passaggio extracellulare di mannitolo (per misurare la permeabilità del monostrato cellulare che diminuisce durante il differenziamento) e l'attività dell'enzima fosfatasi alcalina (un marcatore di differenziamento epiteliale). I risultati hanno dimostrato che la leptina non modifica il differenziamento delle cellule Caco-2 rispetto a cellule di controllo non trattate con questo ormone.
2) In presenza di 200nM leptina negli ultimi 3 giorni di coltura prima dell'esperimento al giorno 18 dalla semina.(trattamento acuto).
Esperimenti di captazione apicale e di trasporto basolaterale del ferro (utilizzando il radioisotopo ^{55}Fe) non hanno evidenziato differenze significative tra le cellule Caco-2 dopo trattamento acuto e cronico con leptina e cellule di controllo, escludendo quindo una azione diretta di questo ormone nell'aumento del trasporto intestinale di ferro che si verifica in gravidanza.

Parole chiave
Ferro, Caco-2, estrogeno, progesterone, gravidanza, differenziamento

Partecipanti alla ricerca	**Mesi persona**	**Qualifica**
M.L.Scarino	11	RIC
Y. Sambuy	3	P.RIC
S. Ferruzza	6	TEC-C

Collaborazioni esterne

Rowett Research Institute, Aberdeen, Scotland,GRAN BRETAGNA	H.J. McArdle	ORD
Institute for Food Research, Norwich, GRAN BRETAGNA	S. Fairweather-Tait	ORD
Dip. Scienze Farmaceutiche, Univ. di Salerno Salerno, ITALIA	A. Leone	ORD
Université Catholique de Louvain, Louvain-la-Neuve, BELGIO	R.R.Chrichton	ORD
GSF Institut fuer Toxikologie, Neuherberg, GERMANIA	K.Summer	D.RIC
NUTRIM, Università di Maastricht Maastricht, OLANDA.	W. Saris	ORD
University of Ulster Coleraine, Irlanda del Nord, GRAN BRETAGNA	Sean Strain	ORD
PRIMM s.r.l. Dipartimento di Biochimica, Milano ITALIA	Paolo Sarmientos	DIR

1.1.6 - Ruolo dei trasportatori di zinco ZnT2, ZnT4 e ZnT6 nell'omeostasi delle riserve intracellulari di zinco

C. Murgia

Obiettivi

1. Definire il ruolo dei trasportatori vescicolari nella compartimentalizzazione e distribuzione dello zinco intracellulare.
2. Caratterizzazione funzionale dei trasportatori vescicolari ZnT2, T4 e T6 e loro eventuale cooperazione nel metabolismo intracellulare dello zinco.

Descrizione dell'attività

Lo zinco è un micronutriente essenziale necessario sia per l'attività di numerosi enzimi che come elemento strutturale di metalloproteine. Sia la carenza che l'eccesso di questo elemento all'interno delle cellule possono portare a tossicità, e per questo motivo l'omeostasi dello zinco intracellulare è finemente regolata sia a livello di ingresso che di efflusso e di compartimentalizzazione intracellulare. Negli ultimi anni sono stati identificati e isolati numerosi geni che codificano per proteine coinvolte nel mantenimento dell'omeostasi intracellulare dello zinco, ma i meccanismi di azione di tali proteine e le loro possibili interazioni non sono ancora stati chiariti a livello molecolare. Il nostro gruppo presso l'INRAN è stato attivamente coinvolto negli scorsi anni nella caratterizzazione molecolare del trasportatore vescicolare di zinco denominato ZnT4, e l'attività di ricerca presente e futura si sta estendendo verso studi che comprendano la caratterizzazione molecolare delle altre proteine che fanno parte della famiglia dei trasportatori vescicolari di zinco in cellule di mammifero. Le attività di ricerca proposte per l'anno 2003, nell'ambito di questo obiettivo a lunga scadenza, sono state la presente e quella proposta da G. Perozzi (1.1.10) e prevedono uno sviluppo triennale comune e integrato. Le conoscenze di base sul metabolismo degli elementi traccia sono inoltre essenziali per definire programmi di supplementazione di oligoelementi per gruppi di popolazione maggiormente esposti al rischio di sviluppare carenze nutrizionali (accrescimento, gravidanza, invecchiamento).
L'attività svolta nel corso dell'anno 2003 ha comportato l'isolamento di due nuovi cloni di cDNA di topo, codificanti per I trasportatori di zinco ZnT2 e ZnT8. Per quanto riguarda ZnT2 è stato ottenuto un anticorpo policlonale dal Prof. Robert Cousins della University of Florida. Utilizzando questo anticorpo in esperimenti di immunofluorescenza, insieme all'anticorpo anti-ZnT4 ottenuto nel nostro laboratorio, abbiamo potuto dimostrare che I due trasportatori risiedono in vescicole distinte all'interno della cellula. Ciò porta ad ipotizzare che agiscano o in fasi diverse durante la formazione delle vescicole intracellulari contenenti lo zinco in eccesso, oppure che esistano compartimenti vescicolari distinti per l'efflusso di questo ione.
Il cDNA corrispondente al gene ZnT8 è stato isolato a partire da una popolazione di RNA di pancreas di topo. La sequenza è stata analizzata, il gene codifica per una nuova proteina che presenta una sostanziale omologia di struttura primaria e secondaria con ZnT4 e ZnT2. L'espressione del clone ZnT8 in una linea cellulare a consentito di confermare per via sperimentale che la proteina codificata ha le dimensioni previste dall'analisi teorica della sequenza. Una porzione di cDNA che codifica per il frammento n-terminale di ZnT8 è stato espresso in un ceppo batterico, per ottenerne quantità consistenti (1-5mg), il frammento di proteina sarà iniettato nei conigli seguendo protocolli di immunizzazione messi a punto in precedenza. I sieri ottenuti dai conigli immunizzati saranno purificati per ottenere un arricchimento degli anticorpi specifici e saggiati in esperimenti di immunoblotting, immunoistochimica e immunoprecipitazione.
I reagenti sviluppati per lo studiare la funzione delle proteine ZnT (anticorpi, cDNA, primers) sono stati utilizzati in un progetto in collaborazione con Peter Zalewski dell'Adelaide University in Australia per studiare il ruolo dello zinco e dei suoi trasportatori nella funzione dell'epitelio

