

Tesi di dottorato in Scienze dell'alimentazione e della nutrizione umana, di Antonio Costa,
discussa presso l'Università Campus Bio-Medico di Roma in data 11/03/2016.
La disseminazione e la riproduzione di questo documento sono consentite per scopi di didattica e ricerca,
a condizione che ne venga citata la fonte.



Università Campus Bio-Medico di Roma

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE DELL'ALIMENTAZIONE E DELLA NUTRIZIONE
XXVIII 2013

Modulazione del Sistema Endocannabinoide nel cancro del colon retto
da parte dell'olio extra vergine di oliva

Antonio Costa

Coordinatore

Chiar.ma Prof.ssa Laura De Gara

Tutor

Chiar.mo Prof. Mauro Maccarrone

Co-Tutor

Dott.ssa Monica Bari

11 Marzo 2016

Antonio Costa

Indice

Prima parte

1. <u>Introduzione</u>	4
1.1 Sistema Endocannabinoide	4
1.2 Cancro e Sistema endocannabinoide	9
1.2.1 Il carcinoma del colon retto	11
1.2.2 Il sistema endocannabinoide nel CRC	11
1.3 Epigenetica, SE e Cancro	13
1.4 Olio extravergine di oliva	15
2. <u>Obiettivo della ricerca</u>	18
3. <u>Materiali e Metodi</u>	19
3.1 Olio di oliva ed estratti fenolici	19
3.1.1 Estrazione dei composti fenolici e loro analisi	19
3.2 Studi in vitro	20
3.2.1 Colture cellulari	20
3.2.2 Trattamenti	20
3.2.3 Analisi della crescita cellulare	21
3.3 Analisi dell'espressione genica e sua regolazione	21
3.3.1 Analisi dell'espressione genica (q-RT-PCR)	21
3.3.2 Analisi della metilazione del DNA (MSP)-qPCR e pirosequenziamento	21
3.3.3 Espressione dei microRNA (q-RT-PCR)	22
3.4 Espressione proteica (Western blot)	23
3.5 Studi in vivo	23
3.6 Analisi statistica dei dati	24
4. <u>Risultati</u>	25
4.1 Analisi dei composti fenolici dell'EVOO	25
4.2 Effetti di EVOO, OPE, HT sull'espressione genica e proteica di mRNA di CB ₁ nella linea cellulare di tumore al colon CaCo2	25
4.3 EVOO inverte la metilazione e riattiva il gene <i>CNR1</i>	26
4.4 Stato di metilazione del promotore <i>CNR1</i> nelle cellule CaCo2 e NCM460	27
4.5 Effetto inibitorio di OPE e HT sulla proliferazione di cellule umane di cancro al colon	28
4.6 Influenza di EVOO alimentare sul peso corporeo, assimilazione del cibo ed espressione genica del Sistema Endocannabinoide <i>in vivo</i>	29
4.7 Influenza di EVOO alimentare su miRNAs bersaglio di CB ₁	31
5. <u>Conclusioni</u>	33
6. <u>Bibliografia</u>	37
7. <u>Ringraziamenti</u>	43

Antonio Costa

Seconda parte

1. <u>Introduzione</u>	44
1.1 Sistema Endocannabinoide nel pesce	44
1.2 Metabolismo lipidico nel pesce	45
1.3 Stato dell'arte dell'acquacoltura	46
1.4 Produzioni in acquacoltura e loro impatto ambientale	48
1.5 Sistemi produttivi a ricircolazione idrica (RAS)	49
1.6 La catena alimentare in acquacoltura	50
1.7 Alimentazione e nutrizione in acquacoltura	51
1.7.1 Proteine e amminoacidi	52
1.7.2 Lipidi	55
1.7.3 Vitamine ed elementi minerali	56
1.8 Persico spigola	59
2. <u>Obiettivo della ricerca</u>	61
3. <u>Materiali e Metodi</u>	62
3.1 Modello animale	62
3.2 Parametri biometrici	63
3.3 Parametri biochimici	67
4. <u>Conclusioni preliminari</u>	68
5. <u>Bibliografia</u>	69
6. <u>Ringraziamenti</u>	73
7. <u>Prospettive future</u>	74

Antonio Costa

PRIMA PARTE

1. Introduzione

1.1 Sistema endocannabinoide

Gli endocannabinoidi (eCBs) sono mediatori lipidici endogeni che agiscono attraverso l'attivazione dei recettori cannabinici (CBR) ed insieme agli enzimi coinvolti nella loro sintesi e degradazione costituiscono il Sistema Endocannabinoide (SE) (figura 1) [Galve-Roperh I., 2013] [De Petrocellis L., 2009]. Gli endocannabinoidi sono ammidi, esteri ed eteri dell'acido arachidonico, biosintetizzati a partire da fosfolipidi di membrana [Finazzi Agrò A., 2013] [Bisogno T., 2008].

I composti maggiormente studiati di questa nuova classe di mediatori lipidici sono *N*-arachidoniletanolamina (AEA, Anandamide), ed il 2-Arachidonilglicerolo (2-AG) [Bisogno T., 2008] [Maccarrone M., 2002]. Il contenuto delle *N*-aciletanolamine (NAE) e del 2-AG è stato determinato in vari tessuti e in particolar modo nel cervello [Fride E., 2002].

La ricerca scientifica nel settore degli endocannabinoidi dimostra come tali lipidi, in particolar modo l'AEA e il 2-AG, siano coinvolti nella modulazione di funzioni biologiche sia a livello del sistema nervoso centrale che nei tessuti periferici [Finazzi Agrò A., 2013].

Gli endocannabinoidi sono considerati neuromodulatori locali, sintetizzati e rilasciati in seguito ad uno stimolo, come l'ingresso di ioni calcio, attraverso vie biosintetiche finemente regolate [Dainese E., 2007] [Caterina M.J., 2007]. Tale meccanismo di biosintesi rende gli endocannabinoidi simili ad altri derivati dell'acido arachidonico, quali le prostaglandine, i leucotrieni e li distingue dai neuromodulatori classici, quali l'acetilcolina, il glutammato e la noradrenalina, che sono pre-sintetizzati, conservati in vescicole secretorie e, in seguito ad uno stimolo, rilasciati [Dainese E., 2007].

La via biosintetica più accreditata per la produzione di AEA prevede l'azione sequenziale di una *N*-aciltransferasi (NAT) Ca^{2+} -dipendente e di una lipasi specifica la *N*-acilfosfatidiletanolamina fosfolipasi (NAPE-PLD) [Piomelli D., 2003]. Nella prima reazione, la NAT catalizza il trasferimento dell'acido arachidonico dalla posizione sn-1 della fosfatidilcolina all'azoto della fosfatidiletanolamina, generando il *N*-arachidonilfosfatidiletanolamina (NArPE) [Leung D., 2006]. Si noti che l'esterificazione dell'acido arachidonico in posizione di un fosfolipide non è

Antonio Costa

molto frequente in natura, e ciò concorda con il basso contenuto di AEA rispetto alle altre NAE. Il NArPE così prodotto è idrolizzato dalla NAPE-PLD che, in presenza di Ca^{2+} , scinde il legame fosfoestere rilasciando AEA e acido fosfatidico. La NAPE-PLD appartiene alla famiglia delle β -lattamasi contenenti zinco ed è stata isolata e clonata nel ratto, nel topo e nell'uomo mostrando un'alta omologia nel contenuto di amminoacidi (89%) tra le varie specie [Egertová M., 2008]. È stato osservato che la NAPE-PLD è strutturalmente e funzionalmente distinta dalle altre PLD e riconosce non solo il NArPE ma anche altre *N*-acilfosfatidiletanolammine con gruppi acilici diversi [Leung D., 2006].

Anche il 2-AG come l'AEA è sintetizzato "on-demand" da precursori fosfolipidici di membrana [Ueda N., 2011] [Finazzi Agrò A., 2013].

Il primo prodotto della reazione di sintesi del monoacilglicerolo è l'1-acil-2-arachidonilglicerolo (DAG), che si può formare attraverso due reazioni alternative: una catalizzata dalla PLC che agisce sul fosfatidilinositolo, l'altra da una fosfolipasi che idrolizza l'acido fosfatidico. Il DAG così formato è convertito in 2-AG mediante l'azione di una diacilglicerolo lipasi (DAGL), specifica per la posizione associata alla membrana cellulare e dipendente da Ca^{2+} [Bisogno T., 2003].

L'azione biologica degli endocannabinoidi è caratterizzata da un'emivita relativamente breve, dipendente da un processo di disattivazione che prevede la ricaptazione da parte delle cellule, l'idrolisi enzimatica e la riesterificazione dei prodotti dell'idrolisi in fosfolipidi di membrana. Una volta attraversata la membrana plasmatica, grazie ad uno specifico trasportatore (Endocannabinoid membrane transporter, EMT), l'AEA viene degradata da un'idrolasi specifica per gli acidi grassi, la FAAH (fatty acid amide hydrolase), che idrolizza il legame ammidico dell'AEA rilasciando acido arachidonico ed etanolamina [Cravatt B.F., 1996]. La FAAH è un enzima dimerico legato alla membrana mediante i segmenti ad α -elica 18 e 19; appartiene alla famiglia delle amidasi ed è caratterizzata da regioni altamente conservate, ricche di residui di serina, glicina, e alanina. La FAAH è maggiormente espressa nel SNC ed in particolar modo nelle aree in cui vi è una maggiore presenza di recettori CB_1 . Essa è in grado di riconoscere e di idrolizzare anche altre ammidi degli acidi grassi, come la *N*-palmitiletanolamina (PEA), la *N*-steariletanolamina (SEA), la *N*-oleiletanolamina (OEA) con un'attività ottimale a pH 9,00 [Cravatt B.F., 1996] [Ueda N., 2013].

La FAAH riconosce e idrolizza anche i monoacilgliceroli, come il 2-AG, sebbene l'enzima principalmente coinvolto nella sua

Antonio Costa

degradazione sia la

monoacilglicerolo lipasi (MAGL), una proteina citosolica, ampiamente caratterizzata *in vitro* e *in vivo*, che idrolizza il legame estere del monoacilglicerolo, rilasciando acido arachidonico e glicerolo [Blankman J.L., 2007].

Il cDNA della MAGL, clonato nell'uomo, ha mostrato un'omologia dell'84% con quello murino e dell'85% con quello di ratto [Blankman J.L., 2007].

Una via alternativa della degradazione dell'AEA e del 2-AG coinvolge le lipossigenasi (LOX), la ciclossigenasi-2 (COX-2) e il citocromo P450 [Howlett A.C., 2000].

Le LOX sono enzimi contenenti ioni ferro, che aggiungono una singola molecola di ossigeno agli acidi grassi polinsaturi convertendoli in idroperossidi coniugati, rapidamente ridotti nei corrispondenti idrossidi. Le 12-15-LOX sono isoenzimi differenti che convertono l'AEA in 12-idrossitetraenoiletanolammide (12-HAEA) e 15-idrossitetraenoiletanolammide (15-HAEA), gli unici inibitori naturali della FAAH [Giuffrida A., 2001].

Le COX sono enzimi coinvolti nella produzione di prostanoidi dall'acido arachidonico. Mediante l'azione della forma inducibile della COX, nota come COX-2, l'AEA è convertita in prostaglandina-etanolammide (PGE₂-2-EA). L'AEA è inoltre substrato del citocromo P450, che la converte in lipidi polari di vario genere [Giuffrida A., 2001].

Una volta sintetizzati gli endocannabinoidi sono immediatamente rilasciati dalla cellula nello spazio extra-cellulare, dove legano e attivano i recettori cannabinici di tipo 1 e di tipo 2 (CB₁ e CB₂). Entrambe i sottotipi recettoriali appartengono alla famiglia dei recettori a sette domini transmembrana accoppiati a una proteina G (GPCR) [Oddi S., 2007]. I CB₁ sono i GPCR più abbondanti nel SNC. Studi di auto radiografia e ibridazione *in situ*, hanno identificato le aree cerebrali in cui CB₁ è maggiormente espresso: i gangli basali, la regione del globo pallido, l'ippocampo, la corteccia e il sistema limbico, quest'ultimo coinvolto nel controllo della memoria e di stati emozionali quali l'ansia e la rabbia [Cravatt B.F., 1996]. Tuttavia i CB₁ sono localizzati anche in tessuti periferici come il tessuto adiposo, il fegato, i polmoni, gli organi riproduttivi sia femminili che maschili, nelle cellule endoteliali e nei linfociti T [Maccarrone M., 2008]. I CB₂ sono localizzati principalmente nei tessuti e cellule del sistema immunitario, quali la milza, le tonsille, i linfociti B, i macrofagi e le piastrine [Oddi S., 2007]. Per molto tempo si era ritenuto che i CB₂ non fossero presenti nel SNC ma di recente sono stati evidenziati anche nelle cellule gliali, nel peduncolo cerebrale e nella retina [Oddi S., 2007]. Il 2-AG è in grado di attivare con la stessa potenza sia i CB₁ che CB₂,

Antonio Costa

mentre l'AEA possiede una buona affinità per il CB₁ ed è agonista debole del CB₂ [Pertwee R.G., 2010].

Tuttavia gli endocannabinoidi possono esercitare la loro azione anche mediante l'attivazione di recettori cannabinici "non classici" [Szallasi A., 1999]. Tali recettori sembrerebbero modulare gli effetti dell'AEA e dei suoi congeneri sul rilascio dell'acido arachidonico e sull'attivazione della cascata trasduzionale che coinvolge "le proteine chinasi attivate da mitogeni" MAPK (mitogen-activated protein kinase). L'AEA è in grado di attivare il recettore vanilloide di tipo 1 (TRPV1, transient receptor potential vanilloid-1) un canale cationico non selettivo costituito da sei domini transmembrana con le estremità amminica e carbossilica sporgenti nel citosol [Di Marzo V., 2010] [Maccarrone M., 2000]. Il TRPV1 espresso sia in neuroni sensoriali periferici che in diverse aree del SNC, viene attivato da ligandi come la capsaicina, dal calore e da pH acidi [Pistis M., 2010].

Gli endocannabinoidi sono in grado di legare e attivare anche i PPAR (peroxisome proliferator activated receptors) [Fride E., 2002]. Questi recettori sono membri della famiglia dei recettori nucleari coinvolti nella regolazione del metabolismo lipidico e glucidico a livello epatico e a livello adipocitico [Fidaleo M., 2014]. Sono suddivisi in tre sottotipi, codificati da differenti geni: PPAR α , PPAR γ , PPAR δ . L'AEA e il 2-AG sono in grado di attivare i recettori PPAR γ [Fidaleo M., 2014].

Quando gli endocannabinoidi si legano ai recettori, il complesso ligando-recettore che si forma è in grado di scatenare innumerevoli eventi molecolari all'interno delle cellule. Tra le risposte innescate dall'attivazione dei recettori CB₁ e CB₂ si ricorda l'inibizione dell'adenilato ciclasi che porta a una riduzione dei livelli di AMP ciclico (cAMP), e l'attivazione delle MAPK [Fowler C.J., 2013].

I recettori CB₁ a differenza del CB₂ sono associati a particolari strutture lipidiche, note come "zattere lipidiche" (*lipid raft*), in grado di modulare le cascate trasduzionali attivate dal legame dell'AEA. L'associazione tra CB₁ e lipid raft è influenzata dal colesterolo, e dinamicamente si modifica in seguito al legame dell'agonista al recettore [Fowler C.J., 2013]. La disgregazione dei lipid raft, per deplezione di colesterolo, modifica l'endocitosi dei CB₁ indotta dal legame dell'AEA.

L'AEA ma non il 2-AG è in grado di legare il TRPV1. Tale legame avviene dal lato citosolico, diversamente da quello ai recettori cannabinoidi che

Antonio Costa

avviene sul versante extracellulare. Il legame del lipide al recettore vanilloide determina un aumento della concentrazione intracellulare di Ca^{2+} e genera una serie di risposte caratteristiche del processo apoptotico [Di Marzo V., 2010].

Il legame degli endocannabinoidi mediata dai recettori PPAR comporta l'attivazione dei geni coinvolti nel metabolismo lipidico e glucidico (ad esempio il gene C-EBP α , il gene $\alpha P2$, il gene dell'adiponectina) [Pistis M., 2010].

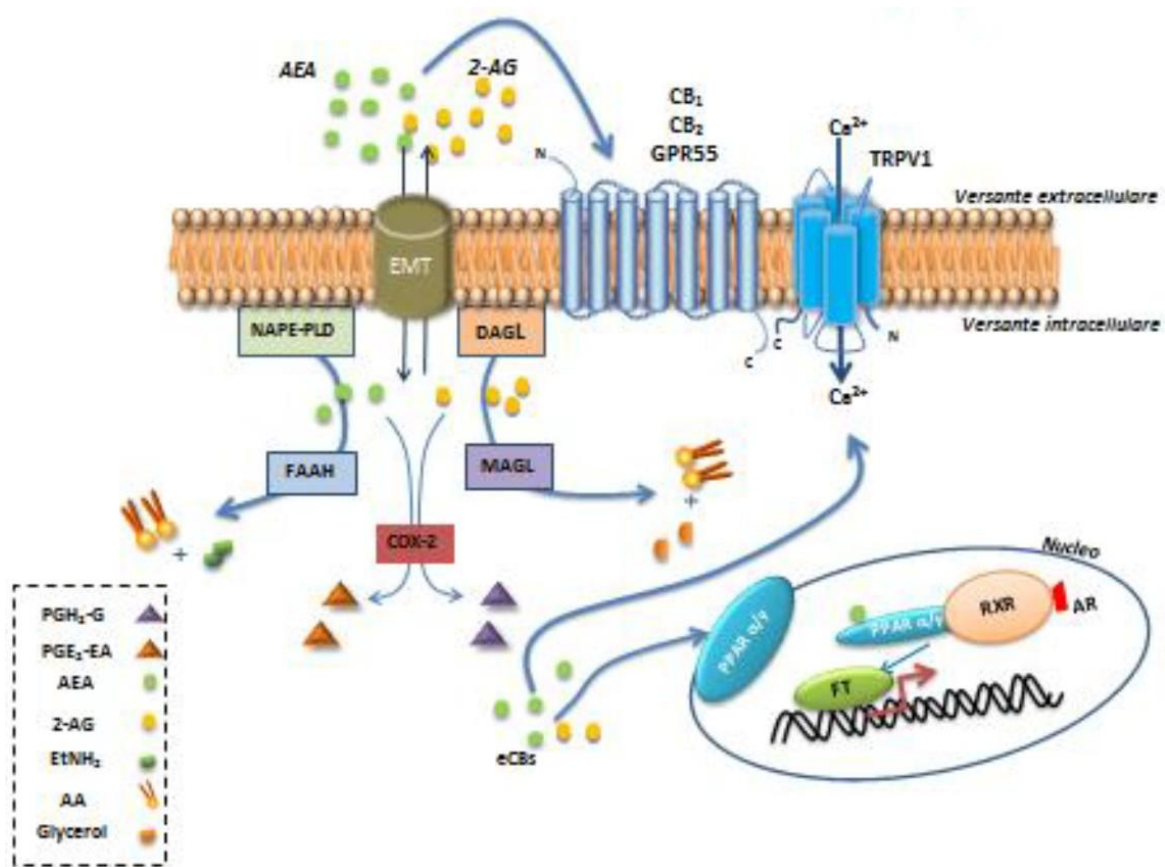


Fig. 1 | Il sistema endocannabinoide.

Antonio Costa

1.2 Cancro e Sistema endocannabinoide

Il cancro è tra le cause principali di morte nel mondo, in accordo con studi recenti, la malattia potrebbe essere prevenibile nel 30-40% dei casi con un'appropriata nutrizione e una regolare attività fisica [Thun M.J., 2010].

Il tumore è costituito da una massa di cellule atipiche la cui crescita è accelerata rispetto alla norma e svincolata dai meccanismi di regolazione che operano nell'organismo sano. Un ruolo importante nell'oncogenesi è rivestito dai proto-oncogeni, che possono subire mutazioni, diventando oncogeni attivi [Thun M.J., 2010]. Questi ultimi producono in modo eccessivo o alterato, fattori di crescita, proteine che regolano il ciclo cellulare o il differenziamento, causando l'incontrollata proliferazione cellulare che dà luogo ad una massa neoplastica. Inoltre all'interno di ogni cellula esistono dei "geni controllori", gli onco-soppressori, che seppur destinati ad impedire che una cellula alterata possa sopravvivere, se silenti o mutati contribuiscono anch'essi all'inizio della crescita tumorale [Thun M.J., 2010].

Molte forme di cancro sono state associate alla mutazione dell'oncogene k-ras e alle alterazioni dell'oncosoppressore p53 [Sarfaraz S., 2008].

La maggior parte dei tumori non rimane confinata nel sito di origine ma, attraverso il circolo sanguigno e linfatico, colonizza nuove aree di proliferazione, note come metastasi. Molte cellule tumorali secernono fattori di crescita che stimolano la formazione di vasi sanguigni per l'apporto di nutrimento alla massa tumorale, processo che prende il nome di angiogenesi.

Diversi studi riportano che i cannabinoidi e gli endocannabinoidi sono in grado di esercitare effetti analgesici nel trattamento del cancro primario, prevenendo nausea, vomito, dolore e stimolando l'appetito [Maccarrone M., 2013]. Inoltre è stato dimostrato un coinvolgimento del sistema endocannabinoide nel blocco della formazione delle metastasi, [Flygare J., 2008] [Bifulco M., 2006] azione che avverrebbe mediante l'inibizione dell'angiogenesi in seguito ad una riduzione nell'espressione di fattori determinanti quali VEGF e Ang1 e 2 [Maccarrone M., 2000].

Il SE è in grado di interferire sulla proliferazione delle cellule cancerose sia inibendo i segnali mitogeni paracrini (legati a PKI3K-Akt-mTORC1) e autocrini [Thun M.J., 2010], sia inducendo l'apoptosi [Maccarrone M., 2000; Maccarrone M., 2003].

Uno dei meccanismi antitumorali e

pro-apoptotico

esercitato

Antonio Costa

dall'anandamide attraverso CB_1 è rappresentato dall'aumento del livello intracellulare di ceramide, uno sfingolipide ubiquitario che svolge un importante ruolo nel controllo del destino cellulare [Pisanti S., 2013].

Il rilascio di ceramide innescato dall'attivazione del CB_1 avviene grazie all'azione della sfingomielinasi che idrolizza la sfingomielina o mediante la sintesi *de novo* attraverso la stimolazione della palmitoiltransferasi.

L'AEA può causare l'apoptosi anche mediante l'attivazione dei recettori TRPV1, determinando aumento del Ca^{2+} intracellulare, attivazione del metabolismo ossidativo dell'acido arachidonico, disaccoppiamento mitocondriale ed attivazione delle caspasi 3 e 9 [Di Marzo V., 2007].

