

Università degli Studi del Piemonte Orientale

“Amedeo Avogadro”



Dottorato di Ricerca in Medicina Molecolare XXVI ciclo

Relazione 2° anno

*Approccio proteomico per la valutazione del quadro infiammatorio
nell'obesità. 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).

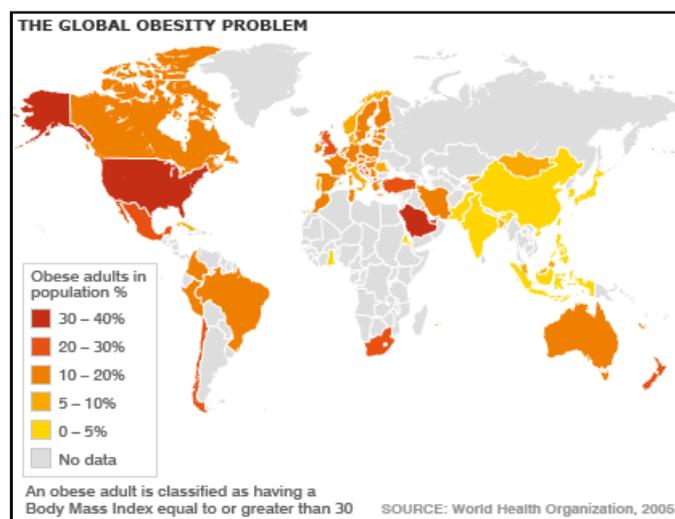


Figura 1. Rappresentazione grafica dello sviluppo dell'obesità nel mondo (fonte: Organizzazione mondiale della sanità, 2005)

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 concause quali: funzionalità pancreatica, loci di suscettibilità genetica, fattori ambientali e componenti della dieta. Ad oggi però, come tutti questi fattori

influiscono 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 a lungo ignorato 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).

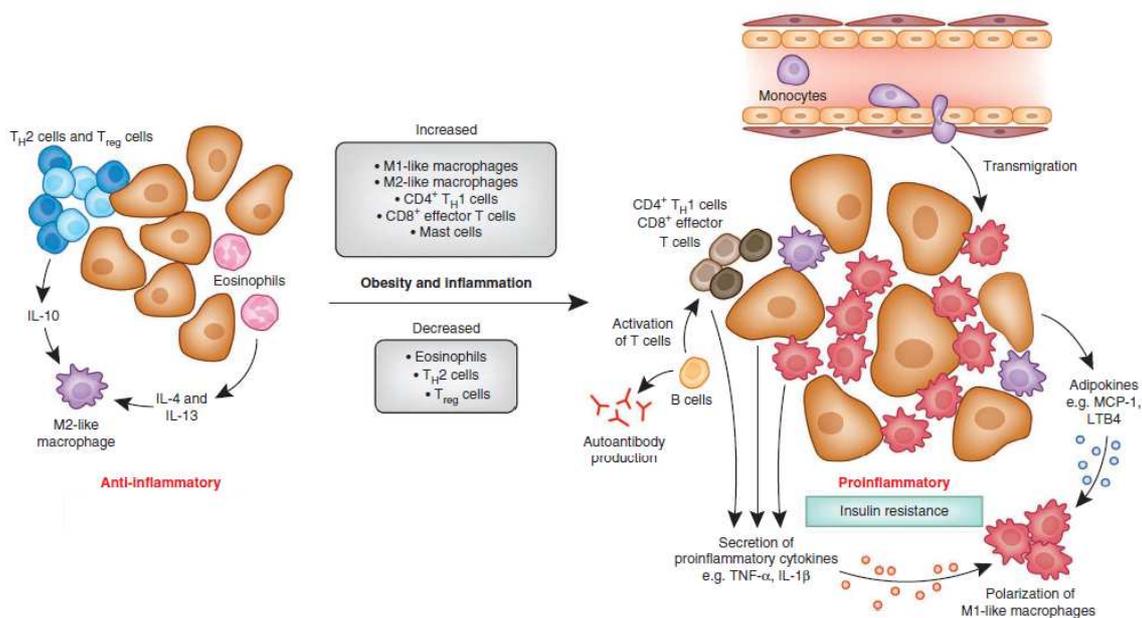


Figura 2. Rappresentazione grafica dell'interazione tra tessuto adiposo e mediatori dell'inflammatione. Da notare la progressiva infiltrazione dei macrofagi e la crescita del tessuto adiposo in risposta ai cambiamenti del microambiente (Osborn *et al.*, 2012).

L'obesità predispone ad uno stato pro-infiammatorio caratterizzato dall'infiltrazione di monociti circolanti, i principali effettori e regolatori dell'inflammatione, che spinti dalle adipochine (leptina e adiponectina), chemochine e citochine pro-infiammatorie prodotte dal tessuto adiposo, quali MCP-1 (Monocyte chemoattractant protein-1), TNF- α (Tumor necrosis factor- α), IL-6 (interleukin-6), IL-1 β (interleukin-1 β), 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'inflammatione 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- α , 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 apporto calorico, ma anche contribuendo alla normalizzazione dello stato di 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 sull'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, portano alla definizione di quella che ormai viene definita come “dieta personalizzata” e possono risultare fondamentali sia per chiarire a livello metabolico la risposta – 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)

È stato osservato in studi recenti svolti su modelli animali che una vasta gamma di sostanze derivanti dalla dieta possono promuovere la crescita, lo sviluppo e la diffusione di numerose malattie croniche. Pertanto molti alimenti possono aumentare il rischio di sviluppare svariate patologie ciò nonostante una vasta gamma di sostanze bioattive può indurre l’espressione di numerosi enzimi coinvolti sia nella difesa cellulare dalle sostanze ossidanti sia nell’eliminazione o inattivazione di molecole elettrofile. L’espressione di enzimi citoprotettivi attivata da sostanze introdotte tramite la dieta sottolinea ancora di più l’importanza di una corretta alimentazione (Hybertson *et al.*, 2011). Studi clinici attualmente in corso evidenziano come il consumo regolare di frutta e verdura diminuisca sensibilmente il rischio di sviluppare numerose patologie. Il progressivo aumento del consumo di questi alimenti, con un comprovato effetto preventivo, è al giorno d’oggi una priorità a livello globale. Molte organizzazioni mondiali e non, oltre ad effettuare una vasta campagna informativa, hanno stabilito numerose linee guida per aiutare il consumatore a scegliere i giusti alimenti in modo da prevenire e ridurre l’insorgere di molteplici patologie. (Surh *et al.* 2003)

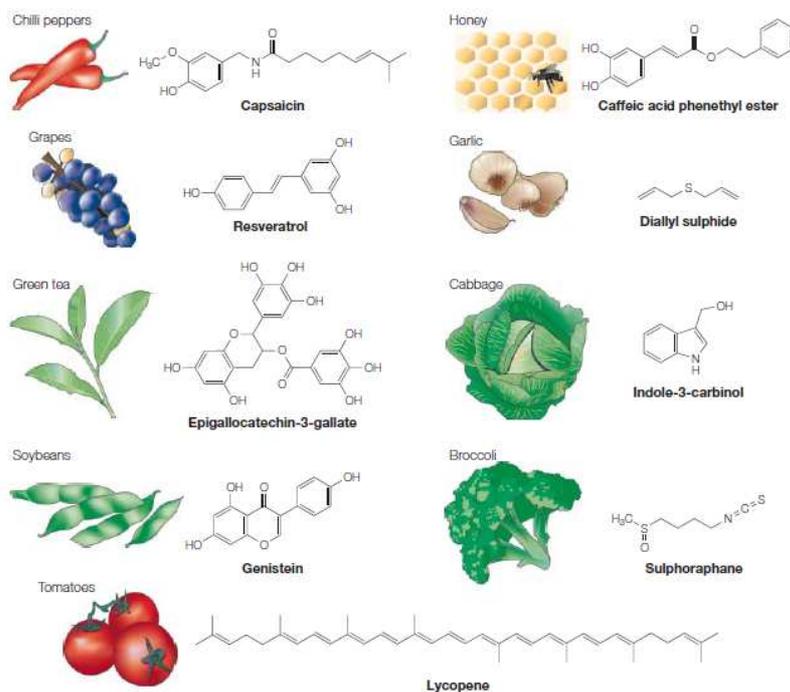


Figura 3. Rappresentazione grafica sostanze fitochimiche e relative fonti alimentari (Surh *et al.*, 2003).

