

SCARTI DELL'INDUSTRIA AGRUMARIA

Modulazione di canali ionici intracellulari indotta da flavonoidi derivanti da scarti dell'industria agrumaria

I flavonoidi rappresentano il più ampio gruppo di metaboliti secondari presenti nelle piante e possiedono molteplici proprietà biologiche, come quelle antiossidanti, antivirali, antinfiammatorie e antitumorali. Gli agrumi sono ricchi di flavonoidi, che potrebbero essere facilmente estratti e quantificati partendo da una matrice di scarti che vengono accumulati proprio in seguito ai processi di trasformazione operati nei processi produttivi dell'industria agrumaria. E diventare così interessanti agenti terapeutici.

***,**Maria Cristina Giunta**
***Laura Cornara**
****Armando Carpaneto**

L'idea di questo lavoro nasce dal crescente interesse verso la possibilità di riutilizzare dei prodotti che normalmente vengono considerati come degli scarti, come, invece, delle vere e proprie risorse. Si parla, per esempio, di reimpiego sostenibile degli scarti dell'industria agrumaria.

La produzione di agrumi in Italia è sicuramente una delle più rilevanti a livello nazionale, ma la sua importanza, soprattutto economica, si estende anche a livello europeo dove l'Italia si attesta ai primi posti. Parte di questa ingente quantità di agrumi viene destinata al consumo del prodotto fresco, quindi tal quale, mentre parte viene destinata alla produzione di succhi.

Il problema è che la produzione industriale di succhi di agrumi rilascia una grande quantità di scarti di lavorazione solidi e liquidi, un residuo umido considerevole che rappresenta circa il 60% dell'intero quantitativo trattato e che comunemente è definito "pastazzo" d'agrumi (fig.1). Considerando che in Italia la produzione di succhi è di circa 1.200.000 t/annue, il residuo umido, quindi il pastazzo, rilasciato annualmente è all'incirca di 720.000 t/annue. Si tratta di veri e propri scarti, costituiti da tutte le porzioni non edi-



Fig. 1

bili degli agrumi e quindi assimilabili a dei veri e propri rifiuti, che determinano per gli agricoltori e per le industrie di trasformazione degli importanti oneri fiscali per il loro stoccaggio e smaltimento. Il problema tende, però, a risolversi con il D.Lgs. 69/2013, il cosiddetto "Decreto del Fare", in cui il pastazzo viene definitivamente sottratto alla categoria dei rifiuti ed è, invece, assimilato al concetto di "sottoprodotto" della lavorazione degli agrumi, per cui può essere direttamente riutilizzato per un ulteriore processo produttivo e non deve essere pertanto smaltito.

Risorsa bioattiva

Non c'è ancora la giusta attenzione verso un riutilizzo del pastazzo nel settore dell'industria farmaceutica vista la sua ricchezza in molecole biologicamente attive, in particolare flavonoidi, il più ampio gruppo di metaboliti secondari delle piante.

In natura ne sono presenti circa 8.000 (Harborne & Williams 2000; Ververidis *et al.*, 2007) e sono molteplici le funzioni che queste molecole possono svolgere come antiossidanti, antivirali, antinfiammatori e anticancerogeni (Picardo & Carrera, 2007;

Kim & Uyama, 2005). Proprio in base alle loro risapute proprietà antiossidanti e alla loro capacità di chelare i metalli legati al sito attivo dei metalloenzimi, i flavonoidi possono determinare una riduzione della pigmentazione (Solano *et al.*, 2006). Ecco perché un certo numero di flavonoidi viene utilizzato nelle preparazioni indicate per lo schiarimento della pelle, per esempio aloesina, derivati dell'idrossistilbene ed estratti di liquirizia (Gillbro & Olsson, 2011).

Tuttavia, ci sono alcuni dubbi sulla concreta possibilità di impiegare i flavonoidi nei trattamenti di schiarimento della pelle visto che alcuni flavonoidi, come naringenina o quercitina, agiscono esattamente in modo opposto, aumentando la melanogenesi. Pertanto, i flavonoidi contenuti negli agrumi emergono come promettenti agenti terapeutici. Essi, infatti, potrebbero essere facilmente estratti e quantificati per esempio partendo da una matrice di scarti, scarti che sono accumulati in grandi quantità proprio in seguito ai processi di trasformazione operati dall'industria agrumaria. Flavanoni come naringenina (fig. 2) ed esperetina, più abbondanti in pompelmi e arance rispettiva-

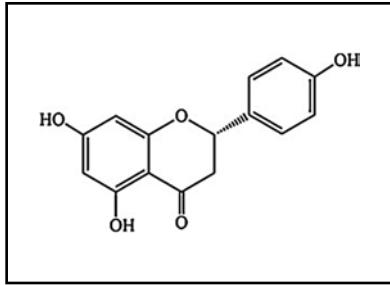


Fig. 2

mente, e flavoni polimetossilati come nobiletina e tangeretina, presenti nei mandarini, sono molecole con una rilevante bioattività, che però dipende sia dalla loro stessa struttura sia da come sono metabolizzate. Per esempio, mentre nobiletina e tangeretina sono facilmente assorbite attraverso l'intestino - non presentando alcun residuo zuccherino - naringina ed esperidina, invece, devono essere prima idrolizzate nelle loro forme di agliconi attivi (Bokkenheuser *et al.*, 1987; Nielsen *et al.*, 2006).

In particolare gli enzimi che, a livello intestinale, sono responsabili di queste reazioni di idrolisi sono: α -L-ramnosidasi, $\text{eso-}\beta$ -glucosidasi, $\text{endo-}\beta$ -glucosidasi e/o β -glucuronosidasi prodotti dalla microflora batterica intestinale; naringina ed esperidina perdono così le loro molecole zuccherine (ramnosio e glucosio) e si trasformano nei loro corrispettivi agliconi: naringenina ed esperetina. In tal modo vengono assorbite e metabolizzate (Manach *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 1998). È importante capire, però, a quanto ammonta la quantità di flavonoidi che dopo l'ingestione, per esempio di succhi di agrumi, si trova realmente disponibile nel plasma. Nell'uomo dopo l'assunzione di 200 mg di naringenina, ingerita tramite succo di pompelmo, il livello plasmatico di tale flavonoide raggiunge un valore di 6 $\mu\text{mol/L}$; il livello nel plasma di esperetina, invece, risulta essere inferiore, pari a 1,3

- 2,2 $\mu\text{mol/L}$ dopo l'ingestione di 130 - 220 mg di esperetina come succo d'arancia (Manach *et al.*, 2005; Erlund *et al.*, 2001). Molteplici studi scientifici sono stati indirizzati verso la ricerca di una associazione tra il consumo alimentare di flavonoidi e la prevenzione di comuni malattie umane. È stato così dimostrato che diete con un notevole apporto di flavonoidi prevengono patologie come il cancro (Weng & Yen, 2012), il diabete di tipo 2 (Wedick *et al.*, 2012), le malattie neurodegenerative (Hwang *et al.*, 2012) e l'osteoporosi (Harcastle *et al.*, 2011; Hooper *et al.*, 2008).