delle vie aeree. I risultati suggeriscono una relazione tra carenza nutrizionale di zinco, ridistribuzione delle riserve intracellulari di zinco e suscettibilità all'asma.

Parole chiave: Zinco, trasportatori, cellule epiteliali

Partecipanti alla ricerca	**Mesi/uomo**	**Qualifica**
C. Murgia	6	RIC
G. Perozzi	2	P-RIC
G. Ranaldi	2	RIC-C
C. Devirgiliis	3	BOR

Collaborazioni esterne

Istituzione	*Nomi*	*Qualifica*
University of Adelaide, Australia	Peter Zalewski	ORD

1.1.7 - Ruolo degli zincosomi e delle proteine ad essi associate nel mantenimento dell'omeostasi dello zinco intracellulare

G. Perozzi

Obiettivi

- Caratterizzare dal punto di vista strutturale e funzionale i compartimenti subcellulari in cui viene accumulato lo zinco in eccesso (zincosomi).
- Definire il ruolo dei trasportatori vescicolari nella compartimentalizzazione e distribuzione dello zinco intracellulare.

Descrizione dell'attività

Lo zinco è un micronutriente essenziale necessario sia per l'attività di numerosi enzimi che come elemento strutturale di metalloproteine. Sia la carenza che l'eccesso di questo elemento all'interno delle cellule possono portare a tossicità, e per questo motivo l'omeostasi dello zinco intracellulare è finemente regolata sia a livello di ingresso che di efflusso e di compartimentalizzazione . Negli ultimi anni sono stati identificati e isolati numerosi geni che codificano per proteine coinvolte nel mantenimento dell'omeostasi intracellulare dello zinco, ma i meccanismi di azione di tali proteine e le loro possibili interazioni non sono ancora stati chiariti a livello molecolare. Il nostro gruppo presso l'INRAN è stato attivamente coinvolto negli scorsi anni nella caratterizzazione molecolare del trasportatore vescicolare di zinco denominato ZnT4, e l'attività di ricerca presente e futura si sta estendendo verso studi che comprendano la caratterizzazione molecolare delle altre proteine che fanno parte della famiglia dei trasportatori vescicolari di zinco in cellule di mammifero e del possible coinvolgimento di alcune di esse nelle formazione del compartimento vescicolare in cui viene immagazzinato l'eccesso di zinco citoplasmatico (zincosomi). Le attività di ricerca proposte per l'anno 2003, nell'ambito di questo obiettivo a lunga scadenza, sono state la presente e quella proposta da C. Murgia (1.1.9) e prevedono uno sviluppo triennale comune e integrato.