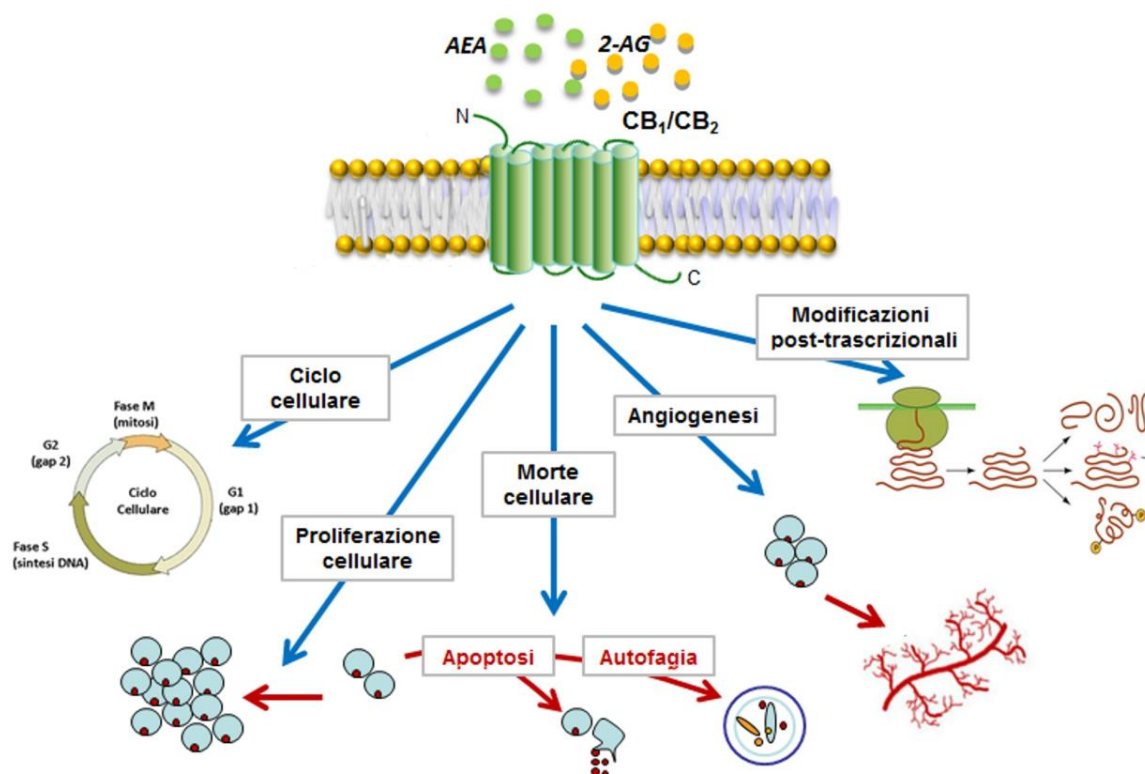


Fig. 2 | Endocannabinoidi e tumori.

Antonio Costa

1.2.1 Il carcinoma del colon-retto

Il cancro al colon-retto (CRC) rappresenta il terzo tumore maligno per incidenza e mortalità, dopo di quello della mammella nella donna, della prostata nell'uomo e del polmone per entrambi i sessi. [Jemal A., 2009]. Il CRC è una malattia eterogenea caratterizzata da alterazioni genetiche ed epigenetiche [Nicola S., 2002].

Il cancro al colon-retto è un classico esempio di patogenesi multi-step [Walther A., 2009] affinché si possano accumulare le mutazioni necessarie alla genesi del carcinoma invasivo occorrono diversi “momenti” patologici caratterizzati dall'attivazione di un proto-oncogene o dall'inattivazione di un oncosoppressore [Walther A., 2009].

Le mutazioni genetiche responsabili del cancro sporadico al colon-retto, sono le stesse che caratterizzano le forme ereditarie [Preston S.L., 2003]; in particolare a livello genetico e molecolare esistono due modelli principali di sviluppo del carcinoma colon-rettale. Il primo progredisce secondo il modello adenoma-carcinoma, partendo quindi da un'origine adenomatosa. Questo è caratterizzato da marcate alterazioni del cariotipo, delezioni alleliche, aneuploidia ed inattivazione di importanti geni oncosoppressori quali l'Adenomatosis polyposis coli (*APC*), il v-Kiras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (*KRAS*), geni localizzati sul braccio lungo del cromosoma 18 e proteina 53 (*p53*) [Preston S.L., 2003]. Il secondo modello è caratterizzato invece da instabilità nei microsatelliti (MSI) e comprende i casi di cancro ereditario non poliposico (HNPCC) [Walther A., 2009].

1.2.2 Il Sistema endocannabinoide nel CRC

Nuove strategie farmacologiche antitumorali sono indirizzate sull'enzima di degradazione del sistema endocannabinoide MAGL [Fowler C.J., 2012]. Nel carcinoma del colon e in altri tipi di tumore un'alta espressione di MAGL è un fattore prognostico negativo. È stato dimostrato che le proteine del sistema endocannabinoide sono presenti in tessuti provenienti da biopsie di cancro al colon ed in colture cellulari di cancro del colon retto (CRC). Inoltre si nota che nei tessuti patologici si osservano aumentati livelli di AEA e 2-AG. Alcune strategie terapeutiche sono rivolte verso lo studio dei trasportatori intracellulari degli endocannabinoidi e verso la composizione lipidica della membrana [Alexander A., 2009].

Nelle cellule tumorali del colon-retto, gli effetti apoptotici e antiproliferativi sono mediati dalla proteina recettoriale CB₁ [Schicho R., 2011].

Antonio Costa

Il gene *cnr1*, che codifica per il CB₁, è un gene oncosoppressore, che esercita effetti anti proliferativi sulle cellule del cancro al colon retto [Pisanti S., 2013]. Anche i recettori CB₂, possono essere coinvolti in base alla linea cellulare considerata [Ligresti A., 2003].

L'AEA ha dimostrato inibire la migrazione delle cellule di carcinoma del colon tramite CB₁, e causare la morte cellulare non apoptotica e non necrotica in cellule di carcinoma del colon resistente all'apoptosi, che dipendono dalla presenza di cicloossigenasi-2 (COX-2) [Wang D., 2008].

Nella linea cellulare HT-29 ed in DLD-1, l'attivazione di CB₁ e CB₂ ha causato l'apoptosi mediante la sintesi di ceramide sensibile a TNF- α [Patsos H.A., 2005].

Studi hanno valutato che i livelli di AEA e 2-AG negli adenomi colon rettali sono aumentati rispetto alla mucosa normale [D'Argenio G., 2007]. Il recettore CB₁, può fornire il legame più forte per il cancro del colon, perché ha dimostrato essere sotto regolato nel carcinoma del colon [Wang D., 2008] questo indica che l'assenza del recettore CB₁ promuove la tumorigenesi.

Tuttavia in uno studio [Ligresti A., 2003] Ligresti e collaboratori non sono riusciti ad osservare una riduzione nella regolazione di CB₁ in biopsie del colon in pazienti con CRC. Altri componenti del sistema endocannabinoide, quale la FAAH, possono svolgere un ruolo nella carcinogenesi. Ad esempio, in un modello murino di carcinogenesi azoxymethane-indotta [Izzo A., 2008], l'inibitore della FAAH *N*-arachidonilserotonina (*AA-5HT*) ha ridotto la formazione dei primi loci neoplastici nel colon ed ha aumentato i livelli di 2-AG.

In un modello di cellula che presenta l'antigene (*APC*) [Wang D., 2008] i topi con una delezione ulteriore nel gene *cnr1* o che sono stati sottoposti a blocco farmacologico del recettore CB₁, hanno dimostrato un carico tumorale del colon superiore rispetto al controllo. Inoltre gli autori hanno evidenziato un aumento della metilazione nel DNA del promotore *cnr1*, indicando che il silenziamento epigenetico del gene *cnr1* potrebbe essere responsabile della maggiore crescita dei tumori.

In contrasto con questi risultati, il rimonabant, antagonista di CB₁ ha inibito la crescita delle cellule tumorali e lo sviluppo di lesioni precancerose nei topi [Santoro A., 2009].

In conclusione si può affermare che gli elementi del sistema endocannabinoide sono coinvolti nella carcinogenesi del colon. Potrebbe essere utile nella protezione contro il cancro del colon-retto analizzare gli elementi del sistema endocannabinoide

Antonio Costa

focalizzando l'attenzione sul recettore CB₁ o l'enzima FAAH.

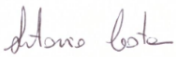
1.3 Epigenetica, SE e Cancro

Molte alterazioni osservate in vari tipi di cancro sono correlate a modificazioni post-trascrizionali di cui si occupa una specifica branca della biologia, l'epigenetica. Si riferisce ad una serie di modificazioni post-trascrizionali che regolano l'espressione del gene senza causare una variazione nella sequenza del DNA [Waddington C.H., 2012].

Le modificazioni epigenetiche includono: la metilazione del DNA (ad opera delle DNA metiltransferasi, DNMTs) le modificazioni degli istoni, acetilazione, fosforilazione, metilazione, ubiquitinazione, ad opera rispettivamente delle istone acetiltransferasi (HAT), istone deacetilasi (HDAC) e istone metiltransferasi (HMT) la disposizione del nucleosoma e gli RNA non codificanti (miRNA) [Jones P., 2007] [Portela A., 2010].

I miRNA costituiscono una famiglia di piccoli RNA endogeni, non codificanti, a singolo filamento (ss), di una lunghezza compresa tra i 21 e i 25 nucleotidi, il cui ruolo fondamentale è quello di regolare negativamente l'espressione genica a livello post-trascrizionale. I miRNA agiscono mediante il riconoscimento di specifici mRNA *targets* al fine di determinarne la repressione della traduzione [Borchert G.M., 2006]. Nel CRC sono stati studiati principalmente due miRNAs: miR-143 e miR-145 che sono deregolati nello stato patologico [Pacher P., 2013] [Bardhan K., 2013]. Gli mRNA dei recettori dei cannabinoidi interagiscono con vari fattori di trascrizione, molti dei quali sono implicati nella metilazione del DNA ed in modificazioni post-trascrizionali degli istoni [D'Addario C., 2013].

È stato osservato che l'ipermetilazione del DNA nel promotore del gene *cnr1* contribuisce a una riduzione della trascrizione di questo recettore nel CRC [Laprairie R.B., 2012] [Rotter A., 2013]. Parallelamente è stato dimostrato che alcuni fitocannabinoidi sono coinvolti nella regolazione epigenetica del differenziamento cellulare dei cheratinociti, [Pucci M., 2013] e che l'AEA è in grado di causare la fosforilazione degli istoni e la metilazione del DNA [Xia D., 2013] [Paradisi A., 2008].

La regolazione epigenetica degli elementi del sistema endocannabinoide è stata oggetto di studio, anche in patologie degenerative di tipo diverso rispetto al cancro [D'Addario C., 2012]. Infatti, in uno studio eseguito su monociti di pazienti affetti da Alzheimer l'espressione della FAAH risulta alterata nei malati rispetto ai controlli a causa di una ridotta metilazione del tratto del DNA corrispondente alla  regione promotore [Campbell R.M.,

2014]. Tali studi suggeriscono un possibile ruolo della FAAH, quale biomarker periferico ed in generale un ruolo degli endocannabinoidi nel rimodellamento della cromatina [Campbell R.M., 2014].

Recentemente è stato ipotizzato che alcuni elementi nutraceutici possano interferire con il controllo epigenetico dell'espressione genica ed esercitare un loro effetto benefico [Chuang J.C., 2007] [Serini S., 2016].

In particolare è stato suggerito che le alterazioni nella regolazione epigenetica potrebbero essere coinvolte negli effetti protettivi di acidi grassi polinsaturi della serie omega 3 (ω -3 PUFA) contro l'insorgenza e la progressione delle malattie neurodegenerative, di disordini immunologici e nel cancro [Serini S., 2016].

L'incidenza e l'aumento di CRC ha portato ad una intensificazione degli studi riguardanti il ruolo protettivo di alcuni elementi nutrizionali. L'ipotesi che esistano pathways che coinvolgano modificazioni di tipo epigenetico regolate da fattori alimentari apre la strada all'identificazione di nuove e possibili strategie di prevenzione contro lo sviluppo di CRC, in particolare nei soggetti a rischio di forme familiari di CRC [Serini S., 2016].

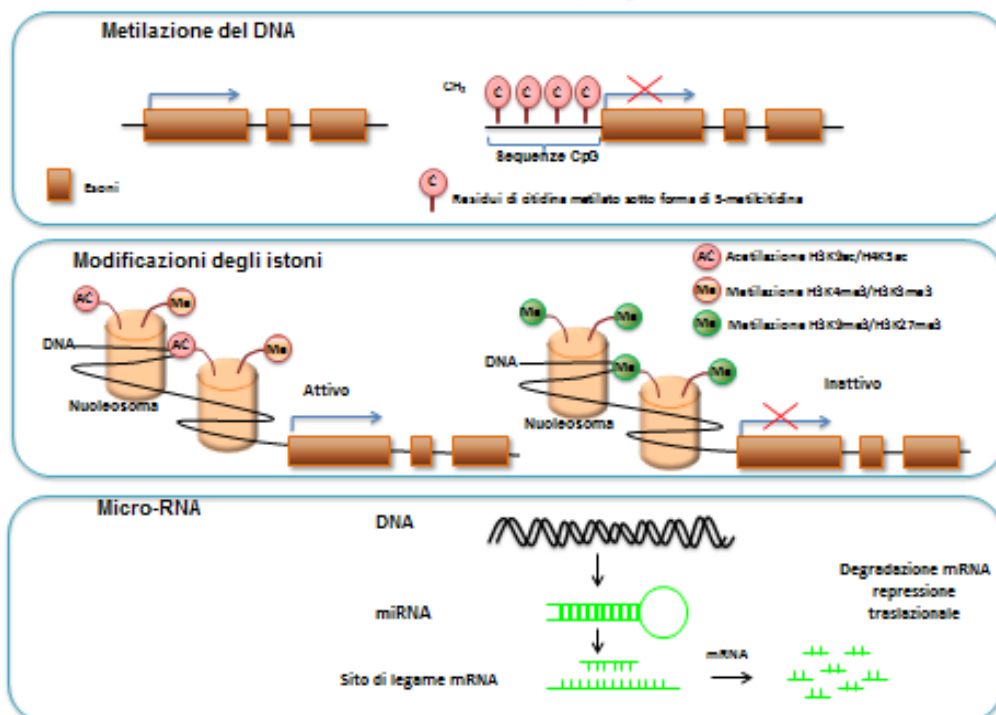


Fig. 3 | Meccanismi epigenetici.

Antonio Costa

1.4 Olio extravergine di oliva

L'olivo appartiene alla famiglia delle Oleaceae, che comprende 20-29 generi [Morettini A., 1972].

Il genere più importante, sia per il grado di diffusione sia per l'interesse agricolo è il genere *Olea*, e in particolare la specie *Olea europea*. Al genere *Olea*, specie *O.europea* L. appartiene un numero imprecisato di varietà coltivate dette cultivar [COI 1997].

Molteplici sono i fattori che hanno portato una così grande variabilità genetica: L'olivo è una specie prevalentemente allogama con un elevato grado di etero-impollinazione che conduce a elevati livelli di eterozigosi e polimorfismo del DNA [Rallo P., 2000].

Nel corso dei millenni si sono originate per incrocio spontaneo e successiva disseminazione naturale dei noccioli, nuove cultivar che sono state fissate per via vegetativa, tecnica che consente di stabilizzare i caratteri fenotipici selezionati. Studi sull'origine dell'olivo e della sua variabilità intraspecifica concordano sul fatto che le moderne cultivar diffuse nelle aree olivicole sono il frutto di processi di selezione e differenziazione *in loco* [Besnard G., 2000].

L'olivo, essendo stato coltivato in ambienti pedoclimatici differenti, ha sviluppato un elevato polimorfismo, che manifestandosi nelle caratteristiche delle produzioni contribuisce a creare popolazioni locali eterogenee per le quali è arduo trovare tratti fenotipici discriminanti. La tendenza a difendere la tipicità dell'olio extravergine d'oliva (EVOO) e il crescente interesse a valorizzare anche modeste produzioni, ha promosso in numerose regioni italiane, la ricerca della biodiversità olivicola territoriale quale strumento da integrare alla tutela dei prodotti locali. In Italia ci sono circa 500 tipi genetici, di cui le cultivar più diffuse sono: il Frantoio, il Moraiolo, il Leccino, il Pendolino, il Canino e il Maurino (figura 4).

Le cultivar sono classificate in base alla fertilità, alla produttività, alla resa in olio, alla capacità rizogena, alla destinazione della produzione.

Antonio Costa

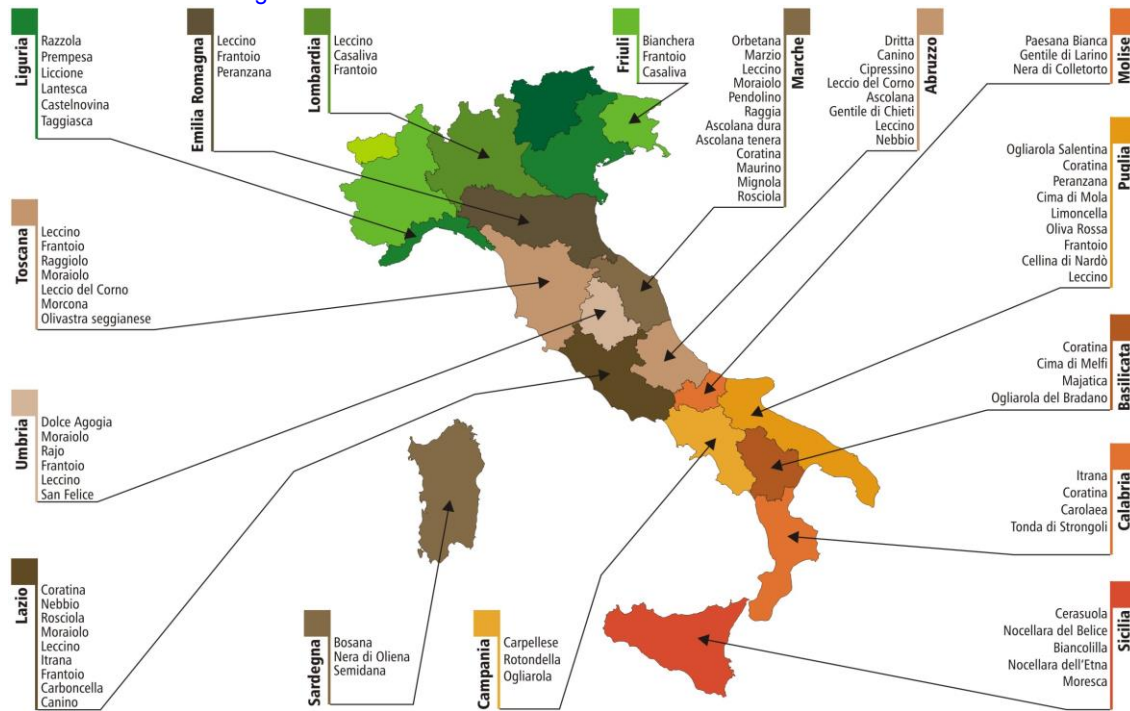


Fig. 4 | Distribuzione geografica delle cultivar più diffuse in Italia.

L'olio extra-vergine di oliva rappresenta una tipica fonte lipidica della dieta mediterranea ed il suo consumo contribuisce all'abbassamento di condizioni patologiche [Naska A., 2013]. Le patologie interessate comprendono: le malattie dell'apparato cardiocircolatorio ed il cancro.

Studi in letteratura suggeriscono che il consumo di olio di oliva contribuisce a una riduzione del rischio di CRC nelle popolazioni del Mediterraneo [Owen R.W., 2004] [Casaburi I., 2013] [Servili M., 2004].

In particolar modo uno studio ha evidenziato che gli acidi grassi derivati dall'olio di oliva hanno generato un effetto pro-apoptotico in cellule tumorali di colon [Notarnicola M., 2011].

Trattamenti con elementi dell'oliva estratti dall'EVOO in cellule umane di adenocarcinoma del colon hanno mostrato indurre l'apoptosi mediante segnali che coinvolgono PPAR γ e NF κ B, derivanti a loro volta da una deregolazione della COX-2 e una modulazione di p53 [Cardeno A., 2013].

La dieta è uno tra i fattori ambientali maggiormente studiati nell'epigenetica, diverse evidenze suggeriscono una deregolazione del pathways epigenetico nel cancro.

L'olio di oliva ha una densità di 916 gr/lt la sua composizione

Antonio Costa

chimica è costituita da una miscela di trigliceridi (frazione saponificabile, quasi il 98%), ed il rimanente 2% (frazione insaponificabile) da sostanze che non subiscono alcuna alterazione se sottoposte all'azione di alcali concentrati. Mentre gli elementi della frazione saponificabile sono pressoché uguali in tutti gli oli di oliva, quelli della frazione insaponificabile subiscono variazioni qualitative e quantitative molto importanti tali da comportare una netta differenziazione [Montedoro G., 1993].

L'olio extra-vergine di oliva è costituito per il 70-75% da acido oleico, 15-20% acido linoleico di-insaturo e dal 2% frazione non lipidica. All'interno della frazione non lipidica rivestono particolare importanza i polifenoli (R-OH), caratterizzati dalla presenza di due o più gruppi ossidrilici legati direttamente ad un anello aromatico. I principali composti fenolici presenti nell'oliva sono l'oleuropeina e il ligstroside, questi sono due glucosidi i cui agliconi sono esteri rispettivamente dell'acido elenolico con il 2-(3,4-diidrossifenil)etanolo (idrossitirosolo; HT) e con il 2-(4-idrossifenil)etanolo (tirosolo) [Montedoro G., 1993].

L'oleuropeina (OPE) (figura 5) e il ligstroside presenti nell'oliva vanno incontro a riarrangiamenti chimici ed enzimatici che portano alla formazione di agliconi durante il processo di estrazione. Il contenuto e il profilo qualitativo dei polifenoli, rende l'olio di oliva un alimento ad alto valore nutrizionale.

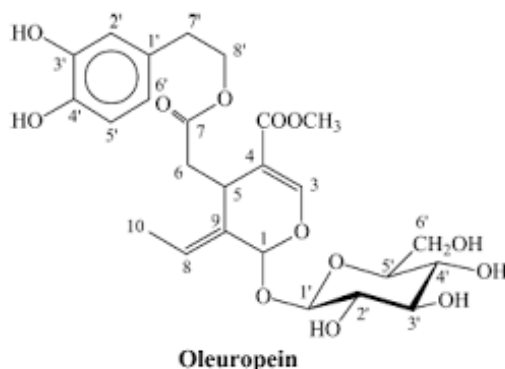


Fig. 5 | Struttura chimica oleuropeina.

Antonio Costa

2. **Obiettivo della ricerca**

Il ruolo che riveste l'alimentazione nella tutela della salute ha consentito di inserire l'EVOO tra gli alimenti con un elevato significato funzionale salutistico [Pons E., 2003].