Oltre ad avere un effetto preventivo nei confronti della progressione di patologie croniche un'altra importante conseguenza è quello di limitare i danni causati al DNA dai radicali liberi. L'attivazione del complesso sistema degli enzimi di fase II in risposta ad uno stress cellulare è una componente altrettanto importante contro i danni che una vasta gamma di sostanze ossidanti e elettrofile può causare al DNA. (Surh *et al.* 2003)

Gli antiossidanti esercitano il loro effetto protettivo non solo nei confronti di ROS ma soprattutto inducendo l'espressione di numerosi geni che codificano per le proteine disintossicanti/difensive, tra cui gli enzimi di fase II. (Surh *et al.* 2008)

Questi geni codificano per enzimi come la glutationi perossidasi, quinone ossido-reduttasi e l'eme ossigenasi-1, e possiedono nella regione al 5' una struttura comune, denominata Antioxidant-Responsive Element (ARE) che viene riconosciuta da svariati fattori di trascrizione che possiedono un'altra sequenza altamente conservata: basic leucine zipper (bZIP), come NRF, JUN, FOS, FRA, MAF, i quali modulano l'espressione dei suddetti enzimi. (Surh *et al.* 2003)

Nello specifico durante questo studio l'attenzione è stata posta su un particolare fattore di trascrizione: NRF2.

RUOLO DEL FATTORE DI TRASCRIZIONE DI NRF-2

Il nuclear factor-erythroid-2-related factor 2 (NRF2) è un fattore di trascrizione (cap "n" collar family) ubiquitario espresso a bassi livelli in tutte le cellule. Esso regola i maggiori meccanismi cellulari di difesa attraverso l'espressione di numerosi enzimi con azione detossificante e antiossidante. (Zhang *et al.*, 2010) In condizioni normali è legato al dimero dello specifico repressore citoplasmatico Kelch-like-ECH-associated protein 1 (KEAP1), che inibisce la sua capacità di traslocare nel nucleo, inoltre, è costantemente degradato dal proteosoma attraverso un meccanismo di poli-ubiquitinazione operato dal complesso Cul3-keap1 (Taguchi *et al.*, 2011). NRF2 e KEAP1 interagiscono l'una con l'altra grazie a numerosi domini ricchi di glicine di KEAP1 che interagiscono con la regione idrofila di NRF2, denominata NEH2. (Surh *et al.* 2003)

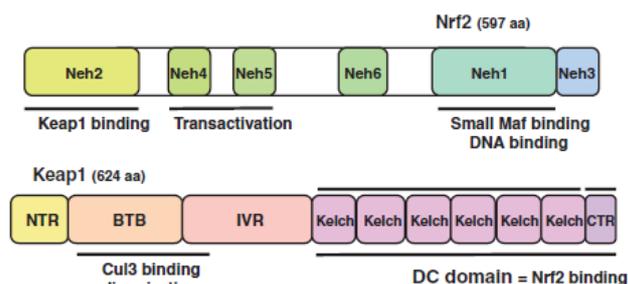


Figura 4. Domini strutturali di NRF-2 e KEAP-1. La proteina NRF-2 è suddivisa in 5 domini altamente conservati (Neh 1 e Neh 6) in particolare il dominio Neh 2 è essenziale per il legame all'inibitore KEAP-1 (Taguchi *et al.*, 2011).

KEAP1 contiene numerosi residui di cisteine (25 nei topi e 27 negli umani) che ricoprono il ruolo di sensori dello stress ossidativo. Le molecole pro-ossidanti causano una modificazione dei residui di cisteine che collegano le due proteine, causando il parziale rilascio del fattore di trascrizione che si dissocia completamente in seguito a fosforilazione nel residuo di serina 40 (S40), da chinasi quali la fosfatidilinositolo-3- chinasi (PI3K), proteina chinasi C (PKC), c-Jun NH2-terminal chinasi (JNK) e extracellular-signal-regulated kinase (ERK). (Surh *et al.* 2003; Niture *et al.*, 2010)

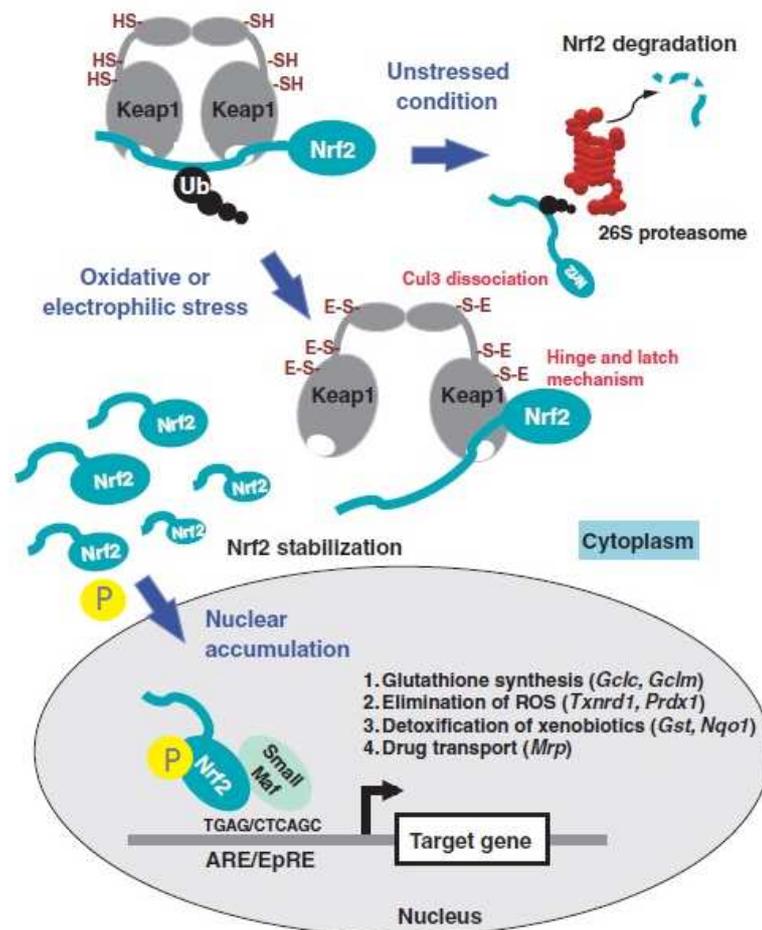


Figura 5. Rappresentazione del pathway KEAP-1 e NRF-2. Il fattore di trascrizione Nrf2 svolge un ruolo centrale nell'induzione dell'espressione di numerosi enzimi citoprotettivi in risposta ad uno stress ossidativo. KEAP-1 è una proteina citoplasmatica essenziale per la regolazione di NRF-2 (Taguchi *et al.*, 2011).

Libero nel citoplasma può traslocare nel nucleo dove associandosi ad altri fattori di trascrizione, quali small MAF, forma un etero dimero che lega i siti ARE e stimola l'espressione di geni che codificano per enzimi antiossidanti, enzimi detossificanti di fase II e anti-infiammatori. (Nair *et al.*, 2008; Surh *et al.* 2003)

In condizione di stress ossidativo l'immediata attivazione delle difese mediate da NRF2 contribuisce a mantenere l'omeostasi cellulare e a prevenire lo sviluppo di patologie (Zhang *et al.*, 2010; Kensler *et al.*, 2007).

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



Figura 6. Immagine di barrette di cioccolato.

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:

- ✓ Flavan-3-oli (37%): le principali sono (+)- catechina, (-)-epicatechina, l'epigallocatechina e la catechina-3-gallato.
- ✓ Antocianine (4%) :cianidin-3- α -L-arabinoside e cianidin-3- β -D-galattoside.
- ✓ Proantocianidine (58%): i più rappresentativi sono i flavan-3,4-dioli.

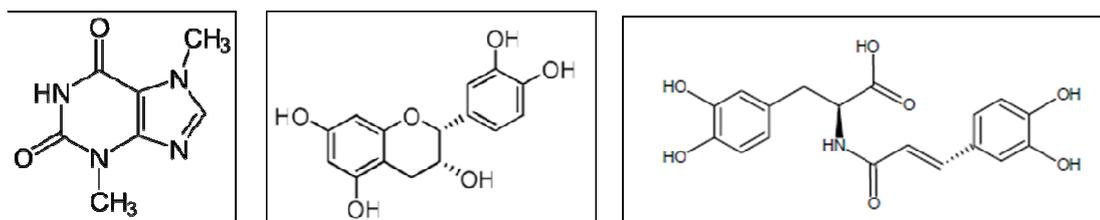


Figura 7. Struttura chimica di tre delle componenti bioattive del cacao. In ordine da sinistra: teobromina, epicatechina e clovamide.

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' α -tocoferolo e del glutathione (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).

