

VEGETALI E LATTE SONO RICCHI DI **microRNA**, IMPORTANTI REGOLATORI GENETICI

Massimo Pizzichini: consulente scientifico Genelab-srl

1. Introduzione

L'evoluzione degli organismi multicellulari è accompagnata da un progressivo aumento della complessità dei meccanismi di regolazione genica. Questa rapida evoluzione è evidente a livello della regolazione trascrizionale, dove si osserva la veloce espansione delle famiglie dei fattori trascrizionali, mentre a livello post-trascrizionale tra i nuovi meccanismi di regolazione è nota oggi una nuova famiglia di geni regolatori: i microRNA (miRNA). Diversi gruppi di ricerca nel mondo sono impegnati nello studio di queste piccole molecole di RNA che regolano i più importanti meccanismi biologici tra cui proliferazione, differenziamento ed apoptosi. Come è noto l'apoptosi è il fenomeno che conduce alla morte naturale delle cellule sane ma che è inibita completamente nelle cellule tumorali che, infatti continuano a proliferare.

Il silenziamento del gene dell'apoptosi è una delle cause dell'insorgenza del tumore, che ruolo giocano i miRNA in questo processo? E' probabile che le condizioni particolari di vita generino di miRNA che silenziano il gene dell'apoptosi, ma son ancora ipotesi. La scoperta dei miRNA è avvenuta nel 1993 dal gruppo di ricerca di (Ambros e Ruvkun). Successivamente Ambros nel 2013 ha scoperto alcune sue funzioni importanti. La ricerca sui miRNA ha innescato subito un forte interesse a livello mondiale. In questi anni molte scoperte state fatte in merito sia alla loro origine che al loro funzionamento biochimico nel campo della genetica, ma rimangono ancora molti aspetti da chiarire soprattutto sul meccanismo di regolazione genetico che ha risvolti interessanti per la medicina e soprattutto per la nostra salute.

All'inizio si pensava che i miRNA fossero dei residui insignificanti di RNA, ma poi iniziarono le ricerche per approfondire il loro funzionamento che ancora oggi rimane da chiarire in taluni aspetti anche in ragione della complessità dei processi di regolazione genetica.

I miRNA sono molto promettenti in future applicazioni di terapia clinica visto il loro ruolo di regolazione simultanea di più geni/proteine. I miRNA che si trovano sia nel mondo vegetale che animale, e sono modulati sia dalle condizioni di vita delle persone che dalla interazione positiva con sostanze contenute negli alimenti come i polifenoli che si trovano nelle verdure, frutta in particolare nell'uva, nel tè e nelle olive compreso l'olio extravergine.

E' stato dimostrato che questa classe di piccoli filamento di RNA, che non codificano proteine ma sono in grado di modulare importanti processi biologici, come la differenziazione cellulare, l'apoptosi (tumori), la risposta immunitaria e il mantenimento dell'identità cellulare e dei tessuti. Inoltre, un'alterata regolazione dei miRNA è stata associata al cancro e ad altre malattie.

I miRNA influenzano l'espressione di quasi il 60% dei geni dei mammiferi codificanti proteine e, quindi, controllano molti processi biologici, tra cui sviluppo, invecchiamento, risposta allo stress, proliferazione cellulare e apoptosi (tumori). Non tutti i miRNA svolgono le stesse funzioni biochimiche ma comunque anche quelli presenti nei vegetali e nel latte hanno dimostrato di essere attivi anche sull'uomo. La lunghezza del filamento nucleotidico dei miRNA anche la sequenza degli stessi nucleotidi sulla catena determinano le funzioni biochimiche specifiche dei miRNA. La scoperta delle proprietà biomediche dei miRNA ha attivato ricerche sempre più mirate per comprendere il loro meccanismo di azione e allo stesso tempo ha incentivato l'uso di quelle tecniche che consentono di recuperarli dalle matrici naturali, per poi somministrarli ai pazienti in forma di integratori o di alimenti. Per essere attivi infatti i miRNA devono essere dosati ad alte

concentrazioni altrimenti i loro effetti risultano nulli o trascurabili. I miRNA si generano anche in certe condizioni patologiche come nel caso dei tumori e questa proprietà viene studiata per scopi diagnostici in modo da poter intervenire precocemente prima che il male si sia diffuso. Si parla già di kit diagnostici a base di miRNA essi sono molto promettenti in future applicazioni di terapia clinica visto il loro ruolo di regolazione simultanea di più geni/proteine.