È stato dimostrato che diversi componenti bioattivi del cibo possono interferire con la metilazione del DNA e le modificazioni degli istoni, in modo tale da interessare lo sviluppo del cancro [Ligresti A., 2003]. Tuttavia vi è una mancanza di conoscenza sulla regolazione dei meccanismi epigenetici da parte di EVOO. Sia le frazioni fenoliche, sia quelle lipidiche di EVOO contengono una varietà di sostanze antiossidanti e antitumorali, questo è dovuto alle interazioni mutuali tra queste. Valutando gli effetti preventivi di ogni singolo componente vi è una chiara rilevanza nel misurare la possibile attività antitumorale di EVOO puro.

L'obiettivo del presente studio, pertanto, è stato valutare la modulazione del Sistema Endocannabinoide in un modello di cancro al colon retto da parte dell'olio extra vergine di oliva. Nello specifico si è voluto indagare sugli effetti dell'olio extravergine di oliva e dei suoi composti fenolici (idrossitirosolo HT, oleuropeina OPE) nella modulazione dell'espressione degli elementi del sistema endocannabinoide, mediante regolazione epigenetica.

La scelta dei polifenoli è stata determinata per la loro capacità di impartire all'olio caratteristiche sensoriali e nutrizionali di grande rilievo. Sono proprio i polifenoli contenuti nell'olio extravergine di oliva i principali responsabili dei numerosi effetti salutari di quest'alimento e quindi della dieta mediterranea [Grosso G., 2013].

Il nostro studio partendo da una mancanza presente in letteratura, vuole investigare sulla regolazione dei geni potenzialmente implicati nella proliferazione cellulare, in particolar modo sugli elementi del sistema endocannabinoide e sugli effetti benefici di EVOO.

Tale studio è stato condotto *in vitro*, nelle cellule umane di cancro al colon (CaCo2) e nelle cellule umane di mucosa del colon (NCM460), ed *in vivo* su ratti Sprague-Dawley.

Il progetto ha fornito risultati *in vitro* ed *in vivo* riguardo il silenziamento epigenetico del gene oncosoppressore *cnr1* dovuto ad un'ipermetilazione sito specifica del promotore del gene, caratteristica già associata con un fenotipo di cancro [Ligresti A., 2003].

Antonio Costa

3. Materiali e metodi

3.1 Olio di oliva ed estratti fenolici

L'olio extra vergine di oliva è stato ottenuto usando la mono cultivar Leccino fornito dal frantoio "Montecchia Morro D'oro Teramo". Per ottenere l'olio di oliva rettificato (ROO) privato dei composti fenolici, i campioni di EVOO sono stati purificati con procedure di estrazione in fase solida. L'olio extra vergine di oliva e i suoi ROO derivati sono stati conservati in bottiglie scure a 4 °C prima di analizzarle. In seguito EVOO è stato filtrato usando filtri con maglia dei fori sino a 0,22 mm ed è stato diluito prima in dimetilsolfossido (DMSO) e quindi in mezzo di coltura alla concentrazione desiderata. Gli estratti fenolici dell'olio extra vergine di oliva e l'idrossitirosolo (HT) sono stati disciolti in DMSO e in seguito in mezzo di coltura cellulare per ottenere una concentrazione finale di 50µM.

3.1.1 Estrazione dei composti fenolici e loro analisi

La frazione fenolica è stata estratta utilizzando una colonna C18 (International Sorbent Technology, UK) precedentemente condizionata con 10ml di metanolo e 10ml di esano.

Il campione di EVOO (1g) è stato disciolto in 5ml di esano, la soluzione ottenuta è stata caricata sulla colonna e successivamente eluita con 10ml di esano per rimuovere completamente la frazione lipofila. I composti polari trattenuti sono stati invece recuperati in un secondo tempo eluendo con 20ml di metanolo.

L'eluato è stato posto in fiasche coniche e fatto evaporare a temperatura ambiente (30 °C, 150 rpm) in un rotavapor. L'estratto è stato recuperato con 0,5ml di DMSO ed il contenuto fenolico totale (TP) è stato valutato usando un metodo colorimetrico basato sul reattivo Folin-Ciocalteu che utilizza come standard di riferimento l'acido gallico. Un volume (20µl o 10µl) dell'estratto o dello standard fenolico è stato miscelato con 20µl di reattivo Folin-Ciocalteu ed incubato in agitazione per 3 minuti. In seguito, sono stati aggiunti 400µl di una soluzione di Na₂CO₃ al 7,5% per poi portare a volume finale di 1000µl con acqua distillata.

Le soluzioni sono state mantenute a temperatura ambiente in agitazione per sessanta minuti e il contenuto di TP è stato determinato spettrofotometricamente a una lunghezza d'onda pari a 760 nm. Successivamente i singoli composti fenolici dell'EVOO sono stati caratterizzati mediante cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC). È stato usato un HPLC in linea con un detector UV-vis impostato a 280 nm ed una colonna Kinetex C18 con particelle di 5µm e *Antonio Costa* dimensioni pari a 250mm di

lunghezza e 4,6mm di diametro. Come fase mobile è stato utilizzato un gradiente con acqua/acido formico (99.5/0.5) ed aceto nitrile con un flusso di 1ml/min. per un totale di 75 minuti. I composti fenolici sono stati quantificati usando una curva di calibrazione fatta con acido 3,4 didrossifenilacetico (DOPAC). La media è stata calcolata su tre replicati per ogni campione. Alla fine una porzione dell'estratto metanolico dell'olio di oliva è stato asciugato e in seguito recuperato con DMSO per ottenere OPE alla concentrazione di 1mM considerando una massa molecolare di 170 g/moli.

3.2 Studi in vitro

3.2.1 Colture cellulari

Gli esperimenti sono stati condotti usando la linea di cellule umane di cancro al colon CaCo2, e la linea cellulare epiteliale NCM460 derivante dalla mucosa di colon sana. Le cellule CaCo2 sono state ottenute da ATCC e sono state fatte crescere in DMEM con aggiunta di siero bovino fetale inattivato al calore (10% v/v), 2mM glutammina, 1% amminoacidi non essenziali, HEPES (25mM), penicillina (100U/ml) e streptomicina (100mg/ml). Le cellule NCM460 sono state fatte crescere in mono-strato in un terreno M3Base (contenente supplementi di crescita e antibiotici) con l'aggiunta di 10% FCS 2,5mM di glucosio e 2mM glutammina).

Le colture cellulari sono state mantenute a 37 °C in ambiente umidificato, contenente 95% di aria e il 5% di CO₂.

3.2.2 Trattamenti

I trattamenti con gli estratti fenolici sono stati fatti in un range μ M.

Tale range è stato stabilito considerando che l'assunzione di olio di oliva nei paesi del Mediterraneo è stimata intorno ai 30-40 g/giorno corrispondenti a circa 10-15 mg di fenoli totali/giorno.

Dato che l'olio di oliva usato in questo studio contiene 320 mg di fenoli totali/kg, che l'assorbimento è di circa il 55/66% dei fenoli ingeriti con l'olio di oliva, tenendo presente il volume del compartimento plasmatico, si può stimare che i livelli circolanti in fenoli di olio di oliva siano nel range del μ M.

Antonio Costa

3.2.3 Analisi della crescita cellulare

Per determinare la crescita cellulare è stato eseguito il test MTT. Le CaCo2 sono state allevate in piastre da novantasei pozzetti (a una concentrazione di $7,5 \times 10^3$ cellule/pozzetto) per le ventiquattro ore antecedenti l'esperimento. Il mezzo di coltura è stato rimpiazzato con terreno (colture non trattate) contenente diluizioni crescenti di OPE e HT. Utilizzato quale controllo positivo il rimonabant ($0,1 \mu\text{M}$, recettore antagonista di CB_1) incubato trenta minuti prima dei fenoli OPE e HT.

Dopo ventiquattro e quarantotto ore d'incubazione, i super natanti sono stati rimpiazzati con 0,1ml di mezzo fresco senza rosso fenolo, contenente 0,5mg/ml di MTT.

I campioni sono stati incubati per quattro ore in agitazione. Quindi, i cristalli di formazano (prodotto metabolico di MTT) sono stati solubilizzati tramite 0,1ml etanolo/DMSO nel rapporto 1:1 con tampone di lisi, e quantificati spettrofotometricamente alla lunghezza d'onda di 570 nm con riferimento a 695 nm. Le differenze nella crescita cellulare sono state misurate come percentuale di crescita delle cellule trattate rispetto a quelle non trattate (controlli).

3.3 Analisi dell'espressione genica e sua regolazione

3.3.1 Analisi dell'espressione genica (q-RT-PCR)

L'abbondanza relativa dell'mRNA è stata valutata mediante q-RT-PCR usando Sensi FAST SYBR Kit. I dati sono stati normalizzati in base ai geni endogeni di riferimento gliceraldeide-3fosfatodeidrogenasi GAPDH, β -actina e rRNA18S. Le differenze nel numero del ciclo soglia (Ct) sono state usate per quantificare la quantità relativa di target di PCR contenuti in ogni campione. L'espressione relativa dei differenti geni trascritti è stata calcolata usando il metodo ΔCt e convertita nel rapporto di espressione relativa ($2^{-\Delta\text{Ct}}$) per le analisi statistiche. Dopo q-RT-PCR, è stata fatta una curva di dissociazione nel range tra 60°C e 95°C per valutare la specificità dei prodotti dell'amplicone. I Primer di ratto e umani usati per l'amplificazione in PCR sono stati disegnati usando il software Primer3.

Antonio Costa

3.3.2 Analisi della metilazione del DNA (MSP)-qPCR e pirosequenziamento

Il DNA genomico è stato estratto dalle cellule o dai tessuti usando il reagente TRizol ed è stato soggetto alle modificazioni del bisolfito. In MSP-qPCR, due coppie di Primer di PCR sono state disegnate per abbracciare 25 siti CpG all'interno della regione del promotore *CNR1*. L'analisi della metilazione è stata condotta mediante Real time basata sulla fluorescenza. La sequenza amplificata di *CNR1* presenta i siti CpG ed è stata localizzata all'interno del primo esone del gene. È stato recentemente mostrato che la metilazione del DNA a valle del sito d'inizio della trascrizione, nella regione del primo esone è strettamente correlata al silenziamento trascrizionale rispetto la metilazione all'origine della regione promotore. La PCR è stata condotta per la regione non contenente isole CpG di *myoD*, che viene usata come controllo.

DNA non metilato nel genoma modificato con bisolfito è stato usato come controllo negativo. La percentuale di metilazione è stata calcolata tramite il metodo $2^{-\Delta Ct}$ in cui:

$$2^{-\Delta Ct} = \frac{[(Ct, M_CNR1 - Ct, myoD)_{\text{campione}} - (Ct, M_CNR1 - Ct, myoD)_{\text{DNA completamente metilato}}] * 100}{1}$$

Per le quantificazioni sono state generate curve standard per ogni gene e *myoD* da diluizioni in serie del DNA metilato modificato con bisolfito. Per confermare i nostri risultati, abbiamo usato come Primer anche le sequenze di DNA non metilato (*U_CNR1*) in DNA selezionato, calcolando la percentuale di metilazione. La metilazione del DNA è stata anche valutata mediante pirosequenziamento. Il DNA trattato con bisolfito è stato amplificato utilizzando il kit PCR PyroMark in accordo con il protocollo del costruttore.

Le condizioni di PCR utilizzate sono le seguenti: 95 °C per 15min. seguiti da 45 cicli di 94 °C per 30s, 56 °C per 30s 72 °C per 30s ed infine 72 °C per 10min.

La qualità del RNA estratto è stata poi verificata mediante gel di agarosio. Le analisi del pirosequenziamento sono state condotte usando PYROmARK q24 software che calcola la percentuale di metilazione.

3.3.3 Espressione dei microRNA (q-RT-qPCR)

L'espressione dei microRNA (miRNA) è stata quantificata

Antonio Costa

usando il sistema di Real time PCR 7900HT.

2µl di RNA totale è stato convertito in cDNA utilizzando Taqman microRNA ed è stato usato per la quantificazione di miR-23a (ID000399), miR-27a (ID000408); miR-29a (ID002112) e miR-301a (ID000528). Per normalizzare l'espressione dei microRNA, è stato usato U6snRNA. Tutte le reazioni sono state eseguite in triplicato e i valori di espressione sono riportati come $2^{-\Delta Ct}$.

3.4 Espressione proteica (Western blot)

I lisati cellulari sono stati preparati risospendendo le cellule CaCo2 e NCM460 in un tampone di lisi, contenente 1% v/v Triton X100, 0,1% w/v SDS (Sodium Dodecyl Sulfate), 2mM CaCl₂, 100µg/ml PMSF (phenylmethylsulphonylfluoride) e 0,1% cocktail d'inibitori della proteasi (Sigma Aldrich, Milan, Italy).

Gli estratti proteici totali da campioni di colon sono stati ottenuti tramite omogeneizzazione tissutale in tampone di lisi contenente 1% v/v Triton X100 0,1% w/v SDS e 0,1% di cocktail d'inibitori delle proteasi.

Uguali quantità di lisato proteico (30µg di proteina) sono state fatte correre in elettroforesi su gel di acrilamide al 10% e sono stati trasferiti su membrane di polivinildenfluoruro (PVDF).

Le membrane sono state saturate con una soluzione di latte in polvere senza grassi al 5%, sono state incubate con anticorpo policlonale di coniglio *anti-CB₁* (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI USA) diluito 1:500 e, sono state incubate con perossidasi di rafano coniugata all'anticorpo secondario diluito 1:3000 (Santa Cruz Biotechnology Inc. Santa Cruz, CA, USA).

I quantitativi sono stati normalizzati incubando le membrane con anticorpo policlonale di coniglio anti-tubulina diluito 1:3000 (Santa Cruz Biotechnology Inc. Santa Cruz, CA, USA) o con un anticorpo policlonale di coniglio *anti-GAPDH* diluito 1:5000 (Cell Signaling, USA). Il complesso antigene-anticorpo è stato rilevato attraverso l'uso di reagenti chemiluminescenti (ECL, Amersham, Bioscience) e l'intensità delle bande immunoreattive è stata quantificata tramite analisi densitometrica tramite software ImageJ.

3.5 Studi in vivo

Sono stati usati diciotto ratti femmina Sprague-Dawley, che all'inizio degli esperimenti  pesavano 225-250g. I ratti sono

stati acclimatati in gabbie individuali con un ciclo di luce/buio di dodici ore con libero accesso sia all'acqua sia al cibo per due settimane prima degli esperimenti. Sono stati tenuti in una stanza con temperatura costante (20-22 °C) e umidità (45-55%). Tutte le procedure sono state condotte in accordo secondo le direttive della comunità Europea per la cura e l'uso degli animali da laboratorio. Gli effetti dell'EVOO sono stati valutati eseguendo singola e ripetute somministrazioni orali. I ratti sono stati divisi in tre gruppi (n=6 per ogni gruppo) che hanno ricevuto: a) 10 giorni di acqua (*gruppo di controllo*); b) 9 giorni di acqua e infine al 10° giorno EVOO 250µl/300g (*somministrazione singola di EVOO*); c) EVOO 250µl/300g ogni giorno (*somministrazione ripetuta di EVOO*). La dose usata è stata scelta in conformità a precedenti studi che mimano l'assunzione umana.

3.6 Analisi statistica dei dati

I dati sono stati espressi come medie \pm la deviazione standard di esperimenti indipendenti. Per determinare la significatività statistica, è stato usato il test di Student per comparare due linee cellulari o la media dei trattamenti rispetto alla media dei controlli. Le analisi della varianza sono state seguite da comparazione multipla mediante il metodo Turkey-Kramer per le analisi delle medie di trattamenti multipli. È stato considerato significativo un valore di probabilità inferiore o uguale a 0,5.

Antonio Costa

4 Risultati

4.1 Analisi dei composti fenolici dell'EVOO

Il contenuto fenolico dei campioni di EVOO usati in questo studio è stato determinato tramite reagente Folin-Ciocalteu e tramite HPLC. Il contenuto totale di composti fenolici ammonta a 320ppm. I più rilevanti ortodifenoli determinati tramite HPLC, l'oleuropeina e l'idrossitirosolo sono risultati rispettivamente pari a 66ppm e 36,5ppm, mentre il mono-fenolo tirosolo pari a 98ppm. Sono stati valutati campioni di olio di oliva rettificato tramite tecniche analitiche, e sono stati determinati i livelli di fenoli non valutabili.

4.2 Effetti di EVOO, OPE, HT sull'espressione genica e proteica di mRNA di CB₁ nella linea cellulare di tumore al colon CaCo2

Abbiamo valutato l'espressione di *CNRI* dopo trattamenti a diversi tempi con EVOO, OPE, e HT. Come mostrato in figura 6 vi è una selettiva sovra regolazione di *CNRI* 24h dopo l'esposizione alle dosi: 100ppm EVOO; 50μM OPE; e 50μM HT. L'effetto stimolatorio di questi composti si manifesta in maniera significativa solo dopo 24 ore di incubazione (figura 6a). Questo effetto sembra essere transiente, infatti dopo ulteriori 24 ore (trattamento a 48h) ritorna ai valori basali. Abbiamo esteso le analisi dell'espressione genica ad altri elementi del sistema endocannabinoide (ECS) ma non sono presenti cambiamenti rilevanti osservati nei recettori CB₂, GPR₅₅, TRPV1 o per gli enzimi NAPE-PLD, DAGL, FAAH, MAGL (4,24,48 ore). In accordo con i dati del mRNA, le analisi del Western blot a 24h mostrano un aumento dell'espressione della proteina CB₁ (figura 6b e 6c). Questi risultati suggeriscono che la composizione complessa di EVOO può aumentare l'effetto dei suoi elementi attivi, ciò è dovuto sia ad effetti sinergici, sia ad un migliorato assorbimento di molecole attive in presenza dell'intera struttura del campione.

Antonio Costa

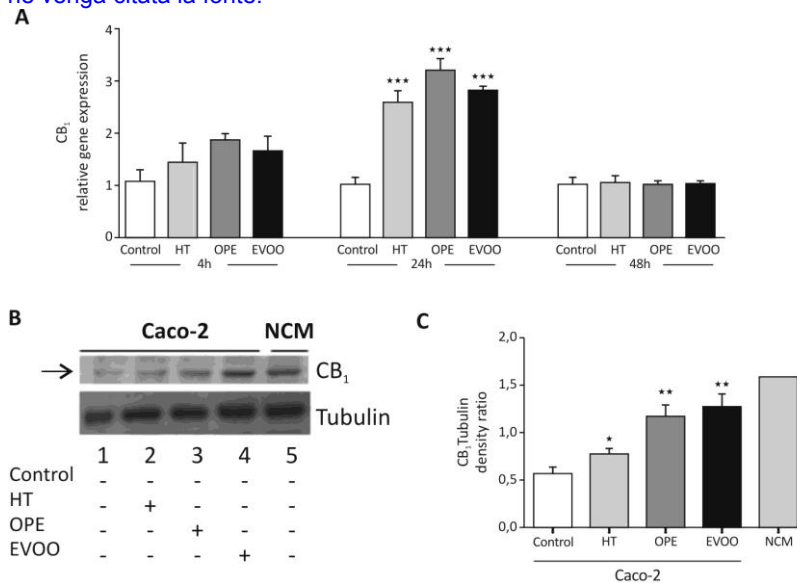


Fig. 6 | Effetti di EVOO, OPE e HT su mRNA di CB₁ e nella concentrazione proteica in cellule CaCo2.

4.3 EVOO inverte la metilazione e riattiva il gene *CNR1*

Basandoci su dati riportati riguardanti l'azione demetilante di alcuni polifenoli contenuti negli alimenti, come l'epigallocatechina-3gallato estratta dal tee verde e isoflavoni di soia, sulle linee cellulari di cancro [Fang M., 2007], abbiamo valutato gli effetti di EVOO e dei suoi estratti fenolici sullo status di metilazione del DNA, nel gene *CNR1* nelle cellule CaCo2. Il trattamento con EVOO ha determinato una significativa riduzione dei livelli di metilazione del promotore del gene *CNR1* ($76,46 \pm 6,83$ vs $94,04 \pm 2,62$) associato con un'incrementata espressione del gene *CNR1*, mentre il trattamento con EVOO deprivato della sua frazione fenolica (ROO) non ha prodotto effetti sulla metilazione di *CNR1* e sui livelli di mRNA (figura 7). Il trattamento con $10 \mu\text{M}$ 5-aza-deoxycitidina (5-aza-dC), potente agente demetilante usato come controllo positivo, ha portato ad una forte riduzione dei livelli di metilazione del promotore di *CNR1* ($23,48 \pm 2,67$) parallelamente ad una significativa induzione dei livelli di mRNA di *CNR1* (figura 7a e 7b). Poiché non vi sono cambiamenti nei profili di espressione di *CNR1* dopo avere trattato le cellule CaCo2 con ROO, abbiamo ipotizzato che la frazione fenolica minore di EVOO possa essere responsabile dell'induzione di *CNR1*, agendo come demetilante a livello del promotore. Pertanto abbiamo deciso di procedere utilizzando OPE estratto dall'EVOO e HT per gli esperimenti successivi. Come mostrato in figura 7 il trattamento con $50 \mu\text{M}$ di OPE ha determinato una significativa riduzione dei livelli di metilazione del promotore di *CNR1* ($69,48 \pm 3,18$) (figura 7a) associato con un'aumentata espressione del gene *CNR1* ($3,75 \pm 0,14$) (figura

Antonio Costa

7b). Allo stesso modo, il trattamento con 50 μ M di HT, il maggior orto-di-fenolo analizzato nella frazione fenolica, ha ridotto la metilazione del DNA rispetto al controllo (figura 7a) ed incrementato l'espressione del gene *CNR1* (figura 7b).

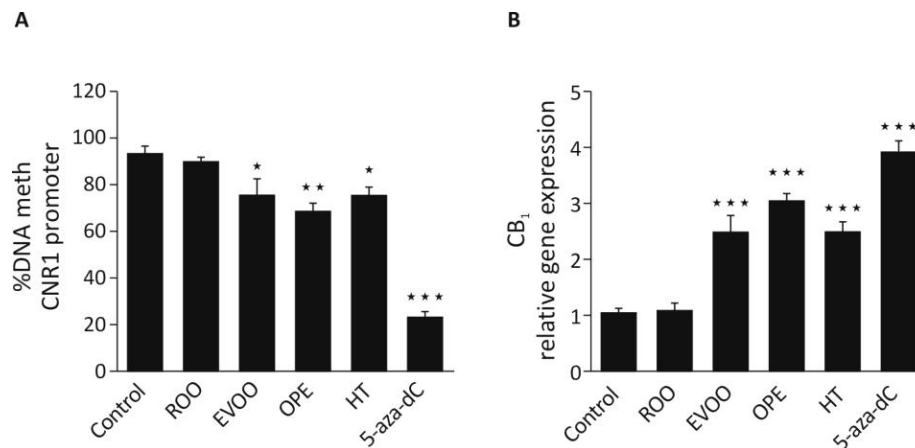


Fig. 7 | Effetti di EVOO sulla regolazione del gene *CNR1* nelle cellule CaCo2.