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 notevole 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 in virtù delle proprietà antiossidanti e anti-infiammatorie proprie del cacao (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. Attualmente in letteratura non vi è alcuna relazione specifica sulla efficiente biodisponibilità dei flavonoidi e l'infiammazione cellulare, nonostante i dati su modelli animali siano promettenti. Per questa ragione in collaborazione con il Dipartimento di Scienza del Farmaco è stata valutata, attraverso un'analisi di cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa (LC-MS), la biodisponibilità dell'epicatechina in particolare del corrispondente metabolita glucuronato, nel plasma di 5 soggetti in seguito al consumo di cacao in acuto e in cronico. Il cacao è stato somministrato sottoforma di barrette di cioccolato da 10g ciascuna, provenienti da due lotti con differente percentuale di cacao pari al 40 % e 80 %. Contemporaneamente presso il nostro laboratorio sono in corso studi sulle proteine, sia su linea cellulare sia su monociti isolati dal sangue di volontari, per comprendere il ruolo dei monociti come componenti chiave dell'infiammazione associata all'obesità. La proteomica è uno studio di proteine su larga scala, che come la genomica include alterazioni nell'espressione genica, ma comprende anche modificazioni post-traduzionali offrendo così un approccio quantitativo e qualitativo al problema in questione.

Colture cellulari

Per lo svolgimento degli esperimenti è stata utilizzata la linea cellulare di monociti umani, U937 che presenta le stesse caratteristiche e funzioni fisiologiche dei monociti maturi, tra cui l'espressione dei CD14, IL-1, IL-6 e TNF- α . Le cellule sono mantenute in coltura con il 5% di CO₂ a 37 °C in un ambiente umidificato. Come terreno è stato utilizzato RPMI 1640 addizionato con il 10% di siero fetale bovino (FBS) scomplementato, L-glutammina 2 mM, 1% di penicillina e streptomicina, (tutti acquistati presso Sigma-Aldrich). Durante i trattamenti è stato utilizzato terreno senza l'aggiunta di siero, e per attivare le cellule è stato aggiunto LPS 1 μ g/mL 30 minuti prima della lisi cellulare (Lewis *et al.*, 2006).

Trattamento delle U937 con epicatechina

Le cellule U937 (1x10⁶ cellule/mL) sono state sottoposte a trattamento con epicatechina (100 μ M) sciolta in DMSO (concentrazione finale nel terreno < 0,5%) (Sigma-Aldrich) per 30 minuti, 1, 2 e 3 ore di incubazione a 37 °C, 5% di CO₂. Successivamente 30 minuti prima del termine del trattamento è stato aggiunto LPS (1 μ g/mL) (Sigma-Aldrich) al fine di attivare le cellule. Durante il trattamento il terreno di coltura delle U937 è stato utilizzato senza l'aggiunta di FBS.

Estrazione e quantificazione delle proteine totali, citoplasmatiche e nucleari

Per l'estrazione delle proteine totali è stato utilizzato il buffer di estrazione RIPA (20 mM di HEPES pH 7.4, 150 mM di NaCl, 1% di Triton-X 100, 1% Sodio deossicolato, 1% SDS, inibitori enzimatici) (Sigma-Aldrich), per l'isolamento delle proteine citoplasmatiche e nucleari è stato utilizzato il PARISkit (Ambion) in seguito le proteine sono state riposte a -80 °C e poi quantificate tramite il Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific).

Elettroforesi ed immunoblotting

I campioni di proteine sono stati separati con SDS-PAGE (10% acrilamide), trasferite su membrana PVDF e analizzate mediante immunoblotting eseguiti con metodi standard utilizzando i seguenti anticorpi anti-lamin B, anti- β -actina, scelte come proteina di controllo, anti-NRF-2 (c20, H300), anti-p-NRF-2 (Ser40). Gli anticorpi sono stati acquistati presso Santa Cruz e Abcam. Le proteine sono state visualizzate in chemiluminescenza (ECL,

Perkin Elmer), il cui segnale è stato analizzato con un sensitometro (Chemidoc, Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Isolamento di monociti da volontari

I monociti sono stati isolati da sangue venoso ed eparinizzato. Il sangue prelevato viene fatto sedimentare con una soluzione di destrano in rapporto 1:1 e centrifugato a 400g per 30 minuti a temperatura ambiente su gradiente di Hystopaque (densità=1.077 g/cm³). L'anello di cellule mononucleate viene trasferito in un altro tubo e lavato con PBS (phosphate-buffered saline pH 7.4) per 10 minuti a 250g per tre volte; le cellule così recuperate vengono piastrate in RPMI 1640 medium con 2 mM di glutammina, 50 µg/ml di streptomina, 5 U/ml di penicillina (Cermak *et al.*, 1993). La popolazione purificata di monociti viene ottenuta per adesione (1 ora, 37°C, 5% CO₂) e le cellule in sospensione (principalmente linfociti) vengono rimosse con tre lavaggi di PBS; la vitalità cellulare viene valutata con "trypan blue dye exclusion" ed è normalmente > 98%.

Estrazione delle proteine totali per isoelettrofocalizzazione

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
Anfoliti	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 3x10⁶), 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 delle proteine

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 5-8 per ottenere una versione più precisa 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 (figura 8).

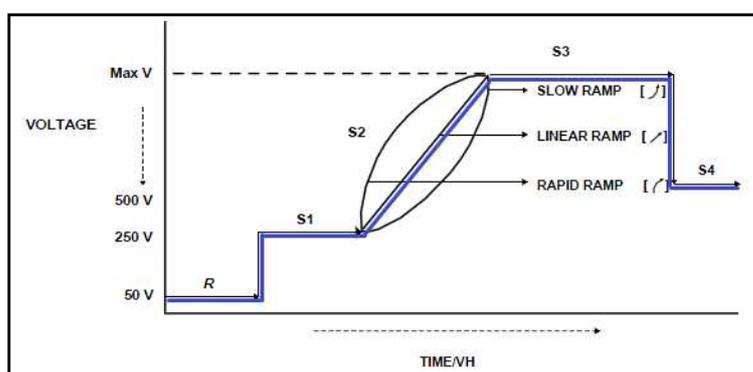


Figura 8. Rappresentazione grafica del protocollo di isoelettrofocalizzazione (IEF). Nell'immagine sono evidenziati in blu i passaggi utilizzati per gli esperimenti.

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 9).

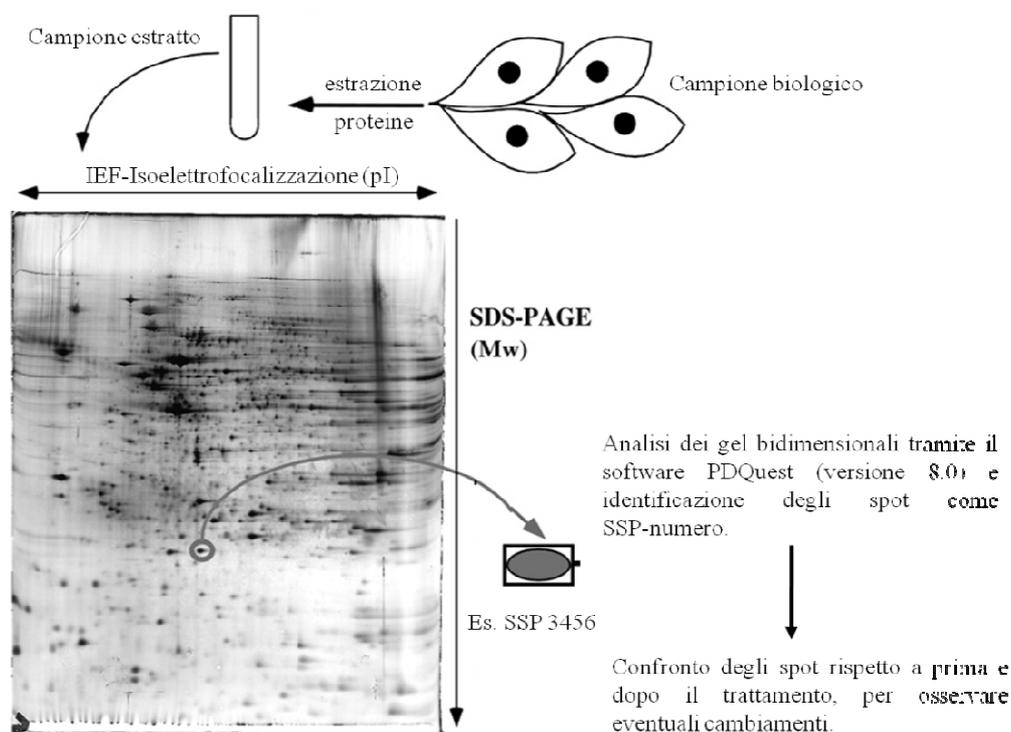


Figura 9. Rappresentazione schematica dell'analisi bidimensionale svolta in questa fase preliminare. Modificata da Rabilloud *et al.*, 2011.

