

EPIGENETICA, NUTRIGENETICA E NUTRIGENOMICA

Dalla regolazione genica alle terapie integrate



Giovanni Chetta



EPIGENETICA, NUTRIGENETICA E NUTRIGENOMICA

Dalla regolazione genica alle terapie integrate

Giovanni Chetta

Edizione 2026

Sommario

Sommario	3
Guida alla lettura.....	8
Premessa	8
Fondamenti di genetica e biologia molecolare.....	8
Acidi nucleici	8
Introduzione.....	8
Genoma, cromatina e cromosomi	12
Meiosi e mitosi.....	16
Indice RF e mappe genetiche	19
Genomica	21
Leggi di Mendel.....	22
Nomenclatura	23
Dark matter e paradossi della genomica	24
Eucromatina ed eterocromatina.....	25
Replicazione del DNA	25
Sintesi del DNA.....	27
RNA.....	31
Trascrizione del DNA.....	36
Proteine.....	38
Traduzione	42
Inizio della traduzione.....	45
Allungamento della catena polipeptidica	46
Terminazione	47
Variabilità genetica: Mutazioni	48
Introduzione.....	48
Mutazioni cromosomiche	49
Mutazioni geniche.....	56
Mutazioni puntiformi.....	58
Elementi trasponibili o trasposoni	60
Mutazioni di splicing del mRNA	64

Mutazioni condizionali	64
Mutazioni per reversione e soppressione	65
Mutazioni indotte e agenti mutageni	66
Sistemi di riparazione del DNA.....	70
Introduzione.....	70
Tipi di danno e riparazione	71
PARP1	75
Sistema di riparo SOS	76
Checkpoint del ciclo cellulare	76
Variabilità genetica: Polimorfismi genetici	77
Descrizione	77
Marcatori genetici.....	78
RFLP	79
STR (STRP) e VNTR.....	79
SNP	81
Frequenza dei polimorfismi genetici e medicina predittiva	83
Studi di associazione e analisi genetica	83
Tecniche di analisi biomolecolari	85
Introduzione.....	85
PCR	86
Elettroforesi su gel di agarosio.....	87
Sequenziamento del DNA	88
Microarray.....	89
Epigenetica, nutrigenetica e nutrigenomica	91
Epigenetica.....	91
Descrizione	91
Meccanismi epigenetici	94
Nutrigenetica e Nutrigenomica.....	99
Introduzione.....	99
Descrizione	99
Effetti della dieta sui principali processi epigenetici	101

Nutraceutici.....	101
Obiettivi.....	103
Dieta ad personam (dieta personalizzata)	104
GENE FUNZIONE BIOLOGICA POSSIBILI ALIMENTI/INTEGRATORI UTILIZZABILI 5HTT 44bp ins..	106
ALIMENTI E FORMULE VITAMINICHE E MINERALICHE SPECIFICHE PER ADATTATORE SS, LL, LS DIO1 rs 2235544.....	106
DIETA MIRATA ATTIVITA' FISICA MIRATA ADRB3 rs4994	106
VALUTAZIONE DELLA PREDISPOSIZIONE ALL'OBESITA'	106
ALIMENTI A BASSO INDICE GLICEMICO DIETA MIRATA.....	106
TCF7L2 rs7903146.....	106
ALIMENTI A BASSO INDICE GLICEMICO DIETA MIRATA ADRB2 Arg16Gly (A>G).....	106
VALUTAZIONE DELLA PREDISPOSIZIONE AL DIABETE	106
VALUTAZIONE DELLA PREDISPOSIZIONE A: IPERLIPIDEMIA, OBESITA', INSULINO RESISTENZA .	106
ALIMENTI A BASSO INDICE GLICEMICO DIETA MIRATA.....	106
Microbiota e Microbioma	107
Descrizione	107
Funzioni del microbiota	111
Ricerca	116
Fitoterapia.....	119
Introduzione.....	119
Preparati fitoterapici.....	122
Descrizione	122
Gemmoterapia	123
Preparati di nuova generazione	124
Antocianine o antociani	127
Curcumina	127
Quercetina.....	129
Resveratrolo	130
Fisetina	132
Licopene	132
Epigallocatechina-3-gallato (EGCG)	134

Capsaicina o capsicina.....	135
Indolo-3-carbinolo (I3C), diindolimetano (DIM) e sulforafano	136
Drenaggio	139
Terapie Connettivali.....	140
Matrice extracellulare (MEC)	140
Descrizione	140
Proteine strutturali	142
Fra le proteine strutturali, i collageni formano la famiglia di glicoproteine più rappresentata nel	142
Proteine specializzate	144
GAG e PG.....	145
Citoscheletro	146
Integrine	147
Metalloproteasi (MMP)	150
Network matriciale	154
Sistema connettivale.....	155
Descrizione	155
Network connettivale	158
Network fasciale.....	159
Tensegrità.....	162
Dalla PNEI alla PNECI.....	168
Psico-neuro-endocrino-immunologia	168
Psico-neuro-endocrino-connettivo-immunologia	169
Esercizio Fisico.....	171
Introduzione.....	171
Esercizio fisico e ormoni.....	171
Impatto dell'esercizio fisico sulla sarcopenia.....	179
Relazione tra esercizio fisico e miRNA	181
Attività fisica e microbiota	183
Esercizio fisico e sirtuine	184
Animale motorio uomo.....	186

Conclusione	186
Bibliografia	187
Riferimenti integrativi aggiornati.....	192
L'Autore.....	192
Giovanni Chetta.....	192
Copyright e note legali	193

Guida alla lettura

Il volume parte dai fondamenti di genetica e biologia molecolare, indispensabili per leggere con maggiore chiarezza i capitoli dedicati a epigenetica, nutrigenetica e nutrigenomica. Il percorso si estende quindi ad alimentazione, microbiota, attività fisica e matrice extracellulare, mantenendo distinta l'evidenza consolidata dalle ipotesi ancora da verificare. La lettura può procedere in sequenza oppure per singoli argomenti, raggiungibili direttamente dal sommario interattivo.

Premessa

Il rapporto tra geni e ambiente non può più essere descritto come l'esecuzione di un programma rigido. L'espressione del genoma cambia, entro limiti biologici precisi, in risposta a segnali metabolici, nutrizionali, neuroendocrini, immunitari e meccanici. Nutrigenetica e nutrigenomica approfondiscono questo rapporto da due prospettive complementari: la variabilità individuale condiziona la risposta agli alimenti, mentre nutrienti e composti bioattivi possono modulare l'espressione genica. Microbiota, fitoterapia, matrice extracellulare ed esercizio fisico completano il quadro. Non tutto è epigenetica: il punto è comprendere come i diversi livelli dell'organizzazione biologica interagiscano e come questa conoscenza possa rendere più personali prevenzione e cura.

Fondamenti di genetica e biologia molecolare

Acidi nucleici

Introduzione

Gli acidi nucleici, DNA e RNA, rappresentano bio-macromolecole di importanza vitale, basti pensare al loro ruolo fondamentale nella sintesi di tutte le proteine. Il loro studio risulta fondamentale per interpretare su basi molecolari i fenomeni della vita. Piccole differenze negli acidi nucleici determinano differenze enormi tra gli organismi.

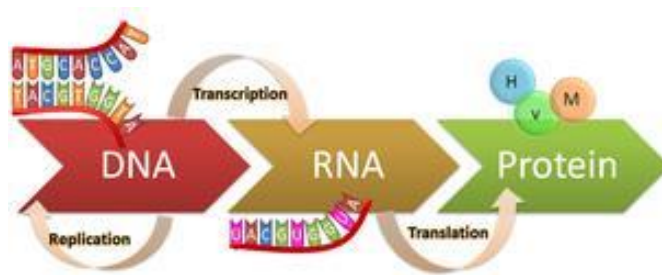
I nucleosidi trifosfato NTP (ATP - GTP - CTP - UTP) sono esempi di nucleotidi che contengono una base azotata legata a uno zucchero a cinque atomi di carbonio (ribosio o desossiribosio) con tre gruppi fosfato legati allo zucchero. Sono i precursori molecolari sia del DNA sia del RNA oltre a fungere come fonte di energia per le reazioni cellulari e a essere coinvolti nelle vie di segnalazione.

Il DNA (acido desossiribonucleico o deossiribonucleico) costituisce il materiale genetico delle cellule ed è presente nel nucleo delle cellule eucariotiche e nel citoplasma delle procariotiche.

L'RNA (acido ribonucleico), presente nel citoplasma e nucleo di cellule eucariote e nel

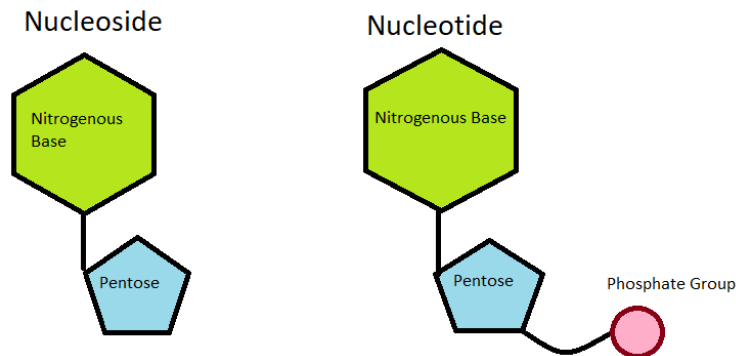
citoplasma delle procariote, svolge una primaria funzione all'interno del complesso processo che porta all'unione degli amminoacidi nella formazione dei polipeptidi.

L'informazione genetica viene sostanzialmente espressa in due stadi: la trascrizione dal DNA al RNA e la successiva traduzione per la sintesi delle proteine. Il DNA è il depositario dell'informazione genetica delle cellule mentre l'RNA viene impiegato principalmente nella trascrizione e nella traduzione di questa informazione che infine si esprime nella sintesi delle proteine.



Nel nucleotide il C-1 del pentoso si lega al N-1 della base pirimidinica o al N-9 della purina; mentre l'acido fosforico si esterifica sul C-5 dello zucchero e, nella catena dell'acido nucleico, forma un ponte col C-3 del pentoso di un altro nucleotide (legame fosfodiesterico tra il gruppo ossidrilico libero in 3' e il gruppo fosfato in 5'); si viene così a formare un lungo scheletro (filamento) o un reticolo. La sintesi di questo particolare legame viene catalizzata da specifici enzimi presenti nel nucleo (rispettivamente DNA-polimerasi e RNA polimerasi) coinvolti in una serie complessa di reazioni determinanti per la replicazione stessa della vita.

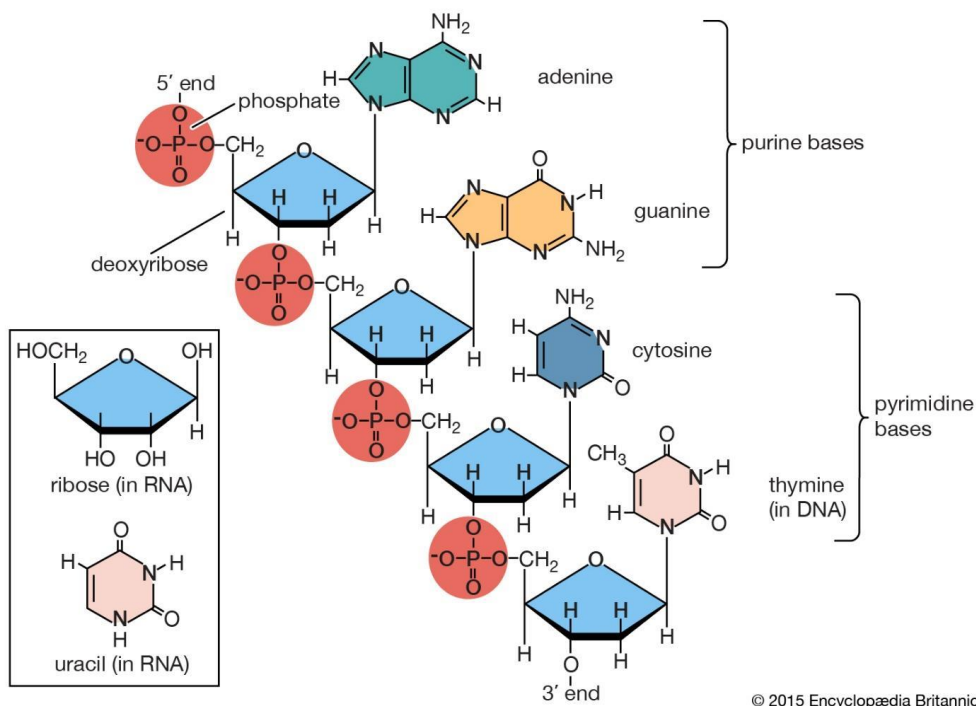
Una blanda degradazione degli acidi nucleici porta a una miscela di monomeri acidi, noti come nucleotidi (ribonucleotidi per l'RNA). Ciascun nucleotide è composto da una base purinica o pirimidinica, una unità di pentoso e da uno a 3 gruppi fosfato. Una successiva idrolisi rimuove selettivamente il fosfato ottenendo una molecola, definita nucleoside, costituita da una base pirimidinica o purinica legata a un'unità di pentoso. Per idrolisi di entrambi i tipi di acidi nucleici si ottiene infatti: acido fosforico, uno zucchero pentoso e una miscela di basi puriniche e pirimidiniche.



Lo zucchero del DNA è il desossiribosio mentre quello dell'RNA è il ribosio

Le basi azotate principali del DNA sono le purine adenina e guanina e le pirimidine citosina e timina, mentre dell'RNA sono adenina, guanina, citosina e un'altra base pirimidinica, l' uracile.

Le purine derivano appunto dalla purina e sono formate da due anelli eterociclici contenenti azoto, le pirimidine dalla piridina in cui l'anello azotato è unico



© 2015 Encyclopædia Britannica, Inc.

Un codone (codon) di DNA o RNA è la specifica tripletta nucleotidica che corrisponde a un singolo amminoacido.

Un gene è una sequenza nucleotidica di DNA che codifica la sequenza primaria di un prodotto genico finale, che può essere un polipeptide, un RNA strutturale (proteina strutturale) o catalitico (enzima).

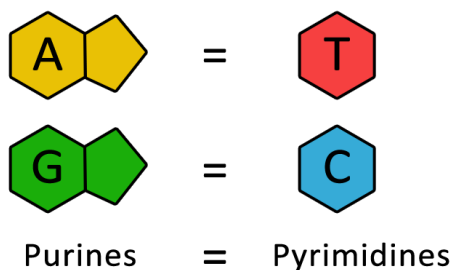
Nelle cellule il filamento di DNA è associata ad una seconda catena polinucleotidica (filamento complementare) tramite legami a idrogeno che si generano tra le basi azotate e complementari

(ogni base azotata può legare solo un'altra specifica base a mò di stampo) che possono facilmente essere rotti per permettere l'apertura del doppio filamento e la trascrizione eseguita dall'enzima RNA-polimerasi.

Questa struttura a "scala" (le basi azotate formano i gradini mentre gli assi longitudinali sono costituiti dagli zuccheri e fosfati) del DNA si avvolge su stessa a formare una doppia elica. Infatti, data la rigidità dei legami fosfodiesterici, per limitare la presenza di acqua intorno alle basi azotate idrofobe tale "scaletta" si avvolge su se stessa intorno all'asse centrale assumendo la tipica conformazione osservata per la prima volta da Watson e Crick nel 1954, che valse loro il premio Nobel per la medicina.

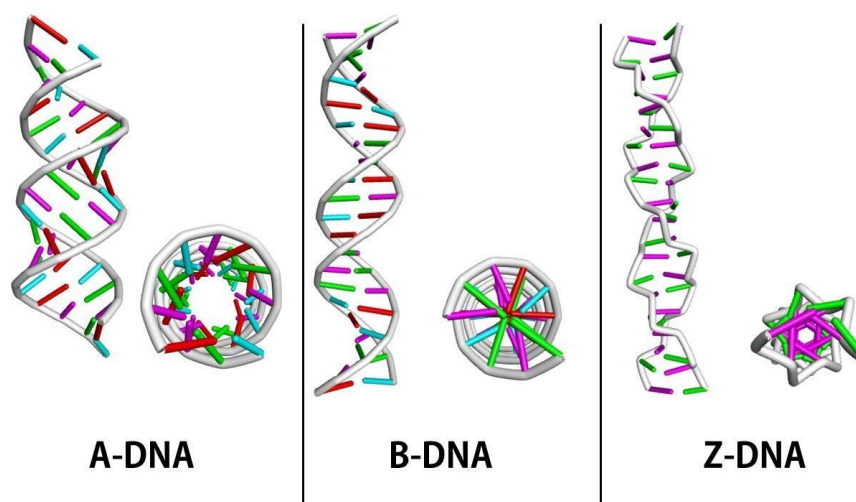
Regole di Chargaff

- 1) La composizione in basi del DNA varia da una specie all'altra.
- 2) La percentuale dei quattro tipi di nucleotidi è sempre la stessa nel DNA di cellule provenienti da tessuti diversi del medesimo individuo.
- 3) La composizione delle molecole di DNA non è influenzata da fattori esterni o dall'età dell'organismo.
- 4) In una molecola di DNA a doppio filamento vi è eguaglianza tra le coppie di basi tali che numero basi Alanina (A) risulta uguale a quello di basi Tiamina (T) e il numero basi Guanina (G) uguale quello di basi Citosina (C).
- 5) Tale uguaglianza si presenta all'incirca anche sullo stesso filamento della doppia elica di DNA (oggi sappiamo che, tale regola non risulta valida per il DNA di mitocondri e cloroplasti).



La doppia elica del Dna può assumere, in particolari condizioni ambientali o per specifiche sequenze di basi, varie forme strutturali alternative caratterizzate da specifici angoli torsionali e movimenti translazionali e rotazionali delle basi azotate, di cui le tipologie di elica più

facilmente riscontrabili vengono denominate forma A, B e Z.

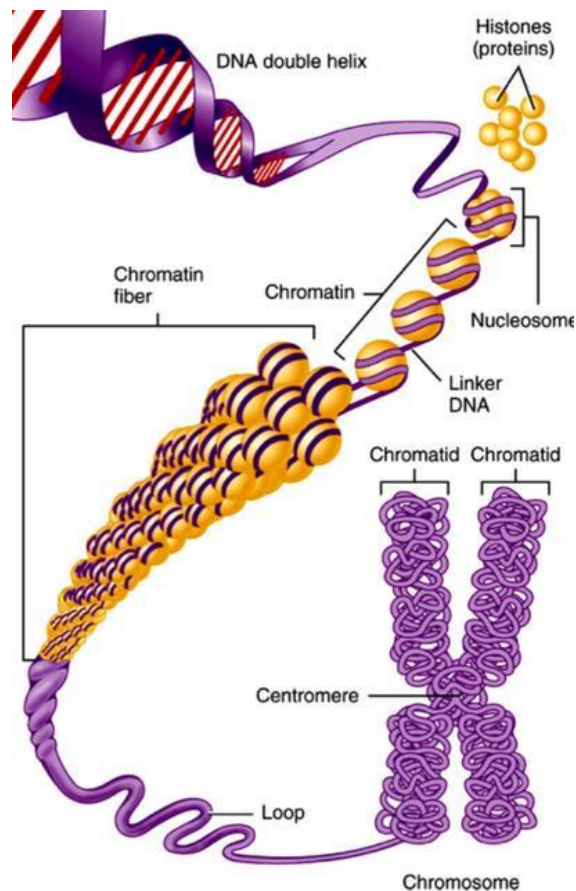


Genoma, cromatina e cromosomi

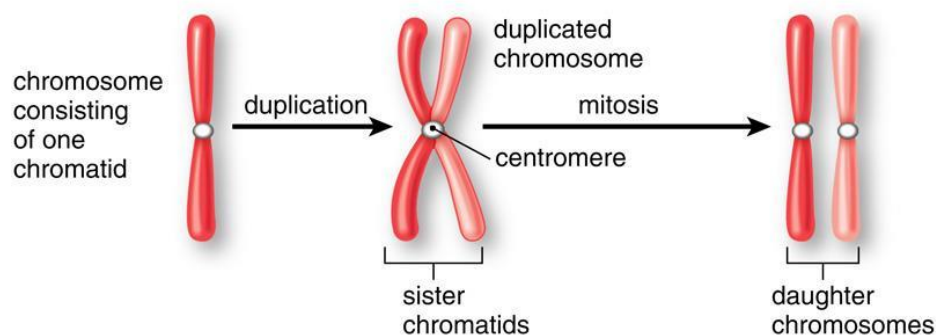
Con il termine genoma (o patrimonio genetico) si intende l'insieme delle sequenze nucleotidiche del DNA di un individuo. Il genoma umano risulta composto da 3,2 miliardi di coppie di nucleotidi: se il filamento di DNA di una singola cellula venisse disteso risulterebbe lungo ca. 1 metro. All'interno del nucleo cellulare le molecole di DNA (genoma cellulare) non si trovano pertanto in forma libera ma, nella cisterna perinucleare, associate a specifiche proteine basiche, definite istoni, costituendo la cromatina. A essa sono associati ulteriori proteine (basiche e acide), alcuni enzimi e molecole di RNA. Tra gli istoni e il DNA si vi è un'attrazione elettrostatica, in quanto le proteine istoniche sono cariche positivamente mentre il DNA presenta le cariche negative dei gruppi fosfato, che determina una struttura molto compatta in cui il DNA si ripiega su stesso avvolgendosi in diversi gradi attorno agli istoni. In questo modo inoltre la cromatina protegge il DNA da danni chimico-fisici e ne modula l'espressione genica.

L'unità base della cromatina è il nucleosoma, formato da otto proteine istoniche sulle quali si avvolgono due giri di filamento di DNA della lunghezza di circa 165 nucleotidi (diametro complessivo 10 nanometri). Ne risulta una struttura detta "collana di perle" in cui i nucleosomi risultano le perle intervallate da un tratto libero di filamento definito DNA-linker. Un'altra proteina, l'istone H1, è in grado di avvicinare tra loro i nucleosomi formando una struttura ulteriormente compattata definita solenoide, in cui le fibre di DNA risultano ispessite (diametro 30 nm) e la fibra di cromatina condensata si avvolge ulteriormente su se stessa raggiungendo

lo spessore di 700 nm.



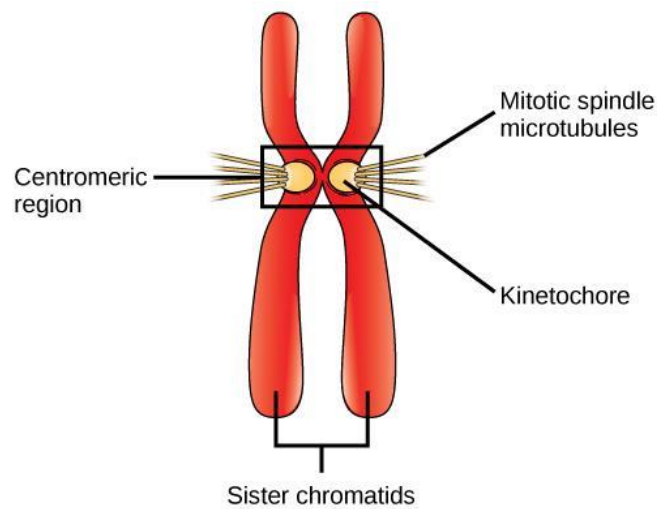
Lo stadio massimo del super-avvolgimento avviene nelle fasi di divisione cellulare in cui la cromatina si compatta nei cromosomi, con la tipica forma a X (composta dai due cromatidi uniti a livello del centromero) di pochi micron (cromosoma X) e visibili tramite colorazione basica al microscopio ottico. È in tal modo infatti che si compatta ciascuna unità funzionale del DNA dopo essersi duplicata. il termine cromosoma può riferirsi per esteso anche al filamento di DNA non distinguibile nella cromatina.



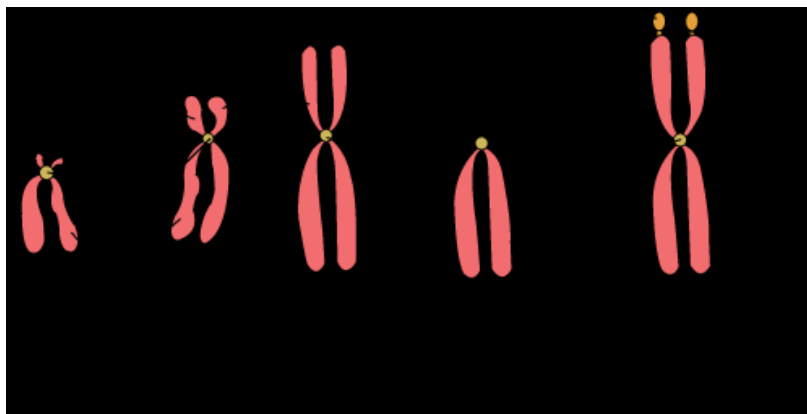
Il centromero o “costrizione primaria”, è il locus, a mò di strozzatura, indispensabile per la sua corretta segregazione cromosomica. Esso presenta un complesso proteico specializzato



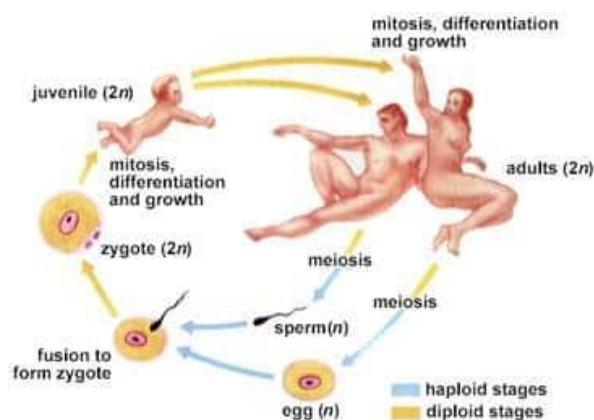
(cinetocore) a cui si agganciano le fibre del fuso mitotico che assicurano la corretta migrazione dei cromosomi durante mitosu e meiosi.



I cromosomi possono presentare diversa posizione e numero di centromeri (monocentrici, policentrici, olocentrici).



