

I risultati sono espressi come medie (± SEM) (n=7 topi/dieta). Quando si confronta ciascuna classe di acidi grassi tra le due diete sperimentali, lettere diverse indicano una differenza significativa con P<0.05 (Student's t test).

Al fine di valutare qualitativamente l'arricchimento in acidi grassi omega 3 (n-3 PUFA) osservato nel CE, TG e PL dei topi nutriti con la dieta Flaxseed oil, il contributo relativo di ALA, EPA, DPA e DHA alle percentuali mostrate in tabella 8 e' stato quantificato (figura 8). A 0 settimane di dieta (baseline), il DHA e' il principale acido grasso omega 3 in PL e TG ed e' uno dei maggiori nella frazione di CE. L'acido alfa-linolenico si accumula preferenzialmente nei lipidi neutri, CE e TG, mentre significative quantita' di EPA sono misurate nei PL. ALA e' assente nella frazione fosfolipidica. Tale pattern di composizione in acidi grassi si mantiene pressocche' costante dopo 4 o 8 settimane suggerendo che l'incorporazione dell'ALA nei lipidi epatici avviene

rapidamente tanto quanto la conversione in EPA che arricchisce la frazione fosfolipica.

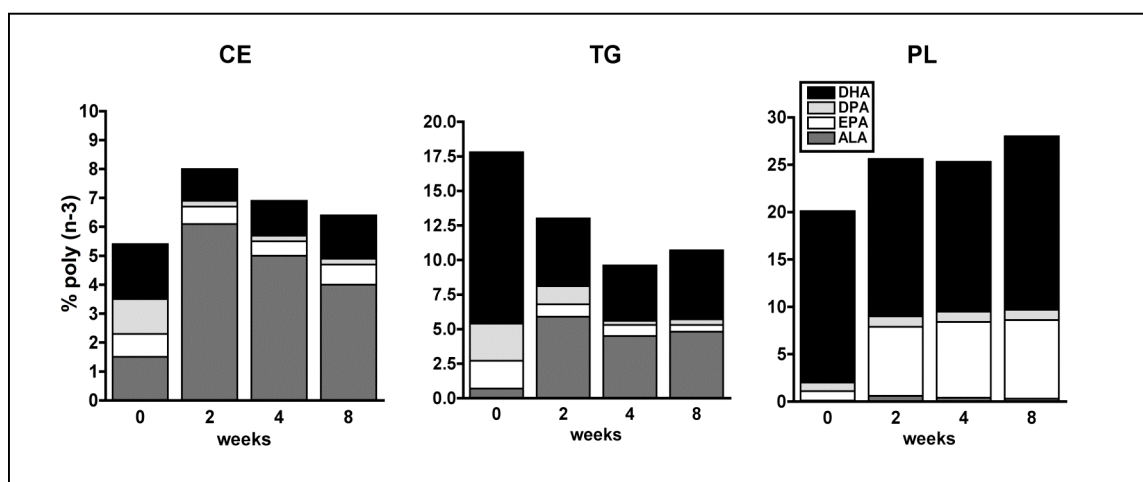


Figura 8. Incorporazione dell'ALA e dei suoi metaboliti nelle classi lipidiche epatiche. Le barre rappresentano le medie percentuali di ALA, EPA, DPA, DHA in colesterolo estere (CE), trigliceridi (TG) e fosfolipidi (PL). La legenda indica il colore corrispondente a ciascun acido grasso omega 3.

L'arricchimento delle frazioni lipidiche epatiche in omega 3 non è accompagnato da cambiamenti apparenti nell'espressione genica di enzimi coinvolti nella biosintesi degli omega 3 quali desaturasi ($\Delta 5$ - e $\Delta 6$ -desaturasi) e elongasi (Elongase 2 e 5) come mostrato in figura 9A.

Le differenze nei livelli plasmatici ed epatici del colesterolo tra le due diete suggeriscono che cambiamenti nell'espressione genica di proteine coinvolte nella sintesi dell'acil-CoA, del colesterolo e del colesterolo estere potrebbero essere presenti. Rispetto al gruppo baseline e ai topi nutriti con acido oleico, quelli nutriti con ALA sembrano esibire ridotti livelli di espressione per i geni coinvolti nella sintesi del colesterolo (figura 9B). Quando i livelli di mRNA di geni quali ACS, ACC e SCD1 sono stati misurati, l'analisi ha rivelato che quelli quantificati nei topi nutriti con ALA sono simili a quelli dei topi baseline (figura 9C); la dieta ricca in acido oleico sembra invece incrementarli. In accordo con dati precedenti [87,140] la proteina ACAT2 non è regolata a livello trascrizionale dagli acidi grassi alimentari.

Il pattern dell'espressione genica misurato in questo set di animali potrebbe almeno in parte spiegare le differenze misurate nelle concentrazioni epatiche di colesterolo tra le due diete.

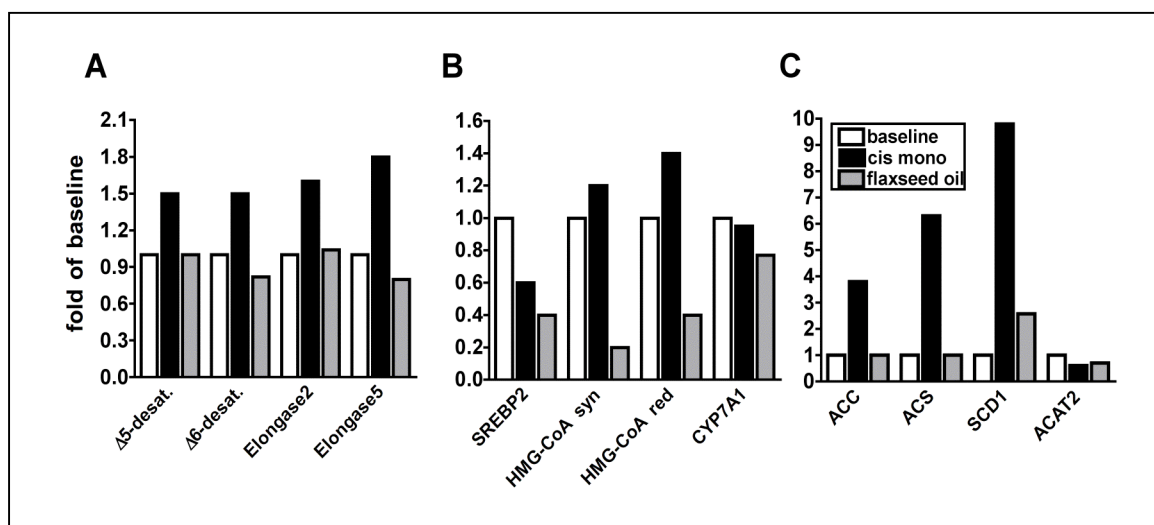


Figura 9. Quantificazione del mRNA epatico dei geni ACC (acil-CoA-carbossilasi), ACS (acil-CoA-sintetasi), SCD1 (stearoil-CoA-desaturasi 1), ACAT2 (acil-CoA:colesterol-aciltransferasi 2), Δ5- e Δ6-desaturasi, Elongasi 2 e 5, SREBP-2 (sterol regulatory element binding protein-2), HMG-CoA-sintasi, HMG-CoA-reduttasi, CYP7A1 (colesterol-7-alfa-idrossilasi) dopo 4 settimane di trattamento. I dati sono espressi come numero di volte di differenza rispetto al gruppo baseline che per comodita' e' stato posto uguale a 1. I dati sono ottenuti da pool (n=5 topi/dieta) di cDNA.

4.2 Studio II:

Valutazione dell'ipocolesterolemia e dell'arricchimento in acidi grassi omega 3 indotti dall'acido alfa-linolenico in condizioni di elevato contenuto di colesterolo nella dieta.

Allo scopo di investigare se l'effetto ipocolesterolemico dell'ALA si possa manifestare anche in condizioni di elevato contenuto di colesterolo nella dieta, i topi arruolati per lo Studio II sono stati nutriti con diete ricche in ALA o acido oleico e contenenti 0.2% di colesterolo (w/w) per 6 settimane. Tale trattamento consente di elevare i livelli plasmatici ed epatici di colesterolo estere in tempi brevi. Per testare l'ipotesi che l'ALA faciliti una più rapida clearance del colesterolo estere rispetto all'acido oleico, dopo le 6 settimane di dieta ad alto contenuto di colesterolo (0.2%) i topi sono nutriti con diete contenenti 0.02% di colesterolo per 2,4,8 e 16 settimane. Tale disegno sperimentale (time-course) consente di misurare la risposta del metabolismo epatico del colesterolo all'arricchimento in ALA in funzione del tempo. La figura 10A mostra che rispetto al gruppo baseline, i topi nutriti con le diete Flaxseed oil e Cis-mono esibiscono un significativo aumento delle concentrazioni plasmatiche del TC, FC e CE al termine delle prime 6 settimane. I topi nutriti con la dieta ricca in ALA però hanno livelli plasmatici di colesterolo inferiori rispetto a quelli misurati nei topi trattati con l'acido oleico. La risposta del fegato alle diete contenenti 0.2% di colesterolo è simile a quella del plasma sebbene la differenza tra le due diete sia minore (figura 10B). Quando nelle diete il contenuto di colesterolo è ridotto di 10 volte (da 0.2% a 0.02%) i livelli plasmatici di colesterolo dei topi nutriti con ALA ritornano al livello del gruppo baseline in 2 settimane mentre quelli nutriti con acido oleico impiegano 4 settimane. Ancora una volta la risposta epatica allo shift nel contenuto di colesterolo è simile a quella plasmatica con i topi nutriti con ALA realizzare la clearance del CE in tempi più brevi rispetto a quelli assegnati alla dieta Cis-mono. Le differenze, seppur minime tra le due diete, si annullano dopo 8 e 16 settimane.

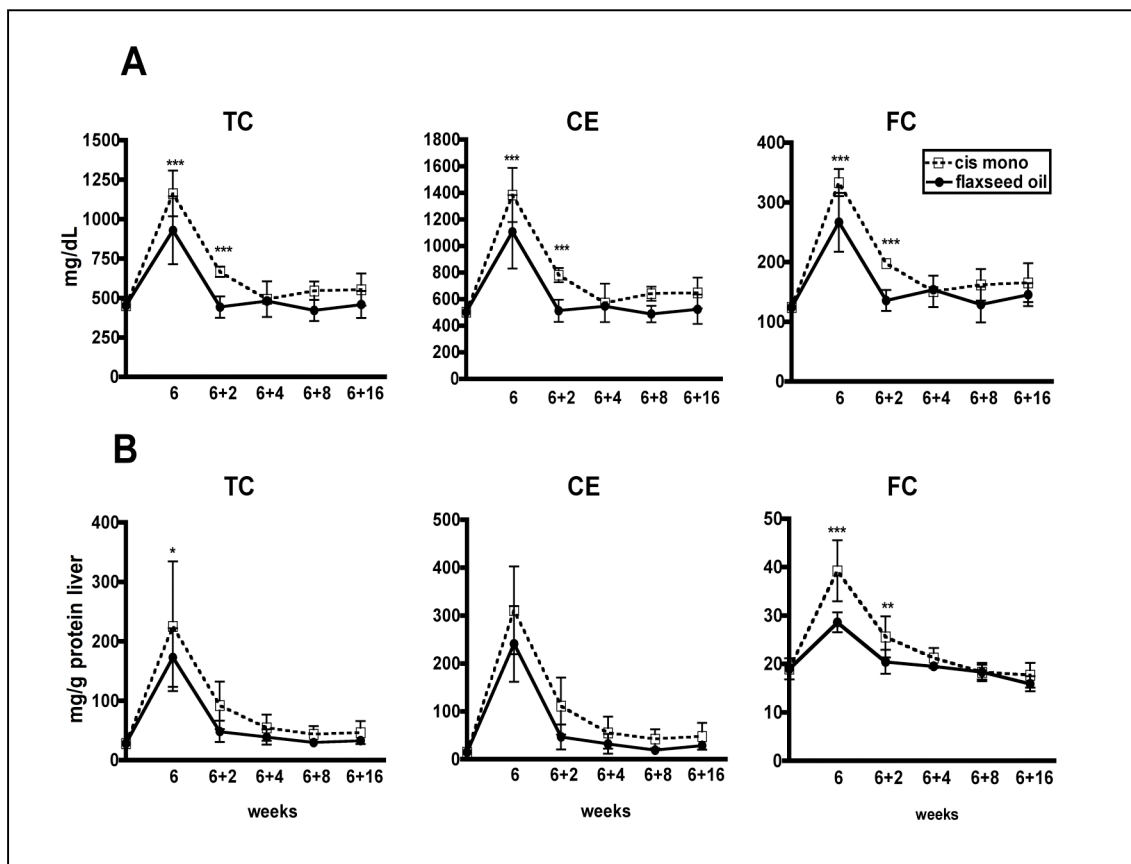


Figura 10. Time-course della risposta plasmatici (A) ed epatica (B) al cambiamento nel contenuto alimentare di colesterolo nei topi nutriti con ALA o acido oleico. I dati sono espressi come medie ($\pm$ SEM) per $n=7$ topi/dieta e analizzati con Two-way ANOVA. *** $p<0.001$, ** $p<0.01$, * $p<0.05$.

