

Università degli Studi di Bologna

Dottorato di Ricerca in Farmacologia e Tossicologia

XIX ciclo - Area Disciplinare BIO14

NUOVE STRATEGIE IN GRADO DI PROTEGGERE DAL DANNO INDOTTO DA MICOTOSSINE

TESI DI DOTTORATO

Presentata da:

Dott. STEFANO COSTA

Coordinatore:

Chiar.mo Prof.

GIORGIO CANTELI FORTI

Relatore:

Chiar.ma Prof.ssa

MARIA CLELIA GUERRA

Esame Finale – Anno 2007

INDICE

INTRODUZIONE	3
SCOPO DEL LAVORO	26
MATERIALI E METODI	28
RISULTATI	40
DISCUSSIONE	57
CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI	66
BIBLIOGRAFIA	67

INTRODUZIONE

Le micotossine.

Caratteristiche generali. Le micotossine sono metaboliti fungini secondari prodotte da patogeni vegetali in determinate condizioni di pH, temperatura ed umidità (le condizioni ottimali sono $T = 20^{\circ}\text{C} - 35^{\circ}\text{C}$, $A_w = 0.85 - 0.99$). Esse sono diffuse in tutto il mondo e infestano un grande numero di substrati alimentari come cereali, grano, miglio, arachidi, pistacchi, mandorle, noci e mangimi per animali (Eaton e Gallagher, 1994). Le micotossine possono essere presenti, inoltre, nelle carni e nel latte di animali che si cibano di alimenti contaminati. I funghi responsabili della produzione di micotossine appartengono a molte specie quali *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Claviceps* ed *Alternaria* (Bennett e Keller, 1997). Più di 400 di questi metaboliti fungini, che mostrano grande eterogeneità per quanto riguarda la struttura chimica, risultano essere tossici, in particolar modo possono sviluppare cancerogenicità, neurotossicità e teratogenicità (Moss, 1996; Sweeney e Dobson, 1998).

Fra le più comuni e pericolose tossine sono l'aflatossina B1 (AFB1), l'ocratossina A (OTA), i tricoceni, lo zearaleone e le fumosine. Piccole tracce di queste tossine sono in grado di causare allergie e neurotossicità, mentre l'esposizione cronica può determinare effetti teratogeni, cancerogeni (soprattutto a carico di fegato e rene) o immunosoppressivi, sugli animali ma anche sull'uomo. Il potere immunosoppressivo (Ramos et al., 2001; Atroshi et al., 2000) di questi metaboliti fungini ha come importante implicazione una ridotta capacità di reagire alle malattie, e di conseguenza un forte impatto sulla salute già precaria delle popolazioni tropicali, particolarmente esposte a questo rischio.

Le micotossine possono causare quattro differenti tipi di tossicità: acuta, cronica, mutagena e teratogena. Il più comune effetto descritto di tipo acuto, è l'alterazione della funzionalità epatica e renale, che in casi estremi può condurre alla morte. Molte tossine agiscono alterando la sintesi proteica producendo effetti che vanno dai rush cutanei, alla necrosi e alla totale immunodeficienza. Altre sono invece neurotossiche e possono causare danno cerebrale o morte (Pitt, 2000).

In generale le micotossine mostrano un ampio range di effetti biologici ed ogni tossina ha un suo specifico meccanismo tossico (IARC, 1993). In tabella 1 sono riportate le caratteristiche generali delle più comuni micotossine.

Tabella 1. Caratteristiche delle principali micotossine.

Micotossine	Microrganismo	Tossicità	Alimenti contaminati
Aflatossine: B1, B2, G1, G2, M1, M2	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>parasiticus</i>	Epatocancerogena, teratogena	Arachidi, cereali, noci e mandorle, latte e carni di animali contaminati
Zearalenoni	<i>Fusarium roseum</i> , <i>tricinctum</i> , <i>moniliforme</i>	Iperestrogenismo, ipofertilità	Mais e altri cereali
Ocratossine: A, B	<i>Aspergillus ocraceus</i> , <i>Penicillium iridicatum</i>	Nefriti, epatiti	Orzo, mais ed altri cereali; pane, pasta ed altri prodotti da forno
Tricoteceni - tossina T2 - deossinilvalenolo - nivalenolo	<i>Fusarium rosum</i> , <i>solani</i> , <i>tricintum</i>	Emorragie, leucopenie, disturbi nervosi, vomito e rifiuto del cibo	Mais, orzo ed altri cereali
Rubatrossina: A, B	<i>Penicillium rubum</i> , <i>purpurogenum</i>	Emorragia, degenerazione epatica	Mais ed altri cereali
Citrina	<i>Penicillium</i>	Epatiti, nefriti	Cereali

Come contrastare le micotossine. Esistono due tipi di contaminazione da micotossine: la contaminazione diretta e quella indiretta. La contaminazione diretta avviene direttamente sull'alimento a causa dello sviluppo di muffe e funghi tossicogeni. La contaminazione indiretta riguarda prodotti alimentari derivanti da animali contaminati e interessa per lo più carne, latte e derivati; la presenza delle micotossine in questo caso è dovuta all'ingestione da parte dell'animale di

alimenti contaminati con conseguente assorbimento ed accumulo delle tossine nelle carni e nel latte.

L'esposizione dell'uomo e dell'animale può avvenire tramite ingestione di alimenti contaminati oppure tramite via aerea, in ambienti di lavoro dove siano presenti polveri di granaglie contaminate aero-disperse, o in ambienti domestici in cattive condizioni igieniche.

Esistono tre metodi per combattere i danni procurati dalle micotossine:

a. prevenire la crescita dei microrganismi che producono le tossine; è possibile intervenire prima del raccolto, sulle strategie di coltivazione, alternando adeguatamente le colture, irrigando correttamente, usando appropriati pesticidi e facendo uso della biotecnologia. Durante il raccolto è necessario evitare un danno meccanico alle colture in quanto questo faciliterà l'attecchimento di muffe e funghi, inoltre è opportuno effettuare le raccolte in tempi opportuni: infatti l'eccessiva maturazione dei prodotti può portare alla formazione di muffe e funghi. Le lavorazioni che interessano la fase post raccolto comprendono essiccazione, stoccaggio e vari processi tecnologici. E' importante monitorare le condizioni di temperatura, pH e umidità degli ambienti durante tali processi.

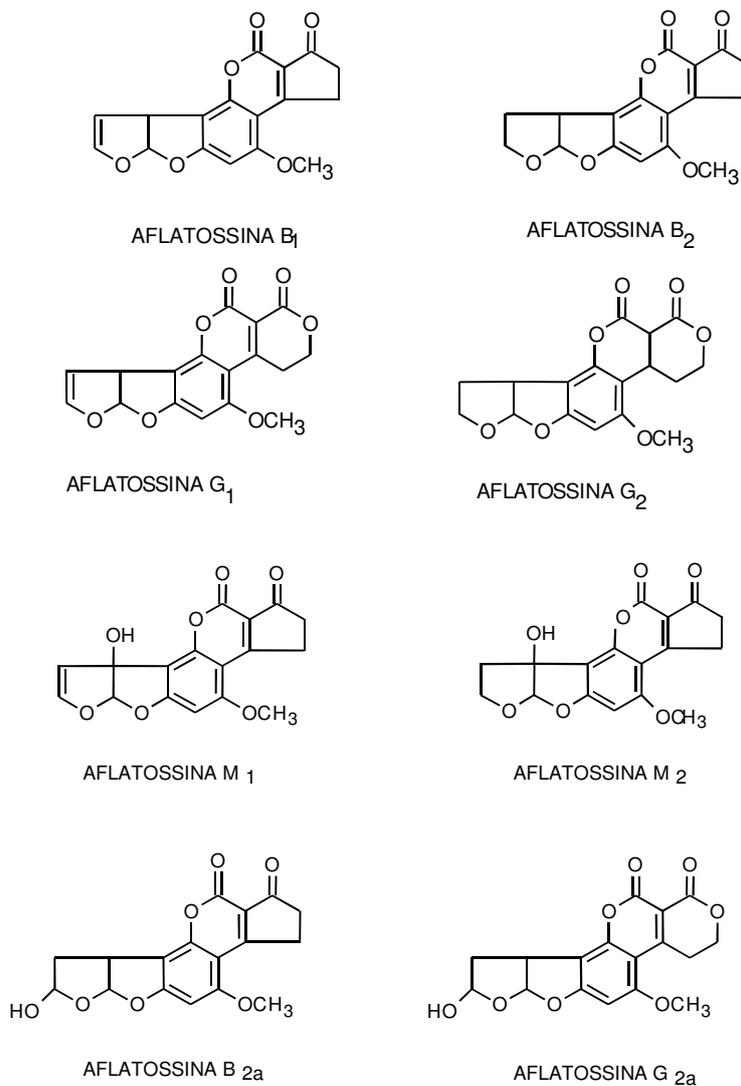
b. decontaminare l'alimento dalle micotossine; per definizione un processo di decontaminazione attuabile deve avere le seguenti caratteristiche: 1. la tossina deve essere trasformata in un prodotto non tossico; 2. le spore fungine devono essere distrutte; 3. gli alimenti devono conservare le proprietà nutritive e la palatabilità; 4. il costo della decontaminazione deve essere inferiore al costo della derrata. I metodi oggi conosciuti non sono attuabili a livello pratico in quanto carenti in uno dei punti elencati. Quali esempi si ricordano il trattamento con alcali, ossidanti o adsorbenti; tali processi incidono molto sulla qualità dell'alimento e non sono molto efficaci. Un altro processo di decontaminazione in via di sviluppo è l'utilizzo di batteri in grado di metabolizzare le micotossine a prodotti non tossici. In questo caso la presenza del batterio che spesso altera le caratteristiche nutritive e organolettiche dell'alimento.

c. utilizzare agenti chemopreventivi che riducano o annullino gli effetti tossici; un metodo che sembra in grado di fornire un certo grado di protezione dalle micotossine è la chemoprotezione. Tale metodo consiste nel fare uso, attraverso la

dieta, di sostanze di origine naturale in grado di prevenire o contrastare i danni indotti dalle micotossine nell'uomo e nell'animale.

Aflatossine. *Aspergillus flavus* produce unicamente aflatossine B1 (AFB1) e B2 (AFB2), mentre *Aspergillus parasiticus* produce G1 (AFG1) e G2 (AFG2). I quattro composti sono distinguibili dal colore della loro fluorescenza sotto illuminazione ultravioletta a onde lunghe, in relazione alla loro mobilità cromatografica relativa; per cui le aflatossine B sono così indicate per la colorazione blu (Blue) mentre quelle G per la colorazione verde (Green).

Figura 1. Principale aflatossine prodotte.



Al gruppo delle aflatossine appartengono inoltre le M1 (contaminanti del latte di mucche che hanno consumato foraggio contaminato) e le M2, forme ossidrilate delle AFB1 e AFB2. Questo sottogruppo di micotossine possiede solo il 10% dell'attività cancerogena esplicita nei ratti dall'AFB1, mentre presenta una tossicità acuta che si avvicina molto a quella della tossina da cui deriva (Hsieh et al., 1984).

AFB1 è un potente agente epatotossico e epatocancerogeno che, insieme all'epatite B, è implicato nell'eziologia del carcinoma epatocellulare (Groopman et al., 1992). La forma attivata è AFB1 8,9-epossido (AFBO) che risulta dal metabolismo del AFB1 da parte del citocromo-P₄₅₀ (Gallagher et al., 1996). L'attivazione metabolica dell'AFB1 da parte della frazione microsomiale epatica, principalmente a carico del CYT-P₄₅₀, produce un miscela di due stereoisomeri (EXO ed ENDO) con una predominanza della forma EXO, che risulta essere molto più reattiva della ENDO nella formazione di addotti con il DNA e quindi con un'attività mutagenica maggiore. Questa molecola si lega ai centri nucleofili delle macromolecole cellulari come l'azoto in posizione 7 (N7) della guanina nella catena del DNA, mediante attacco elettrofilo, in modo da formare un addotto covalente con il DNA (Eaton e Gallagher, 1994). La formazione di questi addotti *in vivo* può dare come effetto la trasformazione o la morte cellulare. L'interferenza con la sintesi di DNA è il primo effetto biochimico osservabile correlato alla presenza dell'AFB1 e indica che l'AFB1 agisce bloccando la fase iniziale della replicazione del DNA piuttosto che il processo di allungamento (Meneghini e Schumacher, 1977).

L'AFB1 sembra avere più affinità per il DNA mitocondriale epatico (Niranjan e Roy, 1982). Le lesioni conseguenti sono persistenti e l'effetto che si verifica è una persistente inibizione della trascrizione e della traduzione mitocondriale accompagnato da una trasformazione neoplastica delle cellule (Hsieh et al., 1987). L'AFB1 possiede una potente azione mutagenica e vi è una forte correlazione fra la capacità dell'AFB1 di essere mutagenica e quella di essere cancerogena (Smith et al., 1985). Inoltre, il complesso N7,guanina-AFB1 si ritrova nella popolazione con una alta incidenza di cancro al fegato (Autrup et al., 1983).

Figura 2. AFB1, 8,9 epossido (AFBO).

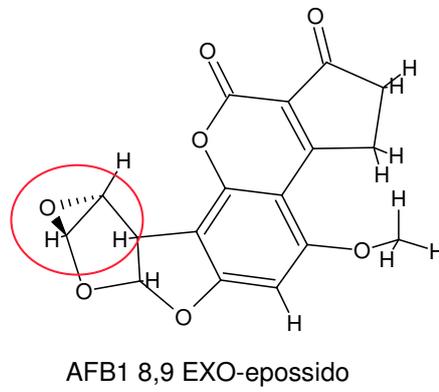
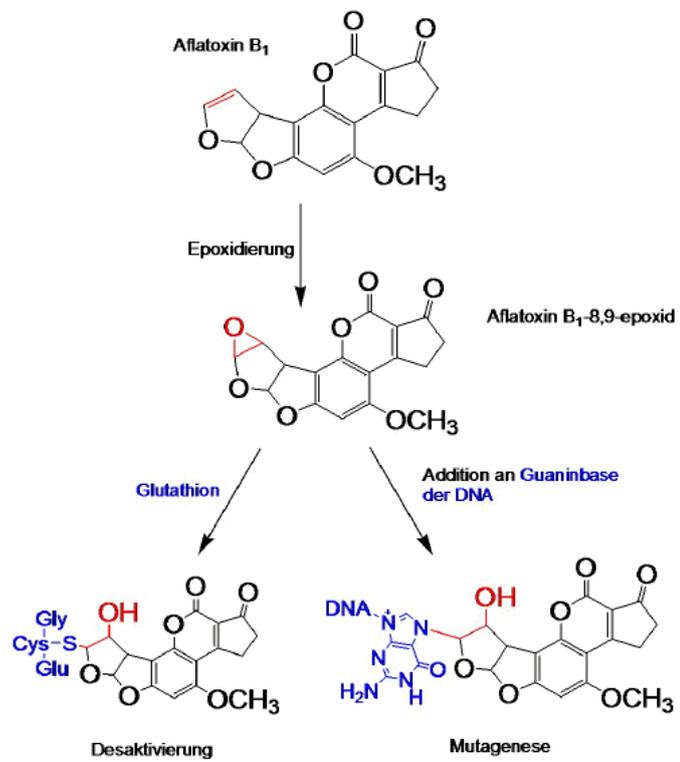


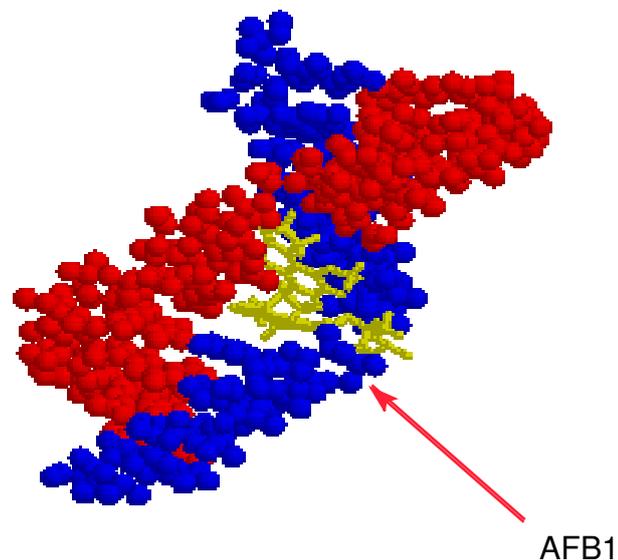
Figure 3. Meccanismo tossicologico di AFB1.



Si attribuisce al metabolita attivo dell'AFBO anche un'azione teratogena (Hayes et al., 1992), infatti, oltre al potere mutageno esplicato da tale molecola, la potente inibizione della sintesi di proteine che induce può essere ritenuta la causa di danni allo sviluppo del bambino e alla differenziazione del feto.

E' stato anche dimostrato che AFB1 può indurre la formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), la perossidazione lipidica e l'ossidazione del DNA *in vivo* e *in vitro* (Shen et al., 1996).

Figura 4. Interazione tra AFBO e la catena di DNA: grazie alla planarità della molecola è possibile una sua intercalazione fra le basi del DNA dopo legame con l'azoto 7 della guanina.

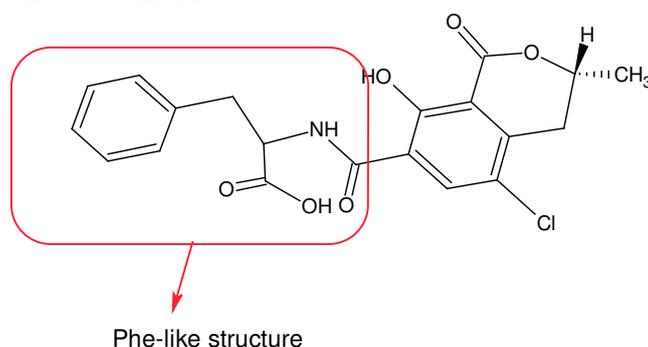


La formazione di radicali liberi indotta da AFB1 probabilmente si verifica durante la fase del metabolismo: dopo il trattamento con la micotossina, l'accumulo di malonilaldeide (MDA), biomarker di perossidazione lipidica, avviene più facilmente in microsomi epatici di ratto rispetto ad altre frazioni sub-nucleari. Questi risultati suggeriscono che il danno ossidativo possa contribuire all'effetto citotossico delle micotossine e che molecole che agiscono da antiossidanti possano prevenire il danno indotto dalla AFB1.

Ocratossina A. L'ocratossina A è prodotta principalmente da *Aspergillus ochraceus* e *Penicillium verrucosum*. OTA è una micotossina diffusa in tutto il mondo e si può ritrovare in numerosi alimenti, dal grano ai chicchi di caffè, ai semi di oleaginose, vino, birra, cereali e in seguito a contaminazione del mangime animale anche nelle carni e nel latte (Palli et al., 1999).

L'esposizione dell'uomo a OTA avviene principalmente attraverso il consumo di grano o prodotti derivanti dal maiale quali insaccati. La tossina causa effetti nefrotossica nei mammiferi (IARC, 1993), immunosoppressiva e teratogena (Malaveille et al, 1991).

Figura 5. Struttura dell'ocratossina A.



Nell'uomo, l'esposizione a OTA è stata collegata all'insorgenza della nefropatia endemica balcanica (BEN) (Sostarci e Vukelic, 1991; IARC, 1993) e associata ad un aumento di incidenza di tumori del tratto urinario (Castegnaro et al., 1990; Vukelic et al., 1992). L'OTA nel ratto e nel topo induce una nefropatia tubulo-interstiziale, adenoma e carcinoma renale, mentre solo nel topo sembra determinare anche la formazione di epatocarcinoma (Bendele et al., 1985; Creppy et al., 1985; IARC, 1993). La tossina danneggia numerosi siti del nefrone: un'esposizione acuta comporta soprattutto danno alla zona post prossimale, mentre l'esposizione cronica determina insorgenza di danni al tubulo prossimale (Gekle et al., 1996).

In base a risultati ottenuti con studi di cancerogenesi, lo IARC ha classificato OTA come un possibile agente in grado di sviluppare tumore nell'uomo (IARC, 1993).

Sono note tutte le fasi della tossicocinetica nell'uomo. Dopo l'assorbimento nel tratto gastrointestinale, OTA si lega alle proteine del siero (99%). Studer e Rohr, nel 1995, hanno determinato l'emivita dell'OTA nell'uomo che è risultata pari a 840 ore dopo ingestione orale, mentre dopo somministrazione per via endovenosa, l'emivita risulta inferiore. La cinetica dell'OTA varia a seconda della dose e della specie animale: si distribuisce nel rene, fegato e muscolo e anche nel tessuto lipidico. La concentrazione plasmatica fetale dell'OTA è doppia rispetto alla quella del siero materno: questo è indice di un importante passaggio attraverso la placenta (Ringot et al., 2006). Una percentuale della tossina subisce un primo metabolismo epatico e viene eliminata con la bile prima di raggiungere il circolo ematico, grazie ad un processo mediato da un trasportatore polipeptidico situato nella membrana cellulare delle cellule epatiche. L'eliminazione di OTA avviene principalmente tramite i tubuli prossimali attraverso un processo mediato dal trasportatore di xenobiotici acidi (Groves et al., 1998; Sokol et al., 1998). OTA può essere riassorbita a livello di tutti i segmenti del nefrone: questo processo ne determina l'accumulo nel tubulo renale (Schwerdt et al., 1996) aumentandone la tossicità. L'eliminazione della tossina avviene anche con le feci e con il latte (Ringot et al., 2006).