Un recente studio ha inoltre dimostrato che, in particolare, l'assunzione dei flavanoni degli agrumi, per mezzo di un regolare consumo di arance e succo di pompelmo, è correlata alla riduzione del rischio di insorgenza di ictus ischemici nelle donne, e questo sottolinea l'attività cardioprotettiva di questi flavonoidi (Cassidy *et al.*, 2012).

Per valutare la reale efficacia di queste molecole e le loro possibili proprietà farmacologiche è necessario, però, lavorare con molecole di sintesi purificate in modo tale da avere una valutazione diretta degli effetti senza incorrere in problemi come: la reale abbondanza dei flavonoidi nelle fonti cibariche, le reali quantità ingerite e poi assorbite o l'effettiva biodisponibilità dei singoli flavonoidi (Assini *et al.*, 2013).

Altri studi hanno, invece, cercato di valutare l'efficacia dei flavonoidi degli agrumi come agenti ipolipemizzanti, cioè in grado di ridurre il livello dei lipidi nell'uomo (Mulvihill & Huff, 2012). Si tratta di una proprietà di notevole importanza, considerando che la dislipidemia è un importante fattore di rischio per l'aterosclerosi. Da queste recenti ricerche è emerso che ci sono diversi fattori

che influenzano l'efficacia dei flavonoidi: il metabolita utilizzato, la dose, la popolazione di pazienti e la durata dello studio (Assini *et al.*, 2013).

In generale, i flavonoidi contenuti in frutti del genere *Citrus*, proprio per il loro potenziale antinfiammatorio, sembrano attenuare lo stato di infiammazione cronica associata alle malattie metaboliche. Il consumo di succo d'arancia rossa per sette giorni, infatti, sembra ridurre il livello di citochine circolanti (come CRP, IL-6 e TNF α) oltre a migliorare la funzione endoteliale (Buscemi *et al.*, 2012).

Il ruolo di tali flavonoidi potrebbe comprendere, inoltre, anche la prevenzione dell'infiammazione, legata a condizioni di obesità e aterosclerosi: gatti resi obesi con un'opportuna dieta e ai quali sono state somministrate dosi aggiuntive di esperidina (0,05 %) o di naringina (0,1%), mostrano una significativa riduzione della quantità circolante della glicoproteina α_1 , una proteina della fase acuta dello stato di infiammazione sintetizzata dal fegato (Leray *et al.*, 2011).

Ulteriore possibile funzione di questi flavonoidi è l'attenuazione dei fenomeni di aterosclerosi in modelli animali sperimentali. Per esempio in topi *Ldlr*^{-/-} (privi cioè della proteina di membrana responsabile del legame delle LDL) e sottoposti a una dieta ricca in grassi, la somministrazione di naringenina (3%) sopprime significativamente la progressione dell'aterosclerosi nel seno aortico in condizioni di lesioni già avanzate (Mulvihill *et al.*, 2010). Inoltre, in topi *Ldlr*^{-/-} sottoposti a una dieta con alto contenuto di grassi e con l'aggiunta di nobiletina (0,3 %) si prevengono lesioni del seno aortico di più del 70% (Mulvihill *et al.*, 2011). Per avere delle certezze rispetto alle reali prospet-

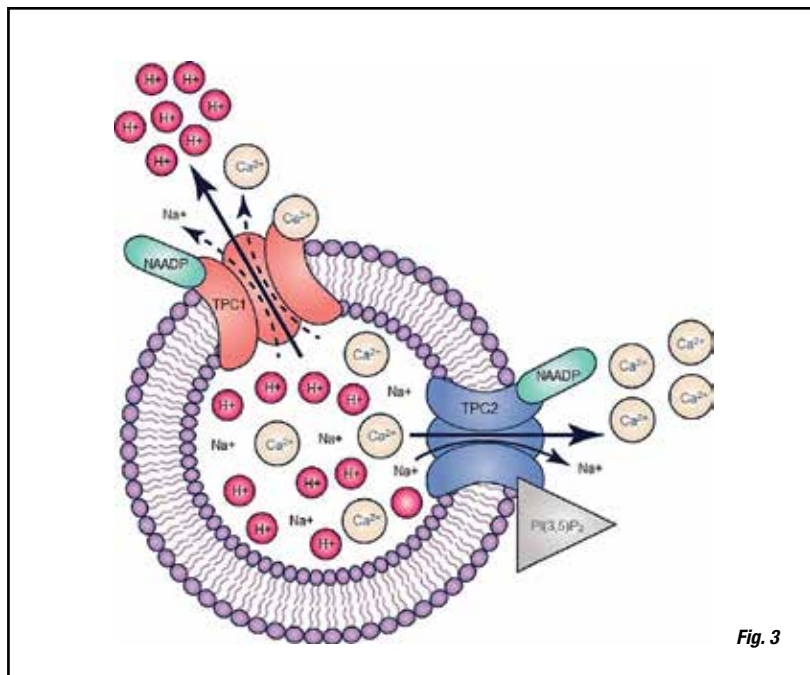


Fig. 3

tive terapeutiche di flavonoidi come quelli contenuti negli agrumi è importante determinare se tale trattamento, in modelli animali con aterosclerosi preabilitata, arresta la progressione della patologia o semplicemente induce un rallentamento delle lesioni indotte dalla stessa (Assini *et al.*, 2013).

Impieghi farmacologici della naringenina

Tra tutti i flavonoidi degli agrumi, la naringenina è la sostanza che attira maggiore attenzione. Questo flavonoide nelle piante è coinvolto in diversi meccanismi, come la resistenza ad attacchi fungini (Padmavati *et al.*, 1997), la crescita delle radici laterali (Webster

et al., 1998) e la biosintesi della lignina (Deng *et al.*, 2004).

