

Allegato/Annex B

Cognome/Surname	Giurintano
Nome / Name	Ambra
Titolo del progetto / Project title	Identificazione e caratterizzazione di nutrienti estratti da scarti di produzione alimentare
Corso di dottorato / PhD	Oncologia e Chirurgia Sperimentali
Firma del candidato/ Applicant's signature	

SOMMARIO

L'incremento dell'aspettativa di vita ha causato un aumento dei tassi di co-morbilità principalmente per malattie cardiovascolari, cancro, ictus, diabete e demenze. Risulta quindi necessario caratterizzare i meccanismi metabolici responsabili dell'insorgenza di alcune delle più comuni e gravi patologie età correlate (es. cancro).

A tale scopo questo progetto si propone di identificare e caratterizzare molecole bioattive capaci di modulare la resistenza cellulare agli stress, la stabilità genomica e l'autofagia, adoperando un doppio sistema di screening su colture cellulari. Le molecole da saggiare saranno estratte da scarti della lavorazione degli agrumi e da scarti della preparazione dell'olio d'oliva. In questo modo il progetto oltre a essere mirato all'individuazione di fitocomposti biologicamente attivi è anche mirato a sviluppare un'economia circolare in cui gli scarti della filiera alimentare possono diventare risorsa per l'estrazione di sostanze con alto valore tecnologico che possono quindi creare sinergie tra la filiera agroalimentare e l'industria dei functional e medical food.

DESCRIZIONE DEL PROGETTO

Negli esseri umani l'aspettativa di vita è aumentata notevolmente negli ultimi decenni grazie all'introduzione di nuovi approcci terapeutici ed a un miglioramento delle condizioni igienico-sanitarie.

È necessario quindi intervenire al fine di prevenire o almeno ridurre queste malattie in modo da migliorare la qualità della vita della popolazione e contemporaneamente attenuare la pressione che le patologie cronic-degenerative esercitano sul sistema socio-sanitario.

A questo fine un sempre maggiore interesse da parte della ricerca e dell'imprenditorialità internazionale si rivolge alla scienza della nutrizione, prevenzione ed invecchiamento, valorizzando sostanze biodisponibili presenti in natura.

La letteratura scientifica è ricca di informazioni sui poteri benefici degli alimenti cardine della dieta mediterranea come l'olio di oliva, il vino rosso, le arance e i suoi derivati, una conoscenza unanimemente riconosciuta a livello internazionale e mondiale.

Nell'ultimo decennio, infatti, si sono moltiplicati gli studi e le ricerche in campo genetico e nutrizionale volti a:

- Identificare i meccanismi metabolici e biomolecolari nell'uomo legati all'insorgenza di alcune delle più comuni e gravi patologie età correlate (es. cancro).
- Indagare i benefici che alcune categorie di alimenti apportano se introdotti in modo preferenziale con la dieta.

Recenti evidenze scientifiche suggeriscono che l'assunzione in dosi non farmacologiche di alcuni fitocomposti contenuti in questi cibi d'origine vegetale (es. sostanze polifenoliche come il resveratrolo, il 2-oh-tirosolo dell'olio di oliva e i polifenoli del tè verde) potrebbero giocare un ruolo importante nell'attivare alcune vie di segnalazione cellulare che rallentano i processi cronico-degenerativi tra cui il cancro (1-3).

Nella dieta mediterranea l'olio di oliva è uno dei cibi più comuni.

Una dieta ricca in olio di oliva diminuisce/migliora i fattori di rischio delle malattie cardiovascolari inclusi i lipidi, l'ipertensione, le disfunzioni endoteliali e il danno ossidativo (4). I grassi monoinsaturi (MUFA) contenuti nell'olio di oliva sono inoltre associati a effetti protettivi contro le malattie neurodegenerative, incluso l'Alzheimer. Nei paesi Europei inclusa l'Italia dove l'olio di oliva rappresenta la maggiore fonte di grassi, l'incidenza del cancro è più bassa in confronto a quella in paesi del nord Europa dove i grassi non provengono dall'olio di oliva (5). Questi studi indicano che l'olio di oliva, oltre a sostanze che hanno particolari effetti contro specifiche malattie, contiene sostanze con effetti più generali e probabilmente che agiscono su sistemi che regolano o influenzano l'invecchiamento. Altri studi hanno recentemente dimostrato che i grassi insaturi promuovono l'allungamento della vita nei *C. elegans*, uno dei principali modelli per studiare l'invecchiamento (6). Un nuovo studio propone che il succo di arancia bevuto con i pasti può controbilanciare gli effetti pro-infiammatori di una dieta con alti carboidrati e grassi. Lo studio indica che il succo di arance ha il potenziale di ridurre la resistenza all'insulina, il diabete e le malattie cardiovascolari e che siano i flavonoidi nel succo di arance che promuovano parte di questi effetti (7).