L'ocratossina A è costituita da una molecola diidrosocumarinica cloridrata legata ad una fenilalanina. Questa sua analogia con l'aminoacido porta all'inibizione della sintesi proteica dovuta alla competizione con fenilalanina, durante la reazione di aminoacilazione di fenilalanina-tRNA (Dirheimer and Creppy, 1991; Fink-Gremmels et al., 1995). L'inibizione della sintesi proteica sembra responsabile di numerosi effetti tossici dell'OTA, ma da sola non potrebbe spiegare i diversi effetti tossici organo specifici. Non è chiaro se essa agisca come cancerogeno genotossico o se l'azione cancerogena sia dovuta ad un meccanismo indiretto, quale induzione di citotossicità, danni ossidativi e aumento della proliferazione cellulare. Numerosi studi propongono il coinvolgimento di stress ossidativi nella tossicità dell'ocratossina (Belmadani et al., 1999; Omar et al., 1990; Rahimtula et al., 1998; Costa et al., 2007). *In vitro*, un aumento OTA-dipendente dell'ossidazione del DNA (produzione di 8-OH-guanina) è correlato a una produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Shaaf et al., 2002; Kamp

et al., 2005, Costa et al., 2007). Sono stati identificati e proposti importanti meccanismi di ossidoriduzione. Inizialmente, Rahitmula e collaboratori hanno dimostrato che OTA è in grado di indurre perossidazione lipidica in frazioni subcellulari: la formazione di specie reattive all'ossigeno potrebbe essere mediata dalla formazione di un complesso Fe^{3+} -OTA, che ne facilita la riduzione in ioni Fe^{2+} in presenza del sistema NADPH-citocromo P450 reduttasi. Il complesso risultante OTA- Fe^{2+} può generare la specie reattiva HO^\bullet che a sua volta è in grado di dare origine a reazioni radicaliche a catena come la perossidazione lipidica. Ulteriori evidenze, fornite da Belmadani e collaboratori suggeriscono che OTA sia un potente pro-ossidante, in grado di indurre perossidazione lipidica in culture primarie di neuroni. Inoltre, la formazione di ROS risulta significativamente aumentata dopo esposizione di cellule fetali di telencefalo di ratto, ad alte concentrazioni di OTA (Monnet-Tschudi et al., 1997). È stato dimostrato anche che l'aumento della perossidazione lipidica causata dall'OTA, modifica la permeabilità delle membrane plasmatiche al Ca^{2+} , danneggiando l'omeostasi. OTA è inoltre capace di inibire la respirazione cellulare in mitocondri isolati di rene di ratto (Ringot et al., 2006). Negli ultimi anni il dibattito riguardo al coinvolgimento dell'OTA nella formazione di addotti con DNA è controverso: sono stati isolati diversi addotti, ma il meccanismo di azione dell'OTA nei confronti del DNA non è stato ancora chiarito (Ringot et al., 2006).

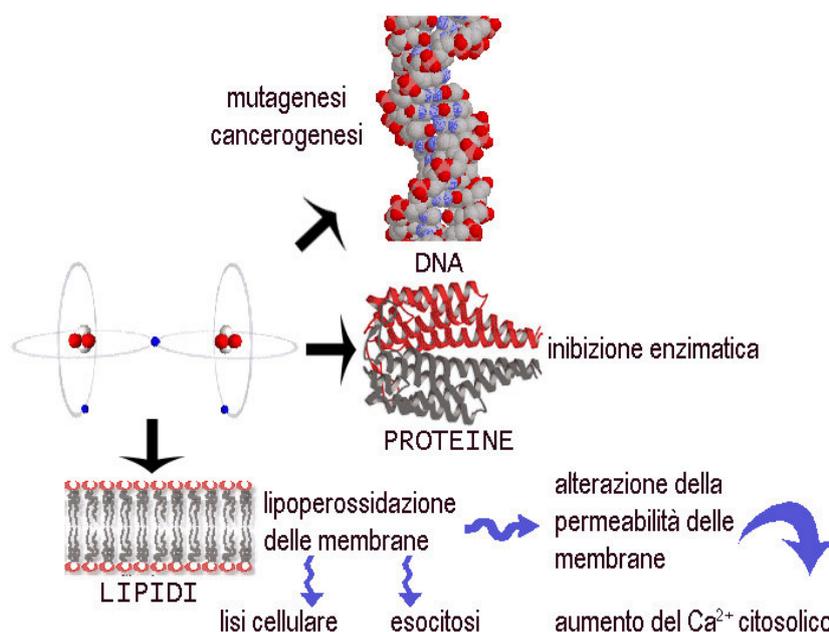
L'organo bersaglio di OTA è comunque il rene. Il rene è un organo dove si verificano importanti processi ossidativi dell'organismo e i ROS giocano un ruolo di primo piano nella patogenesi di molte malattie renali (Shiraishi et al., 2000). Un aumento di malonaldeide, marker dei processi lipo-perossidativi, è stato osservato *in vitro* in seguito ad incubazione di OTA con microsomi epatici in presenza di NADPH. La formazione di radicali liberi indotta dall'OTA probabilmente si verifica durante la fase del metabolismo.

Micotossine, stress ossidativo e antiossidanti. Recenti studi hanno individuato nella produzione di radicali liberi e specie reattive dell'ossigeno, uno dei possibili meccanismi di citotossicità di numerose micotossine. Shen e collaboratori (Shen et al., 1994, 1995a, 1995b, 1996) hanno dimostrato che la citotossicità indotta da

AFB1 su epatociti di ratto era prevenuta dall'aggiunta di catalasi al terreno di coltura. Il risultato di questo esperimento indica l'importante ruolo delle specie reattive dell'ossigeno nella citotossicità degli epatocancerogeni e suggerisce la possibile esistenza di metaboliti radicalici.

Tali antiossidanti in grado di interrompere un processo ossidativo, agiscono di solito come scavengers di radicali liberi (FRS) formando una forma stabile dell'antiossidante radicale. Le più comuni specie chimiche che agiscono come scavenger di radicali liberi, contengono gruppi idrossilici (fenoli), sulfidrilici (cisteine e glutazione) e gruppi aminoacidici (acido urico, proteine). I gruppi ossidrilici associati ai fenoli, sono i più comuni e i più efficaci FRS presenti nei cibi.

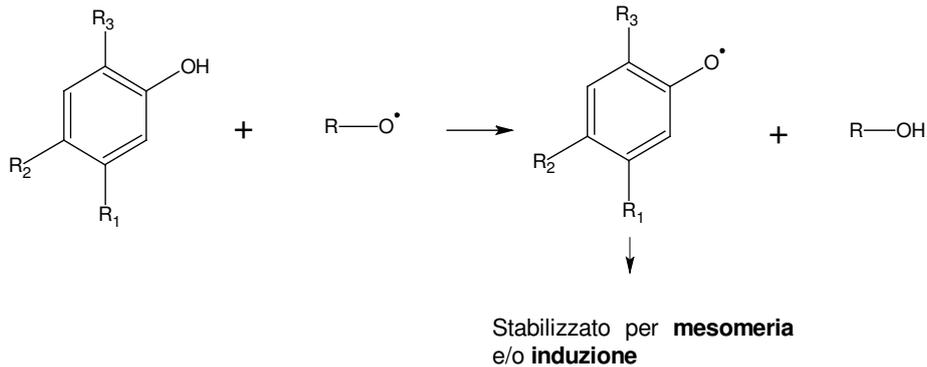
Figura 6. Meccanismo d'azione dei ROS.



Esempi di fenoli che agiscono da antiossidanti sono composti naturali (catechine, tocoferolo, ubiquinone, acido ferulico, acido carnosico) e sintetici (idrossitoluene metilato, idrossianisolo metilato, propilgallato, butilidrossichinone terziario). I

composti a struttura fenolica sono antiossidanti efficaci in quanto sono in grado sia di donare idrogeni che di formare radicali fenolici stabili.

Figura 7. Reazione di un antiossidante fenolico con una specie radicalica.



L'attività antiossidante dei composti fenolici è influenzata dalla natura dei sostituenti nell'anello fenolico, che possono aumentare la loro reattività nei confronti dei radicali lipidici e possono aumentare la stabilità di risultanti radicali fenolici. Nei cibi l'efficienza dei FRS fenolici dipende anche dalla loro volatilità, stabilità al calore e sensibilità al pH che influenzano la loro presenza nei cibi conservati o processati. Dal momento che alcune micotossine (ad esempio AFB1, FB1, OTA, T-2 tossina e deossivalenolo) sono in grado di causare danni alle membrane cellulari determinando un aumento della perossidazione lipidica (Abel e Gelderblom, 1998; Belmadani et al., 1999; Gautier et al., 2001; Rizzo et al., 1994; Yin et al., 1998), l'attività protettiva di sostanze antiossidanti nei confronti delle micotossine è un traguardo auspicabile per contrastare i danni indotti da queste.

Chemoprevenzione con antiossidanti nei confronti delle micotossine.

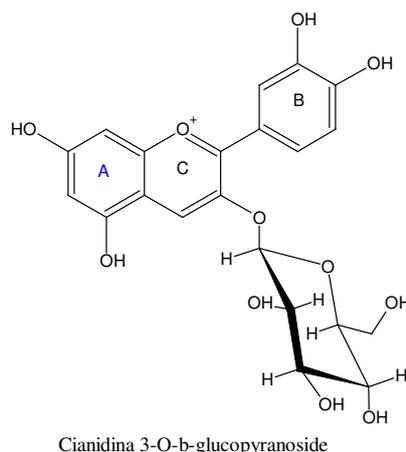
Additivi di mangimi animali, come antiossidanti, aminoacidi contenenti gruppi sulfidrilici, vitamine ed elementi presenti in tracce possono essere utili come detossificanti. In letteratura sono descritti alcuni antiossidanti che, somministrati

prima di cancerogeni possono prevenirne l'attività cancerogenetica. I sistemi biologici da cui sono ottenuti i cibi, contengono numerosi componenti che possono influenzare le ossidazioni lipidiche. Tali sistemi antiossidanti multi componenti, possono inibire differenti tipi di pro-ossidanti (metalli, ROS o enzimi), inattivare radicali liberi o pro-ossidanti in fase acquosa o lipidica e composti in differenti stati di ossidazione (perossil radicali o OH^\bullet) o prodotti di decomposizione derivati da ossidazione lipidica (aldeidi). I sistemi antiossidanti multi-componenti, sono tanto più efficaci in quanto esistono interazioni fra antiossidanti. L'aggiunta di numerosi antiossidanti a cibi o magimi animali spesso non è però pratica o economica anche per restrizioni di tipo legislativo. Inoltre non tutti gli antiossidanti sono utilizzabili nei cibi, a causa del colore o sapore associato (estratti di piante ad esempio), della solubilità e interazioni con altri componenti dei cibi stessi (e.g. proteine e fenoli). In alcuni casi la fonte di potenziali agenti protettivi è a sua volta una via per venire a contatto con micotossine, specialmente OTA ed AFB1. E' il caso del caffè, pepe, uva o erbe medicinali. Altre sostanze, pur essendo state dimostrate in grado di prevenire la tossicità indotta da alcune micotossine, possono a loro volta essere cancerogene (quercetina) o avere effetti tossici (selenio e cumarina). Quindi tra le strategie preventive, quelle che favoriscono il mantenimento o l'aumento dei sistemi antiossidanti endogeni sono da preferirsi.

La cianidina. Le antocianine, metaboliti secondari presenti nella frutta e vegetali e responsabili della loro pigmentazione, hanno di recente stimolato un forte interesse come potenti antiossidanti, in grado di prevenire un danno ossidativo causato da specie reattive dell'ossigeno e di conseguenza di proteggere nei confronti di alcuni tipi di cancro e malattie cardiovascolari (Pietta et al., 2000; Vinson et al., 1995, Wang e Stretch, 2001). Il ruolo biologico delle antocianine nel mondo vegetale, sembra quello di attrarre insetti che contribuiscono all'impollinazione e alla dispersione dei semi. Le antocianine sono molto reattive a causa della deficienza elettronica che le rende anche molto sensibili alle variazioni di pH e temperatura.

Tra le antocianine, la cianidina-3-O-glucopiranoside (C-3-G) è quella maggiormente contenuta nelle arance rosse, ma anche in mirtilli, fragole, ribes, melograno ed è dotata di una particolare attività antiossidante in quanto presenta numerosi gruppi fenolici.

Figura 8. Struttura della C-3-G.



La C-3-G è un polifenolo e la glicosilazione che è presente su specifici atomi di carbonio (3, 5, 7, 3' e 5') della molecola ne aumenta la stabilità. C-3-G presenta gruppi OH sul C 3' e 4' dell'anello B, per un totale di 4 ossidrili e un residuo di beta-D-glucosio legato all'anello C mediante un legame 3-O-beta-glicosidico. È stato provato che C-3-G riduce l'ossidazione indotta da 40 μM Cu a pH = 7.4, delle lipoproteine a bassa densità (LDL) e il suo effetto risulta comparabile con quello indotto da resveratrolo ed acido ascorbico, anche essi antiossidanti naturali. Parte del meccanismo d'azione di C-3-G è stato attribuito alla capacità di chelare ioni di metalli bivalenti, necessari per generare ROS attraverso la reazione di Fenton. Amorini (Amorini et al., 2001) ha dimostrato che C-3-G agisce come un vero antiossidante a causa del suo peculiare potenziale redox. Tutte le concentrazioni di C-3-G testate (1, 2, 5, 10, 20, 50, 100 e 200 μM) sono risultate efficaci nell'inibire la formazione di malondialdeide (MDA), in un sistema cellulare *in vitro*, indice di perossidazione lipidica, in modo significativamente maggiore rispetto ai due antiossidanti di confronto (acido ascorbico e resveratrolo). Esperimenti simili, riguardanti l'inibizione dell'ossidazione di LDL,

effettuati a pH 5 o 6, hanno provato che una variazione di pH tra 5 e 7.4, non fa variare il potere antiossidante della molecola. Ciò suggerisce che la chelazione di metalli, che si può verificare attraverso l'eventuale dissociazione del gruppo fenolico della molecola, potrebbe giocare un minor ruolo nel meccanismo di protezione. La presenza della cianidina nelle arance rosse aumenta in modo significativo i poteri protettivi delle arance rosse rispetto alle arance bionde, quando il succo viene testato nel modello di ossidazione delle LDL da parte di rame.

La valutazione della diretta interazione con specie radicaliche all'ossigeno (H_2O_2 , $O_2^{\bullet-}$, OH^{\bullet}), ha dimostrato che C-3-G è ossidata rapidamente da questi composti e quindi, agisce in modo efficace da scavenger di radicali liberi. Il potere antiossidante della cianidina è in eccellente accordo con il suo potenziale redox fortemente negativo (-405 mV), determinato con misure dirette di voltammetria ciclica.

Sulla base di tali risultati si può considerare C-3-G come uno degli antiossidanti più potenti che possano essere assunti con una dieta ricca di vegetali.

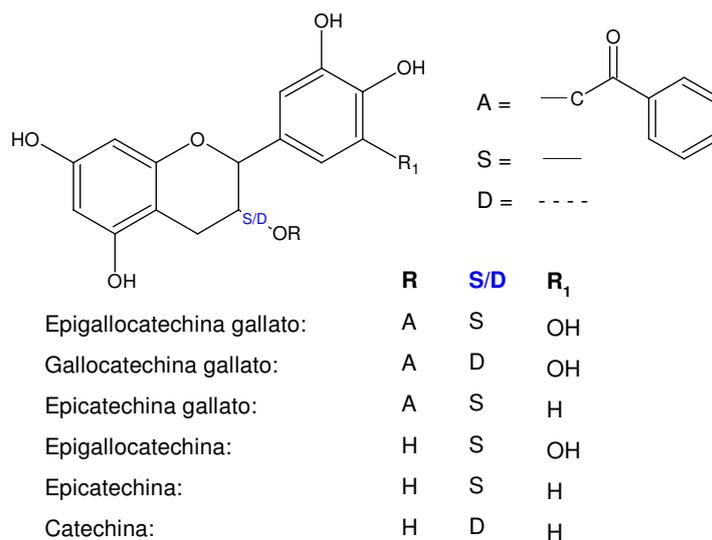
Il potere antiossidante di C-3-G è stato anche testato in cellule e tessuti sottoposti ad un aumento dello stress ossidativo.

Nel cuore isolato e perfuso, concentrazioni di 10 o 30 μM proteggono da perossidazione lipidica, riducendo la formazione di MDA nonché perdita di ATP. Tali effetti sono dovuti alla penetrazione della cianidina nelle cellule del miocardio, che a dosi farmacologiche riduce il danno tissutale dovuto ad ischemia. In modo dose dipendente C-3-G produce anche effetti protettivi in eritrociti umani trattati con H_2O_2 alla dose 2 mM.

Le catechine. Le catechine sono polifenoli con potenti proprietà antiossidanti ed appartengono alla classe dei flavonoidi, composti che possiamo trovare in molti vegetali, frutta, tè, caffè, cioccolato e vino rosso. Tutti i tipi di tè contengono le catechine: nel tè verde l'ossidazione delle catechine è minima, così da lasciarne inalterate le proprietà antiossidanti, mentre la fermentazione necessaria alla produzione degli altri tipi di tè riduce il contenuto di catechine.

La epigallocatechina gallato (EGCG) sembra essere la catechina più efficace per la prevenzione dei tumori. È stato anche dimostrato avere un potere antiossidante 20 volte più forte della vitamina E nel proteggere i lipidi del sistema nervoso centrale dallo stress ossidativo. Recentemente, in uno studio eseguito al Karolinska Institute di Stoccolma, è stato osservato che il tè verde è in grado di inibire l'angiogenesi. Un altro studio (University of Shizuoka, Giappone) ha dimostrato che il tè verde può prevenire la formazione di metastasi. Altre ricerche hanno portato alla scoperta che il tè verde può avere azione protettiva contro i tumori della pelle (melanomi). Infatti un gruppo di ricercatori osservò che bere tè verde può inibire la formazione di tumori associati all'esposizione a raggi UV B.

Figura 9. Struttura delle catechine.



In alcuni casi con tumori già formati dovuti agli UV B, la sua assunzione ha rallentato la crescita e in qualche caso ne ha ridotto le dimensioni. In un ulteriore studio i ricercatori hanno applicato i componenti del tè direttamente sulla pelle e quindi l'hanno esposta ai raggi UV B: la pelle protetta ha subito meno danni rispetto a quella non protetta. Alcuni produttori di creme solari hanno così cominciato ad usare il tè verde nei loro prodotti. Ulteriori ricerche effettuate in Giappone e Stati Uniti hanno messo in luce le proprietà del tè verde anche con

altri generi di tumore, quali leucemia, cancro al seno, all'ovaio, al fegato. Uno di questi studi all'Università di Shizuoka ha mostrato che il tè verde può lavorare in sinergia con i farmaci chemioterapici, aumentandone l'efficacia, e può proteggere le cellule dai danni provocati dall'esposizione a radiazioni. Il Cancer Chemotherapy Center a Tokio ha riscontrato che le EGCG inibiscono fortemente e direttamente la telomerasi, enzima che rende "immortali" le cellule tumorali mantenendone la parte finale dei loro cromosomi (telomeri). Il tè verde ha effetti benefici anche contro le malattie cardiovascolari: riduce i livelli di colesterolo LDL nelle arterie, causa principale dell'insorgenza dell'arteriosclerosi. La formazione di coaguli di sangue (trombosi) è la causa principale di infarti e colpi apoplettici: il tè verde inibisce la formazione di tali grumi con la stessa efficacia dell'aspirina. Può inoltre aumentare i livelli di HDL, colesterolo buono, che aiuta a rimuovere le placche dell'arteriosclerosi dalle pareti delle arterie. Il tè verde è anche ipotensivo e abbassa la pressione sanguigna. Quando si assumono amidi con l'alimentazione, l'enzima amilasi è necessario per trasformarli in zuccheri semplici che possono essere assorbiti dal sangue. Da studi eseguiti si è visto che i polifenoli del tè verde inibiscono l'attività dell'amilasi dell'87%; estratti di tè verde riducono il normale aumento di insulina e glucosio. Alti livelli di glucosio e di insulina nel sangue predispongono al diabete ed a malattie cardiovascolari, e sono associati ad un'accelerazione dell'invecchiamento. Uno studio svolto da un gruppo di ricercatori dell'Università di Newcastle, riporta che assumere regolarmente una tazza di tè verde accentua le capacità mnemoniche perché inibisce l'attività di determinati enzimi associati alla memoria. Il particolare è stato dimostrato che il tè verde inibisce l'enzima acetilcolinesterasi, coinvolto nello sviluppo del morbo di Alzheimer, malattia neurodegenerativa che depaupera il neurotrasmettitore acetilcolina. Inoltre il tè verde ostacola l'attività dell'enzima butirrilcolinesterasi individuato in pazienti malati di Alzheimer, e dell'enzima beta-secretasi, coinvolto nel processo di depositi di proteine in malati di Alzheimer.

