

**Università degli Studi del Piemonte Orientale**  
**“Amedeo Avogadro”**



Dottorato di Ricerca in Medicina Molecolare XXVI ciclo

Relazione 1° anno

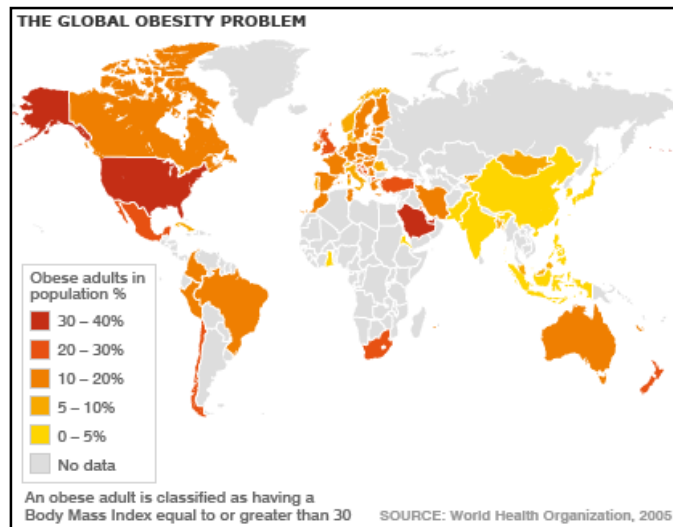
*Approccio proteomico per la valutazione del quadro infiammatorio  
nell'obesità pediatrica. Ruolo preventivo di alimenti funzionali:  
cacao e suoi derivati*

**Responsabile Scientifico**  
Prof. Gianni Bona

**Candidato**  
Marta Roccio

### L'OBESITÀ

Lo sviluppo dell'obesità sta aumentando in modo considerevole in tutto il mondo e secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità ha ormai raggiunto le proporzioni di una pandemia (De Onis *et al.*, 2010).



**Figura 1.** Rappresentazione grafica dello sviluppo dell'obesità nel mondo (fonte: Organizzazione mondiale della sanità, 2005)

L'obesità è il risultato dell'assunzione nella dieta di calorie in eccesso rispetto a quelle necessarie all'attività corporea. Nei mammiferi, un insieme complesso di ormoni e segnali nervosi agiscono assieme per mantenere bilanciato il consumo di energia e nutrienti in modo da tenere a livelli accettabili la quantità di tessuto adiposo che si forma. Dal momento che l'obesità è una condizione associata a diabete mellito di tipo 2, disordini neurodegenerativi, problemi cardiovascolari, dislipidemie e aterosclerosi, negli ultimi decenni si assiste ad un incremento di queste patologie anche in età giovanile.

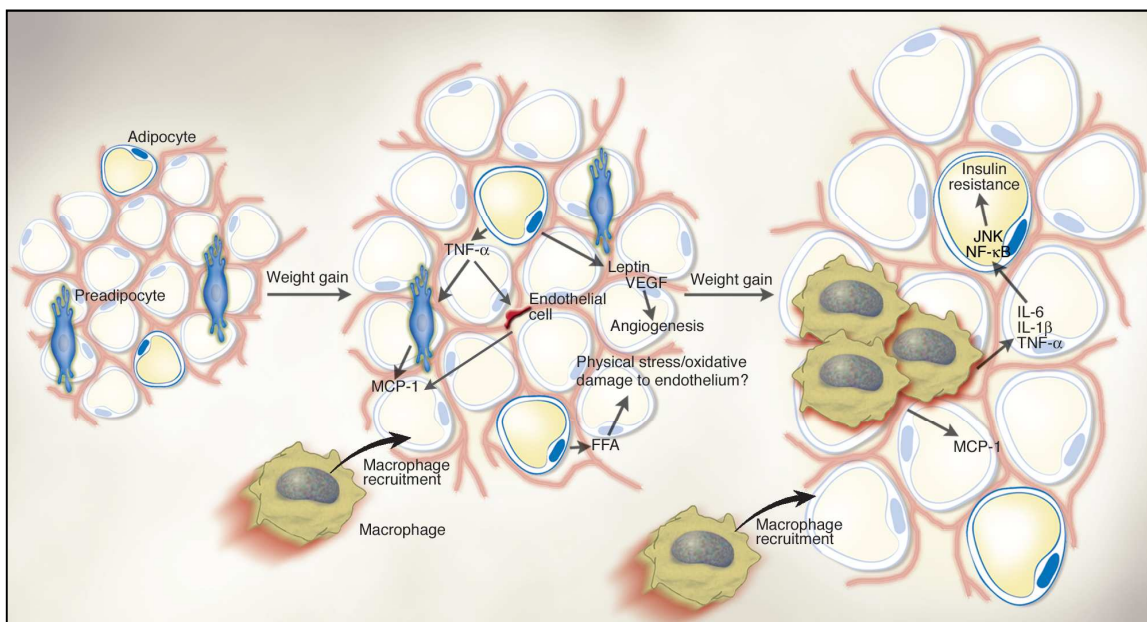
L'obesità infantile, infatti, costituisce una delle più importanti sfide della sanità pubblica a livello globale (Weiss *et al.*, 2005). I soggetti pediatrici in sovrappeso od obesi presentano un'elevata probabilità di restare tali in età adulta e sono, inoltre, soggetti ad un aumentato rischio di sviluppare più precocemente rispetto alla popolazione generale le patologie correlate all'obesità con un significativo impatto sulle aspettative di vita e sulla spesa sanitaria (Bautista-Castano *et al.*, 2004). L'aumento esponenziale non può essere spiegato esclusivamente tramite alterazioni genetiche, infatti sempre più dati suggeriscono che si tratti di una forte interazione tra più cause quali: funzionalità pancreatica, loci di suscettibilità genetica, fattori ambientali e componenti della dieta. Ad oggi però, come tutti questi fattori influiscano sui meccanismi molecolari associati all'obesità rimane ancora poco chiaro, in particolare per quanto riguarda il ruolo degli alimenti assunti tramite la dieta (Hirai *et al.*, 2010; Ahmed *et al.*, 2010).

### OBESITÀ E INFIAMMAZIONE

Il tessuto adiposo è stato ignorato a lungo da biologi e anatomisti perché considerato unicamente come sede di riserva energetica. Negli ultimi vent'anni però c'è stato un progressivo aumento di interesse, dovuto all'incremento dell'incidenza dell'obesità e delle complicanze ad essa associate. Questo ha consentito di riconoscere che il tessuto adiposo prende parte al mantenimento dell'omeostasi di numerosi processi biologici come un vero e

proprio organo endocrino (Kershaw *et al.*,2005). Esso è infatti coinvolto nella regolazione della massa grassa, nell'omeostasi dei nutrienti, nella risposta immunitaria, nel controllo della pressione sanguigna, delle funzioni tiroidee e del sistema riproduttivo. Questi processi sono coordinati principalmente attraverso la sintesi e il rilascio di ormoni da parte degli adipociti stessi (Redinger, 2007).

Studi recenti affermano che l'infiammazione cronica gioca un ruolo cruciale nello sviluppo dell'obesità e nel suo auto-mantenimento. Come per altre patologie è presente una certa componente infiammatoria tissutale anche nello sviluppo dell'obesità, sia per il fatto che il grasso corporeo induce uno stato di infiammazione cronica, sia perché questa stessa infiammazione favorisce l'accumulo di altra massa grassa, creando un circolo vizioso che potrebbe in parte spiegare la difficoltà di riduzione del peso in soggetti fortemente obesi o in sovrappeso (Vachharajani *et al.*,2009).



**Figura 2.** Rappresentazione grafica dell'interazione tra tessuto adiposo e mediatori dell'infiammazione. Da notare la progressiva infiltrazione dei macrofagi e la crescita del tessuto adiposo in risposta ai cambiamenti del microambiente (Wellen *et al.*,2003).

L'obesità predispone ad uno stato pro-infiammatorio caratterizzato dall'infiltrazione di monociti circolanti, i principali effettori e regolatori dell'infiammazione, che spinti dalle adipochine (leptina e adiponectina), chemochine e citochine pro-infiammatorie prodotte dal tessuto adiposo, quali MCP-1 (Monocyte chemoattractant protein-1), TNF- $\alpha$  (Tumor necrosis factor- $\alpha$ ), IL-6 (interleukin-6), IL-1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ ), raggiungono rapidamente il sito dei segnali, dove differenziando in macrofagi e cellule dendritiche promuovendo la risposta immunitaria (Geissmann *et al.*,2010). Un'altra importante correlazione tra tessuto adiposo e risposta immunitaria deriva dalle osservazioni effettuate sui preadipociti, i quali sottoposti a stimoli pro-infiammatori esprimono insieme agli adipociti una vasta gamma di *toll-like receptors* (TLRs) e inoltre differenziano in *macrophage-like cells* favorendo l'assetto flogistico.(Shaffler *et al.*, 2007; Weisberg *et al.*, 2003; Kershaw *et al.*, 2004)

Il reale meccanismo che lega l'obesità all'infiammazione non è ancora stato chiarito, ma è stato dimostrato che l'accumulo di monociti/macrofagi nel tessuto adiposo svolge un ruolo fondamentale nell'instaurare e sostenere la risposta infiammatoria associata all'obesità, essi sono infatti responsabili della produzione locale di prostaglandine, bradichinine e molecole pro-infiammatorie come TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, correlate allo sviluppo di insulino-resistenza e diabete mellito tipo 2 (Wellen *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2003). I monociti, quindi, sono fondamentali per lo sviluppo dello stato infiammatorio correlato all'obesità e rappresentano un valido target per sviluppare gli studi di nutraceutica e nutrigenomica valutando gli effetti della dieta sul metabolismo, a sua volta influenzato da una predisposizione genetica (Nikolajczyk *et al.*, 2011).

