



Consiglio Nazionale delle Ricerche

Istituto di Scienze dell'Alimentazione

via Roma 52 A-C, 83100 Avellino Italy. Tel + 39 0825 299111

Fax + 39 0825 781585 e-mail segreteria@isa.av.cnr.it

Relazione finale sull'attività di ricerca svolta dalla Drssa Filomena Nazzaro

Proponente: Prof Antonio Malorni

Fruitore: Drssa Filomena Nazzaro

Studio della relazione tra danni ossidativi al DNA e consumo di estratti vegetali, mediante metodologie microelettroforetiche

Nell'ambito del programma di SHORT TERM MOBILITY, Filomena Nazzaro, ha svolto la propria attività di ricerca dal 29 giugno al 26 luglio 2006 presso la School of Biomedical Sciences, del Northern Ireland Centre for Food and Health (NICHE), dell'Università dell'Ulster, Coleraine-UK, sotto la supervisione del Prof Ian Rowland, Professore di Nutrizione Umana e Direttore del centro.

L'attività svolta ha riguardato essenzialmente lo studio del danno ossidativo al DNA indotto da alcune sostanze genotossiche su linee cellulari e l'effetto protettivo contro tali danni, ad opera di estratti di origine vegetale. La dr.ssa Nazzaro ha lavorato in collaborazione con il dr Philip Allsopp, il dr Sumanto Haldar ed il sig Gianfranco Bartolini, con i quali ha condotto studi sull'attività anticancro di estratti di agave. A tale scopo, ha applicato la metodologia della microelettroforesi (single cell gel electrophoresis, o COMET). La tecnica consente di valutare le rotture del DNA in cellule eucariote. Le cellule vengono normalmente incluse in agarosio su vetrini e lisate con detergente ed alto sale, così da formare nucleoidi che contengono loops supercoiled di DNA legati alla matrice nucleare. L'elettroforesi condotta ad alto valore di pH determina la formazione di strutture che ricordano le comete, osservabile mediante microscopio a fluorescenza. L'intensità della cometa riflette il numero di rotture del DNA.

Lo studio è stato condotto in particolare sulla linea cellulare leucemico-simile Jurkat.

Le cellule sono state cresciute in Flask Roux con terreno di coltura specifico, in atmosfera al 95% di CO₂.

Istituto di Scienze dell'Alimentazione

via Roma 52 A-C, 83100 Avellino Italy. Tel + 39 0825 299111

Fax + 39 0825 781585 e-mail segreteria@isa.av.cnr.it

L'esperimento è stato effettuato su colture cellulari di 7 gg.

L'estratto vegetale di agave, testato a varie concentrazioni, era stato ottenuto precedentemente dal team nord irlandese.

Tutti gli esperimenti sono stati condotti su una concentrazione cellulare/slide pari a 100.000 cellule.

Come controlli negativi sono stati utilizzati sia PBS sterile sia il terreno di coltura; come controllo positivo è stata usata H₂O₂, preparata al momento dell'uso, ad una concentrazione finale di 75 µM/gel.

Le cellule sono state incubate con PBS o con H₂O₂ o con le varie concentrazioni di estratti per 30' a temperatura ambiente. Dopo centrifugazione, il pellet è stato risospeso in Low Melting Agarose (LMA), e trasferito sui vetrini precedentemente ricoperti con Normal Melting Agarose (NMA). Dopo 1 ora di incubazione a 4° C, i vetrini con i gel sono state posti in buffer di lisi e successivamente sottoposti ad elettroforesi orizzontale, per 20' a 4°C.

Dopo la fase di neutralizzazione, i gel sono stati colorati con bromuro di etidio ed analizzati con microscopio ad epifluorescenza utilizzando il software dedicato KOMET. La stessa tecnica è stata utilizzata anche per analizzare l'eventuale effetto protettivo esercitato dagli estratti di agave sui danni ossidativi indotti dal perossido di idrogeno.

In entrambi i casi, di ogni campione è stata effettuata la prova in triplicato e sono state contate 100 cellule (% cometa del DNA) per gel. L'intensità della cometa è risultata pari a circa il 15-20% nei controlli negativi ed è arrivata sino al 60-70% in presenza di H₂O₂. In presenza degli estratti, la percentuale è risultata minore rispetto ai valori del controllo positivo, indicando sia una non genotossicità degli estratti sia un discreto effetto protettivo indotto da questi sulle cellule in presenza dello standard genotossico.

La Drssa Nazzaro ha potuto acquisire anche altre metodologie utilizzabili per lo studio dell'eventuale effetto antigenotossico indotto sia da estratti vegetali che da probiotici. Utilizzando cellule tumorali del colon CaCo-2 cresciute in monostrato su piastre multiwell, ha acquisito, in particolare, la metodologia della Resistenza Transepiteliale (TER Trans Epithelial Resistance), che permette di misurare, attraverso l'utilizzo di un voltmetro, la resistenza elettrica cellulare, parametro di riferimento per valutare, *in vitro*, la funzionalità



Consiglio Nazionale delle Ricerche

Istituto di Scienze dell'Alimentazione

via Roma 52 A-C, 83100 Avellino Italy. Tel + 39 0825 299111

Fax + 39 0825 781585 e-mail segreteria@isa.av.cnr.it

della barriera intestinale in presenza di sostanze genotossiche od antigenotossiche e di batteri probiotici. Attraverso misure effettuate in presenza di fluoresceina ha potuto anche monitorare la permeabilità di tali cellule nelle condizioni su citate.

Avellino, 5 ottobre 2006

Per presa visione

Il Proponente

Prof Antonio Malorni