Acido carnosico e carnosolo. Tra le numerose piante contenenti molecole ad attività antiossidante l'attenzione è stata posta sul *Rosmarinus officinalis*. Questa

pianta arbustiva, appartenente alla famiglia delle Labiatae, è originaria dell'Europa, dell'Asia e dell'Africa e cresce spontanea nell'area mediterranea, dal livello del mare fino alla zona collinare. Ha radici profonde, fibrose e resistenti. Le foglie, di colore verde lucente, sono persistenti, sottili e addensate numerosissime sui suoi rametti, e vengono utilizzate nell'industria alimentare e nella preparazione di cibi come aromatizzanti; inoltre questo arbusto trova impiego anche nell'industria cosmetica per la preparazione di prodotti utilizzati come tonici ed astringenti.

Gli estratti di *R. officinalis* hanno numerose proprietà benefiche sull'uomo, come l'azione antimicrobica nei confronti di Gram positivi e negativi e di lieviti, dovuta alla loro specifica composizione fenolica (Moreno et al., 2006). L'estratto metanolico delle foglie di *Rosmarinus officinalis* è stato studiato per il suo effetto inibitorio nella induzione e promozione del tumore indotto da benzopirene sulla pelle dei topi (Huang et al., 1994). E' importante anche l'attività antinfiammatoria e antireumatica, che giustifica il largo uso di questa pianta nelle preparazioni medicinali.

Queste differenti proprietà sono dovute alle numerose sostanze antiossidanti presenti nel Rosmarino, in particolare dal punto di vista chimico possiamo distinguerne principalmente tre classi: i diterpeni, i derivati caffeici e i flavoni.

Le analisi HPLC sugli estratti delle foglie, dei fiori e degli steli del *Rosmarinus officinalis*, evidenziano le diverse concentrazioni dei numerosi composti polifenolici presenti. L'estratto acquoso ha un elevato contenuto di acido rosmarinico e flavoni, mentre nell'estratto in DMSO prevale la concentrazione di acido carnosico e carnosolo.

Queste sostanze mostrano una distribuzione diversa durante il ciclo vegetativo della pianta; solo nei primi mesi di crescita sono presenti tutti i polifenoli insieme, in seguito le concentrazioni diminuiscono drasticamente. La concentrazione massima dei composti antiossidanti è nelle foglie, mentre nelle radici dell'arbusto sono presenti solo in piccole tracce (Del Bano et al., 2003).

Figura 10. Strutture chimiche dei composti polifenolici presenti nel rosmarino: diterpeni acido carnosico, **CA** (1), carnosolo, **Car** (2), acido 12-O-metilcarnosico (3); derivati caffeici acido rosmarinico (4); flavoni (5) e (6).

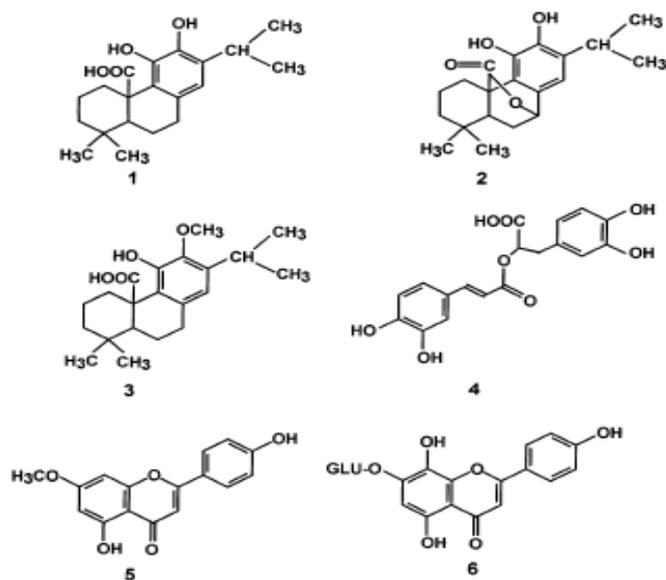
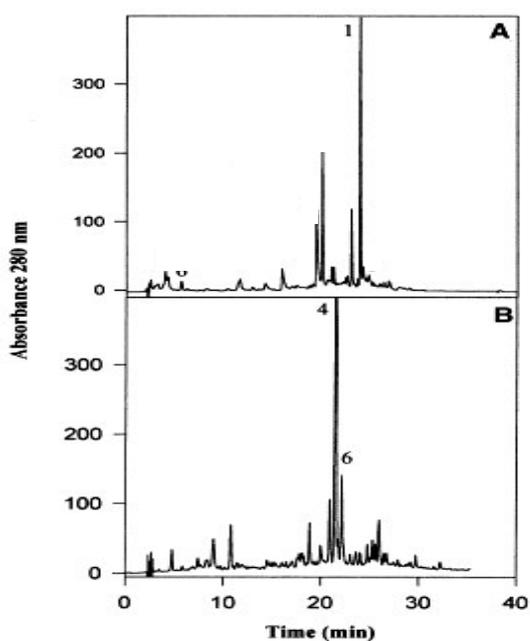


Figura 11. Cromatogrammi HPLC effettuati su estratti in DMSO (A) e acquoso (B) di foglie di *Rosmarinus officinalis*. 1: Acido rosmarinico; 6: CA; 4: Car.



Molti studi hanno dimostrato che gli antiossidanti presenti negli estratti del *Rosmarinus officinalis* possono agire come scavengers di radicali liberi in reazioni di ossidazione come la perossidazione lipidica: l'estratto acquoso con la più alta concentrazione di acido rosmarinico possiede la maggiore attività antiossidante e gli estratti con un'elevata concentrazione di diterpeni (in particolare di acido carnosico) aumentano il periodo di stabilità nei confronti della perossidazione degli acidi grassi in sistemi acquosi (Del Bano et al., 2003).

Questi composti perciò, specialmente l'acido carnosico (CA) ed il carnosolo (Car), sono i maggiori responsabili (per il 90%) dell'azione antiossidante del *Rosmarinus officinalis* (Aruoma et al., 1992). Inoltre l'attività antiossidante di estratti contenenti i più bassi livelli di diterpeni fenolici è comunque maggiore rispetto a quella di antiossidanti comunemente utilizzati come riferimento in acqua (acido ascorbico) e in sistemi lipidici (α -tocoferolo) (Del Bano et al., 2003). Infine i flavoni hanno probabilmente un effetto sinergico con i diterpeni nell'attività di scavenger di radicali.

Tra i diterpeni, quello maggiormente presente è l'acido carnosico. L'elevata attività di scavenger è dovuta proprio alla sua struttura: possiede due gruppi fenolici molto reattivi sull'anello aromatico che contribuiscono alla terminazione della reazione radicalica.

Il meccanismo di reazione antiossidante dell'acido carnosico proposto da Masuda et al. (2001, 2002) prevede la cattura e la stabilizzazione delle specie generate dalla catena radicalica di ossidazione di vari composti.

L'ossidril in posizione 11 dona l'idrogeno alla specie radicalica come per esempio un radicale perossilipidico, producendo un radicale carnosato. Il quenching di quest'ultimo avviene con un secondo radicale perossilipide mediante una reazione di accoppiamento radicale-radicalo.

Questo passaggio può avvenire in posizione 12 o 14 (orto o para, rispettivamente all'ossigeno radicalico) che sono le posizioni stabilizzanti il radicale grazie all'effetto induttivo.

Quando la reazione avviene in posizione orto si forma un perossile emiacetato instabile (4) che si apre per eliminazione di un idroperossido. Se la reazione invece avviene in posizione para, viene prodotto un perossido, anch'esso instabile

a causa dell'enolo reattivo in posizione 13, che attacca un ossigeno portando ad un intermedio epossido (6). Attraverso diversi passaggi di isomerizzazione si arriva ai due chinoni come composti finali di ossidazione (2) e (3).

Questi prodotti di ossidazione contribuiscono ad aumentare l'attività antiossidante del rosmarino in quanto si è notato che soluzioni dei due chinoni mostrano anch'essi una potente attività con il passare del tempo (Masuda et al., 2002).

Dalle analisi quantitative si nota che il rapporto con cui vengono prodotti i composti (2) e (3) è di 4:1, ciò può dipendere dalla maggiore facilità dell'attacco del radicale all'acido carnosico. Probabilmente durante il processo antiossidante l'acido carnosico viene ossidato anche in altri composti fenolici, come il carnosolo e il rosmano (Masuda et al., 2001), anch'essi con potere antiossidante. L'acido carnosico, oltre all'elevata attività di scavenger, possiede la capacità di inibire l'assorbimento di lipidi nell'uomo. Inoltre sembra diminuire il livello di trigliceridi sierici in topi alimentati con diete ad alto contenuto di grassi (Ninomiya et al., 2004).

L'azione antiossidante del carnosolo consiste nell'impedire la reazione di Fenton a livello del Dna con minore produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), citotossiche con elevate proprietà ossidanti nelle strutture cellulari.

Come dimostrato da studi con HPLC, tale proprietà risulta accentuata in presenza di solventi acquosi: il carnosolo addiziona un equivalente di acqua e isomerizza in carnosolo chinone con produzione di un'altra sostanza scavenging di radicali, il rosmano. Affinchè il carnosolo chinone si riduca nuovamente in carnosolo semplice e possa adempiere appieno al suo ruolo antiossidante, si rende necessaria la contemporanea ossidazione del rosmano nella forma chinonica da parte del rimanente carnosolo chinone (Masuda et al., 2002).

Figura 12. Meccanismo con cui l'acido carnosico è in grado di sottrarre radicali liberi.

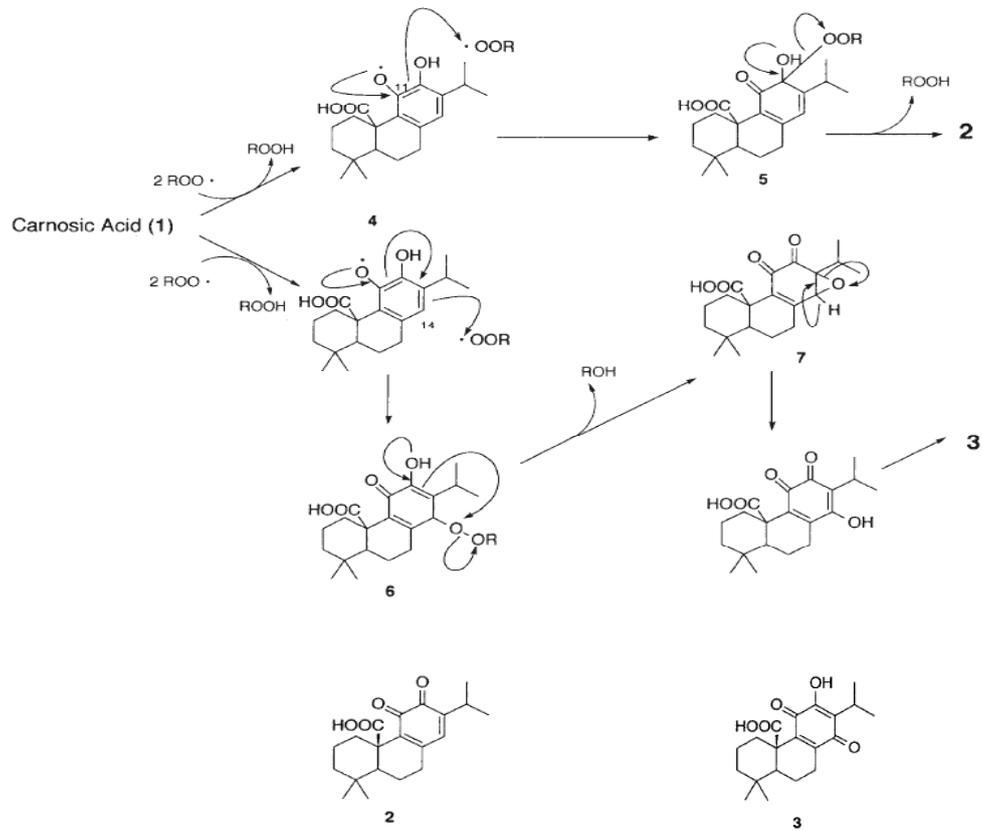
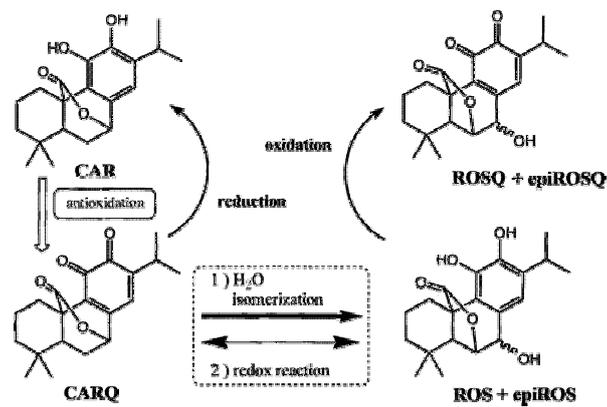


Figura 13. Meccanismo d'azione del carnosolo.



Il carnosolo è un composto dotato anche di attività antiinfiammatoria dal momento che è in grado di inibire specifici lipopolisaccaridi e interferon gamma coinvolti nella sintesi di NO indotta dalla NO sintasi Ca^{+2} dipendente durante i processi infiammatori.

E' possibile spiegare il ruolo antitumorale del carnosolo attraverso due meccanismi: da una parte esso potrebbe prevenire mutazioni puntiformi a livello del DNA, inoltre potrebbe modulare l'attività degli enzimi che sono responsabili della detossificazione. Studi effettuati sul coniglio, inoltre, hanno rivelato come il carnosolo sia in grado di inibire l'aggregazione piastrinica indotta dal collagene e dall'acido arachidonico in maniera direttamente proporzionale alla concentrazione con un valore di IC50 pari a $5,5 \pm 0,3 \mu\text{M}$ e $42,5 \pm 0,9 \mu\text{M}$, rispettivamente. L'inibizione dell'aggregazione piastrinica prodotta dal carnosolo potrebbe essere la conseguenza del blocco della mobilizzazione del calcio citosolico indotta dal collagene, del blocco della secrezione di serotonina e della liberazione di acido arachidonico (Lee et al., 2006). Anche il tipico comportamento di antagonismo non competitivo mostrato dal carnosolo ad una concentrazione di 22-50 μM verso il recettore del TXA2 potrebbe in parte spiegare la suddetta attività.

A livello epatico il carnosolo si è dimostrato utile nel contrastare il tetracloruro di carbonio (CCl_4), composto notoriamente epatotossico utilizzato in campo sperimentale. In laboratorio si è ottenuto il carnosolo, normalmente estratto dalla pianta, grazie ad una semisintesi che origina dall'acido carnosico. Si ritiene che il meccanismo antiossidante del carnosolo sia molto simile a quello proposto da Masuda nel 2002 per l'acido carnosico.

SCOPO DEL PROGETTO

Numerosi studi indicano un coinvolgimento dello stress ossidativo nella tossicità di alcune micotossine in particolare di OTA e AFB1 (Monnet-Tshudi et al., 1997; Omar et al., 1990, 1991; Baudrimont et al., 1994). Le specie reattive all'ossigeno (ROS) che danno origine alla perossidazione lipidica, sono in grado di reagire con il DNA, causandone l'ossidazione.

Gli antiossidanti possono agire con un duplice meccanismo nei confronti del danno indotto da micotossine:

- 1) favorendo la detossificazione e la rimozione di addotti col DNA;
- 2) contrastando la perossidazione lipidica mediante la protezione delle membrane cellulari.

Il problema della sicurezza alimentare e dei mangimi per animali appare di rilevante importanza, data l'evidente tossicità di queste tossine, e poichè sembra difficile evitare completamente qualsiasi contaminazione, è necessario individuare vie alternative al fine di limitare tale tossicità. La presente ricerca è inserita in un progetto più ampio che ha lo scopo di individuare strategie alimentari atte a contrastare i danni indotti dalle micotossine sull'animale da allevamento e quindi migliorarne la sicurezza delle carni, del latte e dei derivati.

Partendo da questi presupposti, lo scopo della presente tesi è stato quello di valutare la capacità di numerose sostanze di origine naturale (cianidina, epigallocatechin gallato, epicatechin gallato, acido carnosico, carnosolo) come potenziali agenti in grado di prevenire il danno cellulare indotto da AFB1 e OTA.

È stata dapprima valutata l'attività antiossidante *in vitro* dei vari composti mediante il metodo della reazione oscillante di Briggs-Rauscher (Cervellati et al. 2001) e il saggio TEAC (Re et al., 1999), in seguito è stata testata l'efficacia nel prevenire i danni specifici delle micotossine su due diverse linee cellulari: cellule derivanti da epatoblastoma umano (HepG2) e cellule immortalizzate derivanti da rene di suino (LLC-PK1).

In un secondo tempo è saggiato il potere preventivo degli antiossidanti selezionati nei confronti del danno citotossico e il loro effetto sulla frammentazione e ossidazione del DNA indotto da AFB1 e OTA. Le linee cellulari sono state

pretrattate con opportune concentrazioni non citotossiche degli antiossidanti e successivamente esposte a concentrazioni scarsi delle micotossine in esame. Si è inoltre valutato l'effetto di queste molecole come ROS-scavenger nelle cellule.

MATERIALI E METODI

Prodotti chimici.

Cianidina, EGCG, ECG, CA, Car, 2'7'-Diclorofluoresceina di acetato (H₂DCF-DA), OTA, AFB₁, MTT (3(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro), Trolox (acido 6-idrossi-2,5,7,8-tetrametil-croman-2-carbossilico) e 2,2'-azinobis-(acido 3-etil-benzotiazolin-6-sulfonico) sale di diammonio (ABTS) sono stati acquistati da Sigma- Aldrich S.r.l. (Milano, Italia). EMEM (Eagle's minimum essential medium, IMDM (Iscove modified Dulbecco's medium), FBS (foetal bovine serum), PBS (phosphate- buffered saline) e penicillina e streptomina sono stati ottenuti da Bio-Whittaker (Walkersville, MD, USA). Acido malonico, manganese (II) solfato, NaIO₃, HClO₄ (70% p/p) e H₂O₂ sono stati acquistati da Merck (Germania). Tutte le soluzioni standard sono state preparate con acqua demonizzata e poi bidistillata. Tutti i prodotti chimici e i solventi, di purezza analitica, sono stati utilizzati senza ulteriori purificazioni.

Attività antiossidante.

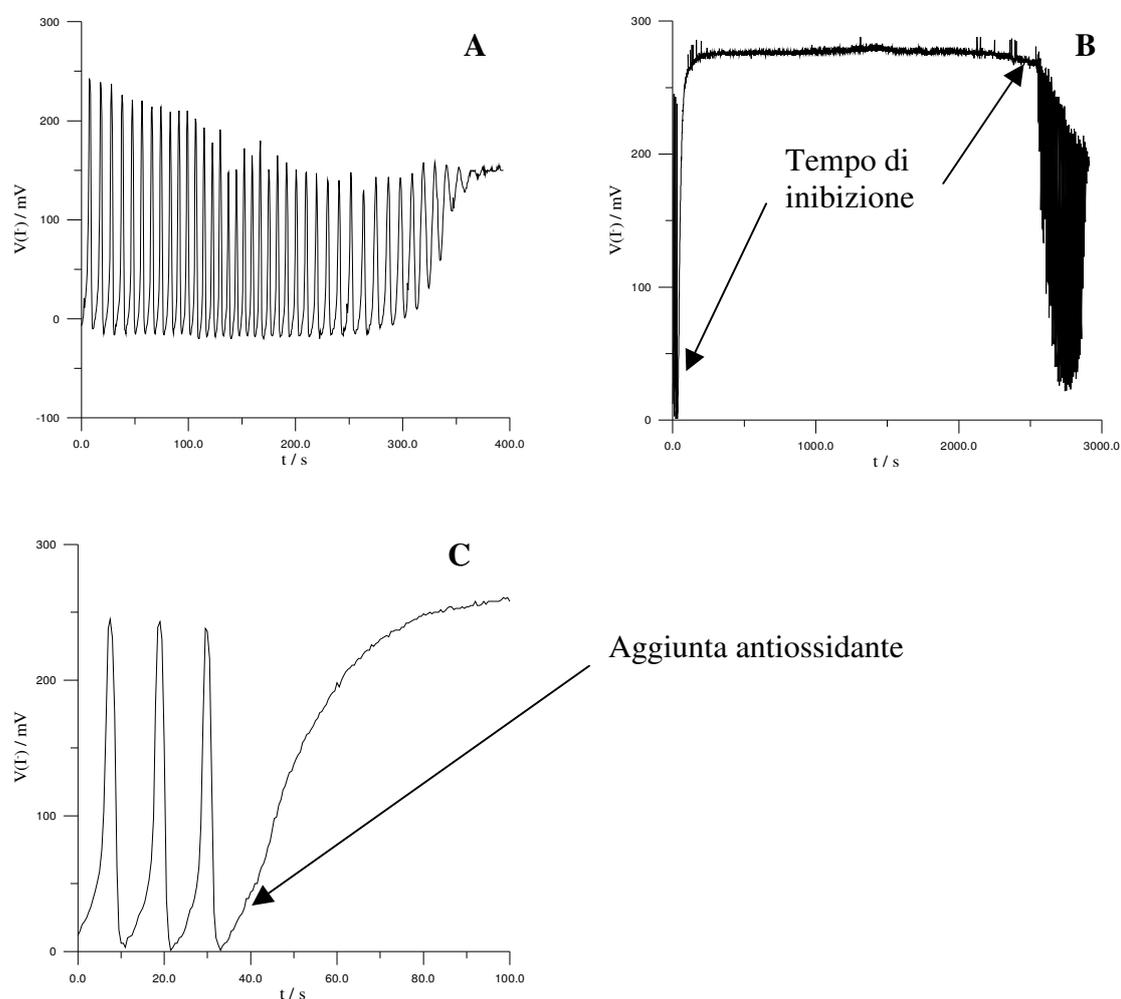
Il metodo BR. Il sistema oscillante di Briggs-Rauscher (BR) è stato scoperto nel 1973 e consiste nella iodurazione e ossidazione di un substrato organico (in generale, acido malonico o suoi derivati C2 sostituiti) da parte dello iodato acido, in presenza di perossido di idrogeno con Mn²⁺ come catalizzatore (Briggs e Rauscher, 1973).