Per l'uomo la naringenina risulta importante per le sue molteplici applicazioni in campo medico e farmacologico. Tuttavia, sebbene siano molteplici gli studi scientifici che associano alla naringenina le più svariate proprietà curative, risultano invece ancora carenti gli studi volti alla messa a punto di opportune tecniche di utilizzo di tale composto in relazione alle sue possibili applicazioni medicinali.

Per esempio, il calcene carbosimetil(CM)-naringenina, un derivato della naringenina, è stato sviluppato da una importante azienda cosmetica per sfruttare meglio le caratteristiche antin-

fiammatorie e anti-allergiche già note, in letteratura, di naringenina contro la 'rosacea'.

Si tratta di una malattia cronica che provoca delle infiammazioni sulla pelle, in particolare si assiste al manifestarsi di diffusi rossori principalmente su guance, naso, mento o fronte; rossori che con il tempo tendono a persistere rendendo visibili anche i vasi sanguigni.

Non trattata, questa patologia può sfociare in una condizione definita 'rinosfima' sviluppando evidenti asperità sulla pelle e sul naso, in particolare, con la presenza di tessuto in eccesso.

Non esiste ancora una cura realmente efficace, anche perché risulta ancora sconosciuta la causa di tale patologia; quindi ci si limita allo studio di farmaci che possano almeno controllare o invertire i suoi sintomi (www.rosacea.org).

La CM-naringenina è una molecola che mostra una maggiore stabilità e solubilità in acqua; uno studio *in vitro* ha evidenziato che tale molecola contribuisce a diminuire il rilascio della catelicidina LL-37, la cui sovrapproduzione nei cheratinociti sembra giocare un ruolo importante nello sviluppo di questo disturbo cutaneo. Un campione di donne caucasiche, che presentavano una leggera rosacea, è stato sottoposto per 56 giorni a un trattamento a base di CM-naringenina, manifestando una riduzione misurabile del flusso sanguigno a carico dei capillari e quindi una visibile diminuzione del rossore. Lo studio ha

- Produzione saponette vegetali 100% personalizzate per erboristerie, profumerie, farmacie
- Saponette da Hotel
- Produzione di cosmetici
- Lavorazione c/o terzi





Alchimia Soap Srl
Via Mantova, 5
21057 Olgiate Olona (VA)
Tel.: 0331631582
Fax: 0331674574
www.alchimiasoap.it
soap@alchimiasoap.it

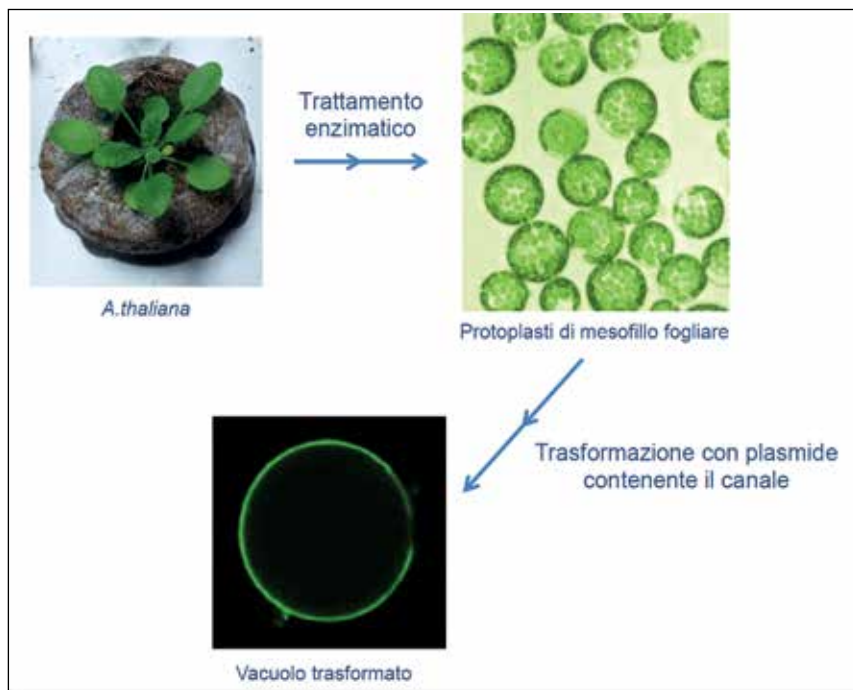


Fig. 4

dimostrato come questa molecola abbia un chiaro potenziale come principio attivo di farmaci per il trattamento di pelli irritate, come quelle colpite da rosacea (www.in-cosmetics.com). La naringenina, come riportato precedentemente, è in grado di aumentare la melanogenesi, uno dei parametri più importanti del differenziamento di melanociti e cellule del melanoma (Hearing & Jimenez, 1989), come dimostrano studi condotti sulla melanogenesi di cellule di melanoma murino B16, un modello per lo studio del melanoma umano: la naringenina aumentava notevolmente sia il contenuto di melanina sia l'attivi-

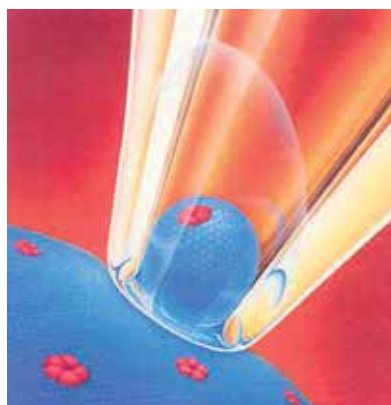


Fig. 5

tà della tirosinasi, un enzima che catalizza la trasformazione ossidativa della tiroxina nel processo di formazione delle melanine. In tale studio sperimentale, la naringenina era sciolta in DMSO e aggiunta alle colture cellulari a una concentrazione finale dello 0,1% v/v. I livelli di melanina aumentavano in modo dose-dipendente, fino ad un livello massimo di 100 μM di naringenina. I livelli di tirosinasi, invece, aumentavano con l'aumentare del tempo di incubazione, specialmente dopo un trattamento a 48 ore (Ohguchi *et al.*, 2006). La naringenina, inoltre, sembra inibire l'enzima ialuronidasi, un enzima che depolimerizza l'acido ialuronico presente nella matrice extracellulare del tessuto connettivo. La presenza di tale enzima è stata riscontrata in organi quali testicoli, milza, pelle, occhi, fegato, rene, utero e placenta; e in fluidi corporei tra cui sangue, lacrime e sperma (Duthie & Chain, 1939). La ialuronidasi è nota per essere coinvolta in reazioni allergiche (Kakegawa *et al.*, 1999), formazione di metastasi tumorali (Cameron *et al.*, 1979), infiammazioni ed emorragie pe-

tecchiali una volta iniettata in preparati mesenterici oltre a determinare un aumento della permeabilità del sistema vascolare (Meyer, 1947). Usando un saggio *in vitro* è stato effettivamente segnalato l'effetto inibitorio della naringenina sulla ialuronidasi di circa il 9,58% a una concentrazione di 200 μM ; tuttavia un suo derivato, in particolare, la 7-O-butyl naringenina, alla stessa concentrazione inibisce lo stesso enzima di più del 44,84 % (Moon *et al.*, 2009).