L'insieme dei cromosomi presenti

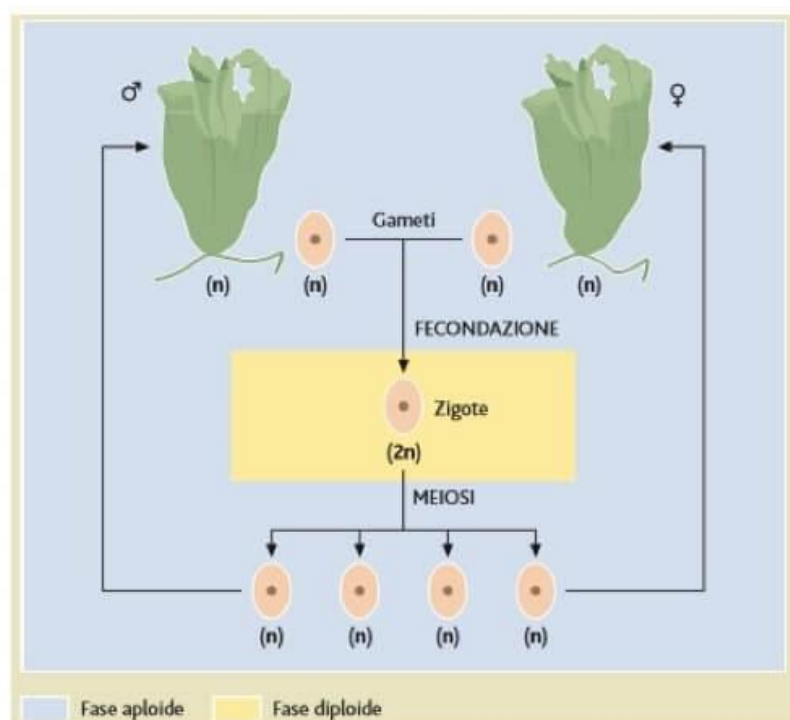


nella cellula rappresenta l'assetto o
corredo cromosomico che è



caratteristico per ogni specie e
rimane costante nelle generazioni.
Ploidia (grado di ploidia n) indica il
coefficiente per cui viene
moltiplicato il numero
fondamentale dei cromosomi (23
nell'uomo):

Nella riproduzione sessuale, lo zigote definisce la cellula uovo fecondata risultante dall'unione
e fusione del gamete maschile e femminile e possiede un corredo diploide derivante dalla
fusione dei corredi cromosomici aploidi dei due gameti.



Le cellule somatiche (le cellule del corpo) degli animali sono diploidi ($2n$) ossia contengono 2 cromosomi per ogni tipo di essi, definiti cromosomi omologhi, mentre i gameti maturi (cellule destinate alla riproduzione) sono aploidi ($1n$) cioè presentano un solo cromosoma per ogni tipo definito eterocromosomi o cromosoma sessuale X e Y. La poliploidia è diffusa nel regno vegetale.

Gli individui di una specie hanno cariotipo simile cioè lo stesso insieme morfologico di cromosomi (numero e morfologia) osservabile al microscopio ottico. L'analisi del cariotipo

permette di costruire una rappresentazione grafica ordinata del corredo cromosomico di un individuo, definita cariogramma. Il cariotipo umano comprende 22 coppie di autosomi (cromosoma che non partecipa alla determinazione del sesso) e una coppia di cromosomi sessuali, diversa nel maschio (XY) e nella femmina (XX).

Il sesso del nascituro dipende dal gamete maschile, che può portare il cromosoma X o il cromosoma Y. Il cromosoma X difatti presenta una eredità di tipo biparentale (trasmissibile da padre e madre) mentre il cromosoma Y è uniparentale da parte del padre. Il cromosoma X umano è metacentrico (centromero localizzato nella porzione centrale) e ha grandi dimensioni (ha più di 150 milioni di coppie di nucleotidi e 900-1200 geni). Molti dei geni del cromosoma X risultano molto importanti per il corretto sviluppo ma solo uno di questi geni svolge un ruolo nel determinare il fenotipo femminile.

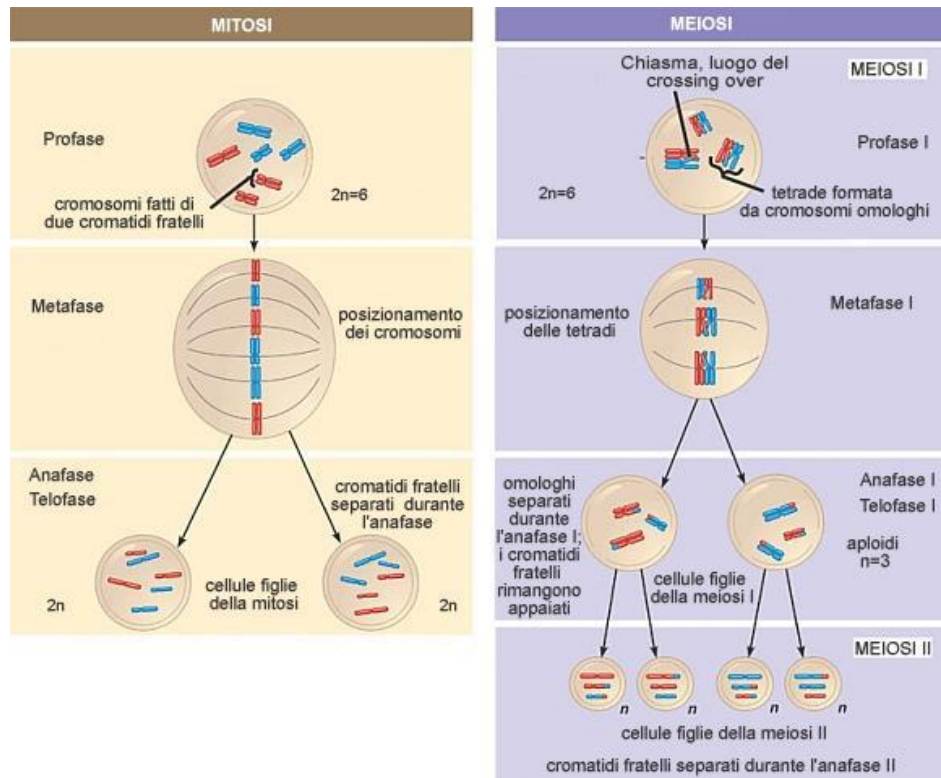
Il cromosoma Y presenta dimensioni più ridotte (57 milioni di coppie di nucleotidi, 200 geni). Il suo gene SRY (Sex Determining Region Y) stimola lo sviluppo dei testicoli nelle prime settimane e quindi la produzione di testosterone e l'attivazione a cascata di altri geni che comportano lo sviluppo maschile.

Meiosi e mitosi

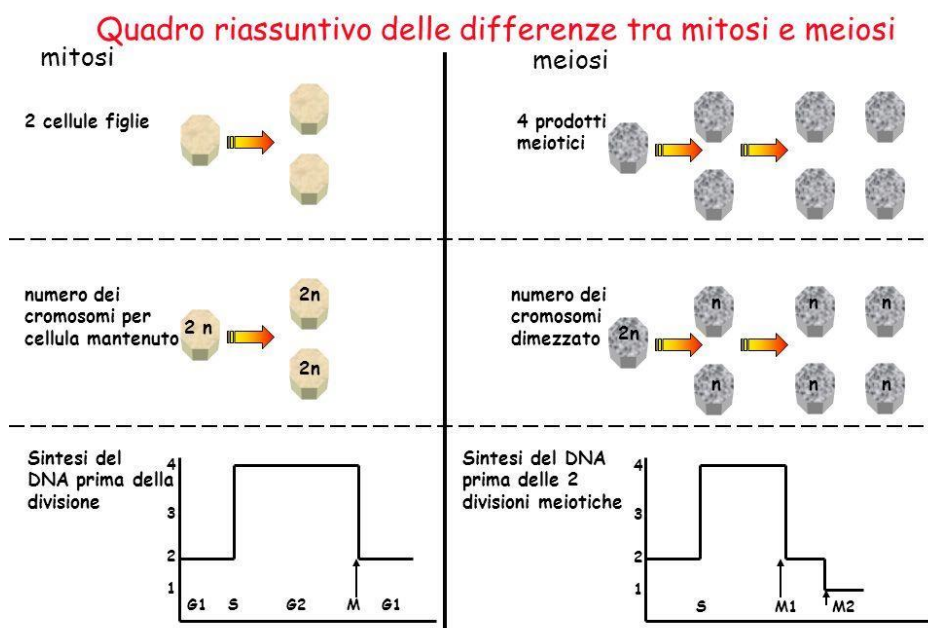
I cromosomi omologhi appaiono durante la meiosi e sono uno di origine paterna e uno di origine materna. Essi presentano nelle stesse posizioni (locus genico) geni che controllano gli stessi caratteri ereditari. Tali geni sono definiti alleli e possono presentare delle varianti derivanti da mutazioni o polimorfismi (es. i gruppi sanguigni). In caso di alleli uguali (2 geni copia) si parla di genotipo omozigote di quell'individuo, nel suo zigote, per quel carattere (a esempio AA o aa), se diversi di genotipo eterozigote (Aa).

Il 99,9% del DNA è conservato fra individui diversi (100% per gemelli identici).

Il genotipo definisce quindi la costituzione genetica di un individuo che, se diploide, è identificata da due alleli per ogni carattere; Il genotipo è determinato dal tipo di allele fornito da ciascun gamete al momento della fecondazione. L'interazione del genotipo con fattori esterni ed interni si manifesta nel fenotipo inteso sia a livello del singolo carattere sia come l'insieme dei caratteri espressi da un individuo; il fenotipo rappresenta pertanto una variabile.

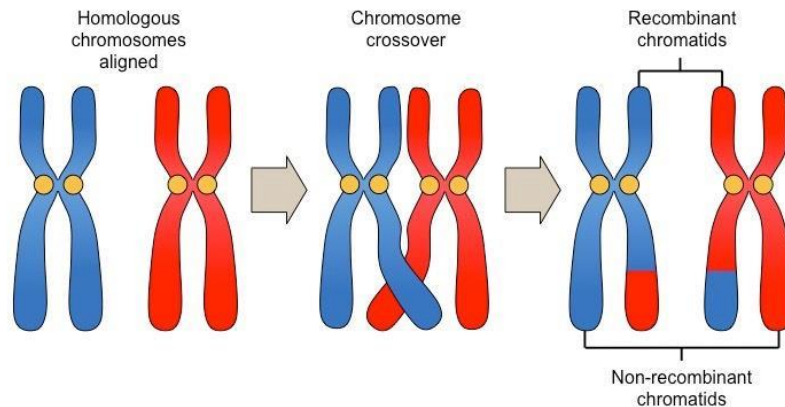


Le cellule somatiche di un organismo possiedono uguale patrimonio genetico e si dividono per mitosi, un processo di riproduzione asessuata delle cellule eucariote, generando cellule che contengono sempre lo stesso corredo. La mitosi serve per la crescita e lo sviluppo embrionale nonché per sostituire le cellule somatiche danneggiate o morte. La frequenza di divisione mitotica varia da tessuto a tessuto e da organo a organo. Il ciclo vitale di una cellula somatica è suddiviso in interfase e fase mitotica.



La meiosi trasforma, mediante due divisioni successive, una cellula diploide in quattro cellule aploidi, geneticamente diverse l'una dall'altra. Un individuo infatti produce per meiosi gameti sempre diversi grazie a due eventi:

1) ricombinazione di alleli diversi durante il crossing-over che avviene due coppie di cromatidi fratelli (coppia formata dalle due copie di un cromosoma duplicato, uniti per il centromero) di due cromosomi omologhi durante la profase meiotica e raramente la mitotica. Di norma la frequenza con la quale il crossing-over avviene è direttamente proporzionale alla distanza che separa i due loci (distanza interlocus), quindi all'aumentare della distanza tra due geni, la proporzione di gameti ricombinanti aumenta e quella di gameti parentali diminuisce.



2) Assortimento degli omologhi durante l'anafase I che separa in modo casuale (segregazione indipendente) i cromosomi di origine materna e paterna. Si definiscono geni associati i geni presenti sullo stesso cromosoma che non segregano indipendentemente (in quanto non sono stati coinvolti in cross-over) e pertanto mostrano un'associazione (definita anche concatenazione o linkage). Nel linkage completo si producono solo gameti parentali ossia non ricombinati in proporzioni uguali (non è intervenuto alcun crossing over). In caso invece di crossing over si produce gameti sia parentali che ricombinanti (linkage parziale). Da quanto detto in precedenza due geni posti molto vicini sullo stesso cromosoma tenderanno ad avere una frequenza ricombinante minima e quindi un'alta probabilità di linkage.

Indice RF e mappe genetiche

L'indice della frequenza di ricombinazione RF (Recombination frequency) di 2 geni posti sullo stesso cromosoma (frequenza con cui avviene il crossover) viene calcolato come rapporto n° gameti ricombinanti (con combinazioni alleliche diverse da quelle dei genitori) / n° gameti totali. La RF risulta pertanto direttamente proporzionale alla distanza tra i due geni. Il centimorgan (cM) è l'unità di misura della RF: 1 cM corrisponde alla distanza tra due geni con $RF = 1\%$ (1 gamete su 100 presenta una ricombinazione fra essi) ossia la distanza di 1 cM tra 2 marker indica che tali marker vengono separati in media 1 volta ogni produzione di 100 gameti ossia 1 volta ogni 50 meiosi ossia equivale al 1% di possibilità che un marker di un locus venga separato da un marker di un altro locus dello stesso cromosoma tramite il crossing over nell'ambito di una singola generazione.

È un metodo che presenta dei limiti come nel caso di crossing over multipli



La creazione di mappe genetiche o mappa cromosomica o di concatenazione (genetic linkage map da non confondersi con la gene map) si basa proprio sul principio della RF e consiste in una rappresentazione della distanza che separa i geni di frequenza di ricombinazione genetica.

Tale mappa consente:

- localizzazione di un locus genico (o di un marker) rispetto agli altri e quindi definizione dell'ordine con cui i geni sono disposti sul cromosoma:

- predizione di segregazione;

- costruzione di una mappa genomica a partire da frammenti di DNA, isolati e inseriti in vettori di clonaggio;

- comprensione dell'organizzazione del genoma.

I risultati ottenuti dalla mappa genetica vengono integrati dalle mappe fisiche (di cui ne esistono tre tipi in base al livello di risoluzione) che, tramite marcatori genetici, esegue un'analisi diretta del DNA.

La mappa citogenetica si ottiene con la visualizzazione al microscopio ottico per mezzo di particolari tecniche di colorazione, dei cromosomi di una cellula.

Il passo successivo è l'identificazione della sequenza delle basi del DNA umano e ciò rientra nel Progetto Genoma Umano HGP (Human Genome Project) i cui scopi sono:

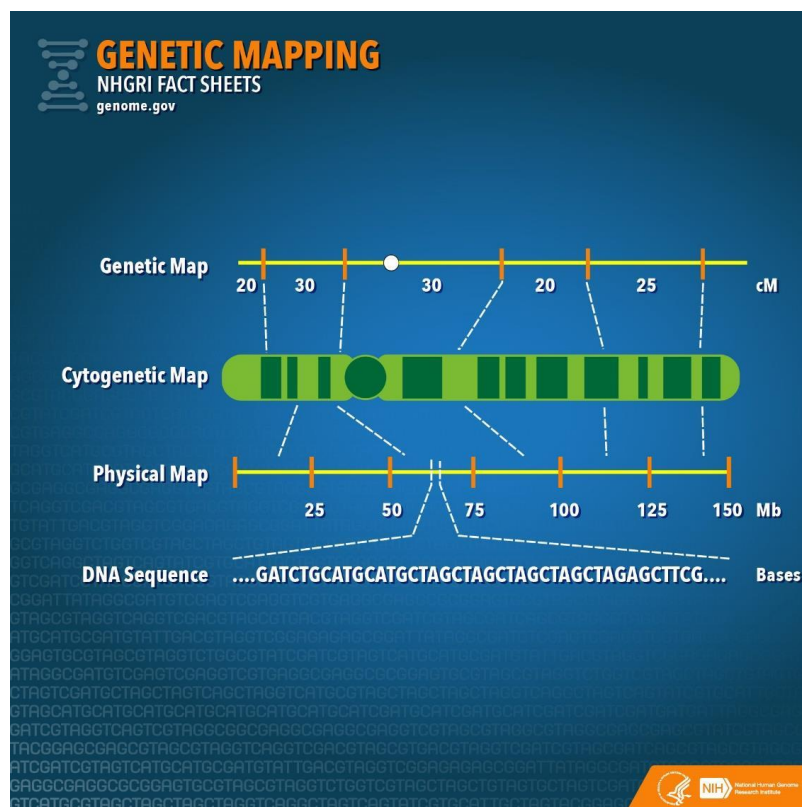
- completamento di una mappa genetica ad alta risoluzione (1cM) del genoma umano;

- completamento di una serie di mappe fisiche ad alta risoluzione di tutti i cromosomi umani;

- acquisizione di una collezione di cloni di DNA ordinati che coprano l'intero genoma;

- determinazione della sequenza nucleotidica completa di un genoma di riferimento;

- mappatura di tutti i geni.



Grazie a tale progetto sappiamo che abbiamo nella cellula:

2 metri di DNA in 5-20 μm di spazio, 46 cromosomi, 30.000-40.000 geni, 6 miliardi di paia di basi,

solo il 3-5% del genoma che codifica per proteine

piu' del 50% del genoma costituito da sequenze ripetute con funzione sconosciuta;

una differenza dello 0,1% del DNA che determina la variabilità della popolazione.

Ancora non si conosce bene:

- esatto numero dei geni, loro localizzazione, funzione e fine regolazione
- tipi di DNA non-codificante, sua distribuzione e funzione;
- struttura e funzione di molte proteine
- correlazione tra variazioni di sequenza tra singoli individui con la salute e la malattia (predizione della suscettibilità a specifiche malattie in base alla variabilità genetica individuale)
- geni coinvolti nelle patologie complesse.

Genomica

Il Progetto Genoma Umano rappresenta un fondamento della genomica che è la disciplina che si occupa della struttura, sequenza, funzione ed evoluzione del genoma ossia di tutta

l'informazione genetica contenuta nel DNA presente nelle cellule di una particolare specie. Questa nuova branca della biologia molecolare nasce e si sviluppa grazie alle tecniche di sequenziamento del DNA.

La genomica comprende principalmente due sottoaree:

genomica strutturale che si occupa della mappatura genetica, di quella fisica e del sequenziamento di interi genomi.

genomica funzionale che mira a comprendere le modalità con cui i geni dirigono lo sviluppo e il funzionamento del nostro organismo e come il loro malfunzionamento induca uno stato patologico.



Leggi di Mendel

I) La prima legge di Mendel o legge della dominanza afferma che dall'incrocio tra due linee pure che differiscono per un solo carattere fenotipico, si ottiene una I generazione filiale (F1) in cui gli individui manifestano uno solo dei due fenotipi parentali. Questo fenotipo è definito dominante, mentre l'altro è recessivo e ricompare in II generazione filiale (F2).

II) La seconda legge di Mendel o legge della segregazione, afferma che le due copie di un gene (alleli) si separano durante la formazione dei gameti; ogni gamete pertanto ne contiene solo una.

III) La terza legge di Mendel o legge dell'assortimento indipendente, afferma che durante la formazione dei gameti, geni diversi si distribuiscono l'uno indipendentemente dall'altro. Oggi sappiamo che tale legge vale sempre per geni collocati su cromosomi distinti (ossia per gli alleli) mentre non è sempre valida per geni presenti sullo stesso



cromosoma.

Nomenclatura

☐ Razza/linea pura: discendenza che presenta lo stesso carattere in tutte le generazioni (la riproduzione sessuale fornisce lo stesso risultato di quella asessuale).

☐ Ibrido: da genitori che presentano forme diverse (alleli diversi) per lo stesso carattere.

☐ Carattere dominante: quello che si manifesta impedendo la comparsa dell'altro che rappresenta quindi il carattere recessivo: la maggior parte delle malattie genetiche umane è causata da alleli recessivi (es. anemia falciforme).

☐ Generazione filiale: derivante dall'incrocio di due diverse linee pure.

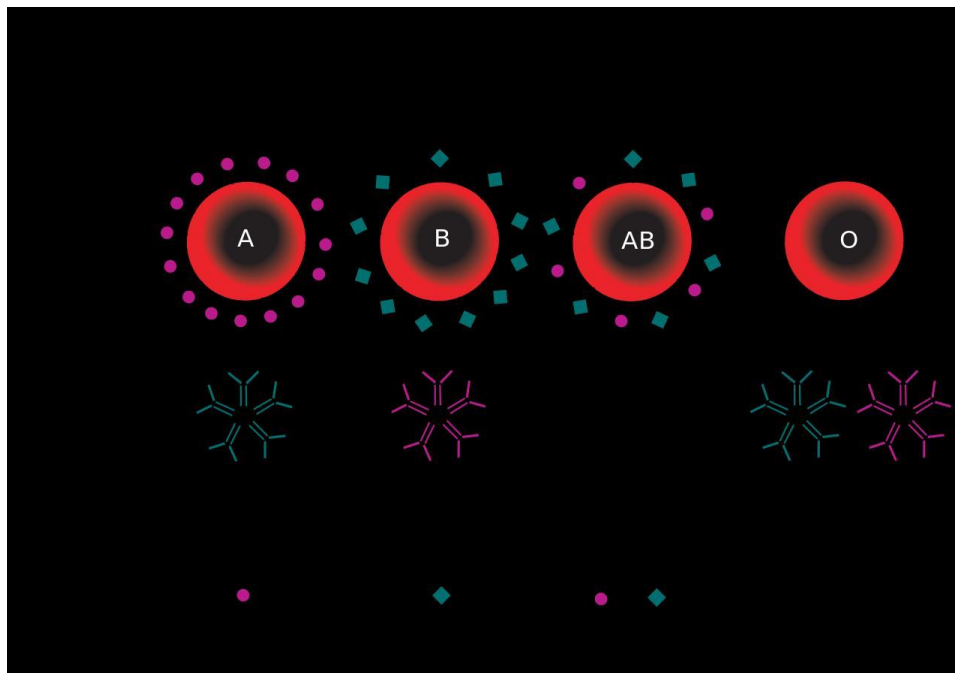
Il termine omozigote si riferisce quindi a un gene in cui l'informazione riportata, che determina il fenotipo, dall'allele materno è identica a quella paterna ossia razza pura. Negli eterozigoti invece il contributo dell'allele materno e paterno è diverso (fenotipi differenti) e la determinazione fenotipica è correlata ai concetti di dominanza e recessività genetica oltre ad altri fattori quali l'interazione genotipo-ambiente.

In accordo con le leggi di Mendel:

Si parla di dominanza incompleta quando nessuno dei due alleli per un carattere risulta dominante sull'altro pertanto l'eterozigote può presentare un fenotipo intermedio (qualitativamente e/o quantitativamente) rispetto a quello dei 2 genitori. Nelle generazioni successive ricompaiono i caratteri dei genitori (secondo le leggi di Mendel).

Si parla di codominanza quando l'eterozigote manifesta i tratti fenotipici di un carattere di entrambi i genitori (tutti e due gli alleli di un locus manifestano il proprio fenotipo).

Un esempio è il sistema ABO dei gruppi sanguigni che rappresenta anche un caso di poliallelia o allelia multipla in cui a uno stesso locus genico corrispondono più di 2 alleli. Nel caso dei gruppi sanguigni i 3 diversi alleli determinano gli antigeni presenti sulla superficie dei globuli rossi. La combinazione di questi 3 alleli produce 4 diversi fenotipi nella popolazione: A, B, O, AB.



Negli organismi diploidi dovrebbe esistere solo una coppia di alleli per ogni gene; in realtà è possibile che ve ne siano di più grazie alle mutazioni genetiche, che possono creare una nuova versione di un allele preesistente.

Al contrario la pleiotropia risulta essere un ampliamento dei principi di Mendel ed evidenzia la capacità di un singolo allele di influenzare più fenotipi diversi. Diverse malattie umane, caratterizzate da quadro clinico complesso (es. fenilchetonuria), trovano origine in un gene pleiotropico.

Inoltre oggi sappiamo che non sono solo i due alleli di uno stesso gene che interagiscono fra di loro bensì anche due o più geni diversi. L'eredità poligenica infatti indica la situazione in cui uno stesso carattere fenotipico è influenzato da più geni risultandone l'espressione sommativa, per questo lo si definisce carattere poligenico; ne sono esempi molti caratteri umani quali il colore della pelle, l'altezza, l'iride degli occhi.

Secondo la concezione di Morgan (Nobel per la fisiologia e medicina nel 1933) tramite questi meccanismi le specie acquisiscono un'ampia gamma di variazioni individuali restando allo stesso tempo unitarie. L'ambiente esercita una pressione selettiva sulla adattabilità delle caratteristiche alternative (alleli).

Dark matter e paradossi della genomica

Si è stimato che circa l'1 - 5% delle 3×10^9 pb (paia di basi) che costituiscono il patrimonio

genetico aploide codifica per proteine. Oggi sappiamo che quanto maggiore è la complessità di un organismo tanto minore è la sua densità genica. Più che il numero di cromosomi, geni o basi, è il genoma non codificante, la cosiddetta dark matter della genomica, che conta per la sua essenziale funzione nei processi di interazione e di regolazione.

I tre paradossi della genomica:

- 1) Paradosso C (enigma del valore C): la complessità di un organismo non è correlata alla grandezza del suo genoma;
- 2) Paradosso K: la complessità di un organismo non è correlata al numero dei suoi cromosomi;
- 3) Paradosso N: la complessità di un organismo non è correlata al numero dei suoi geni.

Eucromatina ed eterocromatina

Oltre alle proteine istoniche la cromatina presenta le proteine regolatrici (sensibili a segnali cellulari e ormonali, che provocano la separazione degli istoni e la conseguente distensione del filamento, in determinate zone, permettendo alla RNA-Polimerasi di leggere e trascrivere la sequenza di nucleotidi per la sintesi proteica. Tale stato “aperto” della cromatina si definisce eucromatina mentre con eterocromatina si identifica il suo stato “chiuso” in cui la deacetilazione delle code istoniche favorirebbe il legame delle proteine Sir (Silent Information Regulator), al nucleosoma. Durante le fasi di crescita cellulare la maggior parte della cromatina si trova sotto forma di eucromatina.