E' stato osservato che il colesterolo contenuto nella dieta puo' influenzare la conversione dell'ALA in EPA e DHA stimolando l'attivita' delle proteine coinvolte nella biosintesi degli omega 3 [121]. La composizione in acidi grassi delle frazioni lipidiche epatiche e' stata misurata al termine delle 6 settimane di trattamento con diete contenenti 0.2% di colesterolo. L'analisi gas-cromatografica ha evidenziato un pattern molto simile a quello mostrato in tabella 8 e quando le analisi sono state estese a tutti i time-point, nessuna differenza rispetto al profilo indicato in tabella 8 e' stato riscontrata (dati non mostrati). Tali dati suggeriscono che il colesterolo non limita l'incorporazione degli omega 3 nei lipidici epatici e che l'arricchimento in omega 3 non e' tempo-dipendente. Per verificare che i contributi relativi di ALA, EPA, DPA e DHA alle percentuali di omega 3 misurate nei lipidi epatici non fossero alterati

dalla presenza di un maggior contenuto di colesterolo, un'analisi dettagliata delle percentuali di tali acidi grassi e' stata condotta (figura 11).

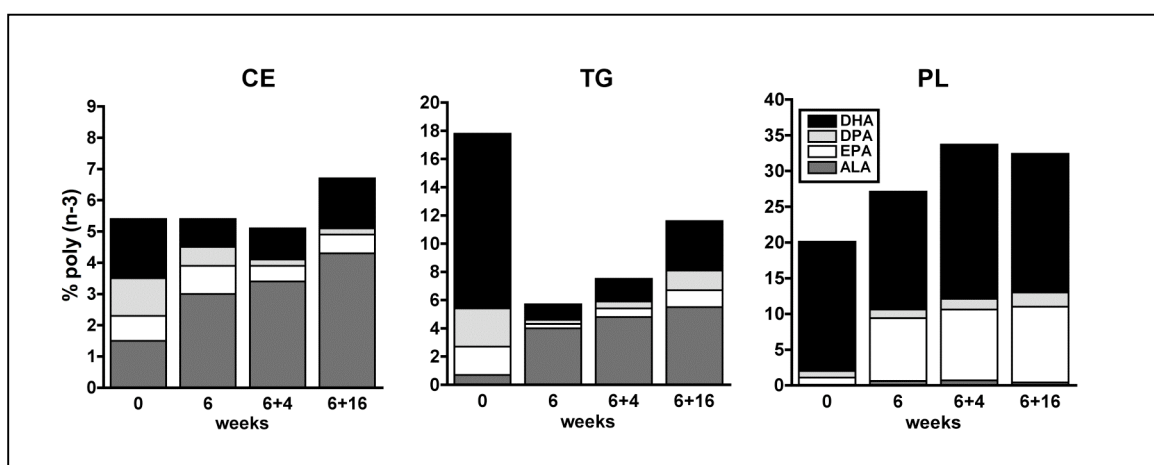


Figura 11. Incorporazione dell'ALA e dei suoi metaboliti nelle classi lipidiche epatiche (CE, TG e PL) durante l'esperimento di time-course della clearance epatica del colesterolo estere. Le barre rappresentano le medie percentuali di ALA, EPA, DPA e DHA e la legenda indica il colore corrispondente a ciascun acido grasso omega 3.

Come illustrato dalla figura 11 la selettiva incorporazione dell'ALA nei lipidi neutrali (CE e TG) e quella dell'EPA sintetizzato dall'ALA nella frazione fosfolipidica hanno luogo in presenza di elevati livelli di colesterolo nella dieta (6 settimane) e non sono influenzati dalla riduzione del colesterolo (6+4, 6+16). L'analisi dell'espressione genica a livello epatico non ha mostrato differenze rispetto al profilo illustrato dalla figura 9.

Complessivamente i dati raccolti negli Studi I e II dimostrano che in un modello murino di aterosclerosi la dieta ricca in ALA limita l'accumulo di colesterolo estere a livello plasmatico ed epatico e arricchisce i fosfolipidi epatici con EPA. Dal momento che il fegato e' l'organo che secerne il colesterolo estere (aterogenico) nelle lipoproteine plasmatiche [117], questo effetto sul metabolismo epatico del colesterolo potrebbe essere rilevante in termini di ateroprotezione.

4.3 Studio III:

Valutazione del potenziale ateroprotettivo dell'acido alfa-linolenico

Gli Studi I e II hanno dimostrato che in topi femmine ApoB^{100/100} LDLr^{-/-} una dieta ricca in acido alfa-linolenico (ALA) limita l'accumulo di colesterolo estere sia nel plasma che nel fegato e arricchisce i fosfolipidi epatici con EPA. Questi risultati suggeriscono un potenziale anti-aterosclerotico dell'ALA. Uno studio precedente nello stesso modello animale ha mostrato tuttavia che una dieta ricca in ALA proveniente dal flaxseed oil non è tanto ateroprotettiva quanto una dieta ricca in olio di pesce (fish oil) [88].

In questo studio abbiamo ipotizzato che il potenziale ateroprotettivo dell'ALA potesse essere dose-dipendente e quindi concentrazioni maggiori di ALA potrebbero fornire una cardioprotezione paragonabile a quella offerta dagli omega 3 contenuti nell'olio di pesce, EPA e DHA.

Nello Studio III due diete contenenti due concentrazioni di ALA (moderate e high flaxseed oil diet) sono confrontate ad una dieta ricca in acido oleico (controllo negativo) e ad una ricca in olio di pesce (controllo positivo). Per la prima volta l'EPA sintetizzato dall'ALA è confrontato con l'EPA introdotto con la dieta ricca in olio di pesce al fine di stabilire se gli omega 3 sintetizzati endogenamente siano tanto ateroprotettivi quanto gli omega 3 di origine alimentare.

Gli animali sono stati nutriti con le 4 diete sperimentali per 16 settimane.

La dieta ricca in acido oleico (Cis-mono) è stata usata come controllo negativo in quanto in diversi modelli animali e in numerose condizioni sperimentali ha promosso in modo consistente il più elevato accumulo di colesterolo estere che è l'end-point che verrà impiegato in questo studio per monitorare qualitativamente l'entità dell'aterosclerosi [72,85,87,117].

La figura 12A illustra la risposta del colesterolo plasmatico alle diverse diete. A due settimane dall'inizio del trattamento i topi nutriti con acido oleico e ALA hanno mostrato un incremento del TPC rispetto al baseline mentre quelli nutriti con l'olio di pesce una riduzione del TPC. Questo trend persiste a 4, 8 e 16 settimane suggerendo che elevate dosi di ALA (high flaxseed oil) non offrono benefici addizionali rispetto alle diete cis-mono e moderate flax. In questo modello animale le LDL sono la principale classe lipoproteica in

quanto la loro clearance e' inibita per l'assenza del recettore LDLr. Le concentrazioni di LDL-colesterolo hanno mostrato un andamento simile a quello del TPC (figura 12B). Anche in questo caso gia' dopo 2 settimane di trattamento la dieta ricca in olio di pesce assicura una significativa riduzione del LDL-c che persiste per tutta la durata dello studio. Le diete ricche in ALA e quella in acido oleico producono livelli di LDL-c che sono circa due volte superiori a quelli prodotti dalla dieta ricca in olio di pesce.

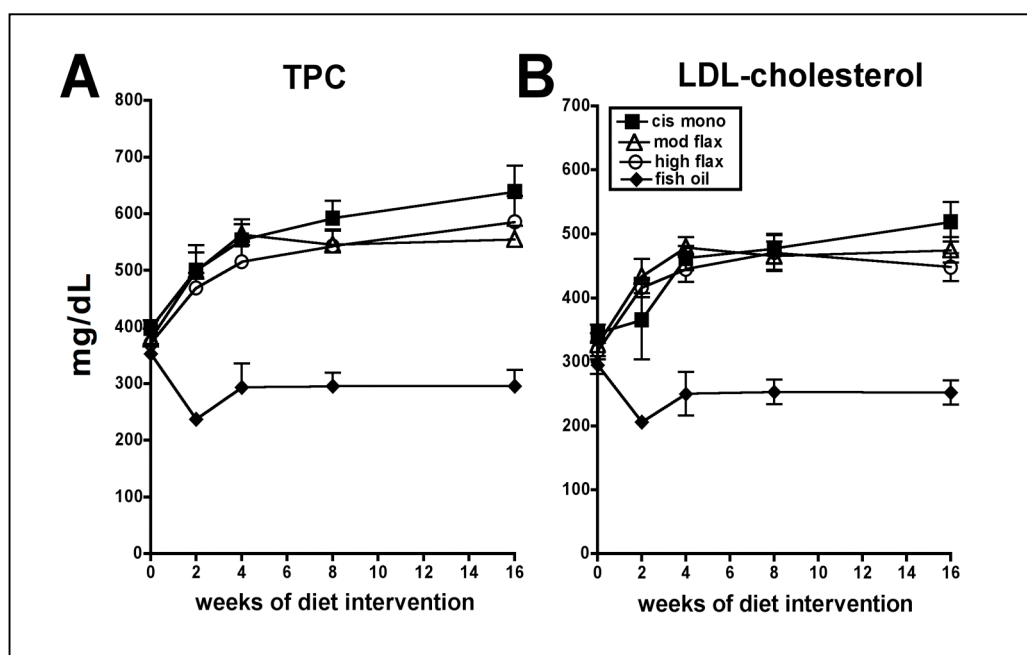


Figura 12. Concentrazioni plasmatiche del colesterolo totale TPC (A) e del colesterolo LDL (B) durante le 16 settimane di dieta. I dati sono espressi come medie ($\pm$ SEM) per n=12 topi per ciascuna dieta.

Quando i livelli di colesterolo sono stati misurati nella frazione VLDL, livelli inferiori (24.3 mg/dL) sono stati trovati nei topi nutriti con la dose piu' alta di ALA (high flaxseed oil) rispetto a quelli di topi nutriti con acido oleico o con la dose moderata di ALA (61 e 37 mg/dL, rispettivamente) ma comunque superiori a quelli misurati nei topi nutriti con l'olio di pesce (5.7 mg/dL). Come atteso da studi precedenti [51,96,97,112] la dieta ricca in olio di pesce risulta efficace nel ridurre i livelli plasmatici dei trigliceridi rispetto al baseline (111.2 vs. 61.2 mg/dL) mentre nessun effetto ipotrigliceridemizzante e' stato osservato nei topi nutriti con acido oleico o con ALA (dati non mostrati).

Studi in primati e topi transgenici hanno mostrato che gli acidi grassi introdotti con la dieta possono indurre alterazioni nelle dimensioni e nella composizione lipidica delle lipoproteine LDL [72,85,87,88]. L'analisi della composizione lipidica delle lipoproteine ha evidenziato che le LDL isolate dai topi nutriti con l'olio di pesce rispetto a quelle dei topi nutriti con acido oleico e ALA hanno un core meno ricco in TG (1.7% vs. 3.67% e 2.5%) e in CE (41% vs. 45.6%). Le differenze minime nella composizione lipidica si riflettono in modeste se non nulle modificazioni delle dimensioni delle LDL (dati non mostrati). La composizione in acidi grassi del colesterolo estere (CE) contenuto nel core delle LDL e' stata riportata essere un fattore predittore dell'aterosclerosi in vivo [72,85,117]. La figura 13 illustra la composizione in acidi grassi del LDL-CE.

