



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

**DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE**

**CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN CHIMICA**

**TESI DI LAUREA MAGISTRALE IN CHIMICA**

**SVILUPPO DI UN METODO PER LA  
QUANTIFICAZIONE DEI LIVELLI PLASMATICI DI  
ACIDI GRASSI A MEDIA CATENA (C6-C12) E  
VALUTAZIONE DEL LORO VALORE  
DIAGNOSTICO IN PATOLOGIE COLORETTALI  
MEDIANTE *FAST GC-MS***

**Relatore: Dott. Valerio Di Marco**

**Correlatore: Dott.ssa Sara Crotti**

**Controrelatore: Dott. Cristiano Zonta**

**LAUREANDA: ELISA AGNOLETTO**

**ANNO ACCADEMICO 2013/2014**



*Ai miei genitori e ai miei amici che, assieme,  
sono per me un'unica grande famiglia.*



# INDICE

<b>1. INTRODUZIONE</b> .....	1
<b>1.1. L'intestino</b> .....	1
1.1.1. L'intestino crasso .....	1
<b>1.2. Patologie del sistema coloretale</b> .....	2
1.2.1. Metodiche di indagine per le patologie coloretali .....	3
<b>1.3. Colite</b> .....	4
<b>1.4. Malattie infiammatorie croniche intestinali</b> .....	5
1.4.1. Il morbo di Crohn .....	5
1.4.2. La rettocolite ulcerosa .....	6
<b>1.5. Poliposi</b> .....	7
1.5.1. I polipi .....	7
1.5.2. La poliposi adenomatosa familiare .....	8
<b>1.6. Il cancro coloretale</b> .....	9
1.6.1. Classificazione .....	10
1.6.2. Diffusione .....	10
1.6.3. Fattori di rischio .....	11
1.6.4. Prevenzione .....	11
1.6.5. Diagnosi e biomarcatori del cancro coloretale .....	12
1.6.6. Stadiazione .....	13
1.6.7. Trattamento .....	13
<b>2. LIPIDOMICA</b> .....	15
<b>2.1. Le scienze omiche</b> .....	15
2.1.1. La metabolomica .....	15
2.1.2. La lipidomica .....	16
<b>2.2. I lipidi</b> .....	17
2.2.1. Classificazione dei lipidi .....	17
<b>2.3. Gli acidi grassi</b> .....	19
2.3.1. Gli acidi grassi saturi a media catena .....	19
2.3.2. Assorbimento degli MCFA .....	20
2.3.3. Metabolismo degli MCFA .....	21

2.3.3.1. $\beta$ -ossidazione degli MCFA .....	21
2.3.3.2. Biosintesi degli MCFA.....	21
<b>2.4. Lipidomica nel cancro coloretale.....</b>	<b>23</b>
<b>2.5. Metodologie analitiche per la lipidomica .....</b>	<b>24</b>
2.5.1. Estrazione dei lipidi .....	24
2.5.2. Analisi dei lipidi.....	25
2.5.2.1. Tecniche di infusione diretta in spettrometria di massa .....	25
2.5.2.2. Tecniche di cromatografia .....	25
2.5.2.3. Tecniche spettroscopiche.....	25
<b>3. TECNICHE ANALITICHE PER LA LIPIDOMICA .....</b>	<b>27</b>
<b>3.1. Introduzione.....</b>	<b>27</b>
<b>3.2. La gascromatografia .....</b>	<b>27</b>
3.2.1. La gascromatografia veloce ( <i>fast GC</i> ) .....	28
3.2.2. Utilizzo della gascromatografia in lipidomica .....	29
<b>3.3. La cromatografia liquida .....</b>	<b>29</b>
<b>3.4. La spettrometria di massa .....</b>	<b>30</b>
3.4.1. Sorgenti ioniche .....	30
3.4.1.1. EI e CI .....	31
3.4.1.2. Sorgenti API (Atmospheric Pressure Ionization) .....	31
3.4.1.3. Nuove metodologie .....	32
3.4.2. Gli analizzatori di massa .....	33
<b>3.5. Accoppiamento cromatografia - spettrometria di massa .....</b>	<b>35</b>
3.5.1. Accoppiamento <i>fast GC</i> -TOF .....	36
<b>4. SCOPO DELLA TESI.....</b>	<b>39</b>
<b>5. PARTE SPERIMENTALE .....</b>	<b>41</b>
<b>5.1. Composti utilizzati.....</b>	<b>41</b>
<b>5.2. Strumentazione e vetreria .....</b>	<b>41</b>
<b>5.3. Parametri strumentali .....</b>	<b>42</b>
5.3.1. Parametri gascromatografici .....	42
5.3.2. Parametri dello spettrometro di massa .....	43
<b>5.4. Derivatizzazione.....</b>	<b>43</b>
<b>5.5. Rette di calibrazione .....</b>	<b>43</b>

5.5.1. Preparazione delle soluzioni madre .....	44
5.5.2. Diluizioni della soluzione di standard interno .....	44
5.5.3. Preparazione delle miscele standard .....	44
5.5.4. Preparazione dei punti della retta.....	44
<b>5.6. Campioni biologici .....</b>	<b>45</b>
5.6.1. Ottenimento e selezione dei campioni .....	45
5.6.2. Trattamento dei campioni per l'analisi.....	47
<b>5.7. Processamento dei dati.....</b>	<b>48</b>
<b>6. RISULTATI E DISCUSSIONE .....</b>	<b>49</b>
<b>6.1. Aspetti qualitativi .....</b>	<b>49</b>
6.1.1. Cromatogrammi degli standard analitici.....	49
6.1.2. Cromatogrammi dei campioni .....	50
6.1.3. Spettri di massa.....	51
<b>6.2. Sviluppo della metodica quantitativa .....</b>	<b>53</b>
6.2.1. Valutazione della linearità .....	53
6.2.2. Valutazione dei limiti di rivelabilità e di quantificazione.....	54
6.2.3. Valutazione dell'accuratezza.....	55
6.2.4. Valutazione della precisione .....	56
6.2.5. Valutazione del recupero .....	57
6.2.6. Valutazione globale del metodo analitico.....	57
<b>6.3. Risultati quantitativi.....</b>	<b>58</b>
6.3.1. Quantificazione degli acidi grassi a media catena nei campioni .....	58
6.3.2. Significatività dei risultati.....	59
6.3.2.1. Test statistici .....	59
6.3.2.2. Confronto tra i quattro macrogruppi .....	60
6.3.2.3. Confronti tra i diversi stadi di cancro coloretale .....	61
6.3.3. Discussione dei risultati ottenuti.....	62
<b>7. CONCLUSIONI E PROSPETTIVE.....</b>	<b>65</b>
<b>APPENDICE A .....</b>	<b>67</b>
<b>APPENDICE B .....</b>	<b>69</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>73</b>





# 1. INTRODUZIONE

## 1.1. L'intestino

L'intestino è un tubo lungo mediamente 7 m, che si estende dal piloro, valvola muscolare che lo connette alla parte inferiore dello stomaco, fino all'orifizio anale. Il principale compito dell'intestino è quello di assorbire le sostanze nutritive provenienti dall'alimentazione ed eliminare il materiale di scarto [1-4]. Una tipica sezione del tratto intestinale è mostrata in Fig. 1.1.

L'intestino è suddiviso in due parti principali: l'*intestino tenue* (o piccolo intestino) e l'*intestino crasso* (o grosso intestino, Fig. 1.2). Queste due porzioni sono strutturalmente diverse, poiché hanno il compito di svolgere differenti funzioni [1-3, 5].

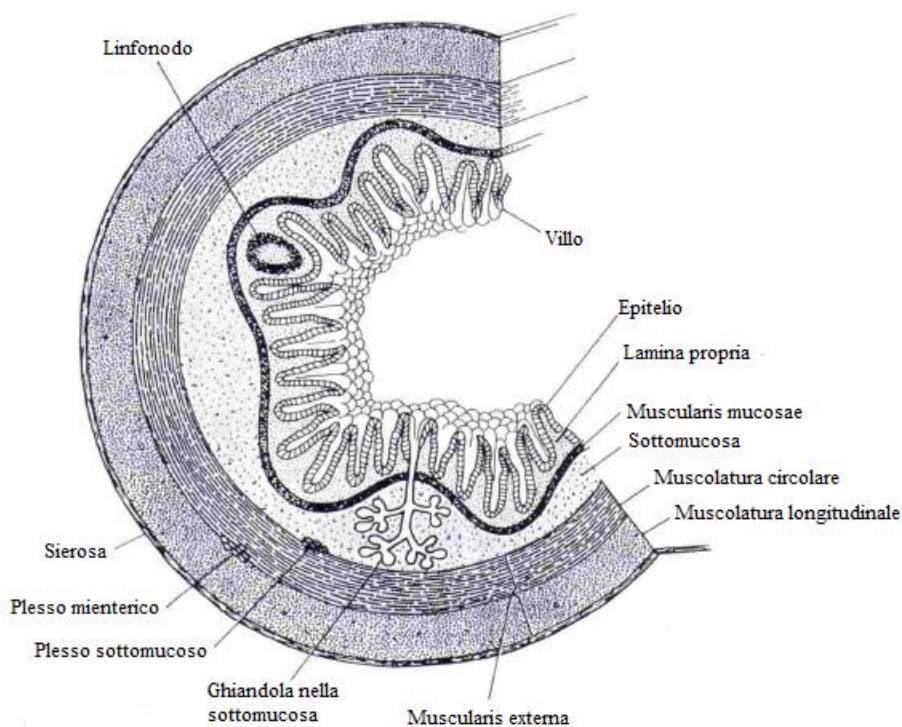


Fig. 1.1. Organizzazione generale dei diversi strati di tessuto che costituiscono l'intestino (figura tratta da [6] e adattata).

L'intestino tenue, a sua volta suddivisibile in duodeno, digiuno ed ileo, è compreso tra il piloro e lo sfintere ileo-cecale (o valvola di Bauhin), che lo collega alla prima porzione dell'intestino crasso, il cieco.

L'intestino crasso è la parte terminale del canale digerente e la sua porzione coloretta-  
le è sede della patologia tumorale oggetto della presente ricerca di possibili biomar-  
catori diagnostici.

### 1.1.1. L'intestino crasso

Sebbene questo organo non sia essenziale per la sopravvivenza, le sue funzioni contribuiscono significativamente al benessere complessivo dell'organismo. Esso completa l'assorbimento di ioni (specialmente  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$ ), metaboliti ed acqua, sintetizza vitamine e provvede alla formazione ed alla successiva espulsione delle feci [2-5, 7-13].

L'intestino crasso ha lunghezza variabile da 150 a 170 cm, con un diametro medio di

circa 7 cm. Esso si divide anatomicamente in vari segmenti successivi, disposti ad arco, che circondano le convoluzioni dell'intestino tenue: il cieco, il colon, il retto e l'ano (Fig. 1.2) [1-3, 5, 8, 10, 12].

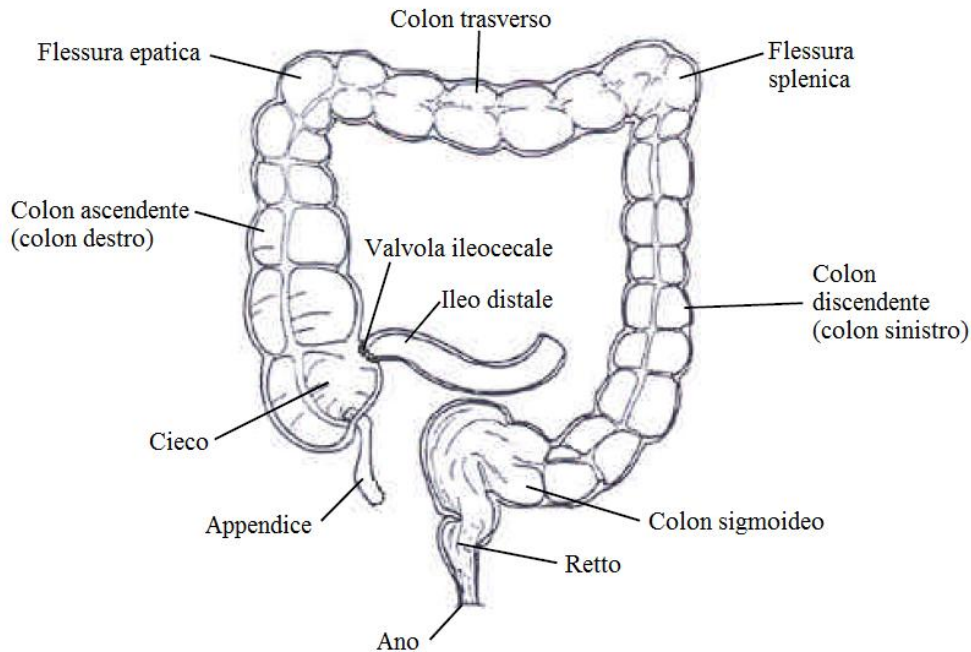


Fig. 1.2. Porzioni anatomiche dell'intestino crasso (figura tratta da [14] e adattata).

Nonostante l'ottima organizzazione dell'apparato digerente, la digestione non è mai efficiente al 100% e parte delle sostanze nutritive non viene assorbita, ma passa dall'intestino tenue al colon. Questi nutrienti costituiscono il sostentamento per una vasta gamma di batteri (per lo più anaerobi) che risiedono abitualmente nell'intestino crasso, dove costituiscono la flora batterica. La maggior parte delle oltre 700 specie di questi batteri è costituita da organismi non patogeni, che non causano danni fintantoché permangono nel lume intestinale. Essi demoliscono i residui di cibo non digerito, come ad esempio gli zuccheri complessi contenuti nelle fibre alimentari, da cui sintetizzano gli acidi grassi a corta catena (SCFA, *Short-Chain Fatty Acids*) come gli acidi butirrico, propionico ed acetico. Questi SCFA sono fonti di nutrienti essenziali per l'epitelio del colon: essi sono trasportati sia attivamente che passivamente all'interno dei colonociti, ai quali sono in grado di fornire fino a 500 cal/giorno attraverso la via della  $\beta$ -ossidazione [7-9].

Poiché la rimanenza di chimo che entra nell'intestino crasso contiene solo pochi nutrienti residui, tale parte dell'intestino può essere completamente rimossa senza alterare significativamente la funzionalità digestiva. In caso di malattie intestinali gravi si può ricorrere infatti alla *colectomia*, operazione chirurgica che prevede l'asportazione parziale oppure completa (colectomia totale) dell'intestino crasso.

## 1.2. Patologie del sistema coloretale

Il sistema coloretale è soggetto ad una vasta gamma di disturbi e malattie, caratterizzati da una diversa gravità e da effetti variabili sul paziente. Le patologie più diffuse sono le coliti, le malattie infiammatorie croniche (che comprendono il morbo di Crohn e la rettocolite ulcerosa), le poliposi e il cancro.

La ricerca ha dimostrato che una diagnosi precoce di queste malattie può portare ad un trattamento più efficace e ad una maggiore probabilità di sopravvivenza. Tuttavia,

molti pazienti non si sottopongono prontamente ai controlli clinici, sia per la mancata comprensione dei sintomi, sia per l'invasività di certe tecniche di analisi [15].

### **1.2.1. Metodiche di indagine per le patologie coloretali**

Al fine di discriminare le varie patologie che possono colpire l'intestino crasso si può fare ricorso a diverse metodiche diagnostiche; quelle più estesamente utilizzate sono la ricerca del sangue occulto nelle feci, l'esplorazione digitale rettale, il clisma opaco a doppio contrasto, l'endoscopia coloretale, l'ecografia, l'ecoendoscopia trans-rettale, la tomografia computerizzata, la TC-colonscopia virtuale, la risonanza magnetica e la tomografia ad emissione di positroni.

La ricerca del sangue occulto nelle feci (o controllo delle feci per il sangue microscopico) è una tecnica non invasiva che permette di rilevare una perdita ematica occulta. Un eventuale esito positivo è indicativo della presenza di una qualche anomalia del sistema coloretale che deve quindi essere esaminato mediante tecniche più mirate, al fine di ottenere una diagnosi corretta [16-17].

L'esplorazione digitale rettale è il primo esame da eseguire in caso di presenza di sangue nelle feci perché permette di rilevare escrescenze a livello del retto [16].

Il clisma opaco a doppio contrasto (o clistere al bario) consiste in una radiografia in seguito all'introduzione (per ingestione o mediante un clistere) di un mezzo di contrasto. Questo è in grado di impartire alla parete intestinale un colore bianco, consentendo così di visualizzare con una migliore definizione eventuali anomalie o lesioni della mucosa. Per consentire una maggiore adesione di questo composto lungo l'intestino, si fa bere al paziente (o si introduce attraverso il clistere) una sostanza che sviluppa CO<sub>2</sub>, la quale, gonfiando l'organo, facilita la distribuzione del mezzo di contrasto nel lume intestinale. Per l'esecuzione di questo esame, il paziente deve presentarsi in condizioni di perfetta pulizia intestinale [2-3, 16].

L'endoscopia coloretale consiste nell'introduzione di una sonda flessibile a fibre ottiche all'interno dell'intestino, in modo da visualizzarne le pareti interne. Ne esistono di tre tipi: la rettoscopia rigida, che permette di visualizzare il retto, la rettosigmoidoscopia (o proctosigmoidoscopia) flessibile, che indaga retto e sigma, e la colonscopia, per la visualizzazione dell'intero colon.

Benché sia una tecnica invasiva, la colonscopia ha il vantaggio di permettere il contemporaneo prelievo di campioni biologici (biopsie): per questa peculiarità essa rappresenta l'esame diagnostico più accurato e completo [1-3, 13, 15-16, 18-22].

L'ecografia è una metodica meno invasiva che si avvale dell'impiego delle onde sonore (ultrasuoni) emesse da una sonda che viene fatta scorrere sulla superficie della pelle in corrispondenza della zona da esaminare. Ogni tipo di tessuto, in base alla sua densità, assorbe o riflette una parte degli ultrasuoni: le onde così riflesse vengono trasformate in immagini dall'ecografo [2-3]. Questa tecnica non permette però di effettuare biopsie per l'analisi del tessuto.

L'ecoendoscopia trans-rettale consiste nell'ecografia delle strutture interne costituenti la parete del viscere intestinale. Essa si avvale dell'utilizzo di speciali sonde ultrasottili inserite all'interno dei comuni endoscopi. Questa tecnica può essere utilizzata nei casi in cui le lesioni raggiungano una grandezza superiore ad 1 cm e permette anche di effettuare prelievi di tessuto per l'esame istologico [1-3].

La Tomografia Computerizzata (TC), fino a pochi anni fa, era nota con il termine di TAC (Tomografia Assiale Computerizzata), poiché in passato veniva usato come punto di riferimento il solo asse centrale del corpo. Recentemente, sono state introdotte delle apparecchiature in grado di ruotare intorno al paziente, fornendo immagi-

ni con dettaglio migliore. È una tecnica indolore simile alla radiografia (impiega quindi raggi X) che consente di ottenere immagini degli organi interni come se fossero esaminati a fettine di uno spessore variabile da 1 a 3 cm; non permette però di effettuare biopsie [2-3].

La TC-colonscopia virtuale consiste in un esame TC-addome previa introduzione di un mezzo di contrasto endovenoso e di aria insufflata mediante un clistere. Questa tecnica, per mezzo di una ricostruzione computerizzata del lume intestinale, consente di navigare virtualmente nel viscere, anche se non permette di effettuare prelievi biotici [1, 13, 16, 20].

La risonanza magnetica è una metodica radiologica simile alla tomografia computerizzata, ma che, a differenza di quest'ultima, non impiega raggi X bensì onde magnetiche [1-3, 13, 20].

La tomografia ad emissione di positroni (PET) è una tecnica diagnostica che permette di seguire il percorso, all'interno del corpo, di sostanze radioattive. In particolare, viene utilizzato il glucosio radioattivo (2-fluoro-2-desossi-D-glucosio), molecola che costituisce una fonte di energia per tutte le cellule dell'organismo. Poiché le cellule tumorali si riproducono più velocemente di quelle sane, esse richiedono più energia, quindi le sedi in cui è localizzato il tumore richiameranno più prontamente il glucosio. Utilizzando il glucosio radioattivo, mediante la PET è dunque possibile localizzare nell'organismo i focolai di cellule con metabolismo alterato, che possono corrispondere a cellule tumorali. Tuttavia, anche le cellule infiammate possono manifestare un metabolismo più rapido di quello delle cellule sane e ciò rende la diagnosi meno specifica [1-3, 13, 20].

### 1.3. Colite

Con il termine colite si intende una generica infiammazione del colon, che può essere di tipo catarrale o mucosa, purulenta, fibrinosa o ulcerosa e può avere decorso acuto o cronico [23].

Le coliti più comuni, brevemente introdotte in questo paragrafo, sono quelle batteriche ed ischemiche, nonché le coliti associate alla malattia diverticolare. Il morbo di Crohn e la rettocolite ulcerosa fanno parte delle cosiddette malattie infiammatorie intestinali e saranno discusse nel paragrafo successivo.

La colite batterica è dovuta ad un'infezione di batteri, parassiti o virus. I sintomi tipici di queste coliti sono generalmente diarrea, dolore addominale e febbre [24].

La colite ischemica è il disordine vascolare più comune del tratto intestinale, nonché la manifestazione più diffusa delle malattie gastrointestinali ischemiche. È causata da un insufficiente afflusso di sangue alla mucosa che può comportare danni al colon sia per la mancanza di ossigeno, sia per effetto dei radicali liberi di ossigeno che vengono rilasciati nel periodo di riperfusione. Comunemente, i pazienti presentano attacchi improvvisi di dolore addominale localizzato nella parte sinistra del basso addome e presenza di sangue rosso nel retto (rettoragia). Altre manifestazioni di carattere via via più grave sono febbre, diarrea, necrosi, perforazione, peritonite e shock settico. La colite ischemica è spesso associata al carcinoma del colon e, in questi casi, si verifica nei pressi del tumore [24-25].

I diverticoli sono delle estroflessioni sacciformi (una sorta di tasche) della mucosa e della sottomucosa. Essi si sviluppano in corrispondenza di punti di debolezza della parete del colon (in particolare del sigma). Il termine diverticolosi (o malattia diverticolare) descrive la presenza di queste estroflessioni, mentre con diverticolite si intende l'infiammazione dei diverticoli, dovuta all'intrappolamento, nelle loro cavità, di

feci contenenti batteri. I principali sintomi provocati da questa colite sono dolore addominale, brividi, febbre, variazioni nelle abitudini intestinali e sintomi da ostruzione nel basso addome [15, 17, 24, 26-27].

Altri tipi di colite, meno comuni, sono la colite da radiazione (conseguenza dei trattamenti radioterapici cui vengono sottoposti i pazienti affetti da cancro rettale, ginecologico o della vescica), la colite da diversione (che si verifica nel segmento di colon bypassato in seguito ad una deviazione chirurgica del flusso fecale), la colite microscopica (che colpisce pazienti affetti da diarrea acquosa cronica di origine sconosciuta) [24].

## **1.4. Malattie infiammatorie croniche intestinali**

Le malattie infiammatorie intestinali (o IBD, *Inflammatory Bowel Disease*) consistono in una condizione infiammatoria cronica che altera significativamente la capacità del tratto gastrointestinale di svolgere le sue funzioni. Le principali IBD sono il morbo di Crohn (CD, *Crohn's Disease*) e la RettoColite Ulcerosa (RCU) [28-31].

Le IBD colpiscono più frequentemente le popolazioni dei Paesi sviluppati come quelle del Nord Europa e del Nord America, dove affliggono 3.6 milioni di persone. Se ne deduce che uno stile di vita occidentalizzato, associato a fumo, a diete ricche di grassi e zuccheri, all'uso di medicinali e allo stress, potrebbe essere legato alla comparsa di queste patologie [24, 28-29, 31-32].

I principali sintomi delle IBD sono diarrea e dolori addominali dovuti, almeno in parte, alla prolungata ipereccitabilità dei neuroni enterici, tipica della fase attiva di queste patologie [28]. L'eziologia è incerta e sembra derivare da molti fattori: una deregolazione immunitaria accoppiata ad un'intolleranza alla flora intestinale sembrano fondamentali per la patogenesi, che, in alcuni casi, è associata anche a fattori ambientali e a mutazioni genetiche. Circa il 10% dei pazienti con una malattia infiammatoria cronica intestinale ha una storia familiare positiva alla patologia. I parenti più colpiti sono quelli di primo grado (genitori, figli, fratelli) che presentano un rischio maggiore di 10-15 volte di sviluppare le IBD [24, 28-29, 31-33].

Al giorno d'oggi non esistono cure per le malattie infiammatorie intestinali. Alcuni medicinali tuttavia aiutano ad indurne e a mantenerne la remissione. Senza un'ulteriore ricerca sulla patogenesi delle IBD, la scoperta di forme di trattamento efficienti e durature è però impossibile [24, 28, 29].

### **1.4.1. Il morbo di Crohn**

La malattia di Crohn è una malattia con decorso cronico recidivante in cui lunghi periodi di remissione possono alternarsi a fasi di attività più o meno severa. La riacutizzazione non è prevedibile e pertanto i pazienti affetti da questa patologia devono seguire un regolare follow-up clinico [33-34]. Le lesioni indotte dalla malattia sono tipicamente discontinue, con zone di intestino sano che si alternano a regioni infiammate, e coinvolgono la parete intestinale a tutto spessore. Nell'80% dei casi il morbo di Crohn è diagnosticato in persone di età compresa tra i 16 e i 40 anni [15, 24, 28-29, 31-34].

La cause che portano allo sviluppo di questa patologia sono tuttora sconosciute. La malattia sembra però essere il risultato di un'interazione tra fattori genetici, ambientali e di natura immunitaria. Questi ultimi comprendono sia una risposta immunitaria esagerata dell'organismo ospitante sia un difetto nella sottoregolazione della stessa,

le quali comportano un'inflammatione cronica. Anche il fumo di sigaretta sembra contribuire allo sviluppo e all'esacerbazione di questa sindrome [31-32].

Le manifestazioni cliniche della malattia di Crohn possono essere estremamente eterogenee. Nelle forme luminali non complicate (*malattia di Crohn infiammatoria*) i sintomi più comuni includono dolore addominale, diarrea cronica o notturna (ematica prevalentemente nelle forme con interessamento colico), incontinenza fecale, febbre, perdita di peso, anemia, gonfiore addominale e sanguinamento rettale.

Il trattamento iniziale della malattia di Crohn è quasi sempre farmacologico, il cui obiettivo è il raggiungimento della remissione clinica ed endoscopica (*deep remission*): a questo scopo vengono somministrati ai pazienti farmaci antinfiammatori o immunosoppressivi [15, 33]. Nei casi più gravi, la terapia medica non è efficace ed è necessario ricorrere alla chirurgia al fine di rimuovere il segmento malato dell'intestino (*resectomia*) e riunirne le parti sane (*anastomosi*). L'intervento chirurgico di resezione intestinale tuttavia è seguito pressoché invariabilmente dalla ricomparsa delle lesioni (*recidiva endoscopica*) e dei sintomi (*recidiva clinica*). Il rischio di recidiva post-operatoria è ancora più alto nei pazienti che fumano abitualmente, che presentano una malattia molto estesa o che hanno subito pregressi interventi chirurgici di resezione intestinale [15, 32-33].

#### **1.4.2. La rettocolite ulcerosa**

La rettocolite ulcerosa è la malattia infiammatoria intestinale più comune nel mondo. Contrariamente al morbo di Crohn, essa colpisce solamente l'intestino crasso (colon e retto) ed è meno incline a complicazioni. È caratterizzata da ulcerazioni estese sulla sola mucosa, con emissione di pus e sangue [23, 28-29, 31-32, 35]. L'incidenza della RCU è stata piuttosto stabile negli ultimi 50 anni, a differenza della malattia di Crohn, che ha avuto un aumento significativo sia in incidenza che in diffusione. La rettocolite si può presentare in pazienti di qualunque età, ma compare prevalentemente tra i 15 e i 30 anni di vita. Come il morbo di Crohn, anche la rettocolite ulcerosa è cronica e caratterizzata da ripetute esacerbazioni e remissioni [15, 30-31, 35]. Contrariamente al morbo di Crohn, il fumo è associato ad una diagnosi in età più elevata e ad una forma più lieve della malattia. Oltre al fumo, la rimozione di un'appendice infiammata in giovane età è associata ad una diminuzione dell'incidenza di rettocolite ulcerosa [31-32].

Benché la prognosi per i pazienti affetti da RCU sia generalmente buona durante il primo decennio dopo la diagnosi, con un basso tasso di colectomia, le persone affette da questa IBD presentano un aumento del rischio del 20-30% di sviluppare il cancro coloretale entro i 30 anni di vita. In particolare, l'incidenza del cancro aumenta se la malattia interessa l'intero colon e perdura da più di 8-10 anni. Le persone malate da lungo tempo devono quindi sottoporsi a frequenti controlli endoscopici, preferibilmente durante i periodi di remissione. Quasi il 33% dei pazienti con una RCU estesa necessita di un intervento chirurgico [15, 30-31, 35].

L'eziologia della rettocolite ulcerosa è tuttora oscura, anche se verosimilmente di natura autoimmunitaria. Infatti, livelli elevati di IgM, IgA e IgG sono comuni in presenza di malattie infiammatorie intestinali; in particolare, si riscontra un incremento di anticorpi IgG1 nella RCU. Tuttavia nessun antigene causale è stato identificato [23, 31, 35]. La RCU sembra anche avere un'associazione genetica in quanto circa il 15% dei casi presenta un altro parente con la patologia. L'evidenza suggerisce che una predisposizione genetica causi una sregolata risposta immunitaria dell'intestino ad agenti ambientali, alimentari ed infettivi [30-31, 35].

Altre anomalie riportate in caso di rettocolite ulcerosa includono difetti nella barriera epiteliale e una diminuzione dell'espressione del recettore  $\gamma$  attivato dai proliferatori dei perossisomi (PPAR  $\gamma$ ), un recettore nucleare che regola i geni infiammatori [31]. Il sintomo peculiare della rettocolite ulcerosa è la diarrea sanguinolenta, con o senza muco. L'attacco può sia presentarsi in modo insidioso, con lievi dolori nei quadranti inferiori dell'addome ed emissione di sangue e muco nelle feci, sia in modo acuto e fulminante, con una violenta diarrea, febbre alta e segni di peritonite [15, 23-24, 26, 30-31, 35].

Oltre al sanguinamento, un'altra complicanza grave, dal possibile esito mortale, è la colite tossica, che comporta la dilatazione del colon in seguito alla perdita del suo tono muscolare. Con un trattamento pronto ed efficace la mortalità può essere mantenuta al di sotto del 4%, ma può essere maggiore del 40% se si verifica una perforazione [35].

Una diagnosi accurata della colite ulcerosa ha inizio con l'anamnesi accompagnata da un esame delle feci e comporta la definizione dell'estensione e della gravità dell'infiammazione, informazioni che forniscono la base per selezionare il trattamento più appropriato e per predire la prognosi del paziente [31]. Una colonscopia completa non è necessaria prima del trattamento e può essere pericolosa durante le fasi attive della malattia per il rischio di perforazione. Per confermare la diagnosi si può effettuare una biopsia dello strato interno del colon. All'esame endoscopico, la mucosa appare uniformemente infiammata a partire dall'estremità retto-animale sino alle regioni più prossimali, con una transizione brusca o graduale dalle regioni colpite a quelle sane [15, 30-31, 35].

Il trattamento iniziale della colite ulcerosa è di tipo farmacologico e consiste nella somministrazione di antibiotici e farmaci antinfiammatori. Questi non portano alla guarigione, ma, se assunti per tutta la vita, possono ridurre la frequenza e la gravità degli attacchi. In caso di fallimento della terapia medica o in presenza di forme gravi di RCU che durano da più anni, si ricorre alla chirurgia: diversamente dal morbo di Crohn, l'asportazione del colon è infatti in grado di curare la rettocolite ulcerosa. L'operazione standard è la *proctocolectomia totale* che, per la RCU, è un trattamento curativo: elimina la malattia in quanto non lascia della mucosa residua in grado di infiammarsi nuovamente e rimuove ogni rischio di sviluppare il cancro del colon e del retto. Un'alternativa alla proctocolectomia totale è data dalla *proctocolectomia restaurativa* [15, 24, 29-31, 35].

## **1.5. Poliposi**

### **1.5.1. I polipi**

Con il termine poliposi si indica la presenza di escrescenze (polipi) originate dalla proliferazione delle cellule della mucosa intestinale, che crescono a dismisura fino a sporgere nel lume. I polipi sono una condizione molto comune del sistema coloretale: si verificano infatti nel 15-20% della popolazione adulta. Essi sono essenzialmente delle forme precancerose: infatti, la maggior parte dei tumori del colon-retto deriva dalla trasformazione in senso maligno di polipi inizialmente benigni. Di conseguenza, la loro pronta identificazione e rimozione previene lo sviluppo di cancro coloretale (CRC, *ColoRectal Cancer*) [1-3, 16, 20, 30].