Esistono zone del DNA, quali a es. i centromeri e i telomeri, che non contengono geni (non codificanti) e si trovano sempre in forma di eterocromatina definita eterocromatina costitutiva.

L’eterocromatina facoltativa riguarda invece porzioni di DNA codificanti e solo temporaneamente silenziate (es. in alcune cellule in base ai tipi di tessuto oppure a seconda delle fasi dello sviluppo dell'organismo o del ciclo cellulare).

Sofisticati meccanismi di regolazione dell’espressione genica determinano l’attivazione/disattivazione di specifici geni in base al tipo di cellula e a fattori ambientali e fisiologici.

Replicazione del DNA

Attraverso il meccanismo definito replicazione, il DNA c’ può essere duplicato e trasferito alle cellule figlie tramandando così le informazioni vitali di generazione in generazione. DuLa

replicazione del DNA può comportare degli errori e l'informazione può quindi essere trasferita leggermente modificata.

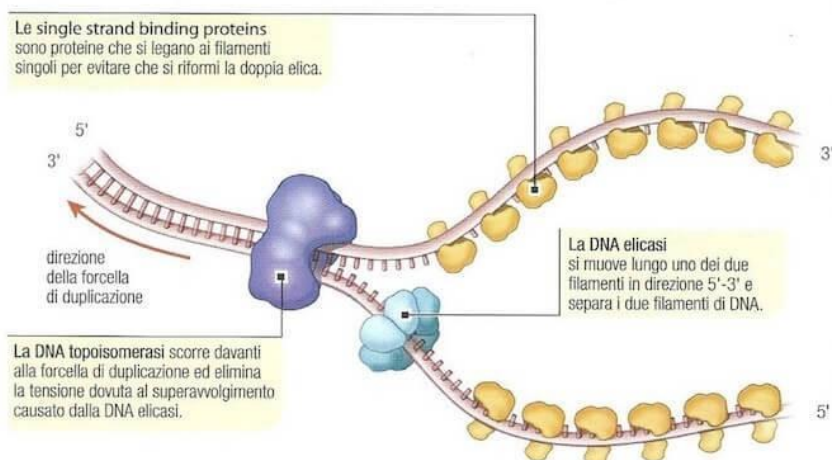
Nella maggioranza dei casi tali modifiche non comportano cambiamenti nell'organismo o, qualora avvengano, risultano incompatibili con la vita o con la capacità riproduttiva dell'individuo e quindi scompaiono al termine della generazione che le ha sviluppate.

Modifiche che invece apportano nuovi caratteri possono rientrare a far parte del pool genico di una popolazione e, qualora al mutare delle condizioni ambientali rappresentassero un vantaggio, selezionerebbero gli individui che le possiedono a scapito degli altri e ciò sarebbe alla base dell'evoluzione.

La duplicazione del DNA è semiconservativa: a ogni ciclo di replicazione le molecole di DNA figlie contengono un filamento vecchio e uno nuovo.

La duplicazione della doppia elica di DNA richiede innanzitutto che i due filamenti (dsDNA double-stranded DNA) vengano svolti e separati in due filamenti singoli (ssDNA single-stranded DNA) rompendo i deboli legami a idrogeno esistenti tra le coppie di basi azotate complementari. Tale processo viene definito denaturazione del DNA (DNA melting) e avviene per opera dell'enzima DNA-elicasi a partire dalla regione detta forca (o forcella) di replicazione.

Gli elementi indispensabili all'avvio della duplicazione di DNA, definiti replisoma o sistema del DNA, sono: DNA elicasi, DNA topoisomerasi (DNA-girasi), proteine SSB (single strand binding proteins).



Il DNA eucariotico viene duplicato in poche ore grazie al fatto che esistono più origini di

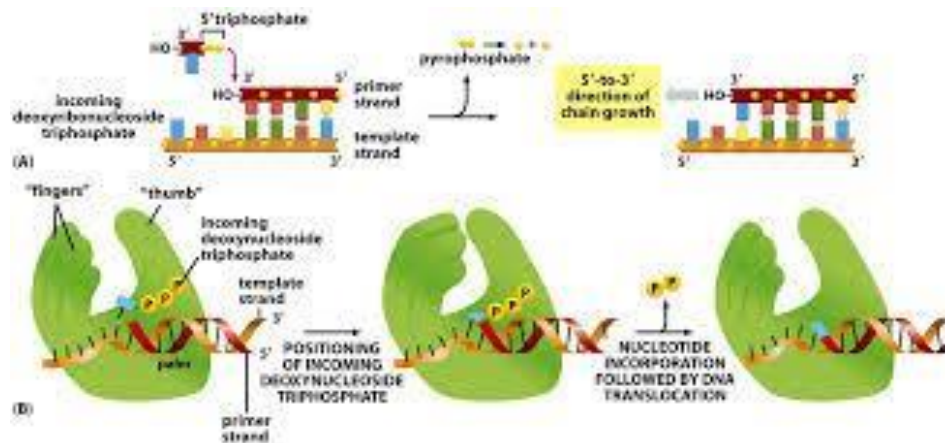
replicazione. In ogni origine vengono organizzate due forche che procedono in direzione opposta; ciò accade anche nelle cellule procariote tipiche, come *Escherichia coli* (in cui il DNA è organizzato in un'unica molecola circolare) dove però l'origine di replicazione, chiamata *oriC*, è unica e in essa si assemblano due forche di replicazione che procedono in direzione opposta fino a incontrarsi in una regione di terminazione, pressoché opposta a *oriC*, detta *terC* (durata duplicazione del DNA batterico circa 40 minuti).

Il tratto di DNA compreso fra un'origine e le due terminazioni della replicazione, cioè i punti in cui le forche di replicazione adiacenti si fondono, rappresenta l'unità di replicazione (contenente tutti i geni che codificano per i polipeptidi atti alla sua autoreplicazione) e viene chiamata replicone.

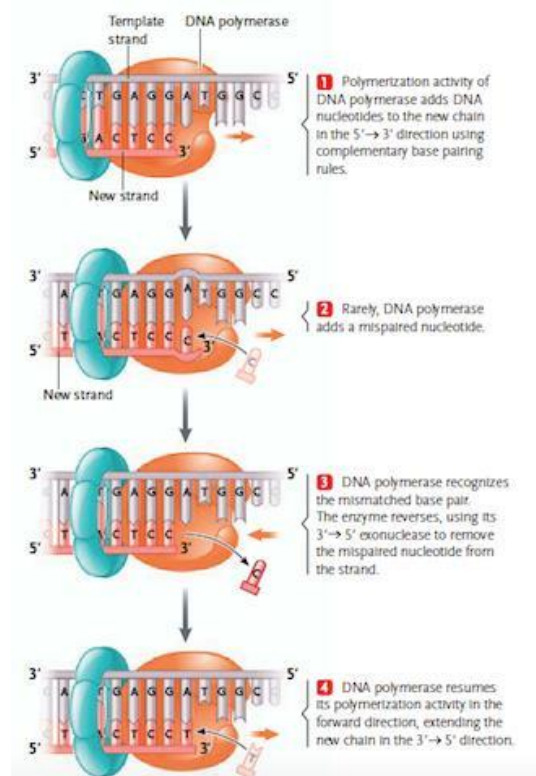
Sintesi del DNA

L'enzima DNA polimerasi I DNA dipendente è in grado di allungare in direzione 5'-3' un tratto di acido nucleico preesistente mediante l'aggiunta di deossinucleotidi rispettando la complementarietà delle basi azotate rispetto a quelle dello stampo. La presenza di quest'ultimo si rende necessaria al fine di evitare sintesi di DNA con sequenze casuali. Pertanto, una volta avvenuta la separazione dei due filamenti, l'enzima primasi (una RNA polimerasi) crea un piccolo tratto di RNA, detto primer o innesco, che viene allungato dalla DNA polimerasi. Quest'ultima utilizza nucleosidi trifosfati (dNTP, deossinucleosidi trifosfato) come substrati: il rilascio di pirofosfato (PPi) e la successiva idrolisi in due gruppi fosfato liberi, in seguito alla formazione del legame fosfodiesterico col 3'-OH dell'ultimo nucleotide del filamento in crescita, genera l'energia indispensabile ad attuare la polimerizzazione.

La struttura della DNA polimerasi ricorda una mano destra parzialmente chiusa che accoglie nel suo palmo il complesso innesco-stampo.



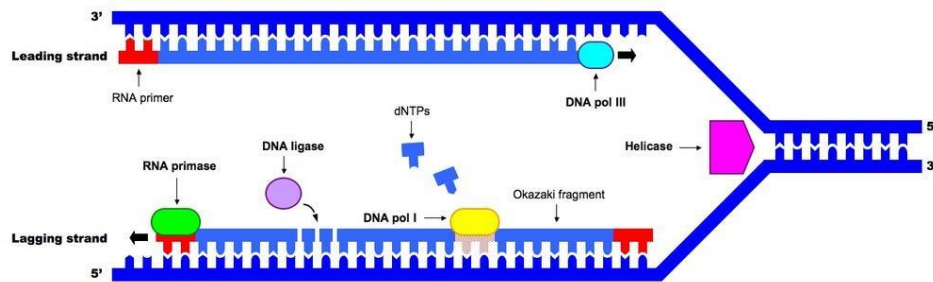
La DNA polimerasi inoltre rileva appaiamenti scorretti e rimuove i nucleotidi errati grazie a un'attività esonucleasica 3'-5' (così definita in quanto la rimozione dei nucleotidi, tramite rottura dei legami fosfodiesterici, avviene a partire da un'estremità), definita correttore di bozze (proofreading).



Poiché, come detto, la DNA polimerasi polimerizza in direzione 5'-3', uno dei due filamenti viene sintetizzato in modo continuo (leading strand) a partire da un unico primer, mentre quello con orientamento opposto in modo discontinuo (lagging strand) producendo dei frammenti di DNA (frammenti di Okazaki) composti da 1000-2000 nucleotidi nei procarioti, 100-200 negli eucarioti. La formazione dei legami fosfodiesterici di questi frammenti è realizzato dall'enzima



DNA ligasi.

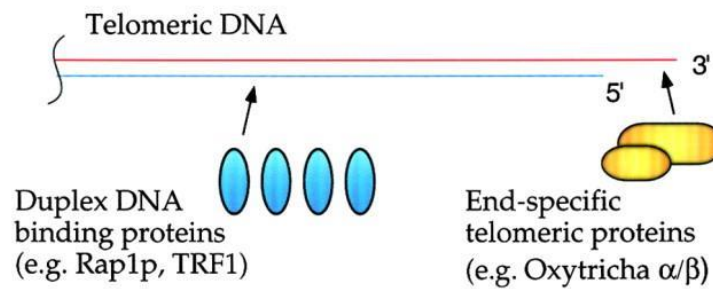


L'enzima RNasi H provvede a eliminare tutti i primer insieme a una polimerasi alternative che provvedono anche a colmare i vuoti rimasti.

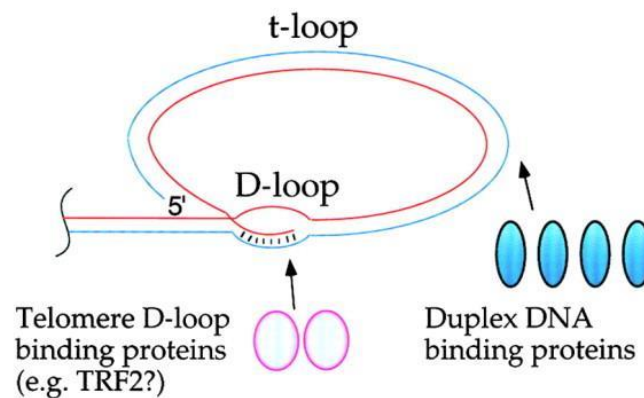
I telomeri costituiscono le parti terminali dei cromosomi e svolgono un ruolo protettivo di fondamentale importanza. Essi sono rappresentati da sequenze 5'-TTAGGG-3' (ripetute circa 2.500 volte nell'uomo), prima di questa sequenza vi sono ripetizioni degenerate e altre sequenze ripetute mentre la parte terminale è costituita da un singolo filamento (di ca. 300 basi) di DNA 3' - protrudente che si ripiega invadendo la regione a doppia elica formando il cosiddetto T-loop. Il T-loop viene tenuto assieme da un insieme di proteine (TRF1, TRF2, POT1, TIN1, TIN2 ecc.) denominato complesso Shelterin. Grazie a tali strutture, i telomeri formano "cappucci" che proteggono le estremità del DNA dall'attacco di vari enzimi (esonucleasi, proteine coinvolte nella riparazione ecc.) e da altre attività cellulari potenzialmente dannose. Durante la divisione cellulare essi vanno incontro ad accorciamento. Un altro fattore capace di comportare l'accorciamento dei telomeri è lo stress ossidativo attuato dai radicali liberi. Un tempo si pensava che i telomeri non presentassero alcun ruolo codificante ma oggi sappiamo che producono trascritti denominati "terra" che sembrano implicati nella loro stessa regolazione.



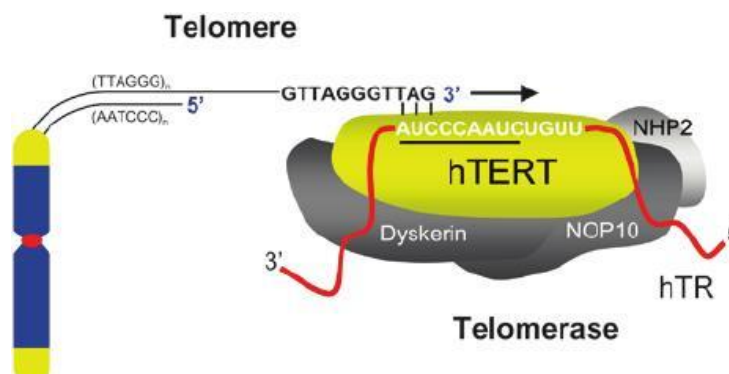
A. The classical view



B. The new view



Il mantenimento dei telomeri è assicurato dalla telomerasi, un complesso proteino-RNA formata principalmente dall'enzima trascrittasi inversa (hTERT) più una frazione ribonucleo-proteica (TER o hTR) contiene uno stampo, costituito da un breve tratto di RNA, che utilizza per creare il DNA ricco di Guanina del telomero. L'insieme proteico afferra l'estremità del telomero portando con sé la telomerasi in modo da permetterle di aggiungere le unità ripetenti.

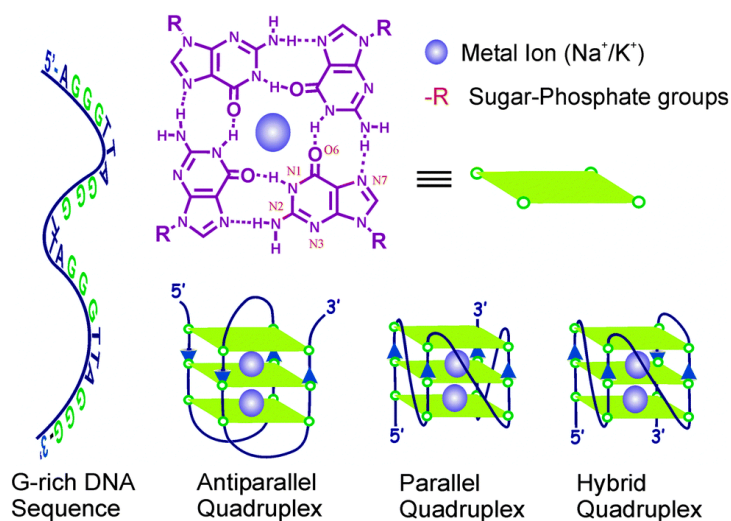


Nei mammiferi la telomerasi svolge la sua massima attività in cellule embrionali, staminali, linfocitiche e cancerose (almeno nell'85% dei tumori). Dopo la nascita è molto meno attiva e così i telomeri si accorciano con l'età. Se i telomeri divengono troppo corti possono essere

identificati come danni del DNA smettendo di crescere (senescenza cellulare) o avviando l'apoptosi cellulare. L'assenza dei telomeri comporta anche una maggiore "collosità" degli acidi nucleici che tenderanno così a compattarsi in maniera anomala.

L'invecchiamento (e lo stato ossidativo) è quindi sinonimo di accorciamento (erosione) dei telomeri. In teoria l'attivazione dell'enzima telomerasi può rendere la cellula eterna; negli animali a crescita continua (che non "invecchiano" mai), come l'aragosta, la telomerasi risulta sempre attiva. Un eccesso di attività della telomerasi può però causare gravi problemi (es. tumori).

La sequenza ricca di guanina dei telomeri può formare una struttura secondaria planare molto particolare in cui quattro guanine poste in quattro punti diversi si uniscono tramite legami a idrogeno, definita quartetto o tetrade di guanine (G4-DNA). Due o più tetradi di guanine possono a loro volta impilarsi l'uno sull'altro per formare un quadruplex G. Tali strutture sono in grado di ridurre l'attività della telomerasi e la loro attività nei processi genetici di base sono oggetto di ricerca oltre che nei telomeri, nella regolazione genica e in genomica funzionale.



Riduzione dello stress, eliminazione del fumo di sigaretta, sana attività fisica e alimentazione, riduzione delle calorie rappresentano stimoli organici a ripristinare una più fisiologica lunghezza telomerica.

RNA

RNA (RiboNucleic Acid) è la macromolecola biologica presente nel nucleo e nel citoplasma presentante un ruolo centrale nella produzione o sintesi delle proteine a partire da una molecola di DNA.

La struttura del RNA è di norma a elica singola (fanno eccezione i dsRNA descritti in seguito) ossia è un unico filamento di nucleotidi tenuta insieme dai legami fosfoesterei da cui “pendono” le varie basi azotate secondo una sequenza prefissata nel DNA nucleare. tale filamento può trovarsi in forma distesa o ripiegata su se stessa tramite legami idrogeno tra alcune basi azotate. La modalità con cui si formano questi legami a idrogeno è infatti stabilita dalla cosiddetta “complementarietà delle basi azotate” (determinata dalla posizione dei vari gruppi OH e NH₂): adenina – uracile (2 legami), guanina – citosina (3 legami).

Esistono diverse classi di RNA, tutti trascritti nel nucleo a partire dal DNA, di cui le principali:

mRNA: messaggero

tRNA: di trasferimento

rRNA: ribosomiale

miRNA (micro) e siRNA (small/short interfering): regolazione dell'espressione genica (descritti nel capitolo “Epigenetica”).

Gli RNA messaggeri (mRNA) vengono trascritti dai geni che devono essere espressi ossia tradotti in specifiche proteine. Pertanto gli mRNA rappresentano la copia del gene, che può essere trasportata fuori dal nucleo raggiungendo il citoplasma, che fornisce le istruzioni per la sintesi proteica nei ribosomi.

L'mRNA trascritto primario (pre-mRNA) subisce nel nucleo tre processi di maturazione prima di essere trasportato nel citoplasma:

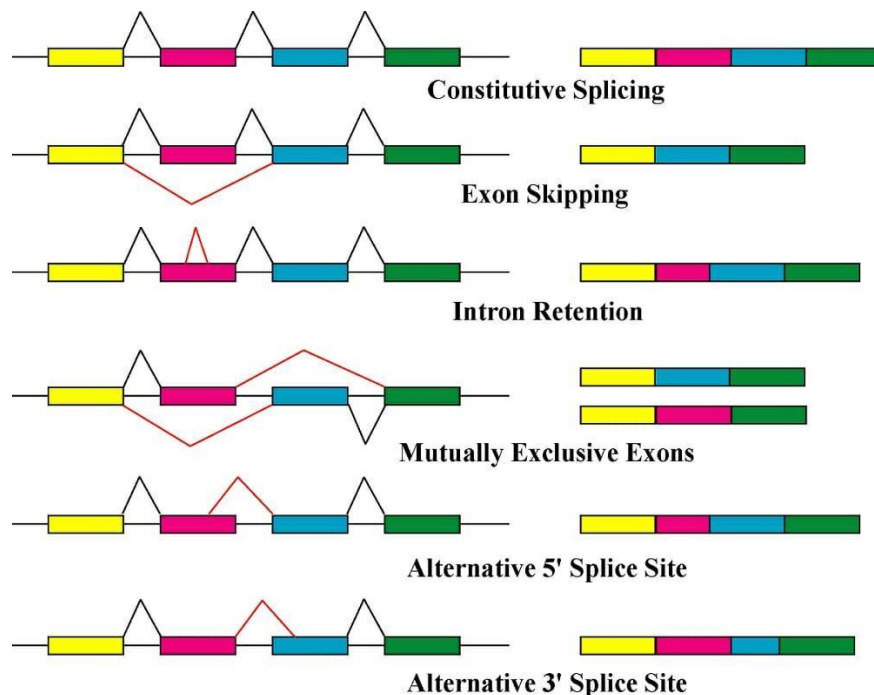
- 1) Capping al 5' (cappuccio in 5' o 5' cap), inserimento di un nucleotide speciale, costituito da guanina, 7-metil-guanosina e due gruppimetilici (CH₃), all'estremità 5' che avviene solo nel nucleo (pertanto l'mRNA di mitocondri e cloroplasti non viene rivestito) in maniera altamente regolata, assicura la stabilità del RNA messaggero mentre avviene la traduzione e riveste un ruolo nell'iniziarla;
- 2) Poliadenilazione al 3'. aggiunta di una coda poli adenilica - poli(A) di circa 50-250 adenine (non presente negli mRNA che codificano per gli Istoni) la cui presenza impedisce l'azione delle esonucleasi 3'-5' e consente la separazione del mRNA dai molto più numerosi rRNA e tRNAI;
- 3) Splicing, rimozione delle parti non codificanti (introni) e legame enzimatici delle zone codificanti (esoni) così da formare l'mRNA definitivo.



Oltre allo splicing “canonico” detto costitutivo (constitutive) esiste lo splicing alternativo che porta alla produzione di RNA messaggeri maturi diversi, a partire da uno stesso pre-mRNA, unendo in maniera diversa gli esoni. In tal modo si ha sintesi di proteine diverse per funzione, localizzazione e altre proprietà.

Sono stati identificati 5 tipi diversi di Splicing alternativo:

- 1) Salto dell'esone, l'esone viene eliminato dal trascritto primario (sembra essere il meccanismo più comune nei mammiferi);
- 2) Introne trattenuto, a causa del non riconoscimento dei siti di taglio col rischio di sintesi di una proteina tronca e/o non funzionale.
- 3) Esone mutuamente esclusivo, solo uno dei due esoni viene mantenuto nell'mRNA maturo;
- 4) Sito di taglio alternativo 5', viene usato un sito di taglio alternativo al 5' cambiando l'estremità 3' dell'esone a monte;
- 5) Sito di taglio alternativo 3', viene usato un sito di taglio al 3' alternativo cambiando l'estremità 5' dell'esone a valle;



Le sequenze che permettono il riconoscimento di siti di Splicing sono riconosciute da proteine SR (ricche in arginina e serina) e vengono chiamate:

- Exotic Splicing Enhancers (ESE) se presenti su esoni;
- Intronic Splicing Enhancers (ISE) presenti su introni.

Le sequenze invece che mascherano i siti di Splicing sono riconosciute dalle proteine hnRNP (Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins) e vengono definite:

- Exotic Silencers (ESS) se presenti su esoni;
- Intronic Silencers (ISS) presenti su introni.

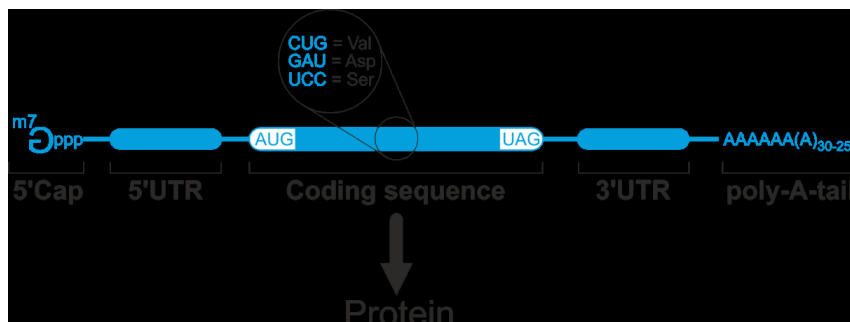
La possibilità che avvenga uno Splicing alternativo dipende dalla presenza nella sequenza del RNA di ESE, ISE, ESS, ISS e dalla disponibilità delle relative proteine di legame.

Pertanto ogni gene e quindi ogni mRNA che viene trascritto contiene l'informazione per un'unica proteina ma da uno stesso pre-mRNA si possono ottenere diversi mRNA biologicamente attivi.

Un esempio nei mammiferi sono le cinque diverse forme di tropomiosina, tutte derivanti dallo stesso pre-mRNA, corrispondenti ai rispettivi tessuti: muscolare striato, muscolare liscio, connettivo, del fegato e del cervello.

La struttura di un mRNA maturo (biologicamente attivo) si compone di tre parti principali:

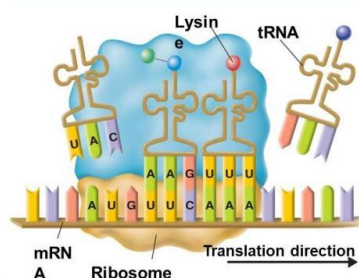
- 1) sequenza leader o "regione al 5' non tradotta" (5' Untranslated Region - 5' UTR) in posizione 5', di lunghezza variabile ma costante per un dato tipo di mRNA, non codifica per un amminoacido ma contiene l'informazione indispensabile al ribosoma per orientarsi e cominciare la sintesi proteica (traduzione);
- 2) sequenza codificante del mRNA, segue la sequenza leader, determina nella traduzione la sequenza amminoacidica di una proteina, la sua lunghezza varia in funzione di quella della relativa proteina;
- 3) sequenza di coda o "sequenza al 3' non tradotta" (3' UTR), presente subito dopo la sequenza codificante e costituisce la porzione terminale in 3' della molecola di mRNA, ha una lunghezza variabile a seconda dell'mRNA.