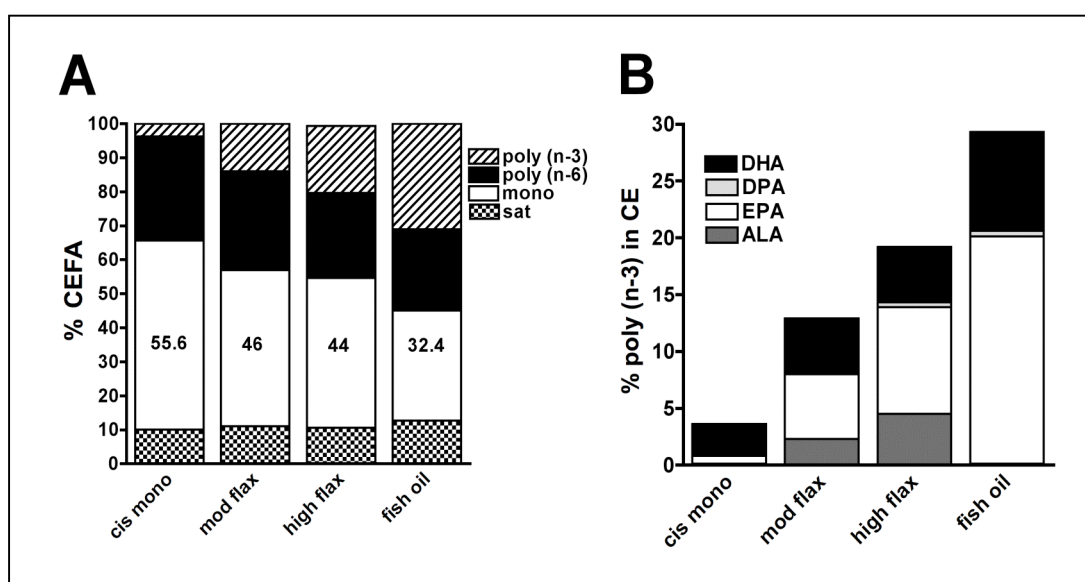


Figura 13. Composizione in acidi grassi del colesterolo estere delle LDL (A) in topi nutriti con le diverse diete per 16 settimane (n=12 topi/dieta). Le barre rappresentano le medie percentuali delle diverse classi di acidi grassi (saturi, monoinsaturi, n-6 polinsaturi e n-3 polinsaturi). Incorporazione di ALA e dei suoi metaboliti nel LDL-CE (B). Le barre rappresentano le medie percentuali di ALA, EPA, DPA, DHA. La legenda indica il colore/disegno corrispondente al tipo di acido grasso misurato.

Come mostrato in figura 13A, gli acidi grassi predominanti nel CE sono i monoinsaturati (principalmente acido oleico) che contribuiscono a circa il 50% degli acidi grassi totali. Rispetto alla dieta Cis-mono, quelle ricche in ALA producono una riduzione dei livelli di monoinsaturi nel CE (44% vs. 55.6%) mentre la percentuale piu' bassa viene registrata quando i topi ricevono la dieta ricca in olio di pesce (32.4%). Le percentuali degli acidi

grassi polinsaturi omega 6 sono simili tra le diverse diete mentre maggiore è l'arricchimento in omega 3 riscontrato nelle LDL isoalte da topi nutriti con ALA o olio di pesce. La figura 13B illustra il contributo relativo di ALA e i suoi metaboliti alla percentuale di omega 3 misurata nel LDL-CE. L'EPA è l'acido omega 3 predominante sia in topi nutriti con ALA che in quelli che hanno ricevuto l'olio di pesce anche se le percentuali sono alquanto diverse (5.7% e 9.4% vs. 20%). L'arricchimento dose-dipendente in ALA e EPA non è accompagnato da rilevanti cambiamenti nelle percentuali di DHA. Gli animali nutriti con l'olio di pesce esibiscono il più grande arricchimento della frazione CE delle LDL con percentuali di EPA e DHA che contribuiscono a circa il 28% degli acidi grassi totali.

La fonte del CE plasmatico è stata identificata nell'enzima epatico ACAT2 [86,141,142]. ACAT2 esterifica il colesterolo usando acil-CoA, principalmente oleoil-CoA. ACAT2 è l'isoforma dell'ACAT responsabile per la sintesi di CE incorporato nelle lipoproteine contenenti apoB secrete dal fegato e dall'intestino [143,144]. Studi precedenti condotti in topi ipercolesterolemici hanno dimostrato che gli acidi grassi alimentari modificano la composizione epatica dell'acil-CoA verso quella della dieta; ciò comporta che le diete ricche in acidi grassi omega 3 producono una minore formazione di oleoil-CoA per la reazione di esterificazione mediata dall'enzima ACAT2 [87]. In base a questi risultati precedenti ci si può aspettare che le diete ricche in ALA e olio di pesce, limitando la formazione di oleoil-CoA, producano un minore accumulo di CE nel fegato. Le concentrazioni epatiche di CE e TG nei topi nutriti per 16 settimane sono mostrate in figura 14. I topi che hanno ricevuto la dieta ricca in olio di pesce hanno mostrato i più bassi livelli di CE e TG nel fegato. Nonostante i topi nutriti con ALA abbiano livelli di CE inferiori a quelli misurati negli animali nutriti con l'acido oleico (46 e 35.5 vs. 84 mg/g proteina) risultano meno protetti rispetto a quelli ricevuti l'olio di pesce dall'accumulo di CE. A differenza dell'effetto ipocolesterolemico, quello ipotrigliceridemico è dose-dipendente con i topi nutriti con la dose più alta di ALA mostrare livelli epatici di TG non significativamente diversi da quelli dei topi nutriti con l'olio di pesce.

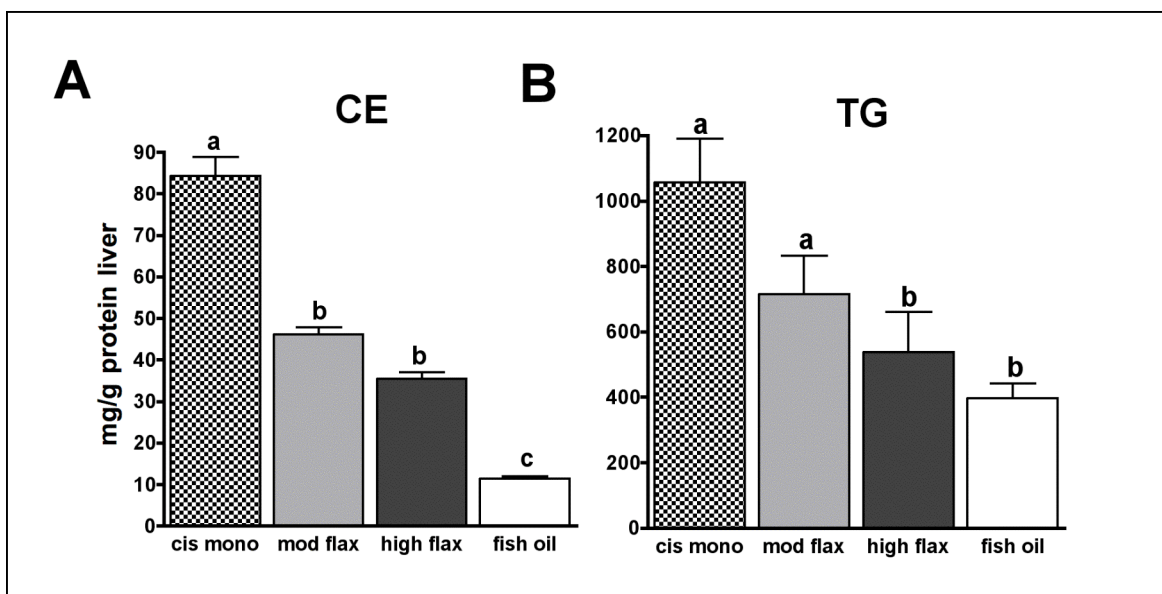


Figura 14. Concentrazioni epatiche di colesterolo estere (A) e triglicerdi (B) in topi nutriti per 16 settimane. I dati sono espressi come medie ($\pm$ SEM) per $n=12$ topi per ciascuna dieta. Lettere diverse indicano differenze significative tra i gruppi ($p<0.05$ Tukey's post-test).

Negli Studi I e II abbiamo osservato che ALA si distribuiva tra le frazioni lipidiche del fegato accumulandosi in via preferenziale nel CE e nel TG; l'EPA sintetizzato dall'ALA veniva incorporato selettivamente nella frazione fosfolipidica. Abbiamo quindi analizzato la composizione in acidi grassi omega 3 delle frazioni lipidiche del fegato per valutare se dosi maggiori di ALA si riflettessero in un maggiore arricchimento di omega 3. In accordo con i risultati precedenti, l'ALA e' l'acido grasso predominante nel CE e nel TG mentre e' assente nei PL. L'incorporazione dell'ALA avviene in maniera dose-dipendente come pure l'arricchimento di tutte le classi lipidiche con EPA (figura 15). Nei topi nutriti con olio di pesce il DHA e' l'acido grasso predominante in tutte le frazioni lipidiche. La composizione in acidi grassi dei fosfolipidi rivela che le percentuali di EPA e DHA misurate nei topi nutriti con ALA sono simili e non significativamente diverse da quelle ottenute nutrendo i topi con l'olio di pesce.

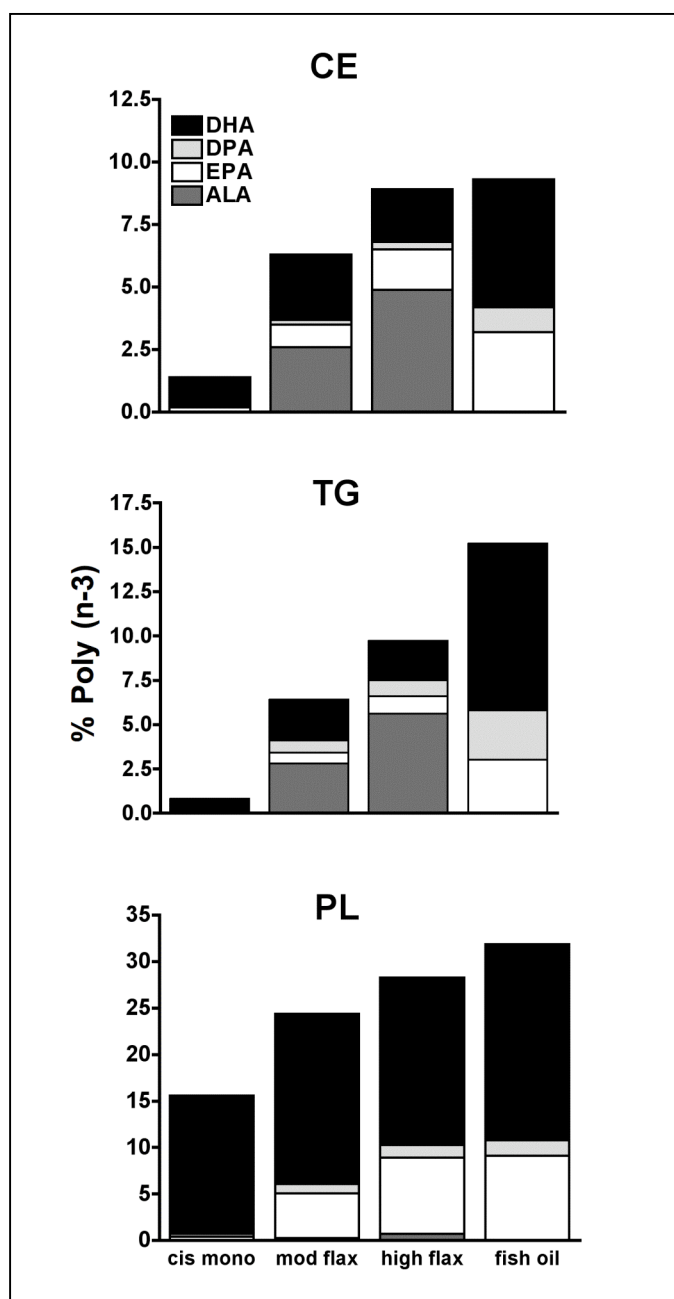


Figura 15. Incorporazione di ALA e dei suoi metaboliti nelle frazioni lipidiche epatiche dei topi (n=12/dieta) nutriti per 16 settimane. Le barre rappresentano le medie percentuali dell'acido alfa-linolenico (ALA), acido eicopentanoico (EPA), acido docosapentenoico (DPA) e docosaesaenoico (DHA). La legenda indica il colore corrispondente a ciascun tipo di acido grasso.