La probabilità che un polipo del colon evolva verso una forma invasiva di cancro dipende dalla presenza e dalla quantità di tessuto villosa e dalla dimensione del polipo stesso: è minima (inferiore al 2%) per polipi più piccoli di 1.5 cm, intermedia (2-

10%) per quelli di 1.5-2.5 cm e significativa (10-50%) per polipi più grandi di 2.5 cm [1-3, 16, 30].

Esistono tre tipologie istologiche di polipi adenomatosi: tubolari, tubolo-villosi e villosi. Il potenziale maligno è maggiore per i polipi villosi (40%) e minore nei polipi tubolari (5%), mentre per i polipi tubolo-villosi il rischio è intermedio (22%) [30].

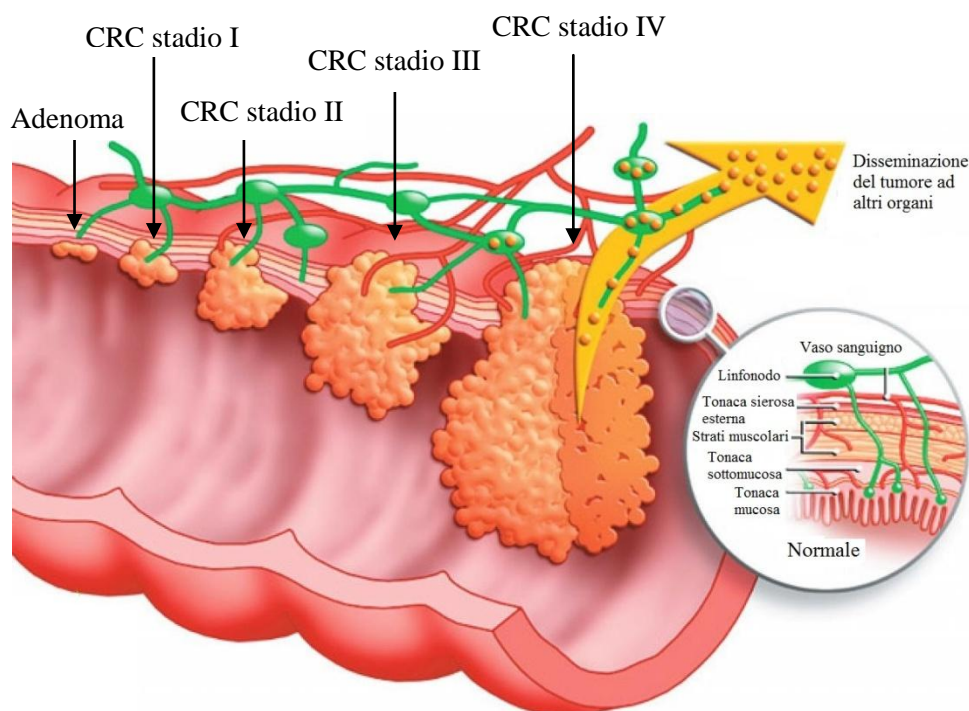
La maggioranza dei polipi è completamente asintomatica; solo nel 5% dei casi si possono verificare delle piccole perdite di sangue rilevabili attraverso un esame delle feci (tale percentuale aumenta di pari passo con la dimensione dei polipi). Un altro campanello d'allarme più vago è un cambiamento significativo e senza apparente motivo delle abitudini intestinali, che si protrae per qualche settimana. In alcuni casi, i pazienti possono presentare stitichezza e dolore addominale o alla schiena [1, 16, 19, 30].

La tecnica di indagine più adatta per la diagnosi è la colonscopia, in quanto essa è sia diagnostica che terapeutica: permette infatti sia l'individuazione che la rimozione di polipi precancerosi, mediante *polipectomia* [1-3, 8, 15-16, 18-20]. Poiché non vi è un modo infallibile di prevedere se un polipo è o diventerà maligno, è consigliata la rimozione totale di tutti i polipi. Tuttavia, alcuni di essi, per la loro dimensione e per la loro posizione, non possono essere asportati mediante trattamento endoscopico ed in questi casi è richiesto l'intervento chirurgico [16].

### **1.5.2. La poliposi adenomatosa familiare**

La poliposi più comune è quella adenomatosa familiare o FAP (*Familial Adenomatous Polyposis*); si tratta di una malattia autosomica dominante (caratterizzata quindi da una probabilità del 50% di trasmettersi ai figli) che comporta lo sviluppo, in età infantile o adolescenziale, di diverse migliaia di polipi (o adenomi) coloretali e di numerose manifestazioni extracoloniche. La maggior parte degli adenomi è tubolare e ha diametro inferiore ad 1 cm. Le caratteristiche principali della FAP sono l'ereditarietà e l'incidenza di cancro coloretale ad essa associato. Tutti i pazienti affetti da FAP, infatti, se non trattati precocemente, sviluppano adenocarcinomi coloretali e muoiono prima dei 40-50 anni. Per questa caratteristica, la FAP ha contribuito molto allo sviluppo del concetto di sequenza adenoma-carcinoma (illustrata in *Fig. 1.3*) come base dell'eziologia del cancro coloretale, non solo nella popolazione affetta da poliposi, ma in generale [18-19, 22, 30, 36-37].





*Fig. 1.3. Schema della sequenza adenoma-carcinoma: da un adenoma di piccole dimensioni si sviluppa una massa tumorale che continua a crescere attraversando tutti gli stadi dal I al IV (figura tratta da [38] e adattata).*

## 1.6. Il cancro coloretale

Nel mondo il cancro costituisce una delle principali cause di morte. Le ultime stime indicano un progressivo aumento dell'incidenza di questa patologia, dovuto al generale allungamento della vita media e alla crescente esposizione a fattori di rischio, quali fumo, sostanze cancerogene ed inquinanti. Ciononostante, negli ultimi anni la mortalità per cancro non è aumentata con lo stesso andamento, poiché la conoscenza dei fattori di rischio, la capacità di fornire diagnosi precoci e la disponibilità di terapie più appropriate stanno aumentando la probabilità di guarigione [1-2, 39].

L'insorgenza del cancro ha origine in un'alterazione genetica. Esistono infatti geni acceleratori, che spingono le cellule a moltiplicarsi, e geni inibitori che arrestano la moltiplicazione cellulare quando non è più necessaria. In condizioni normali vige un equilibrio armonioso tra questi due tipi di geni, ma se si verifica un errore durante la duplicazione del DNA, la cellula e le sue discendenti possono andare incontro a una serie infinita di divisioni. È così che viene a costituirsi un ammasso di cellule caratterizzate da una marcata tendenza a dividersi: il tumore. In generale, se le cellule crescono lentamente nel sito di partenza il tumore è benigno, se invece le cellule diffondono attraverso i vasi sanguigni o linfatici in altre parti del corpo si parla di tumore maligno o cancro. Se le cellule diffuse nella nuova area si dividono e formano un nuovo tumore, questo viene detto tumore secondario o metastasi [39-40].

Il cancro del colon-retto o CRC è dovuto alla proliferazione incontrollata delle cellule epiteliali della mucosa che riveste quest'organo. La maggior parte dei tumori del colon-retto deriva dalla trasformazione in senso maligno di polipi. Altre forme di cancro possono avere l'aspetto di noduli o manifestarsi con ulcere della mucosa [1-3].

La distribuzione di insorgenza lungo l'intestino crasso è varia: per il 20-50% dei casi si manifesta nel sigma e nel retto; per il 16% colpisce il cieco e il colon ascendente; l'8% si localizza nel colon trasverso e nei pressi della flessura splenica; il 6% si presenta nel colon discendente. Al momento della diagnosi, circa un terzo dei malati presenta già metastasi al livello del fegato: i due organi sono infatti strettamente collegati dal punto di vista della circolazione sanguigna [1-3].

### 1.6.1. Classificazione

Da un punto di vista genetico, vi sono tre classificazioni generali di CRC:

1. tumore del colon sporadico;
2. tumore del colon familiare;
3. tumore del colon da sindromi ereditarie [40].

Si parla di tumore *sporadico* quando la sua insorgenza non è correlabile alla presenza di uno specifico fattore predisponente. Più dell'80% dei casi di tumore del colon-retto rientra in questa categoria. Il cancro del colon sporadico si verifica in genere in individui di età superiore ai 60 anni, senza una precedente storia familiare di CRC [2-3, 22, 40].

Alcune famiglie manifestano una certa predisposizione verso lo sviluppo del cancro coloretale. Si tratta di famiglie che contano più di un parente affetto da CRC, soprattutto se il tumore si è verificato in un soggetto di età inferiore a 50 anni. Circa il 20% delle persone con cancro del colon-retto ha un precedente caso in famiglia. Se un parente di primo grado (genitore, fratello o figlio) sviluppa un CRC, il rischio che i membri della famiglia si ammalinino di questa malattia raddoppia. Ciò può essere dovuto sia alla presenza di un gene predisponente sia alla condivisione di determinati fattori ambientali, in grado di favorire l'insorgenza della malattia [22, 40].

Solo una percentuale molto bassa (5-10%) di neoplasie del colon-retto è causata dalla presenza di un rischio genetico di natura ereditaria. Alcune delle sindromi che predispongono al cancro coloretale sono la FAP e l'HNPCC (*Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer*), ovvero il cancro del colon ereditario non-poliposico (o *sindrome di Lynch*). Quest'ultima è una forma ereditaria di tumore al colon con trasmissione dominante, cioè, analogamente alla FAP, ha una probabilità del 50% di manifestarsi nei figli di chi ne è affetto. Diversamente dalla poliposi adenomatosa familiare, la predisposizione allo sviluppo della malattia non si manifesta con la comparsa di polipi, ma direttamente con lo sviluppo del cancro al colon, in genere intorno ai 45 anni di età [2-3, 19, 22, 39-42].

### 1.6.2. Diffusione

Ogni anno, nel mondo, più di 945000 persone sviluppano un cancro coloretale e circa 492000 pazienti muoiono a causa di questa malattia. Nei Paesi occidentali, il cancro del colon-retto rappresenta il secondo tumore maligno per incidenza e mortalità nella donna, dopo quello della mammella, ed il terzo dopo quello del polmone e della prostata nell'uomo. Più del 90% dei pazienti ha più di 40-50 anni, età dopo la quale il rischio di contrarre questo cancro raddoppia dopo ogni decennio, raggiungendo un massimo intorno ai 75-80 anni [1-3, 15, 20, 22, 30]. Nel 2012 in Italia sono state stimate più di 54000 nuove diagnosi di tumore del colon-retto (oltre 31000 negli uomini e oltre 23000 nelle donne) [43].

La prognosi della malattia dipende dallo stadio al momento della diagnosi. Nell'80-90% dei casi si raggiunge una guarigione completa se il tumore viene diagnosticato e

trattato nelle fasi iniziali, ma la percentuale scende al di sotto del 50% se il cancro è diagnosticato nelle fasi successive [2-3, 15, 20, 22].

### **1.6.3. Fattori di rischio**

Un fattore di rischio è una condizione, abitudine o esposizione ambientale o professionale che aumenta la probabilità di sviluppare o contrarre una determinata malattia. I fattori di rischio che concorrono a determinare l'insorgenza del cancro coloretale sono molti: tra essi ne sono stati individuati alcuni legati alla dieta e all'alimentazione, altri genetici e altri di tipo non ereditario [1-3, 39].

La dieta è il principale fattore di rischio esogeno identificato per l'insorgenza del CRC: circa il 70% dei tumori del colon potrebbe essere prevenuto con un intervento dietetico. Molti studi dimostrano infatti che una dieta ad alto contenuto di calorie, ricca di grassi animali (provenienti dalla lavorazione di latte e carne) e povera di fibre è associata ad un aumento dei tumori intestinali; viceversa, diete ricche di fibre (cioè caratterizzate da un alto consumo di frutta e vegetali) sembrano avere un ruolo protettivo. Le verdure, inoltre, contengono numerose sostanze con proprietà antiossidanti e antitumorali (carotenoidi, fenoli, flavonoidi, ecc...): è stato riscontrato che le popolazioni vegetariane presentano un'incidenza di CRC molto minore rispetto alla popolazione generale. L'obesità, il sovrappeso in età adulta e una dieta ricca di zuccheri, grassi totali e saturi sembrano aumentare il rischio di sviluppare una neoplasia del distretto colico. Anche l'insulino-resistenza e l'iperinsulinemia indotte da un eccessivo apporto energetico sembrano rappresentare un fattore di rischio [1-3, 8, 39].

Tra i fattori di rischio genetici vi è la presenza nella famiglia di origine di casi di FAP, sindromi di Gardner e di Turcot e della carcinosi ereditaria del colon-retto su base non poliposica (HNPCC) [1-3, 22, 30, 39].

Tra i fattori non ereditari sono importanti l'età, una storia clinica passata di polipi del colon o di un pregresso tumore del colon-retto o di altri organi (soprattutto utero e ovaie) [1-3, 15, 20, 30, 39].

Ad alto rischio sono anche le persone affette da rettocolite ulcerosa cronica per più di 8-10 anni e anche chi soffre della pancolite di Crohn. Contrariamente alle persone che sperimentano la sequenza polipo-carcinoma, i pazienti con RCU non sviluppano polipi adenomatosi prima dell'insorgenza del cancro [1-3, 15, 20, 22, 30, 39].

Altri fattori di rischio sono l'abuso di alcol e il fumo di tabacco, al quale viene attribuita la responsabilità di circa il 20% dei tumori del grosso intestino nel sesso maschile [2-3, 8, 39].

### **1.6.4. Prevenzione**

Dato che la dieta può giocare un ruolo protettivo nei confronti del cancro coloretale, la prevenzione primaria si basa su generici consigli di igiene alimentare come la riduzione del consumo di alimenti ad alto apporto calorico, tra cui grassi e carne, e l'aumento dell'assunzione di alimenti ad alto contenuto di fibre, vegetali e frutta ed adeguato apporto di acqua con la dieta. È consigliato inoltre di evitare il fumo, l'alcol e i cibi con conservanti (compreso il sale) o affumicati. Tra i fattori protettivi vi sono l'attività fisica, l'uso cronico di aspirina e farmaci antinfiammatori non steroidei (FANS) e la terapia ormonale [1-3, 20, 22, 39].

Poiché la quasi totalità dei tumori del colon e del retto ha inizio da polipi benigni, la loro pronta identificazione e rimozione (permesse da una diagnosi precoce) costituiscono delle tappe importanti nella prevenzione del cancro coloretale [8, 20].

### 1.6.5. Diagnosi e biomarcatori del cancro coloretale

Il tumore del colon-retto viene oggi diagnosticato sempre più precocemente grazie alle campagne di screening sulla popolazione a rischio. La diagnosi precoce è infatti di vitale importanza in quanto il CRC ha un tasso di sopravvivenza elevato se viene individuato prima che esso si sia diffuso oltre i confini della parete del colon [1-2, 15, 20, 30].

I metodi di diagnosi includono la ricerca di sangue occulto nelle feci e l'esame digitale del retto. Il primo è in grado di diagnosticare solo il 25% dei casi di CRC, ma è comunque raccomandato per tutti gli individui tra i 50 e i 75 anni di età, con cadenza biennale. L'esame digitale del retto è un esame poco praticato in Italia, ma molto utile, in quanto capace di rilevare la presenza di neoformazioni localizzate a livello dell'ultimo tratto del canale intestinale, diagnosticando in media il 70% dei tumori del retto [1-3, 8, 13, 15, 20, 22].

Oltre a queste prime due metodiche, anche le altre indagini strumentali menzionate nel paragrafo 1.2.1 possono aiutare nel percorso diagnostico.

Altre metodiche di diagnosi si basano sulla ricerca di biomarcatori tumorali, ovvero di sostanze qualitativamente o quantitativamente rivelabili nei fluidi biologici o nei tessuti e che presentino una connessione causale o probabilistica con la neoplasia maligna. Esse possono essere metaboliti, ormoni, geni, enzimi o proteine [44-45].

Idealmente un marcatore tumorale dovrebbe soddisfare i seguenti requisiti:

- deve essere prodotto soltanto dal cancro (specificità) [44-45];
- deve essere capace di rivelare il cancro in tutti i soggetti malati con una sicurezza del 100%, possibilmente negli stadi più precoci (sensibilità) [44-45];
- i suoi valori devono essere correlabili allo stadio della malattia, alla prognosi e alle variazioni cliniche presentate dal paziente durante il corso della terapia [44-45];
- deve essere rivelabile per mezzo di tecniche semplici ed economiche [44-45];
- deve possedere organospecificità, in modo tale da riuscire a localizzare la neoplasia;
- deve essere presente in campioni ottenibili in modo facile e minimamente invasivo;
- deve possedere un elevato valore predittivo (probabilità di un paziente di presentare o meno la neoplasia) [44-45].

Allo stato attuale nessuno dei marcatori scoperti presenta queste caratteristiche ideali e pertanto essi trovano per lo più utilizzo solamente nel monitoraggio della terapia antitumorale. Sono inoltre impiegati nel follow-up in quanto essi rappresentano spesso il primo ed unico segnale della comparsa di una recidiva [45].

Per quanto riguarda il cancro coloretale, la ricerca di marcatori tumorali consiste nel dosaggio, in campioni di sangue, del CEA (antigene carcino-embriionario) e dell'antigene gastrointestinale CA 19.9 (detto anche GIKA), generalmente presenti a bassi livelli nei soggetti sani. L'aumento di questi marcatori al di sopra dei livelli di riferimento può essere indice della presenza di malattia neoplastica. In particolare, il CEA, di scarsa utilità nella diagnosi precoce e nello screening, riveste un ruolo importante nel monitoraggio della progressione e della risposta al trattamento farmacologico (scende infatti se la chemioterapia è efficace) o per la verifica della ripresa della malattia (risale in caso di ricadute). Inoltre, un alto livello di questo marcatore prima dell'operazione chirurgica spesso suggerisce una prognosi scarsa con probabili metastasi [1-3, 30].

Questi due marcatori hanno però lo svantaggio di essere poco specifici per il CRC in quanto le concentrazioni di queste sostanze possono essere influenzate dalle terapie farmacologiche e dalla presenza di malattie non necessariamente tumorali (ad esempio, malattie infiammatorie croniche del colon) o, come accade per il CEA, dall'abitudine al fumo. Pertanto, il riscontro di un innalzamento dei livelli di questi marcatori, sensibili ma non specifici, non è sufficiente a diagnosticare il tumore del colon-retto [2-3].

### 1.6.6. Stadiazione

Una volta effettuata la diagnosi del tumore al colon-retto, è indispensabile determinarne lo stadio, al fine di stabilire il trattamento più adeguato. Al tumore viene quindi assegnato uno stadio da zero (0) a quattro (IV) che ne definisce l'estensione nell'organismo [2-3, 39].

Il sistema di classificazione standard per i tumori è il TNM, dove ciascuna lettera rappresenta un parametro. T è la dimensione della massa tumorale, N è la localizzazione delle cellule tumorali all'interno dei linfonodi vicini alla massa tumorale ed M indica l'eventuale assenza/presenza di metastasi a distanza [2-3, 46].

Per ognuno dei tre parametri esistono a loro volta diverse categorie, rappresentate da una lettera o un numero che seguono al parametro; se ad esempio la lettera è "x" significa che nessuna informazione è disponibile per il parametro, mentre se è un numero ne indica la gravità (0 = meno grave) (per la descrizione completa dei parametri si veda l'Appendice A) [46].

Una volta stabilito a quali categorie dei parametri T, N ed M corrisponde il tumore in esame, queste informazioni vengono combinate al fine di determinare lo stadio (le combinazioni sono indicate in *Tab. A4* in Appendice A) [46].

### 1.6.7. Trattamento

Per una completa guarigione dal cancro coloretale, è necessario ricorrere alla chirurgia, spesso accompagnata da radioterapia e chemioterapia [15, 20].

Rispetto agli interventi demolitivi diffusi in passato, la chirurgia del CRC è diventata sempre più conservativa, favorendo un maggiore rispetto della funzionalità e dell'integrità fisica e psichica dei malati. In questo è spesso coadiuvata dalla radioterapia preoperatoria, che, riducendo il volume della massa tumorale, è in grado di rendere gli interventi chirurgici meno invasivi.

Tra i farmaci chemioterapici usati per trattare il cancro del colon e del retto vi sono Irinotecan e Oxaliplatin [13]. La chemioterapia svolge un ruolo fondamentale sia nella malattia operabile sia in quella avanzata non operabile e rappresenta un'arma essenziale nei casi in cui il cancro sia diffuso in varie parti del corpo, in quanto è un trattamento sistemico: una volta entrati nel circolo sanguigno, i farmaci vengono infatti trasportati attraverso tutto l'organismo. A causa dell'assenza di un meccanismo specifico antineoplastico, i farmaci chemioterapici presentano numerosi effetti collaterali che includono nausea, vomito, diarrea, alopecia e modificazioni dei valori ematologici (anemia, piastrinopenia, leucopenia) [1-3, 39].

La radioterapia consiste nell'utilizzo di radiazioni, emesse da una fonte radioattiva o da un acceleratore di particelle, indirizzate verso l'area del corpo colpita dal tumore, al fine di bloccarne la crescita. Le radiazioni usate si dicono *ionizzanti* perché producono ioni, i quali reagiscono con il DNA e le proteine circostanti la zona irradiata

provocando la morte cellulare. Il problema principale di questo trattamento è il danneggiamento anche dei tessuti sani, a loro volta bersagliati dalle radiazioni [3, 39].

## 2. LIPIDOMICA

### 2.1. Le scienze omiche

L'evoluzione e lo sviluppo delle tecniche di analisi dedicate alla biochimica ha consentito di identificare e quantificare svariate migliaia di specie all'interno dell'organismo. Questo approccio analitico è sfociato, in primo luogo, nella nascita della genomica, scienza che ha l'obiettivo di "mappare" l'intero genoma, ovvero di studiare la struttura, la funzione e l'evoluzione del DNA e dell'RNA, gli acidi nucleici depositari dell'informazione genetica [47-49].

Questa disciplina è stata presto affiancata da altre due "omiche": la trascrittomica e la proteomica. La prima si basa sull'analisi dell'espressione genica: ricorrendo alla tecnologia dei *microarray*, analizza l'insieme degli RNA messaggeri complementari ai geni codificati nel DNA. La proteomica si concentra invece sullo studio globale dell'espressione proteica: grazie all'elettroforesi bidimensionale e alla cromatografia ad alta prestazione combinate con la spettrometria di massa, si propone di studiare tutte le proteine, con lo scopo di determinarne la sequenza, la struttura tridimensionale, la funzione e le interazioni con altre classi di molecole di interesse biologico [47-49].

L'insieme di questi approcci ha consentito la nascita della "biologia dei sistemi", disciplina che considera gli organismi come dei sistemi che evolvono nel tempo. Essa pertanto, contrariamente alla biologia molecolare classica, non si focalizza sulle singole macromolecole o su uno specifico processo biochimico, ma studia le interazioni dinamiche che si creano fra le diverse specie molecolari e che nel tempo portano alla formazione di un sistema [47]. A partire da queste informazioni, può essere costruita una rete di modelli che permette di prevedere in che modo il sistema risponderà sotto determinate circostanze, come, ad esempio, nel caso di una malattia [50].

La biologia dei sistemi, oltre alla genomica, alla trascrittomica e alla proteomica, può contare anche su un'altra scienza omica sviluppatasi di recente: la metabolomica [47, 49].

#### 2.1.1. La metabolomica

La metabolomica è un campo emergente nella biochimica analitica avente lo scopo di studiare il profilo metabolico globale (o metaboloma), ossia l'insieme completo di tutte le piccole molecole (i metaboliti) prodotte dall'espressione genica e proteica, riscontrabili nelle cellule, nei tessuti, negli organi e nei fluidi biologici [47-51]. Per metabolita si intende qualsiasi specie molecolare coinvolta nel metabolismo, cioè un prodotto o un intermedio dei diversi processi biochimici che avvengono all'interno delle cellule. Analizzando queste migliaia di molecole, gli studi di metabolomica sono in grado di risalire agli eventi biochimici che le hanno prodotte, delucidandone i meccanismi in modo dettagliato. Le identità, le concentrazioni e i flussi di questi composti risultano infatti da un'interazione complessa tra espressione genica, espressione proteica e fattori ambientali. Mentre la genomica, la trascrittomica e la proteomica forniscono informazioni di base sul funzionamento e sull'attività cellulare, il profilo metabolico può fornire invece un'istantanea dello stato fisiologico di quella stessa cellula al momento del campionamento. È dunque plausibile che la metabolomica possa contribuire in modo più significativo alla ricerca medica rispetto alle tecniche che l'hanno preceduta, arrivando perfino all'applicazione clinica. Gli studi di

metabolomica, infatti, possono portare alla scoperta di nuovi biomarcatori diagnostici, effettuare il monitoraggio terapeutico, permettere la comprensione del meccanismo d'azione delle malattie e dei farmaci utilizzati per curarle e, di conseguenza, rendere possibile la previsione della risposta individuale ai farmaci (farmacometabolomica) [47-51].

A causa dell'elevato numero di molecole da identificare e delle basse concentrazioni da rivelare, per lo sviluppo della metabolomica sono necessari esperimenti ad alto rendimento (*high through-put*) in grado di evidenziare un profilo di metaboliti. I profili metabolici sono tipicamente generati con spettroscopia di risonanza magnetica (NMR) e spettrometria di massa (MS): si tratta quindi di spettri che devono essere confrontati tra loro mediante approcci di tipo statistico. Idealmente, i dataset di metabolomica dovrebbero essere combinati con quelli delle altre controparti omiche, in modo da acquisire una visione completa delle vie molecolari della biologia dei sistemi [47, 49].

Data la notevole diversità strutturale e funzionale delle miriadi di metaboliti presenti negli organismi, diverse branche della metabolomica si sono sviluppate nel tempo: le principali sono la *glicomica*, dedicata allo studio globale dei carboidrati, e la *lipidomica*, rivolta allo studio onnicomprensivo dei lipidi [47].

### 2.1.2. La lipidomica

La lipidomica è una branca emergente della metabolomica che ha lo scopo di identificare e quantificare l'intero repertorio lipidico (il *lipidoma*) in un determinato sistema biologico. Essa non si limita solamente allo studio della struttura dei lipidi, ma si concentra anche sulle molecole con cui essi interagiscono, con il fine ultimo di comprenderne il metabolismo e le funzioni biologiche all'interno della cellula [47, 50, 52].

L'interesse dei ricercatori nei confronti dei lipidi è andato crescendo negli ultimi decenni, da quando è emersa la loro importanza fisiologica. È ormai infatti provato che alterazioni del metabolismo lipidico hanno conseguenze disastrose sulla salute dell'intero organismo, in quanto favoriscono l'insorgenza di malattie come l'arteriosclerosi, il diabete, l'obesità e il morbo di Alzheimer. La conoscenza dettagliata dei meccanismi di interazione lipide-lipide e lipide-proteina ha elevato questa classe di molecole da mero bersaglio di enzimi a entità biologiche aventi un ruolo fondamentale nel mantenimento della salute dell'organismo. La lipidomica, grazie all'identificazione sistematica delle diverse migliaia di specie molecolari distribuite nelle cellule e nei tessuti, permette il monitoraggio delle variazioni qualitative e quantitative dell'assetto lipidico, sia in condizioni fisiologiche, sia patologiche [47, 50].

La disponibilità di nuovi strumenti analitici e, in particolare, i recenti sviluppi nella spettrometria di massa, permettono di rilevare minime variazioni nelle concentrazioni delle sostanze analizzate e forniscono inoltre delle istantanee quantitative del lipidoma. Questo aspetto è particolarmente importante data l'enorme complessità di questa classe di composti (una cellula di mammifero può esprimere da 1000 a 2000 specie lipidiche). La sfida analitica consiste quindi nel riuscire ad identificare e quantificare migliaia di lipidi strutturalmente diversi tra loro, presenti a bassissime concentrazioni nei sistemi biologici [47, 52-54].



## 2.2. I lipidi

I lipidi (dal greco *lipos*, "grasso") sono uno dei quattro gruppi di biomolecole che costituiscono le cellule. Essi vengono definiti come "l'insieme degli acidi grassi, dei loro derivati naturali (esteri e ammidi) e dei composti ad essi correlati dal punto di vista strutturale e funzionale" [47].

Si tratta di una classe di sostanze organiche estremamente eterogenee dal punto di vista chimico, le cui strutture, diversamente da carboidrati, proteine e acidi nucleici, non si basano sulla ripetizione di una specifica unità elementare. La principale caratteristica che unisce queste diverse sostanze sotto un'unica categoria è la marcata idrofobicità; tuttavia esistono alcuni lipidi (i fosfolipidi) che presentano una discreta solubilità in acqua. Un altro tratto comune in questa classe di composti è la presenza di almeno un residuo acilico ( $R-CO-$ , dove R è una catena idrocarburica) o di un gruppo riconducibile ad esso [47].

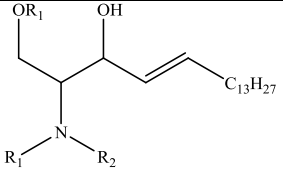
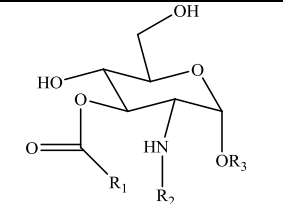
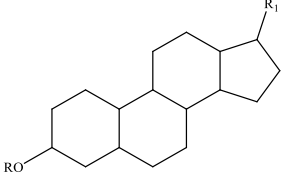
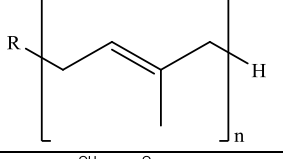
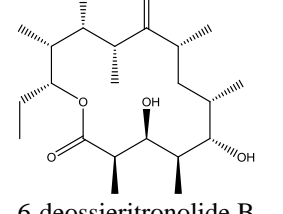
In passato, per la notevole quantità di energia immagazzinata nelle loro catene idrocarburiche e per la loro unica capacità di organizzarsi in micelle o in doppi strati in ambiente acquoso, si è ritenuto che i lipidi avessero solamente due funzioni all'interno dell'organismo: fungere da riserva energetica e costituire la matrice strutturale delle membrane biologiche. In realtà, queste due importanti funzioni sono solamente due esempi di un'ampia gamma di ruoli fisiologici, che includono anche la segnalazione intra- ed intercellulare, l'ancoraggio di proteine di membrana e il mantenimento di gradienti elettrochimici [50, 55].

### 2.2.1. Classificazione dei lipidi

I lipidi sono classificabili in otto categorie, ciascuna delle quali è costituita da altre sottoclassi: 1) acidi grassi, 2) glicerolipidi, 3) glicerofosfolipidi, 4) sfingolipidi, 5) glicolipidi o saccarolipidi, 6) steroidi, 7) isoprenoidi e 8) polichetidi [47, 50, 56-58]. Le formule di struttura generiche o di molecole rappresentative di questi otto tipi di lipidi, assieme alle caratteristiche e alle funzioni principali, sono indicate in *Tab. 2.1*. Un'altra classificazione raggruppa queste otto categorie in due insiemi più ampi: lipidi saponificabili (acidi grassi, glicerolipidi, glicerofosfolipidi, sfingolipidi e glicolipidi) e lipidi non saponificabili (steroidi, isoprenoidi e polichetidi) [47, 50, 56-57].

Di seguito verrà brevemente descritta la classe degli acidi grassi poiché è quella che costituisce l'oggetto della presente tesi.

Tabella 2.1. Strutture, caratteristiche e funzioni delle otto categorie di lipidi.