I principali intermedi le cui concentrazioni variano periodicamente nel tempo (andamento oscillante) sono I⁻, I₂, HOI, HOIO, i radicali iodile IO₂[•] e idroperossile HOO[•], nonché la concentrazione del catalizzatore che oscilla fra i due stati di ossidazione +2 e +3.

Il ruolo fondamentale dei radicali HOO[•] nel far insorgere il regime oscillante è stato riconosciuto da Cervellati e collaboratori (Cervellati et al., 2001, 2004a). Quando un antiossidante scavenger di radicali liberi viene aggiunto a una miscela BR in pieno regime oscillante, si osserva un immediato quenching delle oscillazioni seguito da un tempo di inibizione che dipende linearmente dalla

concentrazione e dalla capacità antiossidante del campione aggiunto e infine una rigenerazione delle oscillazioni.

Figura 14. **A** Registrazione del potenziale della coppia elettrodo ionosensibile e riferimento vs tempo di una miscela BR (concentrazioni iniziali: $[H_2O_2]= 1,2$ M; $[HClO_4]= 0,0266$ M; $[IO_3^-]= 0,0667$ M; $[MA]= 0,05$ M; $[Mn^{2+}]= 0,0067$; $T = 25,0$ °C $\pm 0,1$ °C), dove è stato aggiunto 1 mL di acqua bidistillata dopo la terza oscillazione. **B** e **C** Registrazione del potenziale della coppia elettrodo ionosensibile / riferimento vs tempo immersa in una miscela BR (concentrazioni iniziali: v. A) in cui è stato iniettato 1 mL di soluzione di antiossidante dopo la terza oscillazione (C-3-G 10 μ M).



La cessazione delle oscillazioni è dovuta all'azione scavenger dell'antiossidante aggiunto nei confronti dei radicali idroperossili. Quando la concentrazione

dell'antiossidante si è ridotta al punto in cui i radicali HOO^\bullet possono riformarsi, le oscillazioni riprendono. Il tempo di inibizione è definito come l'intervallo temporale fra la fine dell'aggiunta dell'antiossidante e l'inizio della ripresa delle oscillazioni. È quindi possibile stabilire sulla base del tempo di inibizione, l'attività antiossidante relativa di molecole rispetto ad uno standard opportuno.

L'andamento: cessazione oscillazioni – inibizione – ripresa oscillazioni, è stato ottimamente riprodotto inserendo nel meccanismo della reazione BR (Furrow et al., 2002) lo step inibitorio $\text{Ar}(\text{OH})_n + \text{HOO}^\bullet \rightarrow \text{Ar}(\text{OH})_{n-1}\text{O}^\bullet + \text{H}_2\text{O}_2$ e un successivo step di degrado dell'inibitore (Cervellati et al., 2004a). Gli andamenti oscillanti nella reazione BR possono essere seguite per via potenziometrica utilizzando un elettrodo ionosensibile agli ioni ioduro o un elettrodo al platino lucente accoppiato a un opportuno elettrodo di riferimento. Le oscillazioni nel sistema BR iniziano in seguito all'aggiunta di H_2O_2 a una miscela contenente acido malonico, iodato acido e ioni Mn^{2+} . Dopo la terza oscillazione si aggiunge 1.0 mL di una soluzione opportunamente diluita dell'antiossidante e si misura il tempo di inibizione. Si confronta poi questa concentrazione con quella di uno standard che dà lo stesso tempo di inibizione.

Il metodo BR lavora a un pH analogo a quello dei succhi gastrici (≈ 2) ed è stato testato con successo su frutta ed estratti vegetali (Höner e Cervellati, 2002), vini bianchi (Höner et al., 2002), estratti di piante officinali (Cervellati et al., 2002; Speroni et al., 2003; Cervellati et al., 2004b; Cervellati et al., 2004c). Il metodo è utilizzato anche da altri gruppi di ricerca (Prenesti et al., 2005; Kljusuric et al., 2005).

L'attività antiossidante relativa allo standard scelto, resorcinolo (Cervellati et al., 2001), si calcola dal rapporto:

$$\text{rac} = [\text{std}] / [\text{smp}]$$

dove rac è la capacità antiossidante relativa, [std] e [smp] sono rispettivamente la concentrazione (μM) dello standard e del campione che danno lo stesso tempo di inibizione (in secondi).

Metodo TEAC. L'attività antiossidante a pH 7.4 è stata valutata con il ben noto saggio TEAC (Re et al., 1999). Le misurazioni spettrofotometriche sono state

effettuate a quattro differenti concentrazioni di antiossidante e dello standard trolox[®] ripetendo tre volte la misura per ciascuna concentrazione. La misurazione dell'assorbanza (a 734 nm) è stata registrata esattamente dopo 6 minuti dal mescolamento dei reagenti (radicale ABTS^{•+} e l'antiossidante) con uno spettrofotometro Shimadzu 1601 PC UV- vis. Tutte le soluzioni e le cuvette sono state mantenute a 30 °C (± 1 °C). Infine è stato costruito un grafico $\Delta E6$ [Abs (blank) – Abs (smp)] vs [smp]. In modo analogo si è ottenuto un grafico usando trolox al posto dell'antiossidante. La capacità antiossidante relativa al trolox è stata calcolata dal rapporto :

$$\text{TEAC} = [\text{trolox}] / [\text{smp}]$$

Dove [trolox] e [smp] sono le concentrazioni dello standard e del campione che danno lo stesso $\Delta E6$.

Colture cellulari.

Le linee cellulari sono state scelte in base alla tossicità organospecifica di aflatossina B1 e di ocratossina A.

Per gli studi con AFB1 è stata utilizzata la linea cellulare HepG2, derivata da cellule di epatoblastoma umano, ottenuta dall'American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). Tali cellule mantengono la maggior parte della capacità metabolica delle cellule normali di fegato. Le attività enzimatiche di fase I e fase II sono presenti ed in particolare risulta invariata la capacità metabolica del cytochrome P₄₅₀. Questo è importante per il suo ruolo nell'attivare AFB1 in AFO, la forma epossidata epatocancerogena della micotossina. Le cellule HepG2 sono state coltivate con terreno IMDM (Iscove-Modified Dulbecco's Medium) con l'aggiunta del 10% di FBS e 1% di penicillina e streptomina (v/v). Durante i trattamenti con micotossine o antiossidanti l'aggiunta di siero è stata ridotta al 5%.

Per gli studi sull'OTA, è stata utilizzata la linea cellulare LLCPK1, derivata dal rene di maiale, immortalizzata e non cancerosa. La linea è stata ottenuta dall'Istituto Sperimentale di Zooprofilassi della Lombardia ed Emilia Romagna (Brescia, Italia). Le cellule sono state coltivate in terreno EMEM con aggiunta del 10% (v/v) di FBS (siero fetale bovino) e del 1% (v/v) di penicillina e

streptomycin. Durante i trattamenti con micotossine o antiossidanti l'aggiunta di siero è stata ridotta al 5%.

Entrambe le linee cellulari sono state mantenute in un'atmosfera al 5% di CO₂ e al 37 °C. Il terreno veniva sostituito ogni 2 o 3 giorni. Le cellule sono state esposte alle sostanze test mentre si trovano in fase di crescita logaritmica.

Determinazione della vitalità cellulare.

MTT test. Il test dell'MTT è largamente utilizzato per lo studio della vitalità cellulare. Esso valuta l'attività riducente della cellula misurando l'attività della succinato deidrogenasi mitocondriale. È stata seguita la metodologia descritta da Mosmann, 1983: al termine dei trattamenti le cellule sono state lavate con PBS sterile ed esposte per 4 h a 37° C, al buio, a una soluzione sterile di MTT 0.5 mg/mL in terreno al 5% FBS, 1% penicillina-streptomycin, 2mM glutamina. In questa fase l'MTT viene incorporato nelle cellule e nei mitocondri delle cellule viventi, e qui può essere ridotto. Il prodotto ridotto passa da una colorazione gialla iniziale a una colorazione blu/viola caratteristica. Al termine delle 4 h il terreno viene rimosso con delicatezza e l'MTT ridotto viene estratto dalle cellule con una soluzione 4:1 di DMSO e EtOH. La quantità di MTT ridotto è stata misurata per via spettrofotometrica a 570 nm (690 nm come riferimento). È stato utilizzato un lettore di piastre Genius TECAN (USA). La vitalità percentuale è stata indicata come:

$$\text{Vitalità \%} = (\text{Abs smp} / \text{Abs ctr}) \times 100$$

dove smp = cellule trattate e ctr = cellule non trattate (controllo).

La densità ottica ottenuta è direttamente proporzionale al numero di cellule vitali.

Le due linee cellulari sono state seminate separatamente ad una concentrazione di 10⁴ cellule per pozzetto in piastre da 96 pozzetti, e poste in incubazione per 24 ore.

Citotossicità. La citotossicità dell'OTA (disciolta in metanolo) e dell' AFB1 (disciolta di DMSO) è stata valutata rispettivamente nelle cellule HepG2 e nelle LLC-PK1. I due solventi raggiungono la concentrazione massima dello 0.1%. Durante la fase di crescita logaritmica, le LLC-PK1 sono state trattate con OTA 0-100 µM e le HepG2 con AFB1 0-100 µM per 24 e 48 ore.

In modo analogo sono stati testati gli effetti citotossici degli antiossidanti in esame. Di seguito sono riportati i valori delle concentrazioni usate. Il tempo di esposizione delle cellule alle sostanze è stato 24 h.

Tabella 2. Concentrazioni testate per il test di citotossicità.

	Linea cellulare	Concentrazioni
C-3-G	HepG2	0-250 μ M
EGCG	LLC-PK1	0-150 μ M
ECG	LLC-PK1	0-150 μ M
CA	HepG2	0-70 μ M
	LLC-PK1	
Car	LLC-PK1	0-100 μ M

Citoprotezione. Per valutare l'attività preventiva di C-3-G, EGCG, ECG, CA e Car, nei confronti della eventuale citotossicità indotta da OTA e AFB1, le cellule, seminate in piastre da 96 pozzetti, durante la fase di crescita logaritmica sono state pretrattate con il composto in esame a concentrazioni scelte in base ai valori di citotossicità ottenuti. Il tempo del pre-trattamento è sempre stato 24 h se non è diversamente indicato. Al termine di tale periodo le cellule sono state esposte a OTA 60 μ M (LLC-PK1) e a AFB1 10 μ M (HepG2). La vitalità è stata valutata dopo 24 ore di esposizione alle micotossine. Nella tabella 3 vengono riportati i valori di concentrazione degli antiossidanti e i tempi di esposizione scelti per i test di citoprotezione.

Tabella 3. Concentrazioni degli antiossidanti utilizzate per i test di citoprotezione.

	Linea cellulare	Concentrazioni	Tempo di esposizione
C-3-G	HepG2	25, 50 μ M	24 h
	LLC-PK1	10, 30 μ M	24 h
EGCG		1, 5 μ M	1, 2, 3, 8, 16, 24 giorni
ECG	LLC-PK1	30, 60 μ M	24 h
CA	HepG2	10, 20, 30 μ M	24 h
	LLC-PK1		
Car	LLC-PK1	1, 2.5, 5 μ M	24 h

Nel caso della EGCG è stata effettuata anche una prova di citoprotezione dopo pre-trattamento cronico (1, 2, 3, 8, 16 e 24 giorni) con concentrazioni inferiori (1 e 5 μ M) di EGCG. Per tale esperimento le cellule sono state seminate in fiasche da 75 cc ed esposte alle concentrazioni scelte di EGCG. L'esposizione successiva alla micotossina è stata di 24 h. L'utilizzo di terreno al 5% di FBS anziché 10% per lunghi periodi (24 giorni) non ha influenzato la vitalità cellulare dei controlli.

Pre-, co- e post- trattamento. Questo test è stato effettuato per verificare se anche un trattamento con gli antiossidanti considerati, contemporaneo o successivo all'esposizione delle linee cellulari alle micotossine (AFB1 per HepG2 e OTA per LLC-PK1), poteva risultare efficace nel contrastare i danni indotti da OTA o AFB1. Le concentrazioni degli antiossidanti e la procedura del trattamento sono schematizzati in tabella 4.

Tabella 4. Schema sperimentale per valutare l'efficacia di un pre- co- e post- trattamento.

	Linea cellulare	Concentrazioni	Dopo 24 h			Dopo 48 h			Dopo 72 h
			Pre-	Co-	Post-	Pre-	Co-	Post-	Pre- / Post-
C-3-G	HepG2	50 μ M	C-3-G	C-3-G + AFB1	AFB1	AFB1		C-3-G	
EGCG	LLC-PK1	30 μ M	EGCG	EGCG + OTA	OTA	OTA		EGCG	
ECG	LLC-PK1	60 μ M	ECG	ECG + OTA	OTA	OTA		ECG	
	HepG2	30 μ M	CA	CA + AFB1	AFB1	AFB1	MTT	CA	MTT
CA	LLC-PK1	30 μ M	CA	CA + OTA	OTA	OTA		CA	
Car	LLC-PK1	5 μ M	Car	Car + OTA	OTA	OTA		Car	

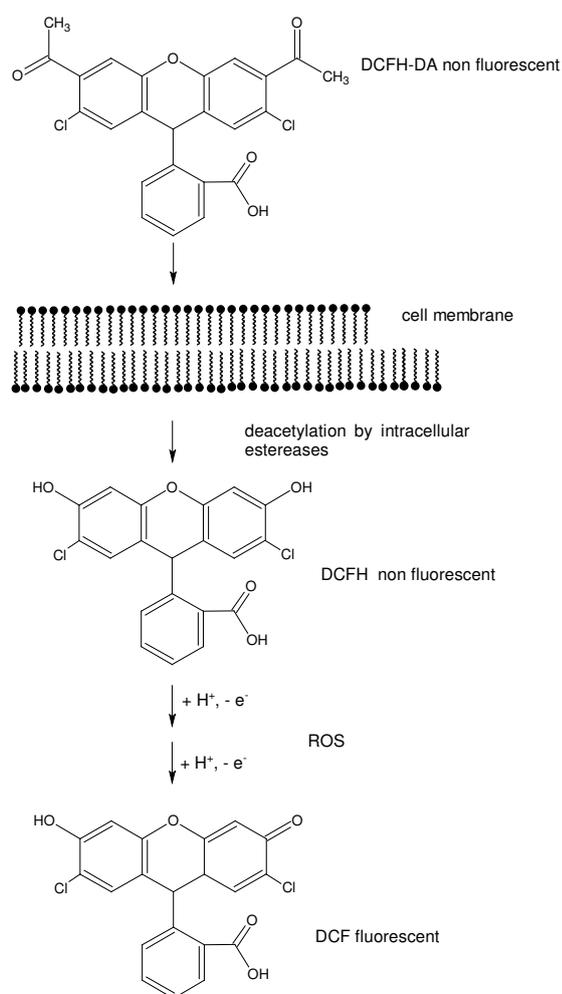
Determinazione della produzione di ROS.

La valutazione delle specie radicaliche all'ossigeno (ROS) intracellulari è stata eseguita mediante una sonda fluorescente, la diidro-2',7'-diclorofluorescina diacetato (H₂DCF-DA). Tale sonda è in grado di rivelare le specie reattive all'ossigeno quali O₂^{•-}, HO[•] e H₂O₂.

Le cellule sono state seminate in fiasche da 25 mL ad una concentrazione di 5×10⁵ per fiasca. Durante la fase di crescita logaritmica le cellule sono state incubate per 1 ora a 37 °C al buio con terreno senza siero contenente H₂DCF-DA 10 μ M. In seguito le cellule sono sempre state mantenute al buio. Dopo aver

eliminato H₂DCF-DA, LLCPK1 e HepG2 sono state esposte a concentrazioni crescenti (0-100μM) rispettivamente di OTA e AFB1 per 8, 12 e 24 ore. Poi le cellule sono state lavate con PBS ed esposte ad una soluzione acquosa di digitonina (2.5 mg/mL) per 1 ora a 4°C al buio. Al termine di tale periodo le cellule vengono separate mediante centrifugazione dal surnatante (11000g, 10', 4°C). La produzione di ROS è stata misurata sul surnatante utilizzando uno strumento WallacVictor2 1420 Multilabel Counter, ad una lunghezza d'onda di eccitazione di 485 nm e di emissione di 538 nm. Ogni esperimento è stato eseguito tre volte.

Figura 15. Meccanismo di entrata e ossidazione di H₂DCF-DA nella cellula.



In tabella 5 sono riportate le concentrazioni utilizzate negli esperimenti con gli antiossidanti: durante la fase logaritmica di crescita le cellule sono state pretrattate con l'antiossidante per 24 h, in seguito sono state trattate con H₂DCF-DA ed esposte OTA 60 µM o AFB1 10 µM per 8 ore.

La produzione relativa di ROS è stata espressa come:

Produzione % ROS = (fluorescenza del campione / fluorescenza del controllo) × 100. I risultati sono indicati come la media di tre esperimenti differenti ± SD (deviazione standard).

Tabella 5. Valori di concentrazione degli antiossidanti utilizzati nel test per la determinazione dei ROS.

	Linea cellulare	Concentrazioni
C-3-G	HepG2	25, 50 µM
EGCG	LLC-PK1	10, 30 µM
ECG	LLC-PK1	30, 60 µM
CA	HepG2	10, 20, 30 µM
	LLC-PK1	
Car	LLC-PK1	1, 2.5, 5 µM

Apoptosi: frammentazione del DNA.

Durante la morte apoptotica, l'organizzazione interna della cellula è mantenuta, almeno nelle fasi precoci del processo, mentre a livello nucleare si osserva la disgregazione del/i nucleolo/i, il taglio della lamina, la condensazione e il taglio della cromatina in frammenti di 180-200 paia di basi o multipli interi di questi numeri, lunghezza che corrisponde a quella dei tratti di DNA internucleosomale. Una metodica quindi per identificare la morte apoptotica è valutare la frammentazione del DNA.

A questo scopo le cellule sono state seminate in fiasche da 175 mL. Durante la fase logaritmica sono state pretrattate con l'antiossidante per 24 ore (si veda tabella 6 per le concentrazioni di antiossidante utilizzate). Successivamente le LLCPK1 sono state esposte all'azione dell'OTA alla concentrazione 60 μM e le HepG2 all'AFB1 10 μM per altre 24 ore. Anche in questo caso l'esperimento è stato ripetuto per tre volte.

Il DNA proveniente da 10^7 cellule, è stato infine estratto quantitativamente utilizzando NucleoSpinTissue Kit (Macherey-Nagel GmbH & Co., D, EU). In breve, il kit si basa su un'estrazione con solventi e l'utilizzo di micro colonne ad alta affinità. Tale metodo consente di estrarre DNA genomico con un alto grado di purezza e con un'alta resa.

Il DNA purificato è stato poi separato in base alle dimensioni tramite corsa elettroforetica su gel di agarosio 1%. Il gel è stato preparato con tampone TBE. Nel gel è stato aggiunto 0.04% di etidio bromuro. Le bande relative alle diverse paia di basi, sono state identificate per esposizione del gel alla luce di una lampada a fluorescenza.

Tabella 6. Valori di concentrazione degli antiossidanti utilizzati per la valutazione dell'apoptosi.

	Linea cellulare	Concentrazioni
C-3-G	HepG2	25, 50 μM
EGCG	LLC-PK1	30 μM
ECG	LLC-PK1	60 μM
CA	HepG2	30 μM
	LLC-PK1	
Car	LLC-PK1	1 μM

Ossidazione del DNA.

Il DNA ottenuto da 10^7 cellule, mediante l'estrazione con NucleoSpinTissue Kit (vedere paragrafo precedente per le procedure, in tabella 7 sono riassunti i trattamenti effettuati) è stato utilizzato per determinare la quantità di 8-OH-deossiguanina (8-OH-dg) mediante il KIT 8-OH-dg ELISA (Gentaur Europe, 1004 Bruxelles, Belgium, EU). In breve, il DNA estratto e purificato viene seminato in una piastra a 96 pozzetti precedentemente ricoperti di anticorpo primario monoclonale specifico per 8-OH-dg; dopo incubazione e lavaggio viene addizionato un anticorpo DNA specifico.