Obiettivi della ricerca proposta sono:

1. Identificare sorgenti, naturali e native del mediterraneo, di biomolecole ad azione preventiva e protettiva cellulare, partendo da materie prime e/o scarti o sottoprodotti delle filiere agro-alimentari;
2. Studiare l'attività biologica delle biomolecole frazionate e i loro meccanismi metabolici e molecolari che rallentano l'invecchiamento e promuovono salute.

Questa analisi si svolgerà in due fasi: nella prima fase gli estratti e le molecole potenzialmente interessanti saranno saggiate su colture di lieviti misurando la resistenza agli stress (termico e ossidativo) e la stabilità genomica mediante saggi di misurazione della comparsa di mutazioni puntiformi e/o genetiche oltre che misurando la longevità (chronological lifespan). La scelta di effettuare la prima fase di screening in questo organismo deriva dalla possibilità di effettuare high throughput analysis a basso costo e dalle risorse genetico-molecolari disponibili. Questa flessibilità permetterà anche di creare mutazioni geniche sito specifiche sui principali pathway di trasduzione del segnale e quindi di caratterizzare le vie di risposta alle specifiche sostanze.

In maggior dettaglio la mutagenesi del trasposone del lievito sarà effettuata come indicato in letteratura (8) utilizzando cellule di lievito wild type DBY746 per generare una libreria di ceppi mutanti. Inoltre, potranno essere generati ceppi specifici con mutazione nei pathway Ras-AC-PKA e S6K-TOR per valutare l'effetto delle sostanze in presenza/assenza di questi pathway. Ceppi trasformati con l'ortologo di Ras oncogenico saranno anche adoperati allo scopo di valutare gli effetti su questo background genetico (Ras2G19V).

Il tasso di mutazione sarà misurato come descritto in precedenza (9) e tutti i tipi di mutazione saranno valutati individualmente. Le proteine del lievito e l'estratto di RNA saranno ottenuti come descritto anteriormente (9). Inoltre, mi propongo di utilizzare la collezione di ceppi di lievito generati dal ceppo BY4741 e ottenibili tramite il consorzio EUROSCARF. La resistenza allo stress ossidativo verrà effettuata come precedentemente descritto (9).

Nella seconda fase le molecole più promettenti individuate nella prima fase di studio verranno saggiate su colture di cellule di mammifero per validarne le proprietà identificate nelle cellule più semplici (lieviti). In queste colture verranno saggiate le proprietà anti-infiammatorie in diverse linee cellulari tra cui: Linee cellulari di cancro al seno: 4T1 (murino); MCF-7; MCF10DCIS; GSK 690693, GSK 10696615, GSK 1120212, T-47D, ZR-75-1, MDA-MB-468, MDA-MB-231, MDA-MB-453, BT-549, BT-474, SUM159 and SK-BR-3 (umano). Cellule del cancro al colon: CT26 (murino); CACO2, DLD-1, HCT116, LOVO, LS-174T, SW48, SW480, SW620, HT-29, RKO and TC71.

Successivamente le molecole che hanno dato un ottimo riscontro nelle analisi in vitro potranno essere

saggiate nei topi, in modo da valutarne i loro effetti protettivi in vivo.

Inoltre in vivo potranno essere condotte ulteriori indagini mirate a stabilire come avviene l'assorbimento, il trasporto e l'eliminazione delle molecole identificate oltre che a valutare la loro emivita in circolo.

Prioritariamente, quindi, questa linea di ricerca intende identificare ed estrarre da prodotti agroalimentari nativi del mediterraneo biomolecole naturali con proprietà protettive e preventive dell'invecchiamento cellulare e di supporto al mantenimento delle funzionalità fisiologiche durante l'insorgenza di malattie cronico degenerative.