Categoria	Struttura	Caratteristiche	Funzioni
Acidi grassi [47, 55, 59]	R-COOH	Acidi carbossilici con catena laterale R di lunghezza variabile.	Costituenti delle principali classi di lipidi.
Glicerolipidi o triacilgliceroli o trigliceridi [47, 55-56]	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{C} - \text{OCOR}_1 \\   \\ \text{HC} - \text{OCOR}_2 \\   \\ \text{H}_2\text{C} - \text{OCOR}_3 \end{array}$	Triesteri del glicerolo, non polari, insolubili in acqua.	Costituenti di grassi e oli; fungono da riserva energetica accumulandosi negli adipociti; proteggono nei confronti di traumi e variazioni di temperatura.
Glicerofosfolipidi o fosfogliceridi [47, 54-56]	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{C} - \text{OCOR}_1 \\   \\ \text{HC} - \text{OCOR}_2 \\   \\ \text{H}_2\text{C} - \text{O} - \text{P} \begin{array}{l} \text{OH} \\ \text{OR} \\ \text{O} \end{array} \end{array}$	Costituiti da glicerolo-3-fosfato, le cui posizioni C1 e C2 sono esterificate con acidi grassi; sono molecole anfipatiche dotate di code apolari idrofobe e teste polari idrofile.	Principali costituenti del doppio strato lipidico delle membrane biologiche; mediano i segnali biochimici comportandosi da messaggeri di membrana.
Sfingolipidi [55]		Derivano dalla sfingosina, amminoalcol a 18 atomi di carbonio; si suddividono in sfingomieline, cerebrosidi e gangliosidi.	Costituenti delle membrane cellulari; fonti per la produzione di lipidi più piccoli.
Glicolipidi o saccarolipidi [54, 56]		Al gruppo COO <sup>-</sup> dell'acido grasso è direttamente connessa una molecola di uno zucchero.	Costituenti delle membrane cellulari.
Steroidi [47, 52, 55]		Derivati del ciclopentanoperidrofenantrene, costituito da quattro anelli non planari fusi.	Componenti delle membrane plasmatiche; fungono da ormoni e da molecole-segnaletto; sono i precursori degli acidi biliari.
Isoprenoidi o terpenoidi [47, 55-56]		Costituiti da unità a cinque atomi di carbonio con il medesimo scheletro molecolare dell'isoprene.	Fungono da pigmenti, ormoni, vitamine liposolubili, antiossidanti e agenti di difesa.
Polichetidi [56]	 <p>6-deossieritronolide B</p>	Sono lattoni macrociclici tensionati costituiti da un numero di atomi di carbonio variabile da 14 a 40 o da sistemi complessi di anelli aromatici.	Utilizzati come agenti antimicrobici, antiparassitari e anticancro; alcuni sono delle potenti tossine.

## 2.3. Gli acidi grassi

Gli acidi grassi sono acidi carbossilici a lunga catena, generalmente lineare, recante un numero pari di atomi di carbonio. Catene idrocarburiche con meno di 14 o con più di 20 atomi di carbonio sono poco frequenti; le più diffuse in natura sono le specie a 16 e a 18 atomi di carbonio. Gli acidi grassi con catene fino a otto atomi di carbonio sono tutti idrosolubili; dimensioni maggiori della catena idrocarburica rendono invece gli acidi grassi pressoché insolubili in acqua [47, 54-55, 59].

Gli acidi grassi possono essere definiti saturi o insaturi a seconda dell'assenza o della presenza di almeno un doppio legame lungo la catena carboniosa. Gli acidi grassi insaturi possono essere ulteriormente suddivisi in monoinsaturi, con un unico doppio legame, o poliinsaturi, con due o più doppi legami separati da gruppi metilenici, in modo da non risultare coniugati ( $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$ ). La presenza di un doppio legame genera inoltre una condizione di isomeria *cis-trans* e quindi esistono due varianti per ogni punto di insaturazione: in condizioni normali è presente però la sola forma *cis*. [47, 54-55, 59].

Un'altra classificazione, basata sulla lunghezza della catena e indipendente dalla presenza o meno di doppi legami, raggruppa gli acidi grassi in tre categorie:

1. gli acidi grassi a catena corta o SCFA (*Short-Chain Fatty Acids*), con un numero di atomi di carbonio inferiore a 6;
2. gli acidi grassi a media catena o MCFA (*Medium-Chain Fatty Acids*), recanti da 6 a 12 atomi di carbonio;
3. gli acidi grassi a lunga catena o LCFA (*Long-Chain Fatty Acids*), con più di 12 atomi di carbonio.

L'attribuzione di un dato acido grasso a una di queste classi è piuttosto arbitraria, soprattutto per quanto riguarda le catene che si collocano al limite tra una categoria e la successiva, come accade ad esempio per l'acido esanoico, da alcuni considerato un MCFA e da altri un SCFA [59-61]. In questo lavoro verrà considerata la suddivisione indicata sopra, in accordo con Bach [62] e di seguito verranno descritte le caratteristiche degli acidi grassi a media catena.

### 2.3.1. Gli acidi grassi saturi a media catena

In *Tab. 2.2* sono indicati la nomenclatura, la formula, il peso molecolare e le temperature di fusione ed ebollizione degli acidi grassi a media catena considerati in questo lavoro.

*Tabella 2.2. Nomenclatura, formula di struttura compatta e principali proprietà degli acidi grassi a media catena [54-55, 62-64].*

Simbolo	Nome sistematico	Nome comune	Struttura	PM	pf (° C)	pb (° C)
6:0	Acido esanoico	Acido caproico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$	116.16	-3	205
8:0	Acido ottanoico	Acido caprilico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$	144.21	16.7	239
10:0	Acido decanoico	Acido caprico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{COOH}$	172.26	31.6	268.7
12:0	Acido dodecanoico	Acido laurico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$	200.32	44.2	296

L'*acido esanoico* si trova in discreta abbondanza nei grassi di origine animale e appare come un liquido oleoso, il cui odore ricorda quello del formaggio. È impiegato a livello industriale negli alimenti, nei farmaci e nei cosmetici, poiché non presenta alcuna tossicità [65].

L'*acido ottanoico* si trova in natura nelle noci di cocco e nel latte materno. Appare come un liquido oleoso, dal gusto rancido. È poco solubile in acqua ed è utilizzato commercialmente nella produzione di coloranti e di esteri per la profumeria [59, 65-66].

L'*acido decanoico* si trova negli oli e nei grassi animali. Appare come un solido trasparente di colore bianco-giallo e presenta un odore spiacevole. È utilizzato in medicina, nella sintesi organica e nella produzione di profumi e coloranti [65].

L'*acido dodecanoico* è un solido bianco che costituisce il grasso principale della noce di cocco e dell'olio di palmisto. Esso è caratterizzato da una tossicità molto bassa e si ritiene che abbia proprietà antimicrobiche; è utilizzato in saponi e shampoo, nonostante sia leggermente irritante per le membrane mucose [59, 65-66].

Grazie alle contenute dimensioni molecolari e alla forma ionica assunta a pH neutro, gli MCFA sono relativamente solubili nei fluidi biologici: la solubilità in acqua a 20° C è 68 mg/100 mL per il C8:0, contro 0.72 mg/100 mL per il C16:0. La relativa solubilità in acqua e le ridotte dimensioni molecolari hanno conseguenze su tutti i livelli del metabolismo di questi acidi [62].

### 2.3.2. Assorbimento degli MCFA

Gli MCFA provengono dai trigliceridi a media catena (MCT, *Medium-Chain Triglycerides*), che, assieme ai trigliceridi a lunga catena (LCT, *Long-Chain Triglycerides*), costituiscono circa il 90% dei lipidi introdotti con la dieta. La digestione, l'assorbimento e il trasporto di queste sostanze idrofobiche avvengono all'interfaccia tra una fase organica e una fase acquosa, in quanto gli enzimi idrolitici sono solubili in acqua. Pertanto, la velocità di digestione dei triacilgliceroli dipende dall'area della superficie di questa interfaccia ed è promossa dall'attività emulsionante degli acidi biliari, molecole anfipatiche in grado di solubilizzare i globuli di grasso [67]. L'enzima che catalizza l'idrolisi dei triacilgliceroli è la *lipasi pancreatica* (o *triacilglicerolo lipasi*). Essa può agire su tutti i tipi di trigliceridi, ma idrolizza più velocemente gli MCT, a causa del minore peso molecolare. La loro idrolisi è quindi più completa rispetto a quella degli LCT, e gli MCFA che ne derivano vengono pertanto assorbiti in maniera più veloce [61-62, 67].

La miscela di acidi grassi (per lo più a media catena) e di mono- e digliceridi (a lunga catena) prodotti dalla digestione lipidica è assorbita dalle cellule che rivestono l'intestino tenue. Qui gli acidi grassi formano complessi con la FABP (*Fatty Acid-Binding Protein*), una proteina citoplasmatica che lega gli acidi grassi, aumentandone la solubilità e rendendoli innocui per la cellula, che altrimenti potrebbe dissociarsi a causa del loro effetto detergente. Sempre nella mucosa intestinale, l'*acil-CoA sintetasi* converte gli acidi grassi in acil-CoA, che poi verranno riesterificati per l'immagazzinamento in forma di trigliceridi. Questo enzima è specifico per catene idrocarburiche con più di 12 atomi di carbonio, quindi agisce preferenzialmente sugli LCFA, lasciando inalterati gli MCFA. Gli acil-CoA a lunga catena sono quindi ritrasformati in triacilgliceroli, mentre la riesterificazione non avviene per gli MCFA, che quindi lasciano l'intestino più velocemente immettendosi direttamente nel sistema venoso portale, dove il legame con l'albumina serica ne facilita il trasporto. Di conseguenza, essi raggiungono velocemente il fegato, senza essere trattenuti dai tessuti extraepatici,

come invece accade per gli LCFA [61-62, 67]. A sfavorire ulteriormente l'esterificazione degli MCFA contribuisce anche il fatto che essi, a differenza degli LCFA, non sono in grado di legarsi alla FABP ed è stato dimostrato che l'affinità di binding dei substrati verso questa proteina è direttamente proporzionale alla loro tendenza all'esterificazione [61-62, 67].

### 2.3.3. Metabolismo degli MCFA

A seconda del fabbisogno energetico dell'organismo, le reazioni metaboliche cui prendono parte gli acidi grassi possono essere anaboliche (biosintesi) o cataboliche ( $\beta$ -ossidazione). Esse avvengono negli adipociti: il citosol è la sede della biosintesi, mentre la  $\beta$ -ossidazione è effettuata nei mitocondri. I due processi sono fisicamente separati per evitare che si verifichi la distruzione degli acidi grassi biosintetizzati.

Gli MCFA, per poter partecipare ai processi metabolici, devono essere attivati ad esteri tiolici mediante la reazione con il nucleotide complesso Coenzima A (CoA) o con la piccola proteina ACP (*Acyl Carrier Protein*). Mediante questa derivatizzazione si forma un legame tioestere ad alta energia tra l'acido grasso e il gruppo -SH del coenzima, e le catene aciliche diventano idrosolubili [54].

Nelle cellule viventi, l'attivazione può essere catalizzata da tre tiochinasi che differiscono per la lunghezza della catena acilica su cui agiscono. Quelle coinvolte nell'attivazione degli MCFA sono la *tiochinasi generale* e la *tiochinasi per acidi grassi a lunga catena* [54, 67]. La reazione di acilazione ATP-dipendente catalizzata dalle tiochinasi è la seguente [67]:



#### 2.3.3.1. $\beta$ -ossidazione degli MCFA

Una volta arrivati al fegato, gli MCFA provenienti dal circolo sanguigno vengono attivati nel citosol degli epatociti per poi seguire la via catabolica della  $\beta$ -ossidazione, al fine di produrre energia metabolica all'interno dei mitocondri [59, 61, 67]. Una volta raggiunta la matrice mitocondriale, gli MCFA sono attivati ad acil-CoA per mezzo dell'*acil-CoA sintetasi* [61-62, 67]: vengono prodotti così numerosi acil-CoA di lunghezza diversa, pronti a subire la  $\beta$ -ossidazione ad acetil-CoA. Data la facilità con cui gli MCFA sono in grado di raggiungere la matrice mitocondriale, essi vengono ossidati più rapidamente rispetto agli acidi grassi a catena più lunga [61-62].

Ciascun ciclo di  $\beta$ -ossidazione produce un NADH, un FADH<sub>2</sub> e un acetil-CoA. Quest'ultimo può poi seguire diverse vie metaboliche, sia nei mitocondri (dove entra nel ciclo di Krebs o è utilizzato per l'allungamento degli acidi grassi) sia nel citosol (dove prende parte alla sintesi *de novo* di acidi grassi e colesterolo) [62, 67]. Dalla  $\beta$ -ossidazione degli acidi grassi vengono originate anche molte molecole di ATP, nelle quali è immagazzinata l'energia che si sviluppa durante questo processo fortemente esoergonico [67].

#### 2.3.3.2. Biosintesi degli MCFA

Oltre ad essere assunti attraverso l'alimentazione, gli acidi grassi sono anche sintetizzati *de novo* dall'*acido grasso sintasi* situata nel citosol. Questo complesso enzimatico permette la sintesi di una catena carboniosa satura fino a 16 atomi di carbonio

(corrispondente all'acido palmitico), attraverso una serie di condensazioni successive di unità a due atomi di carbonio [47, 54, 59, 67].

La prima reazione di questo ciclo biosintetico è catalizzata dall'acetil-CoA carbossilasi e prevede l'attivazione della  $\text{CO}_2$  seguita dalla carbossilazione dell'acetil-CoA che porta alla formazione del malonil-CoA, un  $\beta$ -chetoestere a tre atomi di carbonio connesso al CoA mediante un legame tioestere (Fig. 2.1) [67].

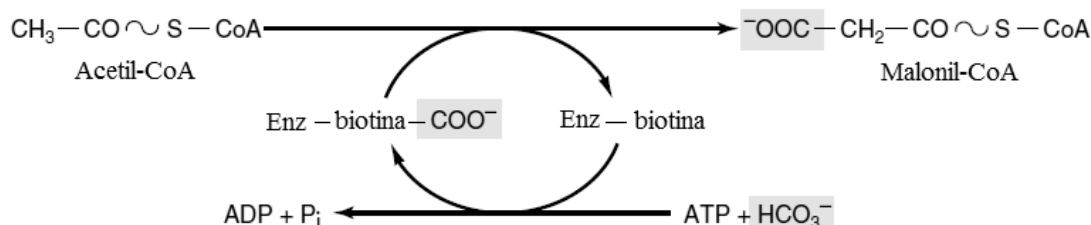


Fig. 2.1. Sintesi del malonil-CoA (figura tratta da [68]e adattata).

Il malonil-CoA e l'acetil-CoA costituiscono i substrati per il primo enzima coinvolto nella biosintesi degli acidi grassi, la malonil/acetil-CoA transacetilasi, la cui funzione è quella di sostituire il CoA con la proteina ACP, la quale è parte integrante del complesso plurienzimatico dell'acido grasso sintasi e costituisce il sito di ancoraggio della catena di acido grasso in formazione. Successivamente, la  $\beta$ -chetoacil-ACP sintasi agisce sull'acetil-ACP e sul malonil-ACP così prodotti, favorendo in primo luogo il trasferimento del gruppo acetilico dall'ACP a un residuo di Cys dell'enzima, e successivamente la sua condensazione con il malonil-ACP (Fig. 2.2). Questo subisce infatti la decarbossilazione, e il carbanione che ne risulta attacca l'acetil-tioestere, formando un  $\beta$ -chetoacetil-ACP a quattro atomi di carbonio [67]. Dopodiché, due riduzioni intervallate da una deidratazione trasformano il gruppo  $\beta$ -chetonico in un gruppo alchilico, allungato di un unità  $\text{C}_2$  rispetto al composto di partenza [67]. Questo gruppo butirrico viene poi trasferito dall'ACP al gruppo Cys-SH dell'enzima, in modo da poter essere ulteriormente allungato mediante altri cicli analoghi a quello appena descritto.

Giunta al palmitil-ACP (con 16 atomi di carbonio), la biosintesi si blocca e avviene l'idrolisi del legame tioestere catalizzata dalla palmitil-tioesterasi che sintetizza il palmitato, il prodotto finale della via biosintetica degli acidi grassi. Successivamente, una specifica elongasi consente, per aggiunta di un'unità bicarboniosa, l'ulteriore allungamento della catena fino a 18 atomi di carbonio (corrispondente all'acido stearico) [47, 67].

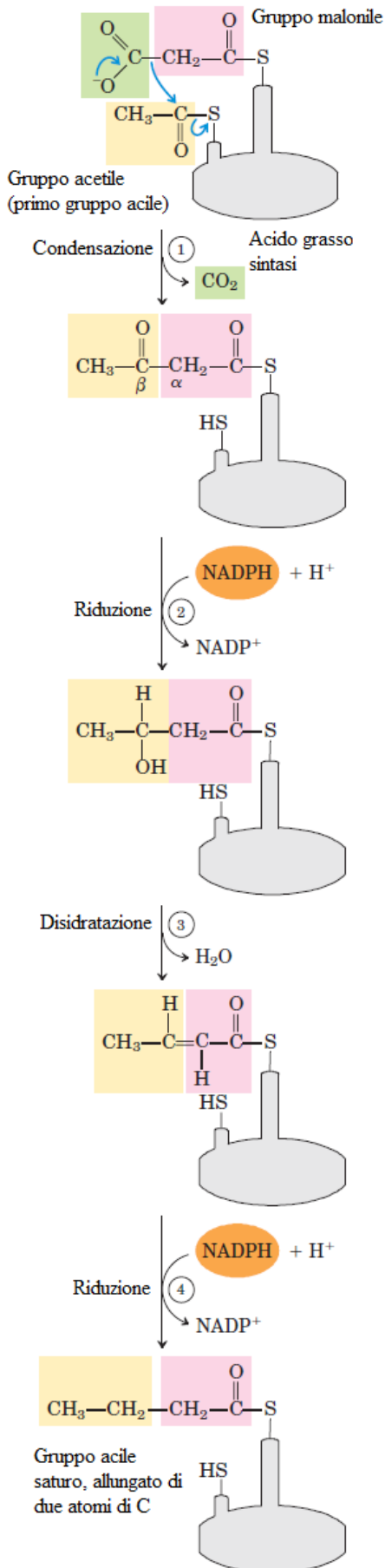


Fig. 2.2. Biosintesi degli acidi grassi: 1) la condensazione di un gruppo acile attivato e del malonil-CoA, con eliminazione di  $\text{CO}_2$  dal gruppo malonile, estende la catena acilica di due atomi di carbonio; 2) il  $\beta$ -chetoacil-ACP così prodotto è ridotto ad alcol; 3) l'eliminazione di acqua crea un doppio legame; 4) il doppio legame è ridotto per formare il gruppo acilico saturo corrispondente (figura tratta da [69] e adattata).

## 2.4. Lipidomica nel cancro colorettales

Il riscontro di anomalie nel metabolismo dei lipidi in corrispondenza ad alcune malattie apre la possibilità di identificare dei possibili biomarcatori tra i composti appartenenti a questa classe di biomolecole. Effettuando un confronto tra i profili lipidici di persone malate con quelli di persone sane è possibile identificare quelle specie che manifestano un'espressione alterata e che possono essere utili per la diagnosi e il trattamento della malattia [57].

Tra le malattie più studiate dalla ricerca vi è sicuramente il cancro, a causa dell'elevata mortalità cui è associato e dell'assenza di cure efficaci e durature. Variazioni nel metabolismo delle cellule cancerose possono implicare il rilascio di metaboliti in tutto l'organismo. Il riscontro di queste sostanze può dunque non solo condurre ad una diagnosi precoce, ma anche mettere in luce il potenziale invasivo del tumore o la probabilità che si sviluppino metastasi [49].

La maggior parte dei metaboliti può essere valutata analizzando i biofluidi. I lipidi possono infatti essere estratti da campioni biologici (quali sangue, plasma e siero), che si possono ottenere senza ricorrere a metodiche troppo invasive. Questa caratteristica assume una notevole importanza nel caso specifico del cancro colorettales: per questa patologia, infatti, la tecnica diagnostica di riferimento è la colonscopia, metodica particolarmente invasiva e poco accettata dal paziente, che tende quindi a non sottoporvisi, ritardando così la diagnosi e peggiorando la prognosi. La possibilità di diagnosticare questo tipo di tumore attraverso un semplice esame del sangue costituirebbe un'innovazione dai numerosi benefici sia nella diagnosi che nella prevenzione. Per questo motivo, molti gruppi di ricerca si sono dedicati

allo studio di metaboliti che presentano alterazioni in caso di cancro, ottenendo, in alcuni casi, delle presunte associazioni. Ad esempio, Swachowicz-Petelska *et al.* hanno dimostrato che, in caso di CRC, la trasformazione maligna è accompagnata da una diminuzione dei livelli nel plasma di acido linoleico e di acido  $\alpha$ -linolenico e da un corrispettivo aumento delle concentrazioni degli acidi oleico e arachidonico. Yamada *et al.* hanno invece riscontrato un aumento dei livelli dei trigliceridi nel siero in corrispondenza di questo carcinoma, in particolare nella forma *in situ*. Oltre a ciò, lo stesso gruppo di ricerca ha trovato un'associazione significativa tra i livelli totali di colesterolo nel siero e il rischio di carcinoma coloretale. Zhao *et al.* hanno invece effettuato uno studio sui lisofosfolipidi nel CRC, da cui hanno riscontrato che i livelli plasmatici di varie lisofosfatidilcoline (LPC), tra cui la 18:1-LPC e la 18:2-LPC, diminuiscono notevolmente nei pazienti malati rispetto ai controlli sani, suggerendo l'utilizzo di questa categoria di lipidi come biomarcatori per la diagnosi di questa forma di cancro. Altri possibili biomarcatori per il CRC potrebbero essere i glicosfingolipidi, come proposto da Ono *et al.*. Tan, Zhang, Ahn *et al.* suggeriscono invece l'utilizzo terapeutico di alcune ceramidi in grado di indurre l'apoptosi nelle cellule maligne del cancro coloretale [47, 49, 57, 70].

Li *et al.* hanno identificato l'espressione lipidica anomala di 15 metaboliti che hanno classificato in quattro classi in base al trend di variazione nella progressione del CRC. Queste sostanze (che includono anche gli acidi esadecanedioico, octadecanoico e miristico, oltre a diversi tipi di LCP, tra cui la 18:2) presentano un'eccellente accuratezza diagnostica, dimostrandosi in grado di differenziare i pazienti in stadio precoce da quelli sani in modo molto migliore rispetto all'antigene carcinoembrionico (CEA). Si tratta di un gruppo di marcatori dalle prospettive promettenti, ma sono necessari altri studi per l'applicazione clinica e per arrivare alla comprensione delle alterazioni biologiche responsabili di queste evidenze [71].

Da tutti questi studi emerge quindi il notevole potenziale dei lipidi sia nella diagnosi che nel trattamento del cancro coloretale. Data la notevole importanza degli studi di lipidomica in questo settore, numerose tecniche analitiche sono state sviluppate al fine di ottenere non solo profili lipidici più accurati, ma anche la quantificazione di queste specie nei campioni biologici, dove possono essere presenti a livelli molto bassi [49].

## 2.5. Metodologie analitiche per la lipidomica

La maggior parte delle tecniche di laboratorio disponibili per l'individuazione e la successiva quantificazione dei lipidi in un campione biologico prevedono la preliminare estrazione dei lipidi mediante solventi organici. Successivamente, le diverse componenti dell'estratto lipidico devono essere separate in modo da identificarle e quantificarle individualmente mediante l'impiego di idonei metodi di rivelazione [47].

### 2.5.1. Estrazione dei lipidi

L'estrazione dei lipidi precedente all'analisi è indispensabile al fine di isolarli dalla matrice e di rimuovere eventuali fonti di interferenza, come proteine e zuccheri. Il metodo più efficiente è l'estrazione liquido-liquido (LLE, *Liquid-Liquid Extraction*) proposta da Folch nel 1957, che prevede l'utilizzo di una miscela cloroformio/metanolo (2:1, v/v). Successivamente sono state individuate altre miscele effica-



ci, mirate all'utilizzo di solventi meno tossici o a favorire l'estrazione preferenziale di una determinata classe di lipidi [55, 57-58].

## **2.5.2. Analisi dei lipidi**

Data la marcata eterogeneità dei lipidi, è impossibile caratterizzarli tutti ricorrendo ad un unico strumento. Per questo motivo, negli anni, si sono sviluppate diverse tecniche analitiche, ognuna specifica per una data classe di lipidi o per un particolare approccio d'analisi. Esse possono essere suddivise in tre categorie principali:

1. infusione diretta in spettrometria di massa;
2. cromatografia;
3. spettroscopia [58].

### **2.5.2.1. Tecniche di infusione diretta in spettrometria di massa**

Le tecniche di infusione diretta (FIA, *Flow Injection Analysis*) in spettrometria di massa sono metodi analitici che non richiedono una separazione preliminare della miscela da analizzare. Esse sono accurate, riproducibili, molto sensibili e più veloci rispetto ad altre tecniche, e pertanto esse sono le più ampiamente utilizzate nello studio della lipidomica [58]. Le più diffuse sono la ionizzazione elettrospray (ESI, *ElectroSpray Ionization*) e la ionizzazione per desorbimento laser assistito da matrice (MALDI, *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization*). A queste si affiancano altre tecniche, sviluppatesi più di recente, quali la ionizzazione chimica a pressione atmosferica (APCI, *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*), la fotoionizzazione a pressione atmosferica (APPI, *Atmospheric Pressure PhotoIonization*), il desorbimento per ionizzazione elettrospray (DESI, *Desorption ElectroSpray Ionization*), la ionizzazione per analisi diretta in tempo reale (DART, *Direct Analysis in Real Time*) e la *Paper Spray* (PS) [47, 53, 58].

Queste tecniche sono molto utili nell'analisi dei lipidi, ma presentano alcuni svantaggi: sono soggette all'effetto matrice, che può indurre la soppressione o l'innalzamento del segnale e permettono la determinazione specifica mediante spettrometria di massa tandem (MS/MS) solamente di pochi analiti per volta.

### **2.5.2.2. Tecniche di cromatografia**

Nei casi in cui l'analisi richieda la separazione delle varie componenti lipidiche del campione biologico, si ricorre in genere alla cromatografia, che racchiude al suo interno diverse tecniche valide per la lipidomica. Esse comprendono la cromatografia su strato sottile (TLC, *Thin-Layer Chromatography*), la gascromatografia (GC, *Gas Chromatography*), la cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC, *High-Performance Liquid Chromatography*) e quella a fluido supercritico (SFC, *Supercritical Fluid Chromatography*). Quando queste metodologie vengono accoppiate alla spettrometria di massa, si ottengono delle tecniche ifenate in grado di fornire informazioni su tutti i lipidi presenti nel campione [53, 58].

### **2.5.2.3. Tecniche spettroscopiche**

Le spettroscopie, che comprendono la risonanza magnetica nucleare (NMR) e la spettroscopia Raman, sono ormai utilizzate molto raramente per l'analisi dei lipidi a causa di alcune limitazioni, come l'incapacità di discriminare molecole individuali in

una miscela complessa, la generazione di spettri complicati e la bassa sensibilità rispetto alla spettrometria di massa [58].

L'NMR è in grado di rispondere a qualsiasi tipo di molecola organica in poco tempo ed è molto utile per investigare la struttura e la dinamica dei lipidi. Purtroppo, però, presenta una risoluzione limitata ed un limite di rivelabilità relativamente elevato (compreso tra  $\mu\text{M}$  e  $\text{mM}$ ) e genera spettri affollati, specie se acquisiti nella monodimensione. Il ricorso all'NMR bidimensionale o tridimensionale potrebbe reindirizzare gli studi di lipidomica verso questa tecnica [53, 58].

La spettroscopia Raman è una valida alternativa per ottenere informazioni chimiche quantitative in maniera non distruttiva e in tempo reale, senza bisogno di manipolare il campione. Viene in genere applicata nello studio di variazioni nei profili lipidici di campioni biologici [58].

### 3. TECNICHE ANALITICHE PER LA LIPIDOMICA

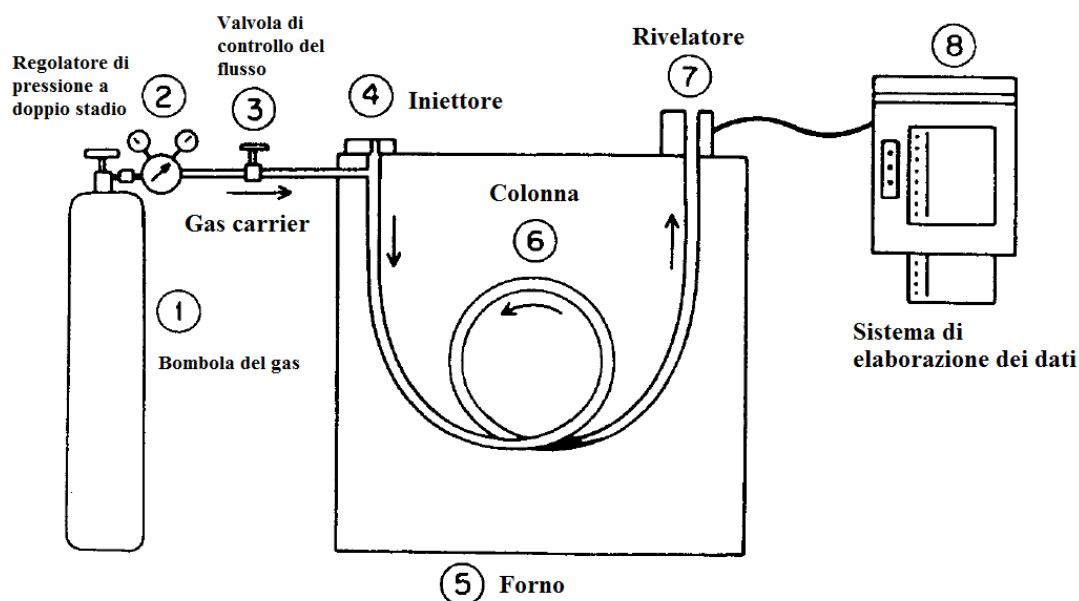
#### 3.1. Introduzione

La lipidomica è lo studio di miscele complesse contenenti analiti appartenenti alle diverse classi lipidiche. Pertanto, una caratteristica fondamentale che una tecnica analitica deve possedere al fine di trovare utilizzo in questo ambito è la selettività, ovvero la capacità di determinare gli analiti in presenza di interferenti nella matrice [72-73].

#### 3.2. La gascromatografia

La gascromatografia (GC, *Gas Chromatography*) è un metodo di separazione che si basa sulla ripartizione del campione tra un letto stazionario con un'ampia area superficiale e una fase mobile gassosa [74].

Lo schema di un gascromatografo è riportato in *Fig. 3.1*. Esso è costituito da un sistema di iniezione ed una colonna capillare, alloggiati in un termostato (o forno), e da un rivelatore e un sistema di elaborazione esterni. Un gas *carrier* inerte fluisce continuamente attraverso l'iniettore, la colonna e il detector [74-75].



*Fig. 3.1. Schema di un gascromatografo (figura tratta da [76] e adattata).*

Per iniettare un campione in fase liquida in una colonna capillare esistono due modalità: *split* e *splitless*. Nella prima, 1  $\mu\text{L}$  di campione viene introdotto nell'iniettore, ma solo una piccola percentuale del vapore che si genera all'interno del *liner* entra nella colonna, mentre la parte restante viene eliminata. La modalità *split* è molto semplice (si basa infatti sull'apertura e la chiusura di un'unica valvola) e garantisce l'ottenimento di separazioni ad alta risoluzione grazie all'elevata velocità di flusso al punto di *split*. Nel caso di analisi in tracce però questo sistema non è utilizzabile ed è più indicata la modalità *splitless*, che prevede l'introduzione in colonna dell'intera aliquota di campione iniettata. In questo modo si ottiene un notevole aumento della sensibilità: in colonna entra infatti una quantità 20-50 volte maggiore di campione e ciò permette la rivelazione di composti presenti in tracce nella miscela [74].

La GC presenta numerosi vantaggi intrinseci:

- analisi veloci (tempo dell'ordine delle decine di minuti);
- alta risoluzione grazie all'utilizzo di colonne capillari efficienti;
- alta sensibilità (è possibile rivelare analiti in concentrazioni dell'ordine dei ppm o dei ppb);
- analisi quantitativa molto accurata ( $RSD \approx 1-5\%$ );
- utilizzo di piccole aliquote di campione (in genere 1-2  $\mu\text{L}$ ).

L'elevata efficienza di separazione delle colonne capillari è dovuta al fatto che esse presentano una bassa resistenza al trasporto di massa rispettivamente nella fase mobile ( $C_m$ ) e nella fase stazionaria ( $C_s$ ), ed in tal modo minimizzano i problemi cinetici che nelle colonne impaccate danno origine ad un notevole allargamento dei picchi. L'equazione che correla l'efficienza (espressa come altezza equivalente del piatto teorico,  $H$ ) coi parametri  $C_m$  e  $C_s$  è l'equazione di Golay (ricavata dall'equazione di van Deemter per il caso specifico delle colonne capillari aperte):

$$H = \frac{B}{u} + C_m \bar{u} + C_s \bar{u} \quad (\text{Eq. 3.1})$$

in cui  $B$  è un termine che tiene conto della diffusione molecolare, ed  $\bar{u}$  è la velocità lineare media del gas *carrier* [74-75, 77]. L'efficienza vera e propria ( $N$ ) si ottiene poi dividendo la lunghezza  $L$  della colonna per  $H$ , secondo l'Eq. 3.2 che fornisce il numero di piatti teorici della colonna:

$$N = \frac{L}{H} \quad (\text{Eq. 3.2})$$

L'elevata efficienza delle colonne capillari è quindi dovuta anche alla loro estrema lunghezza (decine di metri).