2. Meccanismo di generazione dei miRNA

Per comprendere come si formano i micro RNA (miRNA) è necessario ricordare alcuni passaggi fondamentali della sintesi proteica che inizia dal DNA. La trascrizione del DNA inizia dall'apertura della sua doppia elica per formare due filamenti lineari di RNA messaggero che sono speculari tra loro. La figura 1 illustra schematicamente questo processo indicando le basi puriniche e pirimidiniche che si accoppiano con legami idrogeno: adenina-timina con e guanina-citosile, in modo che ogni filamento dell'RNA è speculare con l'altro.

La trascrizione è il processo attraverso il quale l'informazione genetica contenuta nel DNA viene trascritta enzimaticamente in una molecola di RNA messaggero (mRNA). In modo schematico la trascrizione del DNA genera un filamento di mRNA nel nucleo della cellula eucariotica che viene poi inviato nel citoplasma e tradotto in proteina. Soltanto un filamento della doppia elica viene trascritto: il filamento che dirige la sintesi tramite l'accoppiamento complementare delle basi è detto filamento stampo o filamento antisense, mentre l'altro filamento che avrà sequenza identica all'mRNA, con l'ovvia sostituzione delle basi azotate adenina-timina e uracile, -guanina, è detto filamento codificante o filamento senso. Il processo della trascrizione è catalizzato dalla RNA polimerasi.

Questo enzima riconosce e si lega a una sequenza specifica del DNA, il promotore, e inizia a sintetizzare mRNA da una posizione adiacente. In questo processo si formano, nel nucleo della cellula, anche frammenti nucleotidici di miRNA. Sia l'RNA messaggero che i miRNA si trasferiscono nel citoplasma dove avviene la trascrizione, cioè si passa dalla informazione genetica alla sintesi delle proteine di ogni tipo, in particolare di quelle bioattive, cioè gli enzimi. Nel meccanismo che è alla base della sintesi proteica segue tre passaggi, come schematizzato in figura: il primo è di trascrizione (duplicazione del DNA, il secondo di maturazione ed il terzo di traduzione. Quindi l'RNA messaggero, viene letto dal ribosoma scorrendo sul suo filamento. I micro RNA si frappongono proprio fra RNA messaggero e il ribosoma, in questo modo regolano e modulano la trascrizione genetica (V. Jacob O'Brian et al. 2018)