4.4 Stato di metilazione del promotore *CNR1* nelle cellule CaCo2 e NCM460

Il gene *CNR1* viene silenziato in seguito alla metilazione di CpG nel cancro al colon retto e agisce come soppressore tumorale *in vivo* [Wang D., 2008].

Per valutare se la metilazione del DNA influenzi l'espressione del gene *CNR1* sia in cellule normali che in cellule tumorali, abbiamo valutato il livello di metilazione di CpG del promotore di *CNR1* in due linee cellulari di colon, usando piro sequenziamento MSP-qPCR. Come mostrato in figura 8a, i siti metilati CpG nella regione del promotore *CNR1* erano più alti nelle cellule CaCo2 rispetto alle cellule NCM460.

Abbiamo quindi determinato il livello di metilazione di cinque siti CpG a valle del sito d'inizio della trascrizione di *CNR1* usando sequenziamento con bisolfito. Sequenziando le cellule CaCo2 i risultati hanno mostrato che le percentuali di metilazione di CpG dei cinque siti erano pari al 55,3%, 97,0%, 82,0%, 92,3% e 55,3% rispettivamente (figura 8b). Per le cellule NCM460 abbiamo osservato i seguenti valori 47,3%, 62,7%, 52%, 55,3% e 35,7% rispettivamente (figura 8b). Nel complesso, la metilazione media dei 5 siti CpG nelle cellule CaCo2 è risultata significativamente più alta rispetto quella osservata nelle cellule NCM460. Quindi abbiamo esaminato se il silenziamento epigenetico di *CNR1* tramite metilazione del DNA potesse contribuire a ridurre la trascrizione. La RT-PCR ha

Antonio Costa

rivelato che i livelli di mRNA di *CNR1* erano significativamente più bassi nelle cellule CaCo2 rispetto alle cellule NCM460, (figura 8c) dati supportati dalle analisi in western blot che hanno fornito risultati simili al livello di espressione proteica (figura 8d). Questi risultati suggeriscono che la metilazione aberrante delle isole CpG al livello del gene promotore porta al silenziamento trascrizionale del gene umano *CNR1* nelle cellule di cancro al colon.

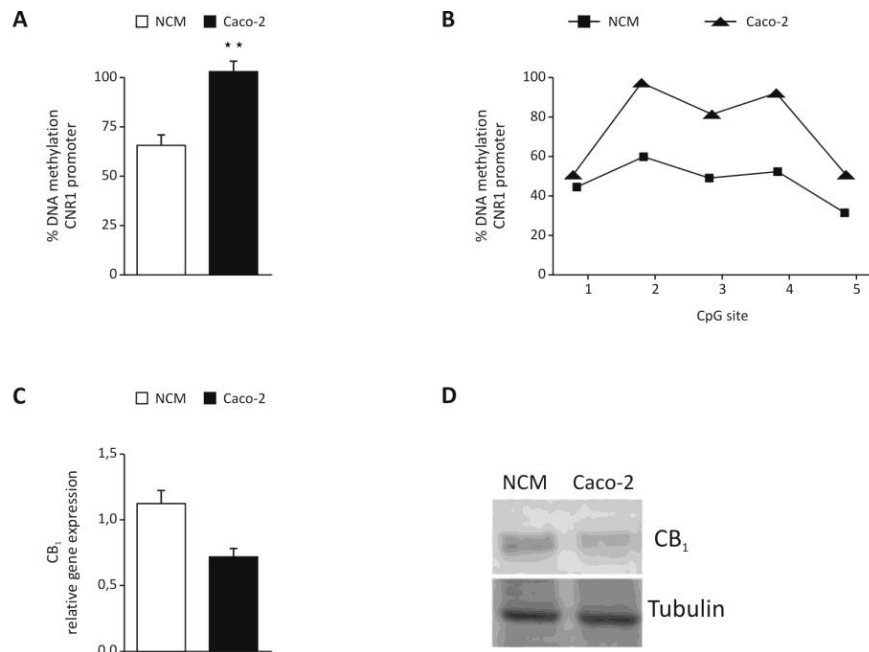


Fig. 8 | Metilazione del DNA ed espressione proteica nelle cellule CaCo2 e NCM460.

4.5 Effetto inibitorio di OPE e HT sulla proliferazione di cellule umane di cancro al colon

È stato dimostrato che gli endocannabinoidi sono in grado di inibire la proliferazione cellulare in linee cellulari di cancro inducendo l'apoptosi [Guzman M., 2003] [Maccarrone M., 2003].

Per determinare se l'attivazione del recettore CB₁ inibisca la crescita tumorale, abbiamo esaminato l'abilità di OPE e HT di arrestare la proliferazione delle cellule CaCo2 usando il saggio del MTT. Le cellule CaCo-2 sono state incubate con varie concentrazioni di OPE e di HT per 48 h. La crescita cellulare è stata espressa come percentuale di cellule non trattate (solo veicolo=100% vitalità cellulare).

I risultati sono medie di tre esperimenti indipendenti condotti in triplicato e l'intervallo di confidenza è pari al 95%.

Come mostrato in figura 9, vi è

Antonio Costa

una significativa riduzione nella

vitalità cellulare dopo 48h di trattamento con OPE ed HT entrambi alla concentrazione di 50 μ M. Invece, nessun cambio significativo nella crescita delle cellule CaCo2 è stato osservato dopo 24h (dati non mostrati). Va notato che il rimonabant (0,1 μ M), antagonista selettivo di CB₁, blocca l'effetto anti proliferativo di OPE e HT, mentre il DMSO da solo (solvente) non influisce sulla crescita della linea cellulare.

Questi risultati dimostrano che il CB₁ media gli effetti anti proliferativi dei composti fenolici isolati da EVOO.

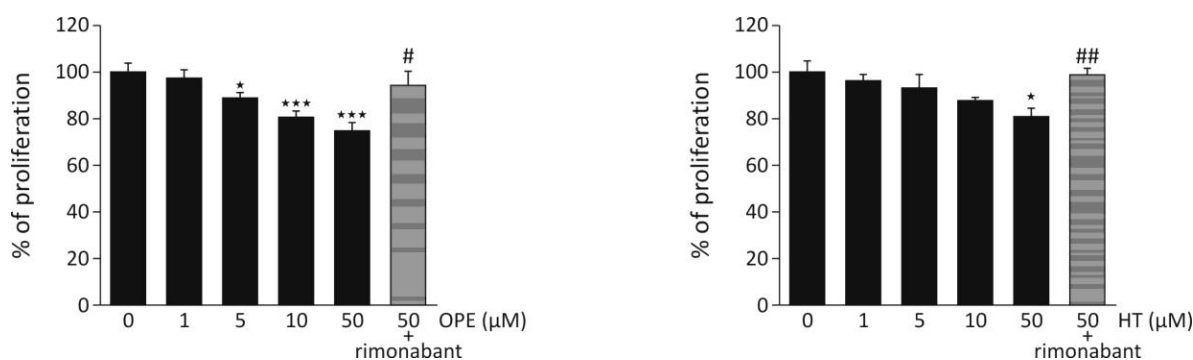


Fig. 9 | Effetti di OPE e HT sulla proliferazione cellulare delle cellule CaCo-2.

4.6 Influenza di EVOO alimentare sul peso corporeo, assimilazione del cibo ed espressione genica del Sistema Endocannabinoide *in vivo*

Al fine di verificare i dati ottenuti negli studi *in vitro*, abbiamo analizzato gli elementi del sistema endocannabinoide su campioni di colon di ratti soggetti a singola somministrazione, e a somministrazione prolungata (10 giorni) con EVOO.

Le analisi della varianza, hanno rivelato tra gli elementi del sistema endocannabinoide un significativo incremento nei livelli di espressione del gene *CNRI* nei campioni di colon di ratti trattati con EVOO per dieci giorni, mentre non sono stati osservati cambiamenti indicativi in nessun altro elemento del Sistema Endocannabinoide (figura 10).

Antonio Costa

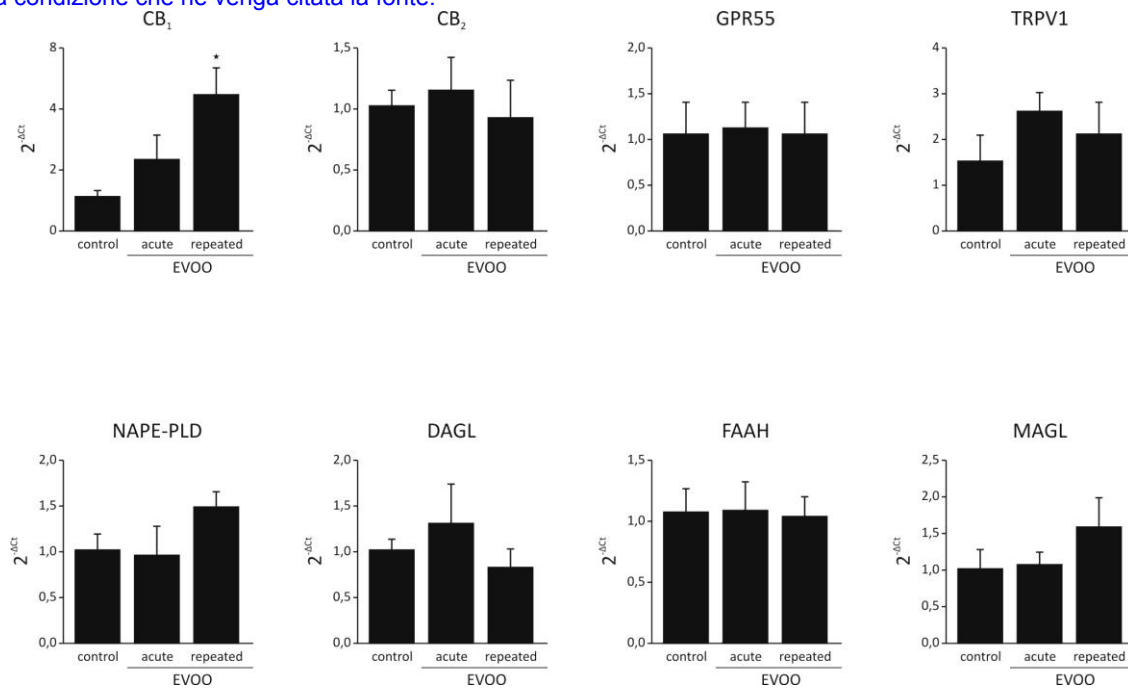


Fig. 10 | Effetti di EVOO sugli elementi del sistema endocannabinoide.

La singola somministrazione (2h) di EVOO ha incrementato l'espressione di *CNR1* senza però essere significativa statisticamente. In accordo, l'espressione proteica di CB₁ è aumentata nei ratti trattati con EVOO per 10 giorni (figura 11).

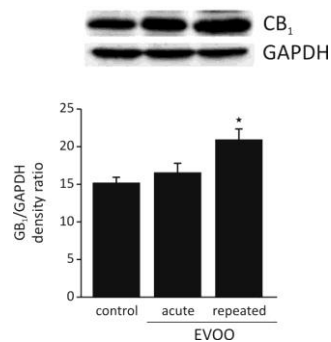


Fig. 11 | Effetti di EVOO sull'espressione proteica di CB₁.

In seguito ad analisi di piro sequenziamento, abbiamo osservato che la metilazione di CpG del gene *CNR1* di ratto è stata ridotta dopo trattamento per 10 giorni con EVOO (figura 12) dimostrando un effetto demetilante di EVOO sul gene *CNR1* anche nei trattamenti *in vivo*. Non è stata osservata differenza nel peso corporeo e nell'assimilazione del cibo tra i gruppi

Antonio Costa

valutati (figura 13).

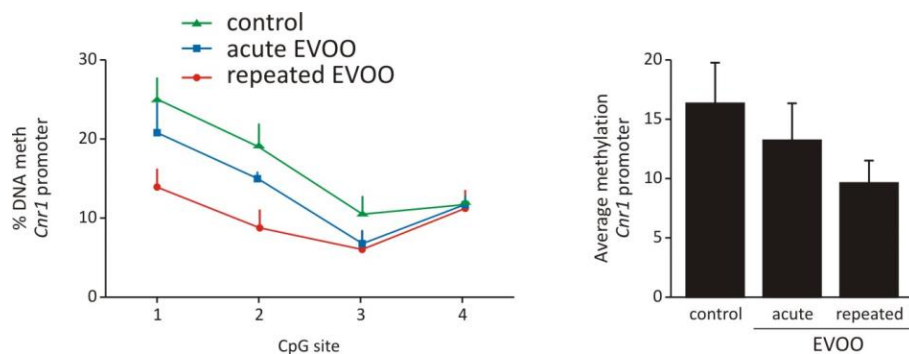


Fig. 12 | Variazione del livello di metilazione di CpG del gene *CNR1* in seguito a somministrazione di EVOO.

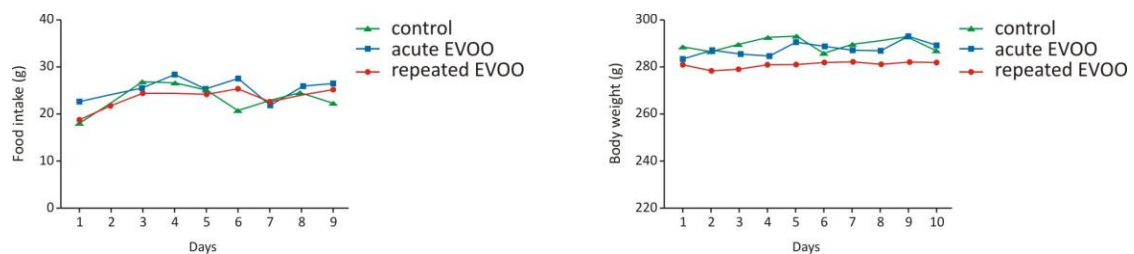


Fig. 13 | Variazione del peso corporeo ed assunzione di cibo in seguito a somministrazione di EVOO.

4.7 Influenza di EVOO alimentare su miRNAs bersaglio di CB₁

Per approfondire i meccanismi epigenetici potenzialmente implicati nella modulazione di CB₁ nella mucosa del colon, abbiamo eseguito analisi bioinformatiche usando TargetScan (<http://www.targetscan.org>) e miRanda (<http://www.microrna.org>), algoritmi predittivi per identificare possibili miRNAs bersaglio del recettore CB₁. Tra le sequenze predette, abbiamo selezionato 4 miRNA (miR-23a, miR-27a, miR-29a, miR-301a) che sono stati mostrati precedentemente essere coinvolti nella patogenesi del cancro del colon retto [Mazeh H., 2013]. Abbiamo analizzato la loro espressione tramite RT-qPCR in campioni di colon di ratti con diete controllo e a base di EVOO. Quest'ultima è sembrato influenzare l'espressione di miR-23a in particolar modo dopo singola somministrazione (figura 14). L'espressione di miR-301a è stata anche ridotta dopo somministrazione singola e somministrazione per 10 giorni di EVOO anche se in misura minore (figura 14) mentre l'espressione di miR-27a e miR-29a non è stata influenzata dal trattamento con EVOO alimentare. Il pattern di espressione miR-23a e miR-301a ha dato risultati inversi rispetto ai livelli di espressione in confronto con i livelli di espressione di CB₁, questo sembra suggerire un possibile ruolo di questi miRNA nella

Antonio Costa

regolazione post-trascrizionale di CB_1 .

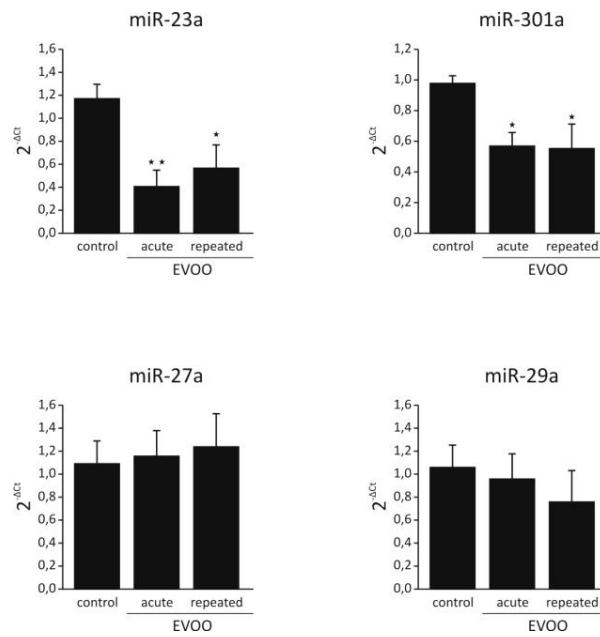


Fig. 14 | Variazione dei livelli di miRNA (miR-23a, miR-27a, miR-29a, miR-301a) in seguito a trattamento con EVOO.

Antonio Costa

5. Conclusioni

Gli elementi bioattivi del cibo influenzano la metilazione del DNA ed i processi di modificazione degli istoni [Ong T.P., 2011].

Tali attività hanno mostrato agire sull'espressione dei geni coinvolti nella proliferazione, morte e differenziazione cellulare che spesso sono alterate nel cancro. Lo studio dei meccanismi epigenetici è importante per analizzare le interazioni gene/ambiente nel tentativo di modificare gli effetti di espressione genica aberrante ed in questo modo influenzare gli effetti dell'ambiente sulla plasticità fenotipica, mediante una dieta specifica.

In questo studio abbiamo mostrato che EVOO e i suoi elementi fenolici regolano selettivamente l'espressione del gene *CNRI* nelle cellule CaCo2 così come nel colon di ratto e quest'effetto è mediato da meccanismi epigenetici. Inoltre, abbiamo osservato che il gene *CNRI* è silenziato nelle cellule CaCo2 se comparato con le normali cellule della mucosa del colon. Abbiamo trovato una più alta metilazione del DNA del promotore di *CNRI* nelle cellule del cancro in confronto ad NCM460. I nostri dati sono in accordo con un precedente studio pubblicato che mostra una frequenza nella metilazione di *CNRI* piuttosto alta (77%) nel cancro al colon [Wang D., 2008], meccanismo che può essere rilevante per la progressione del cancro.

Inoltre, gli estratti fenolici di EVOO sono stati in grado di determinare lo stesso pattern di cambiamenti *in vivo*, mentre EVOO privato della frazione fenolica non produceva alcun cambiamento nella metilazione di *CNRI* e nei livelli di mRNA.

Pertanto la frazione fenolica sembra essere il primo responsabile degli effetti osservati. Le proprietà benefiche dell'olio di oliva sono state principalmente attribuite all'alto contenuto di acido oleico monoinsaturo, che è riportato colpire il profilo lipidico del siero [Riccardi G., 1993] e diminuire, sia *in vivo* sia *in vitro*, le lipoproteine a bassa densità con suscettibilità all'ossidazione [Scaccini C., 1992] [Wiseman S.A., 1996].

In aggiunta, osservazioni concordi indicano che la frazione non glicerica dell'olio di oliva, ricca in composti fenolici, contribuisce significativamente ai benefici dell'olio di oliva sulla salute umana [Manna C., 1999] [Owen R.W., 2000] [Visioli F., 2011].

L'ipotesi che i polifenoli dell'olio di oliva contribuiscano molto ai benefici per la salute è supportata da dati in letteratura, che descrivono le proprietà

Antonio Costa

biologiche dei composti fenolici purificati, come l'idrossitiroso, il maggior orto-di fenolo dell'olio extravergine di oliva. È di grande rilevanza che i nostri studi *in vitro* siano stati confermati *in vivo*. Noi abbiamo osservato che la metilazione del DNA sul promotore di *Cnr1* di colon di ratto era comparabile a quella osservata nelle cellule normali della mucosa del colon.

Quindi mRNA di CB₁ e livelli della proteina sono stati analizzati in animali sani che ricevono dieta standard. Inoltre i ratti che ricevono EVOO per dieci giorni hanno mostrato un incremento selettivo nell'espressione del gene *Cnr1* ed i livelli di proteina nel loro colon, effetto parzialmente associato a una riduzione nella metilazione del DNA al livello del promotore di *CNR1*.

Per approfondire i meccanismi attraverso cui la dieta a base di EVOO può determinare l'induzione di CB₁ *in vivo*, abbiamo studiato l'espressione di quattro miRNAs, in precedenza risultati essere coinvolti nella patogenesi del cancro al colon retto ed in grado di interagire con l'mRNA del CB₁.

Tra questi, l'espressione di miR23a e miR301a è stata selettivamente ridotta ($\approx 30\%$ e $\approx 50\%$ dei controlli, rispettivamente) dopo somministrazione di EVOO singola o per dieci giorni. In ogni modo, i nostri dati supportano un ruolo potenziale di EVOO come agente preventivo e antitumorale [Notarnicola M., 2011] essendo capace di modulare i processi epigenetici che partecipano allo sviluppo del cancro e probabilmente di influenzarne la progressione [Feinberg A.P., 2004].

L'ipometilazione globale del DNA, l'ipermetilazione del gene promotore e le modificazioni post-trascrizionali aberranti dell'istone sono marcatori di cellule neoplastiche, e sono associate con l'instabilità genomica ed una espressione genica alterata [Jones P.A., 2007] [Portela A., 2010]. Poiché la regolazione epigenetica avviene presto nella carcinogenesi ed è potenzialmente reversibile, le strategie di intervento indirizzate sull'epigenoma sono state proposte per la prevenzione del cancro. Un approccio studiato intensivamente che riguarda la terapia epigenetica richiede l'uso di agenti capaci di modificare globalmente l'epigenoma, così come inibitori della metilazione del DNA o dell'acetilazione degli istoni. Una nota precauzionale in approcci globali è che usando farmaci che modificano il metiloma, globalmente possono avere effetti inaspettati sui geni che non sono i target desiderati; per esempio, il 5-aza-dC, che inibisce la metilazione del DNA è stato provato clinicamente per riattivare geni soppressori di tumori silenziati e può sia

Antonio Costa

silenziare che attivare molti geni [Gius D., 2004].

Quindi abbiamo ipotizzato potenziali effetti preventivi di EVOO se usato a dosi corrispondenti a quelle abituali della dieta mediterranea. Gli effetti di EVOO e OPE sulla modulazione di CB₁, osservati *in vitro* mostrano una risposta dopo ventiquattro ore di esposizione, ma transitoria dal momento che dopo quarantotto ore si osservano i valori di partenza. Così abbiamo alimentato i ratti ogni giorno con EVOO, è stato interessante notare che la dose adatta per agire sulla regolazione del gene *CNRI* non influiva sull'assunzione di cibo e sul peso corporeo. Sarà interessante testare questa ipotesi in un modello animale di CRC, e questo è il nostro scopo futuro. Comunque, le ricerche sulla modulazione dell'espressione del gene *CNRI* mediata da estratti fenolici di EVOO, ed attraverso meccanismi epigenetici potrebbero fornire una nuova strategia terapeutica per il trattamento e/o prevenzione del cancro.

In accordo con l'ipotesi che il gene *CNRI* agisca come oncosoppressore del cancro al colon, pensiamo che sia OPE sia HT siano capaci di arrestare la proliferazione cellulare di CaCo-2 alle stesse dosi usate per indurre l'espressione di CB₁, mentre l'antagonista selettivo di CB₁ rimonabant (0,1 µM) previene l'effetto anti proliferativo di OPE e HT.