## **ALIMENTAZIONE PERSONALIZZATA**

In tutto questo processo, l'alimentazione può giocare un ruolo cruciale, non solo dal punto di vista della riduzione dell'eccessivo intake calorico, ma anche contribuendo alla normalizzazione dello stato di iper-infiammazione tissutale. Gli alimenti e le bevande sono la sola materia fisica che introduciamo all'interno del nostro organismo, se escludiamo i farmaci e l'aria che respiriamo, pertanto hanno un notevole peso sulla salute umana (Kussmann *et al.*, 2010).

Questa semplice correlazione è nota da secoli, Ippocrate, il padre della medicina, affermava: “*Che il cibo sia la tua medicina, che la medicina sia il tuo cibo*”, il suo pensiero si basava sulla convinzione che gli alimenti fossero in grado di influenzare lo stato di salute dell'organismo.

Negli ultimi anni la ricerca nutrizionale sta assumendo sempre più importanza muovendosi dal classico studio epidemiologico a quello molecolare e genetico. A seguito di questa tendenza è nata la nutrigenomica come nuova ricerca multidisciplinare nel campo della scienza nutrizionale, che mira a chiarire come la dieta possa influenzare la salute umana (Garcia Canas *et al.*, 2009).

Studi recenti hanno confermato la bioattività, di molti composti biodisponibili, correlata con la prevenzione di disturbi e patologie croniche (Valdecantos *et al.*, 2009) e malgrado in Europa gli alimenti funzionali non siano coperti da una regolamentazione specifica, la loro introduzione nella dieta normale è universalmente riconosciuta come una nuova strategia per migliorare la salute umana (Ferguson *et al.*, 2009).

Gran parte dell'approccio nutrigenomico è incentrato sulla identificazione degli effetti associati al consumo di alimenti funzionali sui processi biochimici. Data una maggiore diversità del proteoma umano, ~100,000 diverse proteine funzionali versus ~30,000 geni codificanti del genoma umano, la proteomica consente una valutazione più ampia di una patologia, con l'identificazione di biomarker che potenzialmente costituiscono la base di un target farmacologico o genetico (Trujillo *et al.*, 2006; Lame t *al.*, 2006). Attraverso l'approccio proteomico e metabolomico, è possibile supportare gli studi di natura *nutrigenomica*, cioè la valutazione dell'effetto sulla espressione dei caratteri effettuato dalle sostanze biodisponibili e bioaccessibili derivanti dagli alimenti. Questi studi (in parallelo e in sinergia a quelli basati sulla *nutrigenetica*, la scienza che studia la naturale biodiversità umana nel comportamento genetico, molecolare, biochimico e funzionale alla risposta ai

diversi nutrienti, portando alla definizione di quella che ormai viene definita come la “dieta personalizzata” possono risultare fondamentali sia per chiarire a livello metabolico la riposta – positiva o negativa - a determinati nutrienti, sia per identificare marker molecolari utili per gestire le patologie a livello clinico, nutrizionale e farmacologico (Mutch *et al.*, 2005; Muller *et al.*, 2003)

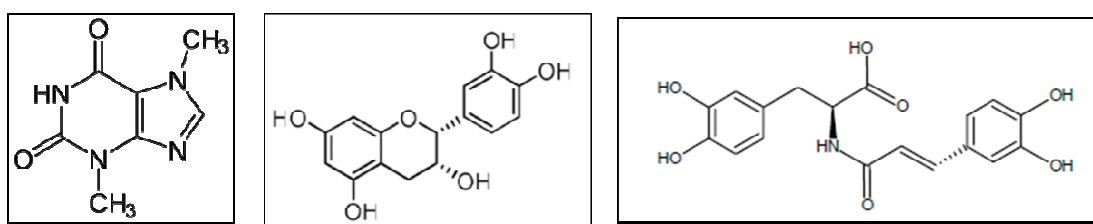
## IL CACAO

Uno degli alimenti più studiati sotto questo profilo è il cacao (*Theobroma cacao* L.). Fu dal 1528 quando il primo carico di cacao raggiunse la Spagna, che gli Europei si resero conto che quella bevanda importata dall’America rendeva più resistenti alla fatica. Nel 1737 Carlo Linneo dà al cacao il nome greco di *Theobroma Cacao*, ovvero “cibo degli dei” (Dillinger *et al.*, 2000). Dalla corte spagnola l’enorme successo del cacao si è ampliato in tutta l’Europa fino ai giorni nostri dove attualmente i prodotti a base di cacao sono considerati come alimenti funzionali per quanto riguarda l’elevato contenuto di sostanze bioattive (Monagas *et al.*, 2009). Il cacao possiede importanti proprietà salutistiche e sta assumendo un ruolo importante nella dieta moderna in quanto è un alimento ricco di polifenoli, noti per il loro alto potere antiossidante (Othman *et al.*, 2007). Nel cacao e suoi derivati sono presenti diversi composti fenolici, i principali appartengono a tre classi:



**Figura 3.** Immagine di barrette di cioccolato.

- ✓ Flavan-3-oli (37%): le principali sono (+)- catechina, (-)-epicatechina, l’epigallocatechina e la catechina-3-gallato.
- ✓ Antocianine (4%) :cianidin-3- $\alpha$ -L-araboside e cianidin-3- $\beta$ -D-galattoside.
- ✓ Proantocianidine (58%): i più rappresentativi sono i flavan-3,4-dioli.



**Figura 4.** Struttura chimica di tre delle componenti bioattive del cacao. In ordine da sinistra: teobromina, epicatechina e clovamide.

Inoltre fra i glucosidi flavonolici si ritrovano quercetina, luteolina, apigenina, naringenina, tracce di clovamide, e tra le numerose sostanze bioattive presenti quelle di grande interesse sono l’anandamide, la teobromina e caffeina che appartengono alla classe delle metilxantine (Belscak *et al.*, 2009).

I polifenoli, essendo antiossidanti, combattono i danni derivati dai radicali liberi dell'ossigeno, dai radicali idrossilici, dai superossidi e dai perossiradicali lipidici e ciò protegge dal deterioramento le cellule somatiche, contribuendo a prevenire alcune malattie croniche. Essi sono in grado di chelare metalli bivalenti, quali ferro e rame, non rendendoli disponibili per le ossidoriduzioni. La capacità antiossidante di queste molecole è tale da superare quella dell'acido ascorbico (vitamina C) e da essere paragonata all'attività dell' $\alpha$ -tocoferolo e del glutatione (Sanbongi *et al.*,1998;. Cook *et al.*,1996; Keen *et al.*,2002).

Studi recenti hanno dimostrato che i polifenoli possono ridurre il rischio di malattie cardiovascolari: essi determinano una diminuzione dell'ossidazione delle lipoproteine a bassa densità (LDL), inoltre ricerche condotte sul consumo di cioccolato hanno rilevato che, in funzione delle dosi assunte, si ottiene una diminuzione nei prodotti che causano l'ossidazione dei lipidi e il miglioramento della capacità antiossidante del sangue, con potenziali benefici effetti sulla salute cardiovascolare (Keen *et al.*,2002; Counet *et al.*, 2004). Studi clinici nell'uomo hanno indicato che una dose giornaliera di polvere di cacao ricco in proantocianidine riduce la suscettibilità all'ossidazione delle lipoproteine a bassa densità (colesterolo LDL) mentre aumenta i livelli di colesterolo HDL (Osakabe *et al.*, 2002).

## SCOPO

---

I nuovi approcci terapeutici per la cura e prevenzione dell'obesità e delle complicanze ad essa associate sono correlati a modificazioni nella dieta ed alla valutazione degli effetti degli alimenti così detti funzionali. Negli ultimi anni si sta sviluppando il concetto di "dieta personalizzata" in base al profilo genetico di ciascun individuo. Nutraceutica e nutrigenomica rappresentano un'importante via per comprendere meglio sia gli aspetti molecolari delle patologie sia la risposta soggettiva ad uno particolare tipo di alimento.