Analisi LC-MS/MS

La cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa, ovvero LC-MS, consiste nell'abbinamento di un cromatografo liquido ad alte prestazioni (HPLC) con uno spettrometro di massa (MS), in questo modo è stato possibile accostare la separazione di vari analiti disciolti in una fase liquida con la loro analisi tramite spettrometria di massa.

L'analizzatore utilizzato per queste analisi è del tipo a trappola ionica.

I vantaggi principali sono dati dalla possibilità di effettuare un'analisi sulla massa dello ione d'interesse (MS/MS) prima di essere espulso. LC-MS fornisce informazioni dettagliate per riconoscere composti organici basandosi sul confronto del tempo di ritenzione del campione analizzato e di uno standard con la medesima massa.

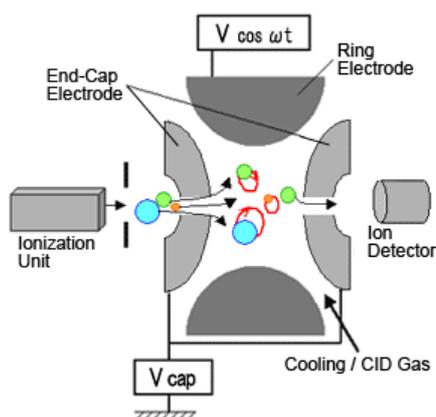


Figura 10. Rappresentazione schematica del funzionamento della trappola ionica dell'LC-MS. fonte Shimadzu.

Questa tecnica è stata utilizzata per valutare la biodisponibilità dell'epicatechina, in particolare è stata valutata la presenza del metabolita glucuronato nel plasma prelevato da volontari in seguito al trattamento giornaliero o settimanale con 7 barrette di cioccolato al 40% e 80% di cacao. Il plasma è stato sottoposto a precipitazione delle proteine con TCA al 10% in rapporto 1:1. In seguito i campioni sono stati centrifugati (13000 rpm, 10 minuti, 24 °C) e aliquotati negli appositi tubini per l'analisi. Nelle tabelle sottostanti sono riportati i reagenti e i criteri utilizzati per l'analisi.

Colonna	Luna C18 100* 2mm (3 um) (s/n 515558-7) + precolonna C18	Gradiente:				
Temp. colonna	35	min	%A	%B	%C	%D
A	acqua 0.2% HCOOH	0.00	90	0	10	0
B		5.00	80	0	20	0
C	acetonitrile	5.50	5	0	95	0
D		10.00	5	0	95	0
Vol. iniezione (µL)	1	10.50	90	0	10	0
Flusso (µL/min)	200	15.00	90	0	10	0

Tabella 2. Elenco dei reagenti e del tipo di colonna utilizzato per l'analisi LC/MS.

Al momento sono state effettuate le analisi solo dopo il consumo del primo lotto di cioccolato.

Per valutare la presenza di un eventuale accumulo del metabolita in seguito ad un tempo più prolungato di trattamento, sono state svolte le medesime analisi su campioni raccolti per una settimana, prima e dopo 4 ore dal consumo delle barrette di cioccolato. I risultati rivelano il medesimo andamento riscontrato durante l'analisi dei prelievi giornalieri (figura 12.A).

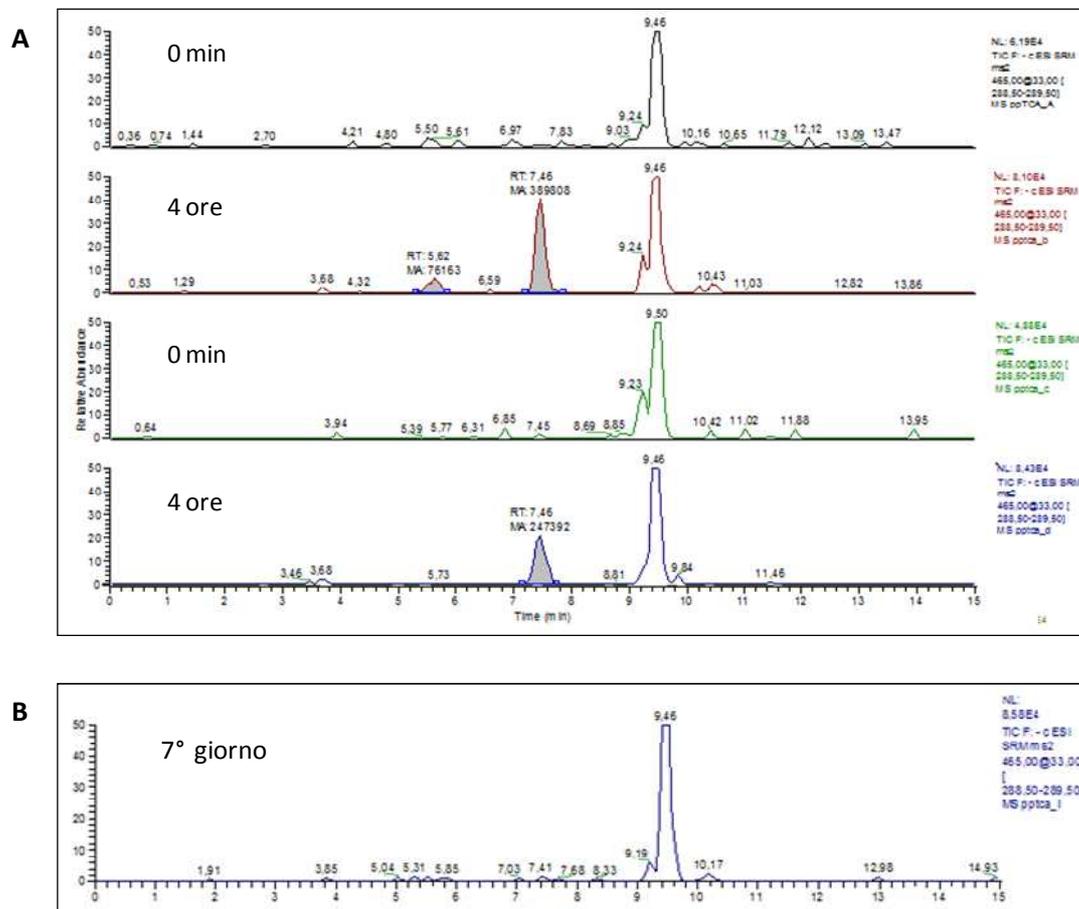


Figura 12. Esempio di cromatogramma della biodisponibilità del cacao effettuata su campioni di plasma prelevati da soggetti normopeso in seguito alla somministrazione per una settimana con barrette di cioccolato. **A)** Sono state riscontrate tracce dei metaboliti dell'epicatechina (EC), in particolare dei glucuronidi, solo dopo quattro ore successive alla somministrazione di 7 barrette di cioccolato (39,76 mg di EC), **B)** a conferma dei dati precedenti, inoltre l'analisi del campione prelevato dopo una settimana di trattamento non ha evidenziato la presenza di metaboliti.

Come si può osservare nel cromatogramma presentato in figura 12.B dopo una settimana di trattamento non è presente alcuna traccia dei metaboliti.

Attualmente sono in corso le medesime analisi in seguito al trattamento singolo o settimanale con il secondo lotto di cioccolato (80% di cacao).

A causa dell'assenza in commercio dello standard dell'epicatechina glucuronata (figura 13.A) è stato necessario svolgere un'analisi LC-MS/MS (che permette di studiare la frammentazione di uno ione generato in massa) come ulteriore analisi per l'identificazione dei picchi osservati.