La naringenina inibisce anche la crescita cellulare, inducendo l'arresto del ciclo cellulare nonché il processo di apoptosi cellulare innescato dalla proteina tumorale p53 (Meiyanto *et al.*, 2012). Ma è stato mostrato anche come essa sia in grado di sopprimere il cancro del colon nei ratti (Leonardi *et al.*, 2010) e come sia capace di inibire la formazione di metastasi e la loro invasione dei tessuti sani (Weng & Yen, 2012).

La naringenina blocca la crescita di cellule di *Dictyostelium discoideum*, un'ameba usata come organismo modello in biologia dello sviluppo, biologia molecolare e in tossicologia ambientale (Russ *et al.*, 2006). È stato dimostrato, da uno studio successivo, che la naringenina inibisce la crescita di queste cellule quando esse esprimono TRPP2, un canale cationico non-selettivo permeabile allo ione calcio, che è implicato nello sviluppo della malattia autosomica dominante del rene policistico (González-Perrett *et al.*, 2001; Vassilev *et al.*, 2001). Si tratta di una malattia provocata proprio da un difetto della proliferazione cellulare con secrezione di fluido nelle cisti che si sviluppano nel rene (Terry *et al.*, 2011).

La naringenina inibisce la crescita delle cellule di *Dictyostelium* con una EC_{50} tra 50 e 100 μM . Questo effetto inibitorio è stato indotto in

cellule che esprimevano la proteina TRPP2, come dimostrato dal fatto che il mutante pKd2⁻ (privo, cioè, del gene *trpp2*) risulta invece insensibile all'azione di naringenina (Waheed *et al.*, 2014).

Canali ionici intracellulari e flavonoidi

La naringenina è una molecola liposolubile e quindi in grado di attraversare la membrana plasmatica; l'idea per lo sviluppo di questo lavoro è stata, pertanto, di verificare l'attività della naringenina come possibile modulatore di canali ionici intracellulari, quali per esempio i canali TPC (*two pore channel*) noti per la loro importanza circa il manifestarsi di gravi patologie umane (fig. 3).

Nell'uomo sono presenti due tipi di canali TPC: hTPC1 e hTPC2 a localizzazione endo-lisosomiale.

Si tratta di veri e propri 'pori di permeazione' presenti, in più copie, sulla membrana di organelli citoplasmatici quali endosomi e lisosomi e che risultano essere modulati da specifici ligandi che ne determinano l'apertura o la chiusura, anche se ci sono due contrapposte scuole di pensiero circa il ligando che attiverebbe entrambi questi canali: NAADP o il fosfoinositide PI(3,5)P2. Gli hTPC sono canali che permettono il passaggio esclusivamente di cationi attraverso la membrana plasmatica, dal lume verso il citosol, ma anche in questo caso diverse sono le conclusioni scientifiche circa i cationi a cui questi canali sono permeabili: Ca²⁺ o Na⁺.

Recentemente il canale hTPC2 è stato associato sia al processo di neo-angiogenesi dei tumori solidi, sia alla patologia del Parkinson. In

particolare è stato dimostrato da recenti pubblicazioni scientifiche che l'assenza del canale hTPC2 determina un'inibizione della risposta neo-angiogenica indotta dal fattore di crescita VEGF e che, inoltre, la sua inibizione produce l'assenza di quei difetti nella morfologia dei lisosomi tipici della mutazione G2019S responsabile della patologia del Parkinson.

Si tratta però di canali ionici intracellulari localizzati su endosomi e lisosomi, che sono organelli sub-micrometrici e quindi di difficile accessibilità con le classiche tecniche elettrofisiologiche. Al fine, però, del loro studio si può

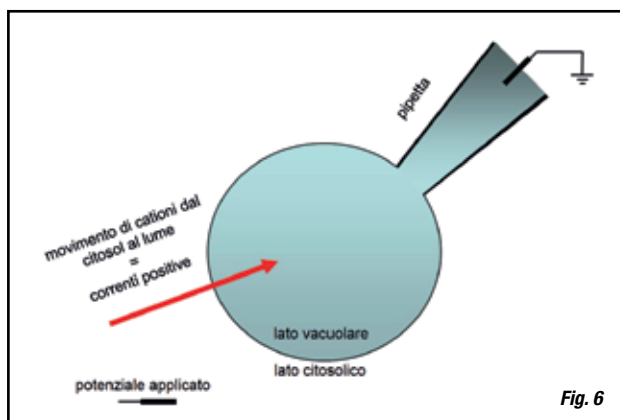


Fig. 6

utilizzare come sistema eterologo, per l'espressione di questi canali, il vacuolo vegetale.

Per questo lavoro, quindi, è stato seguito un protocollo di trasformazione transiente su protoplasti del mesofillo fogliare di piante di *Arabidopsis thaliana* *tpc1* knockout (prive cioè del gene *tpc1* che codifica per il canale At-TPC1 vegetale). Dapprima sono stati isolati i protoplasti del mesofillo tramite un opportuno trattamento enzimatico, poi sono stati trasformati con il plasmide contenente il gene che codifica per il canale umano hTPC1 o hTPC2 ed è stato fuso alla sua porzione N-terminale il gene che codifica

per la proteina EFGP (*Enhanced Green Fluorescent Protein*). In questo modo se, una volta tradotto, il canale hTPC verrà espresso sul tonoplasto, allora quest'ultimo emetterà fluorescenza una volta eccitato a un'opportuna lunghezza d'onda (488 nm) perché sarà stata tradotta anche la EFGP (fig. 4).