Come già suggerito, [Wang D., 2008] aumentati livelli di endocannabinoidi potrebbero non colpire la crescita tumorale per la perdita di CB₁, osservato in molti modelli di tumore del colon retto e questo potrebbe rendere le cellule resistenti a questi ligandi. Comunque, un iniziale trattamento con OPE per aumentare i livelli di CB₁ seguito da una somministrazione dell'agonista di CB₁ per ottenere stimolazione ottimale dell'apoptosi potrebbe essere efficace. È importante anche sottolineare che la ricerca sulla regolazione epigenetica degli elementi del sistema endocannabinoide (ECS) è attualmente molto attiva [D'Addario C., 2013]. In particolare la regolazione di CB₁ è stata correlata ad un vasto numero di malattie neurodegenerative, incluse la malattia di Huntington, la malattia di Alzheimer, e la sclerosi multipla [Micale V., 2007].

Comunque, nuovi studi sono necessari per esaminare se l'espressione di CB₁ sia ridotta in altri tipi di cancro e se i meccanismi epigenetici possano essere rilevanti nella regolazione dell'espressione genica di *CNRI*.

In conclusione, usando un approccio multiplo, abbiamo fornito l'evidenza *in vivo* e *in vitro* che la metilazione del DNA del CB₁, già associata con un fenotipo

Antonio Costa

Tesi di dottorato in Scienze dell'alimentazione e della nutrizione umana, di Antonio Costa,
discussa presso l'Università Campus Bio-Medico di Roma in data 11/03/2016.

La disseminazione e la riproduzione di questo documento sono consentite per scopi di didattica e ricerca,
a condizione che ne venga citata la fonte.

di cancro, potrebbe essere modulata dall'EVOO. Saranno necessari altri studi al fine di testare differenti dosi ed anche diversi tempi allo scopo di suggerire un possibile uso di OPE per la prevenzione o per il trattamento del cancro, eventualmente in combinazione con un agonista di CB₁.

Antonio Costa

6. Bibliografia

Alexander A, Smith P.F, Rhonda J, Rosengren R.J, (2009) Cannabinoids in the treatment of cancer; Cancer letters 285, 6-12.

Bardhan K, Liu K, (2013) Epigenetics and colorectal cancer pathogenesis; Cancer 5, 676-713.

Besnard G, Bervillè A, (2000) Multiple origins for Mediterranean olive (*Olea europaea L. ssp europaea*) based upon mitochondrial DNA polymorphisms: Life Sciences, 323: 173-181.

Blankman JL, Simon GM, Cravatt BF, (2007) A comprehensive profile of brain enzymes that hydrolyze the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. Chem Biol 14: 1347-56.

Bisogno T, (2008) Endogenous Cannabinoids: structure and metabolism; Journal of neuroendocrinology (20) 1-9

Bisogno T, Howell F, Williams G, Minassi A, Cascio MG, Ligresti A, Matias I, Schiano-Moriello A, Paul P, Williams EJ, Gangadharan U, Hobbs C, Di Marzo V, Doherty P, (2003) Cloning of the first sn1-DAG lipases points to the spatial and temporal regulation of endocannabinoid signaling in the brain: J Cell Biol 163: 463-68.

Bifulco M, Laezza C, Pisanti S, Gazerro P, (2006) Cannabinoids and cancer: pros and cons of an antitumour strategy. British journal of pharmacology 148: 123-135.

Borchert GM, Lanier W, Davidson BL, (2006) RNA polymerase III transcribes human microRNAs. Nat Struct Mol Biol. 13: 1097-101.

Campbell R.M, Tummino P.I, (2014) Cancer epigenetics drug discovery and development: the challenge of hitting the mark; The Journal of clinical investigation 124; 64-69.

Cardeno A, Sanchez-Hidalgo M, Cortes Delgado A, Alarcon de Lastra C, (2013) Mechanisms involved in the antiproliferative and pro-apoptotic effects of unsaponifiable fraction of extra virgin olive oil on HT-29 cancer cells; Nutrition and cancer 65 (6) - 908-18.

Casaburi I, Puoci F, Chimento A, Sirianni R, Ruggiero C, Avena P, Pezzi V, (2013) Potential of olive oil phenols as chemopreventive and therapeutic agents against cancer: a review of in vitro studies: Mol. Nutr. Food Res 57, 71-83.

Caterina M.J, (2007) Transient receptor potential ion channel as participants in thermosensation and thermoregulation; Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 292: R64-76.

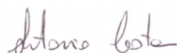
Chuang JC, Jones PA, (2007) Epigenetics and microRNAs. Pediatr Res; 61:24R-29R.

Consiglio Oleico Internazionale (1997) Enciclopedia Mondiale dell'olivo.

Cravatt BF, Giang DK, Mayfield SP, Borger DL, Lerner RA, Giulia NB, (1996) Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. Nature; 384:83-7.

D'Addario C, Di Francesco A, Pucci M, Finazzi Agrò A, Maccarrone M, (2013) Epigenetic mechanism and endocannabinoid signaling, FEBS Journal 280; 1905-1917.

D'Addario C, di Francesco A, Arosio B, Gussago c, Dell'Osso B, Bari M, Galimberti D, Scarpini E, Altamura C, Mari D, Maccarrone M, (2012) Epigenetic regulation of fatty



Tesi di dottorato in Scienze dell'alimentazione e della nutrizione umana, di Antonio Costa, discussa presso l'Università Campus Bio-Medico di Roma in data 11/03/2016.
La disseminazione e la riproduzione di questo documento sono consentite per scopi di didattica e ricerca, a condizione che ne venga citata la fonte.

acid amide hydrolase in Alzheimer disease PlosOne 7: 6 e39186.

Dainese E, Oddi S, Bari M, Maccarrone M, (2007) Modulation of the endocannabinoid system by lipid rafts; Curr Med Chem 14: 2702-15.

D'Argenio G, Petrosino S, Gianfrani C, (2007) Overactivity of the intestinal endocannabinoid system in celiac disease and in methotrexate-treated rats. J Mol Med: 85: 523-30.

De Petrocellis L, Di Marzo V, (2009) An introduction to the endocannabinoid system: from the early to the latest concepts; Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism 23; 1-15.

Di Marzo V, De Petrocellis L, (2010) Endocannabinoids as regulators of transient receptor potential (TRP) channels: a further opportunity to develop new endocannabinoid-based therapeutic drugs. Current Medicinal Chemistry Vol. 17 1430-1449.

Di Marzo V, Petrosino S, (2007) Endocannabinoids and the regulation of their levels in health and disease. Curr Opin Lipidol. 18: 129-40.

Egertová M, Simon G.M, Cravatt B.F, Elphick M.R, (2008) Localization of N-acylphosphatidylethanolamine phospholipase D (NAPE-PLD) expression in mouse brain: A new perspective on N-acylethanolamines as neural signaling molecules: J Comp Neurol; 506(4): 604-15.

Fang M, Chen D, Yang CS, (2007) Dietary polyphenols may affect DNA methylation. J. Nutr. 137: 223S-8S.

Feinberg AP, Tycko B, (2004) The history of cancer epigenetics, Nat Rev Cancer 4; 143-53.

Fidaleo M, Fanelli F, Ceru MP, Moreno S, (2014) Neuroprotective properties of peroxisome proliferator activated receptor alpha (PPAR α) and its lipid ligands. Curr Med Chem 21 (24) 2803-21.

Finazzi Agrò A, Maccarrone M, (2013) Surfing the endocannabinoids wave; FEBS Journal 280, 1873.

Flygare J, Sander B, (2008) The endocannabinoid system in cancer - potential therapeutic target? Seminars in Cancer Biology 18: 176-189.

Fowler C.J, (2013) Transport of endocannabinoids across the plasma membrane and within the cell. FEBS Journal 290; 1895-1904.

Fowler CJ, (2012) Monacylglycerol lipase - a target for drug development? British Journal of Pharmacology 166; 1568-1585.

Fride E, (2002) Endocannabinoids in the central nervous system-an overview. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 66: 221-33

Galve-Roperh I, Chiurchiù V, Diaz-Alonso J, Bari M, Guzmàn M, Maccarrone M, (2013) Cannabinoid receptor signaling in progenitor/stem cell proliferation and differentiation; Progress in Lipid Research 52 (4) 633-650.

Giuffrida A, Beltramo M, Piomelli D, (2001) Mechanism of endocannabinoid inactivation: J Pharmacol Exp Ther: 298:7-14.

Gius D, Cui H, Bradbury CM, Cook J,  Smart DK, Zhao S, et al, (2004)

Tesi di dottorato in Scienze dell'alimentazione e della nutrizione umana, di Antonio Costa,
discussa presso l'Università Campus Bio-Medico di Roma in data 11/03/2016.

La disseminazione e la riproduzione di questo documento sono consentite per scopi di didattica e ricerca,
a condizione che ne venga citata la fonte.

Distinct effects on gene expression of chemical and genetic manipulation of the cancer epigenome revealed by a multimodality approach; *Cancer Cell* 6: 361-71.

Grosso G, Buscemi S, Galvano F, Mistretta A, Marventano S, La Vela V, Drago F, Gangi S, Basile F, Biondi A, (2013) Mediterranean diet and cancer: epidemiological evidence and mechanism of selected aspects; *BMC Surgery* 13 Suppl. 2: S14.

Guzman M, (2003) Cannabinoids: potential anticancer agents. *Nat Rev Cancer* 3; 745-55.

Howlett AC, Mukhopadhyay S, (2000) Cellular signaling transduction by anandamide and 2-arachidonoylglycerol. *Chem Phys Lipids* 108; 53-70.

Izzo A, Aviello G, Petrosino S, Orlando P, Marsicano G, Lutz B, Borrelli F, Capasso R, Nigam S, Capasso F, Di Marzo V, (2008) Increased endocannabinoid levels reduce the development of precancerous lesions in the mouse colon: *J. Mol Med* 86: 89-98.

Laprairie RB, Kelly MEM, Denovan-Wright EM, (2012) The dynamic nature of type 1 cannabinoid receptor (CB₁) gene transcription; *British Journal of Pharmacology* 167: 1583-1595.

Leung D, Saghatelian A, Simon G.M, Cravatt B.F, (2006) Inactivation of N-acyl phosphatidylethanolamine phospholipase D reveals multiple mechanism for the biosynthesis of endocannabinoids. *Biochemistry* 45(15): 4720-6.

Ligresti A, Bisogno T, Matias I, De Petrocellis L, Cascio M, Cosenza V, D'argenio G, Scaglione G, Bifulco M, Sorrentini I, Di Marzo V, (2003) Possible Endocannabinoid Control of Colorectal Cancer Growth, *Gastroenterology* 125: 677-687.

Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ, (2009) Cancer statistics, *Cancer J Clin*, 59:225-49.

Jones PA, Baylin SB, (2007) The epigenomics of cancer, *Cell* 128: 683-92.

Maccarrone M, (2013) Endocannabinoid signaling in cancer: a rather complex puzzle; trends in Pharmacological Sciences Vol. 34, N. 8 426-427.

Maccarrone M, (2008) Good news for CB1 receptors: endogenous agonists are in the right place. *Br. J Pharmacol* 153: 179-81.

Maccarrone M, Finazzi-Agrò A, (2003) The endocannabinoid system, anandamide and the regulation of mammalian cell apoptosis. *Cell Death Differ* 10: 946-955.

Maccarrone M, Finazzi-Agrò A, (2002) Endocannabinoids and their actions. *Vitam Hormon* 65: 225-55.

Maccarrone M, Lorenzon T, Bari M, Melino G, Finazzi Agrò A, (2000) Anandamide induces apoptosis in human cells via vanilloide receptors. Evidence for a protective role of cannabinoid receptors. *J Biol Chem* 275: 31938-45.

Manna C, Della Ragione F, Cucciolla V, Borriello A, D'Angelo S, Galletti P et al, (1999) Biological effects of hydroxytyrosol, a polyphenol from olive oil endowed with antioxidant activity; *Adv. Exp. Med. Biol.* 472; 115-30.

Mazeh H, Mizrahi I, Ilyayev N, Halle D, Brucher B, Bilchik A, Protic M, Daumer M, Stojadinovic A, Itzhak A, Nissan A, (2013) The diagnostic and prognostic role of microRNA in colorectal cancer - a comprehensive review, *J. Cancer* 4; 281-95.

Antonio Costa

Tesi di dottorato in Scienze dell'alimentazione e della nutrizione umana, di Antonio Costa, discussa presso l'Università Campus Bio-Medico di Roma in data 11/03/2016.
La disseminazione e la riproduzione di questo documento sono consentite per scopi di didattica e ricerca, a condizione che ne venga citata la fonte.

Micale V, Mazzola C, Drago F, (2007) Endocannabinoids and neurodegenerative diseases; *Pharmacol. Res.* 56; 382-92.

Montedoro Gianfranco, Servili M, Baldioli M, Selvaggini R, Miniati E, Macchioni A, (1993) Simple and hydrolysable compounds in virgin olive oil 3 Spectroscopic characterizations of the secoiridoid derivatives *J. Agric. Food Chem.* 41: 2228-2234.

Morettini A, (1972) *Olivicoltura*, REDA Ramo Editoriale degli Agricoltori, Roma, Italia.

Naska A, Trichoupoulou A, (2013) The Mediterranean diet paradigm; *Nutrition Metabolism & Cardiovascular disease* 1-4.

Nicola S, Fearnhead J, Wilding L, Bodmer WF, (2002) Genetics of colorectal cancer: hereditary aspects and overview of colorectal tumorigenesis. *British Medical Bulletin*, 64: 27-43.

Notarnicola M, Pisanti S, Tutino V, Bocale D, Rotelli M.T, Gentile A, Memeo V, Bifulco M, Perri E, Caruso M.G, (2011) Effects of olive oil polyphenols on fatty acid synthase gene expression and activity in human colorectal cancer cells; *Genes & Nutrition* 6, 63-69.

Oddi S, Spagnuolo P, Bari M, D'Agostino A, Maccarrone M, (2007) Differential modulation of type 1 and 2 cannabinoid receptors along the neuroimmune axis. *Int Rev Neurobiol.* 82:327-37.

Ong TP, Moreno FS, Ross SA, (2011) Targeting the epigenome with bioactive food components for cancer prevention; *J. Nutrigenet. Nutrigenomics* 4; 275-92.

Owen RW, Haubner Wurtele G, Hull WE, Spiegelhalder B, Bartsch H, (2004) Olives and olive oil in cancer prevention. *European Journal of Cancer prevention*: 13 - 4.

Owen RW, Giacosa A, Hull WE, Haubner R, Wurtele G, Spielhalder B et al, (2000) Olive-oil consumption and health: the possible role of antioxidant; *Lancet Oncol.* 1; 107-12.

Pacher P, Kunos G, (2013) Modulating the endocannabinoid system in human health and disease successes and failures; *FEBS Journal* 280; 1918-1943.

Paradisi A, Pasquariello N, Barcaroli D, Maccarrone M, (2008) Anandamide regulates keratinocytes differentiation by including DNA methylation in CB1 receptor-dependent manner. *Journal of Biological Chemistry* 283-10.

Patsos HA, Hicks DJ, Dobson RR, (2005) The endogenous cannabinoid, anandamide, induces cell death in colorectal carcinoma cells: A possible role for cyclooxygenase 2. *Gut*; 54: 1741-50.

Pertwee R.G, (2010) Receptors and Channels Targeted by Synthetic Cannabinoid Receptor Agonists and Antagonists; *Curr Med Chem.* 17 (14): 1360-1381.

Piomelli D, (2003) The molecular logic of endocannabinoid signaling. *Nat Rev Neurosci.* 4: 873-84.

Pisanti S, Picardi P, D'Alessandro A, Laezza C, Bifulco M, (2013) The endocannabinoid signaling system in cancer; *Trends in Pharmacological Sciences* 34; 273-282.

Pistis M, Melis M, (2010) From surface to nuclear receptors: the endocannabinoid family extends its assets. *Current Medicinal Chemistry Vol.* 17 1450-1467.

Pons E, Llor X, Roca A, Alvarez M ,



Manè J, Fernandez Banares F, Gassull

Tesi di dottorato in Scienze dell'alimentazione e della nutrizione umana, di Antonio Costa,
discussa presso l'Università Campus Bio-Medico di Roma in data 11/03/2016.

La disseminazione e la riproduzione di questo documento sono consentite per scopi di didattica e ricerca,
a condizione che ne venga citata la fonte.

M.A, (2003) The effects of fish oil, olive oil, oleic acid and linoleic acid on colorectal neoplastic processes; *Clinical Nutrition* 22 (1) 71-79.

Portela A, Esteller M, (2010) Epigenetic modifications and human disease; *Nat Biotechnol* 28: 1057-68.

Preston SL, Wong WM, Chan AO, Poulson R, Jeffery R, Goodlad RA, Mandir N, Elia G, Novelli M, Bodmer WF, Tomlinson IP, Wright NA, (2003) Bottom-up histogenesis of colorectal adenomas: origin in the monocryptal adenoma and initial expansion by crypt fission. *Cancer Res.* 63 (13): 3819-25.

Pucci M, Rapino C, Di Francesco A, Dainese E, D'Addario C, Maccarrone M, (2013) Epigenetic control of skin differentiation genes by phytocannabinoids; *British journal of pharmacology* 170: 581-591.

Rallo P, Dorato G, Martin A, (2000) Development of simple repeats (SSRs) in olive trees (*Olea europea L.*) *Theoretical and Applied Genetics*; 104: 984-989.

Riccardi G, Rivellese A, (1993) An update on monounsaturated fatty acids. *Curr. Opin. Lipidol.* 4: 13-6.

Rotter A, Bayerlein K, Hansbauer M, Weiland J, Sperling W, Kornhuber J, Biermann T, (2013) CB1 and CB2 receptor expression and promoter methylation in patients with cannabis dependence; *Eur Addict Res* 19: 3-20.

Santoro A, Pisanti S, Grimaldi C, Izzo A, Borrelli F, Proto M, Malfitano A, Gazzero P, Laezza C, Bifulco M, (2009) Rimonabant inhibits human colon cancer cell growth and reduces the formation of precancerous lesions in the mouse colon. *Int J Cancer* 125: 996-1003.

Sarfaraz S, Adhami VM, Syed DN, Afaq F, (2008) Mukhtar H, Cannabinoids for cancer treatment: progress and promise. *Cancer Res.* 68: 339-42.

Scaccini C, Nardini M, D'Aquino M, Gentili V, Di Felice M, Tomassi G, (1992) Effect of dietary oils on lipid peroxidation and on antioxidant parameters of rat plasma and lipoprotein fractions. *J. Lipid Res* 33:627-33.

Schicho R, Storr M, (2011) Alternative targets within the endocannabinoid system for future treatment of gastrointestinal diseases *Can J Gastroenterol.* 25 (7): 377-383.

Serini S, Ottes Vasconcelos R, Fasano E, Calviello G, (2016) Epigenetic regulation of gene expression and M2 macrophage polarization as new potential omega-3 polyunsaturated fatty acid targets in colon inflammation and cancer *Expert Opin Ther Targets* 7: 1-16.

Servili M, Selvaggini R, Esposto S, Taticchi A, Montedoro GF, Morozzi G, (2004) Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil; *J. Chromatogr. A* 1054: 113-127.

Szallasi A, Blumberg PM, Annicelli LL, Krause JE, Cortright DN, (1999) The cloned rat vanilloid receptor VR1 mediates both R-type binding and C-type calcium response in dorsal root ganglion neurons. *Mol Pharmacol*: 56: 581-7.

Thun MJ, DeLancey JO, Center MM, Jemal A, Ward EM, (2010) The global burden of cancer, priorities for prevention; *Carcinogenesis* 31:100-10.

Ueda N, Tsuboi K, Uyama T, (2013) Metabolism of endocannabinoids and related N-acyl ethanolamines: Canonical and alternative pathways; *FEBS Journal* 280. 1874-1894.

Ueda N, Tsuboi K, Uyama T, Ohnishi T,
the endocannabinoid

Antonio Costa

(2011) Biosynthesis and degradation of
2-arachidonylglycerol. *BioFactors* 1-7.

Visioli F, Bernanrdini E, (2011) Extra virgin olive oil's polyphenols: biological activities Curr. Pharm. Des. 17; 786-804.

Waddington C.H, (2012) The epigenotype; Journal of Epidemiology 41: 10-13.

Walther A, Johnstone E, Swanton C, Midgley R, Tomlinson I, Kerr D, (2009) Genetic prognostic and predictive markers in colorectal. Nat Rev Cancer 9: 489-99.

Wang D, Wang H, Ning W, Blacklund MG, Dey SK, DuBois RN, (2008) Loss of cannabinoid receptor 1 accelerates intestinal tumor growth; Cancer Res 68; 6468-76.

Wiseman SA, Mathot JN, de Fouw NJ, Tijuburg LB, (1996) Dietary non-tocopherol antioxidants present in extra virgin olive oil increase the resistance of low density lipoprotein to oxidation in rabbits; Atherosclerosis 120: 15-23.

Xia D, Wang D, Kim SH, Katoh H, DuBois RN, (2013) Prostaglandin E2 promotes intestinal tumor growth via DNA methylation; Nature medicine 18, 224-226.

Antonio Costa

7. Ringraziamenti

A conclusione del mio lavoro di studio, è doveroso ringraziare il mio docente guida Prof. Mauro Maccarrone (Università Campus Bio-Medico di Roma), la Dott.ssa Monica Bari (Università degli Studi di Roma TorVergata) la Dott.ssa Tiziana Bisogno (Istituto di Chimica Biomolecolare CNR Pozzuoli) per aver creduto nelle mie capacità facendomi appassionare alla ricerca.

Un ulteriore ringraziamento va rivolto al Prof. Claudio D'Addario (Università degli Studi di Teramo) ed al Dott. Andrea Di Francesco (Università degli Studi di Teramo).

Antonio Costa

SECONDA PARTE

1. Introduzione

1.1 Sistema endocannabinoide nel pesce

Gli endocannabinoidi costituiscono una classe di mediatori lipidici, identificati in maniera ubiquitaria negli organismi viventi a partire dagli invertebrati fino all'uomo [Tiscar P.G., 2006].

I recettori dei cannabinoidi e gli endocannabinoidi *N*-Arachidoniletanolamina (anandamide, AEA) e 2-arachidonilglicerolo (2-AG) sono stati correlati ad una grande varietà di processi fisio-patologici nei vertebrati, tra cui il controllo del metabolismo energetico, i processi infiammatori, ed alcuni meccanismi correlati all'appetito [D'Addario C., 2014]. Tra questi è stata molto studiata la regolazione dell'assunzione del cibo, indicata in diversi phyla animali, ampiamente valutata nei mammiferi e riscontrata anche negli uccelli [Di Marzo V., 2005].

Il controllo fisiologico dell'appetito e la sazietà negli animali è regolato da un complesso sistema di segnali a livello centrale e periferico, che includono non solo il sistema endocannabinoide (SE) ma anche neuro-peptidi (NPY) [Piccinetti C., 2010].