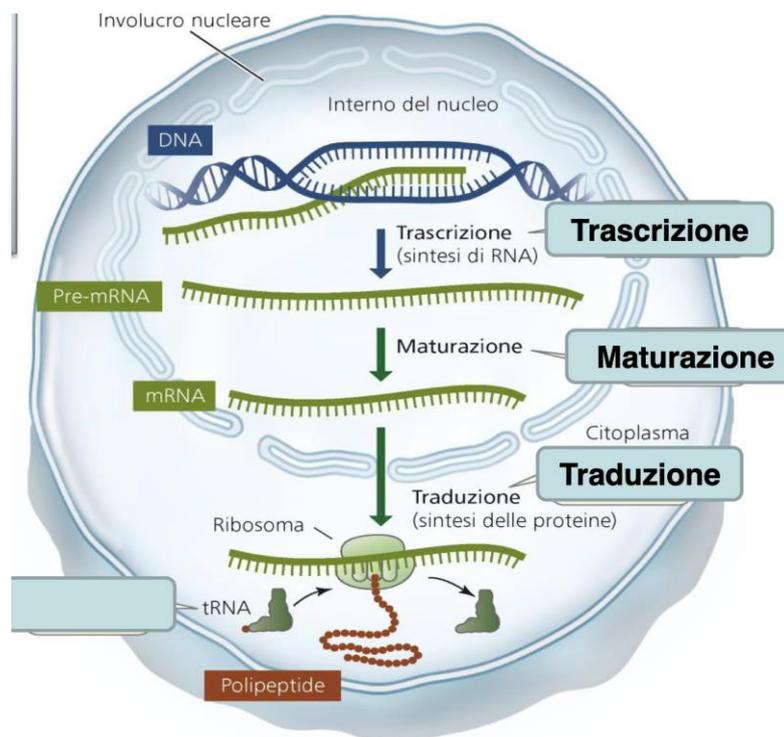


Fig. 1: Dogma centrale della biologia: meccanismo di apertura della doppia elica del DNA

Praticamente i miRNA, lunghi mediamente 21-24 nucleotidi aggiustano e correggono le informazioni contenute nell'RNA messaggero per svolgere importanti funzioni di regolazione genetica, in particolare quella del silenziamento genico. I micro RNA sono nuovi potenziali *biomarkers* utili a individuare diversi tipi di cancro nelle fasi di presviluppo e permettono di adottare opportune strategie per limitarne o evitarne l'effettivo sviluppo. Una dieta equilibrata e varia, ricca in sostanze naturali come i composti fenolici polifenoli, è una tra le strategie più vantaggiose per conseguire questo risultato.

I miRNA vengono inglobati nel complesso di silenziamento indotto da RNA e inducono lo spegnimento genico tramite sovrapposizione con sequenze complementari presenti su molecole di RNA messaggero (mRNA) bersaglio. Tale legame comporta una repressione della traduzione o la degradazione della molecola bersaglio.

2. Gli esosomi contenenti miRNA nel latte

Tutti i latte dei mammiferi contengono i miRNA, ma sono particolarmente presenti nel latte di bufala, più che nel latte vaccino. Il latte più ricco di miRNA è quello dell'orso panda (L.Zhang, D.Hou). I miRNA non sono liberi nei liquidi biologici (sangue, siero, latte, ecc.) ma sono incapsulati all'interno di vescicole lipidiche dette esosomi che ne permettono il transito attraverso la membrana nucleare per fluire nel citoplasma.



Fig. 2 il latte di bufala è ricco di miRNA

La capsula lipidica nel caso di consumo orale di miRNA , dopo essere ingeriti consente il transito a livello gastrico, per poi passare nel sangue e quindi entrare in circolo per raggiungere il citoplasma dove avviene la sintesi proteica. Anche se l'involucro lipidico ha un effetto protettivo dei miRNA è pur vero che i transiti e i passaggi intestinali non sono semplicissimi, la resa di trasferimento non è massima e quindi i dosaggi devono essere significativi.

Per verificare se i miRNA del latte possono andare oltre l'intestino *del topo*, (Manca e Zemleni) e i suoi colleghi hanno escogitato un metodo per etichettare i miRNA contenuti negli esosomi del latte vaccino con composti fluorescenti. Questi potrebbero quindi essere tracciati in modelli animali. Questa tecnologia ha confermato che i miRNA, se incapsulati negli esosomi, si accumulano in vari tessuti, principalmente nel cervello, nel fegato e nella mucosa intestinale. Ciò ha stabilito che i miRNA potevano raggiungere non solo i siti locali (la parete intestinale), ma anche quelli distanti.