Studi recenti dimostrano come il cioccolato, in particolare quello fondente, sia uno strumento interessante per gli studi di nutrigenomica, in quanto è stato osservato che sia cacao che i suoi derivati, possano concorrere alla riduzione del rischio di malattie cardiovascolari tra cui l'aterosclerosi e l'ipertensione arteriosa, probabilmente per le sue proprietà antiossidanti e anti-infiammatorie (Hsu *et al.*, 2008; Rimbach *et al.*, 2009).

Sulla base di queste premesse l'obiettivo di questo studio è determinare, attraverso un approccio proteomico completo, i meccanismi molecolari cardine tramite i quali le componenti bioattive del cacao modulano lo stato infiammatorio in soggetti di età pediatrica normopeso e obesi. Presso il nostro laboratorio sono in corso studi di proteomica per comprendere il ruolo dei monociti come componenti chiave dell'infiammazione associata all'obesità. La proteomica è uno studio su proteine in larga scala, che come la genomica include alterazioni genomiche nell'espressione genica, ma comprende anche modificazioni post-traduzionali offrendo così un approccio quantitativo e qualitativo al problema in questione. Utilizzando la linea cellulare di monociti umani, Mono-Mac 6, che presenta le stesse caratteristiche e funzioni fisiologiche dei monociti maturi (Zeigler-Heitbrock *et al.*, 1994) si sta indagando l'effetto di tre delle maggiori componenti bioattive del cacao, teobromina, clovamide ed epicatechina su tali monociti al fine di individuare singole proteine o processi molecolari che aiuteranno a capire se i composti bioattivi del cacao siano realmente coinvolti nella riduzione dei marker di stress ossidativo e infiammatorio (IL-6, TNF- $\alpha$ , ecc.).

## MATERIALI E METODI

### COLTURE CELLULARI

Per lo svolgimento degli esperimenti è stata utilizzata la linea cellulare di monociti umani, Mono-Mac 6 (MM6), che presenta le stesse caratteristiche e funzioni fisiologiche dei monociti maturi, tra cui l'espressione dei CD14, IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$ . Le cellule sono mantenute in coltura con il 5% di CO<sub>2</sub> a 37 °C in un ambiente umidificato. Come terreno è stato utilizzato RPMI 1640 addizionato con 10% di siero fetale bovino (FBS) deplementato, L-glutamina 2 mM, sodio piruvato 1mM, 1% amminoacidi non essenziali, 1% di penicillina e streptomicina, 10  $\mu$ g/mL di insulina umana (tutti acquistati presso Sigma-Aldrich).

### TRATTAMENTO DELLE MM6 CON LE COMPONENTI BIOATTIVE DELCACAO

Le cellule MM6 sono state sottoposte a tre trattamenti, rispettivamente con teobromina (Sigma-Aldrich), epicatechina (Sigma-Aldrich) e clovamide (sintetizzata nel laboratorio di Chimica degli Alimenti, UPO, Novara) sciolte in DMSO. La concentrazione finale di utilizzo è stata di 10 $\mu$ M e 10nM per 24 e 48 ore di incubazione a 37 °C, 5% di CO<sub>2</sub>. Durante il trattamento il terreno di coltura delle MM6 è stato utilizzato senza l'aggiunta di FBS.

### ESTRAZIONE DELLE PROTEINE TOTALI

L'estrazione delle proteine è stata effettuata utilizzando una versione modificata del protocollo di Singhto *et al.*, (2010). Nella tabella sottostante sono presenti i reagenti utilizzati e le relative concentrazioni.

REAGENTI	CONCENTRAZIONE
Urea	7 M
Thiourea	2 M
Chaps	4 %
DTT	120 Mm
Ampholytes pH3-10	2 %
Trizma	40 mM

**Tabella 1.** Elenco dei reagenti utilizzati (Sigma-Aldrich) per il buffer di estrazione e di risospensione durante isoelettrofocalizzazione (IEF).

In seguito a vari lavaggi in PBS e centrifugazioni (1500rpm per 5 minuti a +4 °C), le cellule (circa 3x10<sup>6</sup>), sono state risospese nel buffer di estrazione e sono state collocate in incubazione per 30 minuti a +4 °C. Dopo una breve centrifugazione a 14000 rpm il pellet è stato risospeso nel buffer di re-idratazione per la successiva analisi bi-dimensionale.



## ANALISI BIDIMENSIONALE

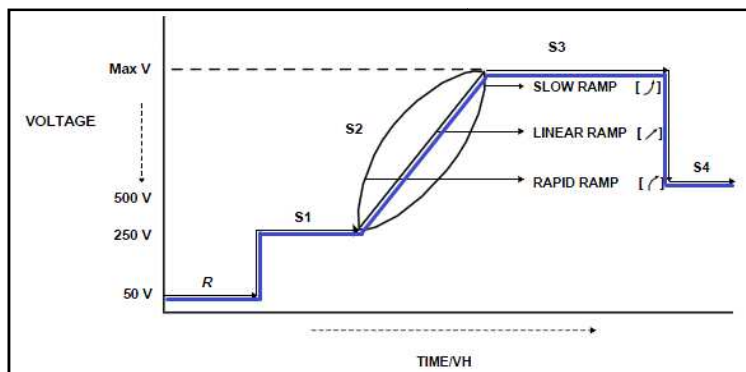
La valutazione proteomica è stata effettuata sulle proteine estratte dalla linea cellulare MM6 e successivamente sarà svolta sui monociti isolati dal sangue dei pazienti.

Per quanto riguarda l'analisi bidimensionale (2D-elettroforesi), i campioni di proteine estratte

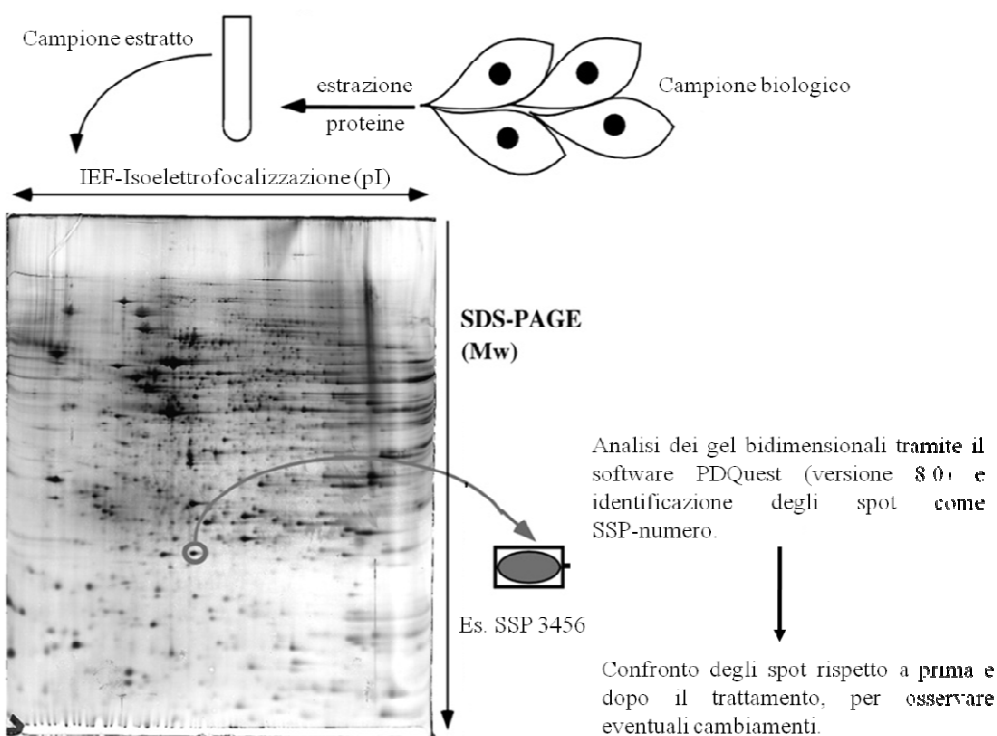
sono state caricate sulle strisce per proteomica (Immobilized pH Gradient -IPG strips), con un gradiente di pH 3-10 per ottenere una versione globale del proteoma.

La prima fase di separazione, l'isoelettrofocalizzazione (IEF), è basata sulla separazione delle molecole in base al loro punto isoelettrico. È stata eseguita in duplicato utilizzando lo strumento Protean IEF Cell (Biorad, Hercules, CA), impostato su un totale di 10.000 V / h con un massimo di 4.000 V.

La fase successiva consiste in una elettroforesi su gel di poliacrilammide (SDS-PAGE) mediante la quale le proteine vengono trasferite dalle strisce IPG al gel dove la separazione avviene rispetto alle dimensioni molecolari. In seguito al fissaggio e sviluppo con una soluzione fluorescente di SYPRO-Ruby, l'analisi dei dati sarà effettuata grazie allo strumento Imager ChemiDoc (Biorad) e le figure relative al profilo proteico verranno analizzate utilizzando il software PDQuest (versione 8.0).