In questa complessa regolazione, gli endocannabinoidi sono mediatori d'informazione metabolica dal sistema nervoso centrale (SNC) alla periferia (SNP) e viceversa [Maccarrone M., 2015].

L'effetto stimolatorio degli endocannabinoidi sull'assunzione del cibo è stato correlato alla loro azione diretta sull'ipotalamo. Infatti, sia il recettore CB₁ che gli endocannabinoidi sono presenti in quest'area del cervello maggiormente coinvolta nel controllo dell'appetito [Cottone E., 2009].

Diversi studi hanno dimostrato la presenza di un sistema endocannabinoide funzionale nel pesce ed il suo possibile coinvolgimento nel comportamento alimentare [Valenti M., 2005].

Infatti, i loro livelli endogeni sono stati misurati in tutte le aree cerebrali di *Carassius auratus* [Valenti M., 2005] nelle quali risultano presenti anche i recettori cannabici e gli enzimi metabolici [Piccinetti C., 2010].

L'attenzione è stata posta sul CB₁ perché nei mammiferi è maggiormente correlato all'assunzione del cibo, sebbene nel pesce siano stati individuati entrambe i geni orologi di CB₁ e CB₂ [Valenti M., 2005].

La localizzazione del recettore CB₁ è stata, anche studiata nello sviluppo di *Xenopus laevis* [Migliarini B., 2006] ed in *Danio rerio* [Piccinetti C., 2010] [Migliarini B., 2009] mostrando un alto grado di conservazione degli elementi del sistema endocannabinoide [Palermo F.A., 2011].

Piccinetti e collaboratori hanno studiato il sistema

Antonio Costa

endocannabinoide in *Sparus aurata* un pesce di acqua salata di alto valore commerciale. In tale studio sono stati valutati i livelli di anandamide (AEA), 2-arachidonilglicerolo (2-AG), ed altre due *N*-aciletanolammine, la *N*-oleiletanolamina (OEA) e la *N*-palmitiletanolamina (PEA) nel cervello e nel fegato di giovanili di *Sparus aurata* in seguito a trattamento con AEA (10 μ M) per 30, 60, 120 minuti [Piccinetti C., 2010].

I risultati hanno mostrato che il pesce esposto ad AEA già dopo 30 minuti mostra livelli di questo endocannabinoide, nel cervello e nel fegato, di parecchi ordini di grandezza superiori rispetto ai livelli basali presenti nel gruppo di controllo.

Nell'ambito dello stesso studio non sono stati registrati cambiamenti significativi aumentando il tempo di esposizione sino a 120 minuti [Piccinetti C., 2010].

Concentrazioni incrementate di AEA sono seguite da un'inibizione dell'assunzione di cibo, mostrando quindi un'inversa correlazione [Piccinetti C., 2010]. Questi risultati possono essere interpretati come la prima evidenza *in vivo* di una stretta correlazione tra CB₁ e NPY nel quadro dei circuiti cerebrali che controllano la stimolazione dell'appetito nel pesce [Piccinetti C., 2010].

1.2 Metabolismo lipidico

I pesci di allevamento sono soggetti a stress dovuto a fattori ambientali biotici ed abiotici.

I cambiamenti biochimici generati da fattori esogeni possono essere monitorati nel tessuto e nelle cellule degli organismi acquatici.

Tra i diversi fattori che influenzano la qualità del prodotto di acquacultura, sicuramente uno dei principali è l'accumulo dei lipidi, causato dalla disponibilità di cibo e dal ridotto movimento.

Essendo i lipidi, in particolare gli acidi grassi, uno dei parametri per valutare la qualità del pesce, diversi studi hanno analizzato il loro coinvolgimento nel processo di perossidazione delle membrane che è facilmente misurabile attraverso la valutazione dell'indice di ossidazione [Maccarrone M., 2000].

I processi di lipogenesi nel pesce sono regolati da tre principali enzimi: glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD), che è coinvolto nella generazione di equivalenti riduttori (NADPH), acido grasso sintetasi (fatty acid synthetase, FAS), complesso enzimatico che necessita di NADPH quale cofattore per sintetizzare gli acidi grassi e l'enzima malico (ME) [Menoyo D., 2004].

Una dieta con pochi acidi grassi stimola il consumo di NADPH, come osservato in *Onchorynchus mykiss* ed in *Dicentrarchus labrax*, mentre una

Antonio Costa

dieta con un alto contenuto in acidi grassi inibisce la FAS attraverso la regolazione della sintesi di NADPH da parte di G6PD [Menoyo D., 2004].

In generale si può affermare che diete con alto contenuto in acidi grassi inibiscono la lipogenesi in molte specie di pesce. Cambiamenti nell'attività di G6PD e FAS non sono soltanto indicativi dello stato lipogenico ma anche della suscettibilità della carne di pesce alla perossidazione [Menoyo D., 2004].

La deposizione lipidica nel tessuto del pesce richiede diversi processi metabolici: la lipogenesi, il trasporto lipidico tramite le lipoproteine, l'assorbimento del tessuto lipidico, mediato dalla lipoproteina lipasi (LPL), il deposito dei lipidi.

I siti principali di deposizione dei grassi nei salmonidi sono il tessuto adiposo periviscerale ed il tessuto muscolare bianco [Richard N., 2006].

Nel pesce il trasporto dei lipidi endogeni e di quelli provenienti dalla dieta verso i tessuti periferici è mediato dalle lipoproteine, la cui organizzazione molecolare ed il loro ruolo nel metabolismo lipidico è simile a quello dei mammiferi.

Studi in letteratura hanno dimostrato che la composizione in acidi grassi dei lipidi ottenuti dalla dieta modifica la composizione lipidica del plasma e delle lipoproteine plasmatiche [Richard N., 2006].

A tal proposito, studi condotti in *Pagrus major* hanno indicato che gli acidi grassi regolano in modo tessuto specifico l'espressione genica di LPL nel fegato e nel tessuto viscerale [Richard N., 2006].

1.3 Stato dell'arte dell'acquacultura

Il pesce ha un importante valore nutrizionale per l'uomo, soprattutto se correlato alla prevenzione di molteplici malattie cardiovascolari, immunologiche e neurologiche dovute in particolare all'alto contenuto in acidi grassi della serie ω -3.

Secondo i dati pubblicati dall'Earth Policy Institute [Larsen J., 2013] nel 2011 la produzione dell'acquacoltura mondiale, con 66 milioni di tonnellate, ha superato la produzione di animali di allevamento terrestri, che nello stesso periodo si attestata intorno ad un valore di 62 milioni di tonnellate (figura 1).

Antonio Costa

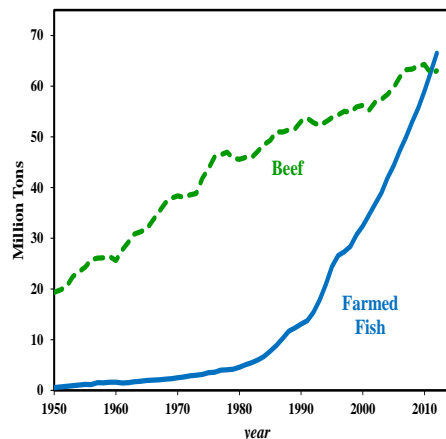


Fig. 1 | Variazione mondiale della produzione di carne derivante da animali terrestri e dalla produzione di pesce di allevamento nel periodo compreso tra 1950 e 2010.

A conferma di questa tendenza positiva, le previsioni della FAO (Food and Agriculture Organization) suggeriscono che l'acquacoltura mondiale nel 2022, con una crescita complessiva del 35% supererà anche la produzione della pesca, che in questo periodo crescerà soltanto del 5%.

La produzione dell'acquacoltura europea, a differenza della crescita significativa registrata a livello globale, è rimasta stazionaria. Essa tuttavia può contare su alcuni punti rilevanti di forza, tra i quali: un settore di ricerca e sviluppo tecnologico molto avanzato ed una consistente base imprenditoriale, con un elevato livello di competenza tecnico e gestionale. Questi sono elementi che permettono di ottenere prodotti di qualità, nel rispetto delle rigorose norme dell'Unione Europea in materia di sostenibilità ambientale, salute degli animali e protezione dei consumatori.

L'Unione Europea, con il Fondo Europeo per la Pesca (FEP) appena terminato ed il Fondo Europeo per gli Affari Marittimi e la Pesca (FEAMP) in fase di avvio, ha individuato nell'acquacoltura uno degli assi prioritari. Nella stesura del FEAMP è stata data notevole importanza al coinvolgimento dei principali portatori di interesse. Al livello comunitario, nazionale, e regionale nel processo di elaborazione dei programmi d'intervento a sostegno dell'acquacoltura, i produttori vengono coinvolti in maniera attiva, con l'intento di intercettare i reali bisogni del settore [Santulli A., 2013].

L'Italia è il quinto produttore in Europeo (inclusa la Norvegia) con poco più di 160.000 t, che ammontano a circa il 13% della produzione dell'acquacoltura dei 27 Stati membri della UE [ISMEA, 2013].

La produzione dell'acquacoltura italiana è costituita essenzialmente da molluschi (mitili e vongole) che costituiscono il 65% della produzione nazionale. I pesci

Antonio Costa

allevati pur rappresentando soltanto il 35% della quantità totale prodotta dall'acquacultura nazionale, costituiscono il 66% dei ricavi totali, derivanti per il 39% dall'allevamento della trota e per il 20% della spigola ed il 18% dell'orata [ISMEA, 2013].

Considerando la crescente importanza del settore dell'acquacultura, molti studi sono proprio finalizzati ad aumentare la produttività e la qualità degli allevamenti ittici.

Tab. 1 | Produzione delle principali specie allevate in Italia sul totale della produzione dei 27 Stati membri dell'Unione Europea nel 2011.

Specie	Nome scientifico	Peso (%)
Cozze o mitilo	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	64,1
Trota iridea	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	21,5
Vongola verace	<i>Ruditapes philippinarum</i>	19,52
Spigola	<i>Dicentrarchus labrax</i>	8,9
Orata	<i>Sparus aurata</i>	6,4
Trota di mare	<i>Salmo trutta</i>	3,83
Storione	<i>Acipenser naccarii</i>	6,65
Vongola verace	<i>Ruditapes decussatus</i>	17,54
Anguilla	<i>Anguilla anguilla</i>	1,49
Carpa	<i>Cyprinus carpio</i>	1,1
Altre specie		0,5
	Totale	12,6

1.4 Produzioni in acquacultura e loro impatto ambientale

L'acquacultura comprende diverse pratiche di allevamento a seconda della specie (alghe, molluschi, crostacei, pesci ed altri organismi acquatici), dell'ambiente, e dei sistemi utilizzati, offrendo un ampio ventaglio di possibilità per accrescere la produzione ed il reddito in molte aree rurali e periurbane. La qualità dei prodotti è specchio della modalità di allevamento, delle tecnologie impiegate e della risorsa idrica utilizzata.

Antonio Costa

Questo settore non può sostituire del tutto la pesca, ma avrà un ruolo progressivamente più importante nell'assicurare al mercato prodotti ittici con una notevole diversificazione di specie, e nel preservare la biodiversità delle acque interne tramite il ripopolamento.

L'acquacultura è un'attività zootecnica intensiva ed in quanto tale interagisce strettamente con l'ambiente, causando mutamenti ambientali dovuti all'immissione nell'habitat acquatico di reflui rappresentati da nutrienti non consumati, e contribuendo all'eutrofizzazione delle acque [Munday B., 1992]. L'impatto negativo dell'acquacultura è controllato da una serie di norme e/o patti intesi a prevenire il degrado ambientale.

Le relazioni tra acquacultura ed ambiente sono di estrema importanza, pertanto nasce la necessità di una produzione che tenga conto della eco sostenibilità del processo produttivo utilizzato [Tancioni L., 2001]. Un'acquacultura ecosostenibile è in grado di procurare benessere economico e sociale, garantendo la preservazione delle risorse e dell'ambiente per le generazioni future.

1.5 Sistemi produttivi a ricircolazione idrica (RAS)

Il RAS (Recirculating Aquaculture System) è una nuova tipologia di impianto che recupera e ricicla l'acqua di allevamento mediante il processo di depurazione (figura 2).

Negli impianti di acquacultura che adottano il ricircolo, il principio della depurazione si basa sulla trasformazione dell'ammoniaca prodotta dai pesci, in nitriti e in seguito in nitrati. Tale processo avviene mediante l'utilizzo di filtri biologici realizzati su sistemi a biomassa adesa caratterizzati da materiali ad elevata porosità e superficie ruvida, in modo da rendere massima la superficie di adesione del biofilm di trasformazione. Il sistema di depurazione in un impianto a ricircolo può essere composto da diverse sub-unità, ognuna avente un ruolo differente: filtro meccanico per il sedimento più fine; filtro biologico di diverso genere per le sostanze organiche tossiche disciolte; modulo di sterilizzazione per la carica batterica.

In tali impianti mediante l'utilizzo di mangimi appositamente studiati, si è ottimizzata l'efficienza di assunzione e conversione di azoto e del fosforo, migliorata la digeribilità e minimizzata la dispersione [Tancioni L., 2001].

Il maggior vantaggio dei sistemi chiusi è di fornire all'operatore il completo controllo delle variabili ambientali.

Antonio Costa

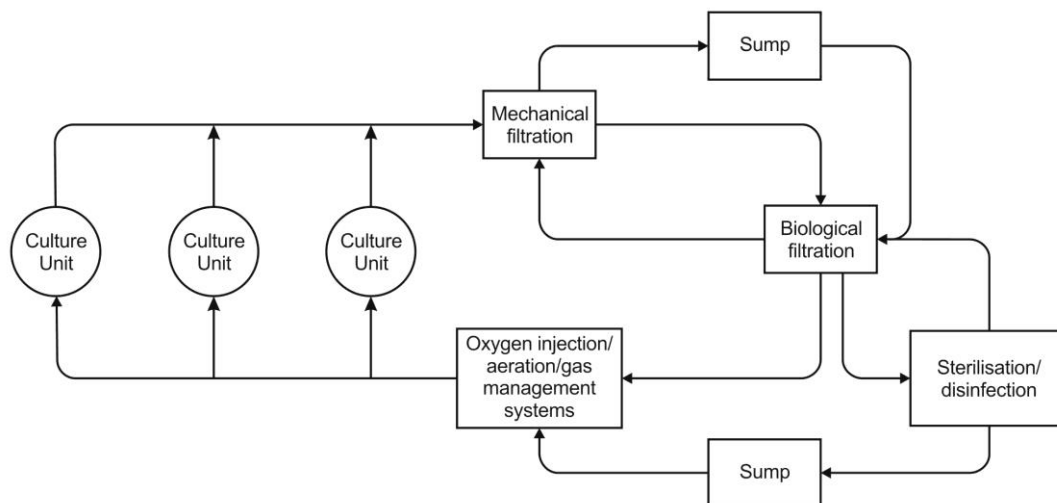


Fig. 2 | Schema generico di un sistema RAS.

L'utilizzo di questa tecnologia di allevamento è importante in aree, dove la fornitura dell'acqua e/o gli effetti dei carichi nutrizionali sugli ecosistemi acquatici circostanti limitano la portata attuale della produzione in acquacoltura [Piedrahita R.H., 2003].

La complessità del RAS sta nell'interazione tra il trattamento dell'acqua ed il giusto accrescimento degli organismi allevati, che implica l'ottimizzazione di un progetto, coinvolgendo configurazione, dimensione, pesce, mangime, flusso idrico che tenga conto dei costi di investimento e gestione, e della stabilità della qualità delle acque [Jamu D.M., 2002].

1.6 La catena alimentare in acquacoltura

La catena alimentare in acquacoltura è semplicemente una riproduzione di quella esistente in natura in cui l'unica differenza è di essere più breve e più efficiente.

L'alimentazione rappresenta un aspetto importante e delicato durante il primo periodo di sviluppo, in quanto le larve di molte specie ittiche alla nascita sono di ridotte dimensioni, con organi di senso ed apparato digerente non completamente sviluppati.

Il tentativo di impiegare esclusivamente mangime nella prima fase di sviluppo di molte specie ittiche ha dato risultati insoddisfacenti sulla sopravvivenza e sulla crescita attribuibili probabilmente alla bassa digeribilità ed appetibilità del prodotto.

L'inizio dell'assunzione di cibo esogeno si ha al termine del riassorbimento del sacco vitellino circa al 5°-7° giorno dalla schiusa. Nella fase iniziale gli unici alimenti utilizzati sono i Rotiferi appartenenti al genere *Brachionus* in particolare la specie *Brachionus plicatilis*, [Fukusho K., 1989], ed il crostaceo *Artemia salina*.

Questi oltre ad essere di piccole

dimensioni e molto digeribili si

Antonio Costa

muovono in continuazione stimolando le larve ad alimentarsi, facilitando incontri frequenti tra larva e preda.

Il crostaceo *Artemia salina* rappresenta nella catena trofica delle larve dei pesci marini la tappa successiva ai rotiferi e costituisce l'anello di congiunzione con le diete inerti (mangimi secchi).

Le diete artificiali sono inserite nel programma alimentare soltanto dalla V-VI settimana dalla schiusa.

In base alla precocità della specie, tale periodo inizia ai 35-40 giorni di età per terminare intorno ai 60 giorni, in corrispondenza alla fine della metamorfosi delle larve [Cataudella S., 2001].

Tuttavia l'uso dell'alimento vivo pone diversi problemi: dalla necessità di fornire un elevato numero di prede (in quanto ad esempio per allevare un larva di branzino in 30 giorni occorrono circa 17500 nauplii) alla conoscenza delle qualità nutrizionali della preda, affinché sia bilanciata rispetto ai fabbisogni della larva.

Per sostenere lo sviluppo e la crescita dei Rotiferi sono usati diversi alimenti tra cui le micro alghe appartenenti al genere *Chlorella* ed il lievito di birra con cui vengono ottenute elevate densità colturali [Saroglia M., 1992].

1.7 Alimentazione e nutrizione in acquacultura

La nutrizione degli organismi acquatici negli allevamenti intensivi riveste una notevole importanza sia dal punto di vista tecnico che economico. Sebbene le conoscenze sui fabbisogni dei pesci non abbiano ancora raggiunto un livello paragonabile a quello conseguito per le specie omeoterme, i dati acquisiti finora appaiono sufficienti a garantire ottimi risultati tecnici ed economici.

In tal modo vengono assicurate prestazioni elevate, alta qualità del prodotto, resistenza agli stress ed alle malattie e contenimento dell'impatto ambientale [Cataudella S., 2001].

La quantità di alimento ingerita dipende da molteplici fattori, classificati come intrinseci ed estrinseci.

Quelli intrinseci dipendono dall'età, dalla taglia, e dallo stato fisiologico dell'animale e sono distinti in meccanismi a breve termine (sotto il controllo ipotalamico) ed a lungo termine (in base al livello di adiposità dell'organismo) [Messina C., 2013].

Gli estrinseci, sono invece legati alle caratteristiche dell'alimento ed alle condizioni ambientali, come la temperatura dell'acqua, il livello di saturazione dell'ossigeno, il fotoperiodo e l'intensità di illuminazione [Buentello A.J., 2000].

Antonio Costa

Tra i fattori intrinseci va menzionato il peso vivo del pesce, poiché la quantità di alimento ingerita in percentuale rispetto al peso vivo, diminuisce al crescere della taglia. Tra i fattori estrinseci, si ricordano le caratteristiche dell'alimento quali, il suo livello di energia, la presenza di quantità elevate di proteine e le dimensioni dei bocconi.

Molti di questi fattori sono di riferimento per i produttori di mangimi che forniscono idonee tabelle di razionamento in funzione della specie, della taglia del pesce e della temperatura dell'acqua [Tacon A.G.J., 2011].

Per il calcolo delle quantità da distribuire è necessario conoscere la taglia media dei pesci ed anche la biomassa totale, ricorrendo a periodici campionamenti.

La raccolta periodica di questi dati ci permette di calcolare il tasso di accrescimento specifico e giornaliero, di stimare anche il peso che sarà raggiunto dopo un "x" periodo di giorni.

$$\text{TAS} = [(\ln (\text{peso finale, g}) - (\ln (\text{peso iniziale, g})/\text{numero giorni})] \times 100$$

I dati ottenuti consentono di calcolare l'indice di conversione, parametro che dà subito un'idea della precisione del razionamento alimentare.

$$\text{IC} = (\text{alimento distribuito, Kg}/\text{accrescimento realizzato, Kg})$$

Se il tasso di razionamento (R) è espresso in % del peso vivo, l'indice di conversione può essere calcolato dal rapporto (IC=R/TAS). D'altra parte, conoscendo l'indice di conversione (IC) e il valore di (R), si può calcolare il valore di (TAS). La registrazione paziente e continua di questi dati consente all'allevatore di prevedere con precisione l'andamento tecnico ed economico del suo impianto.

1.7.1 Proteine e amminoacidi

Le proteine rappresentano una quota rilevante nella dieta dei pesci. Gli amminoacidi (aa) della dieta si sommano a quelli riciclati dalle proteine corporee, soggette ad un continuo turnover necessario al rinnovo delle cellule, per essere insieme utilizzati nella sintesi di nuova massa proteica (accrescimento) e di altri composti azotati bioattivi.

Rispetto al pollo o al suino, il riciclo di aa dai tessuti corporei è quantitativamente minore nei pesci, rendendoli molto dipendenti dalla dieta per la copertura dei fabbisogni proteico-amminoacidici.

Le proteine ingerite non vengono completamente utilizzate dai pesci, infatti si perde nelle feci dal 5 al 15% mentre parte degli aa assorbiti, vengono catabolizzati per ottenere energia vitale specialmente nei carnivori, che non sono in grado di ben utilizzare a tal fine amidi e zuccheri [Adamidou S., 2008].

Questo processo origina "scorie *nitrosi* azotate" date in prevalenza da

ammoniaca, eliminata attraverso le branchie, che assieme alle feci contribuisce ad elevare il carico inquinante dell'allevamento.

Un'alimentazione responsabile del pesce deve pertanto massimizzare l'utilizzo della proteina dietetica per l'accrescimento, minimizzando il rilascio di scorie azotate nell'acqua.

La variabilità del livello proteico dipende in misura modesta da fattori quali la taglia del pesce, la temperatura e la salinità dell'acqua. Molto più influenti sono i fattori alimentari ed in primo luogo il razionamento adottato che, se troppo restrittivo, richiede un aumento del livello proteico del mangime per assicurare la crescita attesa. Il livello proteico ottimale è inoltre condizionato dal contenuto energetico del mangime e in particolare dall'apporto calorico delle frazioni lipidiche e glucidiche [Cataudella S., 2001].