Zemleni ha condotto vari esperimenti in cui ha nutrito i topi con una dieta carente di miRNA liberi e di esosomi contenenti miRNA e li ha confrontati con altri topi che consumavano una dieta che aveva livelli normali di ciascuno. Ha trovato una serie di effetti, tra cui una diminuzione delle prestazioni cognitive dei topi che ricevono la dieta carente sia di miRNA liberi che di esosomi contenenti miRNA, una diminuzione della fecondità e cambiamenti nella crescita muscolare. Gli esosomi sono termosensibili, quindi i trattamenti di bonifica microbica del latte, come la pastorizzazione ne compromettono l'integrità e la funzionalità dei miRNA. Rimangono invece funzionali nel siero di latte, cioè nel liquido che rimane dopo la formazione della cagliata. In questo mezzo acquoso rimane più agevole raccogliere e concentrare i miRNA rispetto al latte stesso. La figura 2 offre una immagine suggestiva di come i miRNA potrebbero "sostituire" il latte materno potenziando le difese immunitarie del neonato.



Fig. 3: questo dipinto di Gino Severini illustra l'importanza della lattazione per la vita.

Dal punto di vista dimensionale gli esosomi hanno un diametro medio di circa 0,02 micron, mentre i globuli di grasso di circa 1,5 mm. Nel siero di latte la materia grassa è stata portata via dalla cagliata ma rimangono le sieroproteine che hanno una dimensione media di circa 0,05 micron, quindi, ad esempio, ultrafiltrando il siero con una membrana da 0,1 micron si raccolgono sia sieroproteine che gli esosomi. Questi affiorano nella soluzione concentrata e si possono raccogliere sul supernatante in modo da poterli utilizzare in campo alimentare e farmaceutico.

I microRNA regolano le risposte relative all'immunità sia acquisita che innata degli esseri umani. Alcuni miRNA regolano in modo importante la trascrizione e persino la disregolazione dei mediatori correlati all'infiammazione. In oncologia è stato osservato che diversi tipi di tumore hanno particolari profili di espressione dei miRNA (diagnosi cliniche) Uno studio che utilizza un pannello di soli 48 miRNA selezionati ha permesso una classificazione accurata del tipo di cancro anche in siti metastatici in quasi l'80% dei casi. Nel campo delle malattie infettive, come nel caso dell'epatite B, l'impiego di soli 10 miRNA ha dimostrato una sensibilità dell'85% ed una specificità del 70%. Questi risultati dimostrano l'interesse per l'impiego dei miRNA in campo biomedico.

3. I miRNA presenti nei vegetali

In tutti gli esseri viventi, animali e vegetali in cui è operativa la sintesi proteica sono presenti miRNA diversi, specifici per singole funzioni di regolazione genetica. La differenza di composizione nucleotidica dei miRNA fra le specie viventi è quasi trascurabile al punto che anche quelli vegetali possono agire positivamente sugli animali e quindi sull'uomo. I miRNA sono infatti presenti nei vegetali assunti negli alimenti ([V.Pantaleo](#)) e quindi possono regolare la trascrizione dei geni nei mammiferi. Questi risultati sono importantissimi perché rimettono in discussione l'utilizzo delle piante OGM complicando le cose per i produttori agricoli. Infatti, fino ad ora alcuna analisi dei micro-RNA è stata fatta e questo aspetto sarà da tenere in considerazione da parte di tutti quegli operatori che richiedono o rilasciano le autorizzazioni alle colture OGM.

Semi, frutti, fiori: tutti i tessuti vegetali sono adatti all'estrazione dei miRNA perché in tutti, dalle radici al seme, ci sono processi di autoregolazione svolti proprio dai miRNA. Una classe di composti che ha effetti benefici a prescindere dalla sequenza di ciascun vegetale, basta che la quantità sia sufficiente per intervenire sulla regolazione genica. Gli studi avanzati di genomica e post-genomica delle piante possono guidare nuove strategie applicative finalizzate al miglioramento dell'adattabilità delle piante agli stress ambientali di origine biotica (patogeni) o abiotica (riscaldamento e inquinamento ambientale).

Il riso è la principale fonte di cibo per oltre la metà della popolazione mondiale. Come altre colture, il riso è sfidato da vari stress ambientali che includono siccità, sale, freddo, caldo e carenza di nutrienti che rappresentano i principali fattori limitanti per la sua crescita e resa. (ha identificato 35 miRNA di riso, di cui 14 nuovi e previsti per mirare a geni coinvolti in diversi processi fisiologici nel riso (Sunkar et al., 2007).