L'unica limitazione della GC è che la tecnica è indicata per i soli composti volatili e non termolabili [74]. Per le sostanze che non posseggono queste caratteristiche, si può ricorrere a delle reazioni di derivatizzazione.

### 3.2.1. La gascromatografia veloce (*fast GC*)

Diminuendo la lunghezza della colonna capillare del gascromatografo è possibile disporre di una variante della GC convenzionale, nota come *fast GC*, in grado di effettuare analisi da 5 a 10 volte più veloci.

Dalla definizione di  $N$  (Eq. 3.2) si deduce che un accorciamento della colonna comporta una diminuzione dell'efficienza di separazione. Da ciò derivano due possibili conseguenze: la diminuzione del potere risolvete e l'aumento del rischio di coeluzione dei picchi, soprattutto in caso di matrici complesse. È necessario quindi individuare le condizioni che permettano un buon compromesso tra velocità dell'analisi e qualità dei risultati ottenuti [74]. Dall'Eq. 3.1 si può notare che  $H$  dipende dai parametri  $C_m$  e  $C_s$ , i quali a loro volta presentano una dipendenza quadratica rispettivamente dal diametro interno (I. D., *Internal Diameter*) e dallo spessore del film. Pertanto, diminuendo il valore di questi due parametri ed aumentando la velocità del gas di trasporto, si possono controbilanciare gli effetti negativi derivanti dall'utilizzo di una colonna più corta, mantenendo un'ottima efficienza di separazione [74, 77].

Si deve però evidenziare che le modifiche sopra descritte provocano anche la diminuzione della massa di fase liquida in colonna e una conseguente riduzione della ca-

pacità di carico. Oltre a ciò, il restringimento del diametro interno richiede anche l'utilizzo di pressioni più elevate all'ingresso della colonna. Per ovviare a questi problemi è necessario ottimizzare l'iniettore, che deve essere più veloce al fine di minimizzare l'allargamento di banda e capace di introdurre piccole quantità di campione. Questo si traduce in elevati rapporti di *split*, *liner* più piccoli per le iniezioni *splitless* e iniezioni a pressione pulsata per evitare di sovraccaricare il sistema. Il ricorso a rapporti di *split* troppo alti può incidere tuttavia sul limite di rivelabilità, ovvero sulla concentrazione minima di analita che può essere rivelata ad un livello di fiducia noto [73-74].

### 3.2.2. Utilizzo della gascromatografia in lipidomica

La GC convenzionale rappresenta la tecnica analitica di scelta per la determinazione degli acidi grassi, dopo la loro derivatizzazione ad esteri metilici. Quest'ultima è necessaria in quanto la maggior parte dei lipidi ha una bassa volatilità e una certa tendenza a degradare alle alte temperature. La loro separazione cromatografica mediante GC convenzionale può essere però dispendiosa in termini di tempo: una corsa può richiedere fino a 30-60 minuti [58, 74].

La *fast GC*, che comporta l'utilizzo di colonne lunghe 10 m e aventi diametro interno di 100  $\mu\text{m}$ , rappresenta un'alternativa migliore della GC convenzionale, poiché permette di ottenere una risoluzione equivalente in un tempo di analisi molto più breve. Garantisce inoltre gli stessi livelli di ripetibilità, linearità e risoluzione [74].

### 3.3. La cromatografia liquida

La cromatografia liquida (LC) è una tecnica di separazione alternativa alla gascromatografia. Sebbene essa presenti sostanzialmente gli stessi componenti della GC, le due tecniche hanno notevolissime differenze. Innanzitutto, gli analiti sono disciolti in soluzione e non sono in fase gas; il *carrier*, a sua volta, è una soluzione, per cui interagisce con gli analiti sottoponendoli ad equilibri di ripartizione con la fase stazionaria. Per poter migliorare l'efficienza, è stata introdotta la tecnica HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) che richiede l'uso di colonne impaccate aventi particelle molto piccole, ed opera generando pressioni molto elevate, dell'ordine del centinaio di bar. Le efficienze che si ottengono permangono inferiori a quelle della GC; in cambio, tuttavia, l'HPLC offre una notevole capacità di modificare le proprietà di eluizione delle sostanze, intervenendo sulla composizione di fase mobile e fase stazionaria, e permette l'analisi di composti termolabili, ionici e non volatili, che invece la GC non è in grado di analizzare. Inoltre, i sistemi HPLC sono isolati dall'ambiente, e ciò può risultare molto utile in quanto, evitando il contatto tra il campione e l'aria, si prevengono anche l'ossidazione e la degradazione di composti instabili in presenza di  $\text{O}_2$ , quali ad esempio molti lipidi.

Per tutte queste ragioni, anche l'HPLC è una tecnica di separazione molto utilizzata in lipidomica. Per l'analisi dei lipidi si ricorre all'utilizzo sia della fase normale (NPLC, *Normal-Phase Liquid Chromatography*), sia della fase inversa (RPLC, *Reverse-Phase Liquid Chromatography*). La prima presenta una fase stazionaria fortemente polare (costituita da glicole etilenico o acqua) ed una fase mobile non polare come l'esano. Pertanto essa viene utilizzata per separare classi diverse di lipidi in base alle loro teste polari. La cromatografia a fase inversa è costituita invece da una fase stazionaria non polare (spesso un idrocarburo) ed utilizza un solvente polare come fase mobile (ad esempio acqua, metanolo o acetonitrile). Ne consegue che essa è in

grado di separare i lipidi in base alle diverse catene idrocarburiche degli acidi grassi che li costituiscono [58, 75].

### 3.4. La spettrometria di massa

Uno spettrometro di massa è uno strumento che misura il rapporto massa/carica ( $m/z$ ) di molecole ionizzate in fase gassosa. Esso è costituito da una sorgente ionica, un analizzatore ed un rivelatore (o detector). Uno schema a blocchi delle componenti che costituiscono uno spettrometro di massa è riportato in Fig. 3.2.

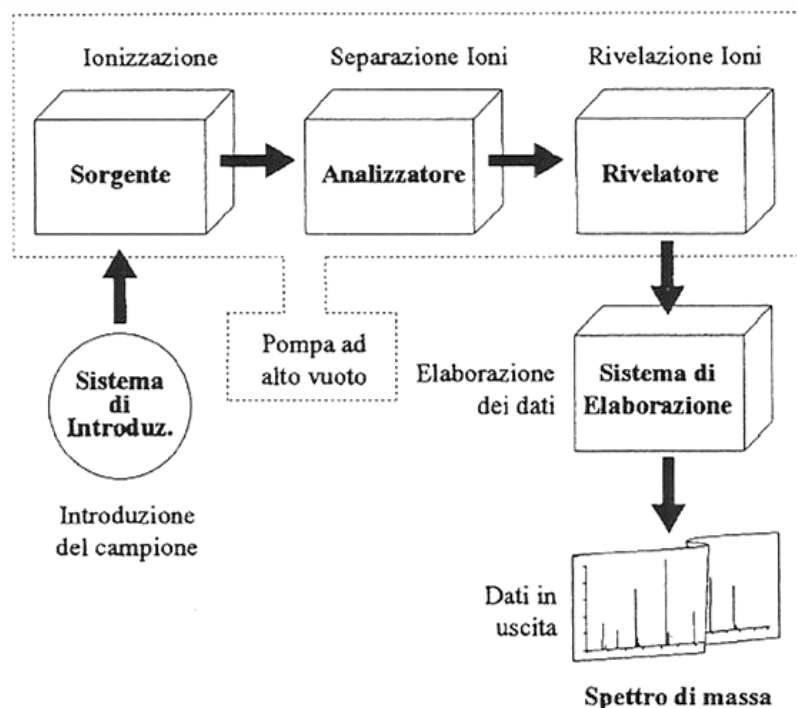


Fig. 3.2. Schema a blocchi di uno spettrometro di massa (figura tratta da [78]).

Una caratteristica di questi strumenti è la necessità di un complesso sistema ad alto vuoto che mantenga bassi valori di pressione (da  $10^{-4}$  a  $10^{-8}$  torr) in tutte le componenti dello strumento, in modo da permettere agli ioni di muoversi e di rendere meno frequenti le loro collisioni [79].

#### 3.4.1. Sorgenti ioniche

Le più comuni sorgenti di ioni utilizzate come interfaccia tra la cromatografia (liquida o gassosa) e la spettrometria di massa sono la ionizzazione ad impatto elettronico (EI, *Electron Ionization*), la ionizzazione chimica (CI, *Chemical Ionization*) e le sorgenti ioniche a pressione atmosferica (ESI, APCI, APPI). In Fig. 3.3 sono illustrati i loro range di applicabilità sulla base del peso molecolare e del grado di polarità della sostanza da analizzare. Si può notare come l'EI sia particolarmente adatta per molecole piccole e apolari e costituisce l'interfaccia di elezione per l'accoppiamento GC-MS. Per analiti più polari è necessario ricorrere alla cromatografia liquida accoppiata allo spettrometro di massa mediante APCI per molecole mediamente polari o ESI per molecole altamente polari. Quest'ultimo tipo di sorgente permette anche l'analisi di composti ad elevato peso molecolare grazie alla sua capacità di generare ioni multi-carica.

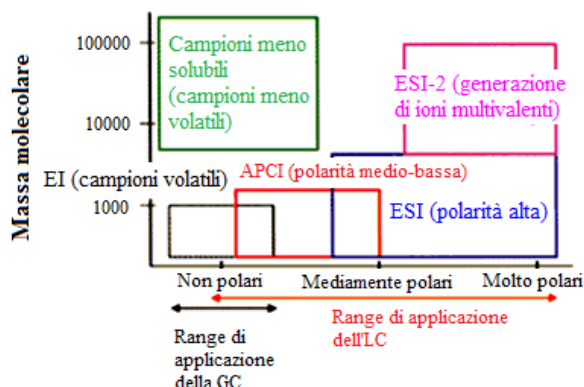


Fig. 3.3. Range di applicabilità delle diverse sorgenti di ioni sulla base del peso molecolare e della polarità degli analiti (figura tratta da [80] e adattata).

### 3.4.1.1. EI e CI

La sorgente EI permette di produrre una miscela di ioni positivi, negativi e specie neutre bombardando le molecole gassose con elettroni aventi un'energia di 70 eV. La principale reazione che avviene tra gli elettroni e una molecola M è quella che porta alla produzione di un radicale catione [78, 81]:



Dato che l'energia degli elettroni utilizzati è molto superiore a quella dei legami della molecola, il radicale catione  $M^{\bullet+}$  tende a frammentarsi per diminuire la propria energia interna, dando origine ad altri ioni. La ionizzazione con elettroni accelerati da un potenziale di 70 V è un metodo ad alta energia (ionizzazione *hard*) che porta ad un'estesa frammentazione, con frequente scomparsa dello ione molecolare [78].

La CI è invece una tecnica di ionizzazione a più bassa energia (*soft*). Le molecole di campione vengono esposte ad un eccesso di gas reagente ionizzato (ad esempio metano o ammoniaca): il trasferimento di un protone a una molecola M del campione da parte di questo gas produce uno ione positivo protonato  $[M+H]^+$  [78].

### 3.4.1.2. Sorgenti API (*Atmospheric Pressure Ionization*)

Le sorgenti API (*Atmospheric Pressure Ionization*), costituite da ESI, APCI e APPI, vengono utilizzate per interfacciare la cromatografia liquida con la spettrometria di massa.

La tecnica elettrospray (ESI) permette di introdurre soluzioni nello spettrometro ed è in grado di ionizzare composti molto polari e non volatili [82]. I meccanismi alla base del processo di ionizzazione non sono ancora del tutto chiari, ma si possono definire quattro passaggi fondamentali: nebulizzazione, desolvatazione, evaporazione e liberazione degli ioni. Inizialmente, la soluzione da analizzare passa attraverso un capillare mantenuto ad un potenziale elevato (nell'ordine dei kV) che promuove la formazione di uno spray fine di goccioline cariche sulla superficie, per azione di campi elettrostatici. Le goccioline sono sottoposte a riscaldamento mediante l'uso di un gas ( $N_2$ ), che porta alla parziale evaporazione del solvente. Ciò diminuisce sensibilmente le dimensioni delle goccioline, che però mantengono la stessa carica. Quan-

do la forza di Coulomb eguaglia la tensione superficiale, le goccioline esplodono, liberando gli ioni di analita (*esplosione coulombiana*) [78, 81-82].

L'APCI (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*) è una tecnica di ionizzazione che usa reazioni ione-molecola in fase gas a pressione atmosferica: è quindi simile alla CI, solo che gli ioni primari che reagiscono con le molecole di analita sono prodotti da una scarica a corona [81, 83].

L'APCI richiede che l'analita sia in fase gassosa per essere ionizzato e pertanto opera a temperature molto elevate (200-5000 °C). Per questo motivo la soluzione è fatta fluire attraverso un nebulizzatore riscaldato dove viene creato uno spray fine. Questo passa quindi attraverso un tubo in ceramica anch'esso riscaldato, che favorisce l'evaporazione del solvente. La miscela gas/vapore risultante passa attraverso un campo elettrico generato da una scarica a corona, dove il solvente, in concentrazione più elevata, viene ionizzato fungendo così da gas reagente; questi ioni, a loro volta, ionizzano l'analita attraverso reazioni ione-molecola in fase gas. [78, 81, 83].

La sorgente APPI (*Atmospheric Pressure PhotoIonization*) utilizza fotoni per ionizzare molecole in fase gas [83-84]. Il campione in soluzione è vaporizzato da un nebulizzatore riscaldato simile a quello dell'APCI e, dopo la vaporizzazione, l'analita interagisce con i fotoni emessi da una lampada UV, i quali inducono una serie di reazioni in fase gas che portano alla ionizzazione delle molecole. Questa tecnica è generalmente utilizzata per analiti non polari, che vengono ionizzati con difficoltà da ESI e APCI. Le lampade UV impiegate (generalmente al Kr) forniscono fotoni con energia maggiore dei potenziali di ionizzazione degli analiti, ma minore di quelli del gas atmosferico e del solvente utilizzato. Questo permette di non ionizzare il solvente, diminuendo quindi il rumore di fondo: vengono infatti prodotti selettivamente i soli ioni dell'analita. L'efficienza di ionizzazione è però bassa in quanto esiste la possibilità che i fotoni vengano assorbiti dalle molecole di solvente, provocandone la fotoeccitazione senza ionizzazione. Dalla sorgente APPI possono emergere sia il catione radicale  $M^+$ , sia lo ione protonato  $[M+H]^+$  derivante dall'estrazione di un protone dal solvente ad opera dell'analita [83-84].

### 3.4.1.3. Nuove metodologie

Recentemente, nuove tecniche di ionizzazione sono state introdotte con lo scopo di effettuare analisi rapide senza la necessità di effettuare la separazione cromatografica.

La ionizzazione ad elettrospray per desorbimento (DESI, *Desorption ElectroSpray Ionization*) è un metodo che si basa sugli stessi principi dell'ESI e che può essere utilizzata per l'analisi di campioni solidi. Questa metodologia prevede innanzitutto la ionizzazione del solvente tramite una sorgente ESI, che porta alla produzione di uno spray fine di gocce cariche. Queste sono inviate da un getto di gas nebulizzante verso la superficie del campione da analizzare, dove favoriscono, dapprima, il desorbimento delle particelle del campione e, successivamente, la loro ionizzazione [83, 85-86].

La tecnica DART (*Direct Analysis in Real Time*) permette l'utilizzo della spettrometria di massa per analizzare istantaneamente gas, liquidi e solidi in aria e al potenziale di terra, a temperatura e pressioni ambientali, senza la necessità di una preparazione preliminare del campione [83, 87]. Nella sorgente, un gas dal potenziale di ionizzazione elevato (solitamente  $N_2$  o He) viene introdotto in una camera dove viene colpi-



to da un fascio di elettroni generato dall'applicazione di un potenziale tra due elettrodi. Di conseguenza, si viene a formare un plasma di atomi e ioni allo stato eccitato. Questa miscela attraversa una serie di elettrodi progettati per rimuovere qualsiasi specie carica lasciando invece passare le molecole neutre di gas. Queste interagiscono con il campione, favorendo il desorbimento e la ionizzazione delle molecole di analita [83, 85, 87]. Il meccanismo di desorbimento non è noto: esso potrebbe essere di tipo termico, oppure potrebbe coinvolgere il trasferimento di energia verso la superficie da parte di atomi e molecole metastabili [83]. Anche i meccanismi di ionizzazione possono essere diversi. Nella modalità a ioni positivi, il gas eccitato trasferisce energia all'analita, formando così il catione radicale (processo noto come *ionizzazione di Penning*) [83]:



La tecnica della *Paper Spray* (PS) è una nuova tecnica di ionizzazione a pressione atmosferica che presenta caratteristiche comuni sia con l'ESI, sia con la DESI e la DART, ed è molto utile per effettuare analisi qualitative e quantitative veloci di miscele complesse [88-89]. Innanzitutto, pochi microlitri di campione sono depositati su un pezzo di carta a forma di triangolo isoscele. Nell'eventualità che il campione sia liquido, esso deve essere asciugato sulla carta prima di procedere con l'analisi. Dopodiché la carta viene posta esattamente di fronte allo spettrometro di massa e si procede con l'aggiunta di una piccola quantità di solvente: la carta così bagnata diventa un conduttore e, per applicazione di un voltaggio elevato, si ottiene la ionizzazione del campione [88, 90].

Questa tecnica permette di analizzare un vasto numero di molecole, tra cui ormoni, lipidi e proteine. Inoltre può essere utilizzata per l'analisi diretta di fluidi biologici come il sangue intero e l'urina [88, 90].

### 3.4.2. Gli analizzatori di massa

Negli spettrometri di massa, la separazione degli ioni viene effettuata dagli analizzatori di massa, che possono essere di diverso tipo. I più ampiamente utilizzati sono il filtro di massa a quadrupolo, la trappola ionica e il tempo di volo (TOF, *Time Of Flight*) [81, 84].

Il filtro di massa a quadrupolo e la trappola ionica si basano entrambi sul concetto che ioni di diverso rapporto  $m/z$  interagiscono in maniera diversa con campi elettrici alternati, generati da potenziali di forma  $U + V \cos \omega t$  su ogni coppia di barre [81, 84].

Il filtro di massa quadrupolare è fisicamente costituito da quattro barre disposte parallelamente, cui è applicato il potenziale  $U \pm V \cos \omega t$ , che genera un campo quadrupolare [81]. Gli ioni che entrano nel sistema oscillano nelle direzioni  $x$  e  $y$  per azione di questo campo [84]. Solo per specifici valori di  $U$  e di  $V$ , uno ione di un dato rapporto  $m/z$  riesce a seguire una traiettoria stabile all'interno dello spazio compreso tra le barre, raggiungendo così il rivelatore. Per valori diversi, quello stesso ione non è invece in grado di seguire una traiettoria stabile e si scarica perciò sulle barre [81, 84]. Effettuando quindi una scansione dei potenziali  $U$  e  $V$ , mantenendo il rapporto  $U/V$  costante, è possibile selezionare di volta in volta ioni con diverso rapporto  $m/z$ . [78].

L'altro analizzatore quadrupolare, la trappola ionica, consiste di tre elettrodi a simmetria cilindrica: applicando un potenziale  $U + V \cos \omega t$  all'elettrodo intermedio (elettrodo anulare) e ponendo gli altri due al potenziale di terra ( $V = 0$ ), si genera un campo quadrupolare e gli ioni all'interno della trappola seguono traiettorie confinate in una

regione di spazio ben definita. Effettuando una scansione di  $V$ , vengono espulsi sequenzialmente tutti gli ioni [81, 84]. Due successive evoluzioni di questo sistema sono date dalla trappola ionica lineare (LIT, *Linear Ion Trap*) e dalla trappola elettrostatica o Orbitrap [91].

Il principio di funzionamento del TOF è invece totalmente differente. Tale analizzatore consiste in un tubo sotto vuoto privo di campi, situato a metà strada tra la sorgente ionica e il rivelatore (Fig. 3.4) [81, 84].

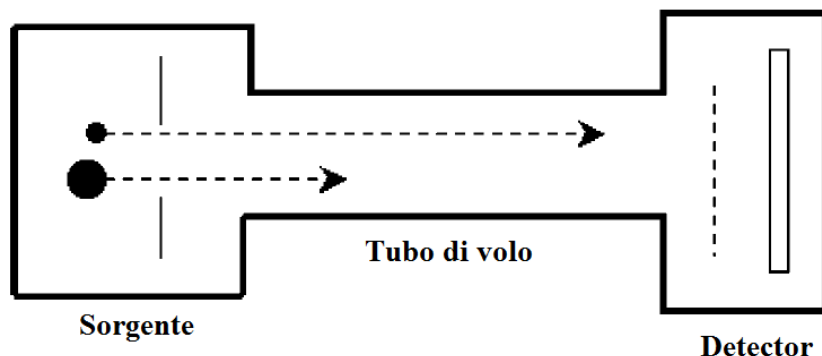


Fig. 3.4. Schema di un analizzatore a tempo di volo lineare (figura tratta da [84] e adattata).

Gli analizzatori TOF separano gli ioni con diverso  $m/z$  sulla base della velocità con cui essi viaggiano nel tubo di volo, dopo essere stati accelerati da un campo elettrico  $V$ . L'energia potenziale ( $E_p$ ) degli ioni espulsi dalla sorgente ionica viene completamente convertita in energia cinetica, per cui le due rispettive equazioni si possono eguagliare:

$$E_k = \frac{mv^2}{2} = qV = zeV = E_p \quad (\text{Eq. 3.5})$$

dove  $m$  è la massa di un dato ione e  $q$  la sua carica, equivalente a  $ze$  [81, 91]. Riarrangiando si ottiene che la velocità è uguale a:

$$v = \sqrt{\frac{2zeV}{m}} \quad (\text{Eq. 3.6})$$

Dopo l'accelerazione iniziale, lo ione viaggia in linea retta a velocità costante verso il rivelatore. Il tempo  $t$  necessario a percorrere la distanza  $L$  prima di raggiungere il detector è:

$$t = \frac{L}{v} = \sqrt{\frac{mL^2}{2zeV}} \quad (\text{Eq. 3.7})$$

Da misure di  $t$  è quindi possibile ricavare il rapporto  $m/z$  se  $V$  ed  $L$  sono noti. L'Eq. 3.7 mostra anche che minore è il rapporto  $m/z$  dello ione, più velocemente esso è in grado di raggiungere il detector [81, 91].

Sebbene il TOF non abbia ancora risoluzioni all'altezza di altri analizzatori, esso presenta comunque numerosi vantaggi che lo rendono oggi molto utilizzato. Innanzitutto è caratterizzato da un'elevata efficienza di trasmissione che porta ad una sensibilità molto alta: tutti gli ioni vengono analizzati, contrariamente agli analizzatori a scansione che trasmettono gli ioni successivamente lungo la scala temporale. Oltre a ciò, anche la velocità di analisi degli analizzatori TOF è molto alta: in pochi  $\mu\text{s}$

si può ottenere uno spettro su un ampio intervallo di valori di  $m/z$  [91]. Tale analizzatore è quindi particolarmente adatto quando si utilizza la spettrometria di massa come rivelatore per la cromatografia, in quanto permette la scansione multipla di un picco cromatografico mentre lo stesso è in eluizione dalla colonna.

Infine, mediante il TOF si possono analizzare macromolecole intatte (ad esempio proteine) grazie al suo elevato range di scansione (centinaia di migliaia di Dalton).

### 3.5. Accoppiamento cromatografia - spettrometria di massa

Accoppiando le due tecniche, quella cromatografica e quella di spettrometria di massa, si ottengono la GC-MS e l'HPLC-MS, a seconda che l'accoppiamento abbia luogo utilizzando la cromatografia gassosa o quella liquida. In entrambi i casi, lo spettrometro di massa scansiona ripetutamente le masse durante l'analisi cromatografica. In questo modo si ottiene un elevato grado di selettività in quanto gli analiti vengono caratterizzati in funzione delle loro caratteristiche sia chimico-fisiche (tempo di ritenzione) che molecolari (spettro di massa).

Dall'accoppiamento di queste due tecniche si può ottenere un cromatogramma di corrente ionica totale (TIC, *Total Ion Current*), in cui è rappresentata la somma dell'abbondanza dei vari ioni in ogni singolo spettro. Ogni picco cromatografico nella TIC rappresenta un composto eluito, identificabile dall'interpretazione del relativo spettro di massa. In alternativa è possibile selezionare ed acquisire i soli dati degli ioni rappresentativi delle molecole di interesse tramite la procedura nota come "rivelazione di ioni selezionati" (SIM, *Selected Ion Monitoring*), che seleziona un singolo valore di  $m/z$  e lo monitora per tutta la durata dell'analisi cromatografica. Gli spettri di massa di ioni selezionati che si ottengono durante un esperimento di cromatografia sono noti come *cromatogrammi di massa* [75, 78].

Nel caso specifico della GC-MS, l'accoppiamento tra le due tecniche richiede l'introduzione di una *transfer line*, ossia di una linea riscaldata che guida il trasferimento degli ioni gassosi dalla colonna cromatografica alla sorgente ionica, evitandone la condensazione in corrispondenza dell'interfaccia.

In GC-MS, poiché l'iniezione manuale del campione non è riproducibile, è necessario confrontare il segnale della sostanza di interesse con quello di uno standard di riferimento interno che viene aggiunto al campione prima dell'iniezione gascromatografica [78]. La sua introduzione consente di eliminare gli errori dovuti alle fluttuazioni della quantità iniettata e della risposta del rivelatore, nonché quelli introdotti dal processo di manipolazione del campione. Un composto, per poter essere utilizzato come standard interno, deve presentare numerosi requisiti:

- non essere presente nei campioni reali;
- essere stabile ed inerte nei confronti dei composti da determinare e del solvente;
- avere caratteristiche chimico-fisiche simili all'analita;
- essere solubile nel solvente utilizzato;
- dare una risposta al rivelatore impiegato;
- avere un tempo di ritenzione compreso nell'intervallo dei tempi di ritenzione dei composti da determinare [92].

Utilizzando uno spettrometro di massa come rivelatore, lo standard interno ideale è lo stesso composto da determinare marcato isotopicamente. Infatti, anche se l'analita e lo standard hanno lo stesso tempo di ritenzione, essi sono rivelati separatamente in base alla loro massa.

La selettività dell'analisi garantita dall'accoppiamento di queste due tecniche può essere ulteriormente migliorata effettuando esperimenti di frammentazione (MS/MS) o ricorrendo a misure di massa accurata [72-73].

La spettrometria di massa tandem, abbreviata in MS/MS, è un metodo generale che implica almeno due stadi di analisi di massa. Nelle forme più comuni di questi esperimenti, un primo stadio è utilizzato per isolare lo ione precursore (o genitore), il quale subisce una successiva frammentazione, spontanea o indotta, in una camera di collisione, originando così gli ioni figli, i quali vengono analizzati da un secondo stadio (Fig. 3.5) [78, 93-94].

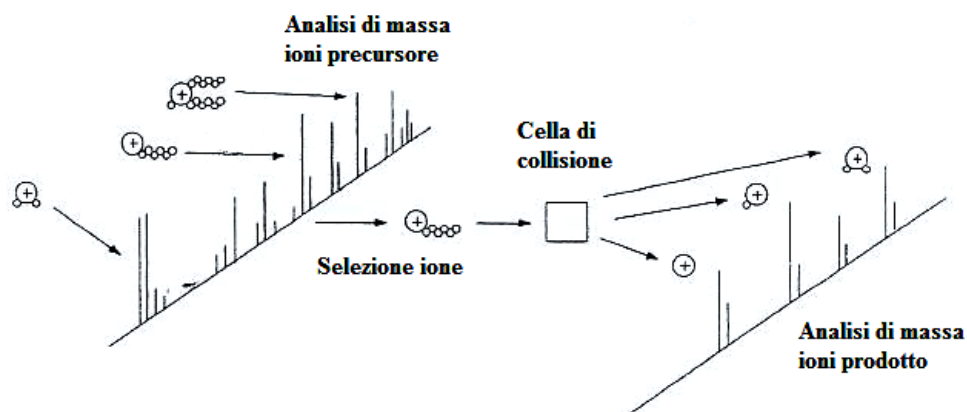


Fig. 3.5. Schema di un esperimento di spettrometria di massa tandem: il primo stadio seleziona ioni con un dato rapporto  $m/z$  per la successiva frammentazione, mentre il secondo stadio produce lo spettro di massa dei frammenti ottenuti (figura tratta da [78] e adattata).

La spettrometria di massa tandem può essere concepita nello spazio, accoppiando due strumenti in successione, oppure nel tempo, utilizzando un dispositivo in grado di trattenere gli ioni e di analizzarne il precursore e i figli in momenti successivi [93]. Un altro modo per aumentare la selettività in spettrometria di massa consiste nel ricorrere a strumenti ad alta risoluzione, in grado di effettuare misure di massa accurata. Questi spettrometri presentano un'accuratezza tale da permettere la determinazione della composizione elementare della specie in esame. Questo è possibile perché ogni elemento ha un difetto di massa caratteristico, ovvero presenta una certa differenza tra massa esatta e massa nominale. Le misure di massa accurata sono in grado di evidenziare il difetto di massa, permettendo così di distinguere due composti caratterizzati dalla medesima massa nominale [95].

### 3.5.1. Accoppiamento *fast* GC-TOF

La gascromatografia *fast* comporta un'eluizione del profilo dei picchi molto più rapida (pochi secondi) rispetto alla gascromatografia convenzionale. Ne consegue che la frequenza di campionamento deve essere aumentata al fine di poter descrivere un picco privo di artefatti. Se per la GC convenzionale è sufficiente una frequenza di campionamento anche minore di 2.5 Hz, per la *fast* GC il campionamento deve essere molto più frequente (nel range 2.5-12.5 Hz) [96]. Pertanto, nel caso della *fast* GC, la frequenza di campionamento minima necessaria a descrivere un picco nel modo corretto è pari a 5.98 Hz, corrispondente ad 11 punti di campionamento per profilo (Fig. 3.6). Di conseguenza, è necessario ricorrere a rivelatori abbastanza veloci: nel caso di accoppiamento della *fast* GC con la spettrometria di massa, l'analizzatore più

adeguato è il TOF, in quanto può garantire una frequenza di acquisizione superiore ai 5 Hz.

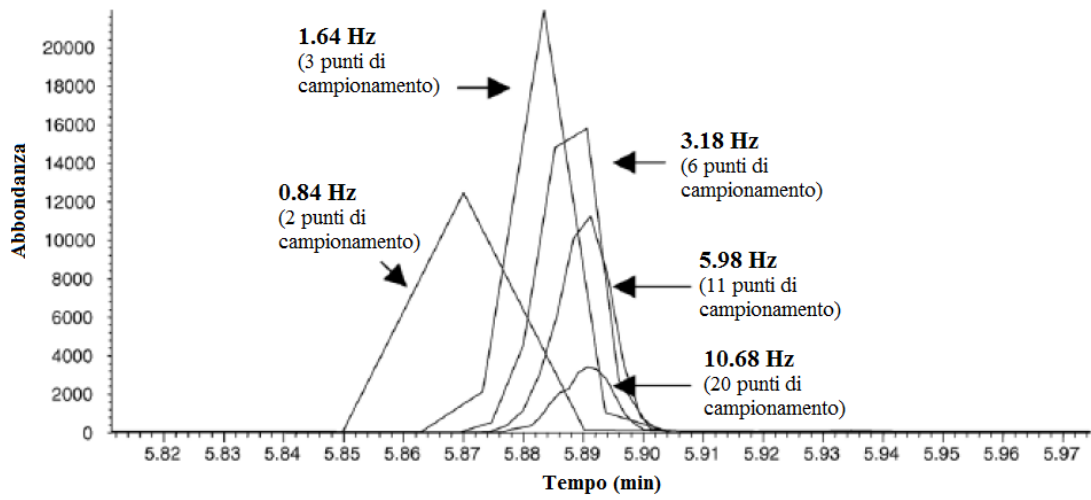


Fig. 3.6. Variazione del profilo cromatografico in fast GC, in funzione della frequenza di campionamento utilizzata (figura tratta da [96] e adattata).