Gli esperimenti sono stati condotti su una linea di cellule CHO (Chinese Hamster Ovary, derivate da epitelio ovarico di cavia) che eran state modificate stabilmente nel laboratorio del Prof. Arturo Leone presso l'Università di Salerno in modo da sovraesprimere una delle GTPasi Rab5 o Rab7. Queste due proteine sono coinvolte nel traffico intracellulare di vescicole verso la membrana plasmatica (Rab5) o verso i lisosomi (Rab7), e identificano due vie distinte mediante le quali le vescicole intracellulari possono riversare il loro contenuto nell'ambiente extracellulare. Gli esperimenti sono stati condotti sia in terreno di coltura normale che in seguito all'aggiunta di concentrazioni crescenti, ma fisiologiche e sub-tossiche, di zinco. I risultati hanno mostrato che, nelle cellule cresciute in presenza di 100 μM zinco, le vescicole citoplasmatiche contenenti ZnT4 si spostano dalla regione dell'apparato del Golgi a una regione più periferica, sottostante la membrana plasmatica. Non vi è sovrapposizione con i marker lisosomiali (Rab7 e Lamp1), mentre si evidenzia una parziale sovrapposizione con Rab5. Se analizzati insieme ai risultati precedentemente ottenuti, questi dati indicano che l'estrusione dell'eccesso di zinco dall'ambiente intracellulare non segue il percorso dei lisosomi, ma è una via diretta, probabilmente mediata dal complesso AP1 che funge da guida per il trasporto di vescicole alla membrana plasmatica.

Parole chiave

Micronutrienti, zinco, zincosomi, Zinquina,

Partecipanti alla ricerca	**Mesi/uomo**	**Qualifica**
Giuditta Perozzi	6	P-RIC

Chiara Murgia	2	RIC
Giulia Ranaldi	2	RIC-C
Chiara Devirgiliis	6	CO

Collaborazioni esterne

Istituzione	*Nomi*	*Qualifica*
Università di Salerno	Arturo Leone	ORD
University of Adelaide, Australia	Peter Zalewski	ORD

PAGINA BIANCA

1.2 STUDI DI BIODISPONIBILITÀ DI NUTRIENTI

PAGINA BIANCA

1.2.1 Folati : dall'alimento alla funzionalità e al miglioramento della salute

E. Carnovale, S. Ruggeri

Obiettivi
Migliorare l'utilizzazione biologica dei folati attraverso lo studio della composizione degli alimenti, l'ottimizzazione dei trattamenti, la valutazione della biodisponibilità con metodologie *in vitro* ed *in vivo*.

Descrizione dell'attività
Nell'ambito della valutazione di diverse strategie di arricchimento in folati della dieta è proseguita l'attività in diverse direzioni:
- attività sperimentale relativa alla determinazione di vitamina B6 e B12 nel plasma dei volontari partecipanti allo studio, attività svolta in collaborazione con l'Università Cattolica;
- determinazione di folati in alcuni alimenti chiave;
- elaborazione dei questionari distribuiti ai volontari per calcolare l'apporto in folati,
- elaborazione statistica di tutti i dati.

Da tutti i dati finora elaborati emerge sempre la maggiore validità dell'arricchimento in folati con gli alimenti rispetto all'arricchimento con gli isolati.

Parole chiave
Folati, omocisteina, folati eritrocitari, biodisponibilità

Partecipanti alla ricerca	**Mesi/persona**	**Qualific**
E. Carnovale	3	D.RIC
S. Ruggeri	9	RIC-C
L. Marletta	1	RIC
A. Turrini	1	P.TEC
A. Aguzzi	3	CTER
M. Cappelloni	1	CTER
P. Salvatore	1	AR
E. Camilli	1	CTER-C
L. Mistura	5	CO

Collaborazioni esterne

Istituzioni	*Nomi*	*Qualifica*
Università Cattolica del Sacro Cuore., Roma - Italia	P. Mastroiacovo	DIR
	B. Zappacosta	RICR
	R. Ricci	ASS
Un. Federico II	G. Andria	ORD
Institute of Food Research Norwich - U.K	P.M. Finglas	DIR

Industrie alimentari (Plasmon e Conserve Italia)
Italia

1.2.2 - Antocianine del vino: assorbimento e farmacocinetica nell'uomo.

R. Bugianesi, G. Maiani

Obiettivi

Al fine di apportare un contributo concreto alla comprensione dell'eventuale ruolo svolto dalle antocianine del vino nella salute umana, l'obiettivo di questa ricerca consiste nella valutazione del loro assorbimento nell'uomo in seguito all'assunzione di vino rosso.