Un corretto rapporto tra proteina ed energia digeribile (PD/ED), realizzato bilanciando i macronutrienti nella dieta, favorisce un maggior utilizzo di "carburanti" non proteici per sostenere il costo calorico del pesce facendo "risparmiare" aa dietetici altrimenti catabolizzati per produrre energia metabolizzabile. Nei pesci carnivori, l'aumento del livello lipidico del mangime è molto efficace a questo fine, e giustifica il largo successo dell'uso delle diete estruse ad alta densità energetica. Anche la qualità della proteina condiziona il livello ottimale nel mangime. Ingredienti proteici poco digeribili e con composizione in aa limitante rispetto al fabbisogno del pesce portano a elevare il livello proteico del mangime a discapito di un'efficiente conversione proteica [Cataudella S., 2001].

Per l'elevato tenore proteico, l'ottimo profilo amminoacidico, l'alta digeribilità ed appetibilità, la farina di pesce, purché ottenuta con idonei processi industriali da pescato fresco e privo di contaminanti, rappresenta la fonte proteica ideale nei mangimi per l'acquacultura.

Vari fattori tra i quali l'espansione della domanda per questa risorsa, cui si contrappone la sua limitata disponibilità, minano da qualche tempo la sostenibilità biologica ed economica di utilizzo di questa risorsa e rendono sempre più attuale l'impiego di ingredienti proteici sostitutivi nell'alimentazione dei pesci [Adamidou S., 2008] [Messina M., 2007].

Con l'emergenza BSE ed il divieto d'uso mangimistico dei derivati proteici ricavati da tessuti di animali terrestri, l'unica possibilità percorribile è data dall'impiego di proteine vegetali, in particolar modo i legumi.

Si tratta di alimenti molto diversi per origine botanica e processo tecnologico di produzione, ma tutti presentano almeno uno dei seguenti limiti rispetto alle farine di pesce: minor titolo proteico, ridotta digeribilità ed appetibilità, profilo amminoacidico insufficiente e/o sbilanciato, presenza di fattori anti

Antonio Costa

nutrizionali ed in alcuni casi di

origine OGM. Nondimeno, alcuni derivati proteici vegetali, singolarmente o in combinazione, si sono dimostrati in grado di sostituire con successo quote significative di farina di pesce nei mangimi per trota, spigola, orata [Tufarelli V., 2006] (Tabella 2).

La sostituzione della farina di pesce nella dieta di branzini (*D. labrax*) e orate (*S. aurata*) è interessante per l'acquacoltura data la diffusione ed importanza commerciale. Una sostituzione del 25-30% con farina di soia non provoca effetti negativi sulla crescita, la conversione del cibo, l'efficienza e la ritenzione proteica di queste specie [Adamidou S., 2008] [Messina M., 2005] [Tibaldi E., 2006].

Tab. 2 | Livelli consigliati di sostituzione della proteina di farina di pesce con derivati proteici vegetali nei mangimi per trota e spigola.

Derivato proteico vegetale	Specie ittica	% della proteina nel mangime	Note e precauzioni
Farina di estrazione di soia tostata e decorticata	Trota	30-40	Integrazione dieta con Lo DL metionina. Verifica del livello di tostatura
	Spigola	30-40	
Concentrato proteico di soia ottenuto con acqua-etanolo.	Trota	50	Integrazione dieta con metionina
	Spigola	50	
Farina glutinata di frumento	Trota	50	Integrazione dieta con L-lisina e L-arginina
	Spigola	50	
Farina glutinata di mais	Trota	30	Integrazione dieta con L-lisina.

1.7.2 Lipidi

I lipidi presenti nelle diete dei pesci sono importanti fonti di energia e di acidi grassi essenziali (AGE) necessari per l'accrescimento e lo sviluppo del pesce [Fried M., 1968]. Essi inoltre concorrono all'assorbimento delle vitamine liposolubili. Dal punto di vista biochimico i lipidi sono miscele costituite da grassi, oli, certe vitamine, ormoni e la maggior parte delle sostanze non proteiche presenti nelle membrane cellulari. La componente comune a tutte le diverse frazioni che costituiscono i lipidi è l'acido grasso.

Gli acidi grassi sono suddivisi in acidi grassi saturi e acidi grassi insaturi.

Similmente ad altri vertebrati, nei pesci alcuni acidi grassi risultano essenziali, ovvero non possono venire sintetizzati dall'animale (tabella 3). Tuttavia solo una carenza dietetica molto prolungata di acidi grassi essenziali porta alla morte del pesce, mentre sub-carenze o carenze periodiche danneggiano le prestazioni produttive e riproduttive [Kavadias S., 2004] [Bayir A., 2005]. Infatti, gli AGE sono necessari ai pesci quali componenti dei fosfolipidi delle membrane cellulari e delle lipoproteine di trasporto; come substrato per la sintesi di un'intera famiglia di molecole con caratteristiche ormonali quali le prostaglandine (PG), ed i suoi composti derivati (leucotrieni e trombossani) ed infine per il ruolo, ancora poco conosciuto, di "secondo messaggero", svolto dall'acido arachidonico (AA) [Moreno V.J., 1979].

I fabbisogni in AGE differiscono da specie a specie ed in generale, si osserva che i pesci d'acqua dolce richiedono l'acido linoleico e l'acido linolenico, mentre quelli marini, stenoalini, l'acido eicosapentaenoico (EPA) e/o l'acido docosaesaenoico (DHA).

Non esiste un fabbisogno assoluto per la categoria generale dei lipidi. Tuttavia i livelli lipidici nelle diete non possono prescindere dalla specie, dallo stadio di sviluppo (avannotto, pesce in accrescimento, riproduttore), dal rapporto ottimale energia/proteina.

Con l'introduzione dei mangimi estrusi, si è verificato un progressivo innalzamento dei tenori in grasso delle diete, per tutte le specie. Queste diete, se ben gestite, consentono di minimizzare l'impatto ambientale e di ottenere accrescimenti molto elevati. L'impiego dei mangimi estrusi richiede un maggior controllo del razionamento e dello stato di conservazione dei grassi, che possono essere soggetti ad ossidazione [Pettersen A., 2008] [Messina C., 2013].

Antonio Costa

Tab. 3 | Fabbisogno in acidi grassi essenziali delle principali specie ittiche allevate.

Specie	Nome scientifico	Acido grasso essenziale	Fabbisogno (% razione)
Trota iridea	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	18:3 (n-3)	0,8 – 1,7
Salmone atlantico	<i>Salmo salar</i>	18:3 (n-3)	1,0 – 2,5
Carpa comune	<i>Cyprinus carpio</i>	18:2 (n-6)	1,0
		18:3 (n-3)	1,0
Anguilla europea	<i>Anguilla anguilla</i>	18:2 (n-6)	0,5
		18:3 (n-3)	0,5
Tilapia nilotica	<i>Oreochromis niloticus</i>	18:2 (n-6)	0,5
Pesce gatto	<i>Ameiurus melas</i>	18:3 (n-3)	1,0 – 2,0
Persico spigola	<i>Morone saxatilis</i>	18:3 (n-3)	1,7

1.7.3 Vitamine ed elementi minerali

Le vitamine sono in genere classificate in liposolubili (A, D, E, K) ed idrosolubili (B, C). Le prime sono assorbite a livello intestinale in presenza di lipidi e possono essere accumulate nelle riserve adipose (tabella 5). Le seconde vengono assorbite mediante trasporto attivo, sono solubili in acqua e non possono essere accumulate dai pesci [Cataudella S., 2001].

Diversi studi hanno evidenziato che i micronutrienti rivestono un ruolo importante in fase riproduttiva; in particolare risultano evidenti gli effetti del contenuto vitaminico della dieta sul successo dei riproduttori. Sono state individuate diverse forme di vitamina C, con la capacità di migliorare la qualità delle uova, in relazione alla loro attività sinergica con la vitamina E nel mantenere i livelli intracellulari di antiossidanti e la vitamina B4 (colina) quale donatore di gruppi metilici [Dabrowsi K., 1991].

I minerali essenziali per i pesci sono circa venti e sono classificati in macro elementi (Ca, P, K, Mg) e micro elementi (Fe, Zn, Mn, Co, I, Se) (tabella 4).

Tra i macronutrienti il P assume importanza poiché scarsamente assunto dall'acqua, e deve essere fornito con la dieta. Un contenuto eccessivo di fosforo (P) nella dieta aumenta la concentrazione dei fosfati nei reflui, rappresenta la causa del fenomeno di eutrofizzazione delle acque.

Antonio Costa

Tra i micro elementi molto importante è il ferro (Fe) che è essenziale per la formazione dell'emoglobina ed interviene in diverse reazioni enzimatiche; lo zinco (Zn), il manganese (Mn) e il rame (Cu) che agiscono come cofattori e attivatori di importanti reazioni enzimatiche.

Nella determinazione dei fabbisogni minerali, a differenza degli animali terrestri nei pesci bisogna considerare che alcuni elementi minerali (Ca, Mg, Na, K, Zn, Cu) possano essere assunti direttamente dall'acqua mediante le branchie, la pelle e l'apparato digerente [Cataudella S., 2001].

Tab. 4 | Sintomi da carenze alimentari legate ai microelementi.

Elemento	Sintomi
Calcio	Anoressia, ridotta efficienza alimentare e limitata crescita
Fosforo	Deminerizzazione ossea, ridotta efficienza alimentare e limitata crescita
Potassio	Ridotta efficienza alimentare e limitata crescita, convulsioni, morte
Magnesio	Anoressia, cataratta, mancata crescita, morte
Ferro	Anemia
Manganese	Cataratta, mancata crescita, deformazioni scheletriche
Rame	Ridotta crescita, cataratta
Selenio	Ridotta crescita, anemia, distrofia muscolare

Tesi di dottorato in Scienze dell'alimentazione e della nutrizione umana, di Antonio Costa, discussa presso l'Università Campus Bio-Medico di Roma in data 11/03/2016. La disseminazione e la riproduzione di questo documento sono consentite per scopi di didattica e ricerca, a condizione che ne venga citata la fonte.

Tab. 5 | Fabbisogni vitaminici per la trota e principali sintomi da carenza.

Vitamina	Fabbisogno trota (mg/Kg alimento)	Principali sintomi da carenza	Note
Idrosolubili			
Vitamina B1	10	Anemia, nuoto erratico, lesioni oculari, emorragie cutanee.	Perdita durante la conservazione dei mangimi
Vitamina B2	5 – 15	Anemia, crescita lenta, cataratta.	Perdita durante la conservazione dei mangimi
Vitamina B6	5 – 15	Nuoto erratico e spirale.	
Vitamina B12	0,02	Anemia.	
Vitamina PP	150	Esoftalmo, emorragie cutanee e pinne.	Perdita durante la conservazione dei mangimi
Vitamina C	100	Deformazioni: scoliosi, lordosi, erosione ed emorragie cutanee.	Perdita durante il processo di produzione, la conservazione del mangime, perdite per dilavamento
Biotina	1	Alta mortalità.	Rare carenze
Acido folico	5	Anemia.	
Acido pantotenico	40	Anoressia, crescita ridotta, infiammazioni branchie, esoftalmo.	
Liposolubili			
Vitamina A	2500 – 5000	Anemia, cataratta, esoftalmia.	Eccessi possono causare erosione delle pinne, scoliosi, lordosi
Vitamina D	1600-2400	Crescita limitata, steatosi epatica.	
Vitamina E	30 UI/kg con adeguato supplemento di Selenio	Distrofia muscolare, anemia, asciti, mortalità, esoftalmia, steatosi.	
Vitamina K	5 – 10	Anemia, emorragie cutanee e viscerali.	

Antonio Costa

1.8 Persico spigola



Fig. 3 | Esempio di persico spigola

Tab. 6 | Classificazione scientifica *Morone saxatilis*

Classificazione Scientifica	
Regno	Animalia
Phylum	Chordata
Classe	Actinopterygii
Ordine	Perciformes
Famiglia	Moronidae
Genere	Morone
Specie	<i>Morone saxatilis</i>

Gli ibridi di persico spigola grazie all'ottima qualità delle carni ed alle buone doti di allevabilità, (figura 3; tabella 6) stanno conquistando un posto di primo piano nell'acquacultura statunitense, dove nel 1999 la produzione ha raggiunto 6500 t destinate nella totalità al mercato alimentare [Melotti P., 1993].

Per le pratiche di acquacultura in USA, in Israele ed in altri Paesi in cui è stato introdotto, quali la Francia e l'Italia, viene utilizzata la forma ibrida, ottenuta da incroci tra le varie specie di Moronidi.

In particolar modo, l'ibrido è derivato dalla femmina di *Morone saxatilis* e dal maschio di *Morone chrysops*.

Quando la femmina parentale è *Morone saxatilis* l'ibrido è chiamato palmetto, mentre quando la femmina è *Morone chrysops* l'ibrido è detto sunshine.

La gonadotropina corionica (hCG)

Antonio Costa

è l'ormone usato per indurre la

maturazione finale e l'ovulazione delle uova di *Morone chrysops* ed aumentare la produzione di spermatozoi di *Morone saxatilis*. L'ormone è iniettato per via intramuscolare al di sotto della pinna dorsale e sopra la linea laterale [McGinty A.S., 2008]. La condizione di eterozigosi esalta alcuni caratteri propri delle specie parentali, quali il vigore, l'accrescimento, la conversione alimentare, l'ottima qualità delle carni e la resistenza nei confronti degli agenti patogeni più comuni [Ludwig G.L., 2004].

Nel dettaglio presenta un range di temperatura piuttosto ampio (0-30 °C) ma predilige la temperatura (23 °C – 27 °C). I livelli di ossigeno devono essere mantenuti a 5mg/L o al di sopra sino a 12 mg/L.

Il range di pH ottimale è tra 7 e 8,5. Si tratta di un pesce anadromo che vive per molto tempo nelle acque salate, ma si riproduce nelle acque dolci.

Come tutti i pesci predatori, le larve di persico spigola richiedono animali vivi, usualmente si usa lo zooplancton, come primo alimento [Ludwig G.L., 2004].

Nel nostro Paese la fornitura di materiale da semina dipende totalmente dall'importazione di larve e avannotti dagli USA (figura 4) ed Israele, in quanto non sono disponibili i riproduttori delle due specie parentali [Melotti P., 1993].

Il persico spigola è adatto per diversi sistemi di acquacultura ed in particolar modo per gli impianti RAS.

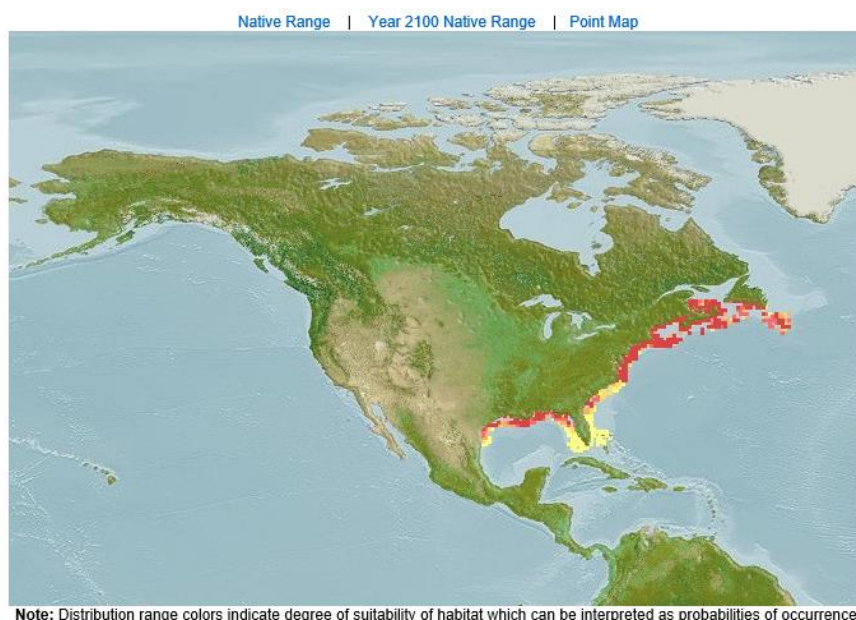


Fig. 4 | Distribuzione di *Morone Saxatilis* in USA (FISH BASE AquaMaps 2010).

Antonio Costa

2. Obiettivo della ricerca

Il pesce è un alimento di alta qualità, molto digeribile, fonte di lipidi essenziali per la dieta dell'uomo.

Questi lipidi sono ricchi in acidi grassi polinsaturi, la maggior parte a lunga catena (20, 22 atomi di C) tra i quali l'EPA ed il DHA appartengono alla serie ω -3.

L'importante ruolo nutritivo del pesce nella prevenzione di molteplici malattie cardiovascolari, immunologiche, neurologiche, sembra essere correlato alla presenza di acidi grassi ω -3.

In base a tali evidenze sarebbe interessante approfondire il metabolismo lipidico nei pesci allevati, focalizzando l'attenzione su un adeguato rapporto tra acidi grassi saturi/insaturi.

Alcuni derivati degli acidi grassi costituiscono un gruppo di lipidi bioattivi tra cui gli eicosanoidi, con importanti ruoli fisiologici. Questi lipidi, infatti, sono modulatori con un'azione locale simile a quella degli ormoni, coinvolti in varie funzioni, quali l'aggregazione piastrinica, la motilità vascolare, la contrazione muscolare, il metabolismo lipidico, ed anche nei processi infiammatori e nella morte cellulare [Taccone-Gallucci M., 2006].

I pesci costituendo un modello biologico semplificato sono di ausilio ad una migliore comprensione di interazioni complesse, quali quelle neuro-immunologiche, negli organismi maggiormente evoluti [Maccarrone M., 2005].

Lo studio ha l'obiettivo di caratterizzare in *Morone saxatilis* proveniente da un impianto di acquacultura, alcuni derivati dell'acido arachidonico, noti come endocannabinoidi, e valutare il loro coinvolgimento nei meccanismi che modulano l'appetito.

Il monitoraggio di queste attività enzimatiche ci permetterà di controllare lo stato fisiologico nel pesce allevato seguendo diversi regimi alimentari.

Tali molecole potranno costituire dei biomarker per valutare lo stato di salute del pesce.

Saranno valutati i principali segnali riguardanti l'appetito (CB_1 , LPT) il metabolismo lipidico ($PPAR_\gamma$) tramite q-RT-PCR. Inoltre verranno caratterizzati i livelli della proteina CB_1 , CB_2 , degli enzimi di sintesi (NAPE-PLD, DAGL) degradazione (FAAH, MAGL) mediante Western blot al fine di determinare indirettamente la concentrazione degli endocannabinoidi (eCBs).

Antonio Costa

3 Materiali e metodi

3.1 Modello animale

Lo studio è stato condotto su esemplari di *Morone saxatilis* proveniente da un impianto di acquacultura rappresentativo della realtà produttiva della Regione Sicilia (Porrazzino S.r.l., Acate, Sicilia, Italia).



Fig. 5 | Porrazzino S.r.l.

Il protocollo sperimentale è iniziato in Maggio 2015 e tuttora in corso d'opera.

I pesci sono allevati in vasche circolari in vetroresina (figura 5) di diametro di 8 m, per un volume operativo di 60mc, Ciascuna vasca è equipaggiata con mangiatoie elettriche, con un ossigenatore ed un sistema di areazione e movimentazione costituito da turbo-soffiante.

I pesci sono soggetti a normale fotoperiodo, e sono alimentati due volte il giorno (9:00; 16.00) con pellet contenente diverso rapporto ω -3/ ω -6 specifico per questa specie.

Due differenti diete sperimentali sono state utilizzate lungo tutto l'intero ciclo vitale, con cambiamenti nel contenuto in lipidi e dimensioni del pellet in accordo alla dimensione del pesce.

Le diete iniziali (1,5; 1,9 mm) contenevano il 52% proteine e il 17% lipidi e le diete successive (3; 4,5 mm) 44% proteine 18% lipidi.

Nel corso della prova sperimentale sono stati rilevati i principali parametri chimici dell'acqua di allevamento. La temperatura è stata misurata tramite termometro digitale (Temp7 PT100), la concentrazione di ossigeno tramite ossimetro (HI98186 Hanna Instrument) il pH (pH7 XS) la salinità, la conducibilità (HI 9828 Hanna Instrument). Le analisi chimiche (NH_4 , NO_2 , NO_3 , PO_4) utilizzando un fotometro (YSI 9500 ed anche C200 Hanna Instrument).

Per eseguire controlli sulla presenza di eventuali parassitosi e di patologie batteriche sono stati eseguiti dei campionamenti e valutati in preparati a fresco con microscopio ottico (B-500 OPTIKA).

Antonio Costa

3.2 Parametri biometrici

Nella tabella 7 sono riportati i dati con il peso medio del pesce (n=200) e la densità in vasca raggiunta durante il protocollo sperimentale. La tabella 8 mostra i parametri dell'acqua mensilmente registrati durante il protocollo sperimentale.

I dati ottenuti, in merito la correlazione tra crescita e fotoperiodo, confermano un precedente studio in cui si dimostra che un incremento della temperatura aumenta l'attività degli enzimi digestivi, accelerando la digestione dei nutrienti, con il risultato di una migliore crescita [Buentello A.J., 2000].

I pesci sono stati al momento della semina casualmente distribuiti in due gruppi (n= 2500) in base alla dieta seguita.

Per ogni campionamento il pesce è stato pesato (g) e sono stati rilevati i parametri biometrici, a seguire riportati, i relativi indici corporei e della resa (figura 6; 7; 8). Ogni tre settimane, i pesci di ogni gruppo sono stati pesati per seguire la curva di crescita e l'assimilazione del cibo.

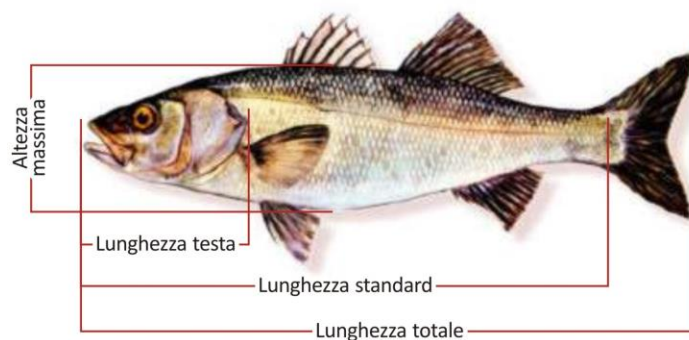


Fig. 6 | Riferimenti topografici per rilevamento biometrico.



Fig. 7 | Misura lunghezza totale.

Antonio Costa

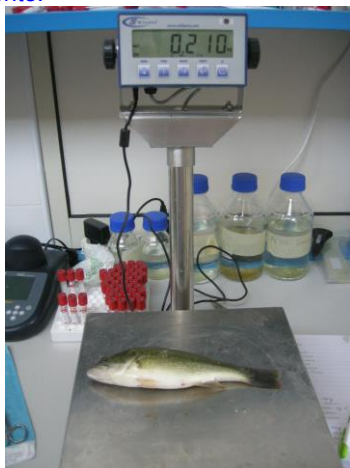


Fig. 8 | Peso.

- Lunghezza totale, pari alla distanza tra l'estremità anteriore del capo (labbro superiore) e la parte distale della pinna caudale;
- Lunghezza standard, pari alla distanza tra la punta del capo (labbro superiore) ed l'estremità caudale delle fibre dei muscoli (attacco della pinna caudale);
- Altezza massima, rilevata tra la prima e la seconda pinna dorsale e la corrispondente area ventrale utilizzando un calibro millimetrato;
- Lunghezza della testa, distanza tra la punta del capo (labbro superiore) e il margine caudale dell'opercolo.