## 4. SCOPO DELLA TESI

Lo scopo di questa tesi è la ricerca di un possibile biomarcatore plasmatico per il cancro coloretale. Il metodo di riferimento per la diagnosi di questo tumore è la colonscopia, un esame piuttosto invasivo, difficilmente accettato dal paziente. L'individuazione di un marker specifico per questo cancro, rivelabile attraverso un esame del sangue, apporterebbe significativi miglioramenti non solo alla pratica diagnostica, ma anche alla prognosi: più pazienti si sottoporrebbero all'esame e il tumore verrebbe diagnosticato precocemente, in una fase in cui la probabilità di sopravvivenza è ancora elevata.

Gli studi di Rashid *et al.* sul tumore coloretale, sembrano dimostrare che esista uno specifico programma genetico che comporta l'attivazione della sintesi degli acidi grassi in concomitanza all'inizio del processo neoplastico: ciò si osserva, infatti, sia nel caso di adenomi (sporadici o ereditari), sia nel caso di rettocolite ulcerosa, forme patologiche che precedono lo sviluppo del tumore [97]. Questi studi si basano però su analisi di tessuti di colon ottenuti mediante resectomia [97-98], che evidenziano la sovraespressione dell'enzima acido grasso sintasi nella sede del tumore. Questo tipo di determinazione preclude la possibilità di utilizzare questo enzima come biomarcatore diagnostico di screening, poiché prevede necessariamente il prelievo di una biopsia, rendendolo più adatto alla valutazione prognostica, successiva all'asportazione del tumore. La ricerca di questo enzima e dei suoi metaboliti all'interno di fluidi biologici, prelevabili in modo meno invasivo dall'organismo umano e rivelabili durante la fase iniziale della malattia, potrebbe essere di estremo interesse nella diagnosi di CRC. A questo scopo, recentemente, Kuhajda *et al.* hanno sviluppato un metodo che utilizza il test ELISA per determinare i livelli di FAS nel sangue, riscontrandone concentrazioni elevate nei pazienti affetti da cancro alla mammella, alla prostata, al colon e all'ovaio [98-99].

Da tutti questi studi sembra emergere quindi che livelli elevati della FAS si riscontrino sia in caso di diverse patologie che colpiscono il colon (adenomi, RCU e cancro), sia in persone che presentano tumori d'organo con sede diversa. Esso non è quindi un biomarcatore specifico per il cancro coloretale, ma l'alterazione della sua attività potrebbe generare metaboliti di tipo diverso in corrispondenza alle differenti patologie. Studi preliminari svolti presso il laboratorio in cui è stata condotta questa tesi di laurea [100] hanno evidenziato un aumento degli acidi ottanoico e decanoico in soggetti affetti da CRC. Lo scopo di questa tesi è quindi quello di analizzare campioni di plasma di pazienti affetti da questo tumore e di individui sani, in numero sufficientemente elevato da verificare se esista una correlazione statistica tra il CRC e gli acidi grassi a media catena. In particolare, sono stati presi in considerazione campioni di plasma di pazienti affetti da adenomi e cancro coloretale a diversi stadi.

Al fine di comprendere se le alterazioni dei livelli plasmatici degli acidi grassi osservati siano specifici per il CRC, sono stati inseriti in questo studio due ulteriori gruppi di soggetti. Un'altra categoria di campioni analizzata è stata infatti quella dei pazienti colpiti da rettocolite ulcerosa, in modo da riuscire a stabilire se le alterazioni nella concentrazione di questi MCFA nel cancro coloretale siano in realtà conseguenza dello stato infiammatorio che è sempre associato al tumore. Oltre a ciò sono stati esaminati anche dei campioni di pazienti affetti da cancro alla mammella, al fine di comprendere se i livelli di questi acidi grassi nel plasma aumentino in corrispondenza a qualsiasi tipo di proliferazione maligna o se siano organospecifici.

Per poter raggiungere questo obiettivo, è stato sviluppato un nuovo metodo di analisi per gli acidi grassi a media catena, valutandone l'accuratezza, la precisione, il recupero

ro, l'intervallo dinamico lineare, la riproducibilità e i limiti di rivelabilità e di quantificazione. Il metodo considerato è la gascromatografia veloce (*fast GC*) accoppiata alla spettrometria di massa con analizzatore TOF. Questo nuovo metodo permette di velocizzare le corse cromatografiche e quindi rende possibile l'effettuazione di un numero maggiore di analisi nel medesimo tempo di lavoro, con un conseguente aumento della produttività e della significatività dei dati raccolti.



## 5. PARTE SPERIMENTALE

### 5.1. Composti utilizzati

I composti utilizzati nel corso di questo lavoro di tesi, assieme alle loro purezze e al corrispondente fornitore, sono elencati in *Tab. 5.1*.

*Tab. 5.1. Elenco dei composti utilizzati (sono indicati anche il fornitore e la purezza).*

<b>Composto</b>	<b>Purezza</b>	<b>Fornitore</b>
Acido esanoico	99.5%	Chem Service
Acido ottanoico	99.5%	Chem Service
Acido d <sub>3</sub> -8,8,8-ottanoico	99.2%	CDN isotopes
Acido decanoico	99.5%	Chem Service
Acido dodecanoico	99.5%	Chem Service
BSTFA: <i>N,O</i> -bis(trimetilsilil)trifluoroacetamide + 1% TMCS	99% + 1% TMCS	Macherey-Nagel GmbH & Co
Cloroformio	> 99.9%	Romil-Pure Chemistry
Cloruro di sodio (NaCl)	99.5 % min	R. P. Normapur-Prolabo
Etanolo	≥ 99.9%	Carlo Erba
Metanolo	> 99.9%	Romil-Pure Chemistry

Gli acidi esanoico, ottanoico, decanoico e dodecanoico sono stati utilizzati come standard analitici per la preparazione delle rette di calibrazione; l'acido d<sub>3</sub>-8,8,8-ottanoico, isotopo deuterato dell'acido ottanoico, è stato utilizzato come standard interno.

### 5.2. Strumentazione e vetreria

La strumentazione, il materiale ed i programmi utilizzati in questo lavoro di tesi sono i seguenti:

- gascromatografo "Master GC (fast Gas Chromatography)" DANI, con colonna capillare "DN-5 FAST" (10 m, diametro interno di 0.1 mm e film di 0.2 µm) accoppiato ad uno spettrometro di massa "Master TOF-MS" DANI; software "Master TOF", DANI (versione 3.2.2.1-A);
- software "Graphpad Prism", versione 5.00, 2007;
- software "Xcalibur", Thermo Fisher Scientific Inc., 1998-2007, versione 2.0.7;
- forno "Bambino", Boekel Scientific, modello 230301;
- bilancia "Sartorius", Cecchinato A., Apparecchi Scientifici;
- micropipette "Eppendorf Research" da 0.5-10 µL, 2-20 µL, 10-100 µL, 20-200 µL, 100-1000 µL;
- puntali "Tip-One" Starlad (graduati con filtro) da 10 µL e 200 µL;
- puntali "Corning Incorporated" (universali con filtro) da 100-1000 µL;
- puntali "Biosphere", Sarstedt (con filtro), da 2-20 µL;

- vortex "VELP Scientifica";
- provette "Eppendorf" da 2 mL;
- centrifuga "Heraeus Fresco 21 centrifuge", Thermo Electron corporation;
- microsiringhe "Hamilton" da 10  $\mu\text{L}$ , 25  $\mu\text{L}$ , 100  $\mu\text{L}$ , 250  $\mu\text{L}$ ;
- microsiringa per iniezione "Hamilton" da 10  $\mu\text{L}$ ;
- parafilm, Bemis flexible packaging;
- provette da 1.5 mL, 11.6 $\times$ 32 mm, Macherey-Nagel-GmbH & Co.;
- tappi per provette in PTFE e silicone, Macherey-Nagel-GmbH & Co.;
- frigorifero "Hemo Cold" a 3.5 °C;
- freezer "Hemo Cold" a -20 °C;
- cilindro da 50 mL, Suprema Continental.

### 5.3. Parametri strumentali

Per le misure GC-MS è stato utilizzato un gascromatografo "Master GC (fast Gas Chromatography)" DANI accoppiato ad uno spettrometro di massa "Master-TOF-MS" DANI con sorgente EI e analizzatore a tempo di volo.

#### 5.3.1. Parametri gascromatografici

Le caratteristiche strumentali e i parametri impostati per tutte le analisi gascromatografiche effettuate in questa tesi sono i seguenti.

##### Caratteristiche del gas di trasporto:

- gas carrier: He, SIAD (purezza:  $\geq 99.998\%$ );
- flusso: costante a 0.6 mL/min.

##### Specifiche delle iniezioni:

- volume di iniezione: 1  $\mu\text{L}$ ;
- modalità iniezione: *split*;
- *split* flow: 50 mL/min;
- *split* ratio: 1:83;
- temperatura iniettore: 250 °C.

Le iniezioni sono state effettuate utilizzando una microsiringa tarata da GC avente un volume da 10  $\mu\text{L}$ .

A causa della notevole sensibilità dello strumento utilizzato, è stato necessario condurre le analisi in modalità *split*, al fine di evitare la saturazione del rivelatore. Da prove sperimentali, un rapporto di *split* pari a 1:83 è risultato ottimale per garantire un'adeguata sensibilità analitica, specialmente per quanto riguarda la determinazione quantitativa dei campioni.

##### Specifiche della colonna capillare:

- tipo di colonna: DN-F Fast 10 m;
- fase stazionaria: 5%-fenil-95%-metilpolisilossano;
- lunghezza nominale: 10 m;
- diametro nominale interno: 0.1 mm;
- spessore nominale del film: 1  $\mu\text{m}$ .

#### Programma di temperatura:

- temperatura iniziale (mantenuta per due minuti): 35 °C;
- rampa termica di 25 °C/min fino a 300 °C;
- temperatura finale (mantenuta per 5 minuti): 300 °C;
- durata totale della corsa: 17.6 minuti.

### 5.3.2. Parametri dello spettrometro di massa

I parametri impostati per l'acquisizione degli spettri di massa sono i seguenti:

- velocità di acquisizione: 5 spettri/sec;
- frequenza di acquisizione: 5 Hz;
- massa iniziale (uma): 50;
- massa finale (uma): 550;
- modalità di ionizzazione: EI a ioni positivi;
- temperatura della sorgente ionica: 200 °C;
- temperatura della *transfer line*: 250 °C;
- tempo di acquisizione: 17.6 minuti;
- *solvent delay*: 4 minuti.

### 5.4. Derivatizzazione

Poiché gli acidi grassi a media catena non sono abbastanza volatili per essere analizzati mediante GC, è necessario derivatizzarli a trimetilsililesteri mediante una reazione di derivatizzazione che utilizza bis-(trimetilsilil)trifluoroacetamide (BSTFA) contenente l'1% di trimetilclorosilano (TMCS) come catalizzatore. La reazione di derivatizzazione è condotta a 70 °C per 30 minuti e per l'acido esanoico è schematizzata in Fig. 5.1.

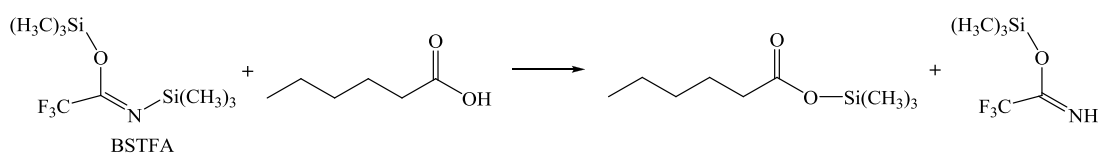


Fig. 5.1. Derivatizzazione dell'acido esanoico al corrispondente trimetilsililestere mediante reazione con BSTFA.

### 5.5. Rette di calibrazione

Per l'analisi quantitativa dei campioni è stato necessario effettuare una calibrazione dello strumento al fine di determinare come esso risponda a concentrazioni note di analita. Nel caso specifico, è stato utilizzato il metodo dello standard interno, che consiste nell'aggiunta di una determinata sostanza (lo standard interno) ai bianchi, ai campioni e agli standard di calibrazione di un'analisi [73, 101]: nel caso specifico, lo standard interno utilizzato è stato l'acido  $d_3$ -8,8,8-ottanoico.

Ricorrendo a sette soluzioni a concentrazione crescente degli analiti, preparate e iniettate all'inizio di ogni settimana, è stato possibile ottenere le rette di calibrazione utilizzate per la quantificazione dei campioni. Assieme a questi ultimi, ogni giorno è stato inoltre iniettato un campione di controllo qualità (QC) a concentrazione costante.

### 5.5.1. Preparazione delle soluzioni madre

Gli acidi esanoico ed ottanoico (deuterato e non) sono liquidi a temperatura e pressioni ambientali, pertanto le loro soluzioni madre sono state preparate prelevando 5  $\mu\text{L}$  di standard puro attraverso una microsiringa da 10  $\mu\text{L}$  e introducendoli in una provetta contenente 500  $\mu\text{L}$  di etanolo. La concentrazione effettiva è stata calcolata tenendo conto della purezza del composto e della sua densità (0.9274 g/mL per l'acido esanoico e 0.9088 g/mL per l'acido ottanoico).

Gli acidi decanoico e dodecanoico sono solidi a temperatura e pressione ambientali e le loro soluzioni madre sono state preparate sciogliendo in 500  $\mu\text{L}$  di etanolo 5 mg di standard.

Procedendo in questo modo sono state ottenute delle soluzioni dei diversi analiti, in concentrazione nominale pari a 10  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , successivamente conservate in frigorifero a 4 °C.

### 5.5.2. Diluizioni della soluzione di standard interno

Partendo dalla soluzione madre di acido  $\text{d}_3$ -8,8,8-ottanoico (D3), sono state preparate altre due soluzioni etanoliche mediante due diluizioni successive:

- a) soluzione "D3a", in concentrazione nominale pari a 100  $\text{ng}/\mu\text{L}$ , ottenuta mediante diluizione 1:100 a partire dalla soluzione madre;
- b) soluzione "D3b", in concentrazione nominale pari a 10  $\text{ng}/\mu\text{L}$ , ottenuta mediante diluizione 1:10 a partire dalla soluzione "D3a".

Queste soluzioni sono state aggiunte ad ogni punto della retta di calibrazione e a ciascun campione all'inizio del trattamento; nei periodi di non utilizzo sono state conservate in frigorifero a 4 °C.

### 5.5.3. Preparazione delle miscele standard

A partire dalle soluzioni madre di ciascun analita, sono state preparate tre miscele, mediante diluizioni successive:

- A. "Mix A", contenente i quattro analiti in concentrazione 100  $\text{ng}/\mu\text{L}$ , preparata mediante diluizione 1:100 a partire da ciascuna soluzione madre;
- B. "Mix B", contenente i quattro analiti in concentrazione 10  $\text{ng}/\mu\text{L}$ , preparata mediante diluizione 1:10 a partire dalla soluzione "Mix A";
- C. "Mix C", contenente i quattro analiti in concentrazione 0.5  $\text{ng}/\mu\text{L}$ , preparata mediante diluizione 1:20 a partire dalla soluzione "Mix B".

Queste miscele sono state usate per preparare le soluzioni standard utilizzate per tracciare le rette di calibrazione; esse sono state conservate in frigorifero a 4 °C nei periodi di non utilizzo.

### 5.5.4. Preparazione dei punti della retta

A partire dalle miscele standard, sono state preparate sette soluzioni standard utilizzate come punti della retta:

0. Punto 0: 10  $\mu\text{L}$  di soluzione "D3b";
1. Punto 1: 10  $\mu\text{L}$  di soluzione "D3b" + 10  $\mu\text{L}$  di "Mix C";
2. Punto 2: 10  $\mu\text{L}$  di soluzione "D3b" + 25  $\mu\text{L}$  di "Mix C";
3. Punto 3: 10  $\mu\text{L}$  di soluzione "D3b" + 5  $\mu\text{L}$  di "Mix B";

4. Punto 4: 10  $\mu\text{L}$  di soluzione "D3b" + 25  $\mu\text{L}$  di "Mix B";
5. Punto 5: 10  $\mu\text{L}$  di soluzione "D3b" + 10  $\mu\text{L}$  di "Mix A";
6. Punto 6: 10  $\mu\text{L}$  di soluzione "D3b" + 15  $\mu\text{L}$  di "Mix A".

Ciascuna di queste soluzioni è stata sottoposta ad un leggero flusso di  $\text{N}_2$  in modo da far evaporare l'etanolo utilizzato come solvente; dopodiché esse sono state conservate a 4 °C fino al momento dell'analisi.

Per l'iniezione in GC-MS, gli standard sono stati ripresi con 25  $\mu\text{L}$  di esano, a cui sono stati aggiunti 25  $\mu\text{L}$  di BSTFA per la derivatizzazione, effettuata come descritto nel paragrafo 5.4.

Le soluzioni ottenute dopo questa reazione presentano una concentrazione costante di standard interno, pari a circa 2 ng/ $\mu\text{L}$ , e concentrazioni crescenti degli analiti, comprese tra 0 ng/ $\mu\text{L}$  e 30 ng/ $\mu\text{L}$ :

0. Punto 0: 0 ng/ $\mu\text{L}$ ;
1. Punto 1: 0.1 ng/ $\mu\text{L}$ ;
2. Punto 2: 0.25 ng/ $\mu\text{L}$ ;
3. Punto 3: 1 ng/ $\mu\text{L}$ ;
4. Punto 4: 5 ng/ $\mu\text{L}$ ;
5. Punto 5: 20 ng/ $\mu\text{L}$ ;
6. Punto 6: 30 ng/ $\mu\text{L}$ .

## 5.6. Campioni biologici

### 5.6.1. Ottenimento e selezione dei campioni

In questo lavoro sono stati utilizzati dei campioni di plasma ottenuti da sangue intero conservato, in seguito al prelievo, in provette contenenti EDTA come anticoagulante. Il campione di sangue è stato centrifugato a 3000 giri per 15 minuti a 25 °C in modo da separare il plasma dalle altre componenti ematiche, e poi conservato a -80 °C fino al momento dell'analisi.

I campioni sono stati ottenuti a digiuno in quanto prelevati prima della colonscopia (per i controlli e gli RCU) o in fase preoperatoria (per i tumori al colon e alla mammella). Ad ogni paziente è stato richiesto il consenso informato per l'utilizzo dei campioni a fine di ricerca e i relativi dati clinici sono conservati nei database della Biobanca.

In totale sono stati analizzati 66 campioni di plasma appartenenti a pazienti affetti da cancro alla mammella (MAM), rettocolite ulcerosa (RCU), adenomi (ADE), cancro coloretale (CRC) (stadi dal I al IV) e soggetti sani (C, controlli). Essi sono stati selezionati in modo tale che non differissero statisticamente per sesso ed età; ciò è stato verificato mediante l'applicazione di due test, entrambi effettuati attraverso il software "Graphpad Prism": il test d'indipendenza  $\chi^2$  e il test di significatività ANOVA (ANalysis Of VAriance). Il primo è un test in grado di verificare se due variabili sono indipendenti tra di loro: in questo caso le variabili considerate sono il tipo di patologia e il sesso del paziente. L'ANOVA invece è stato utilizzato per verificare l'assenza di significative differenze tra le età medie dei quattro gruppi esaminati. Per entrambi i test è stata posta come condizione di significatività  $\alpha < 5\%$ .

In Tab. 5.2 è indicato il numero di campioni analizzati per ciascuna categoria, l'età media dei pazienti sottoposti allo studio e la distribuzione dei campioni tra pazienti di sesso maschile e di sesso femminile. Sono riportati anche i *p-value* relativi sia al sesso che all'età, ottenuti dai test effettuati sui quattro gruppi di soggetti considerati.

Come si può notare,  $p$  è sempre maggiore di 0.05, per cui la condizione di significatività non è soddisfatta: le quattro categorie considerate non differiscono significativamente né per sesso né per età. Questo risultato è evidenziato dalla Fig. 5.2, in cui sono tracciati i *box-plot*, costruiti a partire dalle età dei diversi soggetti reclutati per questo studio. Il 50% dei campioni appartenenti a ciascuna categoria (rappresentato dai riquadri nel grafico) cade all'interno di una stretta fascia di età compresa tra i 50 e i 70 anni. L'unico *box-plot* spostato leggermente ad età inferiori è quello relativo ai pazienti affetti da rettocolite ulcerosa, patologia che insorge solitamente in giovane età.

Tab. 5.2. Numero complessivo e distribuzione per genere dei campioni analizzati per ciascuna categoria di plasma; sono riportati anche l'età media dei pazienti per ciascun gruppo e i p-value ottenuti dai test statistici  $\chi^2$  e ANOVA.

	Totale	Età		Sesso		
		Media	<i>p-value</i>	M	F	<i>p-value</i>
<b>C</b>	17	61	0.1052	9	8	0.9718
<b>CRC</b>	25	65		15	13	
<b>MAM</b>	10	63		5	5	
<b>RCU</b>	11	54		5	6	

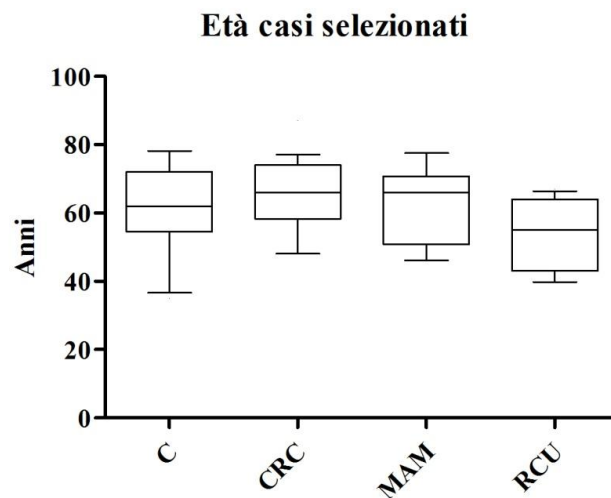


Fig. 5.2. *Box-plot* relativi al test ANOVA effettuato sulle età dei pazienti di cui è stato analizzato il plasma; i riquadri e le barre rappresentano la fascia di età in cui ricadono rispettivamente il 50% (limiti al 25% e al 75%) e l'80% (limiti al 10% e al 90%) dei campioni; l'età media è rappresentata dalla barra orizzontale all'interno del riquadro.

Poiché il cancro coloretale è caratterizzato da una specifica stadiazione, i soggetti appartenenti alla categoria CRC possono essere suddivisi in funzione dello stadio di appartenenza. In Tab 5.3 è indicata la quantità di campioni analizzati per ciascuno stadio e la distribuzione in base al sesso del paziente.

Tab. 5.3. Distribuzione dei campioni di CRC in base allo stadio del tumore.

	<b>ADE</b>	<b>CRC I</b>	<b>CRC II</b>	<b>CRC III</b>	<b>CRC IV</b>
<b>M</b>	2	5	2	6	0
<b>F</b>	1	1	6	2	3
<b>Totale</b>	<b>3</b>	<b>6</b>	<b>8</b>	<b>8</b>	<b>3</b>

### 5.6.2. Trattamento dei campioni per l'analisi

Ciascuno dei campioni considerati è stato scongelato in frigorifero a 4 °C e analizzato in doppio.

In Fig. 5.3 sono schematizzati i vari passaggi effettuati per il trattamento dei campioni.

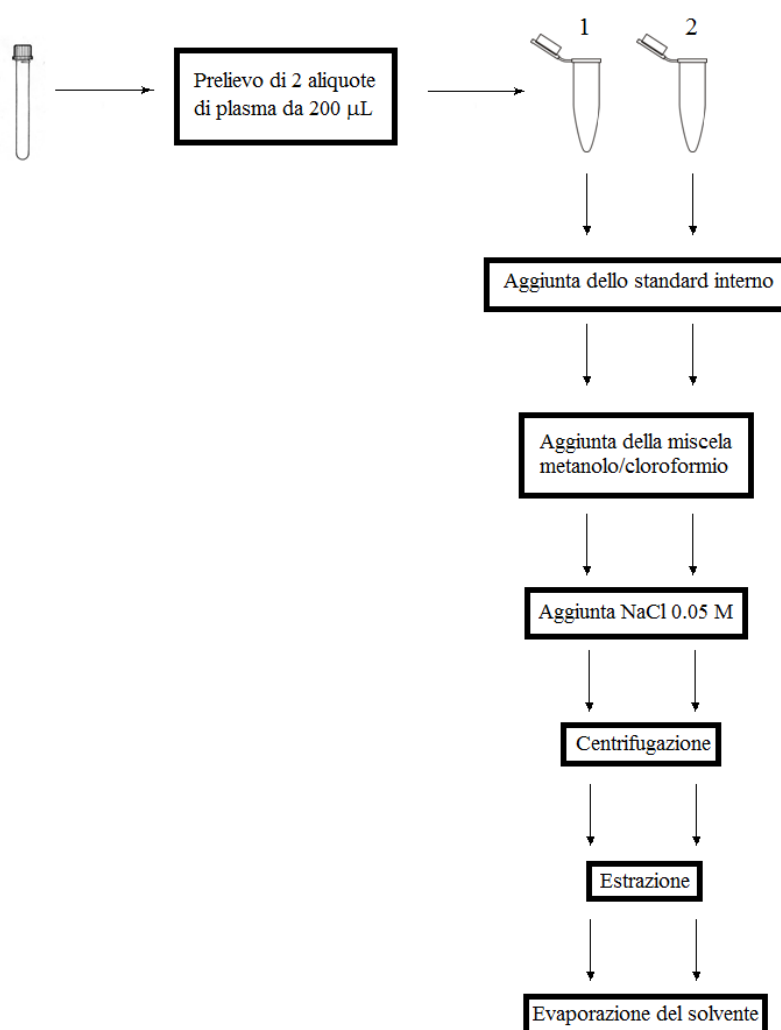


Fig. 5.3. Schema della procedura seguita per il trattamento dei campioni plasmatici.

Da ogni fiala di plasma sono state prelevate e introdotte in due provette eppendorf due aliquote da 200 µL di plasma, successivamente addizionate di 5 µL di soluzione "D3a" (paragrafo 5.5.2).

Dopodiché sono stati aggiunti 1.2 mL di una miscela metanolo/cloroformio (1:2 v/v) e 100 µL di una soluzione 0.05 M di cloruro di sodio, additivo in grado di favorire la formazione di un coagulo di proteine.

Dopo ogni aggiunta, le miscele contenute nelle eppendorf sono state mescolate fino ad ottenere una soluzione omogenea.

Le provette eppendorf così preparate sono state quindi centrifugate a 14000 rpm per 10 minuti a 10 °C. Al termine di questa operazione, il contenuto di ciascuna eppendorf presentava due fasi distinte, interfacciate al centro da un agglomerato di proteine: lo strato sovrastante era costituito dalla fase acquosa, separata dalla fase organica sottostante dallo strato di proteine intermedio. La fase acquosa è stata scartata mentre la fase organica è stata prelevata e trasferita all'interno di provette di vetro.

Le soluzioni così isolate sono state portate a secco al fine di preconcentrare gli analiti, favorendo l'evaporazione del solvente (per lo più cloroformio) mediante l'utilizzo di un leggero flusso di N<sub>2</sub>.

Dopo questo trattamento, le provette contenenti l'estratto lipidico sono state conservate in freezer a -20 °C, fino al momento dell'analisi.

Per l'introduzione in GC-MS, ogni estratto è stato ripreso con 25 µL di esano, cui sono stati aggiunti 25 µL di BSTFA per la derivatizzazione, effettuata analogamente a come descritto nel paragrafo 5.4. Al termine di questo processo, le due aliquote ottenute da ciascun campione sono state iniettate consecutivamente nel gascromatografo, effettuando quindi l'analisi in doppio.

Prima di una serie di analisi di campioni, è stato iniettato un campione a concentrazione nota, equivalente al punto 3 di retta (QC), preparato come descritto nel paragrafo 5.5.4 e derivatizzato seguendo la consueta procedura. Esso è stato utilizzato per verificare che non si presentassero derive della risposta strumentale, tali da compromettere l'utilizzo della retta di calibrazione settimanale per la quantificazione dei campioni iniettati durante i giorni successivi all'iniezione dei punti della retta.

## 5.7. Processamento dei dati

Per ogni iniezione è stato ottenuto un cromatogramma rappresentante la corrente ionica totale (TIC, *Total Ion Current*) da cui, utilizzando il software "Xcalibur", è stato possibile selezionare un determinato rapporto  $m/z$ , ottenendo così un cromatogramma di corrente ionica ricostruita (RIC, *Reconstructed Ion Current*).

Mediante iniezione degli standard è stato possibile individuare il tempo di ritenzione di ciascun analita e il corrispondente spettro di massa.

Dalla RIC è stato possibile integrare manualmente il picco cromatografico, la cui area è proporzionale alla quantità di analita giunta al rivelatore [102].



## 6. RISULTATI E DISCUSSIONE

### 6.1. Aspetti qualitativi

L'utilizzo della gascromatografia accoppiata alla spettrometria di massa ha permesso l'acquisizione di cromatogrammi di corrente ionica totale (TIC), dai quali, selezionando un determinato rapporto  $m/z$ , è stato possibile risalire alla RIC, la corrente ionica generata dall'analita di interesse.

#### 6.1.1. Cromatogrammi degli standard analitici

Gli standard puri sono stati preparati in esano e derivatizzati con BSTFA prima dell'iniezione nel gascromatografo. A partire dai cromatogrammi così ottenuti è stato possibile richiamare la corrente ionica relativa allo ione di riferimento per ciascuno degli acidi grassi considerati in questa tesi. Poiché come sorgente di ioni è stata utilizzata una EI, tecnica di ionizzazione *hard*, l'analisi dei cromatogrammi non è stata basata sulla selezione dello ione molecolare, presente ad intensità bassissima, ma è stato scelto come riferimento lo ione generato dalla perdita di un metile del gruppo trimetilsililestere (ione  $[M-CH_3]^+$ ). In *Tab. 6.1* sono indicati i rapporti  $m/z$  dello ione molecolare e dello ione selezionato per la creazione del cromatogramma RIC, per ciascun derivato degli acidi grassi analizzati.

*Tab. 6.1. Rapporti  $m/z$  dello ione molecolare e dello ione  $[M-CH_3]^+$  relativi a ciascun analita.*

<b>Analita</b>	<b><math>m/z</math> dello ione molecolare <math>M^+</math></b>	<b><math>m/z</math> dello ione <math>[M-CH_3]^+</math> selezionato per la RIC</b>
<i>Trimetilsililestere dell'acido esanoico</i>	188	173
<i>Trimetilsililestere dell'acido ottanoico</i>	216	201
<i>Trimetilsililestere dell'acido <math>d_3</math>-8,8,8-ottanoico</i>	219	204
<i>Trimetilsililestere dell'acido decanoico</i>	244	229
<i>Trimetilsililestere dell'acido dodecanoico</i>	272	257

Dalla RIC è stato possibile individuare i picchi cromatografici originati dagli analiti di interesse e pertanto anche il loro tempo di ritenzione ( $t_R$ ), ovvero il tempo necessario affinché essi eluiscano dalla colonna. In *Tab. 6.2* sono indicati i tempi di ritenzione relativi a ciascun analita, ottenuti in questo lavoro, mediante *fast GC*, ed in un lavoro precedente nel quale è stato utilizzato un GC convenzionale "Agilent 6850 Network" con colonna di 60 m, accoppiato ad uno spettrometro di massa "5975C Agilent" con sorgente EI ed analizzatore quadrupolare [100]. Appare evidente come il metodo qui sviluppato, ovvero l'utilizzo della *fast GC* accoppiata alla spettrometria di massa con analizzatore TOF, apporti una notevole accelerazione delle analisi: gli analiti eluiscono tutti entro i primi dieci minuti di corsa, contro i 27 minuti richiesti da

un GC convenzionale. I cromatogrammi tipicamente ottenuti per gli standard sono mostrati in Fig. 6.1 .

Tab. 6.2. Tempi di ritenzione degli analiti richiesti dalla fast GC e dalla GC convenzionale [100].