È stata utilizzata la tecnica del "patch clamp", che consiste nella possibilità di bloccare ("clamp") la differenza di potenziale su una piccola porzione di membrana ("patch") che si invagina, quindi, all'interno di una sottile pipetta di vetro che viene fatta strettamente aderire alla stessa. In tal modo è poi possibile caratterizzare i canali ionici presenti sulla piccola porzione di membrana isolata (fig. 5).

Gli esperimenti per questo lavoro sono stati condotti utilizzando per le registrazioni dei canali la configurazione "whole-vacuole": quindi la porzione di membrana sottesa alla pipetta si rompe (break-in) attraverso un intenso impulso elettrico e una lieve suzione. Quindi, in accordo con la convenzione di registrazione sulle membrane intracellulari, quando vengono registrate correnti positive si tratta di un movimento di cationi dal citosol al lume (o di anioni nel verso opposto) (fig. 6). Le prime registrazioni di correnti endogene sono state eseguite su vacuoli isolati da protoplasti del mesofillo fogliare di piante di *A. thaliana* wild type che esprimevano, quindi, sul tonoplasto il canale vegetale. Le correnti registrate a diversi potenziali (da -40 a +80 mV) hanno messo in evidenza che si tratta di un canale voltaggio-dipendente, chiuso a



Foto di B. Agostinelli

Il cedro. La produzione di agrumi in Italia è una delle più rilevanti a livello nazionale

potenziali negativi e aperto potenziali positivi (fig. 7).

Il canale che doveva risultare più simile a quello vegetale sarebbe dovuto essere il canale hTPC2. In realtà, hTPC2 non solo è un canale attivato da uno specifico ligando, il fosfoinositide PI(3,5)P2, ma è anche un canale voltaggio-indipendente. Aggiungendo, infatti, nella soluzione del bagno, tramite un sistema di perfusione a caduta il PI(3,5)P2, si assiste a un aumento lineare delle correnti sia a potenziali positivi sia a potenziali negativi, ovvero non c'è nessun meccanismo di rettificazione della corrente in funzione del potenziale a differenza di quanto visto per il canale vegetale (fig. 8). Una volta attivato il canale, si è perfusa una soluzione di naringenina a una concentrazione 500 μM . Con un doppio pulso di potenziale a +40 e -40 mV si è osservata una netta diminuzione della corrente sia a potenziali positivi sia negativi. La curva dose-risposta provando a perfondere altre due concentrazioni di naringenina, 33 e 100 μM , mostra che la concentrazione di mezza inibizione è all'incirca pari a 110 μM (fig. 9). Per il canale hTPC1 è stata condotta la stessa tipologia di esperimenti ma quello che è apparso subito chiaro è che, nonostante sia attivato dallo stesso fosfoinositide PI(3,5)P2, hTPC1 risulta essere un canale voltaggio-dipendente. Con il canale attivato le correnti risultano essere presenti solo a potenziali positivi (fig. 10).

Quello che appare chiaro, confrontando le due curve dose-risposta, è che i due canali TPC umani hanno una diversa affinità per la molecola che li attiva: appena 5 nM per l'hTPC1 e 100 nM per hTPC2 (fig. 11).

A questo punto è stata testata la soluzione di naringenina alla concentrazione 500 μM anche sul canale hTPC1. Quindi si è confron-



Il fiore di limone

Foto di S. Del Moro



Citrus limon

Foto di H. Toyama

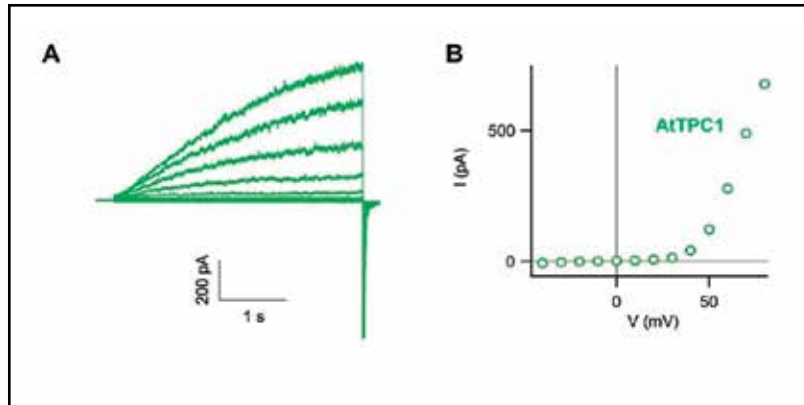


Fig. 7

tato l'effetto della naringenina su questi due canali considerando un doppio pulso di potenziale a +40 e -40 mV.

Considerando la percentuale di corrente residua, ovvero il rapporto tra la corrente in presenza e in assenza di naringenina, c'è una percentuale di corrente residua di appena il 20% per il canale hTPC2 e, invece, di circa il 50% per hTPC1.

Le differenze sono significative e sembra che vi sia una maggiore specificità della naringenina per hTPC2. Il blocco della sostanza non è voltaggio-dipendente visto che è lo stesso sia a +40 che a -40 mV (fig. 12).

Da questo studio si evince che: è possibile esprimere, e di conseguenza studiare, questi canali umani intracellulari di difficile accessibilità esprimendoli su vacuoli vegetali; sono canali che hanno una differente voltaggio-dipendenza e una differente affinità per la molecola che li attiva; entrambi i canali hTPC1 e hTPC2 vengono, effettivamente, inibiti dalla naringenina, ma tale flavanone risulta essere molto più efficace su hTPC2 oltre al fatto che è una molecola di facile reperimento, vista la sua cospicua presenza nel pastazzo, abbondante sottoprodotto della filiera agrumicola, che potrebbe così essere reimpiegato.

Il lavoro relativo alla tesi da cui è tratto questo articolo è proseguito con una collaborazione tra il gruppo di ricerca del Dott. Carpaneto dell'Istituto di Biofisica del CNR di Genova e il gruppo di ricerca del Prof. Filippini dell'Università La Sapienza di Roma.

Quest'ultimo aveva già studiato come l'assenza del canale hTPC2 determinasse l'inibizione del processo di neo-angiogenesi dei tumori solidi *in vivo*; dagli ultimi dati sperimentali, ancora in fase di pubblicazione, appare evidente che la naringenina blocca questo stesso processo di angiogenesi *in vivo*.

Questi risultati, quindi, sono in pieno accordo con i dati emersi da questo lavoro, che dimostra come la naringenina blocchi specificatamente il canale hTPC2.