Il codone è l'unità informazionale del mRNA costituita da una specifica tripletta di nucleotidi

che, all'interno dei ribosomi, traduce il codice genetico in codice proteico per uno specifico amminoacido nell'ambito appunto della sintesi delle proteine. Uno stesso amminoacido viene codificato da vari codoni. Esistono infatti 61 diversi tRNA (61 differenti codoni) pertanto, come già detto, si definisce il codice genetico come "degenerato" o ridondante. Ogni mRNA però risulta specifica per una sola proteina.

I tRNA (RNA transfer o di trasporto) si ottengono tramite processamento di pre-tRNA, contenenti una sequenza leader in 5' (sequenza situata fra l'estremità 5' e il codone di inizio, in



genere non codifica per proteine ma per il peptide leader con funzione regolativa) e una sequenza di coda

in 3' (entrambe eliminate per via enzimatica). I tRNA maturi ossia biologicamente attivi sono corte catene di RNA (di circa 70-90 nucleotidi) trascritti da specifici geni che, una volta sintetizzati, si ripiegano su se stessi assumendo una tipica forma a trifoglio. Ogni tRNA si

lega nel citoplasma a un amminoacido per poi cederlo poi al ribosoma così che quest'ultimo venga incorporato nella catena polipeptidica. Il tRNA presenta una regione con tre nucleotidi, definita anticodone, che riconosce il corrispondente codone del mRNA tramite l'appaiamento di basi complementari. Il tRNA presenta in 3' un sito di attacco per l'amminoacido specifico di una catena polipeptidica in crescita che trasferisce al sito ribosomiale della sintesi proteica. Ogni molecola di tRNA può legarsi ad un solo tipo di amminoacido. Il tRNA rappresenta in cellule procarioti ed eucarioti il 10-15% del RNA totale.

Gli rRNA, 18S, 28S, 5.8S e 5S, sono una famiglia di piccole sequenze di RNA che insieme a proteine specifiche costituiscono la subunità piccola e grande dei ribosomi. La subunità piccola riconosce l'mRNA e si lega a esso, la subunità grande presenta tre siti funzionali:

una importante regione enzimatica che catalizza l'aggiunta di amminoacidi alla catena

polipeptidica nascente, mediante formazione di legame peptidico;

i siti P e A che si legano al tRNA, permettendo quindi di tradurre l'informazione portata dall'RNA messaggero nella corretta sequenza di amminoacidi.

Anche l'rRNA matura deriva da un pre-rRNA contenente sequenze spaziatrici interne (ITS) ed esterne ossi alle estremità (ETS) che vengono rimosse enzimaticamente.

Trascrizione del DNA

La trascrizione rappresenta il processo, simile in cellule eucariote e procariote, di copiatura di sequenze di basi di DNA in sequenze di basi di RNA.

Un breve tratto della doppia elica di DNA vicino al gene viene denaturata e grazie all'azione dell'enzima RNA polimerasi viene sintetizzata (trascritta) una molecola di RNA in direzione 5'-3' dallo stampo di DNA in direzione opposta (3'-5'). Solitamente viene trascritta solo una delle due eliche di DNA, chiamata appunto elica stampo (quella complementare è detta "elica senso").

RNA polimerasi è un enzima appartenente alla classe delle transferasi di cui si conosce ancora relativamente poco. Negli eucarioti esistono 3 diversi tipi di RNA polimerasi:

RNA polimerasi I localizzata nel nucleolo, trascrive rRNA 28S, 18S, 5,8S;

RNA polimerasi II, localizzata nel nucleo, trascrive mRNA e alcuni snRNA;

RNA polimerasi III, localizzata nel nucleo, trascrive rRNA 5S, tRNA e snRNA non sintetizzati dalla RNA polimerasi II.

La polimerizzazione del RNA è molto simile a quella del DNA, l'RNA polimerasi però per iniziare non necessita di un primer ma non ha capacità di correzione di bozza. La trascrizione sottosta a vari tipi di regolazione.

Solo la trascrizione dei geni strutturali in pre-mRNA (poi processato in mRNA maturo) viene tradotta nella sintesi proteica. Tali geni negli eucarioti contengono sia esoni sia introni e pertanto vengono detti frammentati o interrotti. I geni non strutturali esprimono l'informazione anche per strutture non proteiche come alcuni RNA (rRNA, tRNA e snRNA).

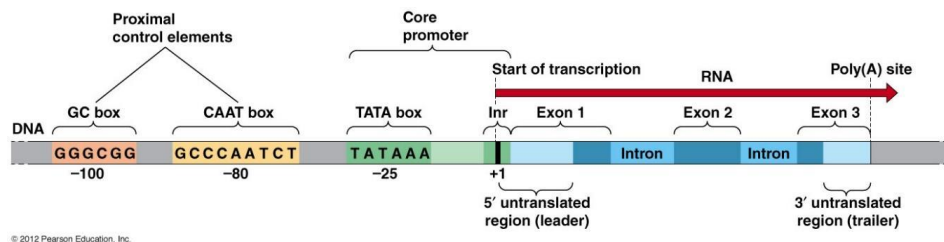
Un gene che codifica per una proteina possiede molti geni regolatori, detti elementi, localizzati a monte e a valle del punto di inizio della trascrizione. Gli elementi regolatori si dividono in promoter, enhancer (attivano la trascrizione) e silencer (reprimono la trascrizione),

Geni Promoter: La regione immediatamente adiacente al sito di inizio della trascrizione è

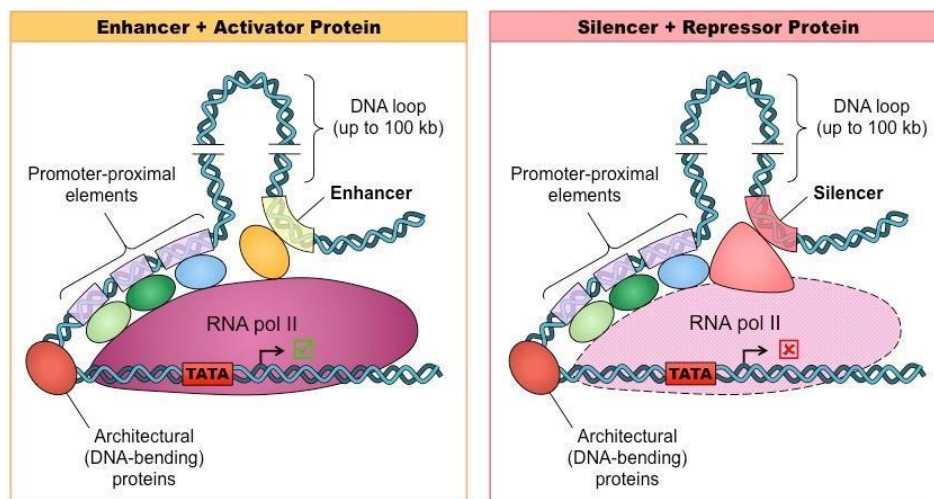
organizzata in una serie di elementi o moduli regolatori con sequenza canonica (ovvero comune a tutti gli organismi) detti promotori ed è essa stessa definita Promotore.

Partendo da quello più vicino al sito di inizio di trascrizione gli elementi promotori sono:

- TATA box o Goldberg-Hogness box
- CAAT box
- GC box



I Geni Enhancer (elementi di intensificazione) e Silencer (silenzianti) sono necessari per ottenere rispettivamente il massimo o il minimo grado di trascrizione di un dato gene. Essi si legano al promotore e il loro effetto si manifesta in entrambi gli orientamenti anche a notevole distanza dal gene. Il loro funzionamento è poco chiaro, si sa che quando le proteine regolative si legano agli enhancer o silencer il DNA forma una struttura a occhiello (loop) in modo da favorire le interazioni con i fattori di trascrizione e di regolazione.



Gli elementi regolatori legano infatti:

fattori di trascrizione o Transcription Factor TF (proteine richieste per l'inizio della trascrizione dalla RNA polimerasi);

fattori di regolazione (proteine coinvolte nella attivazione o repressione della trascrizione di un gene).

RNA polimerasi per riconoscere il proprio promotore necessita di specifici Trascrizione Factori TF i quali, in base al RNA polimerasi con cui cooperano, vengono definiti:

- TFI: RNA polimerasi I
- TF II: RNA polimerasi II
- TF III: RNA polimerasi III

Per ogni RNA polimerasi vengono coinvolti diversi fattori trascrizionali, indicati con una successione di lettere ossia TF A, B, C ecc.

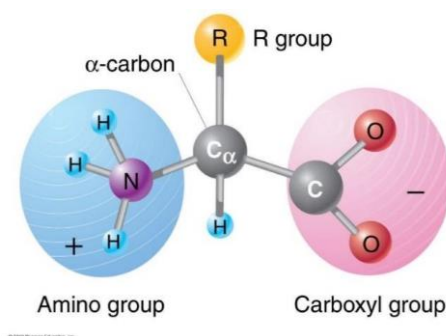
Come già affermato, una volta che mRNA è maturo (biologicamente attivo) codifica la sintesi di una proteina.

Proteine

Le proteine sono composti organici azotati ad alto peso molecolare molto complessi, formate da una o più subunità macromolecolari (polipeptidi), a loro volta costituiti da subunità minori (amminoacidi).

Gli amminoacidi sono implicati praticamente a 360° nelle funzioni organiche, sono composti organici la cui struttura di base è un atomo di carbonio centrale (carbonio alfa) al quale si legano:

- un gruppo aminico (NH_2),
- un gruppo carbossilico (COOH),
- un atomo di idrogeno (H),
- un gruppo variabile (R) che determina le caratteristiche di ogni singolo amminoacido.



Ai 20 amminoacidi proteinogenici "canonici" vanno aggiunti tre scoperti solo recentemente (selenocisteina, pirrolisina e N-formilmetionina).

Il nostro organismo non riesce a sintetizzare alcuni degli amminoacidi che vengono perciò definiti "amminoacidi essenziali (AAE – Amino Acid Enhanced) e devono pertanto essere

introdotti con gli alimenti. Nello specifico essi sono i seguenti otto:

Lisina: presente soprattutto in legumi, latticini, manzo, serve alla formazione della carnitina e della vitamina B3, partecipa alla creazione dell'ormone della crescita (GH) e alla fissazione del calcio nelle ossa, inoltre è fondamentale nella produzione di anticorpi ed è parte costituente della cheratina dei capelli.

Triptofano: si trova in legumi, latticini, uova, carne, pesce, cioccolato, aminoacido chiave nella sintesi proteica e di sostanze fondamentali come il neurotrasmettitore serotonina che può essere convertito in melatonina (fondamentale per la corretta regolazione del ritmo sonno-veglia). Infine circa il 3.3% del triptofano alimentare viene destinato alla sintesi di niacina (nota anche come Vitamina PP) utile, fra le altre cose, per la conversione dei nutrienti in energia.

Fenilalanina: in cereali integrali, carne, pesce, uova, è coinvolta in tutti i processi metabolici, a es. la produzione di dopamina (neurotrasmettitore fondamentale per la regolazione della frequenza cardiaca, del sonno e dell'umore) e degli ormoni tiroidei. Dalla fenilalanina deriva l'amminoacido tirosina (per questo detto semi-essenziale),

Treonina: in legumi, frutta secca, funghi, uovo, prodotti caseari, carne e pesce (merluzzo, sardine), è un costituente degli anticorpi e oltre che nell'ambito del sistema immunitario riveste un ruolo importante nelle funzioni depurative di fegato e reni, è un precursore di collagene ed elastina e, in caso di attività sportive, può essere utile per prevenire stiramenti muscolari e traumi dei tendini.

Metionina: in cereali e altri semi, latticini, albume d'uovo, pesce (merluzzo), proteine della soia (ne sono poveri i legumi e la maggior parte di frutta e verdura), è alla base della produzione di carnitina, cisteina, creatina, taurina e vitamina B12, aumenta le capacità depurative e svolge azione lipolitica a livello epatico. L'amminoacido cisteina viene sintetizzato a partire dalla metionina (e viene pertanto definito semi-essenziale). Stesso discorso vale per N-formilmetionina considerato il 23esimo amminoacido e anch'esso derivato dalla metionina.

Leucina: in cereali, legumi, carne, pesce, uova, latticini, svolge un ruolo importante a livello muscolare in quanto ne accresce la resistenza, stimola la sintesi proteica (evitando il catabolismo muscolare durante l'attività sportiva intensa o di lunga durata) e supporta il metabolismo nei periodi di digiuno.

Isoleucina: in legumi, semi, frutta secca, carne, pesce, uova, è strettamente legata al

fabbisogno di glucosio, viene utilizzata come fonte alternativa ad esso in caso di ipoglicemia avanzata (dovuta a es. a intensa attività fisica), è in grado di stimolare la produzione di insulina e risulta pertanto utile in soggetti diabetici.

Valina: in cereali integrali, legumi, albume d'uovo, funghi, alga Spirulina, latticini e prodotti caseari (soprattutto il Parmigiano), carne, pesce, svolge importanti funzioni di ricostruzione dei tessuti, soprattutto muscolari, motivo per cui risulta particolarmente adatta nell'impiego sportivo, il suo rapido assorbimento intestinale la rende quasi immediatamente biodisponibile.

Istidina (nono aminoacido considerato essenziali per i soggetti in crescita): in carne, pesce, frutti di mare, albume d'uovo, proteine della soia, precursore dell'istamina ed è pertanto indicato nel trattamento di allergie, infiammazioni e patologie autoimmuni come l'artrite reumatoide, è inoltre un componente della carnosina che ha proprietà antiossidanti e anti-invecchiamento. Poiché pare intervenga nella dilatazione dei vasi sanguigni trova applicazione anche nell'ambito degli sport di resistenza.

Leucina, Isoleucina e Valina vengono ulteriormente classificati come aminoacidi essenziali ramificati (BCAA – Branched-Chain Amino Acid) per la loro tipica struttura chimica. Trovano ampia applicazione in ambito sportivo in quanto, differentemente dagli altri aminoacidi, essi, dopo essere stati assorbiti nell'intestino tenue, non devono essere metabolizzati dal fegato ma, veicolati dal sangue, vengono captati direttamente dai muscoli, dove possono essere utilizzati per fini plastici (ricostruzione/riparazione, costruzione e accrescimento del tessuto), anticatabolica (favoriscono l'adattamento progressivo del muscolo agli stimoli dell'allenamento contrastando anche la formazione dell'acido lattico) ed energetica.

Due aminoacidi vengono definiti aminoacidi semi-essenziali in quanto l'organismo li sintetizza a partire da aminoacidi essenziali e sono:

Cisteina, sintetizzata a partire dalla metionina, riveste un ruolo importante nei processi di assorbimento delle proteine e della cheratinizzazione. Soggetti con carenza di vitamina B e/o affetti da alcolismo possono manifestarne una carenza. Inoltre sempre dalla metionina deriva quello che viene considerato il 23esimo aminoacido ossia la N-formilmetionina.

Tirosina, sintetizzata a partire dalla fenilalanina, è imprescindibile nella formazione di neurotrasmettitori quali dopamina, adrenalina e noradrenalina (fondamentali per le capacità adattive dell'organismo, soprattutto in situazioni stressogene) ed è coinvolta nella produzione

degli ormoni tiroidei e della melanina.

Si definiscono aminoacidi condizionatamente essenziali in quanto in determinate condizioni fisiopatologiche l'organismo non riesce a sintetizzarle del tutto o in quantità sufficiente e sono i seguenti cinque: arginina, glicina, glutammina, prolina e taurina.

La loro funzione è necessaria al corretto svolgimento delle attività di omeostasi.

Tutti gli altri sono definiti aminoacidi non essenziali poiché l'organismo è sempre in grado di sintetizzarli autonomamente e sono: acido aspartico, acido glutammico, alanina, arginina, asparagina, glicina, glutammina, prolina, serina.

Il nostro organismo infatti ne produce in quantità diverse e variabili in base al proprio fabbisogno. Essi intervengono sostanzialmente nella sintesi proteica con riflessi in innumerevoli funzioni quali a es. memoria, apprendimento, difese immunitarie, anti-invecchiamento precoce.

I 20 amminoacidi standard possono inoltre essere suddivisi in base alle proprietà chimiche ossia alla carica e alla polarità delle loro catene laterali (gruppi R):

neutri apolari: alanina, fenilalanina, glicina, isoleucina, leucina, metionina, prolina, triptofano, valina;

neutri polari: asparagina, glutammina, serina, treonina, cisteina, tirosina;

carichi acidi: aspartato, glutammato;

carichi basici: arginina, istidina, lisina.

In biochimica ci si riferisce più spesso agli L- α -amminoacidi di formula generica

$\text{NH}_2\text{CH(R)COOH}$ in cui il gruppo amminico e carbossilico sono legati allo stesso atomo di carbonio (definito per questo carbonio α) in configurazione stereoisomerica L.

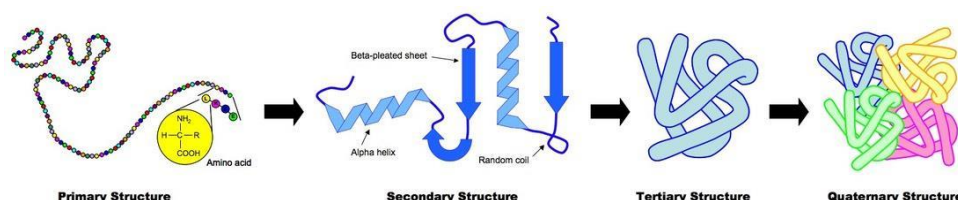
È possibile schematicamente suddividere la complessa struttura molecolare delle proteine in 4 livelli di organizzazione:

- 1) Struttura Primaria, costituita dalla sequenza degli aminoacidi che la compongono- Le strutture primarie sono rette da legami peptidici covalenti, che si vengono a creare durante il processo di traduzione, tra il gruppo carbossilico di un aminoacido e quello aminico dell'aminoacido seguente fino a formare un polipeptide;
- 2) Struttura Secondaria, data dalla disposizione tridimensionale a livello locale del filamento polipeptidico. Le forme più diffuse sono ad Alfa elica (dovuta legami idrogeno all'interno

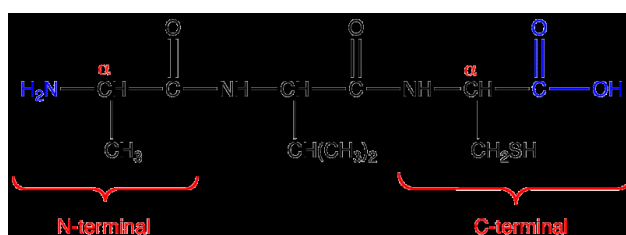
della stessa catena) e quella a Beta foglietto o β -Sheet (dovuta a legami idrogeno tra più filamenti beta adiacenti ossia catene polipeptidiche di 3-10 aminoacidi con conformazione estesa) o segmenti di catena che assumono una forma non stabile.

3) Struttura Terziaria, data dalla struttura tridimensionale globale del filamento. La struttura terziaria è sorretta primariamente da interazioni idrofobiche, da legami idrogeno, interazioni ioniche e ponti disolfuro;

4) Struttura Quaternaria, rappresentazione 3D tipica delle proteine multimeriche, ossia proteine formate da più catene polipeptidiche (subunità) ciascuna con la propria struttura primaria secondaria e terziaria (es. emoglobina formata da due catene alfa e due beta). I legami chimici coinvolti nella formazione della struttura quaternaria sono a idrogeno, forze di Van der Waals (deboli forze intramolecolari fra bipoli) e i ionici.



Le due terminazioni delle catene amminoacidiche sono definite “terminazione carbossilica” (C-terminale) e “terminazione amminica” (N-terminale) e sono basate sulla natura dei gruppi liberi (alfa) delle due estremità.



Traduzione

Ogni tripletta di basi azotate (identificate con una lettera dell'alfabeto) del codice mRNA (codone) specifica un solo aminoacid., Esso viene letto in modo continuo (senza segni di interruzione) in gruppi successivi di tre nucleotidi senza sovrapposizioni. Specifici meccanismi cellulari assicurano che la traduzione inizi nel punto corretto del mRNA. Il codice mRNA contiene infatti dei segnali di inizio (codoni di inizio o consenso) e di fine (codoni di stop o nonsenso) traduzione e quindi sintesi proteica. Tutti i codoni che specificano per aminoacidi vengono denominati codoni consenso, il codone AUG (che specifica per la metionina) è il più

comune codone di inizio della sintesi proteica. Dei 64 codoni esistenti, 61 codificano per gli aminoacidi mentre gli altri tre (UAG o codone Ambra, UAA o codone Ocra, UGA o codone Opale) specificano la fine del processo di traduzione di una catena polipeptidica in quanto non esistono per essi tRNA con l'anticodone appropriato; pertanto vengono denominati codoni stop o nonsenso. In presenza di particolari segmenti di mRNA, il codone UGA e il codone UAG possono codificare rispettivamente la selenocisteina (ventunesimo amminoacido conosciuto) e la pirrolisina, (ventiduesimo amminoacido).

Poiché le possibili combinazioni di triplette sono maggiori rispetto al numero degli aminoacidi, codoni differenti possono codificare per lo stesso amminoacido; ciò conferisce al codice la caratteristica della ridondanza o degenerazione. Il codice è quindi degenerato (ridondante), in quanto a ogni aminoacido corrisponde più di un codone ma secondo schemi precisi es. se in codoni diversi i primi due nucleotidi coincidono mentre il terzo è U o C, essi il più delle volte specificano lo stesso aminoacido. La degenerazione risulta essere un sistema di difesa dalle mutazioni puntiformi qualora esse colpiscano la terza base, in tal caso infatti la sintesi proteica può rimanere intatta.

Al contempo il codice genetico è privo di ambiguità in quanto difficilmente un codone specifica per più di un aminoacido, tranne in rari casi in cui si ha una variazione sito specifica nella traduzione. Ad esempio GUG funge da codone di inizio per la metionina, se però esso si trova in qualsiasi altro punto della sequenza codificante specifica per una valina.

Ciascun amminoacido inoltre è codificato dalle stesse triplette in ogni organismo vivente studiato con piccole eccezioni per protozoi unicellulari e mitocondri (es. l'aminoacido lisina è codificata da AAA o AAG negli mRNA di tutti gli organismi). Il codice è quindi quasi universale.

Un'altra caratteristica del codice genetico è il "vacillamento dell'anticodone" intendendo con ciò che la base al 5' terminale dell'anticodone (complementare alla base al 3' terminale del codone), a differenza delle prime due basi, può appaiarsi con tre basi differenti presenti al 3' del codone. Pertanto esistono 61 codoni consenso che specificano aminoacidi nel mRNA, i quali in teoria potrebbero essere letti da meno di 61 tRNA per via del vacillamento nell'anticodone.



	U	C	A	G	
U	UUU phe	UCU	UAU tyr	UGU cys	U
	UUC	UCC ser	UAC	UGC	C
	UUA leu	UCA	UAA STOP	UGA STOP	A
	UUG	UCG	UAG STOP	UGG trp	G
C	CUU	CCU	CAU his	CGU	U
	CUC leu	CCC pro	CAC	CGC arg	C
	CUA	CCA	CAA gln	CGA	A
	CUG	CCG	CAG	CGG	G
A	AUU	ACU	AAU asn	AGU ser	U
	AUC ile	ACC thr	AAC	AGC	C
	AUA	ACA	AAA lys	AGA arg	A
	AUG met	ACG	AAG	AGG	G
G	GUU	GCU	GAU asp	GGU	U
	GUC val	GCC ala	GAC	GGC gly	C
	GUA	GCA	GAA glu	GGA	A
	GUG	GCG	GAG	GGG	G

La sintesi proteica avviene nei ribosomi, dove il messaggio contenuto in codice nel mRNA viene tradotto in direzione 5'-3' così come viene trascritto; il polipeptide viene sintetizzato a partire dall'estremità N-iniziale e finisce con quella C-terminale.

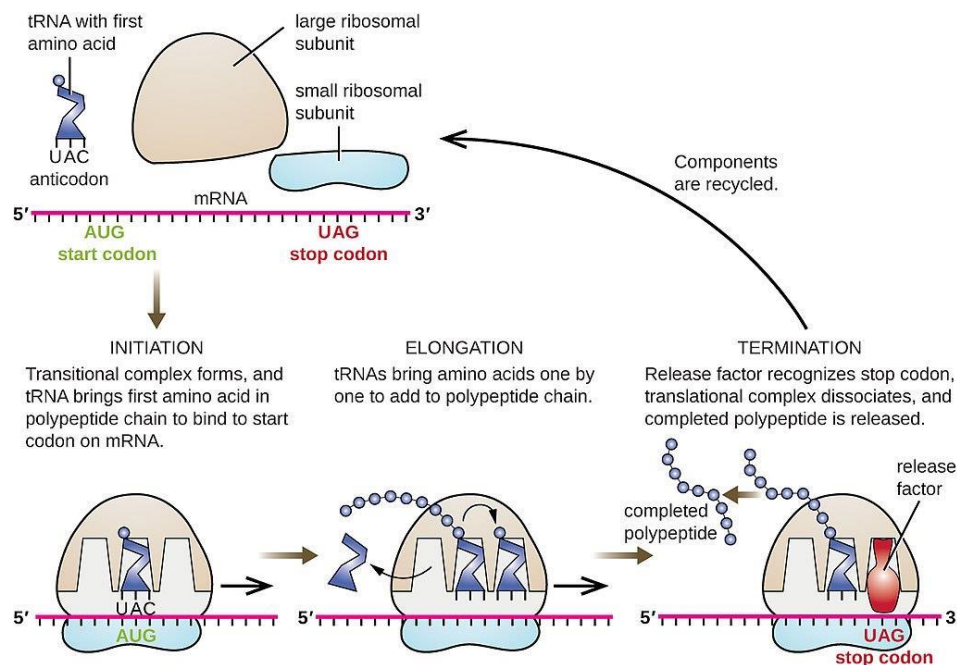
Ogni aminoacido arriva al ribosoma legati in maniera specifica al proprio tRNA, quindi la sequenza corretta di aminoacidi si ottiene grazie al legame specifico tra il codone dell'mRNA e l'anticodone complementare del tRNA. La specificità del riconoscimento del codone risiede nella molecola del tRNA (nel suo anticodone) e non nell'aminoacido da essa trasportato.