Studi precedenti hanno mostrato che cambiamenti della composizione in acidi grassi possono tradursi in effetti sull'aterosclerosi [72,88]. Per questo studio abbiamo misurato l'accumulo di CE nell'intera aorta come endpoint chimico per monitorare qualitativamente l'entità delle lesioni aterosclerotiche. La figura 16 mostra la risposta aterogenica agli acidi grassi introdotti con le diete al termine delle 16 settimane di trattamento. In accordo con precedenti studi [85,87,88] la dieta ricca in acido oleico promuove il più elevato accumulo di CE nell'aorta. Le diete ricche in ALA non manifestano alcun potenziale ateroprotettivo nonostante l'arricchimento in EPA e DHA misurato sia nei lipidi plasmatici che epatici. La dieta ricca in olio di pesce fornisce il più elevato grado di ateroprotezione. La valutazione qualitativa delle lesioni aterosclerotiche è stata accompagnata anche da misurazioni morfometriche (area delle lesioni tramite en-face analysis) che hanno confermato il mancato potenziale ateroprotettivo delle diete ricche in ALA (dati non mostrati).

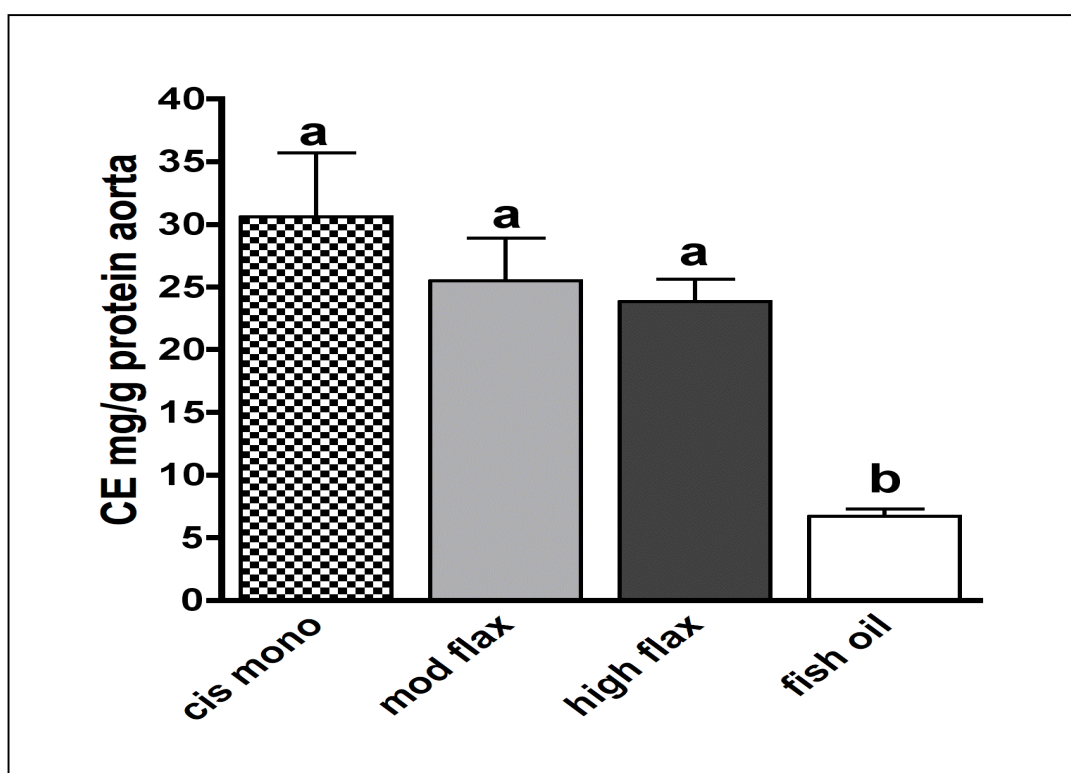


Figura 16. Quantificazione dell'aterosclerosi in topi nutriti con acido oleico (cis-mono), con dosi moderata (mod flax) o elevata (high flax) di ALA o con olio di pesce (fish oil) per 16 settimane (n=12 topi/dieta). Lettere diverse indicano differenze significative tra i gruppi ($p < 0.05$ Tukey's post-test).

I topi nutriti con olio di pesce sono risultati i piu' protetti dall'aterosclerosi in quanto:

1. hanno i livelli plasmatici piu' bassi di TPC e LDL-c;
2. hanno la piu' bassa percentuale dell'aterogenico colesterol-oleato nel LDL-CE;
3. accumulano ridotte qantita' di CE nel fegato.

L'effetto ipocolesterolemico dell'olio di pesce puo' essere attribuito a diversi meccanismi quali ridotta sintesi ed esterificazione del colesterolo, ridotta sintesi di acil-CoA o incrementato catabolismo tramite conversione in acidi biliari. Diversi geni epatici sono coinvolti in tali processi metabolici e un'analisi del profilo genico e' stata condotta tramite RT-PCR (figura 17).

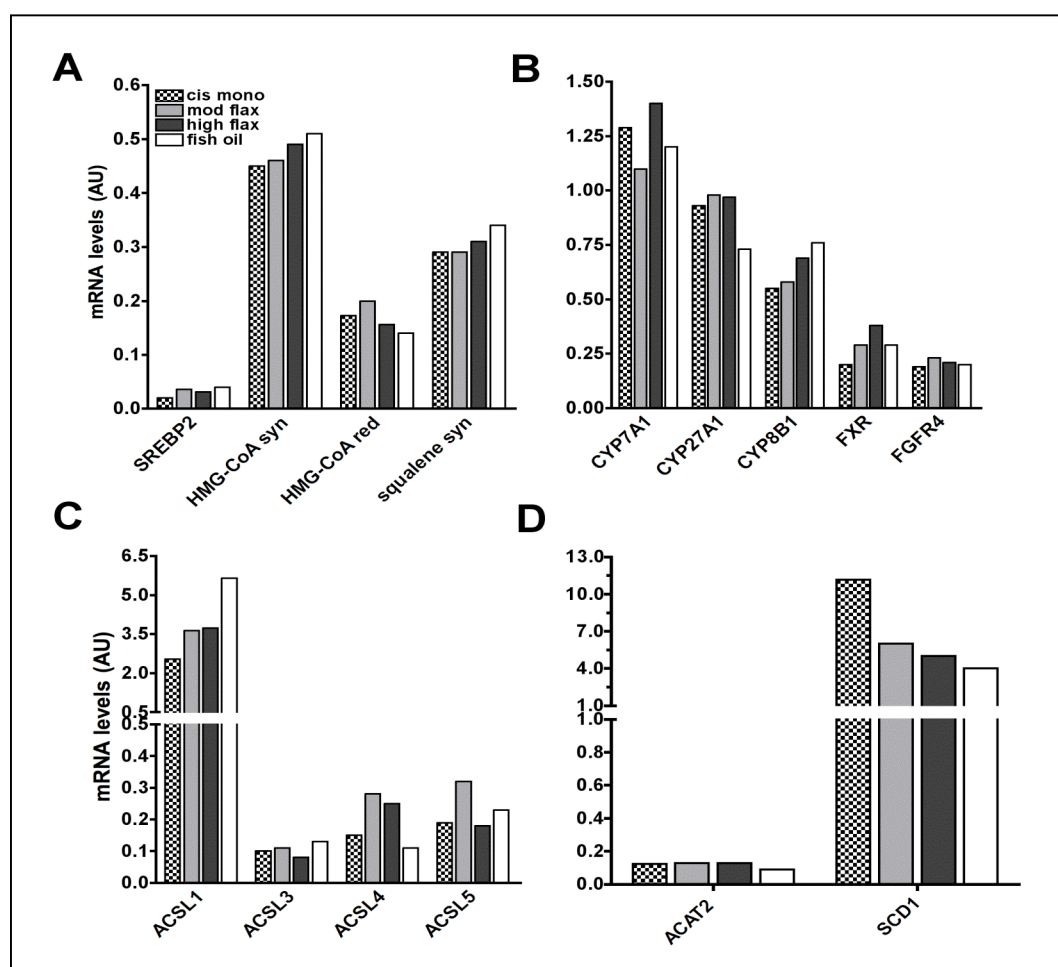


Figura 17. Livelli di mRNA di geni coinvolti nella sintesi del colesterolo (A), nel metabolismo degli acidi biliari (B), nella sintesi dell'acil-CoA (C) e nell'esterificazione del colesterolo (D). L'analisi e' stata condotta su pool (n=5 topi/dieta) al termine delle 16 settimane di dieta. La legenda indica il colore corrispondente a ciascuna dieta.

Come mostrato nella figura 17, nessuna differenza significativa e' emersa tra le diverse diete ad eccezione dell'enzima SCD1 (Figura 17D).

Parallelamente allo Studio III e' stato condotto un esperimento in cui i topi sono stati nutriti per 4 settimane con le medesime diete. I campioni plasmatici ed epatici sono stati sottoposti alle stesse analisi e hanno mostrato un pattern quasi identico a quello misurato dopo 16 settimane suggerendo che le alterazioni indotte dalla dieta hanno luogo rapidamente e possono contribuire alla conseguente risposta aortica (dati non mostrati). Quando il profilo genico dei fegati raccolti dai topi nutriti per sole 4 settimane e' stato analizzato, alcune differenze tra le diete sono state riscontrate. I topi nutriti con olio di pesce hanno mostrato livelli di SCD1, HMG-CoA-sintasi e reduttasi inferiori a quelli misurati nei topi nutriti con acido oleico o con ALA. Tali differenze non appaiono dopo 16 settimane suggerendo che la risposta epatica agli acidi grassi potrebbe essere mascherata (e annullata) da adattamenti fisiologici che si manifestano e persistono fino al termine del trattamento. Si potrebbe quindi ipotizzare che si instauri rapidamente una specie di steady-state che non consente di identificare il meccanismo responsabile del marcato effetto ipocolesterolemico (e quindi ateroprotettivo) dell'olio di pesce. In altre parole, studi la cui durata sia inferiore alle 2 settimane sono auspicabili al fine di "catturare" il momento in cui la risposta epatica si manifesta.

I dati dello Studio III dimostrano quindi che gli acidi grassi omega 3 di nuova sintesi (a partire dall'ALA) non sono ateroprotettivi tanto quanto gli acidi grassi omega 3 preformati (EPA e DHA dell'olio di pesce) nonostante un comparabile arricchimento dei lipidi plasmatici ed epatici in omega 3.

Discussione

Le malattie cardiovascolari rappresentano la prima causa di mortalità nel mondo e i fattori di rischio più correlati alla mortalità sono quelli cardiovascolari come ipercolesterolemia, ipertensione e fumo di sigaretta [145]. Tra le strategie farmacologiche messe in atto per ridurre il rischio cardiovascolare, quelle mirate alla modulazione del metabolismo del colesterolo (ad esempio statine, ezetimibe) si sono dimostrate le più efficienti. Nonostante i progressi della ricerca farmacologica e l'introduzione di nuovi approcci chirurgici abbiano contribuito alla riduzione della mortalità cardiovascolare, la morbilità continua a crescere [33].

Numerosi studi hanno dimostrato che cambiamenti nello stile di vita, in primis la dieta, possono contribuire positivamente alla prevenzione cardiovascolare [52,53,57,61,146]. La prima dimostrazione della relazione tra dieta e malattia cardiovascolare è stata fornita dallo studio ecologico Seven Countries Study [57], il quale ha dimostrato che il tipo di grassi più che la quantità degli stessi introdotta con la dieta sia determinante nell'insorgenza della malattia aterosclerotica e delle complicanze ad essa associate.