Tabella 7. Valori di concentrazione degli antiossidanti utilizzati per la valutazione dell'ossidazione del DNA.

	Linea cellulare	Concentrazioni
CA	HepG2	30 μ M
	LLC-PK1	
Car	LLC-PK1	1 μ M

Dopo incubazione e un ulteriore ciclo di lavaggio si aggiunge l'anticorpo secondario marcato con un'enzima, si incuba e si rimuove per lavaggio l'anticorpo in eccesso. Si aggiunge poi un substrato specifico e si interrompe la reazione tra l'enzima legato all'anticorpo secondario ed il substrato acidificando il mezzo. E' stata misurata poi l'assorbanza a 450 nm tramite lettore di piastre Genius TECAN (USA).

È stata costruita una curva di taratura standard, per poter estrapolare la concentrazione di 8-OH-d-guanina nei campioni in ng/mL.

Analisi statistica.

La significatività dei differenti gruppi di dati è stata prima valutata utilizzando un'analisi one-way ANOVA all'interno dello studio, seguita dal test di NEWMAN KEULS a confronto multiplo. Le differenze sono state considerate significative per $P < 0.05$.

RISULTATI

Attività antiossidante.

In tabella 8 vengono riportati i valori BR (pH \approx 2) e TEAC (pH 7.4).

I valori di attività antiossidante BR (rac) e TEAC possono cambiare al variare della concentrazione di campione considerata (Cervellati et al., 2001), per cui si è ritenuto opportuno calcolare tali valori a diverse concentrazioni e utilizzare poi una media di essi.

Tabella 8. Valori medi di attività antiossidante BR e TEAC.

	Attività antiossidante	
	BR (pH \approx 2) / $rac_m \pm SD$	TEAC (pH 7.4) / $TEAC_m \pm SD$
C-3-G	1.95 \pm 0.06	2.48 \pm 0.22
EGCG	1.00 \pm 0.02	5.00 \pm 0.04
ECG	0.8 \pm 0.02	3.60 \pm 0.02
CA	0.4 \pm 0.03	0.95 \pm 0.03
Car	/	1.04 \pm 0.1

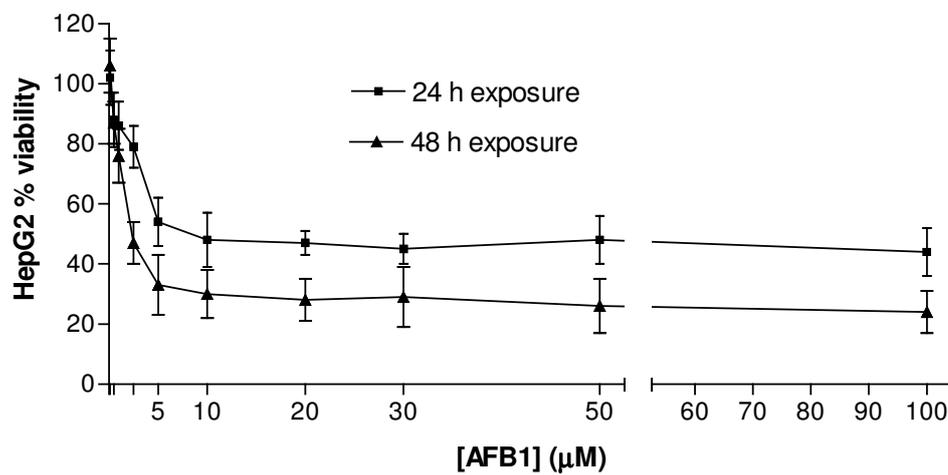
Vitalità cellulare.

Citotossicità. Le prove di citotossicità hanno permesso di individuare le concentrazioni non tossiche utilizzate nei test successivi. In figura 16 sono riportate le curve di citotossicità di AFB1 e di OTA, mentre in figura 17 vengono riportate le curve di citotossicità di C-3-G, EGCG, ECG, CA, Car.

Le concentrazioni scelte per gli studi di tossicità sono riportati in tabella 9. Gli studi di citotossicità hanno portato alla scelta delle concentrazioni 10 μ M per AFB1, che determina una diminuzione della vitalità nelle HepG2 del 50 % ($p < 0.001$) rispetto al controllo, e 60 μ M per OTA, che determina una diminuzione della vitalità nelle LLC-PK1 del 40 % ($p < 0.001$).

Figura 16. Curve di tossicità ottenute con il metodo MTT dopo 24 o 48 h di esposizione a: **a** AFB1 nella linea HepG2; **b** OTA nella linea LLC-PK1. I risultati sono una media di 3 differenti esperimenti \pm SD.

a)



b)

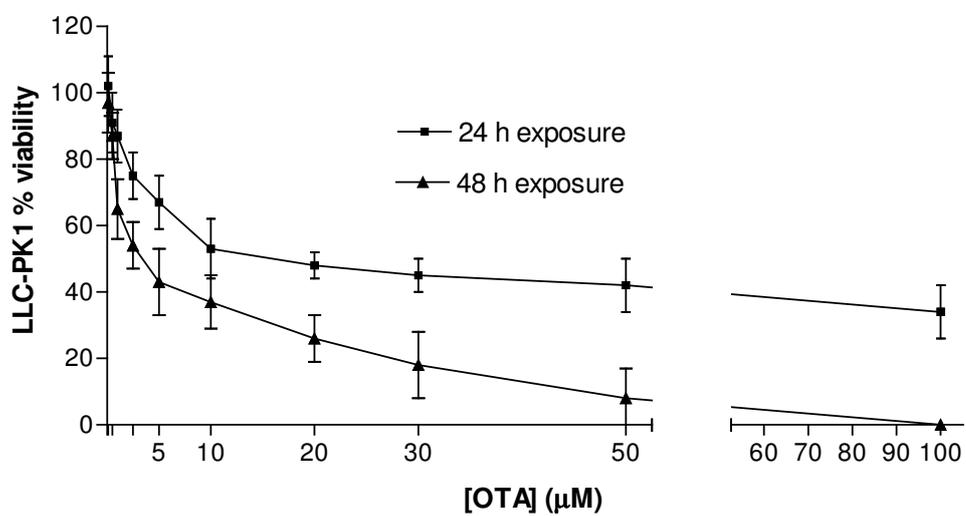


Figura 17. Curve di citotossicità ottenute con il metodo MTT dopo esposizione di 24 h a: **a** C-3-G nella linea HepG2; **b** EGCG nella linea LLC-PK1; **c** ECG nella linea LLC-PK1; **d** CA nella linea LLC-PK1; **e** CA nella linea HepG2; **f** Car nella linea LLC-PK1.

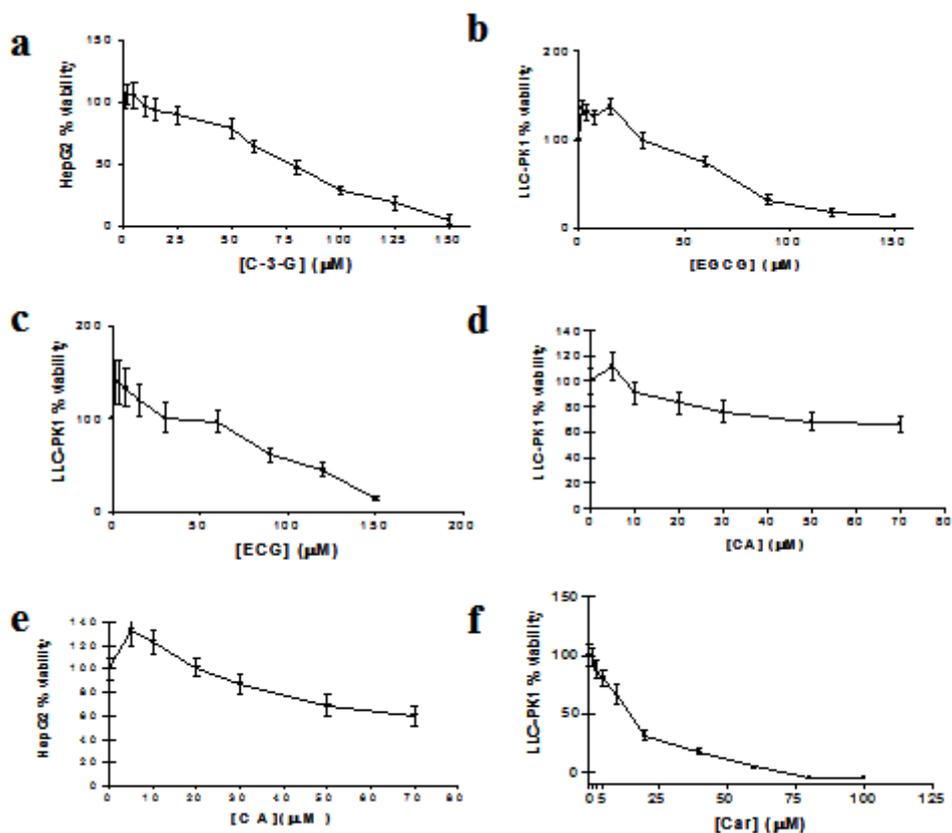


Tabella 9. Concentrazioni delle micotossine e degli antiossidanti scelte per i test di citotossicità.

	Concentrazione (μM)	Diminuzione % vitalità	
		HepG2	LLC-PK1
AFB1	10	50 % (p<0.001)	
OTA	60		40% (p<0.001)
C-3-G	25	11 % (p<0.05)	
	50	21 % (p<0.05)	
EGCG	10		0 %
	30		0 %
ECG	30		0 %
	60		0 %
CA	10	0 %	9 % (p<0.05)
	20	0 %	17 % (p<0.05)
	30	13 % (p<0.05)	24 % (p<0.01)
Car	1		1 % (p>0.05)
	2.5		12 % (p<0.01)
	5		19 % (p<0.01)

Citoprotezione. In questi studi è stato verificato se un pre-trattamento di 24 h con uno degli antiossidanti considerati, fosse in grado di prevenire la citotossicità indotta dalle micotossine.

In figura 18 e in tabella 10, sono riportati i risultati relativi agli esperimenti di citoprotezione: solamente il Car alle concentrazioni 2.5 e 5 μM non è in grado di proteggere le cellule LLC-PK1 da morte indotta da OTA. Tutti gli altri trattamenti sono in grado di inibire la citotossicità indotta dalle micotossine in modo significativo.

Figura 18. Effetto citoprotettivo di un pre-trattamento di 24 h con antiossidante nei confronti di una esposizione di 24 h alla micotossina (AFB1 nella linea HepG2 o OTA nella linea LLC-PK1). I risultati sono espressi come media di tre esperimenti \pm SD. $^{\circ\circ\circ}$ $p < 0.001$ rispetto alle cellule controllo; *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ rispetto alle cellule esposte alla sola micotossina.

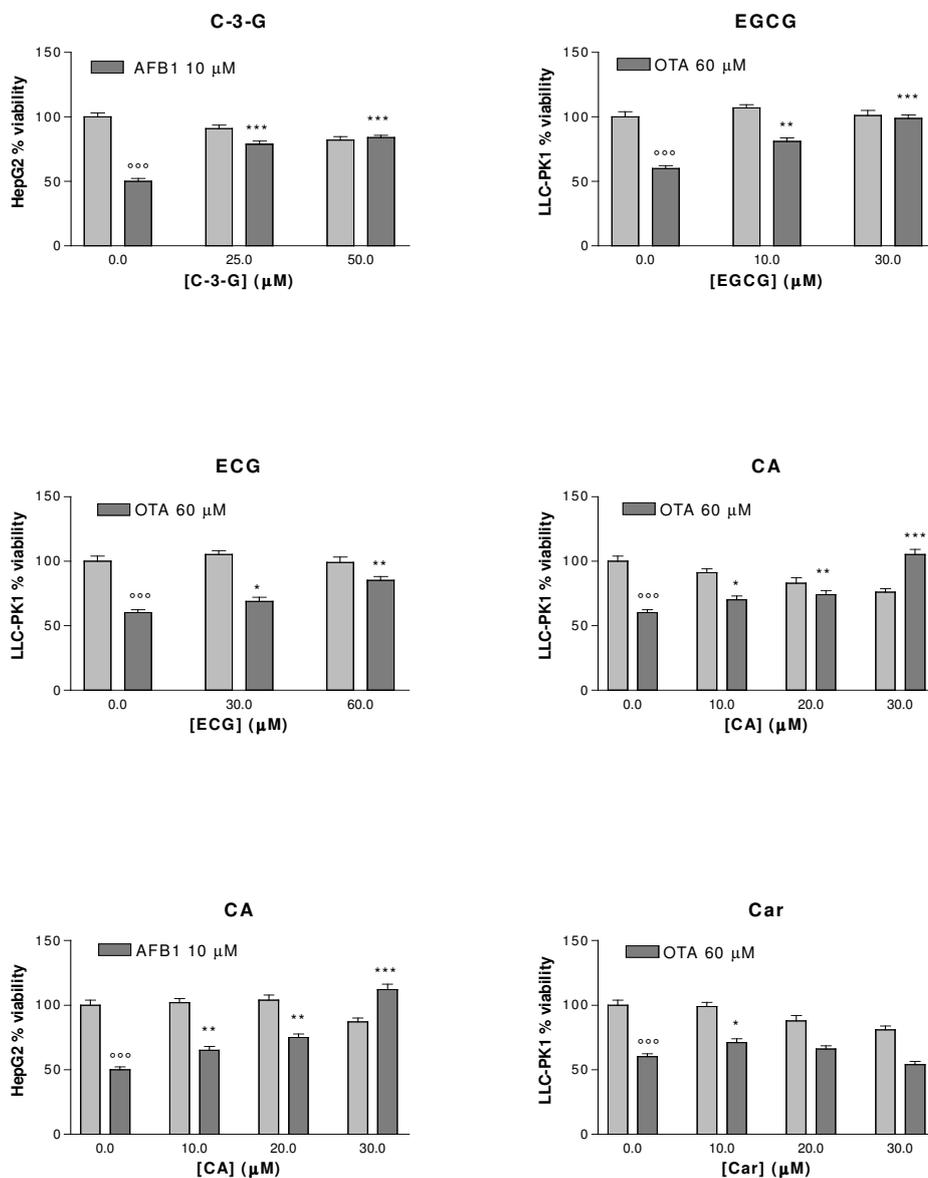


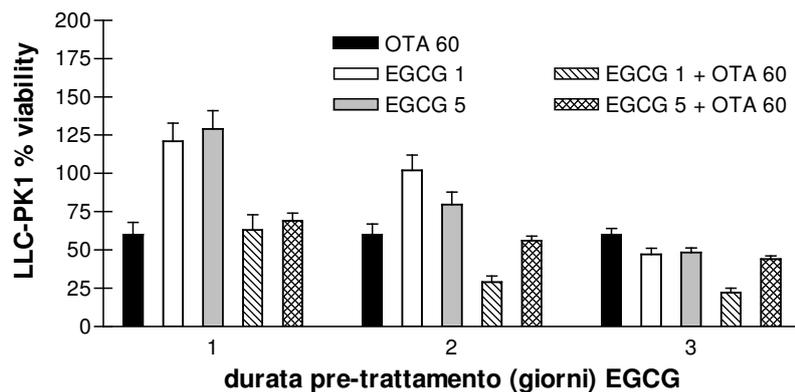
Tabella 10. Effetto citoprotettivo di un pretrattamento di 24 h con gli antiossidanti considerati, sulla citotossicità indotta da AFB1 10 μ M e OTA 60 μ M rispettivamente sulle linee HepG2 e LLC-PK1.

	Concentrazione (μ M)	Aumento % vitalità	
		HepG2	LLC-PK1
		(AFB1 10 μ M)	(OTA 60 μ M)
C-3-G	25	29 % (p<0.001)	
	50	34 % (p<0.001)	
EGCG	10		20 % (p<0.01)
	30		39 % (p<0.001)
ECG	30		9 % (p<0.05)
	60		25 % (p<0.01)
CA	10	15 % (p<0.01)	10 % (p<0.05)
	20	25 % (p<0.01)	14 % (p<0.01)
	30	62 % (p<0.001)	55 % (p<0.001)
Car	1		11 % (p<0.05)
	2.5		6 % (p>0.05)
	5		- 6 % (p>0.05)

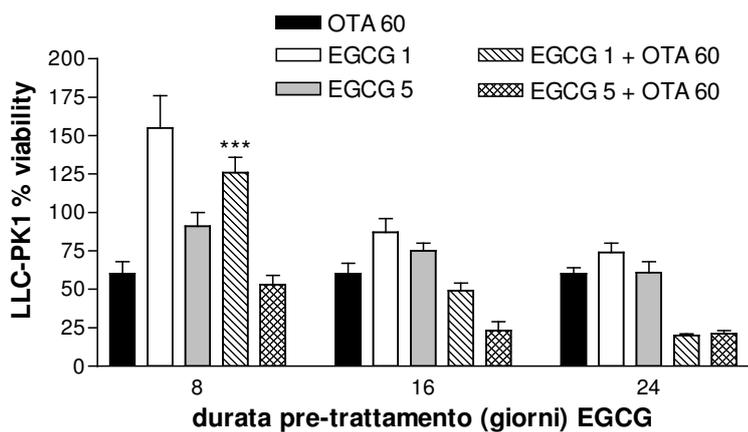
Oltre ai test di citoprotezione con pre-trattamenti di 24 h, sono stati effettuati test con EGCG a concentrazioni inferiori e tempi di pre-trattamento lunghi. I risultati mostrano una capacità citoprotettiva se il pre-trattamento era di 8 giorni con EGCG 1 μ M (p<0.001) nei confronti di esposizione a OTA 60 μ M per 24 h. Nella figura 19 sono riportati i risultati ottenuti.

Figura 19. Vitalità delle LLC-PK1 dopo pre-trattamenti a vari tempi con EGCG 1 e 5 μ M ed esposizione di 24 h ad OTA 60 μ M. a) pre-trattamenti di 1, 2 e 3 giorni; b) pre-trattamenti di 1, 2 e 3 settimane. I dati di vitalità sono stati ottenuti con il metodo dell'MTT. I risultati sono espressi come la media di tre differenti esperimenti \pm SD. *** $p < 0.001$ rispetto alle cellule esposte alla sola OTA.

a)

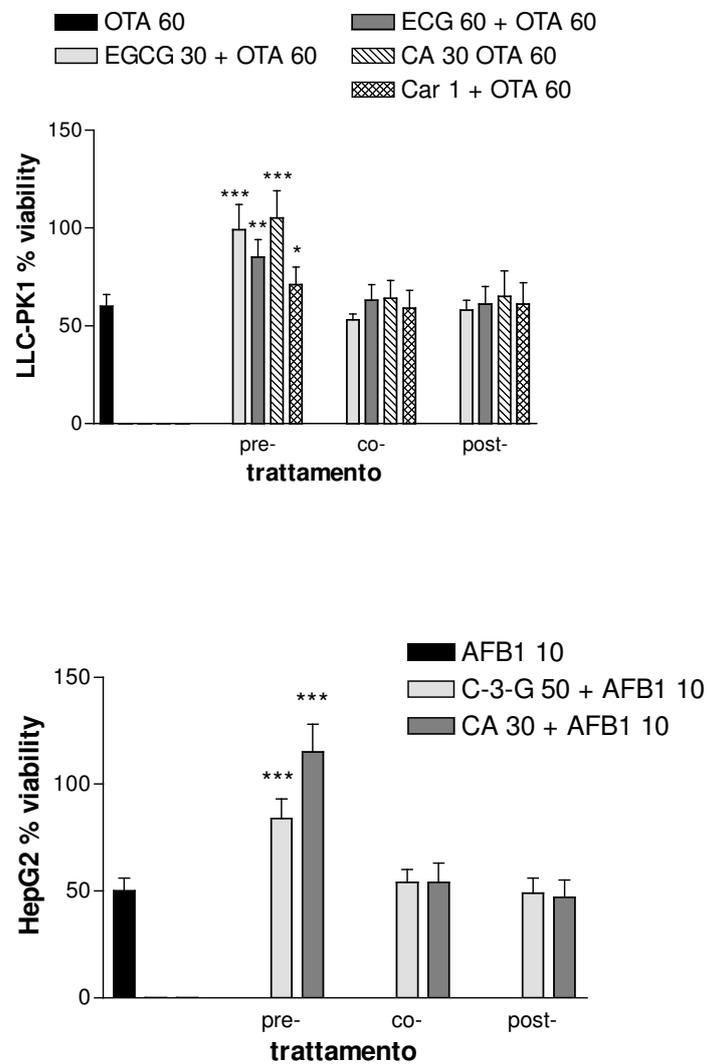


b)



Pre-, co- e post-trattamento. Solo il pre-trattamento risulta attivo nel prevenire la mortalità indotta da micotossine sulle linee cellulari considerate. I risultati sono riportati in figura 20.

Figura 20. Effetti di pre-, co- e post-trattamento con antiossidanti sulla citotossicità indotta dalle micotossine (AFB1 sulla linea HepG2 e OTA sulla linea LLC-PK1). I dati di vitalità sono stati ottenuti con l'MTT test. I risultati sono espressi come la media di tre differenti esperimenti \pm SD. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ rispetto alle cellule trattate con la sola micotossina.