Il “caricamento” dell'aminoacido al proprio tRNA a formare una molecola chiamata aminoacil-tRNA (o tRNA carico) richiede energia fornita da ATP e avviene mediante un legame, tra il gruppo carbossilico dell'aminoacido e il gruppo 3'-OH o 2'-OH del ribosio dell'adenina che si trova alla fine di ogni tRNA, catalizzato dall'enzima aminoacil-tRNA sintetasi altamente specifico ossia uno per ogni aminoacido (pertanto vengono commessi errori solo 1 su 10.000-100.000 reazioni).

Dato che la degenerazione del codice è largamente presente, tutti i tRNA specifici per un dato aminoacido devono possedere un sito di riconoscimento comune per l'aminoacil-tRNA sintetasi specifica per quel determinato aminoacido.

Il processo di sintesi di una proteina avviene in tre fasi simili in cellule procariote ed eucariote:

1. Inizio della traduzione;
2. Allungamento della catena polipeptidica;
3. Terminazione della traduzione.



Inizio della traduzione

Parte con il codone di inizio (codone consenso) AUG del mRNA che codifica per una metionina

Met (solo raramente vi è la tripletta GUG come codone d'inizio) che rappresenterà quindi l'aminoacido N-terminale. Nei procarioti la metionina è formilata (presenta l'aggiunta di un gruppo formile al gruppo aminico), quindi il loro codone di inizio specifica per una formilmetionina (fMet). Per l'inizio della traduzione viene utilizzato quindi uno speciale t-RNA Met (tRNA iniziatore) diverso da quello impiegato per la lettura dei codoni AUG situati in altri punti della molecola di mRNA. Il primo passo è rappresentato dal legame tra il fattore di inizio degli eucarioti eIF4A (multimero di numerose proteine tra cui CBP - Cap Binding Protein) e l'mRNA. Dopo il riconoscimento del cap in 5', si lega al mRNA un complesso formato dalla subunità minore dei ribosomi e alcuni fattori di inizio (eIF, Guanosina Trifosfato - GTP e Met-tRNA). Tale complesso migra lungo l'mRNA alla ricerca del codone di inizio AUG che è inserito in una breve sequenza segnalatrice detta, sequenza di Kozak. Questo modello d'inizio è noto come "modello a scansione, il codone AUG risulta essere quasi sempre il primo codone AUG a partire dall'estremità 5. Una volta trovato il codone d'inizio la sub-unità ribosomiale

minore (40S) e successivamente quella maggiore (60S) si legano al mRNA mentre vengono rilasciati tutti gli eIF; si forma così il complesso di inizio (80 S). Il ribosoma negli eucarioti e nei procarioti possiede due siti per gli aminoacil-tRNA (tRNA carichi): un sito aminoacilico indicato con A e un sito peptidico indicato con P.

Allungamento della catena polipeptidica

Si compone di tre passaggi:

① Legame dell'aminoacil tRNA (tRNA carico) al ribosoma, il primo tRNA-Met (tRNA iniziatore) si lega al codone d'inizio AUG mediante legami idrogeno nel sito P del ribosoma. L'orientamento di questo complesso tRNA-codone porta il codone successivo del mRNA a trovarsi esposto sul sito A del ribosoma; a questo punto la molecola seguente di aminoacil-tRNA, insieme ad alcuni fattori proteici di allungamento e alla GTP, viene condotto al ribosoma e si lega, tramite il proprio anticodone, al codone del mRNA esposto nel sito A.

② Formazione del legame peptidico, il ribosoma presenta quindi i due aminoacil-tRNA in posizione corretta perchè si possa formare il legame peptidico tra i due aminoacidi. Si ha la rottura del legame tra il gruppo carbossilico dell'aminoacido e il tRNA nel sito P, la metionina libera si lega mediante legame peptidico al secondo aminoacido situato nel sito A grazie all'enzima peptidil transferasi. Sul sito P quindi rimane un tRNA scarico e sul sito A un peptidil tRNA legato ai primi due aminoacidi della catena polipeptidica nascente.

③ Traslocazione, consiste nel movimento del ribosoma lungo l'mRNA, un codone alla volta. Una volta formato il legame peptidico tra i due aminoacidi e la catena polipeptidica in formazione si trova sul tRNA nel sito A, il ribosoma si sposta lungo l'mRNA di un codone in direzione 3'. È stato proposto un nuovo modello che coinvolge un terzo sito, il sito E. In questo caso il tRNA scarico si sposta dal sito P sul sito E bloccando il legame del successivo aminoacil tRNA sul sito A che rimane libero di accogliere un nuovo aminoacil -tRNA che porta l'anticodone corretto ad appaiarsi al codone esposto dell'mRNA.

L'avanzamento di ogni tRNA attraverso il ribosoma può essere così schematizzato: citoplasma → sito A → sito P → sito E → citoplasma (a eccezione del tRNA iniziatore, che si attacca direttamente al sito P e non transita mai in A). Tale processo si ripete fino a che la traduzione termina una volta aggiunto un codone di stop.



Terminazione

L'allungamento della catena polipeptidica continua finchè viene terminato il polipeptide codificato dal mRNA. Tale completamento viene segnalato nel mRNA da uno dei codoni di stop (UAG, UAA, UGA).

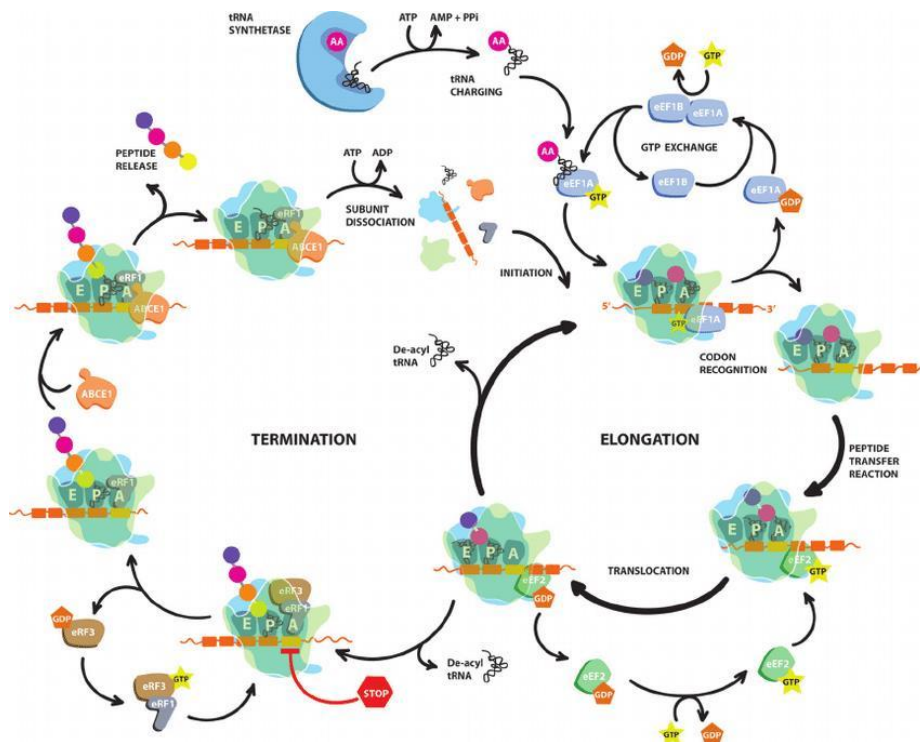
Il ribosoma è in grado di riconoscere i codoni di stop solo grazie all'intervento di proteine specifiche dette fattori di rilascio RF (Releasing Factor), che riconoscono i codoni di stop (negli eucarioti è l'eRF che riconosce tutti e tre i codoni di stop) e danno il via agli eventi specifici di terminazione della traduzione:

rilascio del polipeptide dal tRNA al sito P del ribosoma;

rilascio del tRNA dal ribosoma;

dissociazione delle due sub-unità ribosomiali dall'mRNA.

Il ribosoma incontra il codone di stop grazie all'aiuto del legame col fattore di rilascio eRF che innescava una serie di eventi specifici che conducono alla separazione dei vari componenti e quindi al rilascio del polipeptide completato: il polipeptide e il proprio tRNA sono rilasciati dal ribosoma e quest'ultimo si stacca dal mRNA. Successivamente gli aminoacidi iniziali (Met negli eucarioti e fMet nei procarioti) vengono poi rimossi dal polipeptide e il processo di traduzione risulta così quindi terminato, la proteina è pronta a esplicare la sua funzione.



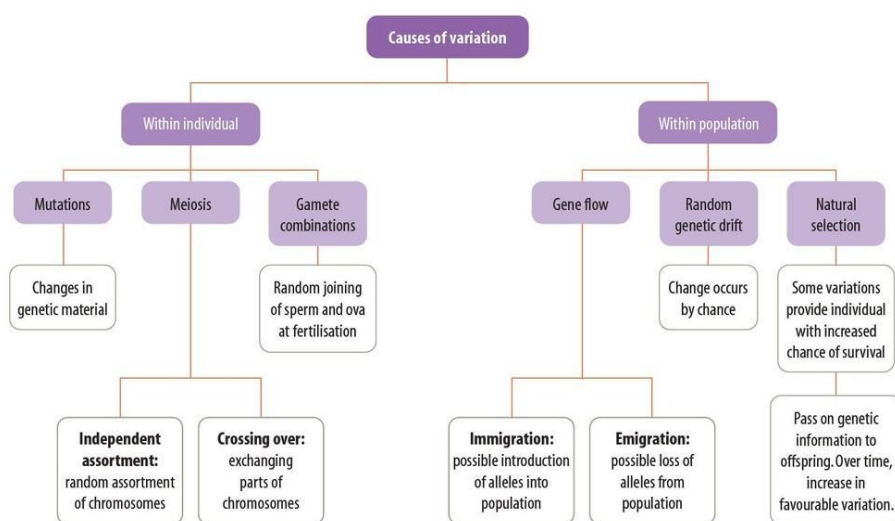
Più ribosomi possono tradurre contemporaneamente per lo stesso mRNA (poliribosomi formati

da 8-10 ribosomi), ciò permette di riprodurre una quantità elevata della stessa proteina.

Variabilità genetica: Mutazioni

Introduzione

Grazie al Progetto Genoma Umano sappiamo che è solo una differenza dello 0,1% del DNA a determina la variabilità della popolazione. Questo 0.1% è responsabile della variabilità fenotipica e determina una risposta individuale all'ambiente.



Con il termine mutazione ci si riferisce a delle variazioni stabili ed ereditabili del materiale genetico (in termini di struttura o nr. dei cromosomi), che possono avere effetti positivi o negativi. Sono più frequenti di quanto si pensasse, possono avvenire spontaneamente o indotte da vari agenti mutageni (fisici, chimici, ambientali).

Considerando che il DNA umano contiene circa 3 miliardi di coppie di basi non sorprende il che quando in una cellula questa enorme quantità di dati viene copiata vengano introdotti degli errori. Al contempo innumerevoli sono gli agenti mutageni con cui in vario modo veniamo in contatto. A differenza di quelle indotte, le mutazioni spontanee sono molto rare ma sono le più importanti nel processo evolutivo. Le mutazioni spontanee avvengono a seguito di errori che “sfuggono” ai meccanismi riparatori: durante la replicazione del DNA, nel crossing-over della meiosi, per destabilizzazione propria (forma vacillante delle basi) o causata dagli elementi trasponibili (trasposomi).

Le mutazioni che avvengono nelle cellule da cui ha origine una nuova vita (cellule germinali) sono chiamate mutazioni germinali e sono le uniche possono essere trasmesse mediante i gameti

alla progenie e si originando un individuo mutato sia nelle cellule somatiche sia in quelle germinali. Le mutazioni che avvengono in qualunque altra cellula del corpo (cellule somatiche) si definiscono mutazioni somatiche e non sono ereditabili.

Le mutazioni sono responsabili della variabilità degli esseri viventi, all'interno delle popolazioni, senza la quale tutti gli individui sarebbero uguali tra loro.

Il tasso di mutazione indica la velocità con cui si verifica una determinata classe di mutazioni (es. mutazioni spontanee) in funzione del tempo (considerando come unità di tempo la generazione) ed è calcolata come frazione del numero di mutazioni di coppie di basi o gene o genoma per generazione. Indica la probabilità che una mutazione si verifichi nel tempo; nell'uomo il tasso di mutazione spontanea per un singolo gene è $10^{-4} - 10^{-5}$ / gene / generazione. La frequenza di mutazione indica il numero di eventi di una specifica mutazione all'interno di una popolazione nel momento dell'osservazione espresso come nr. di cellule o di individui mutati per il nr. che compone la relativa popolazione.

Possiamo dividere le mutazioni in:

- Macro-mutazioni o aberrazioni cromosomiche o macrolesioni, consistono in una variazione della struttura generale o del numero dei cromosomi (mutazioni strutturali e numeriche) che possono arrivare a interessare l'intero genoma (mutazioni genomiche).
- Micro-mutazioni (mutazioni puntiformi) o microlesioni, sono mutazioni geniche (relative a un gene) causate dalla alterazione nella composizione delle basi azotate. La gravità dell'eventuale danno provocato dipende dai cambiamenti a carico delle proteine prodotte.

Mutazioni cromosomiche

Le mutazioni strutturali dei cromosomi comportano dei cambiamenti a carico dell'intero cromosoma o parte di esso (es. mutazioni geniche) senza implicare variazioni del numero dei cromosomi o di interi assetti cromosomici di un genoma.

Sono modificazioni che originano da una o più rotture determinando la formazione di estremità tronche senza telomeri. Ciò rende tali segmenti "appiccicosi" (possono quindi attaccarsi all'altro troncone o alle estremità normali di altri cromosomi) ed esposti all'attività di degradazione operata dalla esonucleasi.

Si distinguono in:

- ☐ Delezione, perdita irreversibile (a differenza delle altre) di un tratto di un cromosoma in



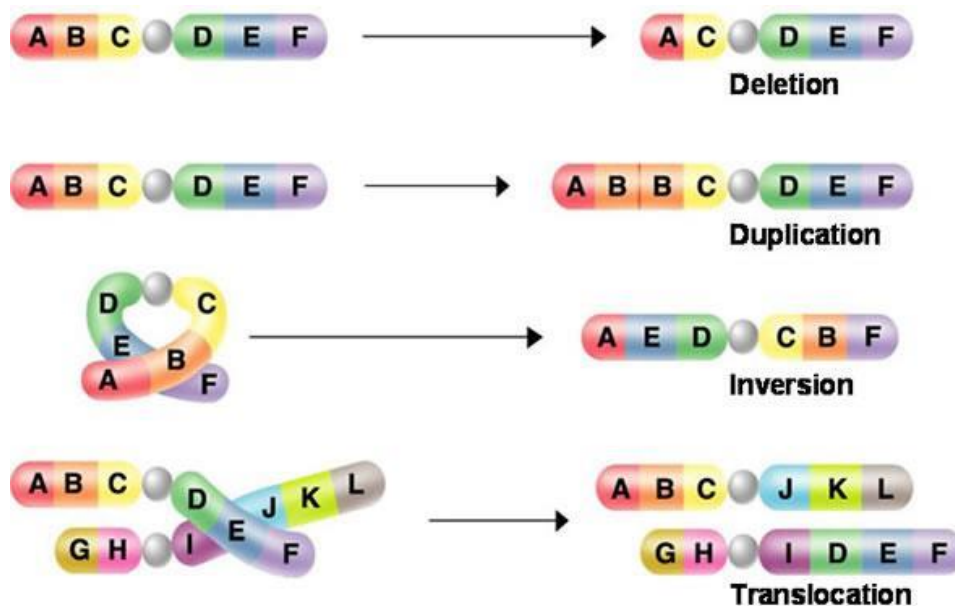
seguito a una rottura che può essere indotta da diversi agenti eziologici (temperatura, radiazioni in particolare quelle ionizzanti, sostanze chimiche, microrganismi, errori nella ricombinazione. Si definisce deficienza terminale la delezione che avviene all'estremità del cromosoma (una rottura), deficienza intercalare (la più comune) quando la delezione avviene all'interno del cromosoma (due rotture). Le conseguenze delle mutazioni per delezione dipendono dai geni interessati. Negli organismi diploidi gli effetti sono di norma attenuati per la presenza sul cromosoma omologo di una copia dei geni mancanti. Però se nel cromosoma omologo si hanno a esempio dei geni recessivi portatori di effetti deleteri, le conseguenze possono essere anche molto gravi. Con pseudodominanza si definisce la delezione di un allele dominante in un eterozigote rende manifesto a livello fenotipico l'allele recessivo. Se la delezione riguarda il centromero determinerà un cromosoma acentrico con conseguente perdita dal genoma dell'intero cromosoma. Nell'uomo le delezioni di tratti cromosomici sono spesso causa di molte malattie negli eterozigoti mentre negli omozigoti una delezione è piuttosto estesa può risultare letale (es. la malattia Cri-du-chat causata dalla delezione di una parte del braccio corto del cromosoma 5). È possibile individuare le delezioni tramite l'analisi del cariotipo;

❏ Duplicazione, r addoppio reversibile di un tratto di un cromosoma che si verifica quando un suo frammento si lega all'omologo causando una doppia presenza di geni per lo stesso locus. Un evento che può causare l'insorgenza di duplicazioni è il crossing-over ineguale, che avviene quando l'appaiamento fra omologhi riguarda un tratto ripetuto causando un piccolo sfalsamento nell'appaiamento dei cromosomi omologhi durante la meiosi in grado di dare origine a gameti con una duplicazione o una delezione. Di norma esistono tre tipi di duplicazioni: tandem (tratti duplicati disposti l'uno vicino all'altro), tandem inversa (ordine dei geni nel segmento duplicato risulta al contrario di quello originale), tandem terminali (segmenti duplicati posti su una delle estremità del cromosoma). Le duplicazioni hanno svolto un ruolo fondamentale nello sviluppo delle famiglie geniche, insieme di geni correlati che si sono evoluti da un gene ancestrale comune mediante il processo di duplicazione allelica e che codificano per un gruppo di proteine che, a loro volta, si sono altamente conservate nel corso dell'evoluzione e

svolgono funzioni simili (es. famiglia dei geni globinici, oche codificano le catene polipeptidiche dell'emoglobina);

📌 **Inversione**; cambiamento reversibile nella disposizione di un tratto cromosomico che si stacca, ruota di 180° e si riunisce al resto del cromosoma (come risultato l'ordine dei geni risulta invertito). Se l'inversione comprende il centromero è detta inversione pericentrica mentre quando il segmento invertito si trova su un braccio del cromosoma è detta inversione paracentrica. Nelle inversioni il materiale genetico non viene perduto ma possono esserci delle conseguenze fenotipiche quando i punti di inversione (punti di rottura) sono all'interno di un gene o in regioni che controllano l'espressione di un gene alterandola. Esse variano fra omozigote ed eterozigote. Nell'inversione omozigote la meiosi avviene senza problemi di duplicazioni o delezioni, nell'eterozigote un crossing-over può portare a gravi conseguenze genetiche. I cromosomi omologhi infatti tentano di appaiarsi con la maggiore corrispondenza possibile tra le basi; ma a causa del tratto invertito su un omologo, l'appaiamento richiede la formazione anelli o anse di inversione (comprendono i tratti invertiti) e i gameti risultanti da cromatidi ricombinanti in tali regioni non sono vitali (a causa dello sbilanciamento dei geni); se invece non si ha crossing-over nell'anello tutti i gameti risultanti sono vitali e avranno un corredo cromosomico completo (due con l'ordine normale, e due con l'ordine invertito).

📌 **Traslocazione**, modifica reversibile della posizione di un segmento cromosomico a seguito di una insolita alterazione della loro forma (non vi è perdita o aumento di materiale genetico). Possiamo distinguerne due tipi: intracromosomica (spostamento di un tratto di cromosoma all'interno dello stesso cromosoma) e intercromosomica (spostamento di un tratto da un cromosoma all'omologo). Se lo spostamento tra gli omologhi avviene in un'unica direzione si parla di traslocazione non reciproca, se in entrambe le direzioni traslocazione reciproca. Negli omozigoti le traslocazioni reciproche sembrano essere le più frequenti, la meiosi avviene normalmente. Negli eterozigoti per traslocazioni reciproche invece le diverse parti di cromosomi omologhi si appaiano come meglio riescono e nella meiosi durante la profase risulta una configurazione a croce con formazione di solo due gameti vitali, per cui tale situazione è denominata semisterilità.



Le mutazioni cromosomiche numeriche (definite anche in maniera meno corretta mutazioni genomiche) possono interessare uno o più cromosomi interi (aneuploidia o eteroploidia) o l'intero assetto cromosomico (euploidia).

Un organismo eucariotico può andare incontro a delle mutazioni che portano a variazioni del numero di interi cromosomi o di sue parti di causando una condizione è chiamata aneuploidia o eteroploidia a sua volta suddivisa in iperoidia e ipoploidia. La causa più comune è la non-disgiunzione di una o più coppie di cromosomi omologhi o cromatidi fratelli durante la meiosi I o la meiosi II, che nella maggior parte degli animali risulta letale.

Negli organismi diploidi vi sono cinque differenti categorie di variazioni aneuploidi:

Nullisomia ($2n-2$), ipoploidia con perdita di due cromosomi omologhi in seguito a non disgiunzione alla meiosi dello stesso cromosoma in entrambi i genitori, da ciò deriva un gamete privo di copie di quel cromosoma.

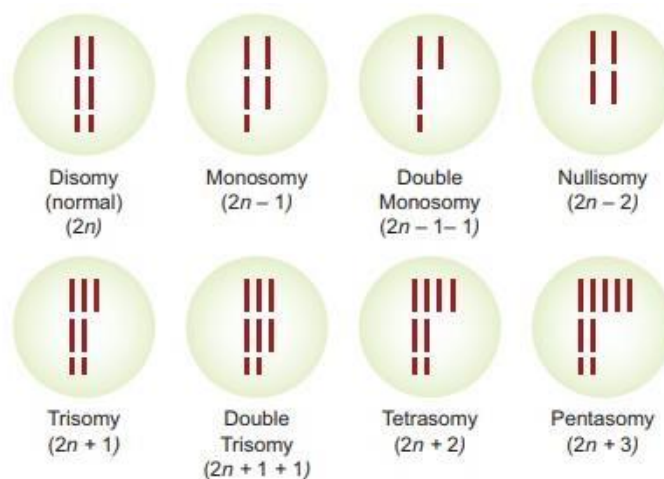
1. Monosomia ($2n-1$), ipoploidia con perdita di un solo cromosoma in seguito a una non disgiunzione alla meiosi in un genitore che origina un gamete privo di copie di quel cromosoma e una copia di tutti gli altri. La perdita di due (come nel mais) o tre cromosomi singoli viene definita rispettivamente monosomia doppia ($2n-1-1$) e tripla ($2n-1-1-1$).

2. Trisomia ($2n+1$), iperoidia che si verifica quando una non disgiunzione alla meiosi in un genitore porta alla produzione di un gamete con due copie dello stesso cromosoma e

una di tutti gli altri, si hanno quindi tre copie dello stesso cromosoma e due di tutti gli altri. In taluni casi si ha l'aggiunta di 2 copie del cromosoma e pertanto una trisomia doppia ($2n+1+1$).

3. Tetrasomia ($2n+2$), rara iperplodia in seguito a una non disgiunzione dello stesso cromosoma alla meiosi di entrambi i genitori, ciascuno dei quali origina due copie di quel cromosoma e una di tutti gli altri, la cellula presenta quindi quattro copie di un determinato cromosoma e due copie di tutti gli altri.

4. Pentasomia ($2n+3$), iperplodia rara risultante in una aggiunta di tre cromosomi derivanti da altre coppie cromosomiche (genitori), la cellula possiede cinque copie di quel cromosoma e due degli altri.



Nell'uomo la monosomia per un autosoma si riscontra raramente mentre le trisomie degli autosomi sono responsabili di circa la metà delle anomalie cromosomiche che causano morte di norma molto precoce.

Trisomia 21 (sindrome di Down), è la più comune tra le trisomie e l'unica in cui si ha sopravvivenza fino all'età adulta, presenta tre copie del cromosoma 21, un cromosoma molto piccolo e con pochi geni rispetto agli altri. Le cause che portano alla non disgiunzione rimangono ancora sconosciute ma la ricerca dimostra che il rischio che insorga questa sindrome aumenta con l'aumentare dell'età della donna. La copia parziale o totale supplementare del cromosoma 21 deriva principalmente dalla madre e solo in ca. il 5% dei casi dal padre.

Trisomia 13, caratterizzata dalla presenza di tre cromosomi 13 che causano la Sindrome

di Patau i cui i soggetti in genere muoiono prima dei tre mesi di vita.

Trisomia 18, si hanno tre copie del cromosoma 18 che causano la Sindrome di Edwards principalmente in bimbe (ca. 80% dei casi), il 90 % muore entro i 6 mesi di vita.

L'aneuploidia (eteroploidia) dei cromosomi sessuali è molto più frequente di quella degli autosomi per via del meccanismo di “compensazione di dose” che inattiva i cromosomi X in eccesso. Rientrano fra le aneuploidie dei cromosomi sessuali:

Trisomia X, detta anche Sindrome della superfemmina (XXX), donne con arti lunghi e QI nella media.

Sindrome 47, XYY o sindrome di Jacobs o disomia del cromosoma Y detta anche sindrome del supermaschio in quanto con altezza media 188 cm, lieve ritardo mentale, spesso con denti e relative radici grandi ma con livelli di testosterone normali.

Sindrome di Klinefelter (47, XXY) che comporta disturbi dell'apprendimento, arti lunghi, testicoli piccoli e sterilità.

Monosomia (45, X0) o sindrome di Turner, le conseguenze variano tra più comuni sono collo corto e con pterigium colli (piega cutanea che si estende dal margine laterale del collo alle spalle), attaccatura delle orecchie bassa, bassa attaccatura dei capelli nella parte posteriore del collo, bassa statura e mani e piedi gonfi.

Quando una cellula o un organismo è caratterizzato da un numero di assetti cromosomici pari o multiplo esatto del corredo aploide (n) si parla di euploidia (x , $2n$, $3n$, $4n$). Le condizioni aploide (n) e diploide ($2n$) si verificano regolarmente una in seguito all'altra e lo stesso numero di cromosomi viene mantenuto di generazione in generazione. Le mutazioni invece che interessano il numero di interi assetti cromosomici risultano solitamente letali nella maggior parte di specie animali, Possiamo distinguerle in:

Monoploidia (x), l'individuo normalmente diploide presenta un solo assetto cromosomico. La condizione di monoploidia differisce da quella naturale di aploidia (n) in quanto si verifica quando un organismo è in condizione di poliploidia. Un monoploide può essere un aploide in un vero diploide ossia quando sia il numero di cromosomi monoploide sia aploide sono uguali.