Studi epidemiologici e di intervento hanno dimostrato l'efficacia cardioprotettiva degli acidi grassi polinsaturi omega 3, EPA e DHA [99-114]. Le proprietà ateroprotettive degli n-3 PUFA includono la riduzione della trigliceridemia, prevenzione delle aritmie, riduzione della pressione arteriosa, ridotta aggregazione piastrinica e diminuita risposta infiammatoria [96,97,112]. L'EPA e il DHA sono contenuti nei pesci ad alto contenuto in grassi (salmone, aringhe, sardine, tonno) e nell'olio di pesce ma possono essere sintetizzati per via endogena a partire dall'acido alfa-linolenico (ALA). Nei paesi industrializzati il consumo di pesce è limitato e non assicura il raggiungimento delle dosi giornaliere di EPA e DHA raccomandate per la prevenzione cardiovascolare (250-500 mg) [106,120,121]. È necessario quindi individuare fonti alternative di EPA e DHA. Gli oli vegetali, quali olio di semi di lino (flaxseed oil) e olio di soia (soybean oil), essendo particolarmente ricchi di ALA, sono potenziali candidati.

Ad oggi le evidenze sperimentali raccolte a sostegno del potenziale cardioprotettivo dell'ALA non sono state convincenti [121-126]. Una documentazione chiara ed approfondita del potenziale ipocolesterolemico e ateroprotettivo dell'ALA sarebbe auspicabile in virtù dell'elevata assunzione giornaliera di questo acido grasso (1.7g) rispetto a quella più limitata (135 mg) dei suoi metaboliti, EPA e DHA.

Il presente lavoro di ricerca si è proposto di investigare il potenziale ateroprotettivo dell'acido alfa-linolenico in un modello murino di aterosclerosi dando particolare enfasi al fegato vista la sua importanza sia nel metabolismo del colesterolo e delle lipoproteine aterogene (VLDL e LDL) che nella biosintesi degli acidi grassi polinsaturi omega 3.

Nella prima parte della ricerca (Studi I e II) il potenziale ipocolesterolemico dell'ALA è stato valutato e confrontato con quello dell'acido oleico (acido grasso monoinsaturo). L'acido oleico è stato scelto come acido grasso di confronto in quanto numerosi studi hanno indicato che gli acidi grassi monoinsaturi esercitano effetti cardioprotettivi [78,80,81,82]. I dati ottenuti hanno indicato che l'ALA, rispetto all'acido oleico, limita l'accumulo di colesterolo estere (CE) nel plasma e nel fegato e ne favorisce una clearance più rapida dal fegato. L'acido oleico, in accordo con studi precedenti [72,83,85,86,87,88], promuove un elevato accumulo epatico di CE che si traduce in una maggiore disponibilità di CE il quale può essere incorporato nelle VLDL nascenti e conseguentemente ritenuto nel core delle LDL. Nel modello murino impiegato, l'analisi della composizione degli acidi grassi dei lipidi epatici ha rivelato che la conversione dell'ALA nei suoi metaboliti ha luogo rapidamente (dopo appena 2 settimane di dieta) ed è indipendente dai livelli di colesterolo nella dieta. L'ALA viene incorporato preferenzialmente nei lipidi neutrali, CE e TG, mentre i suoi metaboliti, principalmente EPA, si accumulano nei lipidi polari ossia i fosfolipidi. Questi dati sono in accordo con precedenti osservazioni secondo le quali l'assunzione di ALA incrementa i livelli di EPA ma non di DHA [125,126].

I risultati degli Studi I e II suggeriscono che l'ALA possa essere ateroprotettivo in virtù del suo effetto ipocolesterolemico e dell'arricchimento dei fosfolipidi epatici in EPA. Uno dei meccanismi tramite i quali l'ALA può esercitare

un'azione anti-aterosclerotica e' la capacita' di limitare l'accumulo epatico di CE e questo meccanismo e' supportato da studi precedenti in topi e primati che hanno dimostrato che l'accumulo epatico di colesterolo estere e' l'anticamera dell'aterosclerosi a livello sia aortico che coronarico [72,83,85,86,87,88,117].

L'analisi del profilo genico epatico ha indicato che i topi nutriti con ALA esprimono ridotti livelli di geni coinvolti sia nella sintesi endogena del colesterolo (HMG-CoA-reduttasi e sintasi) che dell'acil-CoA necessario per la sintesi del CE (SCD1, ACS). Questi effetti possono essere il risultato dell'arricchimento dei fosfolipidi di membrana in acidi grassi omega 3. Si puo' pensare che l'incorporazione preferenziale dell'EPA, sintetizzato dall'ALA, nei fosfolipidi alteri la fluidita' e il contenuto di colesterolo delle membrane. E' stato ipotizzato che incrementati livelli degli acidi grassi polinsaturi nei fosfolipidi di membrana potrebbero promuovere la traslocazione del colesterolo dalla membrana al citosol dove il colesterolo potrebbe limitare l'attivazione proteolitica dei fattori di trascrizione SREBP [147,148]. E' possibile ad esempio che l'EPA, sintetizzato dall'ALA e incorporato nei PL, promuova una ridistribuzione del colesterolo dalle membrane al reticolo endoplasmatico dove il colesterolo puo' limitare l'attivazione dei fattori SREBP e di conseguenza la trascrizione dei loro geni target (ACS, HMG-CoA-reduttasi e sintasi, SCD1).

L'arricchimento dei fosfolipidi epatici in EPA potrebbe mediare un altro meccanismo tramite il quale l'assunzione di ALA e' protettiva. I fosfolipidi epatici sono la fonte dei fosfolipidi plasmatici, in primis le lecitine; le lecitine sono utilizzate dall'enzima LCAT come donatori di gruppi acili per l'esterificazione del colesterolo plasmatico. L'esterificazione del colesterolo con lecitine ricche in EPA piuttosto che in acido oleico puo' essere benefica come supportato da diversi studi negli animali [72,85,88,149].

La mancata conversione dell'ALA in DHA potrebbe inficiare il potenziale ateroprotettivo dell'ALA anche se lo studio JELIS ha dimostrato che l'EPA da solo e' in grado di garantire una riduzione del 19% degli eventi cardiovascolari in pazienti ipercolesterolemici [107].

Nella seconda parte del lavoro abbiamo valutato se l'effetto ipocolesterolemico e l'arricchimento dei fosfolipidi con EPA, osservati nei topi nutriti con ALA, si traducevano in un'effettiva ateroprotezione.

Lo Studio III offre per la prima volta un confronto diretto tra l'EPA e il DHA sintetizzati endogenamente dall'ALA e quelli preformati forniti dall'olio di pesce in un modello murino di aterosclerosi. Quando i topi sono stati nutriti per 16 settimane con diete ricche rispettivamente in acido oleico (controllo negativo), olio di pesce (controllo positivo) e ALA, l'unica dieta ateroprotettiva e' risultata essere quella ricca in olio di pesce, ossia in acidi grassi omega 3 preformati, EPA e DHA. I dati ottenuti indicano che, nonostante una modesta riduzione dei livelli epatici di colesterolo e l'arricchimento in acidi grassi omega 3 (EPA e DHA) delle lipoproteine LDL e dei lipidi epatici, l'ALA non offre la stessa ateroprotezione dell'olio di pesce.

Il fallimento dell'ALA come agente ateroprotettivo potrebbe essere attribuito alla mancata riduzione delle concentrazioni di colesterolo-LDL. Studi precedenti hanno mostrato che le diete ricche in olio di pesce riducono le concentrazioni di LDL-c o incrementando l'uptake delle LDL attraverso un meccanismo LDLr-indipendente [70] o riducendo la secrezione di colesterolo nelle VLDL (precursori metabolici delle LDL circolanti) [150]. Vasandani e collaboratori hanno dimostrato che in topi privi del recettore LDLr una ridotta secrezione di VLDL in combinazione con ridotti livelli epatici di CE contribuisce per il 67% alla riduzione dei livelli plasmatici di LDL-c mediata dagli omega 3. I nostri dati, invece, indicano che i diminuiti livelli di VLDL-c e di CE epatico misurati nei topi nutriti con ALA non si traducono in concentrazioni di LDL-c inferiori a quelle misurate nei topi nutriti con acido oleico suggerendo che vi siano altri meccanismi, oltre a quello proposto da Vasandani.

Si potrebbe ipotizzare che la clearance delle LDL sia inefficiente nei topi nutriti con ALA rispetto a quelli nutriti con olio di pesce oppure che le VLDL dei topi nutriti con ALA siano piu' facilmente convertite in LDL piuttosto che essere rimosse dal torrente circolatorio. Esperimenti che consentano la caratterizzazione delle VLDL nascenti (liver perfusion experiment) e la valutazione delle costanti cinetiche della clearance delle LDL dal

compartimento plasmatico potranno verificare o confutare tali ipotesi. E' importante ricordare che l'ateroprotezione non richiede necessariamente la riduzione dei livelli di LDL-c; ad esempio gli acidi grassi omega 6 non abbassano il colesterolo-LDL [70] ma sono tanto ateroprotettivi quanto gli omega 3 [85,88].

La mancata ateroprotezione potrebbe essere attribuita ad una insufficiente formazione di EPA e DHA a partire dall'acido alfa-linolenico. Nello Studio III sono state usate due concentrazioni di ALA, corrispondenti a circa 2 e 5 g di ALA al giorno. E' bene tener presente che tali quantita' sono superiori a quelle assunte giornalmente (1.7g) ma sono state usate allo scopo di investigare se massimizzare la conversione dell'ALA a EPA e DHA si traduca in un beneficio addizionale contro lo sviluppo di aterosclerosi.

Al momento non vi sono studi volti alla definizione del potenziale ateroprotettivo dell'EPA e del DHA esaminati singolarmente, ad eccezione dello studio JELIS [107]; attribuire quindi l'assenza di ateroprotezione nei topi nutriti con ALA alla mancata conversione dell'ALA in DHA sembra prematuro.

Come osservato negli Studi I e II, l'ALA viene convertito in EPA e in misura minore in DHA. Gli acidi grassi prima di essere incorporati nei lipidi devono essere convertiti in acil-CoA mediante l'enzima ACSL (long chain acyl-CoA-synthetase). L'enzima ACSL ha 5 isoforme la cui caratterizzazione funzionale e' stata condotta nel ratto ad opera di Coleman e collaboratori [151]. Gli studi di Coleman indicano che nel ratto le diverse isoforme di ACSL determinano il destino metabolico degli acidi grassi, sia di nuova sintesi che quelli introdotti con la dieta. Ad esempio, l'isoforma ACSL5, quando sovraespressa in colture cellulari di epatomi di ratto, preferisce gli acidi grassi di natura esogena rispetto a quelli neo sintetizzati e li indirizza verso l'incorporazione in trigliceridi [152]. Se cio' fosse vero anche nel topo, si potrebbe ipotizzare che l'EPA e il DHA di nuova sintesi e quelli preformati dell'olio di pesce abbiano un diverso destino metabolico in base alla loro affinita' verso una specifica isoforma dell'ACSL; questa specificita' potrebbe contribuire al profilo ateroprotettivo o aterogenico associato a questi acidi grassi. Studi volti alla caratterizzazione delle isoforme murine di ACSL espresse a livello epatico

sono auspicabili al fine di comprendere meglio il metabolismo intracellulare degli acidi grassi.

La mancata risposta ateroprotettiva dell'ALA e' stata ottenuta in un modello animale che, pur reso "umanizzato" grazie all'esclusiva espressione dell'apolipoproteina B-100 e ad un profilo plasmatico caratterizzato da elevati livelli circolanti di LDL-c, potrebbe non riprodurre la risposta nell'uomo. Ad esempio nell'uomo l'olio di pesce incrementa, e non riduce, i livelli di LDL-c; questo effetto e' mediato da un aumento delle dimensioni delle LDL piu' che da un incrementato numero di molecole di apoB [153]. Il potenziale ateroprotettivo dell'olio di pesce, tuttavia, e' stato dimostrato in modo consistente e riproducibile sia nell'uomo che nell'animale. In questi mesi si attendono, infine, i risultati di un importante studio chiamato Alpha-Omega Trial che si propone di misurare come endpoint primario la mortalita' coronarica in 5000 soggetti coronaropatici che hanno ricevuto giornalmente per 40 mesi placebo o 2 g di ALA o 400 mg di EPA/DHA o ALA+EPA/DHA. Questo studio potra' confermare o confutare il mancato potenziale ateroprotettivo dell'ALA osservato nelle nostre condizioni sperimentali.