Descrizione dell'attività

Sostenendo l'ipotesi per cui le antocianine potrebbero essere tra i principi attivi responsabili dell'effetto protettivo esplicato dal vino rosso, l'obiettivo di tale studio è stato quello di stabilire:

- il grado di biodisponibilità delle antocianine del vino rosso nell'uomo;
- il loro metabolismo ad opera degli enzimi di fase II nell'uomo (glucoronazioni e solfatazioni);
- la relazione temporale tra l'aumento di capacità antiossidante plasmatica ed il picco di concentrazione plasmatica delle antocianine del vino rosso nell'uomo;
- la presenza di forme ossidate circolanti delle antocianine derivate dall'interazione tra tali molecole ed i radicali alchil-perossilici.

Si è provveduto alla messa a punto ed alla validazione di metodologie analitiche cromatografiche ed estrattive idonee alla ricerca in plasma ed urine di alcune delle antocianine presenti nel vino rosso, e dei rispettivi agliconi, metaboliti e forme ossidate, ed allo svolgimento di uno studio *in vivo* nell'uomo (10 soggetti sottoposti a 2 giorni di dieta condizionata priva di alimenti ricchi in antocianine) consistente in una somministrazione in acuto di 500 ml di vino rosso dealcolato seguita da prelievi ematici (prima e dopo 20, 40, 60, 120, 240, 360 min dalla somministrazione) ed urinari (prima della somministrazione, tra 0-3 h, 3-6 h, 6-9 h e 24 h dopo la somministrazione). La misurazione della capacità antiossidante plasmatica è stata effettuata applicando le metodologie TRAP e FRAP normalmente in uso nel nostro laboratorio. La sintesi dei prodotti ossidativi è stata effettuata seguendo il metodo descritto da Tsuda et *al.*(2001).

Delle cinque antocianine ricercate in plasma ed urine solo quella presente in maggiore quantità nel vino rosso (237 mg/l), la malvidina-3-O-glucoside (Ma-glu), è stata identificata. La concentrazione plasmatica raggiungeva il valore massimo, significativamente diverso dal valore basale (Wilcoxon test, $p<0.05$), dopo 60 min dalla somministrazione (0.07 ± 0.007 μM) per tornare al valore basale dopo 360 min dall'ingestione. Il 31% di Ma-glu circolante era in forma coniugata (glucuronata e/o solfatata). L'aglicone di Ma-glu, la malvidina (Ma), non è stato identificato in nessuno dei campioni analizzati. Ma-glu era escreta solo in seguito a coniugazione. La frazione maggiore di escrezione era tra 0-3 h (11.4 ± 4.5 μg), mentre la frazione totale escreta era di 25.3 ± 7.3 μg. A 24 ore non si osservava più la presenza di Ma-glu nelle urine. Non si identificava la presenza di Ma i nessuno dei campioni urinari.

La capacità antiossidante plasmatica aumentava significativamente (Wilcoxon test, $p<0.05$) rispetto ai valori basali a 60 min, in corrispondenza del picco di assorbimento di Ma-glu.

I prodotti di ossidazione di Ma-glu ottenuti *in vitro* (l'acido 3,5-dimetossi- 4- idrossi benzoico ed il 4,6 diidrossi-2-O-glucosil-3-ossi-2,3-diidrobenzofurano) non sono stati identificati in nessuno dei campioni plasmatici.

Dallo studio effettuato si evince che, approssimativamente, solo lo 0.09% della dose di Ma-glu ingerita con il vino (118,5 mg) raggiunge la circolazione sistemica. Malgrado le basse concentrazioni circolanti, l'andamento della capacità antiossidante plasmatica nel tempo è lo stesso osservato per i livelli plasmatici di Ma-glu. Seppure nel vino rosso le antocianine non siano le uniche molecole aventi capacità antiossidante, è noto che la frazione di antocianine estratta dal vino rosso esplica *in vitro* la maggiore capacità antiossidante rispetto alle frazioni di procianidine e catechine, e di acidi fenolici. Tale evidenza sostiene la possibilità che

l'incremento di capacità antiossidante osservato in questo studio sia dovuto proprio all'assorbimento della Ma-glu.
Il fatto che non sia stata identificata Ma né nel plasma né nelle urine sostiene l'ipotesi per cui le antocianine sarebbero assorbite mediante un trasporto attivo al livello della mucosa gastrica dovuto alla presenza di un trasportatore anionico di membrana, la bilitranslocasi.