Conclusioni

Nonostante le difficoltà degli esperimenti effettuati e il tempo esiguo per realizzarli, si è comunque arrivati ad avere delle concrete indicazioni circa l'effetto del flavanone naringenina sui canali TPC umani 1 e 2. Ci sono sicuramente differenze funzionali tra

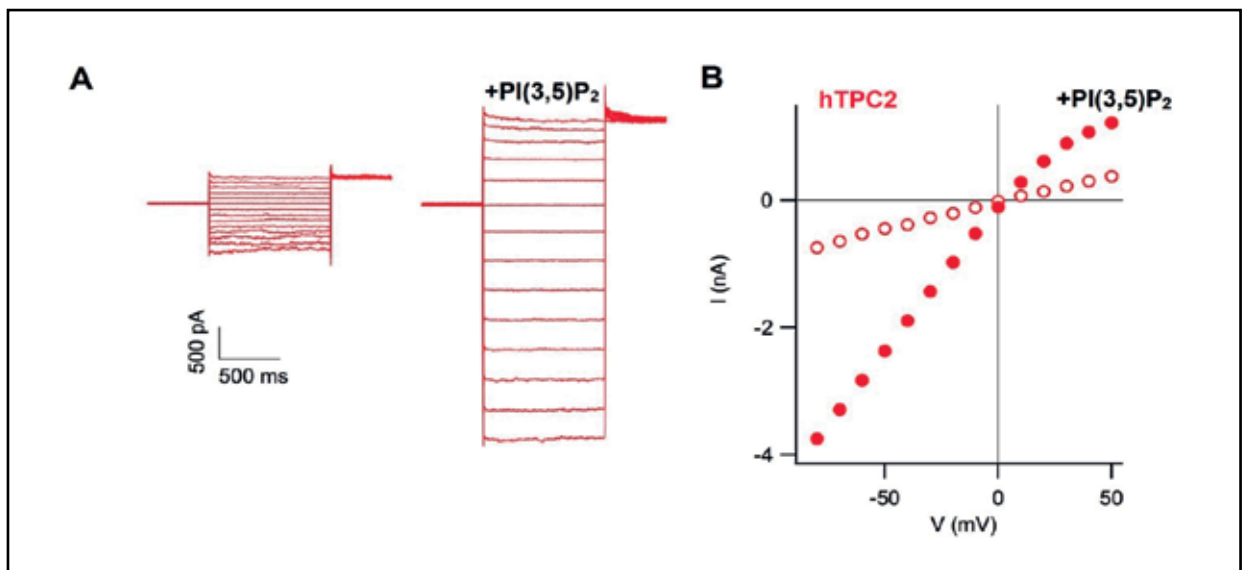


Fig. 8

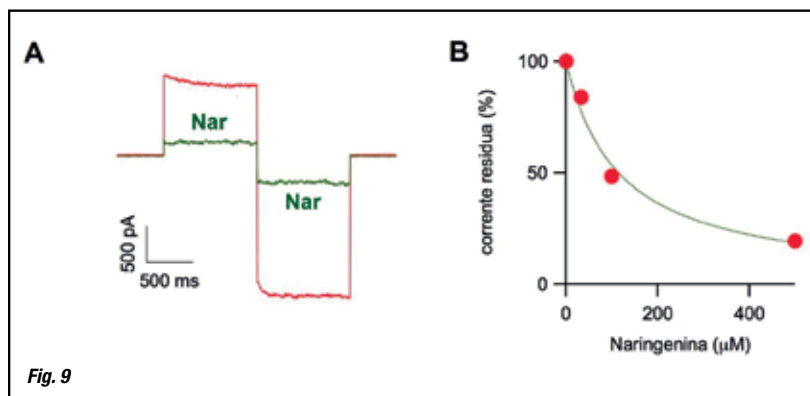


Fig. 9

queste due proteine: per esempio la voltaggio-dipendenza, propria solo del canale hTPC1, e una differente affinità al fosfoinositide PI(3,5)P₂. Per attivare il 50% dei canali di hTPC1 è necessario applicare una concentrazione citosolica di circa 5 nM di fosfoinositide rispetto a circa 100 nM per hTPC2. Non c'è dubbio che la naringenina, il flavanone di cui si voleva testare l'effetto e così tanto abbondante negli scarti non edibili degli agrumi, risulta fungere da inibitore delle correnti mediate da entrambi i canali umani; ma risulta essere nettamente più efficace su hTPC2: a concentrazioni di 500 μM , il blocco indotto è pari, infatti, a più dell'80% della cor-

rente totale contro un'inibizione di circa il 50% per quanto concerne, invece, il canale hTPC1.

Questi dati sono di stimolo per una futura sperimentazione che verificherà se la naringenina possa essere effettivamente usata come agente terapeutico in grado di inibire hTPC2. Recenti studi scientifici indicano che l'assenza o l'inibizione del canale hTPC2 sembra essere correlata alla risoluzione delle problematiche causate dal fattore di crescita delle cellule endoteliali VEGF, coinvolto nella vascolarizzazione di tumori solidi, o da patologie quali il Parkinson.

Va inoltre ricordato che la naringenina è menzionata in diversi studi scientifici, per esempio come

inibitore dell'enzima ialuronidasi, coinvolto nella formazione delle metastasi tumorali, oppure come molecola in grado di contrastare il cancro del colon nei ratti e ancora in grado di bloccare il processo di morte cellulare programmata indotto dalla proteina tumorale p53. Pertanto, il fatto che proprio questa molecola inibisca un canale come hTPC2, anch'esso coinvolto in patologie tumorali, sembra non essere solo una semplice coincidenza, quanto piuttosto un'indicazione concreta sulle grandi potenzialità della naringenina.

Questa molecola è inoltre di facile reperimento, vista la sua presenza in un sottoprodotto della filiera agrumicola quale il pastazzo, talmente abbondante da avere richiesto la pubblicazione di un bando del Ministero dello sviluppo economico per lo sviluppo di nuove tecnologie volte a un suo possibile riutilizzo come risorsa. Se ulteriori ricerche ricalcassero i risultati ottenuti in questo lavoro si aprirebbero le porte a un grande progetto di riutilizzo del pastazzo, ricco in naringenina, per importanti applicazioni in campo farmacologico.