Analita	$t_R$ fast-GC (min)	$t_R$ GC convenzionale (min)
Acido esanoico	4.98	17.32
Acido ottanoico	6.16	20.77
Acido $d_3$ -8,8,8-ottanoico	6.14	20.73
Acido decanoico	7.20	23.81
Acido dodecanoico	8.15	26.53

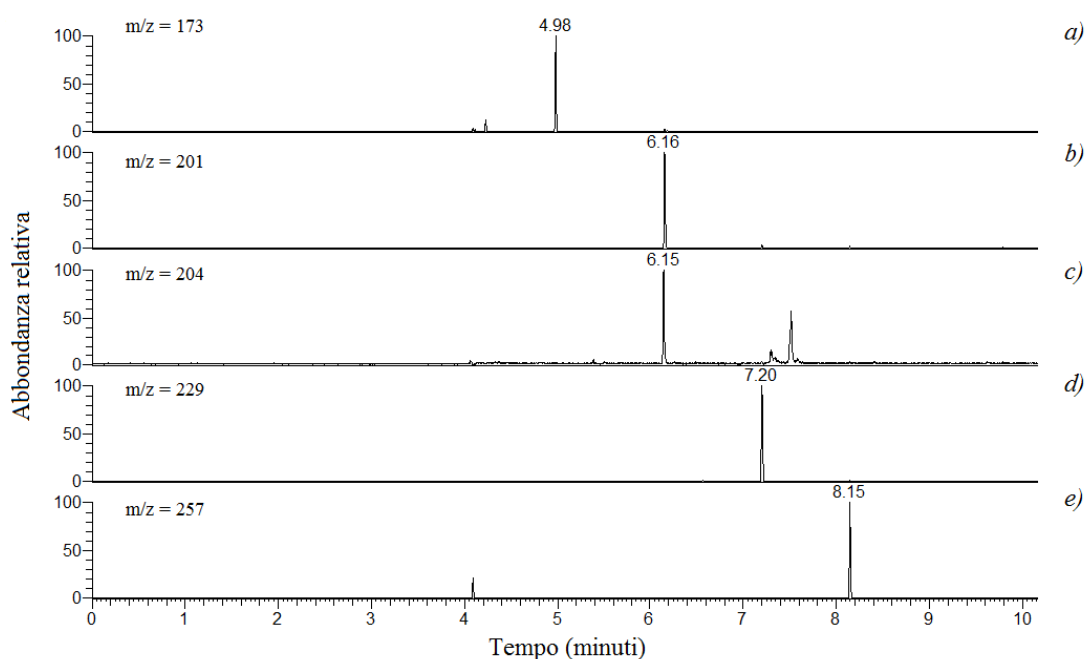


Fig. 6.1. Profili cromatografici relativi al frammento  $[M-CH_3]^+$  del trimetilsililestere di ciascun acido grasso considerato, ottenuti mediante fast GC-MS: a) acido esanoico; b) acido ottanoico; c) acido  $d_3$ -8,8,8-ottanoico; d) acido decanoico; e) acido dodecanoico.

### 6.1.2. Cromatogrammi dei campioni

In Fig. 6.2 è riportato un esempio di un cromatogramma rappresentante la corrente ionica totale di un campione di lipidi estratti da plasma umano. Esso mostra una notevole quantità di picchi cromatografici dato che, oltre ai quattro acidi grassi considerati, nel plasma si riscontrano molte altre specie lipidiche, tra cui acidi grassi a lunga catena e colesterolo.

In Fig. 6.3 è riportato lo stesso cromatogramma ottenuto richiamando la RIC corrispondente al rapporto  $m/z = 229$ , di riferimento per l'acido decanoico: il grafico presenta un numero molto minore di picchi e, in particolare, il segnale a 7.19 minuti ( $t_R$  dell'acido decanoico) aumenta di intensità rispetto alla TIC, risultando, in questo modo, facilmente individuabile.

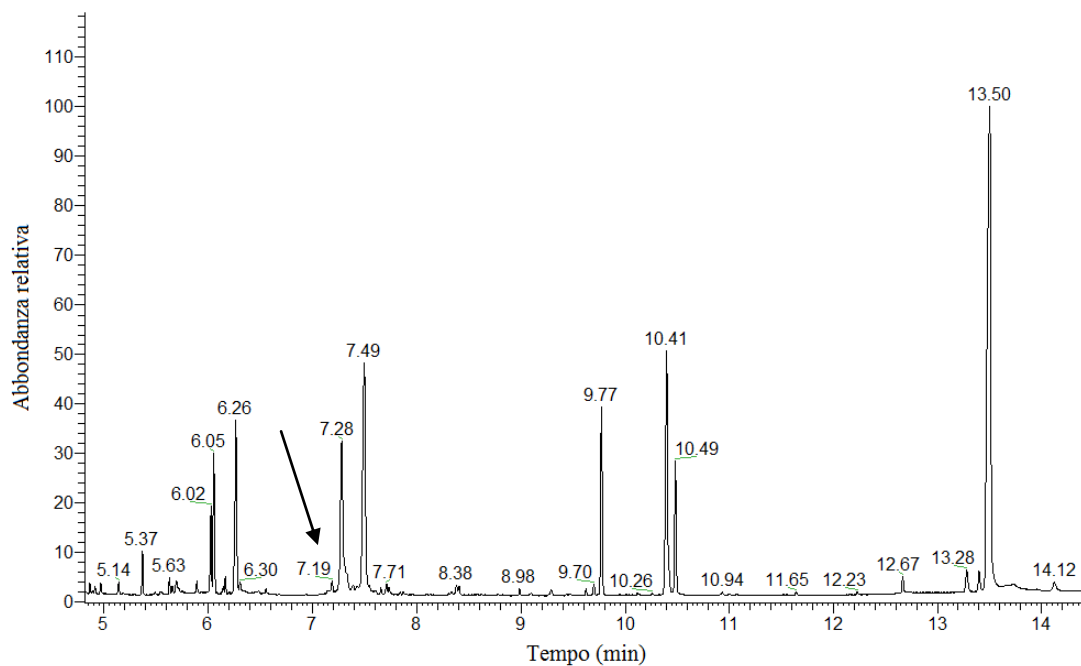


Fig. 6.2. Esempio di un cromatogramma rappresentante la corrente ionica totale (TIC) di un campione di plasma umano; la freccia indica il picco cromatografico del trimetilsililestere dell'acido decanoico ( $t_R = 7.19$  minuti).

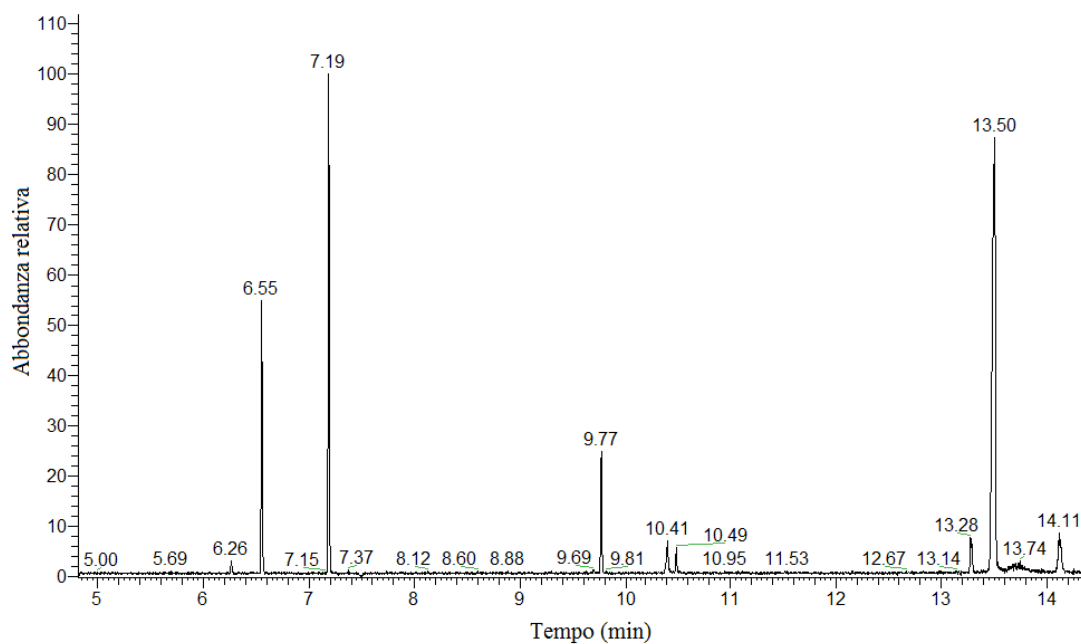


Fig. 6.3. Cromatogramma di un campione ottenuto dalla corrente ionica ricostruita (RIC) selezionando lo ione di riferimento per il trimetilsililestere dell'acido decanoico ( $m/z = 229$ ).

### 6.1.3. Spettri di massa

Ogni composto eluito dalla colonna può essere identificato visualizzando lo spettro di massa corrispondente all'apice del picco cromatografico di interesse. Gli spettri di massa degli analiti considerati in questa tesi sono riportati in Fig. 6.4.

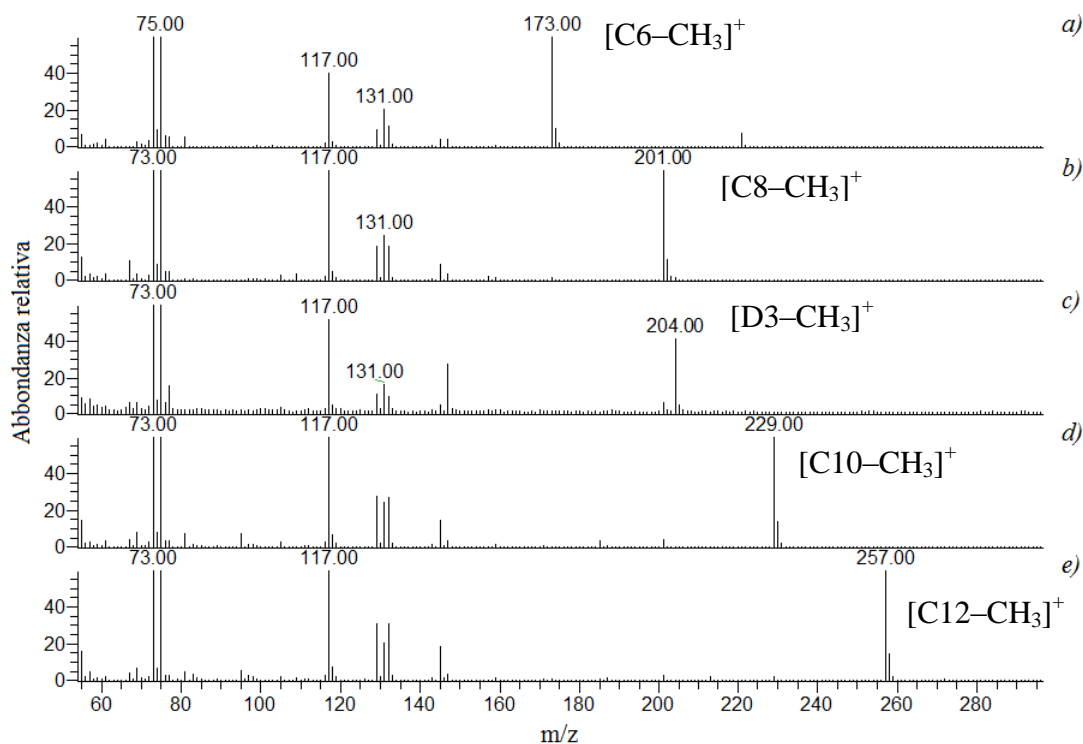


Fig. 6.4. Spettri di massa dei trimetilsililesteri degli acidi grassi considerati: a) acido esanoico; b) acido ottanoico; c) acido  $d_3$ -8,8,8-ottanoico; d) acido decanoico; e) acido dodecanoico.

L'attribuzione dei frammenti più abbondanti presenti negli spettri di massa di Fig. 6.4 è indicata in Fig. 6.5, dove è stato riportato come esempio un ingrandimento dello spettro del trimetilsililestere dell'acido esanoico.

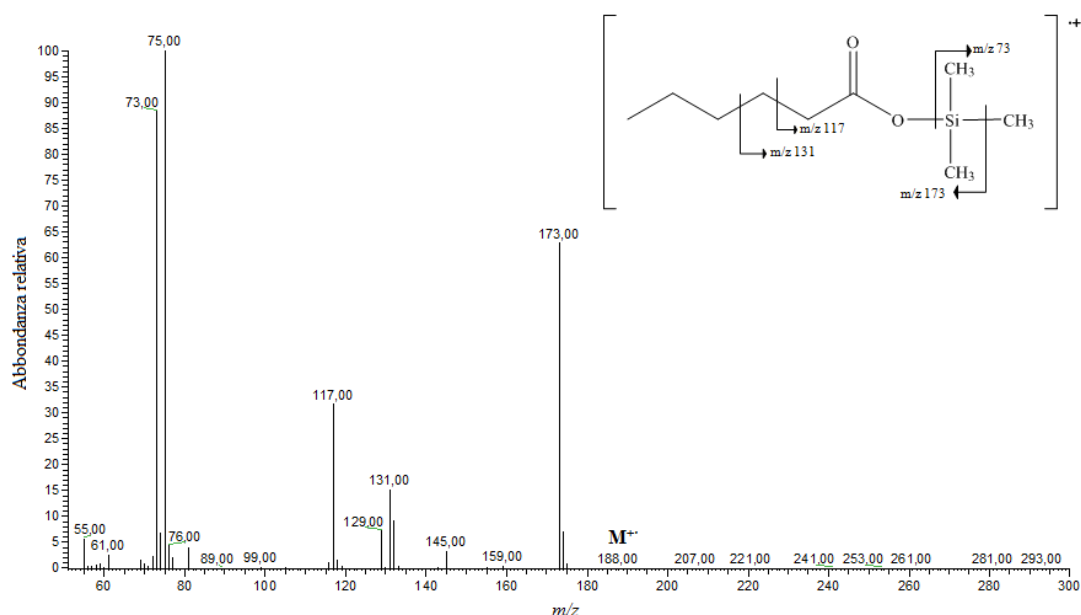


Fig. 6.5. Spettro di massa e attribuzione dei frammenti del trimetilsililestere dell'acido esanoico; per gli altri acidi grassi la frammentazione è analoga.

Come si può osservare, lo ione molecolare  $M^+$  genera un segnale di intensità molto bassa, mentre lo ione  $[M-CH_3]^+$  (di rapporto  $m/z$  pari a 173) risulta molto più intenso. Da questo deriva il frammento che genera il segnale a  $m/z = 75$ , originato da un riarrangiamento di McLafferty e corrispondente alla specie  $[Si(CH_3)_2-OH]^+$ . Gli ioni

di rapporto  $m/z$  pari a 117 [Boris] e 131 derivano dallo ione molecolare per perdita successiva di porzioni diverse della catena idrocarburica. Infine, il segnale ad  $m/z$  pari a 73 [Boris] è attribuibile allo ione  $[\text{Si}(\text{CH}_3)_3]^+$ .

## 6.2. Sviluppo della metodica quantitativa

Un metodo analitico, per poter essere utilizzato per l'analisi quantitativa, deve essere validato. I parametri fondamentali da considerare per la validazione sono l'intervallo dinamico lineare, i limiti di rivelabilità e di quantificazione, l'accuratezza, la precisione, la selettività, la sensibilità ed il recupero [104]. Per la validazione della metodica quantitativa sono stati considerati tre replicati delle rette di calibrazione più  $n$  replicati di una miscela standard preparata per il controllo qualità (Punto 3).

### 6.2.1. Valutazione della linearità

La relazione tra la risposta strumentale e la concentrazione nota di analita è stata determinata costruendo una curva di calibrazione per ciascun composto da quantificare presente nel campione. Per tracciare la curva è necessario utilizzare un numero sufficiente di soluzioni standard a concentrazioni crescenti, che coprano l'intero intervallo di concentrazioni in cui presumibilmente ricade quella incognita dell'analita nel campione. Questo intervallo ovviamente non è noto a priori ed è necessario definirlo attraverso il ricorso a delle prove ripetute, restringendolo progressivamente sulla base dei valori ottenuti per le concentrazioni incognite.

La curva di calibrazione dovrebbe essere preparata nella medesima matrice biologica dei campioni, aggiungendovi concentrazioni note di analita (si parla in tal caso più propriamente di "aggiunte standard"). Oltre alle soluzioni contenenti gli standard, la curva di calibrazione dovrebbe consistere di un "campione zero", costituito dalla matrice del campione processata con il solo standard interno [104].

In questa tesi, le rette di calibrazione sono state tracciate utilizzando il metodo dello standard interno: l'acido  $d_3$ -8,8,8-ottanoico è stato aggiunto ai bianchi, ai campioni e alle soluzioni standard.

Le rette sono state tracciate ponendo come  $y$  il rapporto tra il segnale dell'analita e il segnale dello standard interno (dove il segnale è l'area del picco cromatografico) e come  $x$  il rapporto tra la concentrazione dell'analita e quella dello standard interno. La formula generica di una retta è quindi la seguente:

$$\frac{S_{analita}}{S_{SI}} = m \frac{C_{analita}}{C_{SI}} + q \quad (\text{Eq. 6.1})$$

La pendenza ( $m$ ) e l'intercetta ( $q$ ) di ciascuna retta sono state ottenute mediante regressione lineare dei punti sperimentali. Mediando i risultati ottenuti dai tre replicati delle rette, sono state ricavate le seguenti equazioni:

1. Acido esanoico:  $y = 1.03x + 0.157$  ( $R^2 = 0.993$ );
2. Acido ottanoico:  $y = 1.12x + 0.122$  ( $R^2 = 0.997$ );
3. Acido decanoico:  $y = 0.819x + 0.003$  ( $R^2 = 0.998$ );
4. Acido dodecanoico:  $y = 0.717x + 0.100$  ( $R^2 = 0.998$ ).

Come evidenziato dai valori di  $R^2$  ottenuti dal fitting, il grado di correlazione tra i punti interpolati e la funzione interpolante è piuttosto buono. Le rette di calibrazione medie sono riportate in Fig. 6.6. Le barre di errore rappresentano la deviazione standard relativa a ciascun punto, mentre le fasce di confidenza sono state tracciate per un livello di confidenza del 95%.

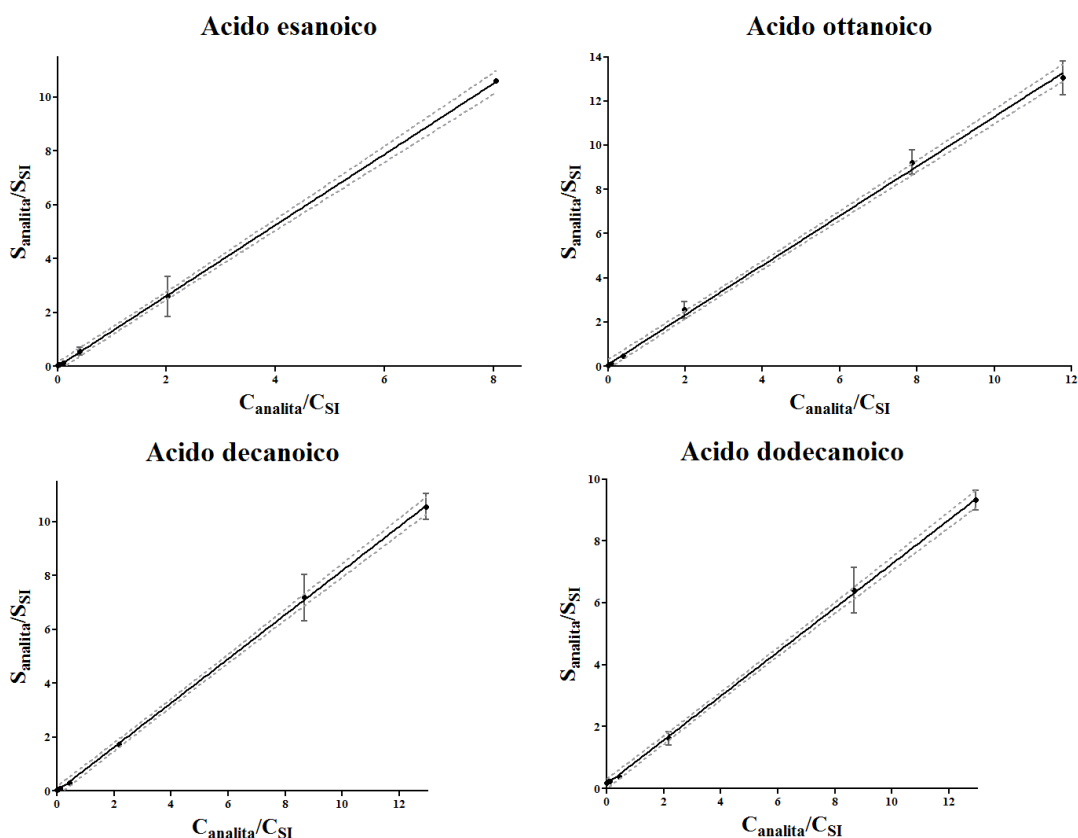


Fig. 6.6. Rette di calibrazione medie, ottenute da tre replicati, per ciascuno degli analiti considerati.

## 6.2.2. Valutazione dei limiti di rivelabilità e di quantificazione

Il limite di rivelabilità (LOD, *Limit Of Detection*) di una procedura analitica è la più piccola quantità di analita in un campione che può essere rivelata, ma non necessariamente quantificata come un valore esatto [105]. Per determinarlo è possibile ricorrere a diversi approcci; quello utilizzato in questa tesi si basa sulla determinazione del bianco. Come riportato da Sanagi *et al.* [106], esso si basa sulla determinazione del LOD del segnale, stimabile dalla media dei segnali ottenuti per il bianco. Come bianco, nel caso specifico, è stato considerato ciascun Punto 0 delle tre rette considerate, contenente il solo standard interno. Il LOD del segnale è quindi pari a:

$$LOD_y = \bar{y}_{b_i} + ks_{b_i} \quad (Eq. 6.2)$$

in cui il primo termine è la media dei segnali del bianco, mentre il secondo termine è dato dalla deviazione standard delle misure del bianco, moltiplicata per il coefficiente  $k$ . Poiché il valore raccomandato per questo coefficiente nel caso del limite di rivelabilità è pari a 3 [106], la formula effettivamente utilizzata per il calcolo è:

$$LOD_y = \bar{y}_{b_i} + 3s_{b_i} \quad (Eq. 6.3)$$

Dal LOD del segnale è necessario risalire al LOD nel dominio delle concentrazioni. Dall'equazione della retta si ha:

$$x = \frac{y - q}{m} \quad (\text{Eq. 6.4})$$

con  $m$  e  $q$  pendenza ed intercetta della retta. Nel caso specifico, come pendenza è stata utilizzata la media delle pendenze ricavate per ciascuna retta (indicata nel paragrafo 6.2.1), mentre l'intercetta coincide con la media del segnale del bianco. Riarrangiando si ottiene:

$$LOD_x = \frac{LOD_y - q}{m} = \frac{3s_{b_i}}{m} \quad (\text{Eq. 6.5})$$

Poiché le rette di calibrazione sono state ottenute considerando come  $y$  il rapporto tra il segnale di ciascun analita e quello dello standard interno e come  $x$  il rapporto tra la concentrazione dell'analita e quella dello standard interno, il valore ottenuto dall'Eq. 6.5 è stato moltiplicato per la concentrazione di standard interno usata per costruire ognuna delle rette considerate. La formula effettivamente utilizzata è quindi equivalente a:

$$LOD_{C_{analita}} = \frac{3s_{b_i} C_{SI}}{m} \quad (\text{Eq. 6.6})$$

Il limite di quantificazione (LOQ, *Limit Of Quantitation*) di una procedura analitica è la più piccola quantità di analita in un campione che può essere determinata quantitativamente con accuratezza e precisione note [105]. Utilizzando l'approccio della determinazione del bianco, la formula per il calcolo del LOQ è analoga ad Eq. 6.6, con l'unica differenza che il valore raccomandato per il coefficiente  $k$  non è 3, ma 10:

$$LOQ_{C_{analita}} = \frac{10s_{b_i} C_{SI}}{m} \quad (\text{Eq. 6.7})$$

I valori medi ottenuti dalle tre rette per ciascun composto considerato sono indicati in Tab. 6.3.

Tab. 6.3. Valori medi di LOD e LOQ per ciascun analita considerato.

<b>Analita</b>	<b>LOD (ng/μL)</b>	<b>LOQ (ng/μL)</b>
<i>Acido esanoico</i>	0.071	0.24
<i>Acido ottanoico</i>	0.066	0.22
<i>Acido decanoico</i>	0.091	0.30
<i>Acido dodecanoico</i>	0.27	0.91

### 6.2.3. Valutazione dell'accuratezza

L'accuratezza di un metodo analitico descrive la vicinanza dei risultati medi ottenuti al valore vero (ovvero alla concentrazione reale) dell'analita [104-105]. È determinata dall'analisi ripetuta di campioni contenenti quantità note di analita, e può essere

quantificata dalla variazione percentuale della concentrazione ottenuta dal metodo rispetto alla concentrazione reale [104-105]. In caso di mancanza di materiali di riferimento certificati (CRM, *Certified Reference Materials*), è possibile stimare l'accuratezza confrontando il rapporto reale tra la concentrazione di analita e quella dello standard interno ( $x_{vera}$ ) e il corrispondente rapporto di concentrazioni ottenuto in base ai parametri della retta ( $x_{calcolata}$ ) per tre replicati di una soluzione a concentrazione nota:

$$Var.\% = |(x_{vera} - x_{calcolata}) \times 100| \quad (Eq. 6.8)$$

La soluzione standard scelta per la valutazione dell'accuratezza è stata quella equivalente al Punto 3 della retta di calibrazione, in quanto caratterizzato da un valore di concentrazione intermedio all'interno dell'intervallo considerato. Sono stati ottenuti i seguenti valori:

1. Acido esanoico: 4.1 %;
2. Acido ottanoico: 6.7 %;
3. Acido decanoico: 8.1 %;
4. Acido dodecanoico: 9.8 %.

Il valore medio dovrebbe cadere all'interno del 15% del valore vero, eccetto per valori molto bassi (vicini cioè al LOQ), dove esso non dovrebbe deviare di più del 20% [104-105]. Dai risultati ottenuti si evince che il metodo è in grado di garantire una buona accuratezza.

#### 6.2.4. Valutazione della precisione

La precisione di una procedura analitica esprime l'accordo tra una serie di misure individuali ottenute da più aliquote di uno stesso campione omogeneo, in determinate condizioni stabilite. È in genere espressa come varianza, deviazione standard o coefficiente di variazione di una serie di misure [105].

Esistono tre livelli di precisione: la ripetibilità, la precisione intermedia e la riproducibilità [104-105]. La *ripetibilità* esprime l'accordo tra misure effettuate nelle medesime condizioni operative, da un singolo operatore, in un breve intervallo di tempo [105]. La *precisione intermedia* si riferisce, invece, a misure effettuate in uno stesso laboratorio, ma da analisti diversi, utilizzando strumenti differenti ed effettuate in più giorni distinti [105]. La *riproducibilità* esprime invece la precisione di misure effettuate in laboratori diversi [105]. Nel caso specifico di questa tesi, è stato possibile stimare solamente la ripetibilità, in quanto tutte le analisi sono state effettuate dallo stesso operatore e con il medesimo strumento.

Per valutare la ripetibilità sono state iniettate consecutivamente tre soluzioni standard equivalenti al Punto 3, preparate analogamente a quanto descritto nel paragrafo 5.5.4. Come stima della precisione è stato scelto il coefficiente di variazione percentuale:

$$CV\% = \frac{\text{deviazione standard}}{\bar{y}} \times 100 \quad (Eq. 6.9)$$

dove sono state considerate la deviazione standard e la media dei rapporti tra i segnali di ciascun analita e quello dello standard interno. In questo modo sono stati ottenuti



i CV% medi relativi a ciascun acido grasso considerato:

1. Acido esanoico: 5.6%;
2. Acido ottanoico: 5.3%;
3. Acido decanoico: 9.3%;
4. Acido dodecanoico: 11.0%.

La precisione non dovrebbe superare il 15% del coefficiente di variazione, eccetto nell'intorno del LOQ, dove il limite sale al 20% [104]: il metodo analitico qui sviluppato risulta quindi sufficientemente preciso e può essere utilizzato per la determinazione di tutti gli acidi grassi considerati.

### 6.2.5. Valutazione del recupero

Per recupero si intende l'efficienza di estrazione di un certo composto, ottenuta mediante un determinato metodo analitico. Per stimarlo si ricorre al confronto tra la risposta del rivelatore all'analita estratto da una matrice biologica, cui era stato precedentemente aggiunto in quantità nota, e la risposta strumentale ottenuta per la concentrazione vera di uno standard puro. Non è necessario che il recupero dell'analita raggiunga il 100%; la sua entità deve essere tuttavia costante, precisa e riproducibile [104].

Poiché nel caso qui considerato la matrice utilizzata (plasma) contiene già gli analiti di cui si vuole stimare il recupero (in concentrazione incognita), la valutazione è stata effettuata sullo standard interno, l'acido d<sub>3</sub>-8,8,8-ottanoico. Sono state considerate le aree del segnale dello standard interno in sei soluzioni standard e in sei campioni estratti. Il recupero percentuale è stato quindi valutato come rapporto dell'area media dello standard interno estratto sull'area media dello standard interno non estratto:

$$\text{Recupero \%} = \frac{\bar{A}_{SI} \text{ estratto}}{\bar{A}_{SI} \text{ non estratto}} \times 100 \quad (\text{Eq. 6.10})$$

Dal calcolo è risultato un valore pari al 73%. Tale dato rappresenta una buona stima del recupero degli acidi grassi a media catena (C6-C12) da plasma, poiché lo standard interno utilizzato possiede le stesse caratteristiche chimico-fisiche degli altri analiti esaminati.

### 6.2.6. Valutazione globale del metodo analitico

Dalla validazione del metodo esaminato è emerso che esso è accurato e preciso, presenta limiti di rivelabilità e di quantificazione relativamente bassi, risponde in modo lineare alla concentrazione degli analiti e ne garantisce un recupero sufficientemente elevato. I valori dei parametri considerati per la validazione sono riassunti in *Tab. 6.4*.

Tab. 6.4. Valori dei parametri considerati per la validazione del metodo analitico esaminato.

Analita	Equazione	R <sup>2</sup>	LOD (ng/μL)	LOQ (ng/μL)	Accuratezza (Var.%)	Ripetibilità (CV%)
<b>C6</b>	$y = 1.03x + 0.157$	0.993	0.071	0.24	4.1%	5.6%
<b>C8</b>	$y = 1.12x + 0.122$	0.997	0.066	0.22	6.7%	5.3%
<b>C10</b>	$y = 0.819x + 0.003$	0.998	0.091	0.30	8.1%	9.3%
<b>C12</b>	$y = 0.717x + 0.100$	0.998	0.27	0.91	9.8%	11.0%

### 6.3. Risultati quantitativi

#### 6.3.1. Quantificazione degli acidi grassi a media catena nei campioni

Per la quantificazione dei campioni è stato necessario calibrare lo strumento ogni settimana, effettuando quotidianamente anche dei controlli di qualità per accertare l'assenza di derive strumentali. Le rette ottenute settimanalmente (Eq. 6.1) per ciascun analita sono state utilizzate per la quantificazione dei campioni.

La concentrazione incognita di analita nel plasma è calcolabile se è nota la concentrazione di standard interno introdotta nel campione all'inizio del trattamento, ed è data dalla seguente equazione:

$$C_{analita} = \frac{C_{SI}}{m} \left( \frac{S_{analita}}{S_{SI}} - q \right) \quad (Eq. 6.11)$$

I risultati ottenuti, suddivisi per gruppo di pazienti analizzati, sono riportati in Tab. 6.5. La variabilità dei dati indicata in parentesi è stata calcolata come deviazione standard della media, pesata per la *t-student* corrispondente al numero di campioni analizzati in ogni gruppo.

Tab. 6.5. Concentrazioni medie degli acidi grassi a media catena determinati nel plasma delle diverse categorie di soggetti considerati; tra parentesi è riportata la variabilità relativa a ciascun risultato (è stata utilizzata la notazione suggerita dalla Royal Society of Medicine [107]).

<b>CONTROLLI</b>				
	<b>Esanoico</b>	<b>Ottanoico</b>	<b>Decanoico</b>	<b>Dodecanoico</b>
<b>Conc. media (ng/μL)</b>	1.21 (0.58)	1.7 (1.4)	4.4 (4.3)	3.1 (3.3)
<b>RETTOCOLITE ULCEROSA</b>				
	<b>Esanoico</b>	<b>Ottanoico</b>	<b>Decanoico</b>	<b>Dodecanoico</b>
<b>Conc. media (ng/μL)</b>	1.8 (1.0)	0.69 (0.77)	1.7 (1.1)	4.3 (2.8)
<b>CANCRO COLORETTALE</b>				
	<b>Esanoico</b>	<b>Ottanoico</b>	<b>Decanoico</b>	<b>Dodecanoico</b>
<b>Conc. media (ng/μL)</b>	0.44 (0.13)	2.9 (1.6)	7.6 (3.2)	3.1 (3.1)
<b>CANCRO MAMMELLA</b>				
	<b>Esanoico</b>	<b>Ottanoico</b>	<b>Decanoico</b>	<b>Dodecanoico</b>
<b>Conc. media (ng/μL)</b>	0.42 (0.26)	0.28 (0.17)	0.81 (0.37)	2.8 (2.2)

In *Tab. 6.6* il gruppo dei CRC è stato stratificato per i diversi stadi della malattia; sono indicate anche le concentrazioni riscontrate per i tre casi di adenomi considerati. Le variabilità dei dati sono state calcolate nello stesso modo adottato per i risultati in *Tab. 6.5*.