Dal punto di vista dell'interesse e delle ricadute industriali i risultati del presente progetto garantirebbero l'acquisizione di Vantaggio Competitivo almeno triennale nel MKT di riferimento dei prodotti medical Food infatti l'identificazione di complessi funzionali, derivati da pregiate fonti agro-alimentari autoctone, ha il vantaggio di una maggiore riduzione delle possibilità di effetti collaterali che nella maggior parte dei casi bloccano lo sviluppo degli integratori, dei medicinali e dei functional o medical food, spesso nelle fasi finali e più costose del processo di approvazione sanitaria.

Questo potrà creare sinergie tra il settore industriale alimentare, farmaceutico e tecnologico.

Va inoltre sottolineato che l'utilizzo e l'estrazione di biomolecole da scarti della filiera alimentare raggiunge anche un non secondario obiettivo di valorizzazione degli scarti alimentari. Questo impatterà sia sull'economia della filiera agroalimentare per la valorizzazione di sostanze altrimenti di scarto e sia dal punto di vista ecologico-ambientale perché stimolerebbe un'economia circolare che riduce la massa e quindi anche l'impatto sull'ecosistema degli scarti alimentari. Secondo il database dell'Organizzazione delle Nazioni Unite per l'alimentazione e l'agricoltura (FAO) nel 2019 sono state prodotte nel mondo 98.749.234 tonnellate di agrumi.

Questo numero esorbitante sottolinea l'importanza della coltivazione degli agrumi nell'economia di diversi paesi del mondo.

L'utilizzo degli agrumi non si limita alla sola produzione di succhi ma si estende ad una ampia gamma di altri prodotti tra cui oli, marmellate, conserve ed ecc.

È stato stimato che circa il 50-60 % della frutta trasformata diventa scarto di produzione che nel caso specifico prende il nome di pastazzo e costituisce un serio problema di smaltimento.

Per cui appare evidente come l'utilizzo di molecole estratte da scarti di produzione, per prevenire l'insorgenza di malattie età correlate, possa avere un effetto vantaggioso non soltanto sull'economia ma anche sull'ambiente e sulle industrie. Un esempio di sostanza con grandi potenzialità estraibile da scarti alimentari è costituita dal D-limonene, un monoterpene ciclico ottenuto dall'olio di buccia d'arancia, il quale possiede interessanti proprietà biologiche.

Studi recenti, infatti, hanno dimostrato che il D-limonene possiede attività antiossidante,

antinfiammatoria, e riduce la formazione degli Advanced Glycation Endproducts (AGE) ritenuti parte importante del processo di senescenza cellulare ed è in grado inoltre di indurre l'autofagia (10).

BIBLIOGRAFIA

- (1) Ingram DK, Zhu M, Mameczarz J, Zou S, Lane MA, Roth GS, deCabo R. Calorie restriction mimetics: an emerging research field. *Aging Cell*. 2006;5(2):97-108.
- (2) Lamming DW, Wood JG, Sinclair DA. Small molecules that regulate lifespan: evidence for xenohormesis. *Mol Microbiol*. 2004;53(4):1003-9.
- (3) Belkhadir Y, Chory J. Brassinosteroid signaling: a paradigm for steroid hormone signaling from the cell surface. *Science*. 2006;314(5804):1410-1.
- (4) *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2010 May;20(4):284-94. Epub 2010 Mar 19)
- (5) *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2010 May;20(4):284-94. Epub 2010 Mar 19)
- (6) Goudeau, Bellemin S, Toselli-Mollereau E, Shamalnasab M, Chen Y, Aguilaniu H. Fatty Acid Desaturation Links Germ Cell Loss to Longevity Through NHR-80/HNF4 in *C. elegans* 2011(3):e1000599
- (7) Ghanim H, Sia CL, Upadhyay M, et al. Orange juice neutralizes the proinflammatory effect of a high-fat high-carbohydrate meal and prevents endotoxin increase and toll like receptor expression. *American Journal of Clinical nutrition* 2010;91 (4):940-949
- (8) Fabrizio P, Pozza F, Pletcher S D, Gendron C M, Longo V D. Regulation of longevity and stress resistance by Sch9 in yeast 2001;292(5515):288-90
- (9) Mirisola M G, Taormina G, Fabrizio P, Wei M, Hu J, D Longo W. Serine- and threonine/valine-dependent activation of PDK and Tor orthologs converge on Sch9 to promote aging 2014;10(2):e1004113
- (10) Anandakumar P, Kamaraj S, Vanitha Kalappan M. D-limonene: A multifunctional compound with potent therapeutic effects 2021;45(1):e13566