I dati presentati in questo lavoro di ricerca dimostrano che gli acidi grassi omega 3 non sono tutti ugualmente ateroprotettivi in un modello murino di aterosclerosi. L'EPA e il DHA sintetizzati dall'acido alfa-linolenico, pur arricchendo i lipidi plasmatici ed epatici con acidi grassi omega 3, non alterano il metabolismo epatico del colesterolo tanto efficacemente quanto l'EPA e il DHA provenienti dall'olio di pesce. In attesa di studi nell'uomo, i risultati della nostra ricerca suggeriscono cautela nel considerare l'ALA come fonte alternativa di EPA e DHA.

Il dono della terra, come Harris ha definito l'acido alfa-linolenico, non ha ancora dimostrato di essere tanto prezioso quanto i doni del mare (EPA e DHA).

ABBREVIAZIONI

ACAT	Acyl-CoA:cholesterol acyltransferase
ACC	Acyl-CoA carboxylase
ACS	Acyl-CoA synthetase
ALA	Alpha-linolenic acid
APOBEC	ApoB converting enzyme
ARF-1	ADP-ribosilation factor-1
CETP	Cholesteryl ester transfer protein
CPT-1	Carnitine-palmitoyl-transferase-1
CYP7A1	Cholesterol-7-alpha-hydroxylase
CYP8B1	Cholesterol-12-alpha-hydroxylase
CYP27	Cholesterol-27-alpha-hydroxylase
DHA	Docosahexaenoic acid
DPA	Docosapentaenoic acid
EL	Endothelial lipase
ER	Endoplasmic reticulum
ELOVL	Very long chain elongase
EPA	Eicosapentaenoic acid
FABP	Fatty acid binding protein
FADH2	Flavin adenine dinucleotide
FAS	Fatty acid synthase
FGFR4	Fibroblast growth factor receptor 4
FXR	Farnesoid X receptor
GLA	Gamma-linoleic acid
GK	Glucokinase
GLUT2	Glucose transporter 2
HDL	High density lipoprotein
HL	Hepatic lipase
HSL	Hormone-sensitive lipase

IDL	Intermediate density lipoprotein
LA	Linoleic acid
LCFA	Long chain fatty acid
LDL	Low density lipoprotein
LDLr	Low density lipoprotein receptor
LPL	Lipoprotein lipase
LRP	Low density lipoprotein receptor-related protein
LXR	Liver X receptor
MTP	Microsomal transfer protein
MUFA	Monounsaturated fatty acid
NEFA	Non esterified fatty acid
OxLDL	Oxidized LDL
PAF	Platelet activating factor
PLTP	Phospholipid transfer protein
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor
PUFA	Polyunsaturated fatty acid
SCD1	Stearoyl-CoA-desaturase 1
SDA	Stearidonic acid
SHP	Small heterodimer partner
SFA	Saturated fatty acid
SREBP	Sterol regulatory element binding protein
TPC	Total plasma cholesterol
VLDL	Very low density lipoprotein
VLDLr	Very low density lipoprotein receptor

Bibliografia

- [1] Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature*. 2000; **407**: 233-241.
- [2] Assmann G, Cullen P, Jossa F, Lewis B, Mancini M. Coronary heart disease: reducing the risk. *Arterioscl Thromb Vasc Biol*. 1999; **19**:1819-1824.
- [3] Gordon DJ, Rifkind BM. High density lipoprotein-the clinical implicatiojs of recent studies. *N Engl J Med*. 1989; **321**:1311-1316.
- [4] Steinberg D, Witztum JL in Molecular basis of Cardiovascular Disease (ed. Chien, KR) 458-475. (Saunders, Philadelphia, 1999)
- [5] Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W, Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis: a report from the committee on vascular lesions of the council on arteriosclerosis, American Heart Association. *Circ*. 1995; **92**:1355-1374.
- [6] Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*. 1993; **362**:801-809.
- [7] Binder CJ, Chang MK, Shaw PX, Miller YI, Hartvigsen K, Dewan A, Witztum JL. Innate and acquired immunity in atherogenesis. *Nat Med*. 2002; **8**: 1218-1226.
- [8] Glass CK, Witztum JL. Atherosclerosis the road ahead. *Cell*. 2001; **104**: 503-516.
- [9] Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 2002; **420**:868-874.
- [10] Boren J et al. Identification of the principal proteoglycan-binding site in LDL. A single-point mutatio in apo-B100 severely affects proteoglycan interaction without affecting LDL receptor binding. *J Clin Invest*. 1998; **101**: 2658-2664.
- [11] Olofsson SO, Boren J. Apolipoprotein B: a clinically important apolipoprotein which assembles atherogenic lipoproteins and promotes the development of atherosclerosis. *J Int Med*. 2005; **258**:395-410.
- [12] Williams KJ, Tabas I. The response-to-retention hypothesis in early atherogenesis. *Artheroscler Thromb Vasc Biol*. 1995; **15**:551-561.
- [13] Ignatowski A. Wirkung de tierischen Nahrung auf den Kaninchenorganismus. *Ber Milit-med Akad*. 1908; **16**: 154-176.
- [14] Anitschkow N, Chalator S. Ueber experimentalle Cholesterinsteatose. *Zbl Allg Path path Anat*. 1913; **24**: 1-9.
- [15] Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science*. 1986; **232**:34-47.

- [16] Ishibashi S, Herz J, Maeda N, Goldstein JL, Brown MS. The two-receptor model of lipoprotein clearance: tests of the hypothesis in 'knockout' mice lacking the low density lipoprotein receptor, apolipoprotein E, or both proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994; **91**:4431-4435.
- [17] Plump AS, Smith JD, Hayek T, Aaltosetälä K, Walsh A, Verstuyft JG, Rubin EM, Breslow JL. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell*. 1992; **71**: 343-353.
- [18] Castelli WP, Garrison RJ, Wilson PWF, Abbott RD, Kalousdian S, Kannel WB. Incidence of coronary heart disease and lipoprotein cholesterol levels: the Framingham Study. *JAMA*. 1986; **256**:2835-2838.
- [19] Segrest JP, Jones MK, De Loof H, Brouillette CG, Venkatachalapathi YV, Anantharamaiah GM. The amphipathic helix in the exchangeable apolipoproteins: a review of secondary structure and function. *J Lipid Res*. 1992; **33**:141-166.
- [20] Vance JE. Assembly and secretion of lipoproteins In: Vance DE, Vance JE, eds. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*. 4th ed. Amsterdam, the Netherlands: Elsevier. 2002; 505-526.
- [21] Kane JP, Hardman DA, Paulus HE. Heterogeneity of apolipoprotein B: isolation of a new species from human chylomicrons. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; **77**:2465-2469.
- [22] Anant S, Blanc V, Davidson NO. Molecular regulation, evolutionary, and functional adaptations associated with C to U editing of mammalian apolipoprotein B mRNA. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 2003; **75**:1-41.
- [23] Walldius G, Jungner I. The apoB/apoA-I ratio: a strong, new risk factor for cardiovascular disease and a target for lipid-lowering therapy-a review of the evidence. *J Intern Med*. 2006; **259**:493-519.
- [24] Goodman and Gilman. *The pharmacological basis of therapeutics*. 9th ed. Mac Graw Hill 1996: 861-864.
- [25] Berneis KK, Krauss RM. Metabolic origins and clinical significance of LDL heterogeneity. *J Lipid Res* 2002; **43**:1363-1379.
- [26] Asp L, Claesson C, Boren J, Olofsson S-O. ADP-ribosylation factor 1 and its activation of phospholipase D are important for the assembly of very low density lipoproteins. *J Biol Chem*. 2000; **275**:26285-26292.

- [27] Adiels M, Packard C, Caslake MJ et al. A new combined multicompartmental model for apolipoprotein B-100 and triglyceride metabolism in VLDL subfractions. *J Lipid Res.* 2005; **46**: 58-67.
- [28] Bensadoun A. Lipoprotein lipase. *Annu Rev Nutr.* 1991; **11**:217-237.
- [29] Takahashi S, Sakai J, Fujino T, Hattori H, Zenimaru Y, Suzuki J, Miyamori I, Yamamoto TT. The very-low density lipoprotein (VLDL) receptor: characterization and functions as a peripheral lipoprotein receptor. *J Atheroscler Thromb.* 2004; **11**: 200-208.
- [30] Myant NB. The biology of cholesterol and related steroids. William Heinemann Medical Books Ltd, London.1981.
- [31] Davis RA, Hui ToY. 2000 George Lyman Duff Memorial Lecture. Atherosclerosis is a liver disease of the heart. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001; **21**:887-898.
- [32] Postic C, Girad J. Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice. *J Clin Invest.* 2008; **118**:829-838.
- [33] Charlton-Menys V, Durrington PN. Human cholesterol metabolism and therapeutic molecules. *Exp Physiol.* 2007; **93.1**:27-42.
- [34] Dietschy JM, Turley SD. Control of cholesterol turnover in the mouse. *J Biol Chem.* 2002; **277**:3801-3804.
- [35] Stryer L. Biochemistry 4th edition. Chapter 27: 808-816
- [36] Brown MS, Goldstein JL. A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999. **96**:11041-11048.
- [37] Foretz M, Guichard C, Ferre' P, Foufelle F. Sterol regulatory element-binding protein 1-c is a major mediator of insulin action on the hepatic expression of glucokinase and lipogenesis-related genes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999; **96**:12737-12742.
- [38] Shimano H, Horton JD, Shimomura I, Hammer RE, Brown MS, Goldstein JL. Isoform 1c of sterol regulatory element binding protein is less active than isoform 1a in livers of transgenic mice and in cultured cells. *J Clin Invest.*1997; **99**:846-854
- [39] Durrington PN. Hyperlipidaemia. Diagnosis and Management. 2007 Hodder Arnold, London.

- [40] Davis RA, Miyake JH, Hui To-Y, Spann NJ. Regulation of cholesterol-7 α -hydroxylase: BAREly missing a SHP. *J Lipid Res.* 2002; **43**:533-543.
- [41] Goodwin B, Jones SA, Price RR, Watson MA, McKee DD, Moore LB, Galardi C, Wilson JG, Lewis MC, Roth ME, Maloney PR, Willson TM, Kliewer SA. A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1 and LRH-1 represses bile acid biosynthesis. *Mol Cell.* 2000; **6**:517-526.
- [42] Lu TT, Makishima M, Repa JJ, Schoonjans K, Kerr TA, Auwerx J, Mangelsdorf DJ. Molecular basis for feedback regulation of bile acid synthesis by nuclear receptors. *Mol Cell.* 2000; **6**:507-515.
- [43] Berkowitz CM, Shen CS, Bilir BM, Guibert E, Gumucio JJ. Different hepatocytes express the cholesterol 7 α -hydroxylase gene during its circadian modulation in vivo. *Hepatology.* 1995; **21**:1658-1667.
- [44] Cooper AD. The regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase in the isolated perfused rat liver. *J Clin Invest.* 1976; **57**:1461-1470.
- [45] Schwarz M, Russell DW, Dietschy JM, Turley SD. Alternate pathways of bile acid synthesis in the cholesterol 7 α -hydroxylase knockout mouse are not upregulated by either cholesterol or cholestyramine feeding. *J Lipid Res.* 2001; **42**:1594-1603.
- [46] Vlahcevic ZR, Stravitz RT, Heuman DM, Hylemon PB, Pandak WM. Quantitative estimations of the contribution of different bile acid pathways to total bile acid synthesis in the rat. *Gastroenterology.* 1997; **113**:1949-1957.
- [47] Duane WC, Javitt NB. 27-hydroxycholesterol: production rates in normal human subjects. *J Lipid Res.* 1999; **40**:1194-1199.
- [48] Glatz JF, Borchers F, Spener F, Van der Vusse GJ. Fatty acids in cell signaling: modulation by lipid binding proteins. *Prostaglandins Leukot. Essent Fatty Acids.* 1995; **52**:121-127.
- [49] McArthur MJ, Atshaves BP, Frolov A, Foxworth WD, Kier AB, Schroeder F. Cellular uptake and intracellular trafficking of long chain fatty acids. *J Lipid Res.* 1999; **40**:1371-1383.
- [50] Abu-Elheiga L, Brinkley WR, Zhong L, Chirala SS, Woldegiorgis G, Wakil SJ. The subcellular localization of acetyl-CoA carboxylase 2. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000; **97**:1444-1449.