Da tali rilevazioni lineari sono stati calcolati i seguenti indici biometrici

$$\text{Fattore di condizione (K)} = [\text{Peso corporeo totale (g)}/\text{lunghezza totale (cm)}]^3 \times 100$$

Questi dati forniscono le prime indicazioni sullo sviluppo morfologico degli animali.

In seguito i pesci sono stati eviscerati e si è proceduto alla valutazione del pacchetto viscerale (g), del fegato (g) del grasso mesenterico (g), del cervello (g) e dei filetti (figura 9; 10; 11).



Fig. 9 | Pratica di eviscerazione.

Antonio Costa

Tesi di dottorato in Scienze dell'alimentazione e della nutrizione umana, di Antonio Costa, discussa presso l'Università Campus Bio-Medico di Roma in data 11/03/2016. La disseminazione e la riproduzione di questo documento sono consentite per scopi di didattica e ricerca, a condizione che ne venga citata la fonte.



Fig. 10 | Encefalo.

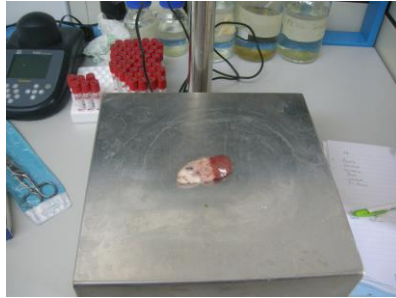


Fig. 11 | Fegato e grasso mesenterico.

Tali rilevazioni ponderali sono state usate per calcolare gli indici corporei riportati di seguito:

-IVS → Indice viscerosomatico = $[\text{peso pacchetto viscerale (g)}/\text{peso totale (g)}] \times 100$;

-IES → Indice epatosomatico = $[\text{peso fegato (g)}/\text{peso totale (g)}] \times 100$;

-IM → Indice grasso mesenterico = $[\text{peso grasso mesenterico (g)}/\text{peso totale (g)}] \times 100$;

-IG → Indice gonadico = $[\text{peso gonadi (g)}/\text{peso totale (g)}] \times 100$;

-Resa eviscerato = $[\text{peso carcassa eviscerato (g)}/\text{peso totale (g)}] \times 100$.

Antonio Costa

Tesi di dottorato in Scienze dell'alimentazione e della nutrizione umana, di Antonio Costa, discussa presso l'Università Campus Bio-Medico di Roma in data 11/03/2016. La disseminazione e la riproduzione di questo documento sono consentite per scopi di didattica e ricerca, a condizione che ne venga citata la fonte.

Tab. 7 | Peso medio di *M. saxatilis* (n=200 ogni mese) e densità in vasca registrata in impianto durante il protocollo sperimentale.

Mese	Peso medio (g)	Densità (Kg/m ³)
Maggio 2015	20,54 ± 4,05	2,4
Giugno 2015	36,12 ± 9,21	3,9
Luglio 2015	75,36 ± 10,01	4,2
Agosto 2015	102,46 ± 14,10	4,85
Settembre 2015	149,76 ± 16,21	7,57
Ottobre 2015	203,11 ± 18,10	11,5
Novembre 2015	246,22 ± 19,24	5
Dicembre 2015	264,31 ± 21,41	5,45
Gennaio 2016	271,12 ± 19,41	5,45

Tab. 8 | Parametri ambientali registrati nell'impianto di acquacultura durante il periodo sperimentale.

Mese	Fotoperiodo (L/D)	Temperatura (°C)	Ossigeno disciolto (mg/l)
Maggio 2015	14/10	21,42	7,96
Giugno 2015	15/9	24,16	7,23
Luglio 2015	15/9	27,10	8,11
Agosto 2015	14/10	27,69	7,34
Settembre 2015	13/11	25,09	7,51
Ottobre 2015	12/12	22,12	7,01
Novembre 2015	11/13	17,93	7,83
Dicembre 2015	10/14	13,81	9,21
Gennaio 2016	10/14	12,30	9,11

Antonio Costa

3.3 Parametri biochimici

Estrazione di RNA e sintesi di cDNA

Il RNA totale è stato estratto con RNeasy Mini Kit (Qiagen) dai campioni di cervello e di fegato.

La concentrazione finale di RNA è stata determinata tramite lettura spettrofotometrica a 260nm, NanoDrop (Thermo Scientific). Le verifiche qualitative sul RNA è stata verificata con elettroforesi in gel di agarosio (1%) in presenza di bromuro di etidio, osservando le due bande predominanti di rRNA 18S e 28S.

Real time PCR

Una quantificazione relativa dell'espressione del gene di CB₁ è stata condotta usando la β -actina quale gene housekeeping, standard interno (tabella 9).

La PCR è stata eseguita con il metodo SYBR green in un iQ5 (BioRad). Per ogni campione analizzato le reazioni di PCR sono state condotte in triplicato. Le reazioni sono state eseguite in piastre da 48 pozzetti miscelando per ogni campione, 1 μ l di cDNA diluito (1/10), 5 μ l di SYBR green PCR Master Mix, 0,3 μ M di forward Primer e 0,3 μ M di reverse Primer. Il ciclo per tutte le reazioni è stato il seguente: 3 min. 95 °C, quindi 45 cicli di 10s a 95 °C, 20s a 60°C e 20s a 72 °C.

Tab. 9 | Sequenza nucleotidica dei Primer usati per valutare l'espressione genica tramite q-RT-PCR.

	forward Primer	reverse Primer	Annealing temperature (°C)
CB ₁	GCTGGGCTGGAAGTGTAAAC	TTCCACAGGATGTATATGTAGGC	60
β -actina	GGTACCCATCTCCTGCTCAA	GAGCGTGGCTACTCCTCACC	60

Western blot

Le proteine estratte da campioni di fegato e cervello sono state dosate e separate usando un gel di elettroforesi al 10% di SDS-PAGE. Le proteine sono poi state trasferite su filtro di nitrocellulosa al fine di valutare l'espressione di CB₁.

I filtri sono stati trattati con soluzione di blocco (2% BSA, 0,25% Tween-20 in TBS, pH 7,6) per una notte a 4 °C per prevenire legame non specifico ed incubati con l'anticorpo. L'anticorpo usato è stato anti CB₁ di ratto (Calbiochem) diluito 1:1000 in 2% soluzione di blocco. Come proteina di controllo è stata usata la β -tubulina.

Antonio Costa

Tesi di dottorato in Scienze dell'alimentazione e della nutrizione umana, di Antonio Costa,
discussa presso l'Università Campus Bio-Medico di Roma in data 11/03/2016.
La disseminazione e la riproduzione di questo documento sono consentite per scopi di didattica e ricerca,
a condizione che ne venga citata la fonte.

Antonio Costa

4 Conclusioni preliminari

I meccanismi che regolano l'appetito nel pesce sono ancora poco conosciuti pertanto i nostri studi potrebbero rappresentare uno strumento per comprendere meglio l'influenza dei fattori esogeni sull'alimentazione e la crescita del pesce.

Lo studio dell'espressione genica e proteica del recettore CB₁ in *M. saxatilis* è tuttora in corso, in quanto è necessario verificare le procedure standardizzate su altri modelli animali.

Antonio Costa

5. Bibliografia

Adamidou S, Nengas I, Nikolopoulou D, Kotzamanis Y, (2008) Growth performance of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) fed extruded diets including low and high levels of three different legumes; filed peas, chickpeas and faba beans. Resource management EAS n.37 pp. 31.

Bayir A, (2005) The investigation of seasonal changes in antioxidant enzyme activities, serum lipid, lipoproteins and hematological parameters of Siraz fish (*Capoeta capoeta umbla*) living in Hinis stream (Murat Basin) Degree diss. Ataturk University, Turkey.

Buentello A.J, Gatlin D.M, Neill W.H, (2000) Effects of water temperature and dissolved oxygen on daily feed consumption, feed utilization and growth of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) Aquaculture, vol.182: 339-352.

Cataudella S, Bronzi P, (2001) Acquacultura responsabile UNIMAR-UNIPROM.

Cottone E, Guastalla A, Pomatto V, Campantico E, Di Marzo V, Franzoni M, (2009) Goldfish CB₁ mRNA expression is affected by fasting and anandamide administration. Neuroreport 20, 595-599.

Dabrowsi K, (1991) Ascorbic acid status in high mountain charr (*Salvelinus alpinus*) in relation to the reproductive cycle Fishes 31:213-217.

D'Addario C, Micioni Di Bonaventura MV, Pucci M, Romano A, Gaetani S, Ciccocioppo R, Cifani C, Maccarrone M, (2014) Endocannabinoid signaling and food addiction. Neurosci Biobehav Rev. Nov; 47: 203-24.

Di Marzo V, Matias I, (2005) Endocannabinoid control of food intake and energy balance. Nat Neurosci, 8, 585-589.

Fried M, Wileox H.G; Faloona G.R, Eoff S.P, Hoffman M.S, Simmerman D, (1968) The biosynthesis of plasma lipoproteins in higher animals. Comparative Biochemistry and physiology 25A: 651-661.

Fukusho K, (1989) Biology and mass production of the rotifer *Brachionus plicatilis*; Int. J. Aq. Fish. Technol.

Larsen J, Roney JM, (2013) Farmed fish production overtakes beef, E.P.I. Plan B Updates - 114 Earth Policy Institute pp. 1-2.

Ludwig G.M, (2004) Hybrid Stripped Bass: fingerling production in ponds; SRAC Publication N° 302.



Tesi di dottorato in Scienze dell'alimentazione e della nutrizione umana, di Antonio Costa, discussa presso l'Università Campus Bio-Medico di Roma in data 11/03/2016.
La disseminazione e la riproduzione di questo documento sono consentite per scopi di didattica e ricerca, a condizione che ne venga citata la fonte.

ISMEA (2013) Checkup 2013. Il settore ittico in Italia, Roma pp. 129.

Jamu D.M, Piedrahita R.H, (2002) An organic and nitrogen dynamics model for the ecological analysis of integrated aquaculture/agriculture system I. Model development and calibration. Environmental modelling software 17; 571-582.

Kavadias S, Castritsi-Catharios J, Dessypris A Miliou H, (2004) Seasonal variation in steroid hormones and blood parameters in cage-farmed European sea bass (*Dicentrarchus labrax L.*) Journal of Applied Ichthyology, 20: 58-63.

Maccarrone M, Bab I, Bíró T, Cabral GA, Dey SK, Di Marzo V, Konje JC, Kunos G, Mechoulam R, Pacher P, Sharkey KA, Zimmer A, (2015) Endocannabinoid signaling at the periphery: 50 years after THC. Trends Pharmacol Sci. 36 (5): 277-96.

Maccarrone M, Barboni B, Paradisi A, Bernabò N, Gasperi V, Pistilli M.G, Fezza F, Lucidi P, Mattioli M, (2005) Characterization of the endocannabinoid system in boar spermatozoa and implications for sperm capacitation and acrosome reaction. Journal of Cell Science, 118; 4393-4404.

Maccarrone M, Bari M, Corasaniti MT, Nisticó R, Bagetta G, Finazzi-Agrò A, (2000) HIV-1 coat glycoprotein gp120 induces apoptosis in rat brain neocortex by deranging the arachidonate cascade in favor of prostanoids. J Neurochem; 75 (1):196-203.

McGinty A.S, Hodson R.G, (2008) Hybrid striped bass: Hatchery phase; SRAC Publication N° 301.

Menoyo D, Izquierdo M.S, Robaina L, Gines R, Lopez-Bote C.J, Bautista J.M, (2004) Adaptation of lipid metabolism, tissue composition and flesh quality in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) to the replacement of dietary fish oil by linseed and soybean oils, British Journal of Nutrition 94, 41-52.

Messina C, Renda G, La Barbera L, and Santulli A, (2013) By-products of farmed European sea bass (*Dicentrarchus labrax L.*) as a potential source of n-3 PUFA; Biologia 68/2: 288-293.

Messina M, Piccolo G, Tulli F, Messina C, Cardinaletti C, Tibaldi E, (2013) Lipid composition and metabolism of European sea bass (*Dicentrarchus labrax L.*) fed diets containing wheat gluten and legumes meals as substitutes for fish meal. Aquaculture 376-379.

Messina M, Tulli F, Messina C, Tibaldi E, (2007) Varying plant protein sources in the diet of sea bass *Dicentrarchus labrax* differently affects lipid metabolism and deposition. It. J. Anim. Sci, 6, p. 806 -808.

Messina M, Tulli F, Messina C, Franchin C, Tibaldi E, (2005) Partial substitution of fish meal with vegetable protein sources in a diet for seabass: effects on lipogenesis. Veter. Res. Comm., 29; p. 371-374.

Migliarini B. Carnevali O, (2009) A novel role for the endocannabinoid system during zebrafish development Mol. Cell Endocrinol. 299; 172-177.

Antonio Costa

Migliarini B, Marucci G, Ghelfi F, Carnevali O, (2006) Endocannabinoid system in *Xenopus laevis* development: CB₁ receptor dynamics. FEBS Letters 580 1941-1945.

Moreno VJ; De Moreno JEA, Brenner RR, (1979) Fatty acid metabolism of the Calanoid Copepod *Paracalanus parvus* 2: Lipids: 14: 318-22.

Munday B, Eleftheriou A, Kentouri M, Divanach P, (1992) The interaction of aquaculture and the environment - A bibliographical review. Commission of the European Communities – Directorate – General for Fisheries, 184.

Palermo F.A, Mosconi G, Avella A, Carnevali O, Verdenelli M.C, Cecchini C, Polzonetti-Magni A, (2011) Modulation of cortisol level, endocannabinoid receptor 1A, proopiomelanocortin and thyroid hormone receptor alpha mRNA expressions by probiotics during sole (*Solea solea*) larval development. General Comp. Endocrinol 10.1016/02.009.

Petterson A, Brannas E, Pickova J, (2008) Effects of crude rapeseed oil on lipid composition in Arctic charr *Salvelinus alpinus*. EAS n.37 pp. 324.

Piccinetti C.C, Migliarini B, Olivotto I, Coletti G, Amici A, Carnevali O, (2010) Appetite regulation: the central role of melatonin in *Danio rerio*: Hormones and behavior 58; 780-785.

Piccinetti C.C, Migliarini B, Petrosino S, Di Marzo V, Carnevali O, (2010) Anandamide and AM251, via water, modulate food intake at central and peripheral level in fish; General and comparative endocrinology 166; 259-267.

Piedrahita R.H, (2003) Reducing the potential environmental impact of tank aquaculture effluents through intensification and recirculation. Aquaculture 226; 35-44.

Richard N, Kaushik S, Larroquet L, Panserat S, Corraze G, (2006) Replacing dietary fish oil by vegetable oils has little effect on lipogenesis, lipid transport and tissue lipid uptake in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) British Journal of Nutrition, 96, 299-309.

Santulli A, (2013) Lo stato dell'acquacultura siciliana-2013 verso il superamento della crisi; Osservatorio della pesca del Mediterraneo.

Saroglia M, Ingle I, (1992) Tecniche di acquacultura. Edagricole.

Taccone-Gallucci M, Manca-di-Villahermosa S, Battistini L, Stuffer RG, Tedesco M, Maccarrone M, (2006) N-3 PUFAs reduce oxidative stress in ESRD patients on maintenance

Antonio Costa

Tesi di dottorato in Scienze dell'alimentazione e della nutrizione umana, di Antonio Costa, discussa presso l'Università Campus Bio-Medico di Roma in data 11/03/2016.
La disseminazione e la riproduzione di questo documento sono consentite per scopi di didattica e ricerca, a condizione che ne venga citata la fonte.

HD by inhibiting 5-lipoxygenase activity. *Kidney Int.* 69 (8): 1450-4.

Tacon, A.G.J., Hasan, M.R. e Metian, M, (2011) Demand and supply of feed ingredients for farmed fish and crustaceans: trends and prospects. *FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper No. 564.* FAO., 87 pp. <http://www.fao.org/docrep/015/ba0002e/ba0002e.pdf>

Tancioni L, Scardi M, (2001) Ecologia in acquacoltura In: *Acquacultura responsabile.*

Tibaldi E, Hakim Y, Uni Z, Tulli F, Luzzana U, Harpaz S, (2006) Effects of the partial substitution of dietary fish meal by differently processed soybean meals on growth performance, nutrient digestibility and activity of intestinal brush border enzymes in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*); *Aquaculture* Vol. 261: 182-193.

Tiscar P.G, Narcisi V, Mosca F, Marozzi S, Calzetta A, Paradisi A, De Sanctis F, Finoia M.G, Maccarrone M, (2006) Functional characterization and biological actions of the endocannabinoid system in *Mytilus galloprovincialis*; *Biol. Mar. Medit* 13 (2): 38-39.

Tufarelli V, Laudadio V, (2006) Il consumo di alimento nei pesci d'acquacoltura. *Il pesce* n. 3.

Valenti M, Cottone E, Martinez R, De Pedro N, Rubio M, Viveros M.P, Franzoni F, Delgado M.J, Di Marzo V, (2005) The endocannabinoid system in the brain of *Carassius auratus* and its possible role in the control of food intake. *Journal of Neurochemistry* 95: 662-672.

Antonio Costa

6. Ringraziamenti

A conclusione del mio lavoro di studio, mi sembra doveroso ringraziare tutti quelli che mi hanno permesso di terminare con successo il Dottorato di Ricerca.

Innanzitutto il mio docente guida Prof. Mauro Maccarrone (Università Campus Bio Medico di Roma), la Dott.ssa Monica Bari (Università degli Studi di Roma TorVergata) che ringrazio per aver creduto nelle mie capacità e per avermi trasmesso la passione per la ricerca.

Un ulteriore ringraziamento va rivolto al Prof. Andrea Santulli (Università degli Studi di Palermo), alla Prof.ssa Venera Ferrito (Università degli Studi di Catania) e alla Dott.ssa Annamaria Pappalardo (Università degli Studi di Catania).

Un ringraziamento speciale va al Sig. Giovanni Giudice (Porrazzito S.r.l.), al Dott. Gianluca Fortino (AcquaAzzurra SpA), al Dott. Andrea Fabris (Associazione Piscicoltori Italiani), al Dott. Mario Giovannetti (Biomar SAS) ed alla mia famiglia (mio padre, mia madre, mia sorella).

Antonio Costa

7. Prospettive future



Progetto Ager

PROGETTO Ager - seconda edizione

Modulistica bando

PROGETTO SINTETICO

1. Titolo del progetto:

Mangimi a basso impatto ambientale per l'acquacoltura in acque interne: effetto sulla qualità delle carni e sull'ambiente.

2. Responsabile scientifico del progetto

TITOLO	NOME	COGNOME	CARICA
Dr	Andrea	Santulli	Ricercatore
TELEFONO	CELLULARE	E-MAIL	
0923 560162	3296909847	andrea.santulli@unipa.it	
INDIRIZZO - CAP - LOCALITÀ - PROVINCIA c/o ente d'afferenza			
Lungomare Dante Alighieri 4 - 91010 Erice, Consorzio Universitario Trapani			

3. Partenariato di progetto

DENOMINAZIONE ENTE	REFERENTE SCIENTIFICO
Consorzio Universitario della Provincia di Trapani	Andrea Santulli
Università Campus Biomedico, Roma	Mauro Maccarrone
Università degli Studi di Catania	Venera Ferrito
n. (partner)	

4. Descrivere brevemente il progetto (max 1000 caratteri)*

Antonio Costa

Tesi di dottorato in Scienze dell'alimentazione e della nutrizione umana, di Antonio Costa, discussa presso l'Università Campus Bio-Medico di Roma in data 11/03/2016.

La disseminazione e la riproduzione di questo documento sono consentite per scopi di didattica e ricerca, a condizione che ne venga citata la fonte.

Il progetto, che vede la collaborazione come sub contractor di tre aziende di acquacoltura in acque interne, ha lo scopo di contribuire alla riduzione dell'impatto ambientale locale dell'acquacoltura, attraverso la definizione di diete a basso impatto, e globale attraverso la definizione di fonti alternative e di farina e olio di pesce prodotte da scarti di lavorazione.

Il progetto prevede un WP per lo studio del metabolismo dei lipidi e dello stress ossidativo dei pesci, allo scopo di contribuire alla definizione di diete formulate capaci di modulare la composizione nutrizionale delle carni. È prevista, inoltre, la caratterizzazione genetica della trota autoctona e di specie alloctone per isolare e selezionare ceppi più performanti.

(a) Obiettivi che intendete perseguire (max 1000 caratteri)*

Il progetto si propone di contribuire a mitigare l'impatto ambientale dell'acquacoltura aumentando la sua sostenibilità, per mezzo di:

1 - una riduzione delle immissioni di materia organica che raggiungono l'ambiente circostante attraverso l'acqua;

2 - una riduzione dell'impatto sulle risorse naturali esercitate dall'utilizzo di farina di pesce e olio di pesce prodotte utilizzando pesci selvatici.

3 - attraverso la manipolazione del profilo amminoacidico e lipidico utilizzando diete formulate, vuole contribuire a modificare il profilo nutrizionale di pesci, sulla base delle esigenze nutrizionali e sensoriali dei consumatori.

Questi obiettivi incontrano gli obiettivi di AGER, vale a dire la riduzione dell'impatto ambientale e dei costi di produzione, il miglioramento delle caratteristiche nutrizionali e sensoriali, l'incremento della sostenibilità generale dell'acquacoltura con la riduzione dell'utilizzo di pesce selvatico per la produzione di farina di pesce e olio di pesce.

(b) Strategia di intervento, strutture e strumenti impiegati (max 1000 caratteri)*

L'intervento si basa sulla collaborazione di tre sub contractor, e vede il coinvolgimento di tre enti di ricerca che svolgeranno parte dell'attività sperimentale direttamente nell'azienda. Questo faciliterà il processo di trasferimento tecnologico, che sarà accompagnato da un adeguato intervento di comunicazione e disseminazione dei risultati.

I tre istituti di ricerca coinvolti garantiscono la strumentazione e le competenze necessarie a raggiungere gli obiettivi prefissati, anche in conformità a solide esperienze precedenti.

(c) Risultati attesi (max 1000 caratteri)*

I risultati attesi riguardano essenzialmente un aumento della sostenibilità dell'acquacoltura, sia a livello locale, con una riduzione dell'impatto locale, che a livello globale con una diminuzione del prelievo di risorse della pesca.

Questo porterà a un miglioramento della percezione del consumatore verso il settore e i suoi prodotti, con un conseguente aumento dei consumi di prodotti allevati.

Antonio Costa

Tesi di dottorato in Scienze dell'alimentazione e della nutrizione umana, di Antonio Costa,
discussa presso l'Università Campus Bio-Medico di Roma in data 11/03/2016.
La disseminazione e la riproduzione di questo documento sono consentite per scopi di didattica e ricerca,
a condizione che ne venga citata la fonte.

Antonio Costa