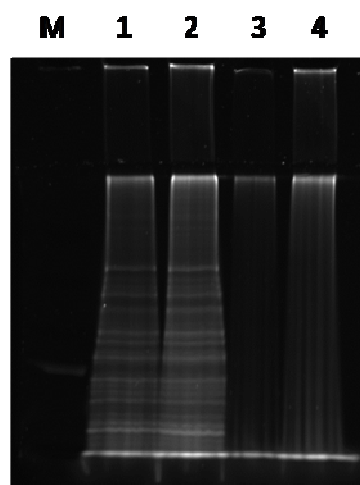
**Figura 5.** Rappresentazione grafica del protocollo di isoelettrofocalizzazione (IEF). Nell'immagine sono evidenziati in blu i passaggi utilizzati per gli esperimenti.



**Figura 6.** Rappresentazione schematica dell'analisi bidimensionale svolta in questa fase preliminare. Modificata da Rabilloud *et al.*, 2011.

### OTTIMIZZAZIONE DELL'ANALISI BIDIMENSIONALE

Per effettuare l'analisi bidimensionale delle proteine è necessario procedere alla loro estrazione dal campione biologico. In seguito alla ricerca bibliografica volta a ottenere un metodo di estrazione pratico e funzionale delle proteine da monociti e macrofagi, sono stati selezionati quattro procedimenti, due dei quali sono stati analizzati per valutarne l'efficacia.



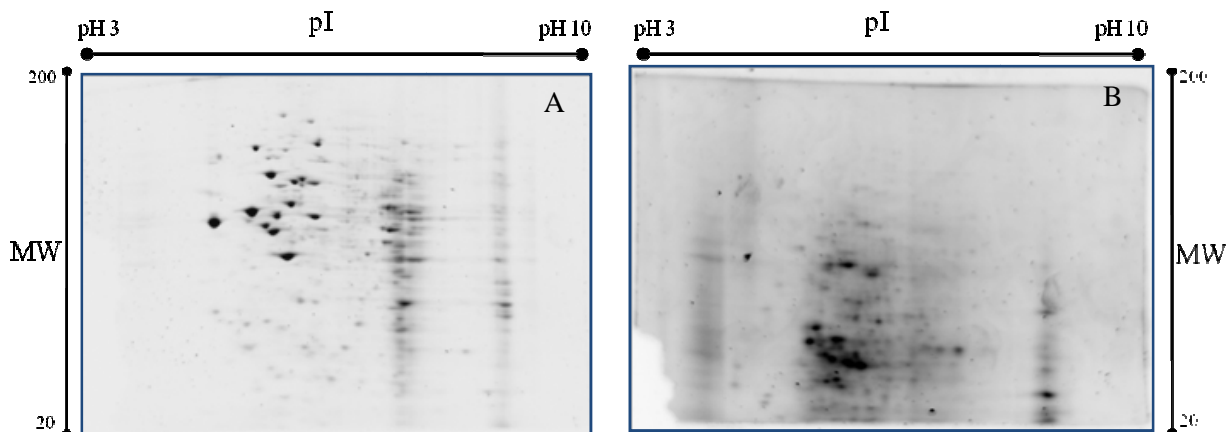
**Figura 7.** Analisi elettroforetica SDS-page 10% effettuata con i campioni proteici estratti dalle Mono Mac-6 con il primo buffer di estrazione (lane 1, 2) e il secondo (lane 3, 4).

**Lane M:** marker; **lane 1:**  $5 \times 10^6$ ; **lane 2:**  $10 \times 10^6$ ; **lane 3:**  $5 \times 10^6$ ; **lane 4:**  $10 \times 10^6$

Come si può notare dalla separazione delle proteine nella figura 7 il metodo di estrazione modificato da Singhto N. *et al.*, 2010 permette una buona estrazione al contrario del secondo protocollo testato.

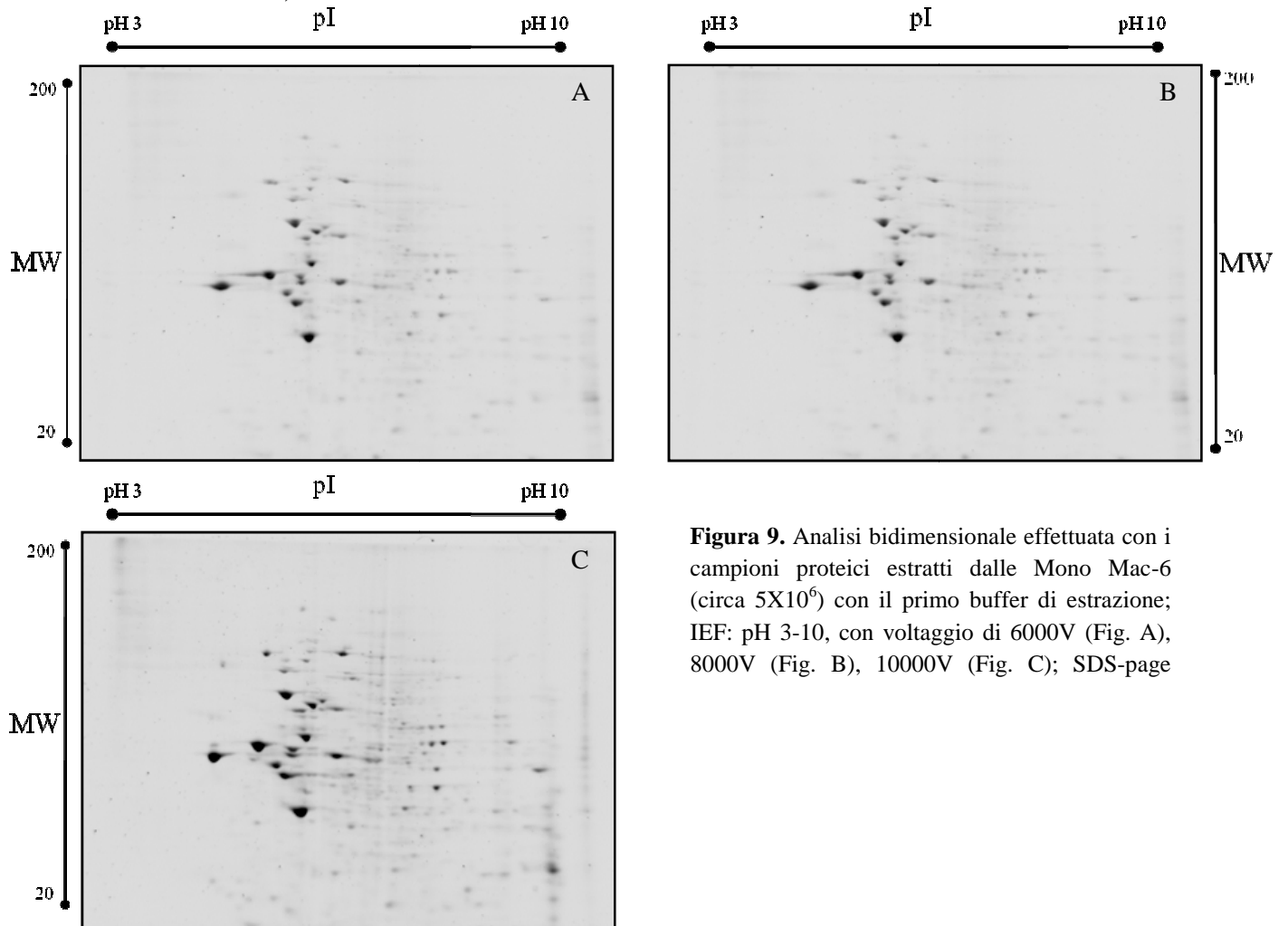
Per avere un'ulteriore conferma della bontà del metodo sugli stessi campioni è stata svolta anche un'analisi bidimensionale seguendo il protocollo già descritto nei materiali e metodi.

Il risultato ottenuto dimostra come il primo metodo sia effettivamente il più adeguato per svolgere le analisi di proteomica negli esperimenti futuri.



**Figura 8.** Analisi bidimensionale effettuata con i campioni proteici estratti dalle Mono Mac-6 con il primo buffer di estrazione (Fig. A) e il secondo (Fig. B); IEF: pH 3-10, SDS-page 10% di poliaccrilammide.

Per capire il voltaggio ideale da utilizzare durante la terza fase dell'IEF sono state effettuate diverse prove con lo stesso campione caricato su strip IPG pH 3-10 sottoposte a tre voltaggi differenti: 6000 V, 8000 V e 10000 V.