Il mais è la seconda coltura alimentare più importante al mondo, utilizzata per alimenti, mangimi e foraggi e come fonte di etanolo per la produzione di carburante. Oltre alla sua importanza agricola ed economica, il mais è stato utilizzato anche nella ricerca come pianta modello.

Famiglie di miRNA sono coinvolte nello sviluppo, nella crescita e nelle risposte allo stress biotico del mais sono state inizialmente descritte e caratterizzate con i loro potenziali geni bersaglio.

Il Dr. Roberto Viola dell'istituto S.Michele all'Adige ha brevettato un impianto, così lo chiama lui, che estrae dalla materia prima vegetale il miRNA presenti in ogni pianta: dall'ortica ai legumi, per creare una banca dati completa, ma non sembra esserci una grande differenza qualitativa. L'importante è la quantità: siamo riusciti a ottenere una resa fino a cento volte superiore a quella che si riteneva possibile». Viola ha creato una start up la **Mirnagreen** che è stata la prima azienda a produrre su scala industriale le molecole naturali ad azione immunomodulante nelle malattie degenerative. MirnaGreen scommette sull'uso di alte dosi del principio attivo così come è in natura estratto da semi, frutti, fiori, cereali tutti i tessuti vegetali sono adatti all'estrazione perché in tutti, dalle radici al seme, ci sono processi di autoregolazione svolti proprio dai miRNA.,

Una classe di composti che ha effetti benefici a prescindere dalla sequenza di ciascun vegetale, basta che la quantità sia sufficiente». Sulla variabilità dell'efficacia la startup sta conducendo studi mirati, in vista di un obiettivo: «Better health for everyone», ovvero far diventare il più accessibile possibile a tutti, questa integrazione benefica. Già adesso, per molte persone non è semplice mangiare le cinque porzioni di frutta e verdura consigliate da esperti e organizzazioni internazionali. Abbiamo stimato, dice Viola che, per massimizzare l'efficacia dei miRNA contenuti negli alimenti vegetali, sarebbe necessario un consumo quotidiano di circa due chili di frutta e verdura.

Un quantitativo molto elevato, e difficile da gestire anche per l'elevata quantità di zuccheri e fibre non consigliabili a tutti e non da tutti tollerati, e la presenza di sostanze che possono creare problemi digestivi. **Mirnagreen** riesce a ottenere quantità di miRNA equivalenti al consumo alimentare di 2 chili di frutta e verdura in un milligrammo di prodotto finito.

4. I miRNA sono attivati dai polifenoli

Stile di vita e dieta salutari ed equilibrati sono fattori chiave nella prevenzione primaria delle malattie gravi e croniche anche gravi, dovute a fenomeni infiammatori, al cancro ed anche contro le

malattie metaboliche in particolare per combattere l'obesità. Alcuni nutrienti e composti bioattivi, tra l'altro, si sono dimostrati capaci di modulare la concentrazione e il funzionamento dei miRNA e così poter intervenire nell'espressione genica alla base dell'iniziazione tumorale. Tuttavia, gli squilibri alimentari e le abitudini di vita insalubri viceversa comportano una disregolazione dei miRNA endogeni, i quali possono favorire stati di infiammazione e predisposizione ai tumori, soprattutto in combinazione a fattori come stress e invecchiamento. **La correzione delle abitudini** quotidiane e l'apporto di alcune sostanze naturalmente contenute negli alimenti, come i polifenoli, risultano utili a ripristinare la corretta espressione dei miRNA (Telma Correa).