Poliploidia ($2n + n + n$), l'individuo presenta un numero di assetti cromosomici superiore al normale sempre a seguito di una non disgiunzione dei cromosomi. Quando

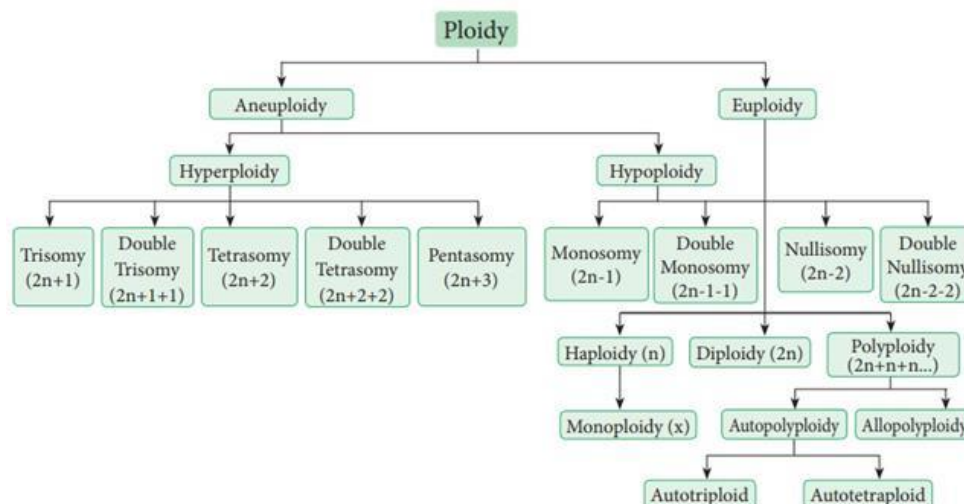
ci sono tre, quattro, cinque o sei serie di cromosomi di base, vengono chiamati rispettivamente triploidia (3x) tetraploidia (4x), pentaploidia (5x) ed esaploidia (6x). In generale la poliploidia è molto comune nelle piante (in cui ha rappresentato un fattore importante nell'origine di nuove specie) e più rara negli animali nei quali un livello di ploidia più alto porta alla morte. Le poliploidie si dividono a loro volta in poliploidie con un numero di assetti cromosomici parie dispari. I poliploidi con assetti pari hanno maggiori probabilità di essere almeno parzialmente fertili in quanto c'è la possibilità che i cromosomi omologhi si appaino durante la meiosi.

Se la non disgiunzione avviene durante la meiosi I, metà dei gameti non avrà alcun assetto cromosomico mentre l'altra metà ne avrà due. Se la non disgiunzione avviene alla meiosi II, due gameti avranno due assetti cromosomici, uno un solo assetto e uno nessuno. La fusione di un gamete con due assetti cromosomici con uno con assetto normale genera uno zigote con tre assetti quindi triploide. La fusione tra due gameti con due assetti cromosomici ciascuno, origina uno zigote tetraploide.

D a uova non fecondate infine si originano in genere Individui monoploidi

Nelle specie vegetali troviamo due tipi di poliploidia:

- 1) Autopoliploidia, l'organismo possiede più di due serie aploidi di cromosomi derivati dalla stessa specie e possono a loro volta essere autotriploidi (con tre serie di propri genomi, possono essere prodotti artificialmente e sono altamente sterili a causa della formazione di gameti difettosi, esempi banane coltivate sono generalmente triploidi e sono prive di semi con frutti più grandi dei diploidi, anguria senza semi, mela, barbabietola da zucchero, pomodoro) e autotetraploidi (con quattro copie del proprio genoma, possono essere indotti raddoppiando i cromosomi di una specie diploide, esempi segale, uva, erba medica, arachidi, patate e caffè).
- 2) Allopoliploidia, l'organismo possiede due o più serie fondamentali di cromosomi derivati da due specie differenti ma strettamente imparentate e può essere sviluppato da incroci interspecifici e la fertilità viene ripristinata mediante il raddoppio dei cromosomi con il trattamento con colchicina.



Le mutazioni cromosomiche nell'uomo causano circa la metà di aborti spontanei e morti neonatali, inoltre pare che circa il 15% delle fecondazioni porti mutazioni cromosomiche e che l'11% circa dei maschi con gravi problemi di infertilità siano portatore di mutazioni cromosomiche. Nell'uomo inoltre un certo numero di tumori è associato a mutazioni cromosomiche, sia per quanto riguarda il numero dei cromosomi, dovuto a non disgiunzione o ad un cambiamento strutturale causato da delezioni, duplicazioni, inversioni o traslocazioni. Un esempio è la leucemia mieloide cronica in cui una parte del braccio lungo del cromosoma 22 è traslocato sul cromosoma 9 e una piccola parte del cromosoma 9 risulta traslocata sul cromosoma 22. Si tratta di un tumore sempre fatale nel quale i geni oncogeni inducono la trasformazione incontrollata di una cellula differenziata in una cellula tumorale. Molte informazioni che oggi abbiamo sulle variazioni della struttura dei cromosomi sono state possibili grazie al caratteristico bandeggio visibile al microscopio dei cromosomi politenici, cromosomi giganti presenti nelle cellule somatiche di alcuni insetti (es. *Drosophila melanogaster*), Sono cromosomi e derivanti da vari cicli di replicazione che producono molte copie (anche centinaia) di cromatidi fratelli che rimangono uniti; di consentono di aumentare il volume cellulare e il livello di espressione genica.

Mutazioni geniche

Una mutazione genica è una alterazione che riguarda una o più coppie di basi di un singolo gene; ciò porta alla formazione di nuovi alleli detti alleli mutanti. Si ha quindi una modificazione strutturale oltre che conseguentemente funzionale (fenotipo) del gene originario, detto selvatico o wild type, che da quel momento si replicherà nella forma mutata. i

maggiori effetti si avranno se la mutazione avviene a carico dei geni che codificano per le proteine. Al contempo va considerato che tali mutazioni sono la maggior causa della variabilità della specie, fattore indispensabile per la sopravvivenza.

Alcuni geni mutano più frequentemente di altri e per questo sono detti instabili o mutabili. Sia le mutazioni geniche spontanee sia quelle indotte insorgono a causa di una variazione nella sequenza di basi del DNA.

Una mutazione genica avviene quindi a livello della sequenza di basi di un gene in un qualsiasi punto del DNA e si classificano in:

- 1) mutazioni per sostituzione di base;
- 2) mutazioni per inserzione/delezione dette anche mutazioni per scivolamento di fase o frameshift.

1) La mutazione per sostituzioni di base si definisce per transizione quando si ha la sostituzione di una purina con un'altra purina o di una pirimidina (T, C) con un'altra pirimidina, se invece una purina è sostituita da una pirimidina o viceversa si definisce per transversione. In genere le transizioni sono più frequenti delle transversioni. Tale mutazioni possono avvenire se a esempio per un errato appaiamento durante la replicazione del DNA e si suppone che le basi subiscano un cambiamento tautomerico (a causa della leggera instabilità delle basi e della loro capacità di assumere forme rare): la nuova base si trova in una forma rara che forma dei legami idrogeno diversi e può determinare un appaiamento errato che origina, in seguito al ciclo replicativo successivo, un mutante. L'azione di correzione di bozze fa sì che molti appaiamenti errati vengano riconosciuti, excisi e sostituiti con le basi corrette. Non tutti sono d'accordo su questo modello della tautomeria come base delle mutazioni. Tramite le nuove tecniche di analisi strutturali basate su raggi X e spettroscopia NMR, si è infatti visto che le basi erroneamente appaiate si trovano in una forma normale (non in tautomerica) ma vacillante. Pertanto l'appaiata avviene in maniera sbagliata per via di un alterato posizionamento spaziale degli atomi che formano i ponti idrogeno. Ciò sarebbe possibile grazie alla flessibilità della molecola del DNA e alle possibili conformazioni alternative delle basi. Inoltre nella depurinazione si ha rottura del legame tra la base azotata purinica e il deossiribosio e l'adenina o la guanina si stacca dal

nucleotide creando un sito apurinico. Se tale danno non viene riparato durante la replicazione, in tale sito può essere inserita una base a caso che funge da nuovo stampo dando origine a una coppia di basi con appaiamento errato e quindi a una mutazione. La deaminazione invece consiste nella perdita di un gruppo amminico di una base azotata che nel caso della Citosina la trasforma in Uracile. Il sistema di riparo agisce rimuovendo questi Uracile ma qualora ciò non accadesse, ciò fa sì che durante la replicazione al posto della coppia di basi pirimidiniche (Citosina-Guanina) venga inserita una coppia di basi puriniche (Timina-Adenina) per transizione.

2) Durante la replicazione del DNA avvengono spontaneamente delle inserzioni o delezioni di una o poche coppie di basi a causa di estrusioni erronee di basi di una o dell'altra elica di solito in corrispondenza di sequenze ripetute di una base; l'estrusione sull'elica stampo determina una mutazione per delezione, mentre sull'elica sintetizzata crea una mutazione per inserzione. Se la base o la sequenza inserita è identica a quella precedente, si parla di duplicazione. Se queste inserzioni/delezioni avvengono in un gene strutturale avremo delle mutazioni frameshift (scivolamento di fase) come risultato si ottiene uno scorrimento del modulo o cornice di lettura (frame) dal sito mutato in poi; si ha uno slittamento di lettura del mRNA di una base determinando l'incorporazione di un aminoacido errato nella proteina. Si usa però correntemente il termine frameshift anche quando le inserzioni/delezioni avvengono in siti non codificanti. Questo tipo di mutazioni risultano le più dannose proprio perchè comportano la perdita o l'aggiunta di uno-due nucleotidi.

Mutazioni puntiformi

Quando il cambiamento riguarda una o poche basi; si parla più propriamente di mutazioni puntiformi (point mutations) anche se attualmente si è soliti indicare come mutazioni puntiformi r quelle che coinvolgono 1-50 o anche più nucleotidi. Molte mutazioni puntiformi sono probabilmente senza effetto, in tal caso si dice che sono neutre, infatti gran parte del DNA in un genoma eucariotico non codifica prodotti proteici ed è incerto se il cambiamento di una singola base nucleotidica in tale regione possa influire sulla salute di un organismo. Una singola mutazione puntiforme può però avere un notevole impatto sul fenotipo come accade a esempio nell'anemia falciforme.

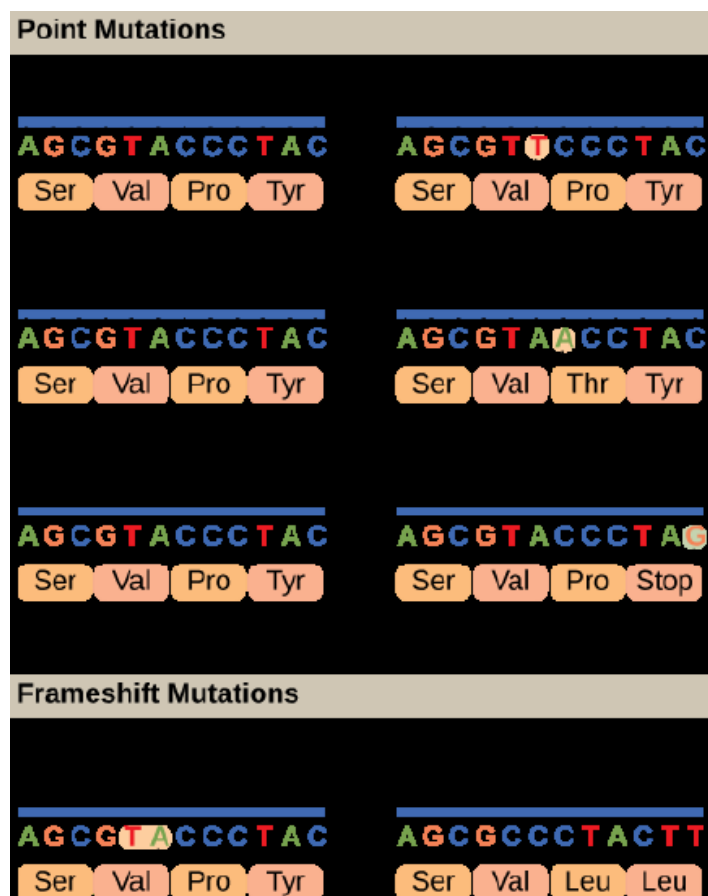
Le mutazioni puntiformi possono essere definite anche dal tipo di variazione che possono causare nella sequenza amminoacidica di una proteina:

Mutazioni missenso non conservativo, la sostituzione di una base azotata causa un cambiamento nel codone del mRNA per cui nella sequenza amminoacidica del relativo polipeptide. Tale mutazione se avviene in un punto critico della catena polipeptidica, l'attività della proteina può risultare ridotta o addirittura inattiva e dare origine a patologie gravi (es. anemia falciforme).

Mutazioni Missenso conservativo o Sinonime o Neutre, la sostituzione della base comporta la codifica di un aminoacido con un altro con proprietà simili, non si presenta quindi alcuna alterazione nella funzionalità della proteina risultante.

Mutazioni silenti, mutazioni missenso in cui la sostituzione della base comporta comunque la codifica dello stesso aminoacido, la proteina risultante è pertanto identica a quella originale.

Mutazione nonsense, la variazione della tripletta nucleotidica risulta in grado di trasformare nel mRNA un codone codificante per un aminoacido in un codone nonsense (codone stop) che causa o la non esportazione del polipeptide o, se codificato, la terminazione della sintesi in un punto non corretto con produzione di una proteina trunca e quindi solitamente non funzionale o nociva.



Un ruolo importante nelle mutazioni in particolare quelle spontanee, per inserzione, delezione e frameshift è interpretato dagli elementi trasponibili.

Elementi trasponibili o trasposoni

Fino ai primi anni cinquanta si pensava che ogni sequenza genetica avesse una localizzazione cromosomica fissa modificabile solo a seguito di rari eventi di riarrangiamento cromosomico. Grazie agli esperimenti sul mais di McClintock l'esistenza di elementi mobili è stata dedotta dalla proprietà tipica di questi elementi genetici di indurre mutazioni spontanee in corrispondenza dei nuovi siti di inserzione.

Gli elementi trasponibili (jumping genes, transposon) sono elementi genetici generici in grado di "saltare" in modo autonomo da una localizzazione cromosomica a un'altra (trasposizione).

Gli elementi trasponibili possono essere definiti come sequenze moderatamente ripetitive di DNA o RNA capaci di inserirsi nel genoma in posizioni diverse e anche in genomi diversi.

Gli elementi trasponibili fanno parte del mobiloma costituito da tutti gli elementi genetici mobili di una cellula (Mobile Genetic Elements - MGE), i quali possono muoversi all'interno o tra genomi diversi. In base al meccanismo con cui si spostano e al tipo di sequenza, essi vengono

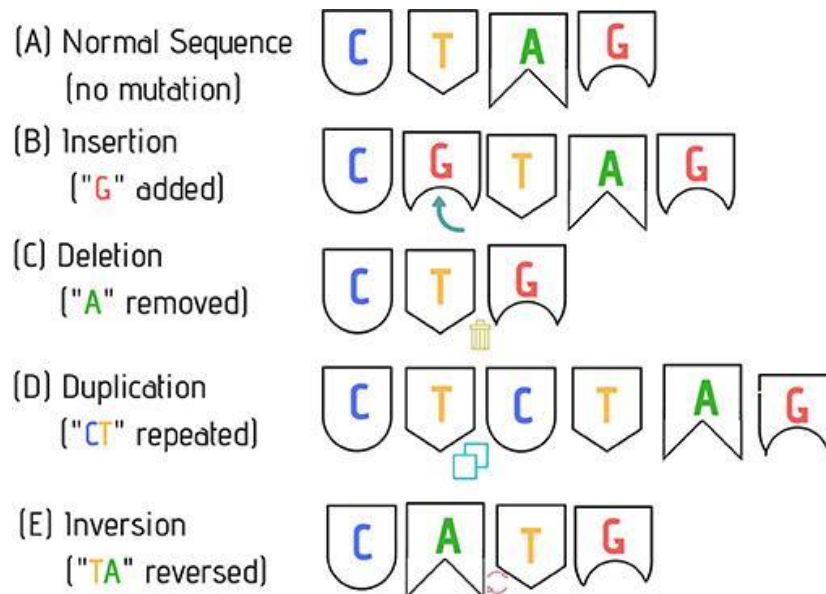
suddivisi in diverse categorie: trasposoni o elementi trasponibili, plasmidi, batteriofagi e ribozimi auto-splicing (RNA-Enzimi ossia molecole RNA con funzioni catalitiche). Negli eucarioti la categoria maggiormente rappresentata è quella degli elementi trasponibili, mentre nei procarioti possono essere rappresentate anche le altre categorie, le quali permettono scambio di materiale genetico tra genomi diversi.

Gli elementi trasponibili (trasposomi) costituiscono più del 40% del genoma umano.

Tali elementi possono essere considerati anche come elementi parassitari, alcuni di essi infatti sono considerati imparentati con alcune famiglie dei cosiddetti retrovirus.

La presenza degli elementi trasponibili nella cellula viene generalmente individuata a seguito dei cambiamenti che essi determinano nell'espressione e nell'attività dei geni nei quali o nelle vicinanze dei quali si inseriscono (mutazioni per inserzione) nonché dell'intero genoma (mutazioni per inserzioni, delezioni, inversioni o traslocazioni). Infatti oltre a poter provocare l'inattivazione di un gene, l'inserimento di un elemento trasponibile può essere alla base di interazioni regolative complesse, dovute al riarrangiamento delle sequenze che controllano l'espressione di un gene e/o all'effetto esercitato dai conseguenti segnali di trascrizione sull'espressione di geni adiacenti. Le sequenze regolative presenti nell'elemento trasponibile possono infatti alterare l'espressione delle sequenze adiacenti al sito di inserimento provocando sia l'attivazione di promotori criptici normalmente silenti sia l'inattivazione o l'alterata espressione di promotori attivi.

Gli elementi trasponibili promuovono anche il verificarsi di estesi riarrangiamenti del genoma. Copie di un elemento inserite in siti diversi forniscono regioni di omologia al cui interno possono verificarsi eventi di ricombinazione; tali scambi possono provocare delezioni, inserzioni, duplicazioni, inversioni o traslocazioni (frameshift).



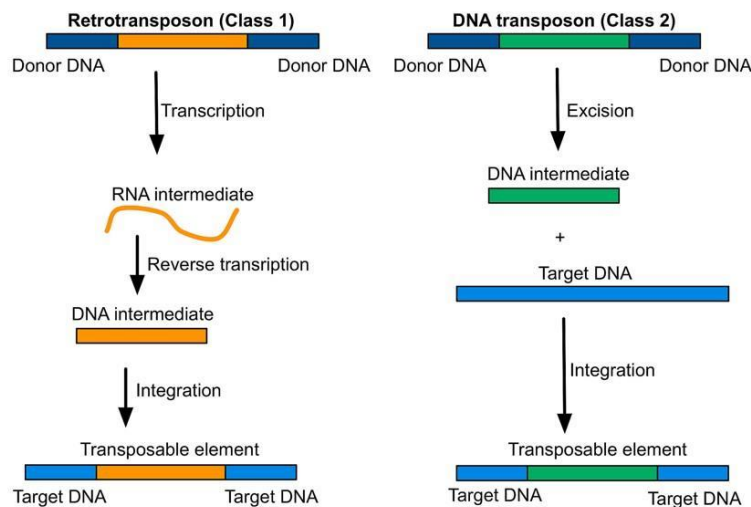
Oggi sappiamo che In tutti gli organismi studiati, una larga percentuale delle mutazioni spontanee è rappresentata da mutazioni da inserzione.

La trasposizione svolge un ruolo rilevante nell'evoluzione del genoma sia nei procarioti sia negli eucarioti. L'effetto principale consiste essenzialmente nell'aumentare la variabilità genetica provocando una larga serie di mutazioni e di riarrangiamenti.

I meccanismi di trasposizione sono essenzialmente distinguibili in due tipi:

Trasposizione conservativa (class 2), l'elemento trasponibile si muove per escissione dal sito occupato e simultanea integrazione in un nuovo sito. Tale trasposizione viene effettuata dai trasposomi a DNA che appunto si spostano con un meccanismo di tipo "taglia e incolla";

Trasposizione replicativa (class 1), l'elemento trasponibile non si sposta dal sito occupato ma si duplica ed è la sua copia che si inserisce in un nuovo sito. Diversamente dalla trasposizione conservativa, quella replicativa comporta quindi un aumento del numero di copie dell'elemento per ogni evento di trasposizione. Questo tipo di trasposizione viene eseguita da trasposomi replicativi a RNA detti Retrotrasposomi o retrovirus like element che appunto creano una copia di se stessi in RNA (in cui si trascrivono autonomamente) che fa da stampo per la sintesi di un nuovo DNA che si muove e inserisce in un altro punto tramite un meccanismo "copia e incolla". Alcuni trasposomi a RNA vengono trascritti e non tradotti mentre altri portano alla sintesi di una proteina.



L'identificazione e la caratterizzazione degli elementi trasponibili da organismi diversi, sia procarioti sia eucarioti, ha portato a stabilire che, indipendentemente dalla loro provenienza, essi condividono alcune caratteristiche generali comuni:

Traspongono in maniera autonoma:

Codificano per enzimi (trasposasi) che catalizzano il loro inserimento in nuovi siti "bersaglio";

Controllano con meccanismi diversi la propria frequenza di trasposizione;

Richiedono l'integrità delle sequenze terminali come requisito indispensabile per la trasposizione, che si svolge in maniera precisa e mediata dal riconoscimento delle estremità da parte della trasposasi;

Ogni elemento trasponibile è fiancheggiato direttamente da corte sequenze ripetute di lunghezza caratteristica per ogni diverso elemento e di composizione differente per ogni sito di inserzione. La formazione di queste ripetizioni è dovuta all'attività endonucleolitica della trasposasi che taglia i due filamenti del DNA in punti sfalsati (ai lati del sito di inserzione). La riparazione dei tagli porta alla duplicazione della specifica sequenza originariamente presente in singola copia nel sito bersaglio;

Molti elementi traspongono con frequenza maggiore in corrispondenza di particolari sequenze, che costituiscono così bersagli preferenziali. La frequenza di trasposizione è caratteristica di ogni elemento (es. nei procarioti 10^{-3} - 10^{-5} per elemento per

generazione) e in molti casi la frequenza può variare in funzione della topologia del DNA e in risposta a precisi stimoli ambientali.

Le mutazioni provocate dagli elementi trasponibili sono spesso caratterizzate da instabilità dovuta alla proprietà tipica di molti di essi di essere escissi dal sito da loro occupato.

Un'escissione precisa è un evento raro e porta al ripristino del fenotipo selvatico, mentre un'escissione imprecisa porta spesso all'origine di un nuovo allele mutante. Numerosi sono gli esempi di geni eucariotici in cui l'inserimento o l'escissione imprecisa di un elemento trasponibile provoca un nuovo profilo di espressione temporale e/o spaziale del gene stesso. Gli elementi trasponibili sono variamente e largamente utilizzati nelle tecniche di manipolazione genetica.

Mutazioni di splicing del mRNA

Le mutazioni di splicing del mRNA, sono di quattro tipi e coinvolgono sequenze importanti per lo splicing del pre-mRNA:

- 1) Mutazioni nel sito marcatore di inizio e in quello di fine sequenza intronica possono portare all'inclusione dell'introne nel trascritto maturo oppure a uno splicing non corretto;
- 2) mutazioni di brevi sequenze consenso a monte e a valle del sito di inizio o di fine splicing o una sequenza consenso del sito di biforcazione (branch-site);
- 3) mutazioni in una sequenza ESE o ESS e possono essere considerate mutazioni silenti;
- 4) mutazioni che creano nuove sequenze consenso all'interno di un introne e qualora esso o sue parti vengano incluse nel trascritto o in un esone, si verifica l'exon skipping (che quindi non viene codificato).

Mutazioni condizionali

Le mutazioni condizionali manifestano i propri effetti solo in determinate condizioni ambientali. Ad es.

mutazioni sensibili alla temperatura; che agiscono cioè solo al di sopra (o di sotto) di determinate soglie

di temperatura e possono interessare anche proteine fondamentali come DNA polimerasi e RNA polimerasi la cui mutazione può causare un danno letale.



Mutazioni per reversione e soppressione

Spesso gli effetti di una mutazione dannosa possono essere invertiti da una seconda mutazione.

Oltre a mutazioni puntiformi che causano un cambiamento genotipico in direzione selvatico → mutante (mutazioni in avanti), esistono infatti mutazioni puntiformi dette per reversione (o reversioni, revertant) che agiscono genotipicamente e fenotipicamente in direzione inversa ossia mutato → parzialmente mutato/selvatico.

Gli effetti (e non la struttura) di una mutazione genica possono essere invertiti del tutto o attenuati anche mediante una mutazione postuma di un sito diverso da quello della prima mutazione, in questo caso si parla di mutazione soppressore (suppressor). Essa quindi non comporta una reversione strutturale della mutazione originaria, ma un mascheramento o compensamento degli effetti causati da quest'ultima sopprimono un cambiamento funzionale dovuto a una mutazione nel sito A, producendo un'ulteriore mutazione nel sito B.

Queste mutazioni soppressore (suppressor) si dividono in due categorie: le intrageniche, che avvengono nello stesso gene della mutazione originale (ma in un sito diverso), e le intergeniche, che si sviluppano in un gene diverso da quello della prima mutazione.

Uno degli esempi più conosciuti di mutazione soppressore è rappresentato dalla mutazione dei geni per i tRNA che sopprimono (e perciò vengono definiti geni soppressori) gli effetti di mutazioni nonsense di altri geni. I geni soppressori, dunque, non agiscono cambiando la sequenza nucleotidica di un gene mutato ma alterando il modo in cui viene letto l'mRNA (modificano la sequenza amminoacidica tradotta). In E. coli sono noti geni soppressori specifici per ciascuno dei tre codoni di stop in grado di interpretarli come codoni ognuno per il relativo amminoacido.