*Tab. 6.6. Valori medi delle concentrazioni degli acidi grassi riscontrate in ciascuna classe di cancro coloretale e nel gruppo di adenomi; tra parentesi è riportata la variabilità relativa a ciascun risultato (è stata utilizzata la notazione suggerita dalla Royal Society of Medicine [107]).*

<b>ADENOMI</b>				
	<b>Esanoico</b>	<b>Ottanoico</b>	<b>Decanoico</b>	<b>Dodecanoico</b>
<b>Conc. media (ng/μL)</b>	0.45 (0.54)	3 (10)	6 (17)	1.5 (2.0)
<b>CRC I</b>				
	<b>Esanoico</b>	<b>Ottanoico</b>	<b>Decanoico</b>	<b>Dodecanoico</b>
<b>Conc. media (ng/μL)</b>	0.48 (0.41)	2.7 (2.0)	6.5 (5.2)	0.96 (0.56)
<b>CRC II</b>				
	<b>Esanoico</b>	<b>Ottanoico</b>	<b>Decanoico</b>	<b>Dodecanoico</b>
<b>Conc. media (ng/μL)</b>	0.42 (0.30)	1.7 (1.0)	6.7 (4.3)	7 (11)
<b>CRC III</b>				
	<b>Esanoico</b>	<b>Ottanoico</b>	<b>Decanoico</b>	<b>Dodecanoico</b>
<b>Conc. media (ng/μL)</b>	0.38 (0.17)	4.2 (5.3)	9 (10)	1.62 (0.59)
<b>CRC IV</b>				
	<b>Esanoico</b>	<b>Ottanoico</b>	<b>Decanoico</b>	<b>Dodecanoico</b>
<b>Conc. media (ng/μL)</b>	0.60 (0.33)	3.4 (4.1)	8 (10)	1.86 (0.66)

La variabilità delle concentrazioni è molto maggiore sui dati di *Tab. 6.6* che non su quelli di *Tab. 6.5*, in quanto è stata calcolata su un numero di campioni più esiguo (le concentrazioni individuali di ciascun campione sono riportate in Appendice B).

### 6.3.2. Significatività dei risultati

#### 6.3.2.1. Test statistici

I diversi gruppi di soggetti considerati sono stati confrontati tra loro in base alla concentrazione di ciascun acido grasso presente nel plasma, con lo scopo di verificare se esistano delle differenze statisticamente significative nelle concentrazioni degli analiti in presenza di diversi stati patologici. Poiché il confronto è stato effettuato considerando più di due gruppi di popolazioni, il test di significatività prescelto è stato il test ANOVA, seguito dal *post hoc* test "Bonferroni": il primo verifica la presenza di significative differenze in almeno uno dei gruppi di campioni considerati, mentre il secondo effettua confronti appaiati per ogni gruppo in esame (ad esempio: controlli vs. CRC, controlli vs. MAM, controlli vs. RCU, ecc...). In questo modo è stato possibile individuare gli analiti presenti ad un livello significativo in un gruppo di soggetti piuttosto che in un altro.

Il risultato del test ANOVA è indicato dal *p-value*: se esso è minore di 0.05, significa che almeno un gruppo differisce significativamente dagli altri. Anche il test "Bonfer-

roni" valuta i gruppi di dati in termini di *p-value*, il cui valore è rappresentato graficamente mediante una serie di asterischi: maggiore è il loro numero, più significativa è la differenza tra le due popolazioni considerate.

### 6.3.2.2. Confronto tra i quattro macrogruppi

I test ANOVA e "Bonferroni" sono stati effettuati per ogni acido grasso, considerando i quattro macrogruppi dei controlli, dei pazienti affetti da rettocolite ulcerosa, dei tumori al colon e dei tumori alla mammella. Una rappresentazione grafica della distribuzione dei quattro acidi grassi a media catena nel plasma delle quattro categorie è riportata in Fig. 6.7 in forma di *box-plot*.

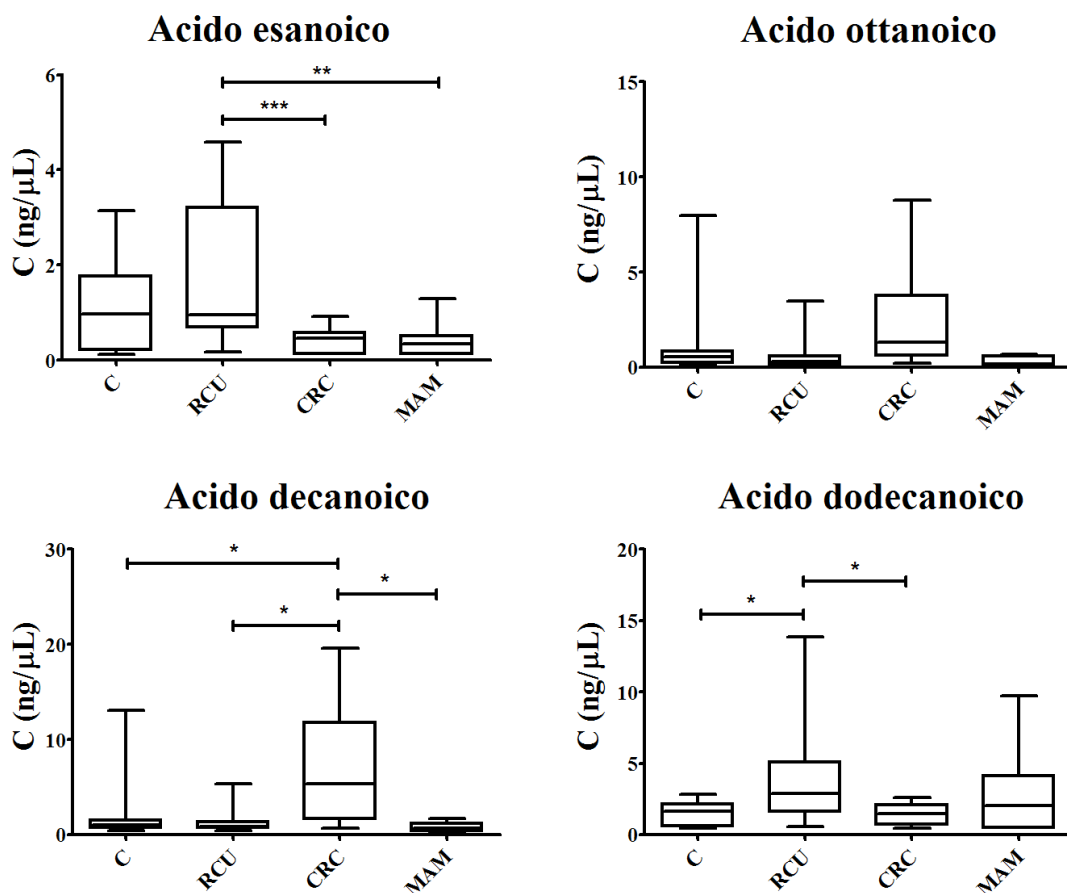


Fig. 6.7. Box-plot rappresentanti la distribuzione di ciascun acido grasso all'interno dei quattro macrogruppi (C, RCU, CRC, MAM); sono riportati anche i risultati del test "Bonferroni" (\*: *p-value* < 0.05; \*\*: *p-value* < 0.01; \*\*\*: *p-value* < 0.001).

I riquadri evidenziano l'intervallo di concentrazioni all'interno del quale ricade il 50% dei campioni analizzati (limite inferiore pari al 25%, limite superiore equivalente al 75%), mentre le barre delimitano la fascia di concentrazione che comprende l'80% dei campioni (limite inferiore pari al 10%, limite superiore uguale al 90%). La riga all'interno dei riquadri rappresenta invece la concentrazione media di un dato acido grasso per ciascuna popolazione considerata. Nei grafici sono riportati anche i risultati del test "Bonferroni". Essi evidenziano che l'acido esanoico si trova in maggiore concentrazione nel plasma dei pazienti affetti da rettocolite ulcerosa rispetto a quello dei pazienti colpiti da cancro al colon o alla mammella. Dal confronto dei li-

velli di questo acido negli RCU con quelli riscontrati nei controlli non appare invece alcuna differenza significativa. I quattro gruppi considerati non presentano invece livelli statisticamente differenti di acido ottanoico, anche se esso mostra un trend di innalzamento nel gruppo dei pazienti affetti da CRC, analogamente a quanto riscontrato in studi effettuati in precedenza [100]. I *box-plot* relativi all'acido decanoico evidenziano un'alterazione dei suoi livelli nei pazienti affetti da cancro del colon: la sua concentrazione plasmatica risulta infatti significativamente maggiore nei CRC rispetto a tutti gli altri gruppi considerati, compresi i controlli. Per questo motivo esso potrebbe costituire un possibile biomarcatore diagnostico in grado di discriminare i soggetti sani da quelli malati. Alti livelli di acido dodecanoico sono stati riscontrati, come per l'acido esanoico, in corrispondenza alla rettocolite ulcerosa. In particolare, la sua concentrazione è risultata statisticamente differente in questo gruppo rispetto ai CRC e ai soggetti sani.

### 6.3.2.3. Confronti tra i diversi stadi di cancro coloretale

La Fig. 6.8 riporta in forma grafica le concentrazioni ottenute in funzione della stadiazione tumorale di CRC.

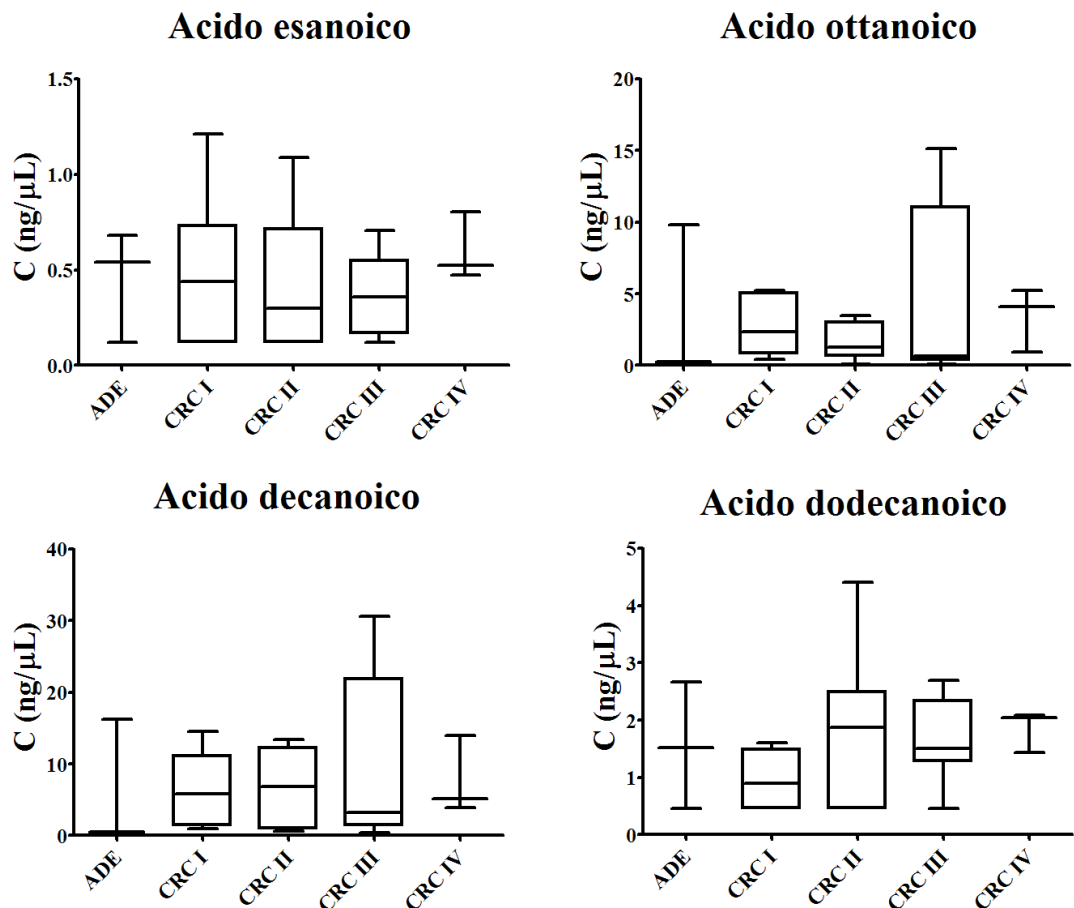


Fig. 6.8. Box-plot rappresentanti la distribuzione di ciascun acido grasso all'interno del gruppo dei CRC, in funzione dello stadio di avanzamento della malattia; sono indicati anche i risultati ottenuti per i campioni di adenomi (ADE). Per i gruppi degli adenomi e dei CRC IV non è possibile rappresentare i dati mediante box-plot in quanto il numero di campioni appartenenti a queste due categorie è troppo esiguo: sono riportati quindi solamente la media e i valori massimo e minimo.

Dai test non è emersa alcuna differenza significativa tra i vari gruppi, quindi nessuno degli acidi grassi a media catena analizzati presenta livelli significativamente diversi in un particolare stadio della patologia rispetto ad altri.

L'indagine è stata quindi focalizzata sulla ricerca di possibili differenze significative nei livelli degli acidi grassi in funzione dell'invasività tumorale. A questo scopo, i dati relativi ai quattro stadi sono stati raccolti in due gruppi, associabili all'assenza (stadi I e II) e alla presenza (stadi III e IV) di coinvolgimento linfonodale. I risultati ottenuti da questa suddivisione sono riportati in Fig. 6.9 ed evidenziano l'assenza di significative differenze nelle concentrazioni degli MCFA in relazione all'invasività del tumore.

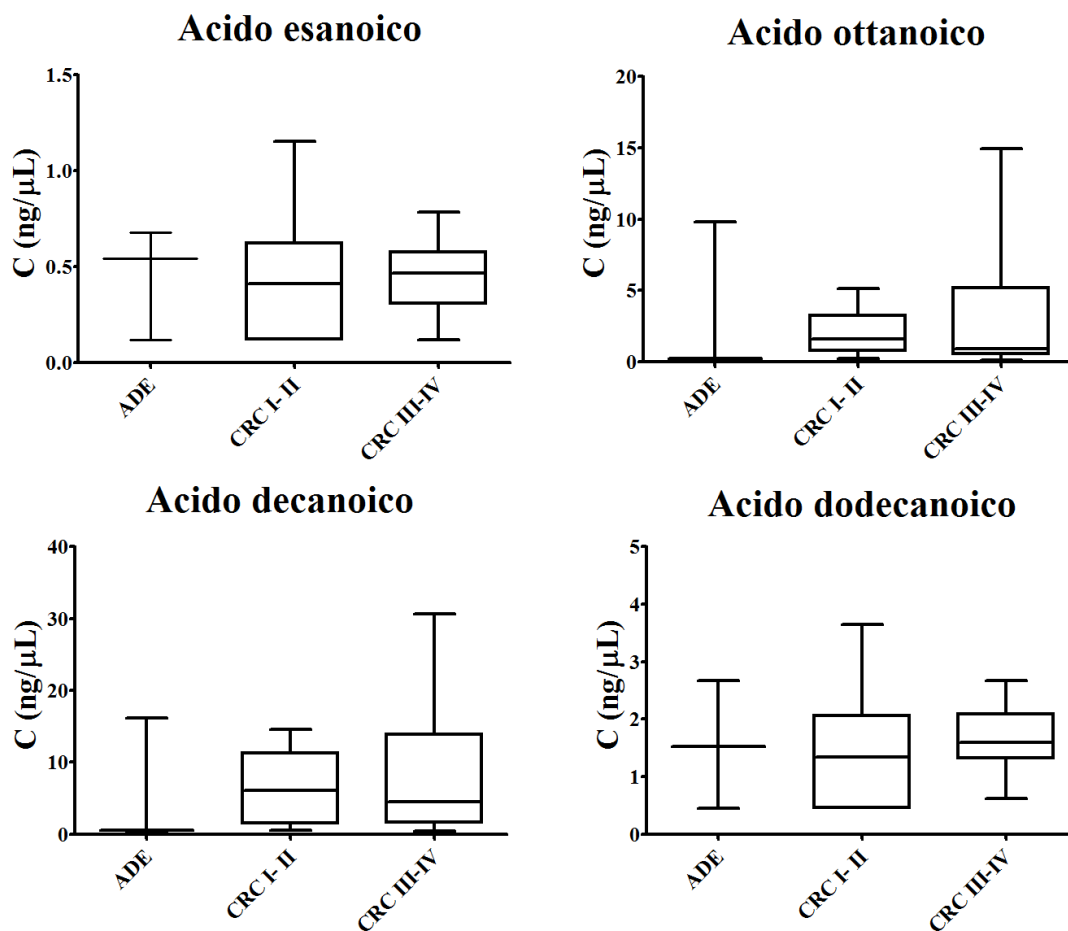


Fig. 6.9. Box-plot rappresentanti la distribuzione di ciascun acido grasso all'interno dei gruppi CRC, in funzione dell'assenza (CRC I-II) o della presenza (CRC III-IV) di coinvolgimento linfonodale; sono indicati anche i risultati ottenuti per i campioni di adenomi (ADE), ma, dato il loro numero esiguo, non è stato possibile tracciarne il box-plot corrispondente e sono indicati quindi solamente la media e i valori massimo e minimo.

### 6.3.3. Discussione dei risultati ottenuti

Le cause degli aumenti dei livelli plasmatici degli acidi grassi a media catena, riscontrati in corrispondenza alle patologie esaminate, non sono ancora note. Dato che i prelievi di sangue sono stati effettuati dopo una notte di digiuno, si può escludere che essi derivino da cause alimentari: come riportato anche da Saito *et al.*, non ci dovrebbe quindi essere un'influenza diretta da parte degli acidi grassi derivanti dal cibo [108]. È dunque possibile che il loro incremento sia legato alla sovraespressione

dell'acido grasso sintasi (FAS), enzima deputato alla biosintesi di acidi grassi a lunga catena a partire da acetil-CoA e malonil-CoA [109]. Alcuni autori hanno infatti riscontrato un aumento della sua concentrazione in corrispondenza all'insorgenza di adenomi, rettocolite ulcerosa e vari tipi di tumori, tra cui quello al colon-retto [97-99, 109]. È infatti noto che lo sviluppo e la progressione del cancro sono accompagnati dall'alterazione dell'espressione e dell'attività degli enzimi coinvolti nell'omeostasi cellulare degli acidi grassi, che comprende la loro sintesi, il loro trasporto e il loro metabolismo [110]. Ciò risulta in una marcata sovraespressione non solo della FAS, ma anche dell'acetil-CoA carbossilasi (ACC), enzima in grado di produrre il malonil-CoA, un metabolita intermedio che funziona non solo da substrato per la sintesi degli acidi grassi, ma anche come inibitore della loro ossidazione [110].

Il meccanismo che causa l'aumento di questi enzimi nei tumori è tuttora sconosciuto. Le cellule normali, eccetto quelle del fegato e del tessuto adiposo, presentano bassi livelli della FAS, la cui espressione risulta regolata da diversi fattori, tra cui il metabolismo dei carboidrati e l'apporto di acidi grassi nella dieta [97, 109]. Al contrario, nelle cellule tumorali in rapida proliferazione vi è una disregolazione nella sintesi *de novo* di lipidi per la costituzione delle membrane e la produzione di energia mediante  $\beta$ -ossidazione [109]. La maggiore sovraespressione potrebbe quindi essere indotta proprio dall'aumentata richiesta di acidi grassi per la rapida costruzione di membrane biologiche necessarie alla proliferazione cellulare [97]. A conferma di questo fatto, è stato osservato che molte cellule cancerose umane non immagazzinano trigliceridi, ma gli acidi grassi sintetizzati per via endogena sono esterificati per lo più a fosfolipidi [99]. Qualsiasi sia la causa, tutte queste evidenze sembrano suggerire che la FAS sia un enzima chiave nella lipogenesi neoplastica [109]. È stato infatti osservato che la sua sovraespressione comincia sin dalle prime fasi dello sviluppo del tumore, diventando più pronunciata col progredire del cancro [110], tant'è che alti livelli di FAS sono legati ad una prognosi scarsa e ad una diminuzione della probabilità di sopravvivenza [109].

Un'ulteriore conferma dell'importanza della FAS nello sviluppo del tumore proviene da studi che hanno dimostrato come l'inibizione di questo enzima sia citotossica per le cellule cancerose umane [99]: l'arresto della biosintesi di acidi grassi si traduce nel rallentamento della crescita cellulare, che porta alla morte selettiva delle sole cellule tumorali [110].

Oltre a costituire dei substrati per la costruzione di membrane e per la produzione di energia, i lipidi agiscono anche a livello della trascrizione genica mediante l'interazione con specifici recettori, i PPAR (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor*) [111-113]. Essi costituiscono una famiglia di recettori nucleari che svolgono il ruolo di fattori di trascrizione attivati da leganti. Essi si presentano in varie isoforme diverse: PPAR  $\alpha$ , PPAR  $\beta$ , PPAR  $\delta$  e PPAR  $\gamma$ .

Il PPAR  $\alpha$  attiva il catabolismo degli acidi grassi, stimola la gluconeogenesi ed è coinvolto nel controllo dell'assemblaggio delle lipoproteine e nella proliferazione dei perossisomi [113-114]. I PPAR  $\beta$  e  $\delta$  controllano la proliferazione e la differenziazione cellulare [114]. Il PPAR  $\gamma$  è coinvolto nell'immagazzinamento e nell'anabolismo dei lipidi e nel metabolismo del glucosio. Esso è espresso nel sistema immunitario, nel colon e nel tessuto adiposo. In quest'ultimo esso è richiesto per la sintesi degli acidi grassi e l'adipogenesi, e gioca un ruolo fondamentale nella differenziazione degli adipociti [111].

I PPAR svolgono quindi numerose funzioni che influiscono sui profili lipidici di un individuo: un'alterazione del loro funzionamento potrebbe comportare l'aumento dei livelli di alcuni acidi grassi rispetto ad altri. Oltre che per il loro ruolo di regolatori

del metabolismo dei lipidi, questi recettori sono interessanti in quanto in molti studi è stata riscontrata la loro associazione con alcune patologie coloretali, tra cui la rettocolite ulcerosa e il CRC: essi potrebbero quindi costituire l'anello di congiunzione tra queste patologie e l'aumento dei livelli degli acidi grassi a media catena riscontrati in questo studio.

Di particolare interesse sembra essere l'isoforma  $\gamma$  di questa famiglia di recettori, in quanto la sua attivazione da parte di specifici leganti ha effetto antineoplastico per diversi tipi di tumori, tra cui, probabilmente, anche quello coloretale [114]: se ne riscontra infatti un'elevata espressione nella mucosa del colon e del retto. Tuttavia, il suo ruolo nella carcinogenesi del CRC rimane controverso [114]: mentre molti dei dati a disposizione suggeriscono che il PPAR  $\gamma$  abbia un effetto antitumorale nei confronti del cancro al colon-retto [114], altri studi dimostrano che la sua attivazione può invece comportare lo sviluppo di questo tumore [112, 114-115]. Queste due osservazioni contrastanti potrebbero derivare da una diversa attivazione del recettore. Infatti, tra i leganti endogeni in grado di attivare il PPAR  $\gamma$  vi sono gli acidi grassi a lunga catena poliinsaturi, gli eicosanoidi [113-114, 116] e alcuni acidi grassi saturi tra cui l'acido decanoico [111]. Quest'ultimo è in grado di attivare il recettore, ma, contrariamente agli altri leganti, non è in grado di indurre l'adipogenesi, probabilmente a causa del fatto che esso si lega in un dominio specifico, precluso agli acidi grassi a lunga catena. La tasca in cui si posiziona è infatti troppo piccola per ospitare catene carboniose più lunghe, e il suo legame in questa sede potrebbe spiegare la sua diversa attività biologica [111]. Se il legame dell'acido decanoico a questo recettore fosse in grado di bloccare la sintesi di acidi grassi a lunga catena destinati a costituire nuove membrane biologiche per la proliferazione delle cellule tumorali, il suo innalzamento nel plasma potrebbe costituire un meccanismo di difesa dell'organismo, volto a limitare la diffusione delle cellule cancerose. Questo fatto potrebbe anche portare a nuove ipotesi riguardo al motivo dell'aumento dell'espressione dell'acido grasso sintasi: potrebbe infatti esistere un meccanismo in grado di bloccare la sintesi degli acidi grassi in corrispondenza a catene carboniose di dieci atomi di carbonio, e tale meccanismo sfrutterebbe quindi la maggiore disponibilità di FAS per produrre più acido decanoico in grado di legarsi al PPAR  $\gamma$ . A sua volta, il PPAR  $\gamma$  attivato promuoverebbe l'inibizione della proliferazione cellulare. Ciò potrebbe anche fornire una spiegazione del perché solo l'acido decanoico aumenti in modo significativo in presenza di cancro coloretale: il PPAR  $\gamma$  non è infatti in grado di legare gli acidi con sei o otto atomi di carbonio, e quelli a catena più lunga si legano in altri domini del recettore [111]. Si tratta però solamente di ipotesi, in quanto, nonostante sia stato dimostrato che gli agonisti del PPAR  $\gamma$  inducono l'arresto della crescita nelle cellule cancerose, il meccanismo molecolare che porta a questa inibizione è complicato e non del tutto noto [113, 116]. Una delucidazione del ruolo dell'acido decanoico nei confronti del PPAR  $\gamma$  potrebbe derivare dall'indagine dei prodotti a valle dell'attivazione di questo recettore.

Il PPAR  $\gamma$  sembra avere inoltre anche un ruolo nel controllo delle reazioni infiammatorie: i soggetti affetti da rettocolite ulcerosa mostrano infatti una diminuzione della sua espressione [31].



## 7. CONCLUSIONI E PROSPETTIVE

Il metodo analitico sviluppato in questa tesi, ossia l'utilizzo della *fast* GC-MS per la determinazione degli acidi grassi a media catena, è stato validato seguendo le linee guida indicate dagli enti FDA (*Food and Drug Administration*) ed EMEA (*European Medicines Agency*). I parametri utilizzati per la validazione hanno evidenziato come esso sia accurato, preciso, sensibile e caratterizzato da un intervallo dinamico lineare sufficientemente ampio, giustificandone così il suo utilizzo per la quantificazione degli acidi grassi nel plasma.

Il metodo è inoltre caratterizzato da una velocità di analisi superiore a quella ottenibile mediante GC-MS convenzionale; tale peculiarità è di fondamentale importanza per l'applicazione clinica, dove è richiesta l'analisi di una notevole quantità di campioni in breve tempo.

I livelli degli acidi grassi a media catena, determinati per ciascun gruppo di soggetti, sono caratterizzati da una variabilità molto elevata, peculiarità tipica dei campioni biologici. Nonostante ciò, i test ANOVA e "Bonferroni" hanno evidenziato la presenza di significative differenze nei livelli di alcuni di essi tra le diverse categorie considerate. In particolare, i livelli degli acidi ottanoico e decanoico, a conferma degli studi preliminari effettuati in precedenza [100], risultano aumentati in caso di cancro coloretale. L'incremento combinato di questi due composti nel plasma potrebbe costituire quindi un'indicazione della presenza di questa patologia. In particolare, l'acido decanoico presenta livelli di concentrazione notevolmente più alti rispetto a quelli riscontrati nei pazienti affetti da RCU e nei soggetti sani. Inoltre, sembra specifico per la sede tumorale, in quanto i suoi livelli non subiscono un aumento nel caso di insorgenza di cancro alla mammella. Per confermarne la specificità, tuttavia, sarebbe opportuno estendere l'indagine ad altri tipi di tumore, specialmente a quelli che colpiscono altri organi coinvolti nella digestione, tra cui stomaco, pancreas e fegato.

Alti livelli plasmatici di acido esanoico, accompagnati da un aumento della concentrazione di acido dodecanoico, sembrano invece indicativi della rettocolite ulcerosa. Data la notevole variabilità associata ai valori ottenuti, appare evidente che, per giungere a conclusioni più sicure, è necessario aumentare il numero di casi considerati. In questo modo infatti, la presenza di eventuali *outliers* inciderebbe con un peso minore sulla media globale, aumentando la significatività dei risultati ottenuti.

Partendo dai dati riportati in questo lavoro di tesi appare necessaria la futura comprensione di quali siano i meccanismi biologici che portano all'alterazione dei profili lipidici in corrispondenza a queste malattie del sistema coloretale. In particolare risulta indispensabile una più profonda indagine del ruolo giocato dall'acido grasso sintasi e dai recettori PPAR in corrispondenza a questi stati patologici, dato il loro ampio coinvolgimento nell'omeostasi degli acidi grassi.



## APPENDICE A

### Stadiazione

Il sistema di classificazione standard per i tumori è il TNM; esso prende in considerazione tre parametri:

1. T, che indica la dimensione della massa tumorale;
2. N, che indica la localizzazione delle cellule tumorali all'interno dei linfonodi vicini alla massa tumorale;
3. M, che indica l'eventuale assenza/presenza di metastasi a distanza (e che possono essere rappresentate anche da linfonodi non locoregionali, ossia localizzati a distanza dalla massa tumorale di origine) [2-3, 46].

Per ognuno dei tre parametri esistono diverse categorie, riportate nelle tabelle che seguono (categorie T in *Tab. A1*, N in *Tab. A2* e M in *Tab A3*).

*Tab. A1. Categorie T della classificazione TNM per il cancro del colon-retto [46].*

<b>Simbolo</b>	<b>Significato</b>
Tx	La descrizione dell'estensione del tumore è impossibile per la mancanza di informazioni.
Tis	Il cancro è nello stadio iniziale; non è cresciuto oltre la mucosa e si tratta di un <i>carcinoma in situ</i> o carcinoma intramucoso.
T1	Il cancro è cresciuto attraverso la mucosa e si estende nella sottomucosa.
T2	Il cancro è cresciuto attraverso la sottomucosa e si estende nel <i>muscularis propria</i> .
T3	Il cancro è cresciuto attraverso il <i>muscularis propria</i> nella sottosierosa, ma non nei tessuti e negli organi vicini.
T4	Il cancro si è diffuso completamente attraverso la parete del colon o del retto nei tessuti e negli organi vicini.

*Tab. A2. Categorie N della classificazione TNM per il cancro del colon-retto [46].*

<b>Simbolo</b>	<b>Significato</b>
Nx	Nessuna informazione sul coinvolgimento dei linfonodi.
N0	Non si riscontra alcun coinvolgimento dei linfonodi.
N1	Da 1 a 3 linfonodi locali presentano cellule cancerogene.
N2	Cellule cancerogene riscontrate in 4 o più linfonodi locali.

*Tabella A3. Categorie M della classificazione TNM per il cancro del colon-retto [46].*

<b>Simbolo</b>	<b>Significato</b>
Mx	Nessuna informazione su metastasi a distanza.
M0	Assenza di metastasi a distanza.
M1	Presenza di metastasi a distanza.

Queste informazioni vengono combinate come indicato in *Tab. A4* al fine di determinare lo stadio del tumore [46].

Tabella A4. Stadi del cancro coloretale come combinazioni delle categorie TNM [46].

<b>Stadio</b>	<b>TNM</b>
0	Tis, N0, M0
I	T1, N0, M0 o T2, N0, M0
IIA	T3, N0, M0
IIB	T4, N0, M0
IIIA	T1-2, N1, M0
IIIB	T3-4, N1, M0
IIIC	Tx-T4, N2, M0
IV	Tx-T4, Nx-N2, M1

## APPENDICE B

### Concentrazioni degli acidi grassi a media catena nei campioni

In *Tab. B1, B2, B3 e B4* sono riportate le concentrazioni plasmatiche degli acidi grassi a media catena considerati rispettivamente nei campioni di controllo e nei campioni di pazienti affetti da rettocolite ulcerosa, da cancro coloretale e da cancro alla mammella. Poiché la maggior parte dei campioni è stata analizzata in doppio, le concentrazioni riportate per ciascun campione sono una media delle due concentrazioni calcolate dai dati di partenza. Le concentrazioni indicate con un asterisco sono state stimate come metà del limite di quantificazione (LOQ), in quanto, dall'estrapolazione mediante retta, i loro valori sono risultati al di sotto del LOQ. La sostituzione di questi valori con il LOQ/2 si basa sull'assunzione che la distribuzione dei dati al di sotto del LOQ sia di tipo uniforme e risulta preferibile alla completa esclusione di tali dati dal calcolo della media. Inoltre, questa soluzione è l'unica applicabile nel caso in cui più del 50% dei dati ricada al di sotto del LOQ, eventualità incontrata per i campioni di cancro alla mammella relativamente ai livelli dell'acido ottanoico [117-119]. I valori di LOQ/2 utilizzati sono riportati in *Tab. B5*.