**Figura 9.** Analisi bidimensionale effettuata con i campioni proteici estratti dalle Mono Mac-6 (circa  $5 \times 10^6$ ) con il primo buffer di estrazione; IEF: pH 3-10, con voltaggio di 6000V (Fig. A), 8000V (Fig. B), 10000V (Fig. C); SDS-page

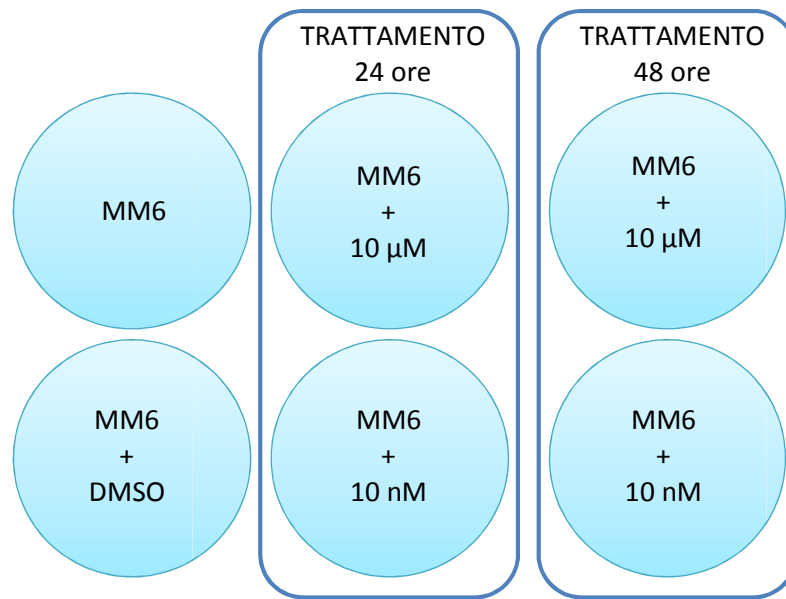
Osservando le tre immagini (Fig. 9 A, B, C), ripetizione dello stesso esperimento con un differente voltaggio di corsa, si può dedurre come la prova eseguita a 10000V sia migliore, in quanto la risoluzione degli spot proteici è di qualità superiore rispetto agli altri.

### **TRATTAMENTO CON TEOBROMINA, EPICATECHINA E CLOVAMIDE**

Dopo aver ottimizzato la metodica di analisi bidimensionale si è deciso di procedere con il trattamento della linea cellulare Mono Mac-6, con tre delle sostanze bioattive presenti nel cacao. Numerosi studi, infatti, riportano per il cacao (ed i suoi derivati, in particolare il cioccolato amaro fondente) un'attività antiossidante ed anti-infiammatoria come descritto nella parte introduttiva. La scelta delle sostanze per gli esperimenti è dipesa dal fatto che teobromina, epicatechina e clovamide rappresentano delle importanti sostanze bioattive, i cui reali benefici sull'organismo umano sono tuttora in fase di studio.

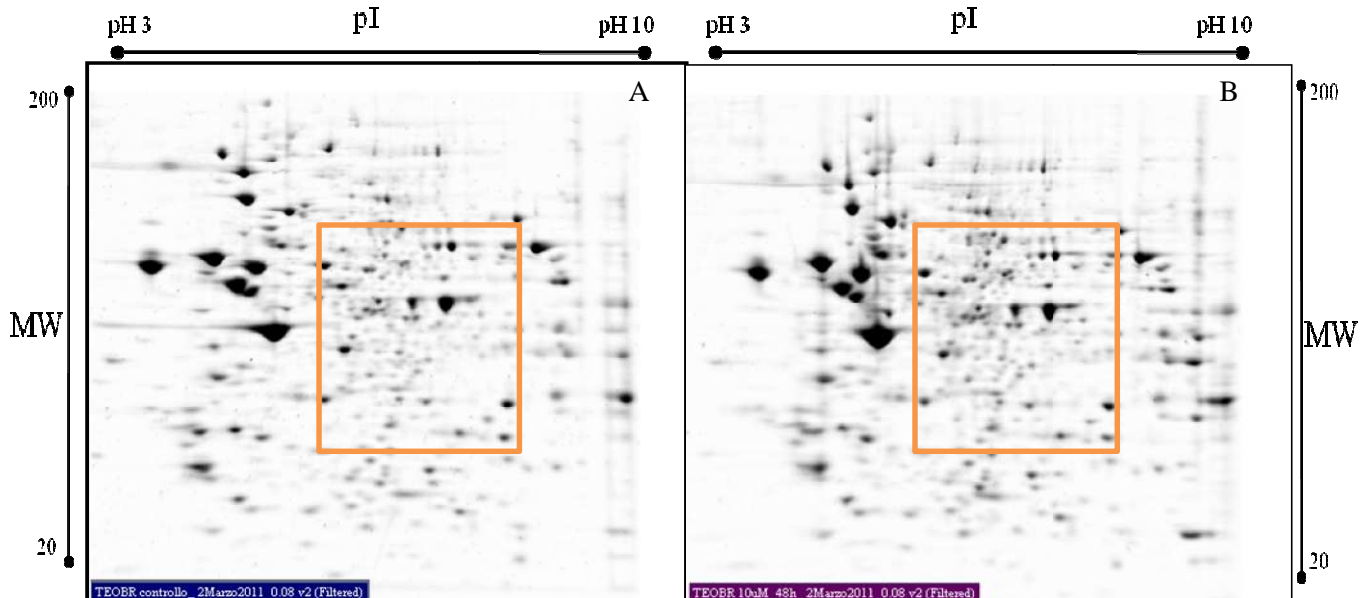
Per constatare se tali sostanze siano in grado di modificare il profilo proteico nelle cellule MM6 sono state condotte delle analisi bidimensionali preliminari.

Negli esperimenti è stato utilizzato lo schema che si può osservare nella figura sottostante.

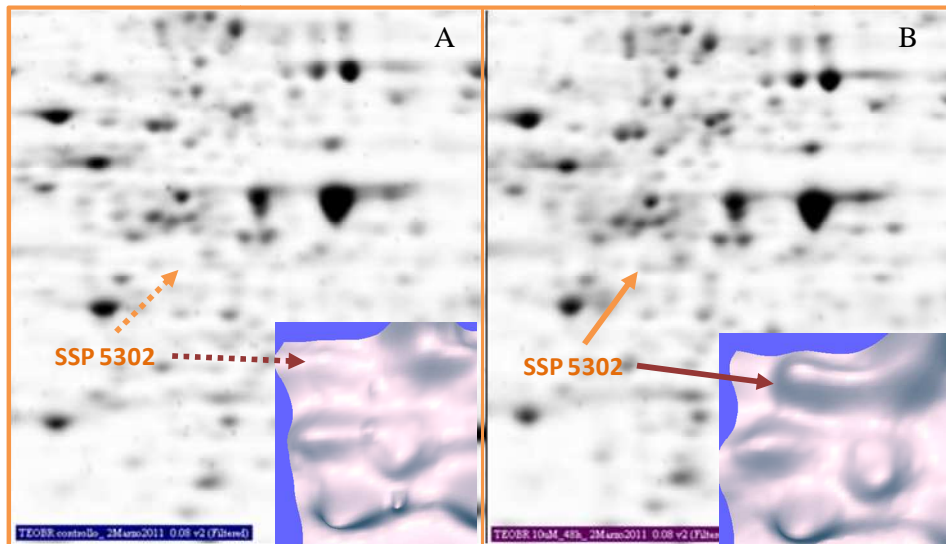


**Figura 10.** Rappresentazione schematica dei trattamenti svolti sulle cellule Mono Mac-6 (MM6), stimulate per 24 e 48 ore con le singole sostanze bioattive a due concentrazioni 10μM e 10nM.

Per quanto riguarda la stimolazione con la teobromina (fig. 11 ), l'incubazione di 48 ore con la concentrazione 10μM fornisce i dati più rilevanti, in quanto se si osserva l'ingrandimento riportato nella figura 12, si può constatare come lo spot SSP 5302 sia più intenso, e quindi più espresso, dopo il trattamento. La visualizzazione tridimensionale mostrata nella figura 12 conferma il risultato ottenuto.