Ogni gene soppressore risulta specifico per gli effetti di un solo tipo di mutazione puntiforme a prescindere da qualunque sia il gene mutato.

In generale in una cellula normale una mutazione nonsense viene riconosciuta soltanto da un fattore di rilascio che termina la sintesi della proteina, in caso di mutazione soppressore si crea un amminoacil-tRNA che può riconoscere il codone mutato in stop e inserire un amminoacido continuando così la sintesi proteica. Le mutazioni missenso possono essere soppressa tramite l'inserzione dell'amminoacido originale o di un altro amminoacido chimicamente simile è accettabile per la proteina. Il risultato delle soppressioni è la produzione di una proteina che

presenta sostituzione di uno o più amminoacidi e che a seconda del cambio nella sequenza, può avere attività parziale o completa. Viene repressa di norma solo una piccola parte delle mutazioni puntiformi.

Mutazioni indotte e agenti mutageni

Le mutazioni indotte sono causate da agenti mutageni e avvengono con una frequenza molto superiore rispetto a quelle spontanee. I genetisti utilizzano mutageni al fine di elevare la frequenza di mutazione e ottenere un numero significativo di individui mutanti da studiare.

Gli agenti mutageni agiscono causando mutazione genetica tramite un complesso di reazioni chimico-fisiche (mutagenesi) in grado di comportare variazioni della sequenza, della disposizione spaziale del del DNA e della struttura e numero degli stessi cromosomi.

Gli agenti mutageni possono essere:

- Agenti fisici (radiazioni)
- Agenti chimici
- Agenti Ambientali.

I Mutageni fisici (radiazioni) si suddividono in:

Radiazioni ionizzanti, sono ad altissima energia e con una lunghezza d'onda corta (es. raggi X e raggi gamma). Tali tagghi esplicano la loro azione mutagenica inducendo la ionizzazione dell'acqua o di altre sostanze causando la formazione di radicali liberi. Un esempio è quello del radicale ossidrilico ($\bullet\text{OH}$) che è in grado di inattivare varie molecole cellulari, in particolare il DNA, e di attraversare facilmente diversi materiali (caratteristica che lo rende un mutageno molto pericoloso). I raggi X sono la causa delle più importanti mutazioni cromosomiche nell'uomo (rotture di cromosomi, riarrangiamenti cromosomici e mutazioni puntiformi) mentre alte dosi possono causare la morte cellulare (da qui il loro utilizzo nella cura del cancro). Gli effetti clinici di questi danni cellulari si possono manifestare anche a distanza di molti anni.

Radiazioni non ionizzanti, sono a bassa energia (microonde, raggi infrarossi, raggi UV) e in grado di essere assorbite dalle basi azotate e quindi di indurre la formazione di dimeri (covalentemente legati) di pirimidine nel DNA. Ciò aumenta il rischio che durante la replicazione la DNA Polimerasi incorpori nucleotidi errati in tale posizione. Le basi più colpite dai raggi UV sono timina e citosina con conseguente formazione di

dimeri di timina che distorcono l'elica ostacolando la duplicazione del DNA. A dosi elevate questi raggi possono risultare letali per le cellule.

I Mutageni Chimici comprendono classi di composti chimici caratterizzate dal loro meccanismo di azione che, in linea generale non ha specificità di azione, ma produce effetti simili a quelli delle radiazioni (penetrano nelle cellule e alterano la struttura del DNA). Tali mutageni possono essere suddivisi in:

1. Mutageni Diretti, in quanto possiedono una struttura molecolare che gli consente di interagire direttamente con il DNA (sono quindi altamente reattivi) e sono a loro volta classificati in analoghi delle basi, agenti che modificano le basi, agenti intercalanti;
2. Mutageni Indiretti, non interagiscono direttamente con il DNA ma possono originare a molecole reattive;
3. Promutageni, precursori che diventano attivi (mutageni diretti) solo una volta introdotti e metabolizzati nell'organismo.

Gli Analoghi delle basi sono mutageni chimici diretti con una struttura molecolare molto simile a quella delle basi azotate di DNA e RNA, per cui in fase di replicazione del DNA possono essere incorporate negli acidi nucleici al posto delle basi normali inducendo mutazioni. Essi possono cambiare nella propria forma tautomerica anche dopo esser stati incorporati causando mutazione per sostituzione di coppie di basi. Non tutti gli analoghi delle basi sono mutageni, un esempio è l'Azidotimidina (AZT), analogo della timina usato per curare l'AIDS.

Gli agenti che modificano le basi sono mutageni chimici diretti che modificano la struttura chimica e quindi le proprietà delle basi inducendo così cambiamenti anche in assenza di replicazione del DNA. Un esempio è l'Acido Nitroso HNO_2 che agisce come agente deaminante e quindi in grado di trasformare la citosina in uracile (che come si appaia con l'adenina), per cui viene prodotta una mutazione per transizione da C-G a T-A durante il processo replicativo.

Altri esempi di questo tipo di mutageni sono:

- Idrossilamina ($\text{NH}_2\text{-OH}$) che aggiunge un gruppo OH alla citosina (si produce quindi una transizione da CG a TA).
- Metilmetasulfonato (MMS), un agente alchilante che introducendo gruppi alchilici - CH_3 ,

CH₂-CH₃ sulle basi e determina per metilazione transizioni (Una guanina metilata si comporta come una adenina, una timina metilata come una citosina).

Gli agenti intercalanti sono mutageni chimici diretti che agiscono inserendosi tra due basi di una o di entrambe le eliche del DNA. La loro incorporazione distorce la struttura del DNA provocando l'inserzione o delezione di basi durante la replicazione del DNA o lo spostamento di lettura del codice in un gene strutturale (mutazione frameshift).

Le mutazioni causate da agenti intercalanti possono essere revertite da un trattamento con lo stesso agente. Esempi di agenti intercalanti sono Acridina, Proflavina, Bromuro di Etidio. Ai mutageni chimici indiretti appartengono quegli agenti chimici che sono in grado di formare specie reattive dell'ossigeno (mutageni ossidativi) o che interagiscono con la sintesi, la replicazione e il corretto mantenimento della struttura del DNA. Un esempio di tali agenti sono le diossine tra cui la TCDD risulta la molecola dotata di più spiccata tossicità esplicando una ampia gamma di effetti specie- e tessuto-specifici quali induzione a trasformazione neoplastica; tossicità a carico del sistema immunitario, del fegato, della pelle.

I Protomutageni sono composti relativamente polari (e quindi chimicamente poco reattivi) che possono essere attivati metabolicamente a forme più reattive in grado di interagire con i centri nucleofili del DNA. Il protomutageno più studiato è il benzene, uno dei composti chimici più usati nei paesi industrializzati, che metabolizzato primariamente nel fegato che lo trasforma in diversi metaboliti idrossilati ad anello aperto che vengono poi trasportati anche al midollo osseo, dove ha luogo un metabolismo secondario in cui vengono danneggiate le macromolecole cellulari attraverso la formazione di legami covalenti e l'induzione di danno ossidativo in grado di provocare diverse patologie quali anemia aplastica, leucemia, mieloma multiplo.

I diversi elementi dell'ambiente attuale contengono innumerevoli agenti Mutageni Ambientali:

Aria: benzene, idrocarburi policiclici aromatici (IPA) e loro derivati, idrocarburi idrogenati ecc.

Acqua: pesticidi, idrossifuranoni, triometani. idrocarburi policiclici aromatici (IPA) e loro derivati ecc.

Suolo. idrocarburi policiclici aromatici (IPA) e loro derivati, pesticidi, metalli pesanti ecc.

Cibo: aflatossine, amine aromatiche, idrocarburi policiclici aromatici, prodotti finali

della glicazione avanzata (AGEs) ecc.

Tutti i mutageni sono cancerogeni ma non tutti i cancerogeni sono mutageni. Tanto più è piccolo il gruppo chimico che viene trasferito, tanto più quell'agente è reattivo e quindi pericoloso.

Mutagen	Risk factors	Health behavior that prevents exposure
Sunlight 	Increased exposure to sunlight leading to thymine dimers in DNA	• Wear sunscreen • Avoid excess sun exposure • Reapply sunscreen every 2 h • Wear clothes/hat that cover skin
X-ray radiation 	• Multiple X-rays • Close proximity to X-rays	• Limit the number of X-rays to only ones that are necessary • Wear protective lead vest over areas not being X-rayed • Use alternative imaging devices
Tobacco products 	• Smoking • Chewing tobacco • Second-hand smoke	• Avoid smoking/tobacco products • Avoid being near smoke
Chemicals 	Increased exposure to carcinogenic/mutagenic chemicals	• Limit exposure • Dispose of chemicals properly • Wear protective gear
Nitrites	Increased consumption of processed meats, such as hot dogs, sausages, and bacon	Limit consumption of processed meats and grilled meats

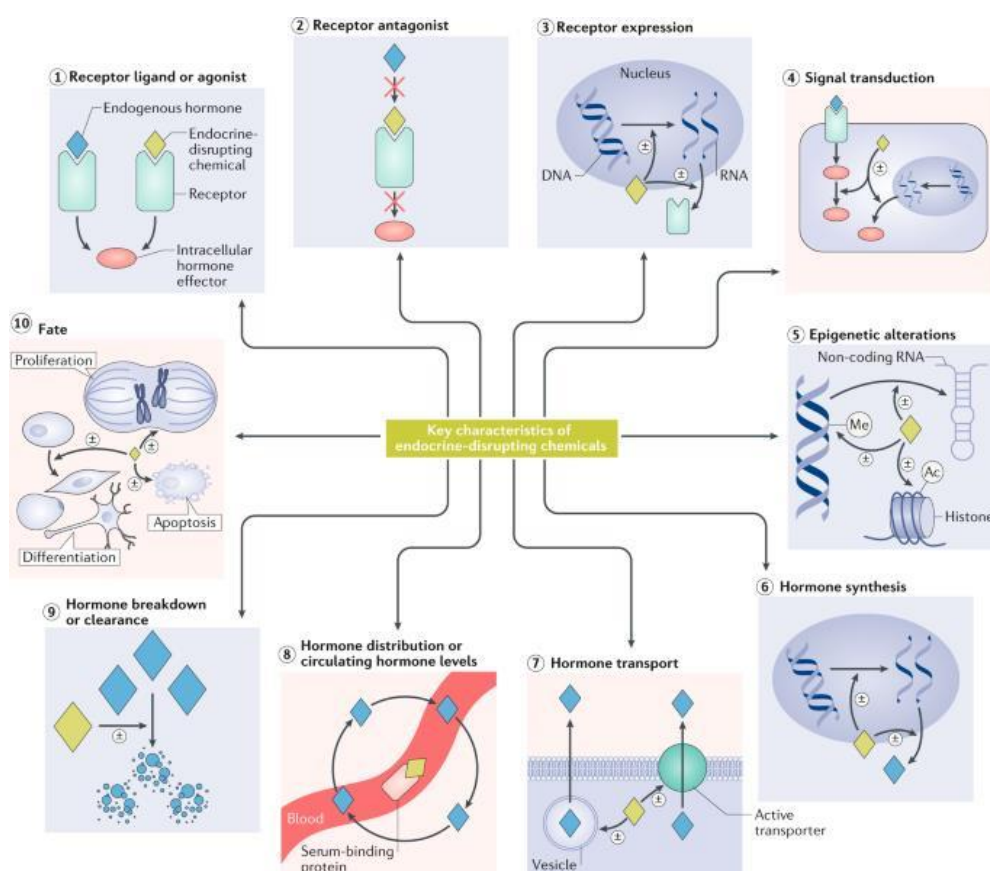
Interferenti Endocrini (IE)

Gli interferenti endocrini (IE) possono anch'essi agire sul DNA rappresentando una minaccia per la salute umana e per l'ambiente. Perturbatori o distruttori endocrini sono costituiti da un grande ed eterogeneo gruppo di sostanze chimiche che si possono trovare nell'ambiente come contaminanti persistenti (quindi facilmente concentrabili negli organismi viventi), in molti prodotti di consumo di uso comune ma anche come sostanze naturali. Tali interferenti riescono ad alterare il normale funzionamento del sistema endocrino in quanto possono "spegnere", "accendere" o "modificare" i segnali inviati dagli ormoni. Questi composti, spesso molto comuni nella vita quotidiana, oltre all'incremento del rischio di patologie riproduttive (infertilità, endometriosi, aborto, criptorchidismo, intersessualità, ipospadia, diminuzione della qualità del seme umano ecc.), possono generare alcuni tipi di tumori ormono-dipendenti (in particolare a seno e testicoli), possono essere causa di disturbi comportamentali nell'infanzia,

forse anche del diabete e dell'obesità, ma sicuramente interferiscono con lo sviluppo cerebrale. Le conseguenze negative generate dagli IE possono essere incrementate dall'effetto sommatoria (effetto cocktail) causato dalla possibile assunzione/esposizione multipla e cronica a diversi interferenti endocrini (Cumulative Risk Assessment).

Esempi di IE sono: alcuni PCB (PoliCloroBifenili), alcune Diossine, Perfluorottano Sulfonato (PFOS) e Acido Perfluorottanoico, Sale Ammonico (PFOA), Fitofarmaci soprattutto i pesticidi, Ftalati come il DEHP (Dietilesilftalato), Bisfenolo A (BPA), alcuni (Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA) FRA CUI

benzopireni e benzofluoranteni, alcuni Metalli presenti nell'ambiente come inquinanti.



Sistemi di riparazione del DNA

Introduzione

I sistemi di riparo del DNA sono dei meccanismi di correzione che le cellule procariotiche ed eucariotiche hanno sviluppato per rimediare a certi danni al DNA e quindi sono finalizzati al mantenimento dell'integrità del genoma e della relativa informazione genetica.

Sebbene mutazioni di diverso grado siano alla base dell'evoluzione, la

sopravvivenza degli organismi sarebbe minacciata se questi danni potenzialmente mutageni e citotossici, non venissero riparati. Il processo di riparazione del DNA è pertanto costantemente attivo nella cellula in quanto indispensabile per la sua sopravvivenza: protegge il DNA da alterazioni funzionali e mutazioni nocive. Ogni giorno le normali attività metaboliche e i fattori ambientali possono causare almeno 500,000 singole lesioni strutturali del DNA in ogni cellula. Non tutte le lesioni mutazionali possono essere riparate in maniera adeguata, di conseguenza senza i sistemi di riparazione le lesioni mutazionali si accumulerebbero e alla fine sarebbero letali per la cellula e l'organismo.

Tutti questi sistemi di riparo sfruttano l'attività di enzimi per operare le correzioni. Alcune lesioni mutazionali vengono riparate direttamente mentre in altri casi la zona danneggiata viene excisa e successivamente sostituita con un nuovo tratto di DNA neosintetizzato.

Tipi di danno e riparazione

Tipi di danno:

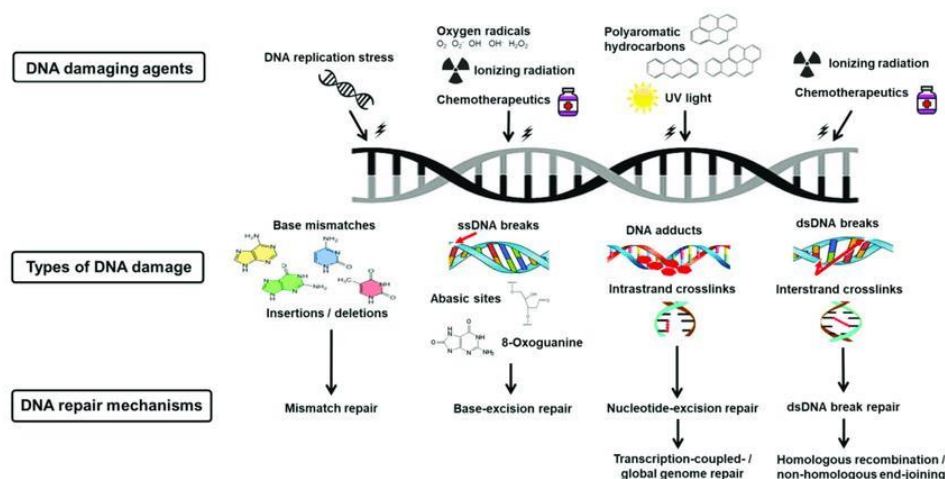
1. ossidazione di basi e generazione di interruzioni nei filamenti di DNA ad opera di specie reattive dell'ossigeno (ROS);
2. alchilazione di basi (generalmente metilazione);
3. idrolisi di basi (es. depurinazione e depirimidinazione);
4. mismatch, ossia appaiamento errato di basi avvenuta durante la replicazione del DNA.

La cellula reagisce al danno del DNA:

- aggirando il danno
- riparando il danno
- rimuovendo il danno

Con l'invecchiamento l'azione riparativa tende a perdere gradualmente di efficacia andando incontro a tre possibili stati:

- 1) Senescenza, in cui vi è un rallentamento del turnover e alterazioni biochimiche che possono condurre a patologie;
- 2) Apoptosi, morte cellulare programmata che può impedire l'instaurarsi malattie e ancor più l'involuzione allo stadio successivo;
- 3) Carcinogenesi.



Quando il danno riguarda solo uno dei due filamenti l'altro può essere usato come stampo per guidare la correzione tramite:

- Sistemi di riparo diretto (Fotoriattivazione e Transmetilazione)
- Sistemi per escissione (NER-BER-MMR):

Il sistema di riparazione diretto per fotoriattivazione o riparazione dipendente dalla luce, entra in azione a una determinata lunghezza d'onda quando i raggi UV formano dei dimeri di timina e pirimidina (CPD, uno dei principali danni indotti sul DNA dai raggi ultravioletti UV), tramite legami covalenti, riportandoli alla forma originaria monomerica tramite l'azione dell'enzima fotoliasi (utilizza l'energia della luce per tagliare questi legami), presente sia nei procarioti sia negli eucarioti inferiori ma non nell'uomo (fotoreversione enzimatica) o per fotoreversione spontanea a una lunghezza d'onda di 200-300nm (fotoreversione non enzimatica).

(CPD uno dei principali danni indotti sul DNA dai raggi ultravioletti (UV))

La Transmetilazione è un sistema di riparazione diretto che interviene in caso di danni da alchilazione in seguito all'azione di agenti alchilanti, i quali modificano i nucleotidi trasferendo gruppi alchilici, metilici o etilici in siti reattivi delle basi o dei fosfati. Questi gruppi possono essere rimossi e trasferiti su un altro substrato da enzimi specifici come l'enzima O6-metilguanina metiltransferasi che agisce sulla O6-metilguanina, base metilata altamente citotossica e non si appaia con la Citosina ma con la Timina.

Il riparo per escissione comporta appunto un'escissione di basi azotate (BER) o di nucleotidi indicato (NER) mentre i sistemi MMR intervengono per correggere errori di replicazione sfuggiti alla correzione di bozze.

- Riparazione per escissione di base (Base Excision Repair BER): riparazione del danno

di un singolo nucleotide, causato da ossidazione (es. Guanina in 8-oxo-guanina, analogo dell'adenina), alchilazione (perlopiù metilazione), idrolisi, deaminazione (es. della Citosina in Uracile) tramite un meccanismo enzimatico che parte dall'attivazione di una DNA-glicosilasi, la quale riconosce la base alterata e rompe il legame N-glicosidico, successivamente una AP-endonucleasi 1 (AP sta per sito a-purinico o a-pirimidinico o, più in generale, a-basico) elimina la base azotata lasciando il fosfato e il deossiribosio che vengono tolti da una liasi consentendo così alla DNA-polimerasi di legare il nuovo nucleotide infine incorporato nel filamento dalla ligasi. L'attività di rimozione e polimerizzazione simultanea della DNA polimerasi viene denominata "nick translation".

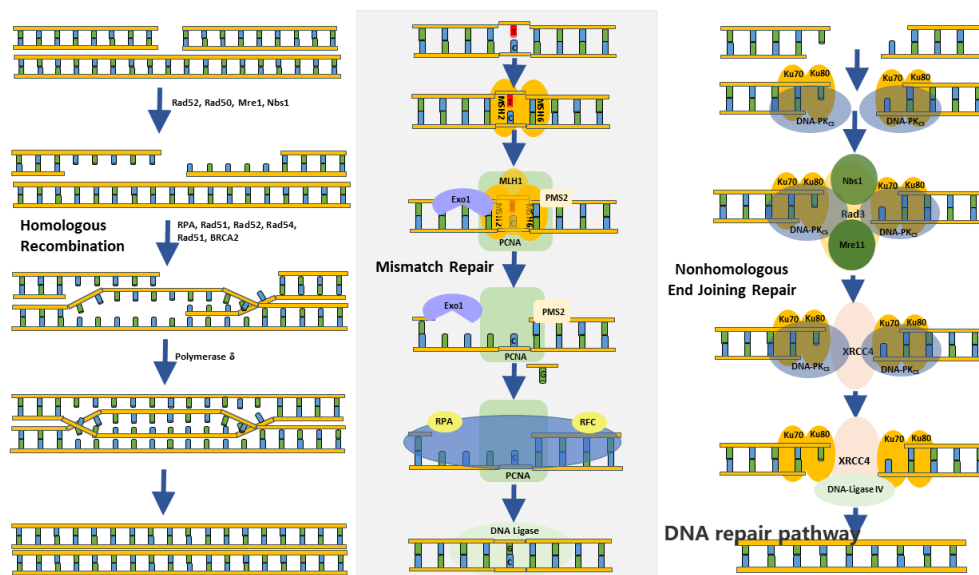
- Riparazione per escissione di nucleotidi (Nucleotide Excision Repair NER) presente sia nei procarioti che negli eucarioti, riparazione di un danno che coinvolge filamenti di 2-30 nucleotidi (lesioni voluminose come distorsioni dell'elica dovute alla formazione di dimeri di timina causati da luce UV).. Il complesso XPC-hHR23B (o Rad23B) riconosce il sito da riparare, le elicasi XPB e XPD srotolano l'elica, XPG e XPF (endonucleasi) tagliano ed eliminano l'oligonucleotide danneggiato, DNA-polimerasi sintetizza nuovamente il DNA nel sito del danno, DNA-Ligasi "ricuce" il filamento riparato. Una forma specializzata di NER, nota come riparazione associata alla trascrizione (Transcription-Coupled Repair TCR), dispiega enzimi NER ad alta priorità per geni che sono attivamente trascritti.
- Mismatch Repair (MMR), riparazione di errori di replicazione e ricombinazione genetica, sistema di riparo che interviene nella rimozione di basi erroneamente appaiate sfuggite alla correzione di bozze subito dopo la replicazione del DNA. Gli enzimi coinvolti in questo processo sono le proteine Mut studiate in E. Coli. Negli eucarioti questo meccanismo di riparo è simile ma ancora non del tutto chiarito. Gli enzimi coinvolti sono: MutS che riconosce il mismatch e vi si lega, MLH1 e PMS2 attivati dal complesso DNA-MSH6 e MSH2, che attiva a sua volta MutH il quale, in combinazione a una endonucleasi, taglia il frammento implicato dopo che la elicasi ha aperto la doppia elica, la DNA-polimerasi può ora aggiungere il frammento idoneo e la ligasi unirlo. Di questi quelli generalmente mutati e coinvolti nella cancerogenesi sono MSH2 e MLH1.

Nell'uomo sono stati identificati quattro “geni mutatori” implicati in questo processo in quanto la loro perdita causa un accumulo di mutazioni nel genoma: hMSH2, hMLH1, hPMS1 hPMS2.

La rottura del doppio filamento (Double-Strand-Break DSB), ossia di un cromosoma, rappresenta un tipo di danno al DNA particolarmente pericoloso per le cellule in divisione. Esistono due meccanismi capaci di riparare questo danno: Homologous End-Joining – HEJ (ricombinazione omologa o riparazione per ricombinazione o riparazione assistita da stampo o unione omologa delle estremità) e Non-Homologous End-Joining - NHEJ (saldatura delle estremità non omologhe, unione non omologa delle estremità).

- HEJ) La riparazione per ricombinazione (Homologous End-Joining) richiede la presenza di una sequenza identica (o quasi) che possa essere usata come stampo. Il complesso enzimatico che esegue tale processo è praticamente identico a quello del crossing-over durante la meiosi. Tale processo riparativo viene utilizzato principalmente durante la replicazione o a duplicazione avvenuta. Ciò consente l'impiego come stampo del cromatide fratello neosintetizzato portando a un completo ripristino del tratto rotto.
- NHEJ) Il Non-Homologous End-Joining può verificarsi a tutti gli stadi del ciclo cellulare, nelle cellule di mammifero risulta il principale meccanismo fino a quando la replicazione del DNA consente la riparazione HEJ. L'assenza dello stampo nella NHEJ determina infatti il rischio di perdita di sequenza e quindi tale riparazione può essere mutagenica (a seconda del tratto perduto le conseguenze saranno più o meno gravi); rappresenta pertanto più che altro un sistema di emergenza in cui la cellula, pur di ricostituire l'integrità del cromosoma accetta di perdere parte dell'informazione, Va però anche considerato che la comune assenza di “junk DNA (DNA spazzatura), un NHEJ mutagenico risulta probabilmente meno pericoloso di una riparazione con stampo di sequenze presenti in copia multipla che potrebbero produrre riarrangiamenti cromosomici indesiderati. Nel NHEJ intervengono il complesso Ku70/Ku80 e la protein chinasi DNA-PK che interagiscono tra loro e riconoscono le estremità della rottura a doppio filamento. Le estremità possono essere processate, seppur in maniera limitata, dal complesso MRN che presenta attività esonucleasica. Le proteine XRCC4 e DNA

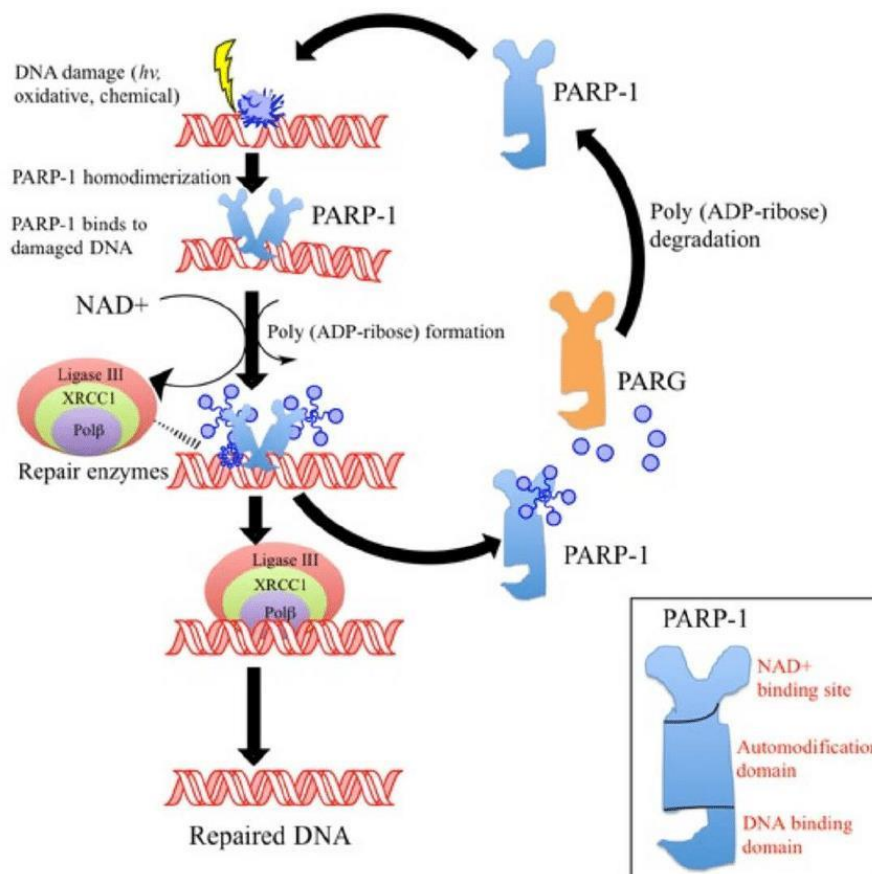
ligasi 4 infine ricongiungono le due estremità. Tale sistema enzimatico viene anche utilizzato nei linfociti B per riunire rotture generate dalle proteine RAG (Recombination Activating Gene) durante la ricombinazione VDJ (passo cruciale nella produzione della diversità degli anticorpi da parte del sistema immunitario).