Parole chiave
vino rosso, antocianine, biodisponibilità , farmacocinetica

Partecipanti alla ricerca	**Mesi/persona**	**Qualifica**
G. Maiani	1	P RIC
R. Bugianesi	4	AR
G. Catasta	2	CTER

Collaborazioni esterne		
ISMAA, Trieste	F. Mattivi	P. RIC

PAGINA BIANCA

1.3 ANTIOSSIDANTI E STRESS OSSIDATIVO

PAGINA BIANCA

1.3.1 - Ruolo delle aldeidi insature prodotte durante la perossidazione lipidica e degli acidi grassi poliinsaturi nella modulazione del danno vascolare e cerebrale ed effetto di antiossidanti di interesse nutrizionale.

M. Nardini

Obiettivi

- Identificazione e caratterizzazione dei meccanismi di citotossicità di acidi grassi poliinsaturi su cellula tumorali, con particolare riferimento a linee cellulari di glioma.
- Identificazione e caratterizzazione dei meccanismi di citotossicità di aldeidi insature (apoptosi, necrosi) e modulazione del danno da parte di antiossidanti di interesse nutrizionale.

Descrizione dell' attività

La perossidazione lipidica è implicata nella patogenesi di numerose malattie, come l'aterosclerosi, il diabete, il cancro, l'artrite reumatoide e l'invecchiamento. Le aldeidi, prodotte per decomposizione degli idroperossidi formati durante la perossidazione lipidica sono coinvolte in molti degli effetti patofisiologici associati con lo stress ossidativo nelle cellule e nei tessuti. In particolare, le aldeidi insature, quali l'acroleina e il 4-idrossi-nonenale, sono composti altamente reattivi in grado di modificare proteine, acidi nucleici, fosfolipidi, e di indurre una rapida deplezione del glutatione intracellulare. Addotti proteina-aldeidi sono stati identificati in soggetti affetti da malattie croniche almeno in parte correlate con lo stress ossidativo (nefropatia diabetica, morbo di Alzheimer, aterosclerosi). E' stato quindi studiato l'effetto dell'acroleina su cellule monocitiche e su cellule endoteliali umane. L'acroleina (30 min di trattamento) induce notevoli effetti citotossici su cellule monocitiche umane (U937) anche quando presente a concentrazioni estremamente basse (2.5 μM), come mostrato dal rilascio di lattico deidrogenasi nel mezzo di coltura, misurato a vari tempi di incubazione dopo il trattamento con acroleina. In cellule endoteliali primarie (HUVEC) l'acroleina ha pure mostrato effetti citotossici a concentrazioni superiori a 5 μM. Saranno indagati i meccanismi coinvolti nell'effetto citotossico dell'acroleina e l'effetto di antiossidanti di interesse nutrizionale nel modulare il danno prodotto da acroleina.

Molte di queste aldeidi insature sono presenti anche nell'atmosfera come conseguenza dell'inquinamento ambientale, e in particolare nel fumo di sigaretta. Nel corso di questa ricerca è stato studiato l'effetto dell'acroleina sull'attivazione di cellule epiteliali bronchiali umane e sulla produzione di chemochine da parte di queste ultime. Sono state utilizzate per questo studio sia colture primarie (NHBE) che cellule immortalizzate (HBE-1). Il trattamento con acroleina influenza la produzione di IL-8 sia basale che dopo stimolazione con citochine. In particolare l'acroleina provoca una diminuzione dose-dipendente dei livelli di IL-8 mRNA e un calo corrispondente della produzione di IL-8 sia in cellule normali che immortalizzate. L'acroleina agisce inibendo l'attivazione del fattore di trascrizione NF-kB, un evento essenziale nella produzione di IL-8, come dimostrato dall'inibizione della traslocazione nucleare di NF-kB e dalla ridotta degradazione di IkB□I risultati ottenuti mediante analisi immunochimiche suggeriscono una modifica diretta della subunità □della chinasi IKK (un regolatore dell'attivazione di NFkB sensibile allo stato redox intracellulare) da parte dell'acroleina. In conclusione i risultati ottenuti dimostrano che l'acroleina è in grado di sopprimere i processi infiammatori nelle vie aeree per mezzo dell'inibizione dell'attivazione di NF-kB e della produzione di IL-8. Quindi i risultati ottenuti suggeriscono che l'inalazione di acroleina, come componente principale del fumo di sigaretta o altre forme di inquinamento ambientale, può contribuire ad alterare la risposta infiammatoria–immune.

Parole chiave
Acroleina, apoptosi, necrosi, antiossidanti, cellule endoteliali.

Partecipanti alla ricerca	**Mesi/persona**	**Qualifica**
M. Nardini	3	TEC
V. Gentili	2	CTER
M. Di Felice	2	CTER

Collaborazioni esterne		
Istituto Superiore di Sanità	S. Salvati	P.RIC
Istituto Superiore di Sanità	F. Leonardi	BOR