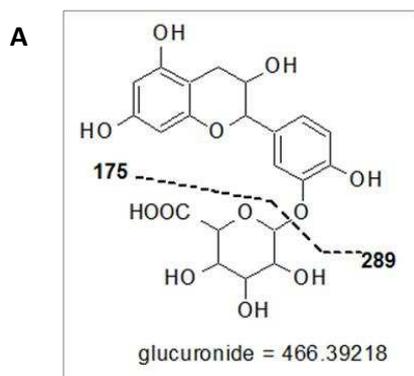
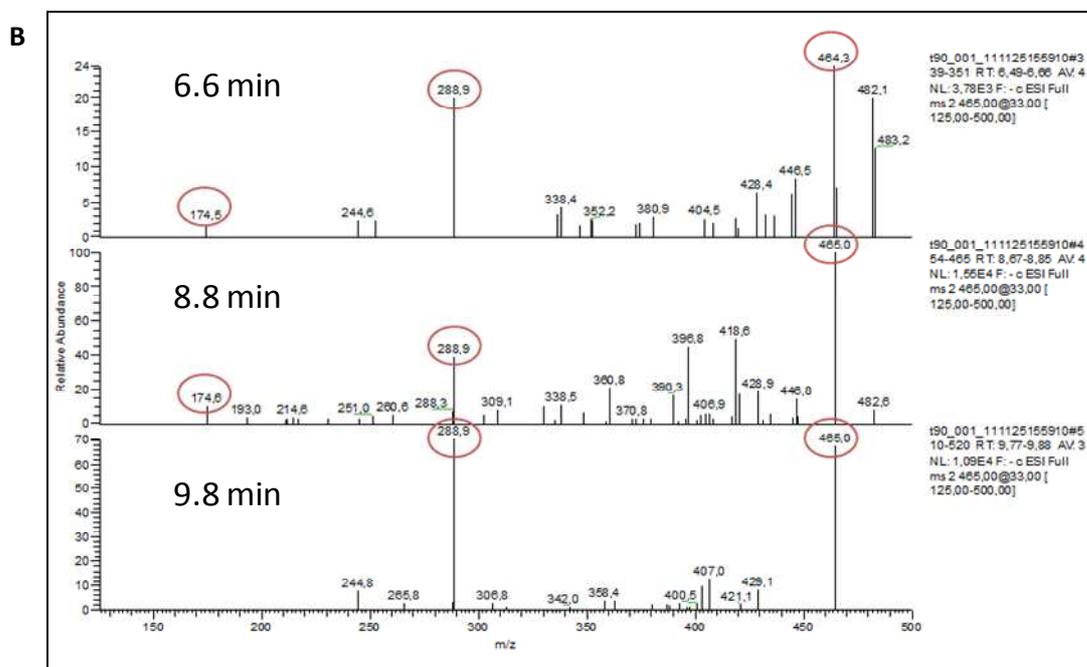


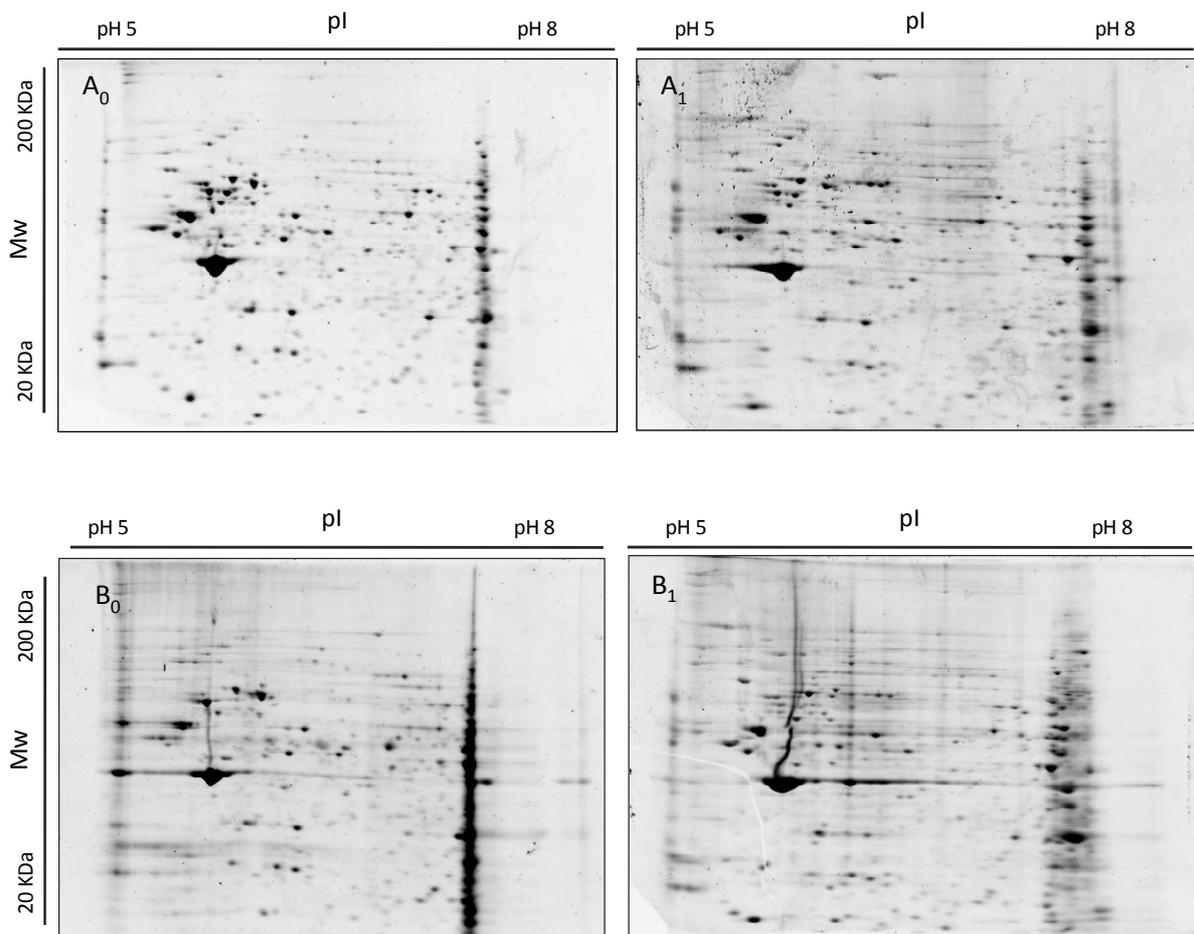
Figura 13. A. rappresentazione della frammentazione della molecola di epicatechina glucuronata. **B.** Rappresentazione degli spettri di MS² a 6.6 min, 8.8min e 9.8 min.



Tutti i tre spettri di MS² (figura 13.B) presentano il frammento a 289 (perdita di acido glucuronico) mentre solo nei primi due è visibile anche lo ione 175 tipico dell'acido glucuronico carico che si stacca. Sulla base di questi dati si può affermare che solo i primi due picchi siano dei glucuronidi delle catechine. In tutti i campioni analizzati non è stata osservata traccia di catechine ed epicatechine non metabolizzate, molto probabilmente perché sono velocemente metabolizzate dall'organismo.

Profilo proteico dei monociti isolati dai volontari dopo la somministrazione di cioccolato

I monociti isolati dal sangue periferico dei volontari sani sono stati lisati e le proteine estratte sono state separate tramite elettroforesi bidimensionale utilizzando per la prima dimensione IPGstrip con un range di PH da 5 ad 8 e per la seconda dimensione un gel di poliacrilammide al 10%. Utilizzando il software statistico PDQuest (versione 8.0) sono stati confrontati i rispettivi profili proteici tra prima e dopo 3 ore dalla somministrazione di 7 barrette di cioccolato (sia al 40% sia all'80%). I cambiamenti più rilevanti sono stati osservati solo dopo l'assunzione di cioccolato con la percentuale più alta di cacao, e quindi con un contenuto maggiore di flavonoidi. Nelle immagini sottostanti sono rappresentati i profili proteici estratti prima (A_0 , B_0 , C_0 , D_0 , E_0) e dopo 3 ore (A_1 , B_1 , C_1 , D_1 , E_1) dal consumo di cioccolato all'80% di cacao (figura 14).