I polifenoli sono le sostanze più coinvolte nel regolare l'espressione dei vari miRNA imputati al controllo dello sviluppo dei diversi tipi di cancro, in aggiunta all'attività antiossidante come illustrato (M. Pizzichini). Possono indurre apoptosi nelle cellule tumorali, inibirne la proliferazione o addirittura la metastasi, contenendone la diffusione in siti diversi da quelli di formazione. Tra le molecole fenoliche più importanti si segnalano quelle riportate nella tabella 1, unitamente alla loro provenienza:

Principali polifenoli che interagiscono con i miRNA	
Molecola fenolica	Provenienza
EGCG. L'epigallocatechina-3-gallata	nelle foglie del tè verde,
Curcumina	nel rizoma della curcuma,
Resveratrolo	nelle uve rosse che residua anche nel vino
Quercitina	Nelle mele,, cipolle, pomodoro
Idrossitirosolo (HT)	nelle olive verdi e mature, olio extra vergine
Tirosolo	nelle olive olio extra vergine
Acido gallico	nelle olive, olio extra vergine
Oleuropeina	Nelle foglie di ulivo
Ellagitannini	Mele granate

Tabella 1: principali molecole polifenoliche

L'idrossitirosolo (HT) è il più studiato della frazione fenolica degli estratti derivanti dalla spremitura delle olive, vedi figura 4 .

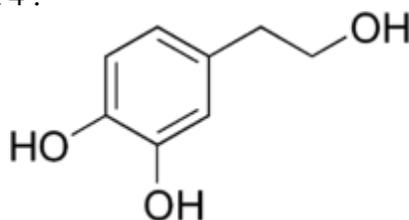


Fig. Formula di struttura dell'idrossitirosolo.

L'HT è considerato un potente antiossidante grazie ai suoi due gruppi ossidrilici adiacenti. L'idrossitirosolo inibisce l'ossidazione LDL indotta dal rame (Visioli and Bernardini). Numerose indagini e studi supportano le proprietà antiossidanti dell'idrossitirosolo e dei suoi derivati. È stato anche dimostrato che l'idrossitirosolo riduce il danno ossidativo nelle cellule epiteliali intestinali (Manna, 2002) negli epatociti e negli eritrociti umani. L'idrossitirosolo è un efficiente scavenger di radicali (anione superossido, radicale idrossile, perossinitrito) e ha capacità chelanti dei metalli; protegge efficacemente dall'ossidazione delle LDL in vitro a concentrazioni relativamente basse. I dati mostrano che l'idrossitirosolo è un potente inibitore della perossidazione lipidica che è considerata uno dei principali meccanismi di danno tissutale da parte dei radicali liberi. Infine, le

proprietà antiossidanti dei polifenoli dell'oliva sono state dimostrate anche in vivo in modelli animali. Pertanto, i polifenoli dell'oliva e in particolare l'idrossitirosolo possono chiaramente ridurre il danno ossidativo in vitro e in vivo e proteggere le cellule dal danno ossidativo.

I miRNA sono stati associati a infiammazione, stress ossidativo, adipogenesi compromessa, segnalazione dell'insulina, apoptosi e angiogenesi nell'obesità (M.Zollo).

I miRNA possono svolgere un ruolo nella comunicazione tra adipociti e tra tessuto adiposo e altri tessuti. Diversi nutrienti e non nutrienti, inclusi i polifenoli, possono regolare le vie di segnalazione coinvolte nella risposta infiammatoria, la riduzione dello stress ossidativo e la modulazione dell'espressione del miRNA. La modulazione del miRNA da parte dei polifenoli sembra essere una nuova strategia per regolare il metabolismo e le malattie correlate.

5. Conclusioni

I miRNA hanno rivoluzionato il mondo della biologia molecolare, con prospettive incredibili in campo biomedico (terapia genica). Infatti, un concetto rilevante in ambito terapeutico è che un miRNA può regolare l'espressione di più proteine target, interagendo con più RNA target. L'utilizzo dei miRNA potrebbe essere una nuova modalità di "terapia epigenetica" e potrebbe essere applicata a patologie multigeniche causate dall'alterata regolazione dei geni.