Le concentrazioni indicate come > ULOQ sono risultate superiori all'*Upper Limit of Quantitation* (ULOQ), corrispondente al punto della retta a concentrazione maggiore, e non sono state considerate nella trattazione statistica dei dati riportata nel paragrafo 6.3.2.

*Tab. B1. Sesso, età e concentrazione di ciascun analita per ogni campione di controllo.*

Campione	Sesso	Età	C6 (ng/μL)	C8 (ng/μL)	C10 (ng/μL)	C12 (ng/μL)
C1	M	37	1.69	0.32	0.70	1.15
C2	F	77	0.12*	0.11*	0.36	0.45*
C3	F	83	0.12*	0.11*	0.75	1.82
C4	F	54	1.78	0.57	1.20	2.26
C5	M	70	0.29	0.11*	0.84	1.92
C6	F	57	4.15	0.85	1.08	1.66
C7	F	74	0.81	0.54	1.60	0.45*
C8	M	76	2.90	0.53	1.09	2.27
C9	F	47	2.40	0.43	0.86	0.99
C10	F	67	0.42	0.81	4.04	> ULOQ
C11	F	57	1.75	0.48	1.12	3.51
C12	M	65	0.97	0.54	1.02	1.70
C13	M	66	0.98	0.88	0.53	0.45*
C14	M	62	0.12*	7.94	14.83	1.57
C15	M	35	1.05	8.17	> ULOQ	2.57
C16	M	55	0.83	0.11*	0.44	0.94
C17	M	56	0.12*	5.82	12.26	0.45*

Tab. B2. Sesso, età e concentrazioni degli acidi grassi a media catena relativi ai campioni di plasma dei pazienti affetti da rettocolite ulcerosa.

Campione	Sesso	Età	C6 (ng/μL)	C8 (ng/μL)	C10 (ng/μL)	C12 (ng/μL)
RCU 1	F	64	1.75	0.90	1.86	8.91
RCU 2	F	49	0.85	0.28	0.88	15.06
RCU 3	F	51	3.22	0.58	1.36	4.00
RCU 4	M	56	3.05	4.11	6.25	0.45*
RCU 5	M	64	0.37	0.51	1.16	1.59
RCU 6	F	39	4.84	0.28	0.71	2.90
RCU 7	M	43	0.83	0.11*	1.24	4.39
RCU 8	F	55	3.57	0.23	0.46	1.10
RCU 9	M	62	0.12*	0.11*	0.48	2.43
RCU 10	F	67	0.96	0.11*	0.64	5.08
RCU 11	M	43	0.68	0.34	0.75	1.62

Tab. B3. Sesso, età e concentrazioni degli acidi grassi a media catena relativi ai campioni di plasma di pazienti affetti da cancro coloretale di diverso stadio.

Campione	Stadio	Sesso	Età	C6 (ng/μL)	C8 (ng/μL)	C10 (ng/μL)	C12 (ng/μL)
ADE 1	-	M	23	0.12*	0.11*	0.15*	0.45*
ADE 2	-	M	40	0.54	0.24	0.54	2.67
ADE 3	-	F	63	0.68	9.83	16.20	1.53
CRC 1	1	M	76	0.12*	5.03	14.55	0.45*
CRC 2	1	M	67	0.12*	1.94	6.34	0.45*
CRC 3	1	M	65	0.53	2.73	5.32	0.45*
CRC 4	1	M	71	0.57	5.23	10.03	1.46
CRC 5	1	M	76	1.21	0.92	1.60	1.61
CRC 6	1	F	67	0.34	0.42	1.00	1.34
CRC 7	2A	F	90	0.12*	2.55	10.79	0.45*
CRC 8	2A	M	65	0.55	3.20	13.40	2.49
CRC 9	2A	F	74	1.09	0.59	0.58	0.45*
CRC 10	2A	F	57	0.12*	3.46	7.82	1.28
CRC 11	2A	M	64	0.77	0.80	1.81	2.26
CRC 12	2A	F	87	0.12*	0.11*	0.69	4.40
CRC 13	2A	F	75	0.12*	1.20	12.82	> ULOQ
CRC 14	2A	F	59	0.48	1.30	5.92	1.87
CRC 15	3C	M	69	0.39	14.10	30.62	0.45*
CRC 16	3A	M	73	0.31	0.55	4.50	2.69
CRC 17	3B	M	49	0.12*	0.11*	0.42	1.59
CRC 18	3	F	62	0.32	0.63	1.40	1.41
CRC 19	3B	M	58	0.47	0.65	1.58	2.56
CRC 20	3C	M	76	0.12*	0.30	1.99	1.26
CRC 21	3B	F	74	0.71	2.02	6.01	1.32
CRC 22	3B	M	57	0.58	15.13	27.16	1.70
CRC 23	4	F	59	0.52	0.93	3.89	2.09
CRC 24	4A	F	53	0.47	5.22	13.92	2.04
CRC 25	4A	F	72	0.80	4.13	5.10	1.44

Tab. B4. Sesso, età e concentrazioni degli acidi grassi a media catena relativi ai campioni di plasma di pazienti affetti da cancro alla mammella.

Campione	Sesso	Età	C6 (ng/μL)	C8 (ng/μL)	C10 (ng/μL)	C12 (ng/μL)
MAM 1	M	70	0.37	0.64	1.75	6.64
MAM 2	M	64	0.54	0.59	0.44	0.45*
MAM 3	F	65	0.41	0.11*	0.31	0.45*
MAM 4	F	52	1.38	0.26	0.95	3.30
MAM 5	F	47	0.12*	0.11*	0.68	2.47
MAM 6	M	69	0.50	0.66	1.62	10.06
MAM 7	F	46	0.12*	0.11*	0.40	0.45*
MAM 8	F	73	0.32	0.11*	1.03	1.75
MAM 9	M	78	0.12*	0.11*	0.61	2.36
MAM 10	M	67	0.30	0.11*	0.33	0.45*

Tab. B5. Valori di LOQ/2 sostituiti alle concentrazioni risultate al di sotto del limite di quantificazione.

	Esanoico	Ottanoico	Decanoico	Dodecanoico
LOQ/2 (ng/μL)	0.12	0.11	0.15	0.45





## BIBLIOGRAFIA

- [1] Sito *Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro* (accesso: 30/04/2014); <http://www.aisrc.it/tumori/tumore-al-colon-retto.asp>.
- [2] Sito *Startoncology* (accesso: 30/04/2014); <http://www.startoncology.net/area-pubblica/tumore-del-colon-it/>.
- [3] Sito *Startoncology* (accesso: 30/04/2014); <http://www.startoncology.net/area-pubblica/it-tumore-del-retto/>.
- [4] "Gastrointestinal system"; Cheng, L. K.; O'Grady, G.; Du, P.; Egbuji, J. U.; Windsor, J. A.; Pullan, A. J.; *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, 2; 65-79 (2010).
- [5] Sito *Ricerca Medica* (accesso: 20/09/2014); [www.ricercamedica.com](http://www.ricercamedica.com).
- [6] Sito *Dipartimento di Medicina dell'Università degli Studi di Perugia* (accesso: 10/08/2014); <http://www.med.unipg.it/ccl>.
- [7] Thomson, A. B. R.; Shaffer, E. A.; Gonska, T.; *First Principle of Gastroenterology and Hepatology in Adults and Children, Vol. I, Gastroenterology*; 2014; pp. 344-347.
- [8] OpenStax College; *Anatomy & Physiology*; 2013; <<http://cnx.org/content/col11496/latest/>>; pp. 1035-1070.
- [9] Postlethwait, J. H.; Hopson, J. L.; *Life*; ETAS, RCS Libri; Milano, 2005; p. 484.
- [10] "Anatomy and physiology of the colon, rectum, and anus"; Irving, M. H.; Catchpole, B.; *British Medical Journal (BMJ)*, 304, 1106-1108 (1992).
- [11] "Colon physiology - A review"; Carey, W. D.; *Cleveland Clinic Journal of Medicine*, 44, 73-81 (1977).
- [12] Gray, H.; "The Large Intestine" in *Anatomy of Human Body*; 20<sup>th</sup> Edition; revised and re-edited by Lewis, W. H.; LEA & Febiger; Philadelphia and New York; 1918; pp. 1177-1184.
- [13] "How to Collect High Quality Cancer Surveillance Data"; National Program of Cancer Registries Education and Training Series; Department of Health and Human Services, USA.
- [14] Sito *Surveillance, Epidemiology, and End Results Program* (accesso: 20/08/2014); <http://seer.cancer.gov/tools/ssm/digestive>.
- [15] Sito *American Society of Colon & Rectal Surgeons* (accesso: 06/08/2014); [http://www.fascrs.org/aboutus/press\\_room/backgrounders\\_and\\_tip\\_sheets/colorectal](http://www.fascrs.org/aboutus/press_room/backgrounders_and_tip_sheets/colorectal).

- [16] Sito *Chirurgia Coloretale* (accesso: 14/08/2014); <http://www.chirurgiacoloretale.eu/it/doc/polipi-del-colon-e-del-retto.html>.
- [17] Thomson, A. B. R.; Shaffer, E. A.; Gonska, T.; *First Principle of Gastroenterology and Hepatology in Adults and Children, Vol. I, Gastroenterology*; 2014; pp. 392-398.
- [18] "Diagnosis of Familial Adenomatous Polyposis"; Bülow, S.; *World Journal of Surgery*, 15; 41-46 (1991).
- [19] "Guidelines for the clinical management of familial adenomatous polyposis (FAP)"; Vasen, H. F.; Möslin, G.; Alonso, A.; Aretz, S.; Bernstein, I.; Bertario, L.; Blanco, I.; Bülow, S.; Burn, J.; Capella, G.; Colas, C.; Engel, C.; Frayling, I.; Friedl, W.; Hes, F. J.; Hodgson, S.; Järvinen, H.; Mecklin, J.-P.; Møller, P.; Myrhøi, T.; Nagengast, F. M.; Parc, Y.; Phillips, R.; Clark, S. K.; Ponz de Leon, M.; Renkonen-Sinislao, L.; Sampson, J. R.; Stormorken, A.; Tejpar, S.; Thomas, H. J. W.; Wijnen, J.; *Gut*, 57; 704-713 (2008).
- [20]: Sito *Chirurgia Coloretale* (accesso: 02/05/2014); <http://www.chirurgiacoloretale.eu/it/doc/carcinoma-del-colon-retto.html>.
- [21] Sito *Chirurgia Coloretale* (accesso: 02/05/2014); <http://www.chirurgiacoloretale.eu/it/doc/colonscopia.html>.
- [22] "Colorectal cancer"; Weitz, J.; Koch, M.; Debus, J.; Höhler, T.; Galle, P. R.; Büchler, M. W.; *The Lancet*, 365; 153-165 (2005).
- [23] Sito *Enciclopedia Treccani* (accesso: 18/08/2014); <http://www.treccani.it/enciclopedia/colite/>.
- [24] "A practical approach to colitis"; Patel, S.; Voltaggio, L.; *Diagnostic Histopathology*, 17; 376-385 (2011).
- [25] "Ischemic Colitis"; Gandhi, S. K.; Hanson, M. M.; Vernava, A. M.; Kaminiski, D. L.; Longo, W. E.; *Diseases of the Colon & Rectum*, 39; 88-100 (1996).
- [26] Thomson, A. B. R.; Shaffer, E. A.; Gonska, T.; *First Principle of Gastroenterology and Hepatology in Adults and Children, Vol. I, Gastroenterology*; 2014; p. 358-364.
- [27] Sito *Chirurgia Coloretale* (accesso: 30/04/2014); <http://www.chirurgiacoloretale.eu/it/doc/malattia-diverticolare.html>.
- [28] "Neuroinflammation in inflammatory bowel disease"; Lakhan, S. E.; Kirchgessner, A.; *Journal of Neuroinflammation*, 7; 1-12 (2010).
- [29] "Treatment of inflammatory bowel disease: A review of medical therapy"; Kozuch, P. L.; Hanauer, S. B.; *World Journal of Gastroenterology*, 14; 354-377 (2008).

- [30] Thomson, A. B. R.; Shaffer, E. A.; Gonska, T.; *First Principle of Gastroenterology and Hepatology in Adults and Children, Vol. I, Gastroenterology*; 2014; p. 382-395.
- [31] "Ulcerative Colitis"; Danese, S.; Fiocchi, C.; *The New England Journal of Medicine*, 365; 1713-1725 (2011).
- [32] Thomson, A. B. R.; Shaffer, E. A.; Gonska, T.; *First Principle of Gastroenterology and Hepatology in Adults and Children, Vol. I, Gastroenterology*; 2014; pp. 282-284.
- [33] Sito *Chirurgia Coloretale* (accesso: 14/08/2014); <http://www.chirurgiacoloretale.eu/it/doc/morbo-di-crohn.html>.
- [34] Sito *Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro* (accesso: 08/06/2014); <http://www.airc.it/cancro/glossario/m/morbo-di-crohn>.
- [35] Sito *Chirurgia Coloretale* (accesso: 02/05/2014); <http://www.chirurgiacoloretale.eu/it/doc/rettocolite-ulcerosa.html>.
- [36] "Historical Developments in Familial Polyposis Coli"; Bussey, H. J. R.; *Seminars in Surgical Oncology*, 3; 67-70 (1987).
- [37] "Familial Adenomatous Polyposis (FAP): Frequency, Penetrance, and Mutation Rate"; Bisgaard, M. L.; Fenger, K.; Bülow, S.; Niebuhr, E.; Mohr, J.; *Human Mutation*, 3; 121-125 (1994).
- [38] "Sviluppo e progressione del cancro coloretale: applicazione di un approccio nanotecnologico nella caratterizzazione del profilo proteico plasmatico"; Bedin, C.; Tesi di Laurea, 2009-2010, Università degli Studi di Padova.
- [39] Sito *State of the Art Oncology in Europe* (accesso: 30/04/2014); <http://www.startoncology.net/area-pubblica/informazioni-generalisui-tumori/>.
- [40] Sito *Chirurgia Coloretale* (accesso: 02/05/2014); <http://www.chirurgiacoloretale.eu/it/doc/genetica-e-cancro-del-colon-retto.html>.
- [41] Sito *Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro* (accesso: 08/06/2014); <http://www.airc.it/cancro/glossario/s/sindrome-di-lynch/>.
- [42] "Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer (Lynch Syndrome), An Updated Review"; Lynch, H. T.; Smyrk, T.; *Cancer*, 78; 1149-1167 (1996).
- [43] Sito *Istituto Superiore di Sanità* (accesso: 30/04/2014); <http://www.iss.it/pres/index.php?lang=1&id=1375&tipo=1>.
- [44] "Biomarkers: An Emerging Tool for Diagnosis of a Disease and Drug Development"; Sahu, P.; Pinkalwar, N.; Dubey, R. D.; Paroha, S.; Chatterjee, S.;

- Chatterjee, T.; *Asian Journal of Research in Pharmaceutical Sciences*, 1; 9-16 (2011).
- [45] Sito *Società Italiana di Medicina Specialistica* (accesso: 21/09/2014); [http://www.simsdm.it/Tumori\\_del\\_Seno/Marcatori.html](http://www.simsdm.it/Tumori_del_Seno/Marcatori.html).
- [46] "Colorectal Cancer Staging"; *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 54; 362-365 (2004).
- [47] Iorio, E. L.; Ferreri, C.; *Lipidomica*; estratto da "Trattato Italiano di Medicina di Laboratorio", Vol. IX, "Diagnostica molecolare nella medicina di laboratorio" a cura di Balestrieri, C.; D'Amora, M.; Giordano, A.; Napoli, C.; Pavan, A.; Piccin - Nuova Libreria; Padova, 2009.
- [48] "Metabolomics - A New Exciting Field within the "omics" Sciences"; Dettmer, K.; Hammock, B. D.; *Environmental Health Perspectives*, 112; A396-397 (2004).
- [49] "Metabolomics Takes Its Place as Latest Up-and-Coming Omic Science"; Schmidt, C.; *Journal of the National Cancer Institute*, 96; 732-734 (2004).
- [50] "Lipidomics: a global approach to lipid analysis in biological systems"; Watson, A. D.; *Journal of Lipid Research*, 47; 2101-2111 (2006).
- [51] "Metabolomics: A Global Biochemical Approach to Drug Response and Disease"; Kaddurah-Daouk, R.; Kristal, B. S.; Weinshilboum, R. M.; *The Annual Review of Pharmacology and Toxicity*, 48; 653-683 (2008).
- [52] "Advances in Mass Spectrometry for Lipidomics"; Blanksby, S. J.; Mitchell, T. W.; *Annual Review of Analytical Chemistry*, 3; 433-465 (2010).
- [53] "The Emerging Field of Lipidomics"; Wenk, M. R.; *Nature Reviews - Drug Discovery*, 4; 594-610 (2005).
- [54] Gurr., M. I.; James, A. T.; *Lipid Biochemistry: An Introduction*; Chapman and Hall; 3<sup>rd</sup> Edition; London, New York; 1980; pp. 1-39 .
- [55] Voet, D.; Voet, J. G.; Pratt, C. W.; *Fondamenti di Biochimica*; Zanichelli; Bologna, 2007; pp. 223-236.
- [56] "A comprehensive classification system for lipids"; Fahy, E.; Subramaniam, S.; Brown, H. A.; Glass, C. K.; Merrill, A. H.; Murphy, R. C.; Raetz, C. R. H.; Russell, D. W.; Seyama, Y.; Shaw, W.; Shimizu, T.; Spener, F.; van Meer, G.; VanNieuwenhze, M. S.; White, S. H.; Witztum, J. L.; Dennis, E. A.; *Journal of Lipid Research*, 46; 839-861 (2005).
- [57] Ma, X.; Yang, J.; "Lipidomics in Cancer Biomarker Discovery" in *Omic Technologies in Cancer Biomarker Discovery*; Landes Biosciences, 2011; pp. 101-109.

- [58] "Analytical Methods in Lipidomics and Their Applications"; Li, M.; Yang, L.; Bai, Y.; Liu, H.; *Analytical Chemistry*, 86; 161-175 (2014).
- [59] "Fatty Acids: Structures and Properties"; Rustan, A. C.; Drevon, C. A.; *Encyclopedia of Life Sciences*; John Wiley & Sons; 1-7 (2005).
- [60] "Short term effects of dietary medium-chain fatty acids n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids on the fat metabolism of healthy volunteers"; Beerman, C.; Jelinek, J.; Reinecker, T.; Hauenschild, A.; Boehm, G.; Klör, H. U.; *Lipid in Health and Disease*, 2; 1-10 (2003).
- [61] "Medium Chain Fatty Acid Metabolism and Energy Expenditure: Obesity Treatment Implications"; Papamandjaris, A. A.; MacDougall, D. E.; Jones, P. J. H.; *Life Sciences*, 62; 1203-1215 (1998).
- [62] "Medium-chain triglycerides: an update"; Bach, A. C.; Babayan, V. K.; *The American Journal of Clinical Nutrition*, 36; 950-962 (1982).
- [63] *Handbook of Chemistry and Physics*; Lide, D. R. Editor-in-Chief; 87<sup>th</sup> Edition; 2006-2007.
- [64] *Sito Chemical Book* (accesso: 13/09/2014); [http://www.chemicalbook.com/ProductMSDSDetailCB0357278\\_EN.htm](http://www.chemicalbook.com/ProductMSDSDetailCB0357278_EN.htm).
- [65] *Sito Human Metabolome Database* (accesso: 22/05/2014); [www.hmdb.ca/metabolites](http://www.hmdb.ca/metabolites).
- [66] "The Composition of Bovine Milk Lipids: January 1995 to December 2000"; *Journal of Dairy Science*, 85; 295-350 (2002).
- [67] Voet, D.; Voet, J. G.; Pratt, C. W.; *Fondamenti di Biochimica*; Zanichelli; Bologna, 2007; pp. 586-621.
- [68] Murray, R. K.; Granner, D. K.; Mayes, P. A.; Rodwell, V. W.; *Harper's Illustrated Biochemistry*; 26<sup>th</sup> Edition; Lange Medical Books/McGraw-Hill; 2003; p. 174.
- [69] Nelson, D. L.; Cox, M. M.; *Lehninger Principles of Biochemistry*; 4<sup>th</sup> Edition; W.H. Freeman and Company; New York, 2005; pp. 788-790.
- [70] "Plasma Lysophosphatidylcholine Levels: Potential Biomarkers for Colorectal Cancer"; Zhao, Z.; Xiao, Y.; Elson, P.; Tan, H.; Plummer, S. J.; Berk, M.; Aung, P. P.; Lavery, I. C.; Achkar, J. P.; Li, L.; Casey, G.; Xu, Y.; *Journal of Clinical Oncology*, 25; 2696-2701 (2007).
- [71] "Lipid profiling for early diagnosis and progression of colorectal cancer using direct-infusion electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry"; Li, F.; Quin, X.; Chen, H.; Qiu, L.; Guo, Y.; Liu, H.; Chen, G.; Song, G.; Wang, X.; Li, F.; Guo, S.; Wang, B.; Li, Z.; *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 27; 24-34 (2013).

- [72] Sito *IUPAC* (accesso: 24/09/2014);  
<http://www.iupac.org/nc/home/projects/project-db>.
- [73] Holler, F. J.; Skoog, D. A.; Crouch, S. R.; *Chimica Analitica Strumentale*; EdiSES; seconda edizione; Napoli, 2009; pp. 17-21.
- [74] Harold McNair, H.; *From GC to fast GC*; Blacksburg, VA USA; DANI Instruments spA Milano, 2012.
- [75] Holler, F. J.; Skoog, D. A.; Crouch, S. R.; *Chimica Analitica Strumentale*; EdiSES; seconda edizione; Napoli, 2009; pp. 768-829.
- [76] McNair, H. M.; Miller, J. M.; *Basic Gas Chromatography - Techniques in Analytical Chemistry*; John Wiley & Sons; 1997; p. 12.
- [77] Kenndler, E.; *Gas Chromatography*; Institute for Analytical Chemistry; University of Vienna.
- [78] *Cos'è la spettrometria di massa*; traduzione da *What is Mass Spectrometry* autorizzata da ASMS (American Society for Mass Spectrometry); a cura del Dr. Andrea Raffaelli.
- [79] Holler, F. J.; Skoog, D. A.; Crouch, S. R.; *Chimica Analitica Strumentale*; EdiSES; seconda edizione; Napoli, 2009; pp. 550-584.
- [80] Sito *Shimadzu* (accesso: 23/09/2014);  
<http://www.shimadzu.com/an/hplc/support/lib/lctalk/47/47intro.html>.
- [81] D'Ischia, M.; *La chimica organica in laboratorio*; Piccin; Padova, 2002; pp. 284-338.
- [82] "Electrospray: Principles and Practice"; Gaskell, S. J.; *Journal of Mass Spectrometry*, 32, 677-688 (1997).
- [83] De Hoffmann, E.; Stroobant, V.; *Mass Spectrometry - Principles and Applications*; 3<sup>rd</sup> Edition; Wiley; 2007; pp. 55-65.
- [84] Lavagnini, I.; Magno, F.; Seraglia, R.; Traldi, P.; *Quantitative Applications of Mass Spectrometry*; John Wiley & Sons; 2006; pp. 11-26.
- [85] "Ambient Mass Spectrometry"; Cooks, R. G.; Ouyang, Z.; Takats, Z.; Wiseman, J. M.; *Science*, 311; 1566-1570 (2006).
- [86] "Mass Spectrometry Sampling Under Ambient Conditions with Desorption Electrospray Ionization"; Takats, Z.; Wiseman, J. M.; Gologan, B.; Cooks, R. G.; *Science*, 306; 471-473 (2004).
- [87] "Direct Analysis in Real Time (DART) Mass Spectrometry"; Cody, R. B.; Laramée, J. A.; Nilles, J. M.; Durst, H. D.; *JEOL News*, 40; 8-11 (2005).

- [88] "Paper Spray for Direct Analysis of Complex Mixtures Using Mass Spectrometry": Wang, H.; Liu, J.; Cooks, R. G.; Ouyang, Z.; *Angewandte Chemie*, 122; 889-892 (2010).
- [89] "Paper spray ionization devices for direct, biomedical analysis using mass spectrometry"; Yang, Q.; Wang, H.; Maas, J. D.; Chappell, W. J.; Manicke, N. E.; Cooks, R. G.; Ouyang, Z.; *International Journal of Mass Spectrometry*, 312; 201-207 (2012).
- [90] "Direct Analysis of Hops by Leaf Spray and Paper Spray Mass Spectrometry"; Blain, K.; Master's Theses; Western Michigan University; 2012.
- [91] De Hoffmann, E.; Stroobant, V.; *Mass Spectrometry - Principles and Applications*; 3<sup>rd</sup> Edition; Wiley; 2007; pp. 122-129.
- [92] Ottaviani, M.; Bonadonna, L.; *Metodi analitici di riferimento per le acque destinate al consumo umano ai sensi del DL.vo 31/2001. Metodi chimici*; Rapporti ISTISAN 07/31; pp. 164-178.
- [93] De Hoffmann, E.; Stroobant, V.; *Mass Spectrometry - Principles and Applications*; 3<sup>rd</sup> Edition; Wiley; 2007; pp. 190-192.
- [94] McLafferty, F. W.; *Tandem Mass Spectrometry*; John Wiley & Sons; 1983; p. 17.
- [95] De Hoffmann, E.; Stroobant, V.; *Mass Spectrometry - Principles and Applications*; 3<sup>rd</sup> Edition; Wiley; 2007; p. 245.
- [96] "Metodi di acquisizione del segnale in cromatografia-spettrometria di massa. GC-MS: Innovazioni strumentali"; Palmisano, F.; Dipartimento di Chimica, Università degli Studi di Bari; *Scuola Nazionale Metodologie Analitiche e Bioanalitiche in Spettrometria di Massa*, Parma, 14-18/05/2012.
- [97] "Elevated Expression of Fatty Acid Synthase and Fatty Acid Synthetic Activity in Colorectal Neoplasia"; Rashid, A.; Pizer, E. S.; Moga, M.; Milgraum, L. Z.; Zahurak, M.; Pasternack, G. R.; Kuhajda, F. P.; Hamilton, S. R.; *American Journal of Pathology*, 150; 201-208 (1997).
- [98] "Fatty acid synthase expression in melanoma"; Innocenzi, D.; Alò, P. L.; Balzani, A.; Sebastiani, V.; Silipo, V.; La Torre, G.; Ricciardi, G.; Bosman, C.; Calvieri, S.; *Journal of Cutaneous Pathology*, 30; 23-28 (2003).
- [99] "Fatty Acid Synthase and Cancer: New Application of an Old Pathway"; Kuhajda, F. P.; *Cancer Research*, 66; 5977-80 (2006).
- [100] "Analisi quantitativa di acidi grassi plasmatici a media catena quali possibili biomarcatori nello sviluppo di cancro colon rettale"; Mattia, C.; Tesi di Laurea; Anno Accademico 2013-2014.
- [101] Harvey, D.; *Modern Analytical Chemistry*; Mc Graw Hill; 2000; pp. 115-117.

- [102] Mallet, A. I.; Down, S.; *Dictionary of Mass Spectrometry*; Wiley; 2009; p. 98.
- [103] "Toward the Complete Characterization of Atmospheric Organic Particulate Matter: Derivatization and Two-Dimensional Comprehensive Gas Chromatography/Time of Flight Mass Spectrometry as a Method for the Determination of Carboxylic Acids"; Boris, A. J.; Portland State University; p. 38 (2012).
- [104] *Guidance for Industry - Bioanalytical Method Validation*; U. S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM); 2001.
- [105] *Note for Guidance on Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology* (CPMP/ICH/381/95); EMEA; 2006.
- [106] "Comparison of Signal-to-noise, Blank Determination, and Linear Regression Methods for Estimation of Detection and Quantification Limits for Volatile Organic Compounds by Gas Chromatography"; Sanagi, M. M.; Ling, S. L.; Nasir, Z.; Ibrahim, W. A. W.; Naim, A. A.; *Journal of AOAC International*, 92; 1833-1838 (2009).
- [107] *Sito Royal Society of Medicine* (accesso: 20/09/2014); <http://www.rsmjournals.com/site/misc/stats.xhtml>.
- [108] "Differences in metabolite profiles between blood matrices, ages, and sexes among Caucasian individuals and their inter-individual variations"; Saito, K.; Maekawa, K.; Pappan, K. L.; Urata, M.; Ishikawa, M.; Kumagai, Y.; Saito, Y.; *Metabolomics*, 10; 402-413 (2014).
- [109] "Fatty acid synthase as a potential therapeutic target in cancer"; Flavin, R.; Peluso, S.; Nguyen, P. L.; Loda, M.; *Future Oncology*, 6; 551-562 (2010).
- [110] "Chemical Inhibition of Acetyl-CoA Carboxylase Induces Growth Arrest and Cytotoxicity Selectively in Cancer Cells"; Beckers, A.; Organe, S.; Timmermans, L.; Scheys, K.; Peeters, A.; Brusselmans, K.; Verhoeven, G.; Swinnen, J. V.; *Cancer Research*, 67; 8180-8187 (2007).
- [111] "Identification and Mechanism of 10-Carbon Fatty Acid as Modulating Ligand of Peroxisome Proliferator-activated Receptors"; *The Journal of Biological Chemistry*, 287; 183-195 (2012).
- [112] "Peroxisome Proliferator-Activated Receptors and Progression of Colorectal Cancer"; Wang, D.; DuBois, R. N.; *PPAR Research*, 1-7 (2008).
- [113] "The Role of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors in Colorectal Cancer"; Park, J. I.; Kwak, J. Y.; *PPAR Research*; 1-12 (2012).



- [114] "Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  and colorectal cancer"; Dai, Y.; Wang, W. H.; *World Journal of Gastrointestinal Oncology*, 2; 159-164 (2010).
- [115] "Activation of the peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  promotes the development of colon tumors in C57BL/6J-APC<sup>Min</sup>/+ mice"; Lefebvre, A. M.; Chen, I.; Desreumaux, P.; Najib, J.; Fruchart, J. C.; Geboes, K.; Briggs M.; Heyman, R.; Auwerx, J.; *Nature Medicine*, 4; 1053-1057 (1998).
- [116] "Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) and colorectal carcinogenesis"; Voutsadakis, I. A.; *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 133; 917-928 (2007).
- [117] "Methods of Dealing with Values Below the Limit of Detection using SAS"; Croghan, C. W.; US-EPA, Research Triangle Park, pp. 1-5.
- [118] "Estimation of Average Concentration in the Presence of Nondetectable Values"; Hornung, R. W.; Reed, L. D.; *Applied Occupational and Environmental Hygiene*, 5; 46-51 (1990).
- [119] Menichini E.; Viviano G.; Gruppo di lavoro Istituto Superiore di Sanità *Metodiche per il rilevamento delle emissioni in atmosfera da impianti industriali*; "Trattamento dei dati inferiori al limite di rivelabilità nel calcolo dei risultati analitici"; Rapporti ISTISAN 04/15.



## **RINGRAZIAMENTI**

*Ringrazio la Dott.ssa Roberta Seraglia, il Dott. Pietro Traldi e il Dott. Marco Agostini per avermi ospitata, chi prima e chi poi, nei loro laboratori, permettendomi di portare a compimento questo lavoro di tesi.*

*Un ringraziamento particolare va alla Dott.ssa Sara Crotti per avermi seguita e accompagnata durante lo sviluppo di questo lavoro e aver risposto a tutte le mie assillanti e frequentissime domande.*

*Ringrazio Eleonora, Marco, Mattia, Giulia, Edoardo, Lisa e Chiara per aver allietato le mie giornate in laboratorio, condividendo con me gioie e dolori della ricerca.*

*Un sentito grazie al Dott. Valerio Di Marco, per avermi accolta in tesi per ben due volte, per la costante disponibilità e per il supporto scientifico, anche a distanza.*

*Ringrazio i miei genitori per il supporto morale e materiale e per aver sempre creduto in me, anche nei momenti di più totale sfiducia in me stessa.*

*Ringrazio infine tutti i miei amici per aver sopportato con pazienza i numerosi inviti declinati a causa di esami e università: grazie a Giorgia, per essere una delle poche a comprendermi nelle mie volubili sfaccettature, ad Ale, che questa tesi se l'è letta tutta, per esserci sempre nel momento del bisogno, a Luca, per aver preso il posto di un fratello maggiore, sempre pronto a dispensare consigli e a sgridarmi quando è giusto farlo e a Sara, per avermi resa cosciente della mia forza di volontà, per aver creduto sempre in me e per esserci sempre stata, nei momenti bui come in quelli sereni.*