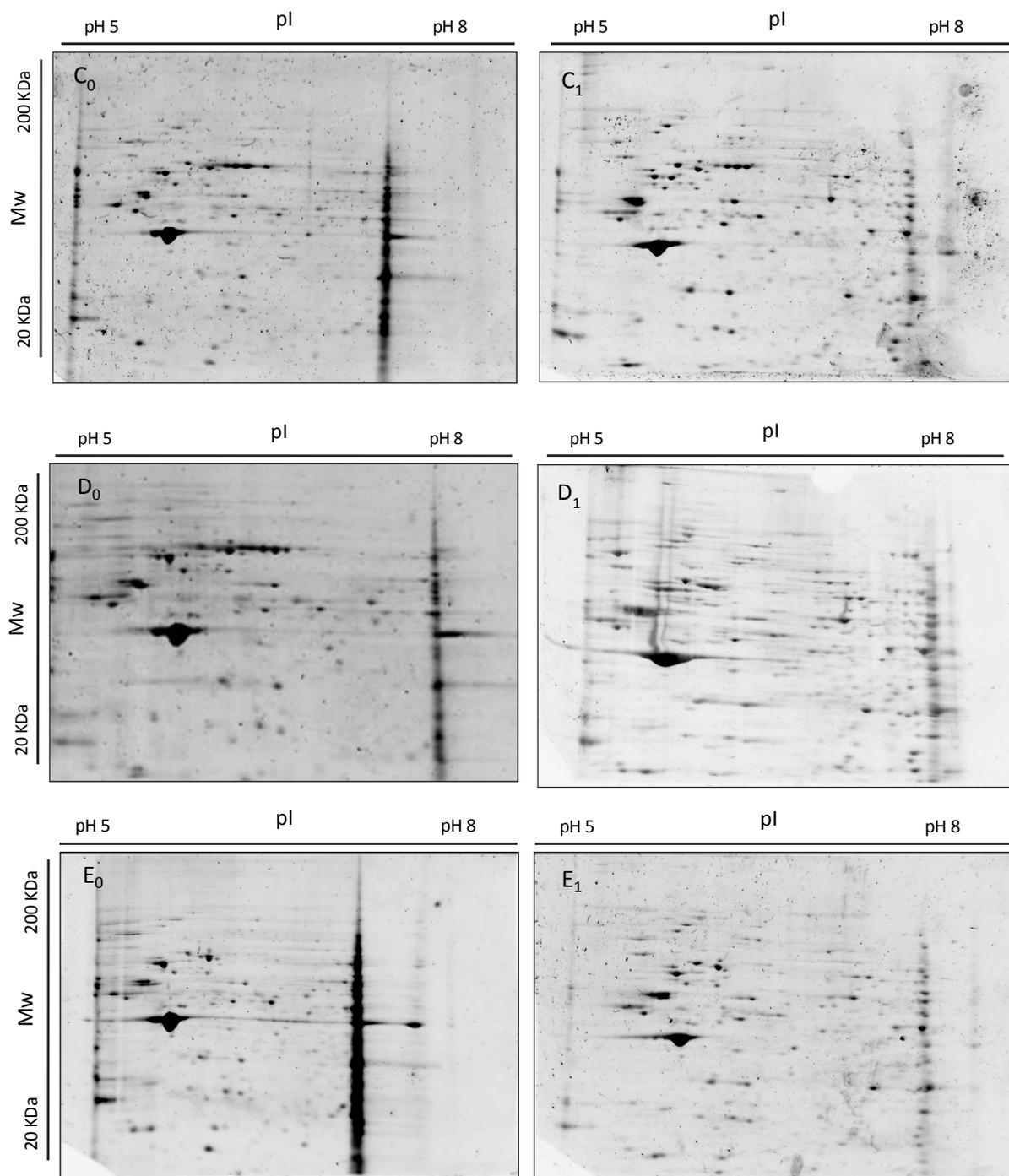


Figura 14. Analisi proteomica bidimensionale (IEF: pH 5-8, SDS-page 10% di poliaccrilamide) delle proteine estratte dai monociti circolanti dei volontari sani prima (A0 , B0, C0, D0, E0) e dopo 3 ore (A1, B1, C1, D1, E1) dal consumo di 7 barrette di cioccolato all'80% di cacao.

Nel complesso, l'analisi ha evidenziato una media totale di 705 punti (n = 5) presenti all'interno dei monociti isolati.

Sono tuttora in corso le analisi dei vari profili ma a seguito di un'analisi più approfondita riguardo agli spot proteici localizzati tra 40 e 70 KDa, sono state osservate differenze significative nell'espressione proteica dopo tre ore dalla somministrazione di cacao se confrontato con il profilo basale (figura 15).

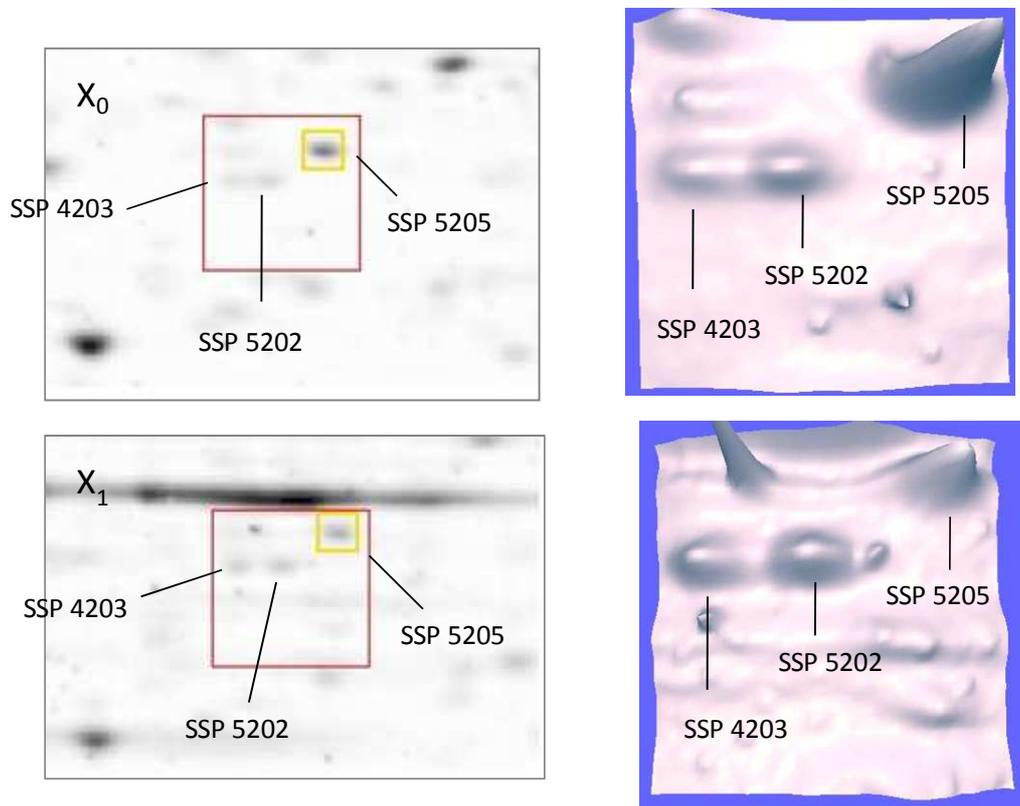


Figura 15. Esempio dei cambiamenti osservati durante l'analisi con il software statistico dei profili proteici dei soggetti. Ingrandimento di alcuni spot localizzati tra i 40 e i 70 KDa. Prima (X_0) e dopo 3 ore (X_1) dalla somministrazione di cioccolato all'80% di cacao. L'immagine tridimensionale a lato di ciascun ingrandimento rappresenta gli spots proteici analizzati più

Analizzando l'ingrandimento presentato nella figura 15, si può osservare come l'espressione degli spot SSP 4203, SSP 5202 e SSP 5205 si modifichi in seguito al trattamento con il cioccolato. Esaminando attentamente l'immagine tridimensionale, più esplicitiva e immediata rispetto a quella proposta nel gel, si può notare come gli spots SSP 4203 e SSP 5202 siano più espressi dopo il consumo di cacao (fig. X_1) e al contrario lo spot SSP 5205 sia meno espresso prima della somministrazione. Il medesimo risultato è stato osservato anche nei profili proteici degli altri soggetti (dati non mostrati).

Effetto dell'epicatechina sull'attivazione di NRF-2 nella linea cellulare U937

NRF-2 è il principale fattore di trascrizione coinvolto nella protezione della cellula dallo stress ossidativo attraverso l'induzione di numerosi enzimi di fase II e nelle cellule del sistema immunitario promuove anche la produzione di citochine anti-infiammatorie.

Al fine di indagare il possibile ruolo dell'epicatechina come agente antiossidante in grado di indurre l'attivazione del fattore di trascrizione è stata utilizzata la linea cellulare U937. Le cellule in coltura sono state trattate per 30 minuti, 1, 2 e 3 ore con l'epicatechina (100 µg/mL), e per gli ultimi 30 minuti di ciascuna incubazione sono state stimolate aggiungendo LPS (1µg/mL). Come controllo dell'esperimento sono state utilizzate cellule sia incubate per 3 ore con la medesima molecola sia mantenute in coltura prive di trattamenti. In questi due ultimi esperimenti il risultato è rimasto invariato (dati non mostrati).