- [51] Nakamura MT, Cheon Y, Li Y, Nara TY. Mechanisms of regulation of gene expression by fatty acids. *Lipids*. 2004; **39**:1077-1083.
- [52] Renaud S, Lanzmann-Petithory D. Coronary heart disease: dietary links and pathogenesis. *Public Health Nutr*. 2001; **4**:459-474.
- [53] Hu FB, Willett WC. Optimal diets for prevention of coronary heart disease. *JAMA*. 2002; **288**:2569-2578.
- [54] Kinsell LW, Partridge J, Boling L, Margen S, Michaels G. Dietary modification of serum cholesterol and phospholipids levels. *J Clin Endocrinol Metab*. 1952; **12**:909-913.
- [55] Moore RB, Anderson JT, Taylor HL, Keys A, Frantz ID Jr. Effect of dietary fat on the fecal excretion of cholesterol and its degradation products in man. *J Clin Invest*. 1968; **47**:1517-1534.
- [56] Connor WE, Witiak DT, Stone DB, Armstrong ML. Cholesterol balance and fecal neutral steroid and bile acid excretion in normal men fed dietary fats of different fatty acid composition. *J Clin Invest*. 1969; **48**:1363-1375.
- [57] Keys A. Coronary heart disease in seven countries. *Circ*. 1970; **41(Suppl.1)**:1-198.
- [58] Keys A, Anderson JT, Grande F. Effect on serum cholesterol in many of mono-ene fatty acids (oleic acid) in the diet. *Metabolism*. 1965; **14**:747-787.
- [59] Hegsted DM, McGandy RB, Myers ML, Stare FJ. Quantitative effects of dietary fat on serum cholesterol in man. *Am J Clin Nutr*. 1965; **17**:281-295.
- [60] Shekelle RB, Shryock AM, Paul O, Lepper M, Stamler J, Liu S, Raynor WJ Jr. Diet, serum cholesterol, and death from coronary heart disease. The Western Electric Study. *N Engl J Med*. 1981; **304**:65-70.
- [61] Woodside JV, Kromhout D. Fatty acids and CHD. *Proc Nutr Soc*. 2005; **64**:554-564.
- [62] Nicolosi RJ, Stucchi AF, Kowala MC, Hennessy LK, Hegsted DM, Schaefer EJ. Effect of dietary fat saturation and cholesterol on LDL composition and metabolism. In vivo studies of receptor and nonreceptor-mediated catabolism of LDL in cebus monkeys. *Arteriosclerosis*. 1990; **10**:119-128.
- [63] Mensink RP, Zock PL, Kester AD, Katan MB. Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: a meta-analysis of 60 controlled trials. *Am J Clin Nutr*. 2003; **77**:1146-1155.

- [64] Lichtenstein AH, Ausman LM, Carrasco W, Jenner JL, Ordvas JM, Schaefer EJ. Hydrogenation impairs the hypolipidemic effect of corn oil in humans. Hydrogenation, trans fatty acids, and plasma lipids. *Arteriosclerosis and Thrombosis*. 1993; **13**:154-161.
- [65] Mensink RP. Metabolic and health effects of isomeric fatty acids. *Curr Opin Lipidology*. 2005; 16:27-30.
- [66] Katan MB, Zock PL, Mensink RP. Trans fatty acids and their effects on lipoproteins in humans. *Ann Rev Nutr*. 1995; 15:473-493.
- [67] Nestel P, Noakes M, Belling B, McArthur R, Clifton P, Janus E, Abbey M. Plasma lipoprotein lipid and Lp[a] changes with substitution of elaidic acid for oleic acid in the diet. *J Lipid Res*. 1992; **33**:1029-1036.
- [68] Grundy SM, Bilheimer D, Blackburn H, Brown WV, Kwiterovich PO Jr, Mattson F, Schonfeld G, Weidman WH. Rationale of the diet-heart statement of the American Heart Association. Report of Nutrition Committee. *Circ*. 1982; **65**:839A-854A.
- [69] Sacks F. Dietary fats and coronary heart disease. Overview. *J Card Risk*. 1994; **1**:3-8.
- [70] Vasandani C, Kafrouni AI, Caronna A, Bashmakov Y, Gotthardt M, Horton JD, Spady DK. Upregulation of hepatic LDL transport by n-3 fatty acids in LDL receptor knockout mice. *J Lipid Res*. 2002; **43**:772-784.
- [71] Spady DK, Bilheimer DW, Dietschy JM. Rates of receptor-dependent and independent low density lipoprotein uptake in the hamster. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1983; **80**:3499-3503.
- [72] Rudel LL, Parks JS, Sawyer JK. Compared with dietary monounsaturated and saturated fat, polyunsaturated fat protects African green monkeys from coronary artery atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995; **15**:2101-2110.
- [73] Rudel LL, Johnson FL, Sawyer JK, Wilson MD, Parks JS. Dietary polyunsaturated fat modifies low-density lipoproteins and reduces atherosclerosis of nonhuman primates with high and low diet responsiveness. *Am J Clin J Nutr*. 1995; **62**:463S-470S.
- [74] Shepherd JC, Packard CJ, Patsch JR, Gotto AM, Taunton OD. Effects of dietary polyunsaturated and saturated fat on the properties of high density

lipoproteins and the metabolism of apolipoproteins A-I. *J Clin Invest.* 1978; **61**:1582-1592.

[75] Parks JS, Rudel LL. Different kinetic fates of apolipoproteins A-I and A-II from lymph chylomicra of nonhuman primates. Effect of saturated versus polyunsaturated dietary fat. *J Lipid Res.* 1982; **23**:410-421.

[76] Mathur SN, Watt KR, Field FJ. Regulation of intestinal NPC1L1 expression by dietary fish oil and docosahexaenoic acid. *J Lipid Res.* 2007; **48**:395-404.

[77] Alvaro A, Rosales R, Masana L, Vallve' J-C. Polyunsaturated fatty acids down-regulate in vitro expression of the key intestinal cholesterol absorption protein NPC1L1: no effect of monounsaturated nor saturated fatty acids. *J Nutr Biochem* in press.

[78] Mattson FH, Grundy SM. Comparison of effects of dietary saturated, monounsaturated, and polyunsaturated fatty acids on plasma lipids and lipoproteins in man. *J Lipid Res.* 1985; **26**:194-202.

[79] Gardner CD, Kraemer HC. Monounsaturated versus polyunsaturated dietary fat and serum lipids. A meta-analysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995; **15**:1917-1927.

[80] Mensink RP, Katan MB. Effect of monounsaturated fatty acid versus complex carbohydrates on high density lipoproteins in healthy men and women. *Lancet.* 1987;**1**:122-125.

[81] Grundy SM. Comparison of monounsaturated fatty acids and carbohydrates for lowering plasma cholesterol. *N Engl J Med.*1986;**314**:745-748.

[82] Kris-Etherton PM. AHA Science Advisory. Monounsaturated fatty acids and risk of cardiovascular disease. American Heart Association Nutrition Committee. *Circ.*1999;**100**:1253-1258.

[83] Brown JM, Shelness GS, Rudel LL. Monounsaturated fatty acids and atherosclerosis: opposing views from epidemiology and experimental animal models. *Curr Atheroscler Rep.* 2007; **9**:494-500.

[84] Merkel M, Velez-Carrasco W, Hudgins LC, Breslow JA. Compared with saturated fatty acids, dietary monounsaturated fatty acids and carbohydrates increase atherosclerosis and VLDL cholesterol levels in LDL receptor-deficient, but not apolipoprotein E-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; **98**:13294-13299.

- [85] Rudel LL, Kelley KL, Sawyer JK, Shah R, Wilson MD. Dietary monounsaturated fatty acids promote aortic atherosclerosis in LDL receptor-null, human apoB100-overexpressing transgenic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998; **18**:1818-1827.
- [86] Rudel LL, Haines J, Sawyer JK, Shah R, Wilson MD, Carr TP. Hepatic origin of cholesteryl oleate in coronary artery atherosclerosis in African Green monkeys. Enrichment by dietary monounsaturated fat. *J Clin Invest.* 1997; **100**:74-83.
- [87] Bell AT III, Wilson MD, Kelley KL, Sawyer JK, Rudel LL. Monounsaturated fatty acyl-coenzyme A is predictive of atherosclerosis in human apoB100 transgenic LDLr^{-/-} mice. *J Lipid Res.* 2007; **48**:1122-1131.
- [88] Bell AT III, Kelley KL, Wilson MD, Sawyer JK, Rudel LL. Dietary fat-induced alterations in atherosclerosis are abolished by ACAT2-deficiency in apoB100-only LDLr^{-/-} mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007; **12**:1396-1402.
- [89] Manning JM, Gebre AK, Edwards IJ, Wagner WD, Rudel LL, Parks JS. Dietary polyunsaturated fat decreases interaction between low density lipoproteins and arterial proteoglycans. *Lipids.* 1994; **29**:635-641.
- [90] Reaven P, Parthasarathy S, Grasse BJ, Miller E, Steinberg D, Witztum JL. Effects of oleate-rich and linoleate-rich diets on the susceptibility of low density lipoproteins to oxidative modification in mildly hypercholesterolemic subjects. *J Clin Invest.* 1993; **91**:668-676.
- [91] Ma J, Folsom AR, Lewis L, Eckfeldt JH. Relation of plasma phospholipids and cholesterol ester fatty acid composition to carotid artery intima-media thickness: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Am J Clin Nutr.* 1997; **65**:551-559.
- [92] Warensjo E, Sundstrom J, Vessby B, Cederholm T, Riserus U. Markers of dietary fat quality and fatty acid desaturation as predictors of total and cardiovascular mortality: a population-based prospective study. *Am J Clin Nutr.* 2008; **88**:203-209.
- [93] Sprecher A. LDL cholesteryl oleate: a biomarker for atherosclerosis?. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007; **27**:1228-1230.
- [94] Lopez-Miranda J, Mata P. Protective effect of dietary monounsaturated fat on arteriosclerosis: beyond cholesterol. *Atherosclerosis.* 2002; **163**:385-398.
- [95] Mertens A, Holvoet P. Oxidized LDL and HDL: antagonists in atherothrombosis. *FASEB J.* 2001; **15**:2073-2084.