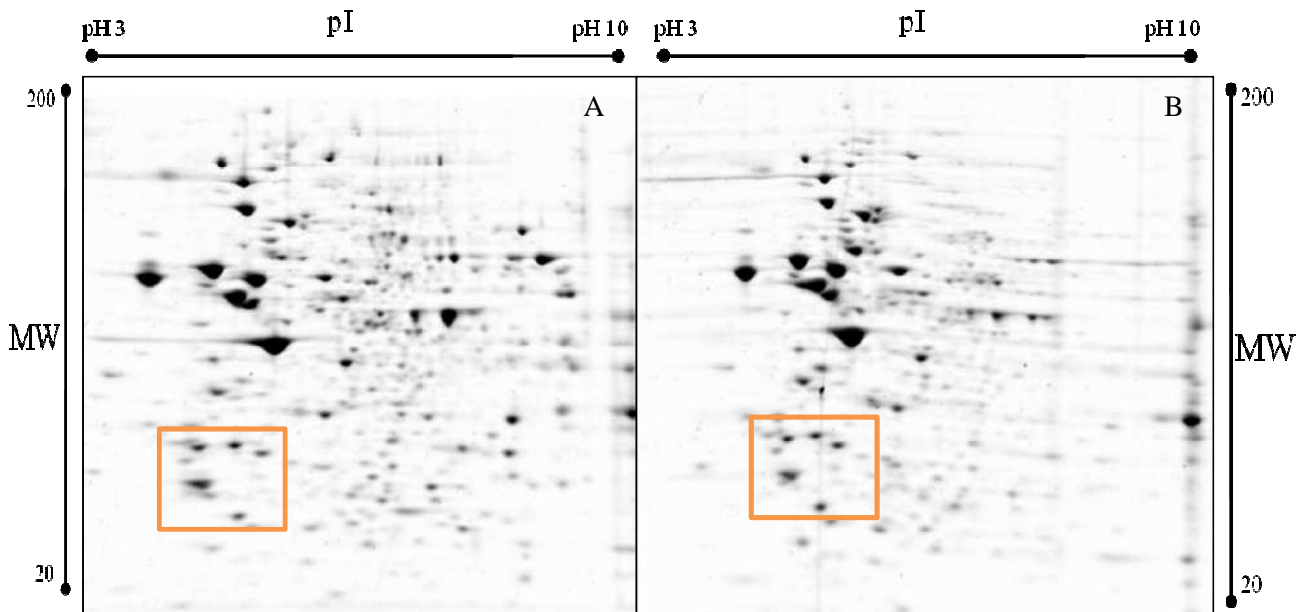


**Figura 11.** Analisi proteomica bidimensionale (IEF: pH 3-10, SDS-page 10% di poliaccrilamide) della linea cellulare di monociti umani MM6, controllo (Fig. A) e trattate con la singola componente bioattiva teobromina (Fig. B), con una concentrazione di 10 μM per 48 ore.



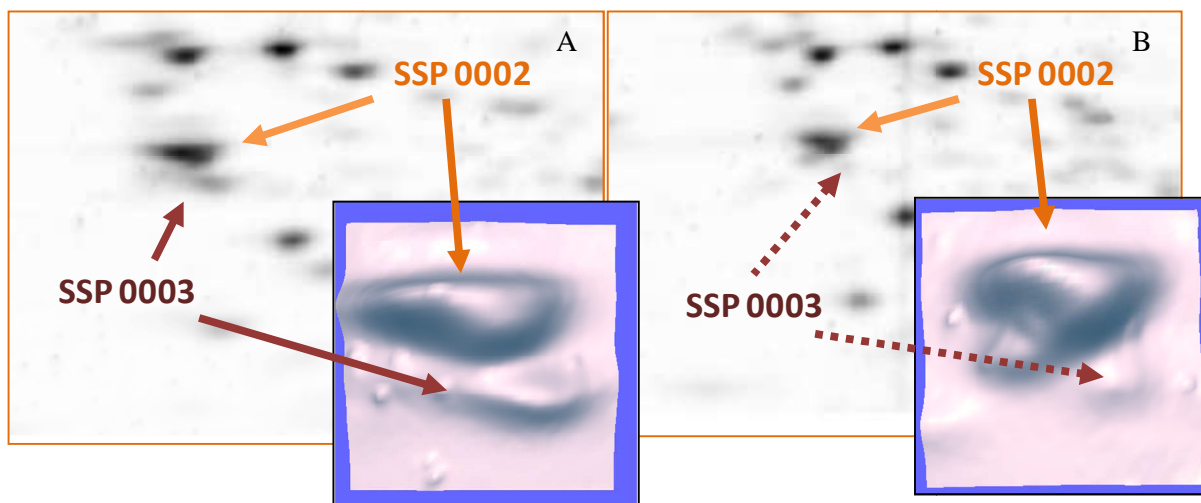
**Figura 12.** Ingrandimento della figura 12. Non trattate (Fig. A) e trattate con la singola componente bioattiva teobromina (Fig. B). L'immagine tridimensionale a lato di ciascun ingrandimento rappresenta lo spot proteico analizzato (SSP 5302) e ne evidenzia la sovrappressione rispetto al non trattato.

Il successivo trattamento con l'epicatechina ha riportato risultati rilevanti, anche in questo caso, durante l'incubazione di 48 ore con la concentrazione massima utilizzata di 10  $\mu$ M.



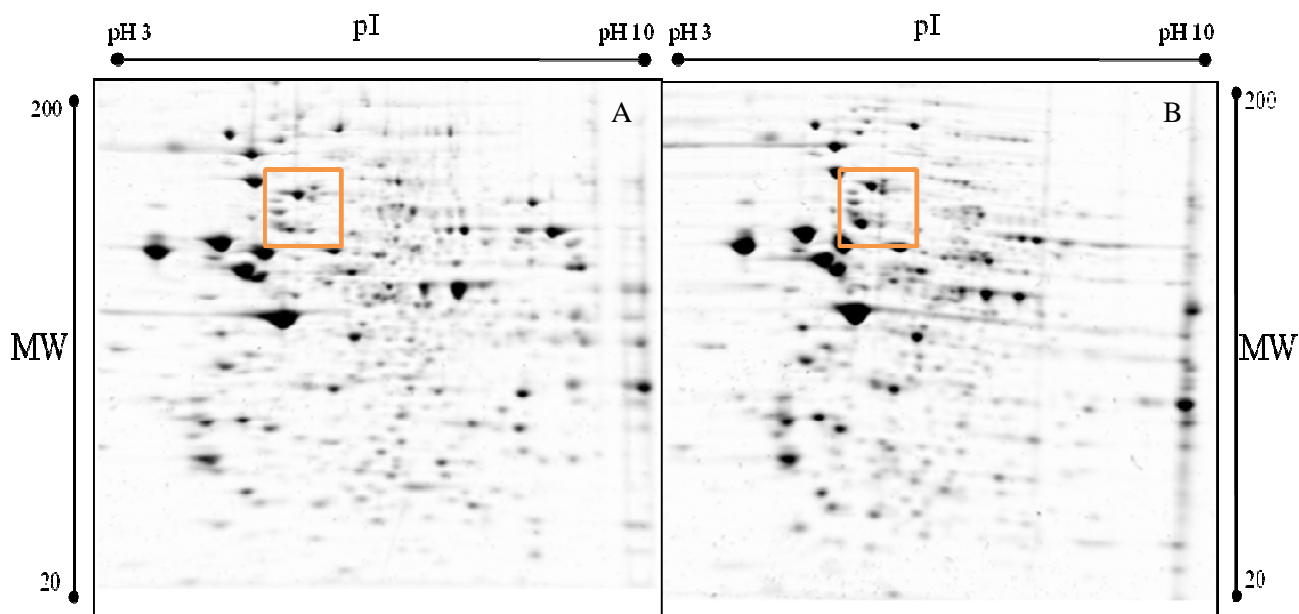
**Figura 13.** Analisi proteomica bidimensionale (IEF: pH 3-10, SDS-page 10% di poliaccrilamide) della linea cellulare di monociti umani MM6, controllo (Fig. A) e trattate con la singola componente bioattiva epicatechina (Fig. B), con una concentrazione di 10  $\mu$ M per 48 ore.

Dall'ingrandimento del riquadro evidenziato nella figura 13 si può notare la presenza dello spot SSP 0002 sia nelle cellule non trattate sia in seguito alla somministrazione nel terreno di coltura dell'epicatechina. Osservando attentamente l'immagine risulta evidente la presenza dello spot SSP 0003 unicamente nel non trattato. Per verificare ulteriormente l'assenza dello spot nel profilo proteico delle cellule in seguito all'incubazione è stata considerata anche l'immagine tridimensionale dello spot, come si osserva nella figura 14.



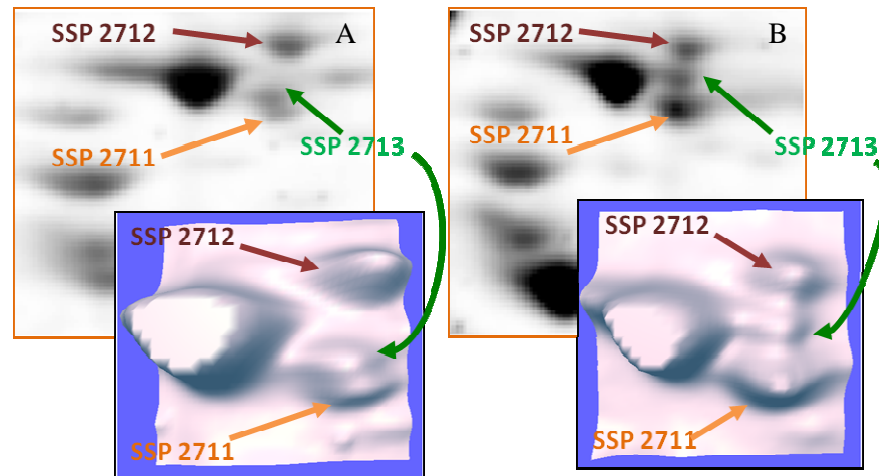
**Figura 14.** Ingrandimento della figura 13. Non trattate (Fig. A) e trattate con la singola componente bioattiva epicatechina (Fig. B). L'immagine tridimensionale a lato di ciascun ingrandimento rappresenta gli spots proteici analizzati (SSP 0002, SSP 0003). Quest'ultima mette ben in evidenza la mancata espressione dello spot SSP 0003 in seguito all'incubazione con la sostanza bioattiva.