Determinazione della produzione di ROS.

Dopo un periodo di 8 e 12 ore di incubazione con concentrazioni crescenti di OTA e AFB1 (0-100 μM), la produzione di ROS aumenta in modo dose-dipendente in entrambe le linee cellulari (tabella 11).

Tabella 11. Valori della produzione di ROS indotta esposizione di 8 e 12 h a concentrazioni crescenti di AFB1 e OTA rispettivamente su HepG2 e LLC-PK1.

[AFB1] (μM)	Time of exposure		[OTA] (μM)	Time of exposure	
	8 h	12 h		8 h	12 h
1	120 %	119 %	1	101 %	119 %
5	196 %	189 %	5	126 %	145 %
10	* 256 %	263 %	10	137 %	187 %
20	350 %	372 %	20	164 %	201 %
30	467 %	474 %	30	172 %	234 %
50	ND	ND	60	* 192 %	262 %
100	ND	ND	100	225 %	298 %

ND = non misurabile. La quantità di ROS prodotta determina una fluorescenza fuori dal fondo scala dello strumento

* trattamento scelto per gli studi con gli antiossidanti

In figura 21 e in tabella 12 sono riportati i risultati di un pre-trattamento di 24 h con gli antiossidanti, sull'aumento della concentrazione di ROS indotta dalle micotossine.

Figura 21. Effetto di un pre-trattamento di 24 h con antiossidanti sulla produzione di ROS indotta da esposizione di 8 h a AFB1 10 μ M e OTA 60 μ M rispettivamente nelle linee HepG2 e LLC-PK1. I dati sono espressi come media di tre esperimenti \pm SD. La produzione relativa di ROS è riferita al controllo (100%). *** p<0.001, ** p<0.01, * p<0.05 rispetto alle cellule esposte alla sola micotossina.

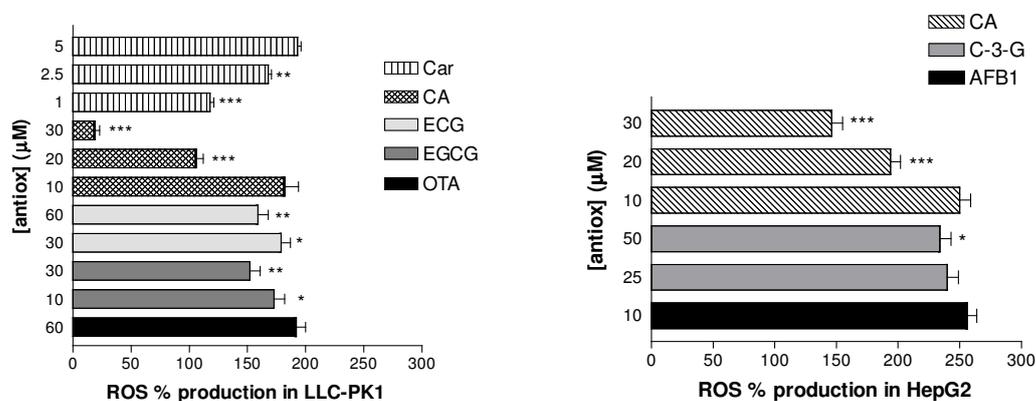


Tabella 12. Effetto di un pre-trattamento di 24 h con antiossidanti sulla produzione di ROS indotta da esposizione di 8 h a AFB1 10 μ M e OTA 60 μ M rispettivamente nelle linee HepG2 e LLC-PK1. La produzione relativa di ROS è riferita al controllo (100%).

	Concentrazione (μ M)	Diminuzione % conc ROS	
		HepG2	LLC-PK1
		(rispetto AFB1 10 μ M)	(rispetto OTA 60 μ M)
C-3-G	25	16 % (p>0.05)	
	50	22 % (p<0.05)	
EGCG	10		19 % (p<0.05)
	30		40 % (p<0.01)
ECG	30		13 % (p<0.05)
	60		33 % (p<0.01)
CA	10	10 % (p<0.05)	6 % (p>0.05)
	20	86 % (p<0.001)	62 % (p<0.001)
	30	173 % (p<0.001)	110 % (p<0.001)
Car	1		74 % (p<0.001)
	2.5		24 % (p<0.05)
	5		0 %

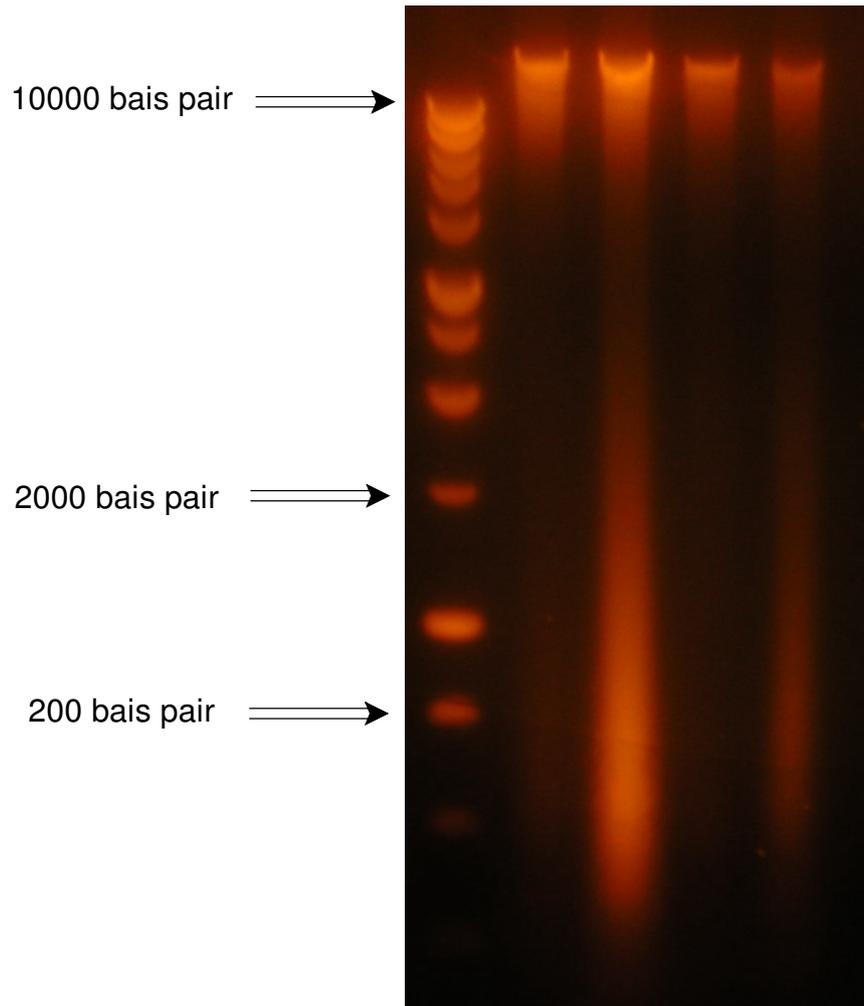
Apoptosi: frammentazione del DNA.

Il trattamento con micotossine causa l'induzione di eventi apoptotici in sistemi sperimentali *in vitro*. Allo scopo di valutare se la pre-incubazione con antiossidanti fosse in grado di prevenire il fenomeno dell'apoptosi indotto da AFB1 e OTA è stato valutato il grado di frammentazione del DNA in cellule HepG2 e LCPK1 trattate prima con antiossidanti per 24 h, poi esposte alle micotossine per altre 24 h. In figura 22 sono riportate le fotografie del gel di agarosio.

Figura 22. Effetto di un pre-trattamento con antiossidanti di 24 h sulla frammentazione del DNA indotta dall'esposizione di 24 h delle due linee cellulari, HepG2 e LLC-PK1, rispettivamente a AFB1 10 μ M e OTA 60 μ M. Il ladder, nella banda a sinistra del gel di agarosio 1 %, è un indicatore delle dimensioni dei frammenti presenti nelle bande. La banda a 200 paia di basi è indice di frammentazione del DNA e quindi di morte apoptotica. **a** C-3-G 50 μ M in HepG2, **b** EGCG 30 μ M e ECG 60 μ M in LLC-PK1, **c** CA 30 μ M in HepG2 e LLC-PK1, **d** Car 1 μ M.

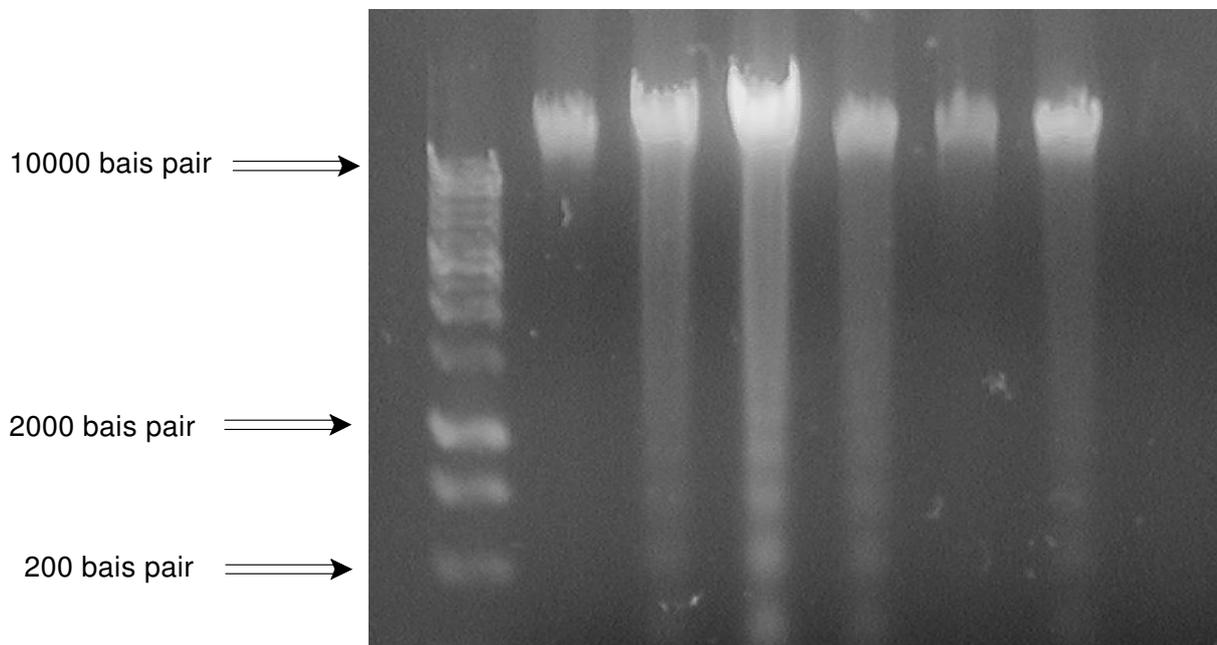
a

HepG2				
AFB1 10 μ M	-	+	-	+
C-3-G 30 μ M	-	-	+	+



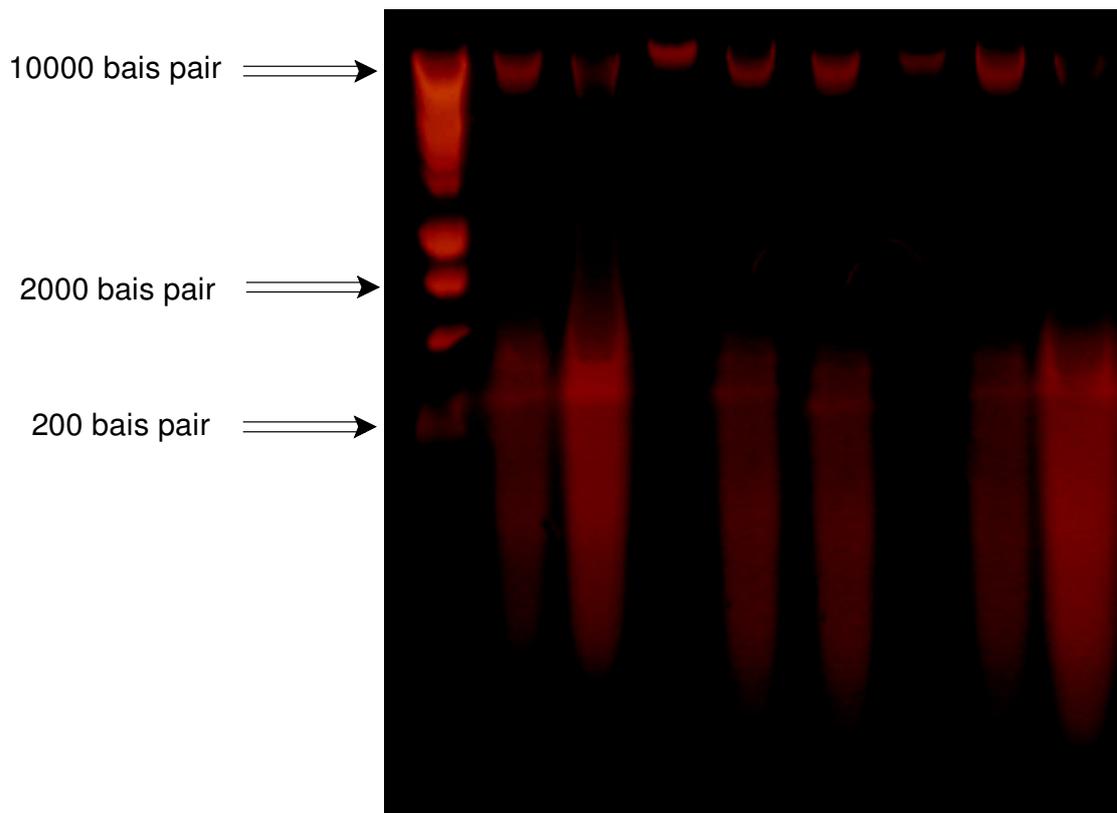
b

LLC-PK1							
OTA 60 μ M	-	-	+	+	-	+	-
EGCG 30 μ M	-	-	-	+	-	-	-
ECG 60 μ M	-	-	-	-	+	+	+
H ₂ O ₂ 2mM	-	+	-	-	-	-	-



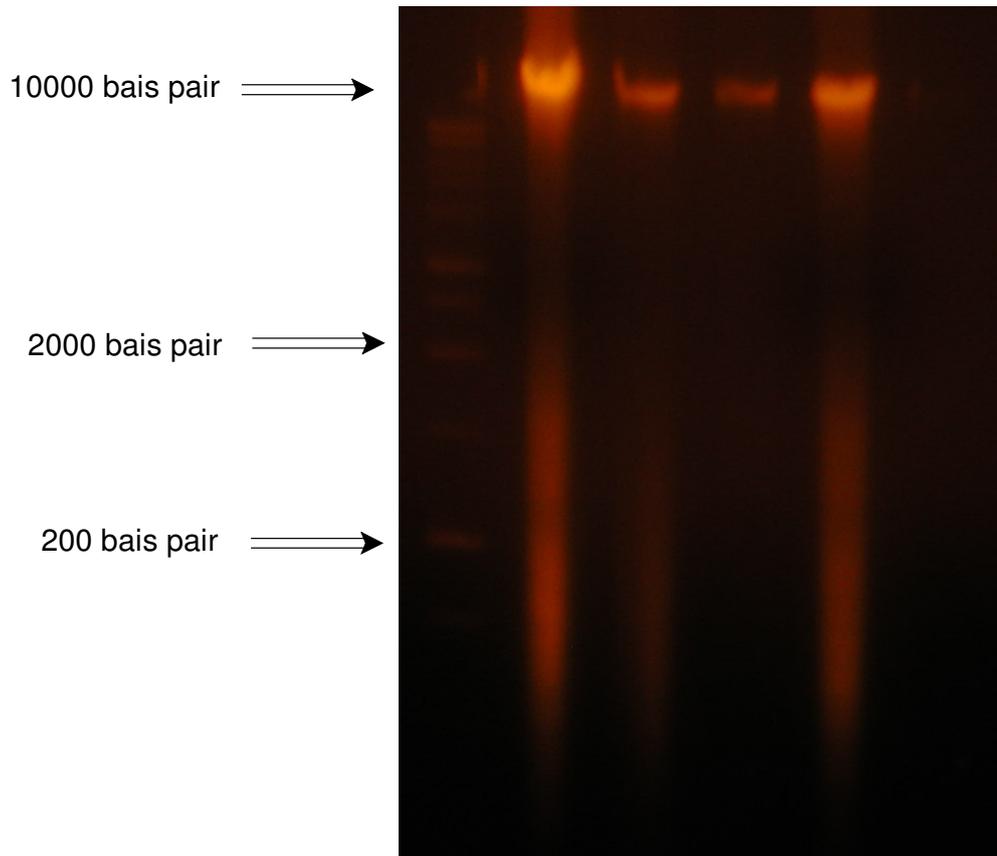
c

	HepG2				LLC-PK1			
AFB1 10 μ M	-	+	-	+	-	-	-	-
OTA 60 μ M	-	-	-	-	-	-	+	+
CA 30 μ M	+	-	-	+	+	-	+	-



d

	LLC-PK1				
AFB1 10 μ M	+	-	-	-	+
H ₂ O ₂ 2 mM	-	-	-	+	-
Car 1 μ M	-	+	-	-	+



Ossidazione del DNA.

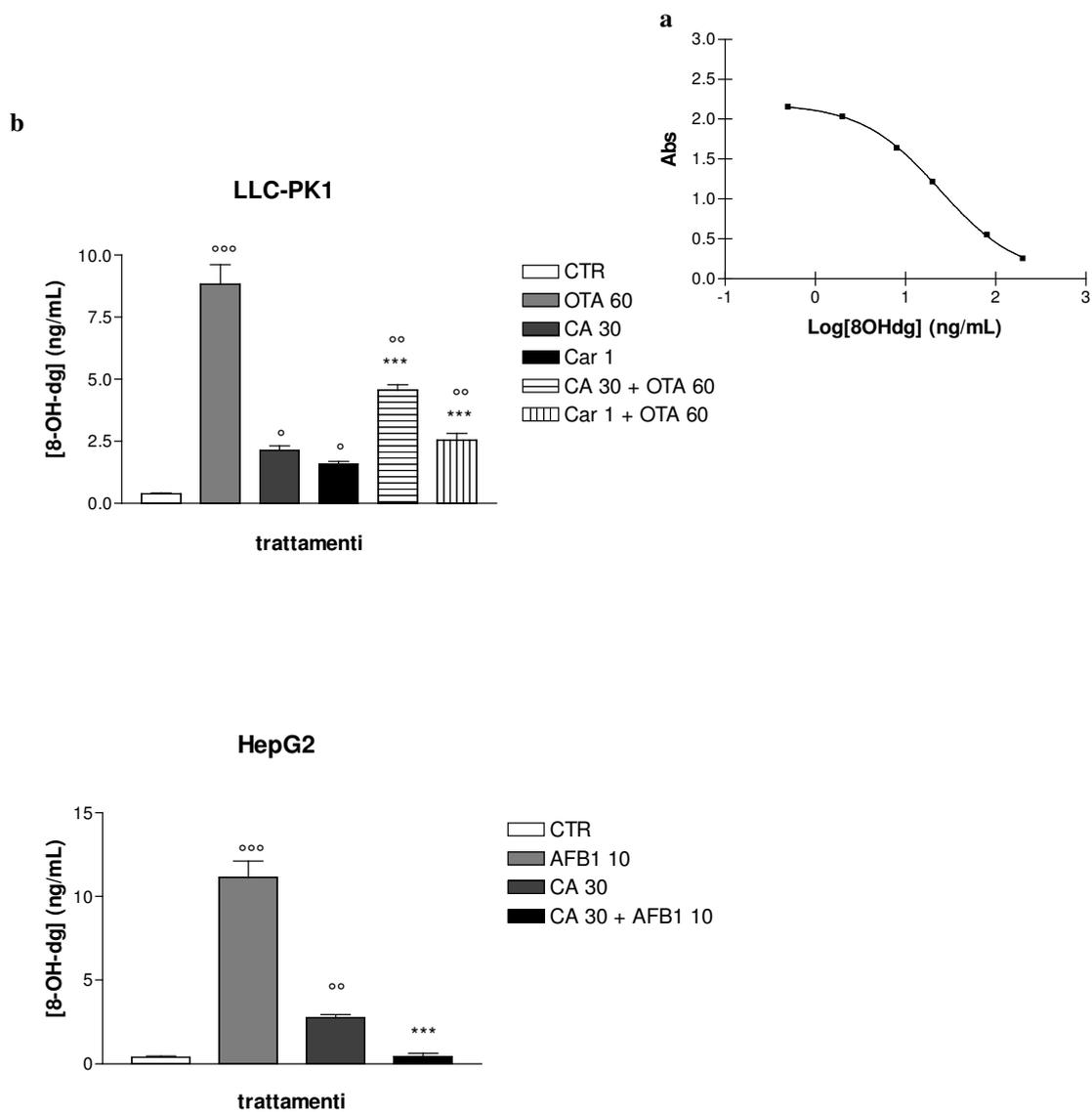
In tabella 13 e in figura 23 sono riportati gli effetti del pre-trattamento per 24 h con gli antiossidanti sull'aumento della concentrazione di 8-OH deossiguanina indotta dalle micotossine.