- [96] Kris-Etherton PM, Hecker KD, Binkoski AE. Polyunsaturated fatty acids and cardiovascular health. *Nutr Rev.* 2004; **62**:414-426.
- [97] Demaison L, Moreau D. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids and coronary heart disease-related mortality: a possible mechanism of action. *Cell Mol Life Sci.* 2002; **59**:463-477.
- [98] Parks JS, Kaduck-Sawyer J, Bullock BC, Rudel LL. Effect of dietary fish oil on coronary artery and aortic atherosclerosis in African Green monkeys. *Arteriosclerosis.* 1990; **7**:1102-1112.
- [99] Dyerberg J, Bang HO, Stoffersen E, Moncada S, Vane JR. Eicosapentaenoic acid and prevention of thrombosis and atherosclerosis?. *Lancet.* 1978; **2**:117-119.
- [100] Bjerregaard P, Dyerberg J. Mortality from ischaemic heart disease and cerebrovascular disease in Greenland. *Int J Epidemiol.* 1988; **17**:514-519
- [101] Daviglus ML, Stamler J, Oencia AJ, Dyer AR, Liu K, Greenland P, Walsh MK, Morris D, Shekelle RB. Fish consumption and 30-year risk of fatal myocardial infarction. *N Eng J Med.* 1997; **336**:1046-1053.
- [102] Hu FB, Bronner L, Willett WC, Stampfer MJ, Rexrode KM, Albert CM, Hunter D, Manson JE. Fish and omega 3 fatty acid intake and risk of coronary heart disease in women. *JAMA.* 2002; **287**:1815-1821.
- [103] Burr ML, Fehily AM, Gilbert JF, Rogers S, Holliday RM, Sweetnam PM, Elwood PC, Deadman NM. Effects of changes in fat, fish, and fibre intakes on death and myocardial infarction: diet and reinfarction trial (DART). *Lancet* 1989; **2**:757-761.
- [104] Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto Miocardico Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the GISSI-Prevenzione Trial. Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto miocardico. *Lancet.* 1999; **354**:447-455.
- [105] Singh RB, Niaz MA, Sharma JP, Kumar R, Rastogi V, Moshiri M. Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of fish oil and mustard oil in patients with suspected acute myocardial infarction: the Indian experiment of infarct survival-4. *Cardiovasc Drugs Ther.* 1997; **11**:485-491.
- [106] Lichtenstein AH, Appel LJ, Brands M, Carnethon M, Daniels S, Franch HA,

- Franklin B, Kris-Etherton PM, Harris WS, Howard B, Karanja N, Lefevre M, Rudel LL, Sacks F, Van Horn L, Winston M, Wylie-Rosett J. Diet and Lifestyle recommendations revision 2006. A scientific statement from the American Heart Association Nutrition Committee. *Circ.* 2006; **114**:82-96.
- [107] Yokoyama M, Origasa H, Matsuzaki M, Matsuzawa Y, Saito Y, Ishikawa Y, Oikawa S, Sasaki J, Hishida H, Itakura H, Kita T, Kitabatake A, Nakaya N, Sakata T, Shimada K, Shirato K. Japan EPA lipid intervention study (JELIS) Investigators. Effects of eicosapentaenoic acid on major coronary events in hypercholesterolemic patients (JELIS): a randomized open-label blinded endpoint analysis. *Lancet.* 2007; **369**:1090-1098.
- [108] Sprecher H. Metabolism of highly unsaturated -3 and n-6 fatty acids. *Biochim Biophys Acta.* 2000; **1486**:219-231.
- [109] Albert CM, Hennekens CH, O'Donnell CJ, Ajani UA, Carey VJ, Willett WC, Ruskin JN, Manson JE. Fish consumption and risk of sudden cardiac death. *JAMA.* 1998; **107**:23-28.
- [110] Howe PR. Dietary fats and hypertension. Focus on fish oil. *Ann NY Acad Sci.* 1997; **827**:339-352.
- [111] Calder PC. N-3 polyunsaturated fatty acids and inflammation: from molecular biology to the clinic. *Lipids.* 2003; **90**:405-412.
- [112] Calder PC. N-3 fatty acids and cardiovascular disease: evidence explained and mechanisms explored. *Clin Sci (Lond).* 2004; **107**:1-11.
- [113] Pepe S, McLennan PL. Dietary fish oil confers direct antiarrhythmic properties on the myocardium of rats. *J Nutr.* 1996; **126**:34-42.
- [114] Macchia A, Levantesi G, Franzosi MG, Geraci E, Maggioni AP, Marfisi R, Nicolosi GL, Schweiger C, Tavazzi L, Tognoni G, Valagussa F, Marchioli R. GISSI-Prevenzione Investigators. Left ventricular systolic dysfunction, total mortality, and sudden death in patients with myocardial infarction treated with n-3 polyunsaturated fatty acids. *Eur J Heart Fail.* 2005; **7**:904-909.
- [115] Tabor DE, Kim JB, Spiegelman BM, Edwards PA. Identification of conserved cis-elements and transcription factors required for sterol-regulated transcription of stearoyl-CoA-desaturase 1 and 2. *J Biol Chem.* 1999; **274**:20603-20610
- [116] Xu J, Nakamura MT, Cho HP, Clarke SD. Sterol-regulatory element binding protein-1 expression is suppressed by dietary polyunsaturated fatty

acids: a mechanism for the coordinate suppression of lipogenic genes by polyunsaturated fats. *J Biol Chem*. 1999; **274**:23577-23583.

[117] Degirolamo C, Shelness GS, Rudel LL. LDL cholesteryl oleate as a predictor for atherosclerosis: evidence from human and animal studies on dietary fat. *J Lipid Res*. 2009; Suppl **50**:S434-S439.

[118] Nishimoto T, Pellizzon MA, Aihara M, Stylianou IM, Billheimer JT, Rothblat G, Rader DJ. Fish oil promotes macrophage reverse cholesterol transport in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009; **29**:1502-1508.

[119] Le Jossic-Corcos C, Gonthier C, Zaghini I, Logette E, Shechter I, Bournot P. Hepatic farnesyl diphosphate synthase expression is suppressed by polyunsaturated fatty acids. *J Biochem*. 2005; **385**:787-794.

[120] Harris WS, Mozaffarian D, Lefevre M, Toner CD, Colombo J, Cunnane SC, Holden JM, Klurfeld DM, Morris MC, Whelan J. Towards establishing dietary reference intakes for eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid. *J Nutr*. 2009; **139**:804S-819S.

[121] Williams CM, Burdge G. Long chain n-3 PUFA: plant vs. marine sources. *Proc Nutr Soc*. 2006; **65**:42-50.

[122] de Lorgeril M, Salen P, Martin JL, Monjaud I, Delaye J, Mamelle N. Mediterranean diet, traditional risk factors, and the rate of cardiovascular complications after myocardial infarction: final report of the Lyon Heart Study. *Circ*. 1999; **99**:779-785.

[123] Baylin A, Kabagambe EK, Ascherio A, Spiegelman D, Campos H. Adipose tissue alpha-linolenic acid and nonfatal acute myocardial infarction in Costa Rica. *Circ*. 2003; **107**:1586-1591.

[124] Campos H, Baylin A, Willett WC. Alpha-linolenic acid and risk of nonfatal acute myocardial infarction *Circ*. 2008; **118**:339-345.

[125] Hu FB, Stampfer MJ, Manson JE, Rimm EB, Wolk A, Colditz GA, Hennekens CH, Willett WC. Dietary intake of alpha-linolenic acid and risk of fatal ischemic heart disease among women. *Am J Clin Nutr*. 1999; **69**:890-897.

[126] Albert CM, Oh K, Whang W, Manson JE, Chae CU, Stampfer MJ, Willett WC, Hu FB. Dietary alpha-linolenic acid intake and risk of sudden cardiac death and coronary heart disease. *Circ*. 2005; **112**:3232-3238.

- [127] Prasad K. Reduction of serum cholesterol and hypercholesterolemic atherosclerosis in rabbits by secoisolariciresinol diglucoside isolated from flaxseed. *Circ.* 1999; **99**:1355-1362.
- [128] Ratnayake WMN. Chemical and nutritional studies of flaxseed in rats. *J Nutr Biochem.* 1992; **3**:323-326.
- [129] Pellizzon MA, Billheimer JT, Bloedon LT, Szapary PO, Rader DJ. Flaxseed reduces plasma cholesterol levels in hypercholesterolemic mouse models. *J Am Coll Nutr.* 2007; **26**:66-75.
- [130] Duspasquier CMC, Dibrov E, Kneesh AL, Cheung PK, Lee KG, Alexander HK, Yeganeh BK, Moghadasian MH, Pierce GN. Dietary flaxseed inhibits atherosclerosis in the LDL receptor-deficient mouse in part through antiproliferative and anti-inflammatory actions. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007; **293**:H2394-H2402.
- [131] Prasad K. Flaxseed and cardiovascular health. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2009; **54**: 369-377.
- [132] Veniant MM, Zlot CH, Walzem RL, Pierotti V, Driscoll R, Dichek D, Herz J, Young SG. Lipoprotein clearance mechanisms in LDL receptor-deficient “apoB48-only” and “apoB100-only” mice. *J Clin Invest.* 1998;**102**: 1559-1565.
- [133] Farese RV Jr, Veniant MM, Cham CM, Flynn LM, Pierotti V, Loring JF, Traber M, Ruland S, Stokowski RS, Huszar D, Young SG. Phenotypic analysis of mice expressing exclusively apolipoprotein B48 or apo-lipoprotein B100. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996; **93**:6393-6398.
- [134] Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol.* 1959; **37**:911-917.
- [135] Carr TP, Andersen CJ, Rudel LL. Enzymatic determination of triglyceride, free cholesterol and total cholesterol in tissue lipid extracts. *Clin Biochem.* 1993; **26**:39-42.
- [136] Fiske CA, Subbarow Y. The colorimetric determination of phosphorous. *J Biol Chem.* 1925; **66**:375-400.
- [137] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; **193**:265-275.
- [138] Willner E, Tow B, Buhman K, Wilson MD, Sanan D, Rudel LL, Farese RV Jr. Deficiency of acyl-CoA:cholesterol acyltransferase 2 prevents atherosclerosis

in apolipoprotein E-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; **100**:1262-1267.

[139] Temel RE, Lee RG, Kelley KL, Davis MA, Shah R, Sawyer JK, Wilson MD, Rudel LL. Intestinal cholesterol absorption is substantially reduced in mice deficient in both ABCA1 and ACAT2. *J Lipid Res*. 2005; **46**:2423-2431.

[140] Seo T, Oelkers PM, Giattina MR, Worgall TS, Sturley SL, Deckelbaum RJ. Differential modulation of ACAT1 and ACAT2 transcription and activity by long chain free fatty acids in cultured cells. *Biochemistry*. 2001; **40**:4756-4762.

[141] Lee RG, Willingham MC, Davis MA, Skinner KA, Rudel LL. Differential expression of ACAT1 and ACAT2 among cells within liver, intestine, kidney and adrenals of nonhuman primates. *J Lipid Res*. 2000; **41**:1991-2001.

[142] Carr TP, Parks JS, Rudel LL. Hepatic ACAT activity in African Green monkeys is highly correlated to plasma LDL cholesteryl ester enrichment and coronary artery atherosclerosis. *Arterioscler Thromb*. 1992; **12**:1274-1283.

[143] Lee RG, Kelley KL, Sawyer JK, Farese RV Jr, Parks JS, Rudel LL. Plasma cholesteryl esters provided by lecithin:cholesterol acyltransferase and acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase 2 have opposite atherosclerotic potential. *Circ.Res*. 2004; **95**:998-1004.

[144] Parini P, Davis M, Lada AT, Erickson SK, Wright TL, Gustafsson U, Sahlin S, Einarsson C, Angelin B, Tomoda H, Omura S, Willingham MC, Rudel LL. ACAT2 is localized to hepatocytes and is the major cholesterol-esterifying enzyme in human liver. *Circ*. 2004; **110**:2017-2023.

[145] Organization WH. The atlas of heart disease and stroke. Disponibile sul sito internet http://www.who.int/cardiovascular_diseases/resources/atlas/en.

[146] Danaei G, Ding EL, Mozaffarian D, Taylor B, Rehm J, Murray CJL, Ezzati M. The preventable causes of death in the United States: comparative risk assessment of dietary, lifestyle, and metabolic risk factors. *PLoS Med*. 2009; **6**: 1-23.

[147] Jump DB. The biochemistry of n-3 polyunsaturated fatty acids. *J Biol Chem*. 2002; **277**:8755-8758.

[148] Bordoni A, Di Nunzio M, Danesi F, Biagi PL. Polyunsaturated fatty acids: from diet to binding to PPARs and other nuclear receptors. *Genes & Nutr*. 2006; **1**:95-106.

- [149] Parks JS, Rudel LL. Effect of fish oil on atherosclerosis and lipoprotein metabolism. *Atherosclerosis*. 1990; **84**:83-94.
- [150] Parks JS, Wilson MD, Johnson FL, Rudel LL. Fish oil decreases hepatic cholesteryl ester secretion but not apoB secretion in African Green monkeys. *J Lipid Res*. 1989; **30**:1535-1544.
- [151] Coleman RA, Lewin TM, Van Horn CG, Gonzalez-Baro' M. Do long chain acyl-CoA-synthetases regulate fatty acid entry into synthetic versus degradative pathways? *J Nutr*. 2002; **132**:2123-2126.
- [152] Mashek DG, McKenzie MA, Van Horn CG, Coleman RA. Rat long chain acyl-CoA synthetase 5 increases fatty acid uptake and partitioning to cellular triacylglycerol in McArdle-RH7777 cells. *J Biol Chem*. 2006; **281**:945-950.
- [153] Harris WS. N-3 fatty acids and serum lipoproteins: human studies. *Am J Clin Nutr*. 1997; **65**:1645S-1654S.