L'ultimo trattamento preso in considerazione in questa fase di analisi preliminare è stato l'incubazione con la clovamide. In seguito a 48 ore di stimolazione con la concentrazione di 10  $\mu$ M, si sono osservati dei cambiamenti nel profilo proteico delle cellule utilizzate, come si è verificato anche nei precedenti esperimenti.



**Figura 15.** Analisi proteomica bidimensionale (IEF: pH 3-10, SDS-page 10% di poliacrilamide) della linea cellulare di monociti umani MM6, controllo (Fig. A) e trattate con la singola componente bioattiva clovamide (Fig. B), con una concentrazione di 10  $\mu$ M per 48 ore.

Analizzando l'ingrandimento del profilo proteico delle MM6 presentato nella figura 16, si può osservare come la disposizione degli spot SSP 2712, SSP 2711 e SSP 2713 si modifichi in seguito al trattamento. Esaminando attentamente l'immagine tridimensionale, più esplicitiva e immediata rispetto a quella proposta nel gel, si può notare come in realtà nelle cellule trattate gli spot SSP 2711 e SSP 2713 siano quasi sovrapposti, mentre dopo il trattamento si dispongono l'uno di seguito all'altro.



**Figura 16.** Ingrandimento della figura 15. Non trattate (Fig. A) e trattate con la singola componente bioattiva clovamide (Fig. B). L'immagine tridimensionale a lato di ciascun ingrandimento rappresenta gli spots proteici analizzati (SSP 2712, SSP 2711, SSP 2713). Quest'ultima mette ben in evidenza la diversa disposizione degli spots SSP 2711, SSP 2712, SSP 2713 in seguito all'incubazione con la sostanza bioattiva.

Plausibilmente gli spot presenti nell'immagine 16 A rappresentano isoforme diverse della stessa proteina, al contrario nell'altra figura 16 B lo spot SSP 2713 rappresenta una proteina diversa.

## CONCLUSIONI

---

Tra le tante caratteristiche positive dei composti bioattivi del cacao, è stato dimostrato in studi epidemiologici sugli esseri umani, che la supplementazione cronica con i composti del cacao è in grado di innescare una riduzione del peso corporeo e inoltre sembrano essere coinvolti nella riduzione dell'iperglicemia, del rischio di sviluppare diabete di tipo 2 e della pressione sanguigna. Questa tesi è sostenuta dai numerosi approcci diretti e indiretti che supportano il concetto che l'infiammazione è la causa principale dell'obesità, e contribuisce allo sviluppo di altre patologie correlate, come il diabete di tipo 2 e il rischio cardiovascolare. Come ampiamente riportato in letteratura i composti bioattivi del cacao potrebbero migliorare lo stato antiossidante dell'organismo e allo stesso tempo modulare le funzioni direttamente colpite da infiammazione e stress ossidativo. I risultati degli studi epidemiologico-osservazionali sono sempre più concordi nel dire che un elevato consumo di sostanze ad attività antiossidante si associa ad una migliore prognosi cardiovascolare e seppure in misura minore anche chemopreventiva. Negli ultimi anni sono numerosi gli studi che associano il coinvolgimento dei processi ossidativi nella patogenesi di diverse malattie. Questa teoria però non ha un riscontro *in vivo* poiché non si riescono ad ottenere prove incontrovertibili delle capacità antiossidanti di queste sostanze bioattive in quanto mancano attualmente dei biomarker di attività antiossidante e dei risultati convincenti di trials clinici. Molto probabilmente quanto si riscontra *in vitro* (l'attività antiossidante nei confronti di macromolecole) in realtà non si verifica *in vivo*, presumibilmente ciò accade perché negli studi effettuati si utilizzano le sostanze "tal quali" e non i metaboliti, le reali sostanze che interagiscono *in vivo* con le cellule dell'organismo.

Gli studi iniziali di questo progetto sono focalizzati sulla valutazione della biodisponibilità delle sostanze bioattive del cacao e sulla caratterizzazione chimica completa e selezione delle matrici di cacao. Tutti i composti a base di cacao utilizzati in questo studio saranno forniti da un'Azienda Italiana leader nel settore in stretta collaborazione con il Gruppo di Chimica degli Alimenti del DiSCAFF (Università degli Studi del Piemonte Orientale A. Avogadro) con il quale è in corso una collaborazione. L'obiettivo successivo sarà utilizzare l'approccio proteomico per valutare i profili di proteine sintetizzate dalle cellule infiammatorie presenti nel sangue in un ampio gruppo di soggetti in età pediatrica, sia normopeso, sia gravemente obesi (indice di massa corporea, BMI > 99 ° percentile per età e sesso secondo le curve di crescita italiane SIEDP) in età puberale, prima, durante e dopo una dieta controllata additivata di un particolare alimento funzionale, nello specifico cacao (nella forma di massa di cacao non zuccherata o di cioccolato ad alta percentuale di massa di cacao). Parallelamente saranno svolti degli studi di proteomica classica e funzionale su culture di linee cellulari di monociti. Saranno sottoposte a trattamenti tempo e dose dipendenti con i metaboliti bioattivi di cacao (teobromina, catechina, epicatechina, clovamide, procianidina B2, ecc.) individuati attraverso l'analisi di biodisponibilità. Proteine differenzialmente espresse saranno prelevate e analizzate mediante spettrometria di massa tramite un servizio esterno utilizzando uno strumento MALDI-TOF/TOF. Inoltre sarà effettuato anche uno studio di proteomica funzionale utilizzando come campione una coltura *ex-vivo* di monociti estratti da pazienti normopeso ed obesi. I campioni di cellule saranno trattati con i medesimi componenti e



metaboliti bioattivi del cacao, tempo e dose dipendenti. Il trattamento della linea di monociti per le analisi di proteomica è già in atto e i risultati preliminari ottenuti sono stati presentati in questa relazione.

Questi obiettivi si concentrano sui meccanismi molecolari che regolano i monociti e mirano al miglioramento delle conoscenze sulla biodisponibilità delle sostanze bioattive del cacao, considerando anche l'azione reale di alcuni metaboliti per capire quali composti sono realmente funzionali in vivo e non esclusivamente in modelli in vitro, e alla comprensione della diretta e indiretta correlazione (approccio dose-risposta) della biodisponibilità sui monociti, con uno stretto legame tra infiammazione ed obesità.

Ci aspettiamo che i dati ottenuti dall'analisi proteica offrano un nuovo modello per una miglior comprensione delle modificazioni post-traduzionali e dell'alterata espressione proteica tra soggetti magri e obesi in relazione al trattamento (con o senza cacao).

Sulla base di studi preliminari in vitro ed in vivo presenti in letteratura su piccoli gruppi di adulti, ci si aspetta di osservare inizialmente un miglioramento del profilo lipidico e in seguito di quello pressorio. Oltre a definire meglio la bioaccessibilità e la biodisponibilità delle componenti bioattive del cacao, si attende, di valutare se e su quali meccanismi proteici gli alimenti funzionali prescelti possano modulare lo stato infiammatorio cronico dell'obesità ed attraverso quali meccanismi molecolari.

Si prevede inoltre di ottenere risultati importanti in relazione alla supplementazione della dieta con cacao, ponendo le basi per il design di nuovi alimenti a connotazione funzionale e/o di integratori alimentari. Tali risultati potranno suggerire un'eventuale supplementazione alla dieta ipocalorica o isocalorica suggerita, nonché fornire nuove fondamentali indicazioni relative all'effetto della matrice cacao sulla salute dell'uomo. I risultati raggiunti, inoltre, potrebbero essere fondamentali per la preparazione e la formulazione di claims, ai sensi della normativa europea vigente.

## BIBLIOGRAFIA

---

De Onis M, Blossner M, Borghi E. Global prevalence and trends of overweight and obesity among preschool children. *Am. J. Clin. Nutr.*, 92:1257-1264 (2010).

Weiss R., Caprio S. The metabolic consequences of childhood obesity *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 19 (3) 405–419 (2005).

Bautista-Castano I., Doreste j., Serra-Majem L., Effectiveness of interventions in the prevention of childhood obesity *European Journal of Epidemiology* 19: 617–622 (2004).

Hirai S, Takahashi N, Goto T, Lin S, Uemura T, Yu R, Kawada T. Functional food targeting the regulation of obesity-induced inflammatory responses and pathologies. *Mediators Inflamm* (2010).