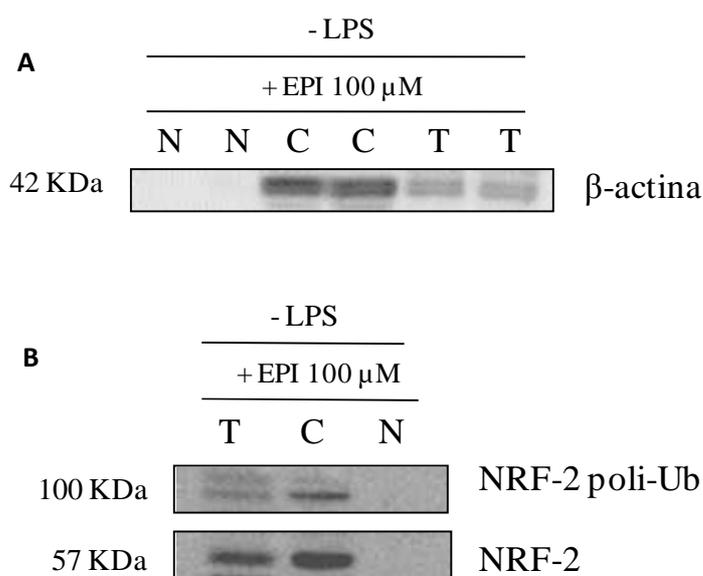


Figura 16. Campioni di proteine totali (T), citoplasmatiche (C) e nucleari (N) estratte dalle cellule U937 stimolati con 100 µM di epicatechina (EPI) per 3 ore. Le proteine sono state separate tramite SDS-PAGE, trasferite su membrana di PVDF ed analizzate mediante immunoblotting con gli anticorpi specifici. In figura A e B sono riportati gli esperimenti rappresentativi di 3 condotti sulla stessa linea cellulare.

Come si può osservare nella figura 16.A e 16.B in assenza di stimolazione il pathway di NRF-2 risulta inattivo, in quanto non è presente alcuna banda relativa al fattore di trascrizione nei campioni di proteine nucleari (N). Al contrario le analisi svolte sulle proteine

totali (T) o citoplasmatiche (C) mostrano le bande caratteristiche di NRF2 citoplasmatico a 57 KDa o in fase di degradazione poli-ubiquitinato a 100 kDa.

In seguito all'incubazione per 30 minuti, 1, 2 e 3 ore con l'epicatechina (100 μ M) e successivamente stimulate per gli ultimi 30 minuti con 1 μ g/mL di LPS, i risultati mostrano una graduale attivazione del fattore di trascrizione in quanto la banda è presente anche nel campione di proteine nucleari come si può osservare nelle immagini sottostanti (figura 17).

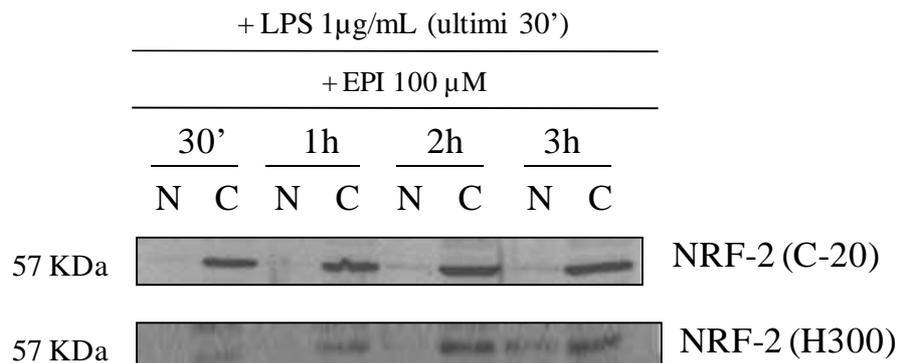


Figura 17. Campioni di proteine citoplasmatiche (C) e nucleari (N) estratte dalle cellule U937 incubate con 100 μ M di epicatechina (EPI) per 30 min, 1, 2, e 3 ore, e successivamente stimulate con LPS 1 μ g/mL per l'ultima mezzora d'incubazione. Le proteine sono state separate tramite SDS-PAGE, trasferite su membrana di PVDF ed analizzate mediante immunoblotting con gli anticorpi specifici per NRF-2. In entrambi i casi risulta evidente la traslocazione nucleare.

La traslocazione nucleare successiva alla stimolazione delle cellule non comporta necessariamente l'attivazione del fattore di trascrizione. Per questo motivo sono state svolte ulteriori analisi per verificare l'effettiva attivazione di NRF-2.

È stato utilizzato un anticorpo specifico per la forma fosforilata della serina-40, ovvero la modificazione post-traduzionale che attiva il fattore di trascrizione (Niture *et al.*, 2011). Dalle analisi effettuate si è osservato che in seguito alla stimolazione con LPS nei campioni nucleari, ma non in quelli citoplasmatici, sono presenti le bande corrispondenti a NRF-2 fosforilato nella serina-40 (figura 18), questo ad indicare la reale attivazione del fattore di trascrizione solo a livello nucleare.

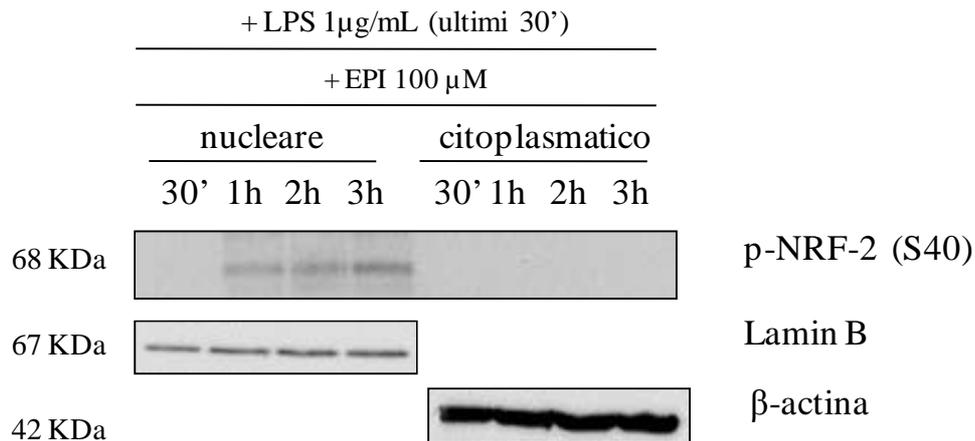


Figura 18. Campioni di proteine citoplasmatiche (C) e nucleari (N) estratte dalle cellule U937 incubate con 100 µM di epicatechina (EPI) per 30 min, 1, 2, e 3 ore, e successivamente stimulate con LPS 1 µg/mL per l'ultima mezzora d'incubazione. Le proteine sono state separate tramite SDS-PAGE, trasferite su membrana di PVDF ed analizzate mediante immunoblotting con gli anticorpi specifici per NRF-2. In entrambi i casi risulta evidente la traslocazione nucleare.

Per valutare l'effetto dell'attivazione del pathway di NRF-2 sulle cellule infiammatorie sono tuttora in corso ulteriori analisi con specifici anticorpi sia per valutare l'espressione degli enzimi che mantengono l'equilibrio cellulare sia per verificare l'attivazione dei pathway di NFκB e PPARγ noti per essere coinvolti nella risposta cellulare al danno ossidativo.

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 (Ding *et al.*, 2006; Galleano *et al.*, 2009; Selmi *et al.*, 2008; Min *et al.*, 2012). 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 (Cooper *et al.*, 2008; Osborn *et al.*, 2012).

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 estratte direttamente dalla materia prima e non i metaboliti, le reali sostanze che interagiscono *in vivo* con le cellule dell'organismo.

Gli studi iniziali di questo progetto si sono focalizzati sulla valutazione della biodisponibilità nel plasma prelevato da volontari del metabolita glucuronato dell'epicatechina, in seguito al trattamento giornaliero o settimanale con alcune barrette di cioccolato proveniente da due lotti con differente percentuale di cacao. Tutti i composti a base di cacao utilizzati in questo studio sono forniti da un'Azienda Italiana leader nel settore in stretta collaborazione con il Gruppo di Chimica degli Alimenti (Dipartimento di scienza del Farmaco, Università degli Studi del Piemonte Orientale A. Avogadro) con il quale è in corso una collaborazione. L'obiettivo successivo è stato quello di utilizzare l'approccio proteomico per valutare i profili

di proteine sintetizzate dalle cellule infiammatorie presenti nel sangue di un gruppo di soggetti, prima, durante e dopo una dieta controllata con l'aggiunta di un particolare alimento funzionale, nello specifico cioccolato al 40% e 80% di cacao. Le analisi effettuate sui profili proteomici hanno mostrato modificazione nell'espressione di alcuni spot proteici. Successivamente saranno svolti gli stessi esperimenti anche su campioni di monociti estratti da soggetti obesi e le 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 caco, tempo e dose dipendenti.