Tabella 13. **A** aumento della concentrazione di 8-OH deossiguanina nel DNA genomico, indotta dalle due micotossine. **B** effetto del pre-trattamento per 24 h con antiossidante sull'aumento della concentrazione di 8-OH deossiguanina indotta dalle micotossine

A	[8-OH deossiguanina] (ng/mL)	
	HepG2	LLC-PK1
CTR	0.39	0.38
AFB1	11.1 (p<0.001)	
OTA	8.8 (p<0.001)	

B	Concentrazione (μ M)	Diminuzione [8-OH deossiguanina] (ng/mL)	
		HepG2 (rispetto AFB1 10 μ M)	LLC-PK1 (rispetto OTA 60 μ M)
CA	30	8.38 (p<0.001)	4.26 (p<0.001)
Car	1		6.28 (p<0.001)

Figura 23. Effetto di un pretrattamento di 24 h con CA 30 μ M o Car 1 μ M sull'ossidazione del DNA indotta dall'esposizione delle cellule per 24 h alla micotossina (AFB1 nelle HepG2 e OTA nelle LLC-PK1). **a** Curva di taratura dello standard, **b** concentrazioni di 8-OH-dg nelle cellule HepG2 e LLC-PK1 con e senza pre-trattamento con antiossidante. I risultati sono espressi media di 3 differenti esperimenti \pm SD. $^{\circ\circ\circ}$ $p < 0.001$, $^{\circ\circ}$ $p < 0.01$, $^{\circ}$ $p < 0.05$ rispetto alle cellule controllo. *** $p < 0.001$ rispetto alle cellule esposte alla sola micotossina.



DISCUSSIONE

Attività antiossidante.

Tale ricerca si è basata sull'ipotesi che molecole scavengers di radicali liberi fossero in grado di contrastare i danni indotti da alcune micotossine come AFB1 e OTA, che favoriscono la produzione di ROS e quindi lo stress ossidativo che è uno dei meccanismi della loro tossicità.

L'attività scavenger di radicali liberi delle molecole considerate (C-3-G, EGCG, ECG, CA, Car) è stata valutata con il metodo BR e con il metodo TEAC.

Metodo BR. Tale metodica ha alcuni vantaggi rispetto ad altre di più comune utilizzo. Innanzitutto valuta l'attività antiossidante a un pH simile a quello dello stomaco (a differenza degli altri metodi disponibili). Il primo sito di azione tossica delle micotossine può infatti essere lo stomaco perchè l'intossicazione avviene soprattutto per ingestione. Proprio in questa sede quindi è importante che tali antiossidanti svolgano la loro funzione di scavenger di radicali liberi. In effetti sono state riportate evidenze sperimentali che lo stomaco agisce come un bioreattore nel quale molte sostanze possono interagire (Kanner e Lapidot, 2001). E' stato anche dimostrato che antocianine vengono rapidamente assorbite nelle pareti gastriche (Talavera et al., 2003).

Inoltre il metodo BR indica la capacità di una molecola di sottrarre i radicali HOO^\bullet , i quali sono radicali 'fisiologici' e che comunque sono molto simili come dimensioni e proprietà chimico-fisiche ai radicali HO^\bullet , la specie radicalica più pericolosa per l'organismo. I metodi comunemente utilizzati (TEAC, DPPH, ecc.) utilizzano radicali molto grandi, quindi assai diversi dalla natura dei ROS fisiologici.

Metodo TEAC. Il metodo TEAC, che utilizza come standard il Trolox, un derivato idrosolubile a pH 7.4 della vitamina E, è ampiamente utilizzato per lo studio dello stato antiossidante del sangue (pH 7.4) oltre che per la determinazione dell'attività antiossidante di sostanze pure o in matrice. Si è deciso di utilizzare questo metodo per due ragioni: in primo luogo per avere un confronto dei valori BR con quelli ottenuti tramite un metodo classico e consolidato; in secondo luogo si è ritenuto indispensabile valutare l'attività antiossidante di

queste molecole, anche a pH 7.4, più vicino a quello dei distretti in cui poi è richiesta la loro azione (ad esempio fegato o rene).

Comunque per le differenze di pH, dei radicali utilizzati e delle condizioni sperimentali, i risultati ottenuti con i due metodi non possono essere direttamente confrontabili. Di seguito si riportano gli ordini di attività antiossidante BR e TEAC.

BR: C-3-G (1.95) > EGCG (1) > ECG (0.8) > CA (0.4)

TEAC: EGCG (5) > ECG (3.6) > C-3-G (3.48) > Car (1.04) > CA (0.95)

L'attività di sottrazione di ROS è determinata dalla capacità della molecola scavenger di donare un H[•] al radicale generando un radicale stabile (stabilizzato per risonanza o mesomeria), che non è in grado quindi di proseguire la catena radicalica.

Attività chemopreventiva.

Il pre-trattamento con le molecole prese in esame determina una diminuzione della citotossicità, una diminuzione della produzione di ROS, della presenza di frammenti di 200 bp di DNA e dell'ossidazione del DNA indotti dalle micotossine. Tale effetto è dose dipendente in entrambe le linee cellulari; mentre per C-3-G, EGCG, ECG e CA l'effetto cresce all'aumentare della dose, il Car mostra un comportamento inverso. Al contrario un co- e un post- trattamento non danno risultati apprezzabili. In figura 24 è riportato l'effetto dei pre-trattamenti sui parametri considerati.

Si può ipotizzare che un pre-trattamento sia necessario perchè le molecole di antiossidante attraversino la membrana cellulare e si trovino nel citoplasma (o nella membrana) dove possono esercitare l'azione di scavenger di radicali liberi nei confronti dei ROS prodotti in seguito all'azione tossica di OTA e AFB1. Conseguentemente si ha una diminuzione dell'ossidazione del DNA indotta dalle micotossine e una diminuzione dell'apoptosi che si osserva dopo esposizione delle cellule a OTA o AFB1.

Figura 24. Schema riassuntivo degli effetti prodotti dai pretrattamenti descritti sulla citotossità indotta da AFB1 e OTA.

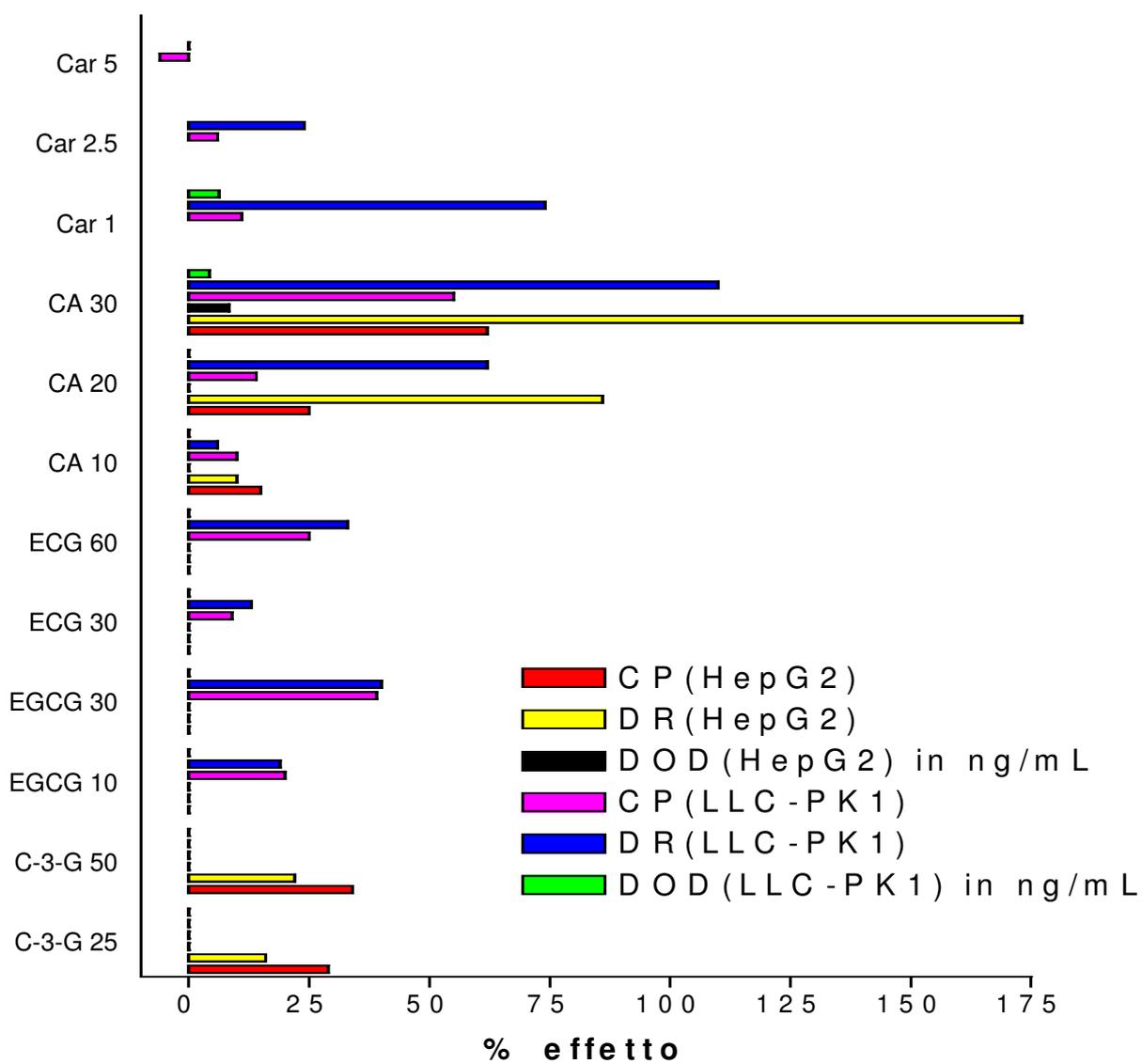
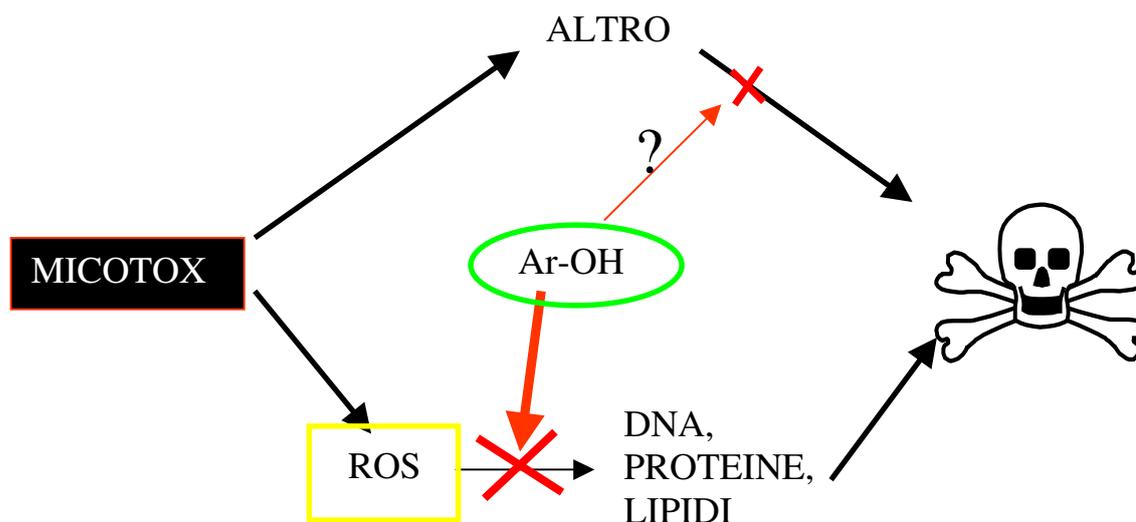


Figura 25. Ipotesi meccanismo d'azione degli scavenger di radicali liberi nei confronti del danno indotto da micotossine.



Al fine di poter comparare l'efficacia dei vari antiossidanti nel prevenire i danni indotti dalle due micotossine, gli effetti del pre-trattamento con antiossidanti sono stati riferiti a 1 μ mole di sostanza attraverso la formula:

$$FP_{\mu\text{mole}_m} = \Sigma_n(\% \text{ protezione} / [\text{antiox}]_{\mu\text{M}}) / n$$

dove:

- $FP_{\mu\text{mole}_m}$: fattore di protezione medio determinato da 1 μ mole di antiossidante.
- n: numero di concentrazioni
- % protezione: effetto determinato dal pre-trattamento sulla citotossicità, concentrazione di ROS o ossidazione del DNA
- $[\text{antiox}]_{\mu\text{M}}$: concentrazione dell'antiossidante in μM

In tabella 14 sono riportati i valori ottenuti.

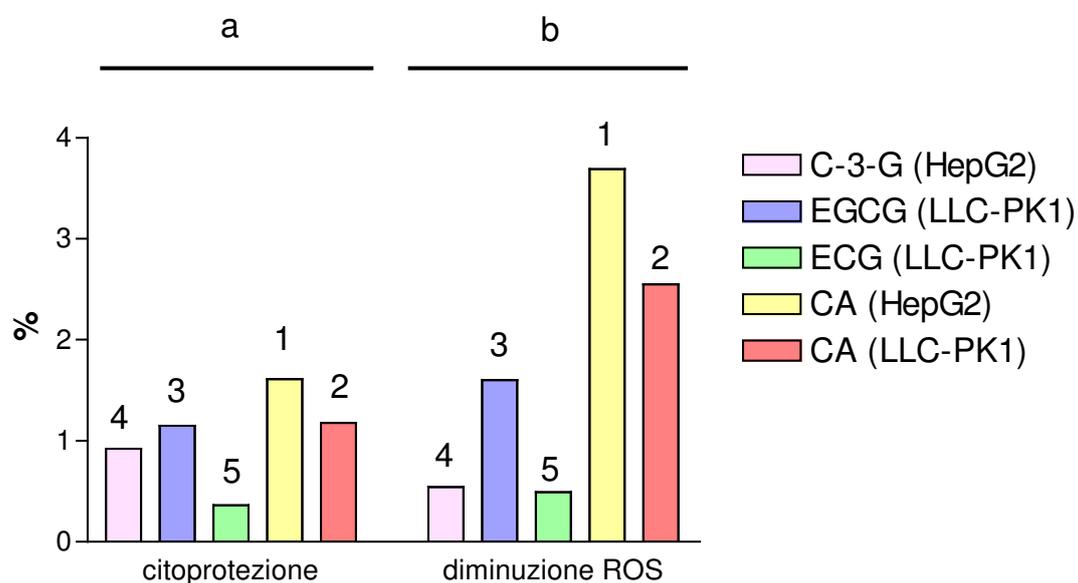
Tabella 14. Valori calcolati di citoprotezione (CP/ μM), diminuzione dei ROS (DR/ μM) e diminuzione dell'ossidazione del DNA (DOD/ μM) calcolati con la formula: $FP_{\mu\text{mole}_m} = \Sigma_n(\% \text{ protezione} / [\text{antiox}]_{\mu\text{M}}) / n$.

	Conc (μM)	HepG2			LLC-PK1		
		CP/ μM	DR/ μM	DOD/ μM	CP/ μM	DR/ μM	DOD/ μM
C-3-G	25	1.16	0.64				
	50	0.68	0.44				
	<i>Media</i>	<i>0.92</i>	<i>0.54</i>				
EGCG	10				1	1.9	
	30				1.3	1.3	
	<i>Media</i>				<i>1.15</i>	<i>1.6</i>	
ECG	30				0.3	0.43	
	60				0.42	0.55	
	<i>Media</i>				<i>0.36</i>	<i>0.49</i>	
CA	10	1.5	1		1	0.9	
	20	1.25	4.3		0.7	3.1	
	30	2.07	5.77	0.28	1.83	3.67	0.14
	<i>Media</i>	<i>1.61</i>	<i>3.69</i>	<i>0.28</i>	<i>1.18</i>	<i>2.55</i>	<i>0.14</i>
Car	1				11	74	6.28
	2.5				2.4	9.6	
	<i>Media</i>				<i>6.7</i>	<i>41.8</i>	<i>6.28</i>

Attività chemopreventiva e capacità scavenger di radicali liberi.

In figura 26 sono rappresentati i valori medi di citoprotezione e di attività di ROS-scavenger (v. tabella 11).

Figura 26. **a** Efficacia citoprotettiva e **b** attività scavenger di ROS. Car non è rappresentato in quanto fuori scala sia per **a** che per **b**.



Come si può osservare vi è una relazione tra i due parametri considerati infatti l'ordine crescente per entrambi è:

Car > CA (HepG2) > CA (LLC-PK1) > EGCG > C-3-G > ECG

Al contrario non esiste alcuna relazione tra attività scavenger di radicali liberi determinata per via chimica e quella riscontrata invece sulle linee cellulari. Questo potrebbe essere dovuto alle diverse condizioni sperimentali.

Meccanismi chemopreventivi indipendenti dalla capacità scavenger di ROS.

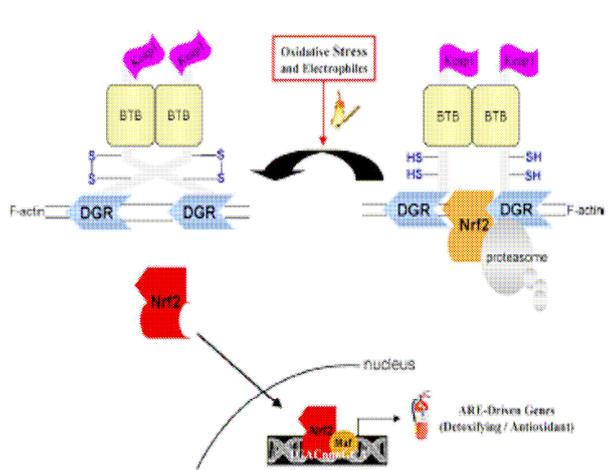
Molecole con determinate caratteristiche chimico fisiche, quali la presenza di un piano aromatico idrofobico o la presenza di gruppi elettrofili, sono in grado di indurre la trascrizione degli enzimi di fase I e II, e dei trasportatori di xenobiotici (oggi indicati anche come metabolismo di fase III).

Il metabolismo di fase I determina un aumento dell'idrofilia della molecola e comprende reazioni di ossidazione e di riduzione. Lo scopo di queste reazioni è attivare gli xenobiotici per le reazioni di coniugazione (fase II) con molecole quali il glutatione, l'acido glucuronico, gruppi metile, acetile e solfato. Le reazioni di fase I, sebbene utili affinché possano avvenire le reazioni di fase II, spesso attivano molecole potenzialmente cancerogene a cancerogeni. In un'ottica di chemoprevenzione può essere auspicabile l'individuazione di molecole in grado di inibire le reazioni di fase I. Le reazioni di coniugazione invece inattivano gli xenobiotici e ne facilitano l'eliminazione. Accanto a queste reazioni metaboliche agiscono anche molecole trasportatrici, sia assorbendo gli xenobiotici nel citoplasma, sia espellendoli, insieme a loro metaboliti, nello spazio extracellulare. In linea generali, da un punto di vista chemopreventivo sono utili le sostanze in grado di aumentare il metabolismo di fase II e fase III. I sistemi metabolici che più sono coinvolti nella chemoprevenzione sono: fase I- CYP 1A1, 1A2, 2E1 e 3A4; fase II- UDP-glucuronil transferasi (UGT), glutatione transferasi (GST), chinone reductasi (QR); fase III- multidrug resistano protein (Mdr), Organic anion-transporting polipeptide (Oatp), Organic anion transporter (Oat), Organic cation transporter (Oct) (Klaassen, 2002; Sheweita e Tilmisany, 2003, Xu et al., 2005).