Ahmed F. Health: Edible Advice. *Nature* 468:S10-12 (2010).

Kershaw EE. and Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89: 2548-2556 (2004).

Redinger RN. The Pathophysiology of Obesity and Its Clinical Manifestations *Gastroenterology & Hepatology* 3 (11): 856-863 (2007).

Vachharajani V. and Granger DN., Adipose tissue: A motor for the inflammation associated with obesity. *IUBMB Life.* 61(4): 424–430 (2009).

Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K. Development of monocytes, macrophages and dendritic cells. *Science*, 327:656-661 (2010).

Schaffler A., Scholmerich J., and Salzberger B., Adipose tissue as an immunological organ: Toll-like receptors, C1q/TNFs and CTRPs. *Trends In Immunology* 28 (9): 393-399 (2007).

Weisberg SP., McCann D., Desai M., Rosenbaum M., Leibel RL. and Ferrante AW., Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue, *The Journal of Clinical Investigation* 112 (12): 1796-1806 (2003)

Wellen KE and Hotamisligil GS. Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *J. Clin. Invest.*, 112:1785-1788 (2003).

Xu H., Barnes GT., Yang Q., Tan G, Yang D., Chou CJ., Sole J., Nichols A., Ross JS., Tartaglia LA. and Chen H. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 112:1821–1830 (2003).

Nikolajczyk BS, Jagannathan-Bogdan M, Shin H, Gyurko R. State of the union between metabolism and the immune system in type 2 diabetes. *Genes Immun.*14 (2011)

Kussmann M., Panchaud A. and Affolter M., Proteomics in Nutrition: Status Quo and Outlook for Biomarkers and Bioactives. *Journal of Proteome Research* 9: 4876–4887 (2010).

García-Cañas V., Simó V., León C., Cifuentes A., Advances in Nutrigenomics research: Novel and future analytical approaches to investigate the biological activity of natural compounds and food functions. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 51: 290–304 (2010).

Valdecantos MP, Pérez-Matute P, Martínez JA. Obesity and oxidative stress: role of antioxidant supplementation. *Rev Invest Clin.*61(2):127-39 (2009).

Ferguson LR., Nutrigenomics Approaches to functional foods. *Journal of the American dietetic Association* 109: 452-458 (2009).

Trujillo E., Davis C., Milner J., Nutrigenomics, proteomics, Metabolomics an the practice of dietetics. *Journal of the American dietetic Association* 106: 403-413 (2006).

Lam L., Lind J., Semsarian C., Application of proteomics in cardiovascular medicine. *International Journal of Cardiology* 108: 12-19 (2006).

Müller M., and Kersten S., Nutrigenomics: goals and strategies. *Nature Reviews Genetics* 4: 315-322 (2003).

Mutch MD., Wahli W., and Williamson G., Nutrigenomics and nutrigenetics: the emerging faces of nutrition. *Faseb J.* 19: 1602–1616 (2005).

Dillinger TL., Barriga P., Escarcega S., Jimenez M., Lowe MS. And Grivetti LE., Food of the Gods: Cure for Humanity? A Cultural History of the Medicinal and Ritual Use of Chocolate. *Journal of Nutrition.* 2057S-2072S (2000).

Monagas M, Khan N, Andres-Lacueva C, Casas R, Urpí-Sardà M, Llorach R, Lamuela-Raventós RM, Estruch R. Effect of cocoa powder on the modulation of inflammatory biomarkers in patients at high risk of cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr.* 90(5):1144-50 (2009).

Othman A., Ismail A., Ghani N., Adenan I., Antioxidant capacity and phenolic content of cocoa beans. *Food Chemistry* 100: 1523–1530 (2007).

Belščak A., Komes D., Horzic´ D., Kovacˇevic´ Ganic´ K., Karlovic D., Comparative study of commercially available cocoa products in terms of their bioactive composition. *Food Research International* 42: 707–716, (2009).

Sanbongi C., Osakabe N., Natsume M., Takizawa T., Gomi S., Osawa T. Antioxidative polyphenols isolated from *Theobroma cacao*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46: 454-4578 (1998).

Cook N.C., Sammam S. Flavonoids - Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *Nutritional Biochemistry* 7: 66-76 (1996).

Keen C. L., Holt R.R., Polagruto J.A., Wang J.F., Schmitz H.H. Cocoa flavonols and cardiovascular health. *Phytochemistry Reviews* 1: 231-240 (2002).

Counet C., Ouwerx C., Rosoux D., Collin S. Relationship between procyanidin and flavour contents of cocoa liquors of different origins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 6243-6249 (2004).

Osakabe N. and Yamagishi M. Procyanidinis in *Theobroma cacao* Reduce Plasma Cholesterol Levels in High Cholesterol-Fed Rats. *J. Clin. Biochem. Nutr* 45, 131–136 (2009).

Hsu CL., and Yen GC., Phenolic compounds: Evidence for inhibitory effects against obesity and their underlying molecular signaling mechanisms. *Mol. Nutr. Food Res.* 52: 53 – 61 (2008)

Rimbach G., Melchin M., Moehring J. and Wagner AE. Polyphenols from Cocoa and Vascular Health-A Critical Review. *Int. J. Mol. Sci.* 10, 4290-4309 (2009).

Zeigler-Heitbrock HWL, Schraut W, Wendelgaß P, Ströbel M, Sternsdorf T, Weber C, Aepfelbacher M, Ehlers M, Schütt C, Haas J. Distinct pattern of differentiation induced in the monocytic cell line Mono Mac 6 J. *Leukocyte Biol.*, 55: 73–80 (1994).

Singhto N., Sintiprungrat K., Sinchaikul S., Chen ST. and Thongboonkerd V. Proteome Changes in Human Monocytes upon Interaction with Calcium Oxalate Monohydrate Crystals. *Journal of Proteome Research* 9: 3980–3988 (2010).

Rabilloud T. and Lelong C. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: A tutorial. *Journal of Proteomics* (2011)

## CORSI FREQUENTATI

Journal club in lingua inglese dal 10 dicembre al 4 febbraio.

- 4 marzo 2011 Prof. Emanuele Albano  
“Introduction to systemic degenerative diseases I”
- 11 marzo 2011 Prof. Emanuele Albano  
“Introduction to systemic degenerative diseases II“
- 18 marzo 2011 prof. Emanuele Albano  
“Introduction to systemic degenerative diseases III”
- 25 marzo 2011 Prof. Lucia Corrado  
“Amyotrophic laterla sclerosis”
- 1 aprile 2011 Prof. Cristoforo Comi  
“Parkinson and Alzheimer diseases”

## SEMINARI

- 29 novembre 2010 Dott. Lorenzo Moretta  
“Le cellule NK: dalla biologia alla terapia di leucemie ad alto rischio”
- 1 Dicembre 2010 Prof. Pierre Sonveaux  
“Targeting Lactate-Fueled Respiration In Cancer:A New Therapeutic Opportunity?”
- 2 marzo 2011 Prof. Emilio Berti  
“Linfomi Cutanei Primitivi”
- 12 Aprile 2011 Dptt.ssa. Sonia Levi  
“Ferritins: ancient proteins with novel unexpected features”
- 13 Aprile 2011 Dott.ssa Elisabetta Bugianesi  
“Metabolic syndrome: the gastroenterologist point of view”
- 29 aprile 2011 Dott. Valerio Nobili  
“Liver fibrosis in children affected by NASH: how to investigate that”
- 3 Maggio 2011 Dott. Gilberto Filaci  
“Reverse vaccination in autoimmune diseases?”
- 9 Maggio 2011 Dott. Henrik Wolff  
“Innate Immunity and the pathogenicity of inhaled microbial particles”
- 12 Maggio 2011 Prof. Roberto Baldelli  
“Endocrine disturbances during Thyrosine Kinase Inhibitor treatment”
- 13 maggio 2011 Dott. Alberto Corsini  
“Farmacologia dell'aterosclerosi”
- 19 Maggio 2011 Prof. Leonard Petruccioli  
“Mechanisms and Models of TDP-43 Proteinopathies”
- 23 Maggio 2011 Dott. Alessandro Di Nicola  
“Ion Torrent”
- 25 Maggio 2011 Dott. Steven R. Ellis  
“Iron Management in the Hecpidin Era”
- 17 giugno 2011 Prof. Mauro Fasano  
“Molecular pathogenesis and biomarkers of Parkinson's disease”

24 Giugno 2011 Dott. Jonathan D. Rohrer

“Frontotemporal Dementia: trying to solve a complex disorder”

1 Luglio 2011 Prof. Maurizio Parola

“Hypoxia, angiogenesis and liver fibrogenesis”

## **CONGRESSI**

- Secondo Congresso Nazionale di Nutraceutica svolto nei giorni 24-26 febbraio 2011, Milano
- Primo Congresso Internazionale su Cacao, Caffè e Té svolto nei giorni 13-16 settembre 2011, Novara