Parallelamente sono stati svolti degli studi sulla linea cellulare U937. Le cellule sono state sottoposte a trattamenti con una delle principali sostanze bioattive presenti nel cacao, l'epicatechina. Successivamente saranno svolte le medesime analisi utilizzando anche teobromina e clovamide. I primi risultati presentati in questa relazione nella sezione risultati e discussione, mostrano una traslocazione e conseguente attivazione del fattore di trascrizione di NRF-2 in seguito al trattamento con epicatechina 100 μ M e LPS 1 μ g/mL. Non è ancora ben chiaro il meccanismo molecolare responsabile della risposta cellulare allo stress ossidativo, quindi l'importanza di ottenere informazioni su questi sensori proteici di stress ossidativo è data dal fatto che tali target molecolari possono costituire dei biomarkers di tale condizione cellulare, in virtù del fatto che lo stress ossidativo costituisce una caratteristica comune a vari eventi patogenetici. Per tale ragione sono in atto ulteriori analisi per verificare la reale attivazione del pathway di NRF-2 in seguito alla stimolazione tramite LPS e al trattamento con sostanze bioattive potenzialmente antiossidanti. Successivamente saranno svolti i medesimi esperimenti anche su monociti *ex-vivo* per appurare l'attivazione del pathway di NRF-2 non solo su linea cellulare. Saranno condotti inoltre esperimenti tramite microscopia confocale al fine di rafforzare i risultati ottenuti.

Tutti 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).

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).

Osborn O. and Olefsky JM., The cellular and signaling networks linking the immune system and metabolism in disease. *Nature Medicine*. 18(3): 363-374 (2012).

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

Tilg H. and Moschen AR., Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nature Reviews*, 6: 772-783 (2006)

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., Kovac´evic´ 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).

Hybertson BM., Gao B., Bose SK., McCord JM., Oxidative stress in health and disease: The therapeutic potential of Nrf2 activation. *Molecular Aspects of Medicine* 32: 234–246 (2011).

Surh YJ., Kundu JK, Na HK., Nrf2 as a Master Redox Switch in Turning on the Cellular Signaling Involved in the Induction of Cytoprotective Genes by Some Chemopreventive Phytochemicals. *Planta Med* 74: 1526-1539 (2008).

Surh YJ., Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nature reviews*.3: 768-780 (2003)

Nair S., Doh ST., Chan JY, Kong AN. and Cai L., Regulatory potential for concerted modulation of Nrf2- and Nfkb1-mediated gene expression in inflammation and carcinogenesis. *British Journal of Cancer*. 99, 2070 – 2082 (2008).

Zhang DD., The Nrf2-Keap1-ARE Signaling Pathway: The Regulation and Dual Function of Nrf2 in Cancer. 13: 1623- 1626 (2010).

Kensler TW., Wakabayashi N. and Biswal S., Cell Survival Responses to Environmental Stresses Via the Keap1-Nrf2-ARE Pathway. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 47:89–116 (2007).

Taguchi K., Motohashi H. and Yamamoto M., Molecular mechanisms of the Keap1–Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. *Genes to Cells* 16, 123–140 (2011).

Niture SK., Kaspar JW., Shen J. and Jaiswal AK., Nrf2 Signaling and Cell Survival. 244(1): 37–42 (2010).

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)

Ding EL., Hutfless SM., Ding X. and Girotra S., Chocolate and Prevention of Cardiovascular Disease: A Systematic Review. *Nutrition & Metabolism* 3:2 1-12 (2006).

Galleano M., Oteiza PI. and Fraga CG., Cocoa, chocolate and cardiovascular disease. *J Cardiovasc Pharmacol.* 54(6): 483–490 (2009).

Selmi C., Cocchi CA., Lanfredini M., Keen CL. and Gershwin ME., Chocolate at heart: The anti-inflammatory impact of cocoa flavanols. *Mol. Nutr. Food Res.* 52, 1340 – 1348 (2008).

Cooper KA., Donovan JL., Waterhouse AL. and Williamson G., Cocoa and health: a decade of research. *British Journal of Nutrition*. 99, 1–11 (2008).

Min SY., Yang H., Seo SG., Shin SH., Chung M-Y., Kim J., Lee SJ., Lee HJ. and Lee KW., Cocoa polyphenols suppress adipogenesis in vitro and obesity in vivo by targeting insulin receptor. *International Journal of Obesity*. 1–9 (2012).

ATTIVITÀ RELATIVE AL PRIMO ANNO DI DOTTORATO

CORSI FREQUENTATI

Journal club in lingua inglese dal 10 dicembre al 4 febbraio 2011.

Corso di Radioprotezione svolto dal Dr. Marco Brambilla il 13 aprile 2011.

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 Petrucelli
“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 Hepcidin 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 Tè” svolto nei giorni 13-16 settembre
2011, Novara

ATTIVITÀ RELATIVE AL SECONDO ANNO DI DOTTORATO

CORSI FREQUENTATI

Corso di lingua inglese, 16 lezioni tenute dal Dott. Marcello Arsura

Corso di Citofluorimetria “BD FACSCalibur, BD Cell Quest Software”, presso BD Biosciences (Buccinasco –MI) dal 4 al 5 Aprile e 3 Maggio 2012

Corso Prof. Ellis “Genetics and Molecular Medicine”, dal 21 Maggio al 1 Giugno 2012

SEMINARI

7 Novembre 2011 Prof. Mauro Peretti

“The resolution of inflammation: players and targets”

10 Ottobre 2011 Prof. Joseph A. Bellanti

“New trends in allergy and immunology”

19 Dicembre 2011 Prof. Mauro Peretti

“Alpha-MSH and the melanocortin system in inflammation”

20 Dicembre 2011 Prof. Mauro Peretti

“Galectins-carbohydrate binding protein: sweet or sour?”

9 Gennaio 2012 Dott. Marta Cerruti

“Bio -synthetic interfaces: from explosives to bone”

25 Gennaio 2012 Dott. Paolo Fortina

“Next-generation DNA sequencing and target arrays in the clinics”

24 Febbraio 2012 Prof. Lötvall J.

“Exosomes Shuttle RNA”

8 Marzo 2012 Dott.ssa Elena Rainero

“Signalling pathways controlling integrin trafficking during invasion”

23 Marzo 2012 Prof. Isabel Merida

“Role of Diacylglycerol kinases in the control of T cell activation and differentiation programs”

28 Marzo 2012 Prof Costantino Pitzalis

“Developing strategies for tissue specific targeting”

15 Maggio 2012 Prof. Mauro Peretti

“Microparticles as novel effectors in Inflammation”

- 16 Maggio 2012 Prof. Mauro Peretti
“Resolvins and Omega-3 in Inflammation”
- 23 Maggio 2012 Prof Andrea Danani
“Numerical simulations as virtual microscope at the nanoscale: some examples with dendritic molecules”
- 15 giugno 2012 Prof. Pino Macino
“High-throughput Biochemical Target Investigation Unveils a Novel Function of miR-21 as a Negative Modulator of Signal Transduction in T-lymphocytes”
- 21 Giugno 2012 Prof. Luigi Naldini
“Recent Advances in Hematopoietic Stem Cell Gene Therapy: from microRNA Regulation to Targeted Gene Transfer”
- 10 Luglio 2012 Dott. Kim De Keersmaecker
“Next generation sequencing in T-ALL”
- 13 Luglio 2012 Dott. Sjaak Philipsen
“Molecular control of human fetal globin expression: towards a potential cure for b -thalassemia and sickle cell anemia”
- 19 Luglio 2012 Prof. Philip Beart
“Brain, brain quite contrary how do you neurones die? programmed cell death”
- 20 Luglio 2012 Prof. Philip Beart
“Oxidative stress and recruitment of autophagy to brain cell death”

CONGRESSI

- “Congresso Nazionale ENGIOF”, svolto nei giorni 11-12 Novembre 2011, Modena
Poster : “A nutrigenomic approach to evaluate the inflammatory molecular profile of pediatric obesity: functional impact of cocoa”
- “1st American Society for Nutrition Middle East Congress”, svolto nei giorni 15-17 Febbraio 2012, Istanbul, Turchia
Presentazione orale: “Proteomic approach to evaluate inflammation in obesity: role of cocoa”
- “VI Forum Internazionale di Nutrizione Pratica”, svolto nei giorni 14-15 Marzo 2012, Milano

Poster: “Approccio proteomico per la valutazione del quadro infiammatorio nell’obesità: ruolo preventivo del cacao”

Congresso “Inflammation And Atherosclerosis”, svolto nei giorni 20-21 Settembre 2012, Monaco, Germania

Poster: “Proteomic approach to evaluate the role of cocoa consumption in the inflammatory pathway”