In oncologia, è stato osservato che diversi tipi di tumore hanno particolari profili di espressione dei miRNA e questo aspetto è molto importante sotto il profilo della diagnosi oncologica in modo di poter intervenire prima che la malattia si propaghi. Uno studio che utilizza un pannello di soli 48 selezionati miRNA ha permesso una classificazione accurata del tipo di cancro anche in siti metastatici in quasi l'80% dei casi. Nel campo delle malattie infettive, come ad esempio nel caso di epatite cronica B l'impiego di soli 10 miRNA, ha dimostrato una sensibilità dell'85% ed una specificità del 70% che costituiscono sicuramente un buon punto di partenza. I miRNA del latte, specialmente di bufala, stimolano le difese immunitarie in particolare dei neonati che non hanno avuto il latte materno. Questo latte si presta bene per questo scopo commerciale perchè il latte di bufala non ha un mercato del fresco ed il siero è spesso considerato, a torto, un residuo della lavorazione casearia.

Questo aspetto consentirebbe, da una parte di trovare una destinazione d'uso di questo latte attualmente impiegato nelle produzioni casearie, in particolare della famosa mozzarella di bufala, e dall'altra di mettere sul mercato preparati ricchi di miRNA da utilizzare nel campo dei baby food ed anche in campo biomedico. Dal punto di vista del recupero e del riutilizzo dei miRNA dal latte/siero di bufala bisogna mettere a punto processi industriali in grado di trattare volumi importanti di latte e siero, senza però danneggiare gli esosomi..

Tecniche di filtrazione tangenziale applicate sul siero, come l'ultrafiltrazione o la stessa microfiltrazione sono molto promettenti allo scopo, ma si può sfruttare insieme alle filtrazione anche la proprietà idrofobica degli esosomi che affiorano in un mezzo acquoso e quindi si possono separare dalle sieroproteine, che rimangono disciolte.

Lo scopo di questa nota è anche quello di sollecitare iniziative industriali per recuperare i miRNA sia dalle matrici animali, come il latte, che da quelle vegetali il riso, il mais, le radici delle piante ecc.

6. Bibliografia

- V. Ambros: The broad scope of microRNA; J Cell Biol. 2013 May 13; 201(4): 492–493 PMID: PMC3653358.
- V. S. Manca, B. Upadhyaya, J. Zemleni et al; Milk exosomes are bioavailable and distinct microRNA cargos have unique tissue distribution patterns ExRNA 2, 2 ;(2020).
<https://doi.org/10.1186/s41544-019-0041->
- V. Jacob O'Brian et al. :*Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation*. Front. Endocrinol., 03 August 2018.
- V. Pantaleo, G. Szittyá and all: Identification of grapevine microRNAs and their targets using high-throughput sequencing and degradome analysis. Rivista: The Plant Journal. 62(6), 2010.
- L. Zhang , D. Hou D, X Chen X, et al. Exogenous plant MIR168a specifically targets mammalian LDLRAP1: evidence of cross-kingdom regulation by microRNA. Cell Res 2012;22:107-26.
- R. Sunkar and J.K. Zhu: Micro RNA and short-interfering RNAs in plants; <https://doi.org/10.1111/j.174-7909;2007>.
- Telma AF Correa and Marcelo M. Rogero: Biophenols regulation microRNA and inflammation biomarkers in obesity; Nutrition pp.150-157 2019.
- M. Pizzichini; D. Pizzichini; G. Iasonna: I polifenoli delle olive possono combattere la sindrome metabolica, Fidak 17, 2020, <http://www.fidak.it/index.php> , 2020.
- F. Visioli, and E. Bernardini "Extra virgin olive oil's polyphenols: biological activities." Curr Pharm Des 17(8): 786-804. (2011).
- C. Manna, S. D'Angelo, et al. "Protective effect of the phenolic fraction from virgin olive oils against oxidative stress in human cells." J Agric Food Chem 50(22): 6521-6526.2002.
- M. Zollo, I. Andolfo et al: Ruolo dei microRNA in medicina; Frontiere, 2007