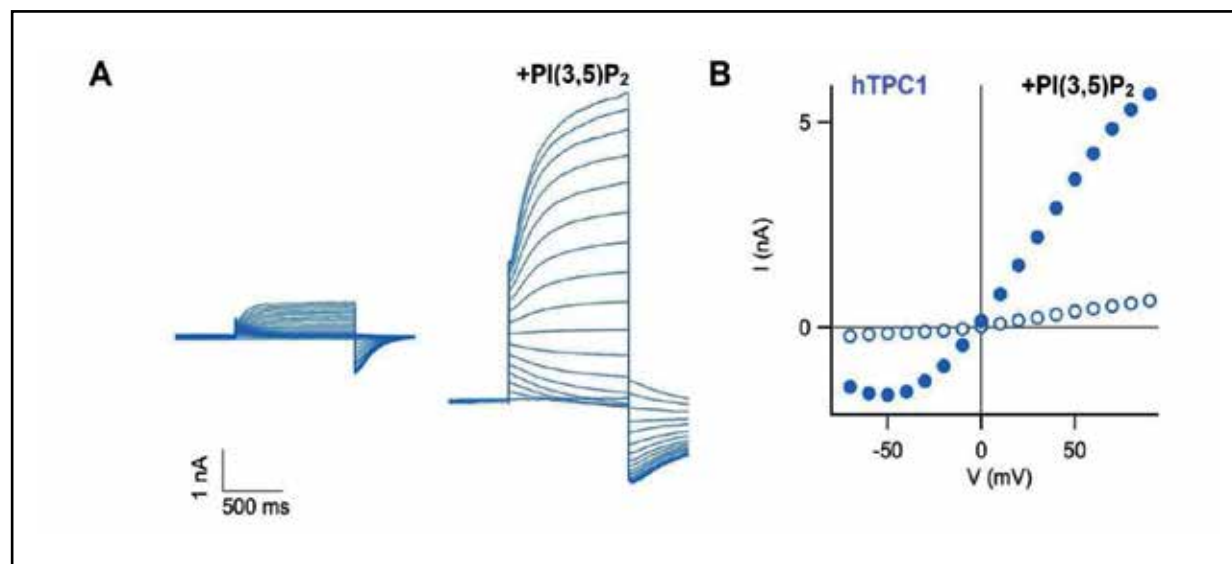


Fig. 10

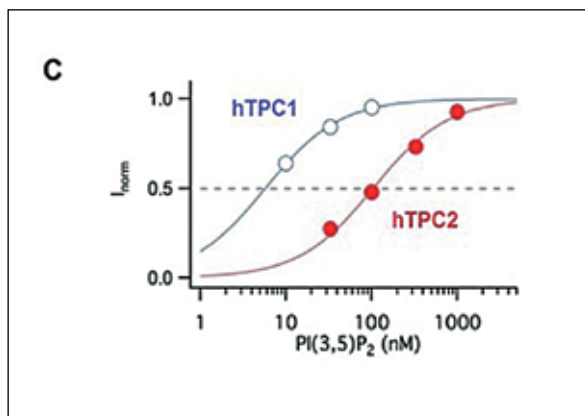


Fig. 11

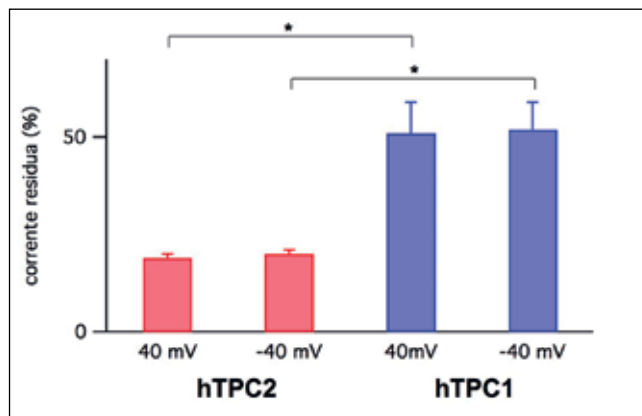


Fig. 12

* UNIVERSITÀ DEGLI STUDI
DI GENOVA
Dipartimento di Scienze della
Terra dell'Ambiente e della Vita
** Istituto di Biofisica, CNR, Genova

Bibliografia

- Harborne J.B. and Williams C.A. (2000) Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55, 481-504.
- Verwerdis F., Trantas E., Douglas C., Vollmer G., Kretschmar G. and Panopoulos N. (2007) Biotechnology of flavonoids and other phenylpropanoid-derived natural products. Part I: Chemical diversity, impacts on plant biology and human health. *Biotechnol. J.* 2, 1214-1234.
- Picardo M. and Carrera M. (2007) New and experimental treatments of cloasma and other hypermelanoses. *Dermatol. Clin.* 25(3), 353-362.
- Kim Y.J. and Uyama H. (2005) Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future. *Cell. Mol. Life Sci.* 62(15), 1707-1723.
- Solano F., Briganti S., Picardo M. and Ghanem G. (2006) Hypopigmenting agents: an updated review on biological, chemical and clinical aspects. *Pigment Cell Res.* 19(6), 550-571.
- Gillbro J.M. and Olsson M.J. (2011) The melanogenesis and mechanisms of skin-lightening agents – existing and new approaches. *International Journal of Cosmetic Science* 33, 210-221.
- Bokkenheuser V.D., Shackleton C.H., Winter J. (1987) Hydrolysis of dietary flavonoid glycosides by strains of intestinal Bacteroides from humans. *Biochem J.* 248, 953-956
- Nielsen I.L., Chee W.S., Poulsen L. et al. (2006) Bioavailability is improved

by enzymatic modification of the citrus flavonoid hesperidin in humans: a randomized, double-blind, crossover trial. *J. Nutr.* 136, 404-408.