Un meccanismo d'azione proposto per l'attività chemopreventiva di alcuni composti naturali polifenolici come ad esempio i flavonoidi, o i derivati caffeici, è l'induzione degli enzimi di fase II (Moon et al., 2006). Tale induzione avviene tramite il fattore di trascrizione Nrf2. Nrf2 è associato alla proteina Keap1 e tramite essa ai filamenti di actina dove viene ubiquitinilato e degradato da sistemi proteasomici. La proteina Keap1 contiene 25 residui di cisterna mentre la proteina Nrf2 ne contiene 7. Questa alta presenza di gruppi -SH rende queste due proteine molto sensibili allo stato redox del citoplasma e agli elettrofili. L'interazione di

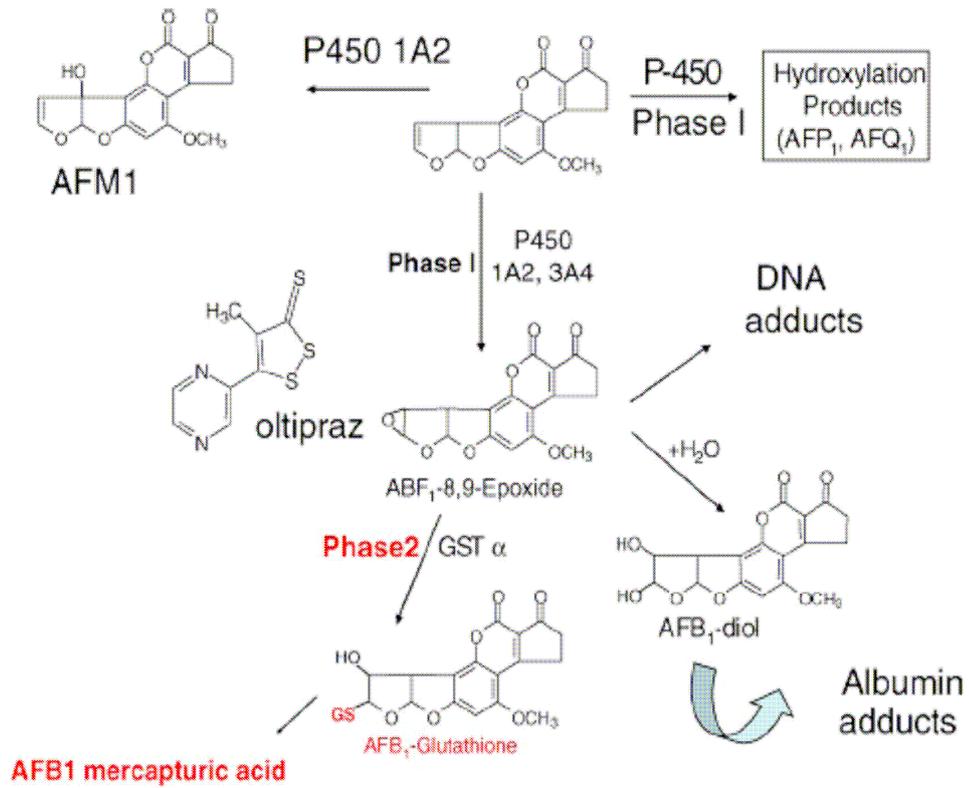
Keap1 o Nrf2 con specie elettrofile determina un cambiamento della loro struttura e Nrf2 viene liberato. La forma libera di Nrf2 migra all'interno del nucleo dove forma eterodimeri con piccole proteine (maf) e può interagire con l'antioxidant response element o l'electrophile response element (ARE/ERE) (Lee e Surh, 2005; Pool-Zobel et al., 2005). Tali promotori della trascrizione sono presenti su geni che codificano per enzimi di fase II. In figura 27 è riportato lo schema di attivazione della trascrizione di enzimi inducibili di fase II.

Figura 27. Meccanismo di interazione tra Nrf2 e Keap1.



Negli anni '80 l'oltipaz fu ampiamente studiato per la terapia della schistosomiasi. E' stato osservato che una singola dose di oltipaz era in grado di elevare l'attività degli enzimi di fase II nei tessuti epatici ed extraepatici. Studi sull'attività chemopreventiva dell'oltipaz hanno messo in evidenza le proprietà preventive dell'oltipaz nei confronti del cancro al colon, alla mammella, al pancreas, ai polmoni, allo stomaco, alla pelle e al fegato, in modelli sperimentali. Roebuck e collaboratori hanno riportato che l'assunzione di oltipaz inibisce la cancerogenesi indotta da AFB1 (figura 28), probabilmente inducendo la trascrizione della glutatione transferasi che catalizza la coniugazione della AFB1 8,9 epossido con il glutatione (Pool-Zobel et al., 2005).

Figura 28. Detossificazione da AFB1 indotta da oltipraz.



CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI

Le strategie alimentari chemopreventive possono essere un metodo facilmente attuabile per contrastare i danni che le micotossine determinano sia nell'uomo che nell'animale.

Le molecole individuate in questo studio sono presenti in diversi vegetali quali il rosmarino, la salvia (carnosolo, acido carnosico), il tè verde, il vino rosso, la cioccolata fondente (catechine), arance rosse, mirtilli, melograno (cianidina). Tali vegetali possono normalmente entrare a fare parte della nostra dieta, ma anche in quella animale in forma di estratti miscelabili ai mangimi.

Per approfondire le conoscenze attuali sul meccanismo d'azione delle molecole prese in considerazione, sono in progetto nuovi esperimenti. Tali esperimenti studieranno l'effetto dose/tempo di trattamenti con gli antiossidanti C-3-G, EGCG, ECG, CA e Car sull'attività di alcuni enzimi di fase II quali la glutatione-S-transferasi e la glutatione perossidasi, e sulla disponibilità intracellulare di glutatione ridotto, nelle linee cellulari LLC-PK1 e HepG2.

Altri studi sono in progetto per verificare la capacità chemopreventiva di tali molecole nei confronti dei danni indotti da micotossine, in presenza o in assenza di inibitori specifici della glutatione-S-transferasi.

Si intende poi verificare gli effetti chemopreventivi di estratti vegetali contenenti le molecole studiate. L'utilizzo di estratti vegetali anziché molecole pure determina una diminuzione dei costi. Inoltre negli estratti potrebbe verificarsi un effetto sinergico tra le molecole presenti.

BIBLIOGRAFIA

Abel S, Gelderblom WC. 1998. Oxidative damage and fumonisin B1-induced toxicity in primary rat hepatocytes and rat liver in vivo. *Toxicology* **131**:121-131.

Amorini AM, Fazzina G, Lazzarino G, Tavazzi B, Di Piero D, Santucci R, Simibaldi F, Galvano F, Galvano G. 2001. Activity and mechanism of the antioxidant properties of cyanidin-3-O-beta-glucopyranoside. *Free Rad. Res.* **35**:953-966.

Aruoma OI, Halliwell B, Aeschbach R, Loligers J. 1992. Antioxidant and pro-oxidant properties of active rosemary constituents: carnosol and carnosic acid. *Xenobiotica* **22**:257-268.

Atroschi F, Biese I, Saloniemi H, Ali-Vehmas T, Saari S, Rizzo A, Veijalainen P. 2000. Significance of apoptosis and its relationship to antioxidants after ochratoxin A administration in mice. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* **3**:281-291.

Autrup H, Bradley KA, Shamsuddinm AKM, Wakhisi J, Wasunna A. 1983. Detection of a putative adduct with fluorescence characteristics identical to 2,3-dihydro-2-(7-guanyl)-3-hydroxy aflatoxin B1 in human urine collected in Muranga district, Kenya. *Carcinogenesis* **4**:1193-1195.

Baudrimont I, Sostarci B, Yenot C, Betbeder AM, Dano-Djedje S, Sanni A, Steyn PS, Creppy EE. 2001. Aspartame prevents the karyomegaly induced by ochratoxin A in rat kidney. *Arch. Toxicol.* **75**:176-183.

Belmadani A, Steyn PS, Tramu G, Betbeder AM, Baudrimont I, Creppy EE. 1999. Selective toxicity of ochratoxin A in primary cultures from different brain regions. *Arch. Toxicol.* **73**:108-114.

Bendele A, Carlton W, Krogh P, Lillehoj EB. 1985. Ochratoxin A carcinogenesis in the (C57BL/6J×C3H) F₁ mouse. *J. Nation. Canc. Inst.* **75**:733-742.

Bennett JW and Keller NP. 1997. Mycotoxins and their prevention. In: T. Anke, Editor, *Fungal Biotechnology*, International Thompson Publishing Company, Weinheim. 265-273.

Briggs T and Rauscher W. 1973. An oscillating iodine clock. *J. Chem. Educ.* **50**:496.

Castegnaro M, Chernozemsky IN, Hietanen E, Bartsch H. 1990. Are mycotoxins risk factors for endemic nephropathy and associated urothelial cancers? *Archive für Geschwulstforschung* **60**:205-303.

Cervellati R, Höner K, Furrow SD, Neddens C, Costa S. 2001. The Briggs-Rauscher reaction as a test to measure the activity of antioxidants. *Helv. Chim. Acta* **84**:3533-3547.

Cervellati R, Renzulli C, Guerra MC, Speroni E. 2002. Evaluation of antioxidant activity of some natural polyphenolic compounds using the Briggs-Rauscher reaction method. *J. Agric. Food Chem.* **50**:7504-7509.

Cervellati R, Höner K, Furrow SD, Mazzanti F, Costa S. 2004a. An experimental mechanistic investigation of the complexities arising during inhibition of the Briggs-Rauscher reaction by antioxidants. *Helv. Chim. Acta* **87**:133-155.

Cervellati R, Innocenti G, Dall'Acqua S, Costa S, Sartini E. 2004b. Polyphenols from *Polygala* spp. and their antioxidant activity. *Chem. Biodivers.* **1**:415-425.

Cervellati R, Speroni E, Govoni P, Guerra MC, Costa S, Arnold UW, Stuppner H. 2004c. *Wulfenia carinthiaca* Jacq. antioxidant and pharmacological activities. *Z. Naturforschung* **59**:255-262.

Costa S, Utan A, Speroni E, Cervellati R, Piva G, Prandini A, Guerra MC. 2007. Carnosic acid from rosemary extracts: a potential chemoprotective agent against aflatoxin B1. An in vitro study. *J. Appl. Toxicol.* **27**:152.

Creppy EE, Kane A, Dirheimer G, Lafarge-Frayssinet C, Mousset S, Frayssinet C. 1985. Genotoxicity of ochratoxin A in mice: DNA single-strand break evaluation in spleen, liver and kidney. *Toxicol. Lett.* **28**:29-35.

Del Bano MJ, Lorente J, Castillo J, Benavente-Garcia O, del Rio JA, Ortunto A, Quirin KW, Gerard D. 2003. Phenolic diterpenes, flavones, and rosmarinic acid distribution during the development of leaves, flowers, stems, and roots of *Rosmarinus officinalis*. Antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* **51**:4247-4253.

Eaton DL, Gallagher EP. 1994. Mechanisms of aflatoxin carcinogenesis. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **34**:135-172.

Fink-Gremmels J, Jahn A, Blom MJ. 1995. Toxicity and metabolism of ochratoxin A. *Nat. Toxins* **3**:214-220.

Furrow SD, Cervellati R, Amadori G. 2002. New substrates for the oscillating Briggs-Rauscher Reaction. *J. Phys. Chem.* **106**:5841-5850.

Gallagher EP, Kunze KL, Stapleton PL, Eaton DL. 1996. The kinetics of aflatoxin B1 oxidation by human cDNA-expressed and human liver microsomal cytochromes P450 1A2 and 3A4. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **141**:595-606.

Gautier JC, Holzhaeuser D, Markovic J, Gremaud E, Schilter B, Turesky RJ. 2001. Oxidative damage and stress response from ochratoxin A exposure in rats. *Free Radic. Biol. Med.* **30**:1089-1098.

- Gekle M. and Silbernagl S. 1996. Renal toxicodynamics of ochratoxin A: a pathophysiological approach. *Kidney Blood Press. Res.* **19**:225-235.
- Groopman JD, Dematos P, Egner PA, Love-Hunt A, Kensler TW. 1992. Molecular dosimetry of urinary aflatoxin-*N*⁷-guanine and serum aflatoxin-albumin adducts predicts chemoprotection by 1,2-dithiole-3-thione in rats. *Carcinogenesis* **13**:101-106.
- Groves CE, Morales M, Wright SH. 1998. Peritubular transport of ochratoxin A in rabbit renal proximal tubules. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **284**:943-948.
- Hayes JD, Judah DJ, Neal GE, Nguyen T. 1992. Molecular cloning and heterologous expression of a cDNA encoding a mouse glutathione *S*-transferase Yc subunit possessing high catalytic activity for aflatoxin B₁-8,9-epoxide. *Biochem. J.* **285**:173-180.
- Höner K and Cervellati R. 2002. Measurements of the antioxidant capacity of fruits and vegetables using the BR reaction method. *Eur. Food Res. Technol.* **215**:437-442.
- Höner K, Cervellati R, Neddens C. 2002. Measurements of the in vitro antioxidant activity of German white wines using a novel method. *Eur. Food Res. Technol.* **214**:356-360.
- Hsieh DP, Cullen JM, Ruebner BH. 1984. Comparative hepatocarcinogenicity of aflatoxins B₁ and M₁ in the rat. *Food Chem. Toxicol.* **22**:1027-1028.
- Huang MT, Huang TW, Lee PH, Chung YC, Hu RH, Lee CS. 1994. Expression of tumor necrosis factor and tissue adhesion molecules in the failed renal allograft. *Transplant. Proc.* **26**:2181-2183.

IARC, 1993. Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins. International Agency for Research on Cancer, Lyon. **56**:489-521.

Kamp HG, Eisenbrand G, Schlatter J, Würth K, Janzowski C. 2005. Ochratoxin A: Induction of (oxidative) DNA damage, cytotoxicity and apoptosis in mammalian cell lines and primary cells. *Toxicology* **206**:413-425.

Kanner J and Lapidot T. 2001. The stomach as a bioreactor: dietary lipid peroxidation in the gastric fluid and the effects of plant-derived antioxidants. *Free Radc. Biol. Med.* **31**:1388-1395.

Klassen CD. 2002. Xenobiotic Transporters: another protective mechanism for chemicals. *Int. J. Toxicol.* **21**:7-12.

Kljusuric JG, Djakovic S, Kuhak I, Ganic KK, Komes D, Kurtanek Z. 2005. *Acta Alimentaria* **34**:483.

Lee JJ, Jin YR, Hong JT, Kim TJ., Chung JH., Yun YP. 2006. Antiplatelet activity of carnosol is mediated by the inhibition of TXA(2) receptor and cytosolic calcium mobilization. *Vascul. Pharmacol.*

Lee SJ and Surh YJ. 2005. Nrf2 as a novel molecular target for chemoprevention. *Canc. Lett.* **224**:171-184.

Malaveille C, Brun G, Bartsch H. 1991. Genotoxicity of ochratoxin A and structurally related compounds in Escherichia coli strains: studies on their mode of action. In: M. Castegnaro, R. Pleština, G Dirheimer, I.N. Chernozemsky and H. Bartsch, Editors, Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumors. IARC Scientific Publications no. 115, International Agency for Research on Cancer, Lyon 261:266.

Masuda T, Inaba Y, Maekawa T, Takeda Y, Tamura H, Yamaguchi H. 2002. Recovery mechanism of the antioxidant activity from carnosic acid quinone, an oxidized sage and rosemary antioxidant. *J. Agric. Food Chem.* **50**:5863-5869.

Masuda T, Inaba Y, Takeda Y. 2001. Antioxidant mechanism of carnosic acid: structural identification of two oxidation products. *J. Agric. Food Chem.* **49**:5560-5565.

Meneghini R and Schumacher RI. 1977. Aflatoxin B1, a selective inhibitor of DNA synthesis in mammalian cells. *Chem Biol. Interact.* **18**:267-276.

Monnet-Tschudi F, Sorg O, Honegger P, Zurich MG, Huggett AC, Schilter B. 1997. Effects of the naturally occurring food mycotoxin ochratoxin A on brain cells in culture. *Neurotoxicology* **18**:831-839.

Moon YJ, Wang X, Morris ME. 2006. Dietary flavonoids: Effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. *Toxicology in Vitro* **20**:187-210.

Moreno S, Scheyer T, Romano CS, Vpjinov AA. 2006. Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. *Free Radic. Res.* **40**:223-231.

Moss MO. 1996. Centenary review. Mycotoxins. *Mycol. Res.* **100**:513-523.

Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**:55-63.

Ninomiya K, Matsuda H, Shimoda H, Nishida N, Kasajima N, Yoshino T, Morikawa T, Yoshikawa M. 2004. Carnosic acid, a new class of lipid absorption inhibitor from sage. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **14**:1943-1946.

Niranjan AR, Roy SK. 1982. The use of stomach cytochrome from the water snail *Pila globosa* in root tip squashes of ferns. *Stain Technol.* **57**:188-190.

Omar RF, Hasinoff BB, Mejilla F, Rahimtula AD. 1990. Mechanism of ochratoxin A-stimulated lipid peroxidation. *Biochem. Pharmacol.* **40**:1183-1191.

Omar RF, Rahimtula AD, Bartsch H. 1991. Role of cytochrome P-450 in ochratoxin A-stimulated lipid peroxidation. *J. Biochem. Toxicol.* **6**:203-209.

Palli D, Miraglia M, Saieva C, Masala G, Cava E, Colatosti M, Corsi AM, Russo A, Brera C. 1999. Serum levels of OTA in healthy adults in Tuscany: correlation with individual characteristics and between repeat measurements. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* **8**:265-269.

Pietta PG. 2000. Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.* **63**:1035-1042.

Pitt JI. 2000. Toxicogenic fungi and mycotoxins. *Br. Med. Bull.* **56**:184-192.

Pool-Zobel B, Veeriah S, Böhmer FD. 2005. Modulation of xenobiotic metabolising enzymes by anticarcinogens-focus on glutathione S-transferases and their role as targets of dietary chemoprevention in colorectal carcinogenesis. *Mut. Res.* **591**:74-92.

Prenci E, Toso S, Berto S. 2005. Redox chemistry of red wine. Quantification by an oscillating reaction of the overall antioxidant power as a function of the temperature. *J. Agric. Food Chem.* **53**:4220-4227.

Ramos-Gomez M, Kwak MK, Dolan PM, Itoh K, Yamamoto M, Tala-lay P, Kensler TW. 2001. Sensitivity to carcinogenesis is increased and chemoprotective efficacy of enzyme inducers is lost in nrf2 transcription factor-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**:3410-3415.

Rahimtula AD, Bereziat JC, Bussacchini-Griot V, Bartsch H. 1998. Lipid peroxidation as a possible cause of ochratoxin A toxicity. *Biochem. Pharmacol.* **37**:4469-4477.

Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* **26**:1231-1237.

Ringot D, Chango A, Schneider YJ, Larondelle Y. 2006. Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update. *Chem. Biol. Interact.* **159**:18-46.

Rizzo AF, Atroshi F, Ahotupa M, Sankari S, Elovaara E. 1994. Protective effect of antioxidants against free radical-mediated lipid peroxidation induced by DON or T-2 toxin. *J. Vet. Med. Assoc.* **41**:81-90.

Schaaf GJ, Nijmeijer SM, Maas RFM, Roestenberg P, Groene EM, Fink-Gremmels J. 2002. The role of oxidative stress in the ochratoxin A-mediated toxicity in proximal tubular cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1588**:149-158.

Schwerdt G, Bauer K, Gekle M, Silbernagl S. 1996. Accumulation of ochratoxin A in rat kidney in vivo and in cultivated renal epithelial cells in vitro. *Toxicology* **114**:177-185.

Shen HM, Shi CY, Lee HP, Ong CN. 1994. Aflatoxin B1-induced lipid peroxidation in rat liver. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **127**:145-150.

Shen HM, Ong CN, Lee BL, Shi CY. 1995a. Aflatoxin B1-induced 8-hydroxydeoxyguanosine formation in rat hepatic DNA. *Carcinogenesis* **16**:419-422.

Shen HM, Ong CN, Shi CY. 1995b. Involvement of reactive oxygen species in aflatoxin B1-induced cell injury in cultured rat hepatocytes. *Toxicology* **99**:115-123.

Shen HM, Shi CY, Shen Y, Ong CN. 1996. Detection of elevated reactive oxygen species level in cultured rat hepatocytes treated with aflatoxin B1. *Free Radical Biol. Med.* **21**:139-146.

Sheweita SA and Tilmisany AK. 2003. Cancer and phase II drug-metabolizing enzymes. *Curr. Drug Metab.* **4**:45-58.

Shiraishi F, Curtis LM, Truong L, Poss K, Visner GA, Madsen K, Nick HS, Agarwal A. 2000. Heme oxygenase-1 gene ablation or expression modulates cisplatin-induced renal tubular apoptosis. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **278**:726-736.

Speroni E, Cervellati R, Govoni P, Guizzardi S, Renzulli C, Guerra MC. 2003. Efficacy of different *Cynara scolymus* preparation on liver complaints. *J. Ethnopharmacol* **86**:203-211.

Sokol DL, Zhang X, Lu P, Gewirtz AM. 1998. Real time detection of DNA/RNA hybridization in living cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**:11538-11543.

Sostaric B and Vukelic M. 1991. Characteristics of urinary tract tumors in the area of Balkan endemic nephropathy in Croatia. In: M. Castegnaro, R. Pleština, G. Dirheimer, I.N. Chernozemsky and H. Bartsch, Editors, Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumors. IARC Scientific Publications no. 115, International Agency for Research on Cancer, Lyon. 29-65.

Sweeney MJ and Dobson ADW. 1998. Review: mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. *Int. J. Food Microbiol.* **43**:141-158.

Talavera S, Felgines C, Texier O, Besson C, Lamaison JL, Ramsey C. 2003. Anthocyanins are efficiently absorbed from the stomach in anesthetized rats. *J. Nutr.* **133**:4178.

Vinson JA, Dabbagh YA, Serry MM, Jang J. 1995. Plant flavonoids, especially tea flavonols, are powerful antioxidants using an in vitro oxidation model for heart disease. *J. Agric. Food Chem.* **43**:5677-5684.

Vukelic M, Sostaric B, Belicza M. 1992. Pathomorphology of Balkan endemic nephropathy. *Food Chem. Toxicol.* **30**:193-200.

Wang SY and Stretch AW. 2001. Antioxidant capacity in cranberry is influenced by cultivar and storage temperature. *J. Agric. Food Chem.* **49**:969-974.

Yin JJ, Smith MJ, Eppley RM, Page SW, Sphon JA. 1998. Effects of fumonisin B1 on lipid peroxidation in membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **1371**:134-142.

Xu C, Li CY, Kong AN. 2005. Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. *Arch. Pharm. Res.* **28**:249-268.