- Manach C., Williamson G., Morand C., Scalbert A. and Rémésy C. (2005) Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies 1-3. *Am. J. Clin. Nutr.* 81, 230S-242S.
- Kim D.H., Jung E.A., Sohng I.S., Han J.A., Kim T.H., Han M.J. (1998) Intestinal bacterial metabolism of flavonoids and its relation to some biological activities. *Arch. Pharm. Res.* 21(1), 17-23.
- Weng C.J. and Yen G.C. (2012) Flavonoids, a ubiquitous dietary phenolic subclass, exert extensive *in vitro* anti-invasive and *in vivo* antimetastatic activities. *Cancer Metastasis Rev.* 31, 323-351.
- Wediek N.M., Pan A., Cassidy A. et al. (2012) Dietary flavonoid intakes and risk of type 2 diabetes in US men and women. *Am. J. Clin. Nutr.* 95, 925-933.
- Hwang S.L., Shih P.H. and Yen G.C. (2012) Neuroprotective effects of citrus flavonoids. *J. Agric. Food Chem.* 60, 877-885.
- Hardecastle A.C., Aucott L., Reid D.M. and Macdonald H.M. (2011) Associations between dietary flavonoid intakes and bone health in a Scottish population. *J. Bone Miner. Res.* 26, 941-947.
- Hooper L., Kroon P.A., Rimm E.B. et al. (2008) Flavonoids, flavonoid-rich foods, and cardiovascular risk: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am. J. Clin. Nutr.* 88, 38-50.
- Cassidy A., Rimm E.B., O'Reilly E.J. et al. (2012) Dietary flavonoids and risk of stroke in women. *Stroke* 43, 946-951.
- Assini J.M., Mulvihill E.E. and Huff M.W. (2013) Citrus flavonoids and lipid metabolism. *Curr. Opin. Lipidol.* 24(1), 34-40.

- Mulvihill E.E. and Huff M.W. (2012) Citrus flavonoids and the prevention of atherosclerosis. *Cardiovasc. Hematol. Disord. Drug Targets* 12(2), 84-91.
- Buscemi S., Rosafo G., Arcoleo G. et al. (2012) Effects of red orange juice intake on endothelial function and inflammatory markers in adult subjects with increased cardiovascular risk. *Am. J. Clin. Nutr.* 95, 1089-1095.
- Leray V., Freuchet B., Le Bloc'h J. et al. (2011) Effect of citrus polyphenol- and curcumin-supplemented diet on inflammatory state in obese cats. *Br. J. Nutr.* 106 (Suppl 1), S198-S201.
- Mulvihill E.E., Assini J.M., Lee J.K. et al. (2011) Nobiletin attenuates VLDL overproduction, dyslipidemia, and atherosclerosis in mice with diet-induced insulin resistance. *Diabetes* 60, 1446-1457.
- Mulvihill E.E., Assini J.M., Sutherland B.G. et al. (2010) Naringenin decreases progression of atherosclerosis by improving dyslipidemia in high-fat-fed low-density lipoprotein receptor-null mice. *Arterioscler Thromb Vasc. Biol.* 30, 742-748.
- Padmavati M., Sakthivel N., Thara K.V. and Reddy A.R. (1997) Differential sensitivity of rice pathogens to growth inhibition by flavonoids. *Phytochem.* 46, 499-502.
- Webster G., Jain V., Davey M. R., Gough C., Vasse J., D'enan'è J. and Coking E.C. (1998) The flavonoid naringenin stimulates the intercellular colonization of wheat roots by *Asorhizobium caulinodans*. *Plant, cell and environment* 21, 373-383.
- Deng F.A.N., Aoki M. and Yogo Y. (2004) Effect of naringenin on the growth and lignin biosynthesis of gramineous plants. *Weed Bio. and Mange.* 4, 49-55.
- Hearing V.J. and Jimenez M. (1989) Analysis of mammalian pigmentation at

- the molecular level. *Pigment Cell Res.* 2, 75-85.
- Ohguchi K., Akao Y. and Nozawa Y. (2006) Stimulation of melanogenesis by the citrus flavonoid naringenin in mouse B16 melanoma cells. *BioSci. Biotechnol. Biochem.* 70(6), 1499-1501.
 - Duthie E.S. and Chain E.A. (1939) A mucolytic enzyme in tests extract. *Nature* 144, 977.
 - Kakegawa H., Matsumoto H. and Satoh T. (1999) Inhibitory effects of some natural products on the activation of hyaluronidase and their anti-allergic action. *Chem. Pharm. Bull.* 40, 1439-1442.
 - Cameron E., Pauling L. and Leibovitz B. (1979) Ascorbic acid and cancer: A review. *Cancer Res.* 39, 663-681.
 - Meyer K. (1947) The biological significance of hyaluronic acid hyaluronidase. *Physiol. Rev.* 27, 335-359.
 - Moon S.H., Kim K.T., Lee N.K., Han Y.S., Nah S.Y., Cho S.G., Park Y.S. and Paik H.D. (2009) Inhibitory effects of naringenin and its novel derivatives on hyaluronidase. *Food Sci. Biotechnol.* 18, 267-270.
 - Meiyanto E., Hermawan A. and Anindyajati A. (2012) Natural products for cancer-targeted therapy: citrus flavonoids as potent chemopreventive agents. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 13, 427-436.
 - Russ R., Martinez R., Ali H. and Steimle P.A. (2006) Naringenin is a novel inhibitor of *Dictyostelium* cell proliferation and cell migration. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 345, 516-522.
 - González-Perrett S., Kim K., Ibarra C., Damiano A.E., Zotta E., Batelli M. et al. (2001). Polycystin-2, the protein mutated in autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD), is a Ca²⁺-permeable nonselective cation channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 1182-1187.
 - Vassilev P.M., Guo L., Chen X.Z., Segal

- Y., Peng J.B., Basora N. et al. (2001). Polycystin-2 is a novel cation channel implicated in defective intracellular Ca²⁺ homeostasis in polycystic kidney disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 282, 341-350.
- Terryn S., Ho A., Beauwens R. and Devuyt O. (2011). Fluid transport and cystogenesis in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Biochim. Biophys. Acta.* 1812, 1314-1321.
- Waheed A., Ludtmann M.H.R., Pakes N., Robery S., Kuspa A., Dinh C., Baines D., Williams R.S.B. and Carew M.A. (2014) Naringenin inhibits the growth of *Dictyostelium* and MDCK-derived cysts in a TRPP2 (polycystin-2)-dependent manner. *British Journal of Pharmacology* 171, 2659-2670.



MERRY VEGAN CHRISTMAS!



Anche a Natale scegli **GOvegan**, la linea di prodotti biologici e 100% Vegetali per un nuovo modo di mangiare etico senza rinunciare al gusto!

I **Vegan Christmas**, sono dolci biologici di Natale perfetti per non rinunciare alla tradizione delle feste. Morbidi, profumati e gustosi sono a lievitazione naturale, con sciroppo d'agave e certificati da Vegan Society.

Disponibili in 3 diverse versioni con farina di farro, di frumento al naturale o al cioccolato.





www.probios.it



La linea GOvegan ha una registrazione presso Vegan Society, certificata da Certificatori Europei Italia che ne controlla tutte le fasi produttive e le materie prime.