PARP1

La Poly [ADP-ribose] polymerase 1 (PARP-1) conosciuta anche come NAD + ADP-ribosyltransferase 1 o poly[ADP-ribose] synthase 1, è un enzima codificato nell'uomo dal gene PARP1. Tale enzima è il più abbondante della famiglia PARP (di cui ne utilizza il 90% del NAD+)

PARP1 agisce primariamente nella rilevazione dei danni al DNA e quindi facilita la scelta del percorso di riparazione. PARP1 contribuisce all'efficienza della riparazione mediante ADP - ribosilazione degli istoni che porta alla decompattazione della cromatina e interagendo/modificando più fattori di riparazione del DNA. PARP1 è pertanto implicato nella regolazione di diversi processi di riparazione del DNA, inclusi i percorsi di riparazione del DNA.



Sistema di riparo SOS

Gli enzimi replicativi sono in grave difficoltà quando una base dell'elica di DNA stampo non può codificare per la base complementare e se il danno non viene corretto può anche divenire letale. Il sistema di riparo SOS rappresenta il principale sistema di riparo di *E. coli*; in presenza di grossi danni al DNA agisce bloccando il processo replicativo. Tale sistema SOS è una sorta di risposta d'emergenza a un danno mutazionale, coinvolge più di 20 geni ed è controllato da due geni LexA, che è un repressore che regola la propria espressione e quella dei geni SOS, e RecA che è un regolatore dell'induzione della risposta SOS: si generano dei tratti di DNA a singolo filamento a cui si lega la proteina RecA che si attiva e stimola la proteina LexA ad autoscindersi mediante un taglio auto catalitico, in tal modo viene eliminata la repressione dei geni che trascrivono per la riparazione.

Checkpoint del ciclo cellulare

I checkpoint del ciclo cellulare eucariotico sono meccanismi di controllo che ne assicurano la corretta progressione: controllano di avere completato correttamente la fase precedente prima di iniziare la fase successiva. Ogni checkpoint funge da potenziale punto di stop del ciclo

cellulare, qualora la valutazione non soddisfi condizioni favorevoli per l'avanzamento corretto del ciclo cellulare. Esistono diversi tipi di checkpoint, che si dividono in intrinseci, che agiscono in un ciclo cellulare imperturbato, ed estrinseci, che si attivano solo in risposta ad agenti esterni. I checkpoint del ciclo cellulare eucariotico sono meccanismi di controllo che ne assicurano la corretta progressione: controllano di avere completato correttamente la fase precedente prima di iniziare la fase successiva. Ogni checkpoint funge da potenziale punto di stop del ciclo cellulare, qualora la valutazione non soddisfi condizioni favorevoli per l'avanzamento corretto del ciclo cellulare. Esistono diversi tipi di checkpoint, che si dividono in intrinseci, che agiscono in un ciclo cellulare imperturbato, ed estrinseci, che si attivano solo in risposta ad agenti esterni.

Variabilità genetica: Polimorfismi genetici

Descrizione

Il termine polimorfismo deriva dal greco poly (multiplo) e morph (forma) e in genetica descrive una variazione ereditabile nelle sequenze di DNA presente in una popolazione con una frequenza maggiore dell'1%. Al di sotto di tale soglia si è soliti parlare di variante rara (SNV – Single Nucleotide Variant). Diversamente dalla mutazione, il polimorfismo indica un evento che comporta varianti alleliche di un determinato gene che lascia però inalterata la funzionalità del gene stesso (implicano quindi necessariamente differenze di genotipo ma non di fenotipo). A tale regola fanno eccezione gli SNPs in quanto possono anche fungere da mutazioni puntiformi che cambiano solo un nucleotide per l'aggiunta, perdita o sostituzione di una base del DNA.

I polimorfismi si trovano normalmente nei pressi di un gene ricercato (gene candidato) e vengono ereditati con esso. Il gene candidato si ipotizza sia responsabile dello sviluppo di una determinata patologia e viene definito tale in base a due caratteristiche;

- 1) posizione nel genoma, determinata tramite l'individuazione di tratti genetici associati alla malattia, detti marcatori genetici e assenti negli individui sani;
- 2) funzione alterata del polipeptide derivante, possibile causa dell'insorgenza della patologia.

Per tale ragione risultano molto importanti per comprendere alcune variazioni del fenotipo, per l'individuazione di determinate predisposizioni anche patologiche fornendo a es. informazioni

sul modo in cui una determinata malattia si potrebbe sviluppare e sui rischi di sua trasmissione alle generazioni successive. In altre parole i polimorfismi possono fungere da marcatori genetici.

Marcatori genetici

I marcatori genetici sono geni noti (già mappati) che appunto marcano il territorio, ovvero il cromosoma. Parti di DNA che giacciono vicine in un cromosoma tendono a essere ereditate insieme, per questo i marcatori, possono essere utilizzati per determinare il modo con cui un gene (es. gene candidato) non ancora esattamente localizzato viene ereditato. Più marcatori si hanno a disposizione, più risulta facile localizzare la posizione di un nuovo gene.

Un marcatore genetico ideale presenta le seguenti caratteristiche:

polimorfia, quanto più è alto il numero di alleli posseduti tanto più risulta utile nello studio genetico:

indipendenza dall'ambiente da cui non deve essere influenzato;

stabilità di espressione anche se nel caso del DNA ciò non risulta fondamentale in

quanto noi non si analizzano i prodotti ma il materiale genetico;

dispersione nel genoma ossia possibilmente localizzato su tutti i bracci di tutti i

cromosomi in modo da coprire il più possibile l'intero genoma:

ereditabilità con modalità mendeliana semplice;

determinazione facile nell'analisi sperimentale, più lavoro di ricerca della posizione del gene si ha diventa onerosa e faticosa l'analisi che invece deve essere veloce ed economica;

eterozigosi, al fine di poter evidenziare parentali e ricombinanti;

riproducibilità, in tal modo lo stesso marcatore anche se utilizzato in diversi laboratori consente i dati confrontabili.

Esistono diversi tipi di marcatori genetici:

1. Marcatori Morfologici, es. caratteri mendeliani (forma della foglia, colore della cariosside, presenza o assenza di corna), non vengono più utilizzati in particolare nell'uomo.

2. Marcatori Biochimici o Proteici, es. isoenzimi e gruppi sanguigni, utilizzati fino agli anni 70 poi hanno lasciato il posto ai marcatori molecolari.

3. Marcatori genetici Molecolari o Marcatori a DNA, sono la classe più recente di marcatori, consistono in sequenze variabili di DNA (non sempre codificante) facilmente identificabili in quanto di esse si conosce la posizione su un determinato gruppo di associazione (costituito da geni associati ovvero localizzati sullo stesso cromosoma e non segreganti indipendentemente) e la distanza da altri marcatori. Sono ereditati con modalità mendeliana che può essere monitorata mediante l'utilizzo di opportune tecniche. Questi sono i marcatori più utilizzati nella ricerca di un gene candidato.

RFLP

Restriction Fragment Length Polymorphism, polimorfismi di lunghezza di frammenti di restrizione, indicano la variazione di lunghezza di sequenze di nucleotidi a seguito dell'azione di enzimi di restrizione che vengono fatti reagire con il campione di DNA da analizzare. Gli enzimi di restrizione sono di origine batterica e sono nucleasi che i batteri utilizzano per contrastare ed eliminare l'invasione interna di DNA estraneo extracellulare. Tali enzimi agiscono tagliando il DNA tutte le volte che incontrano una determinata sequenze di taglio; se il sito di taglio viene alterato da una mutazione, essi non entrano in azione e si origina un RFLP. L'analisi degli RFLP risulta però essere un processo lungo e che richiede una grande quantità di DNA di alta qualità. Essa si basa infatti su una serie complicata di passaggi: separazione del DNA, costruzione di una sonda, frammentazione del DNA, corsa elettroforetica, southern blotting (metodo di trasferimento di acidi nucleici e proteine su carrier), ibridazione, autoradiografia, L'analisi di RFLP è stata la base per primi metodi di fingerprinting genetico e tramite essa è possibile anche individuare gli SNP.

STR (STRP) e VNTR

Short Tandem Repeat Polymorphism o DNA Microsatelliti, e Variable Number of Tandem Repeats, classe molto importante di DNA polimorfico che consiste in sequenze variabili ripetute in tandem (adiacenti fra loro) in zone non codificanti del DNA. La differenza tra le diverse varianti non è data da un cambio nucleotidico (come accade per RFLP e SNP) ma dalla ripetizione in tandem di specifiche sequenze nucleotidiche; ognuno di essi possiede alle estremità delle sequenze che sono uniche.

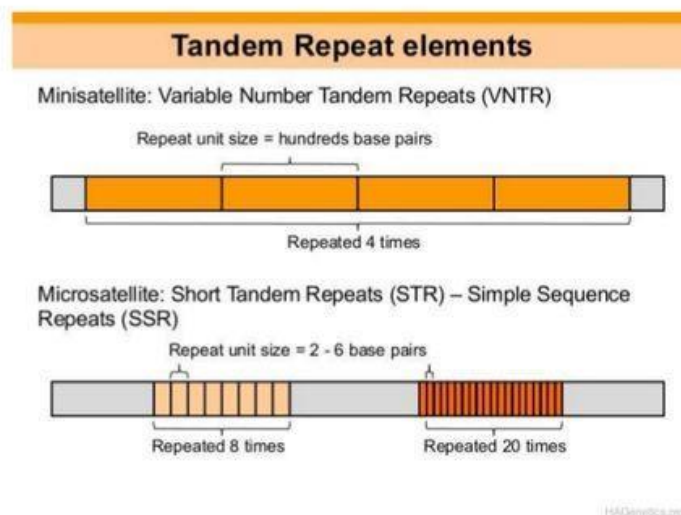
Gli STR sono costituiti da di 2-6 pb ripetute 20-30 volte (per un totale di circa 150 pb), gli VNTR da 10 -100. Le sequenze nelle regioni di DNA non codificante in individui diversi

presentano mediamente una differenza (base alterata) ogni 200-300 nucleotidi.

Le sequenze ripetute del nostro genoma sono diverse e di varia origine e rappresentano circa il 44% del DNA. Quelle ripetute in tandem sono caratterizzate appunto dal trovarsi adiacenti l'una all'altra mentre le sequenze intersperse possono anche trovarsi in punti distanti tra loro (es. i retrotrasposoni). STR e VNTR sono invece “dispersi” nel genoma ossia localizzati su tutti i bracci di tutti i cromosomi e anche per questo sono ampiamente utilizzati come marcatori genetici nello studio di geni responsabili di un determinato fenotipo. Si calcola che esistano circa 50.000 differenti regioni microsatellite distribuite uniformemente lungo tutto il DNA a distanze tra loro ravvicinate, tali da permettere una mappatura di tutti i cromosomi.

I microsatelliti sono altamente variabili da individuo a individuo perciò nella popolazione esiste un numero elevato di alleli per ognuno di questi repeats e pertanto è statisticamente improbabile che tutti gli individui affetti da una determinata patologia ereditino la stessa variante di questo polimorfismo che potrà essere altresì presente in un soggetti sani. I microsatelliti maggiormente informativi sono quelli presenti in eterozigosi. Gli individui eterozigoti per un certo polimorfismo sono importanti in quanto permettono di stabilire la frequenza con cui i due alleli vanno incontro a ricombinazione rispetto a un certo marcatore qualsiasi. Per poter fare una diagnosi precoce (prenatale in alcuni casi) o comunque pre-sintomatica della malattia è indispensabile che il genitore, che può aver trasmesso al figlio l'allele patologico, sia eterozigote per il polimorfismo in stretta associazione con la malattia; esaminando i familiari è in genere possibile stabilire quale dei due alleli è associato con l'allele responsabile della malattia.

La tecnica per analizzare i microsatelliti è molto semplice e si basa su PCR seguita da elettroforesi su gel di agarosio e sequenziamento automatico.



SNP

Single Nucleotide Polymorphism), variazioni polimorfiche di singoli nucleotidi, rappresentano il gruppo di marcatori più recenti, sono i più abbondanti e distribuiti nei genomi. Essi corrispondono a differenze di un singolo nucleotide nella sequenza di DNA tra individui appartenenti alla stessa specie e quindi vengono considerati come la base molecolare della maggior parte delle differenze tra individui della stessa specie. Per questo motivo attraverso specifiche tecniche di analisi vengono oggi ampiamente utilizzati soprattutto nelle indagini genetiche.

La maggioranza delle differenze tra individue deriva dagli SNPs. Essi sono i marcatori con la più alta densità all'interno del genoma, con una frequenza di circa 1 ogni 1000 pb, rappresentano ca. il 90% dei polimorfismi, sono presenti nel genoma umano in un nr. superiore a 4 milioni con una frequenza pari a 1/700 nucleotidi. Lo 0,1% di materiale ereditario che costituisce la "variabilità interindividuale" che è dovuta molto spesso a queste sostituzioni di singoli nucleotidi che compongono il nostro DNA, ossia agli SNPs.

Il 90% degli SNP è presente in tutti i popoli ma con frequenze variabili. Essi possono trovarsi in regioni del DNA non codificanti e codificanti, in quest'ultime la loro presenza può comportare la comparsa di anomalie dell'espressione e/o della struttura della proteina sintetizzata (come per mutazione puntiforme).

Il loro effetto informativo risulta notevole se li si considera nel loro complesso e non singolarmente. Gruppi di queste piccole variazioni infatti, sommandosi tra loro, sono causa di

suscettibilità o di resistenza a molte malattie quali diabete, alzheimer, cancro, aterosclerosi. Essendo delle variazioni che si mantengono pressoché stabili nel corso dell'evoluzione, è possibile seguire con una certa facilità la loro trasmissione attraverso le generazioni. Questo rappresenta un notevole vantaggio negli studi di popolazione mirati alla ricerca di una specifica malattia genetica.

Gli SNPs quindi oltre a rappresentare degli ottimi marcatori neutri di geni candidati (polimorfismi in senso stretto), possono avere un ruolo diretto nella predisposizione e causa alle malattie (mutazioni puntiformi).

Grazie alle nuove tecnologie di analisi genetica si è visto che gli SNPs svolgono un ruolo importantissimo nell'indurre la suscettibilità delle risposte dell'organismo nei confronti di stimoli esogeni ed endogeni, essi infatti sono in grado di:

- condizionare le risposte dell'organismo es. regolando l'espressione genica e quindi determinando una maggiore o minore produzione di una proteina;
- indurre delle variazioni a carico della funzionalità della proteina stessa, es. possono causare la sintesi di una proteina inattiva o parzialmente funzionante;
- causare la predisposizione a un certo tipo di patologie;
- influenzare la suscettibilità di un organismo ad un determinato alimento una volta ingerito, ricoprendo quindi un ruolo determinante nelle intolleranze alimentari;
- influenzare la risposta ai patogeni, agli agenti chimici, ai farmaci.

Oggi gli SNPs vengono studiati principalmente tramite i microarray di DNA (chip a DNA).

La maggior parte degli SNPs sono stati identificati durante le fasi del progetto genoma umano e del successivo progetto Hap-Map ottenendo così dei loro database:

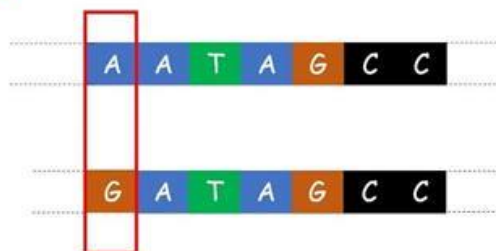
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/index.html>

• Human Genome Variation Database (HGVBbase) <http://hgvbbase.cgb.ki.se/>

TSC: The SNP Consortium <http://snp.cshl.org/>

Gli SNPs sono indicati anche con la sigla RS (RefSNPs) seguita da un codice numerico.

SNP or Mutation?



Still confused then watch this

Frequenza dei polimorfismi genetici e medicina predittiva

Le frequenze dei polimorfismi genetici all'interno di una popolazione sono controllate da diversi fattori di cui il più importante sembra essere la selezione naturale: se la frequenza di due o più polimorfismi rimane costante, si parla di polimorfismo bilanciato e ciò deriva una selezione equilibrante (balancing selection).

Oltre il 30% dei loci del genoma mostrano varianti polimorfiche nella popolazione ma solo una piccola parte delle variazioni nella sequenza di DNA è causa di malattia, la maggior parte aumenta la variabilità genetica.

Le nuove conoscenze di cui oggi disponiamo riguardo il genoma umano, hanno permesso lo sviluppo della cosiddetta " Medicina Predittiva ", in grado cioè di fornire una stima del rischio di un individuo di sviluppare una determinata patologia. nell'arco della sua vita, basandosi sulle informazioni genetiche dell'individuo stesso (analisi di linkage). Si può così effettuare screening prenatale e neonatale di diverse patologie frequenti nella popolazione e l'individuazione di portatori sani e quindi predire il rischio di figli affetti; ciò risulta importante nei casi di malattie a insorgenza tardiva, malattie monogeniche e malattie poligeniche.

Studi di associazione e analisi genetica

Negli studi di associazione si valuta a livello di popolazione se esista una associazione statisticamente significativa tra un determinato fenotipo e un particolare allele (o genotipo) al fine di individuare i geni coinvolti nella determinazione fenotipica: si confrontano gruppi di individui della stessa popolazione che presentano caratteristiche fenotipiche differenti (es. capelli chiari vs capelli scuri o una malattia) analizzandoli per una batteria di marcatori genetici (su tutto il genoma nei recenti studi di associazione genome-wide GWAS Genome-Wide

Association Study). Differenze statisticamente significative nella frequenza di alleli (o genotipi) tra i gruppi potrebbero indicare che quel marcatore si trova in corrispondenza di un gene rilevante per il fenotipo indagato.

Gli studi di associazione sono importanti a es. quando la ricerca riguarda malattie multifattoriali, rendono possibile la costruzione di un Aplotipo ossia di set di varianti alleliche (diversi tipi di polimorfismo) che caratterizza un cromosoma o porzione di esso che tendono a essere trasmessi assieme (come un segmento unico), posto in prossimità di un locus di interesse (o all'interno del loci stesso), coincidenti con uno di riferimento:

Un'analisi genetica aiuta a identificare una mutazione in un particolare gene o cromosoma ed è in grado quindi di fornire notizie precise su un determinato corredo genetico. Un vantaggio dell'analisi genetica risiede nel fatto che le mutazioni genetiche sono spesso trasmesse all'interno della famiglia pertanto i risultati ottenuti per un individuo possono rivelare informazioni genetiche circa altri membri della famiglia, in particolare in relazione al loro rischio genetico di contrarre la malattia.

Grazie pertanto allo sviluppo di nuovi metodi diagnostici e prognostici, lo studio dei polimorfismi, localizzati nei pressi di geni candidati e quindi associati a una aumentata suscettibilità verso specifiche patologie, è possibile elaborare percorsi preventivi e terapeutici personalizzati e

prevenzione altamente personalizzati e quindi efficaci.

Lo studio dei polimorfismi trova ampio spazio e campo di applicazione anche nella farmacogenetica, che studia come la variabilità genetica inter-individuale è in grado di alterare il metabolismo (e quindi gli effetti) di un determinato farmaco. Il profilo genetico di un individuo risulta pertanto importante nel determinare anche il metabolismo dei farmaci e la variabilità di risposta agli stessi al fine di giungere a una terapia individuale, basata sull'utilizzo di farmaci e relativi dosaggi specifici per ogni individuo.

Un ulteriore esempio è il test che permette di identificare trentacinque polimorfismi di due geni per la P450 che sono coinvolti nel metabolismo ossidativo di alcuni farmaci come i FANS.

Alcune varianti alleliche di questi geni determinano una ridotta o assente attività enzimatica della P450 per cui questi farmaci non vengono metabolizzati in tempi brevi determinando così un aumento della tossicità negli individui che presentano questa variante allelica; conoscere

questa predisposizione permette di dosare il farmaco in maniera tale da evitare gli effetti tossici o collaterali.

Lo studio sul genoma ha fatto emergere un aspetto molto importante, che è alla base di scienze di ultima generazione, la Nutrigenetica e la Nutrigenomica, che mettono in relazione le caratteristiche genetiche di un individuo con la sua alimentazione e mirano a elaborare una nutrizione personalizzata, basata sulle caratteristiche del proprio genoma.

Un determinato polimorfismo può quindi essere associato a una specifica malattia o a una risposta a un farmaco ma anche a un alimento e a specifici stili di vita, risultando pertanto una importante discriminante fra possono quindi essere associati alla salute e malattia.

Lo studio dei polimorfismi trova applicazione in diversi ulteriori ambiti quali:

Medicina legale, utilizzato soprattutto per il riconoscimento, tramite il profilo genetico, del grado di parentela, per l'identificazione di vittime di catastrofi e persone scomparse nonché autori di crimini;

Zootecnia e agricoltura, settori in cui si possono effettuare modifiche genetiche (es. OGM), con i relativi pro e contro, arrivando all'inserimento di geni batterici, come nel caso del mais, per produrre tossine contro insetti oppure nella produzione di molecole di interesse, quali insulina o l'alfa1antitripsina, da parte di individui transgenici come batteri e mammiferi.

Tecniche di analisi biomolecolari

Introduzione

Quanto fin qui descritto nei precedenti capitoli è possibile grazie a un insieme di moderne tecniche biomolecolari specifiche per ciascun tipo di applicazione.

La nuova tecnologia di analisi dei polimorfismi consente di analizzare e manipolare il patrimonio genetico di un organismo. Risulta infatti possibile studiare la struttura e l'espressione di un gene e dei suoi elementi di controllo, inoltre partendo da un fenotipo di interesse se ne può identificare i geni responsabili.

Tecniche di notevole importanza nello studio dei polimorfismi sono: PCR (Polymerase Chain Reaction), Elettroforesi su gel di Agarosio. Sequenziamento. Microarray di DNA (Chip a DNA).

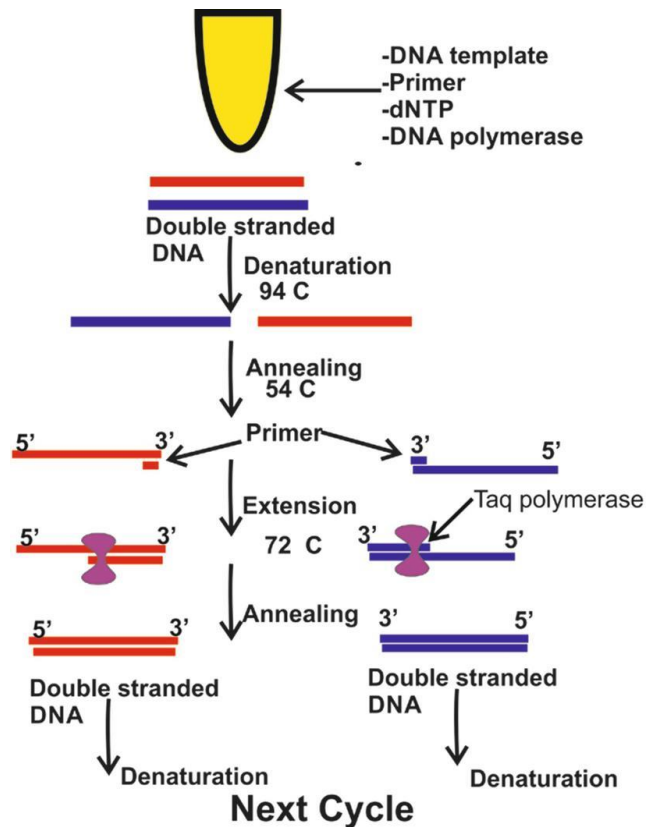
PCR

La PCR (Polymerase Chain Reaction) è una metodica altamente sensibile creata nel 1985 dal Biochimico statunitense Kary Mullis, che gli valse il premio Nobel per la chimica nel 1993, e la sua prima applicazione fu uno studio prenatale sull'anemia falciforme. È una metodica molto semplice che offre la possibilità di ottenere, a partire da un campione di DNA ridotto, un numero elevato di copie di una determinata sua regione di interesse, mediante un processo di amplificazione enzimatica in vitro.

Ogni ciclo si compone di tre fasi;

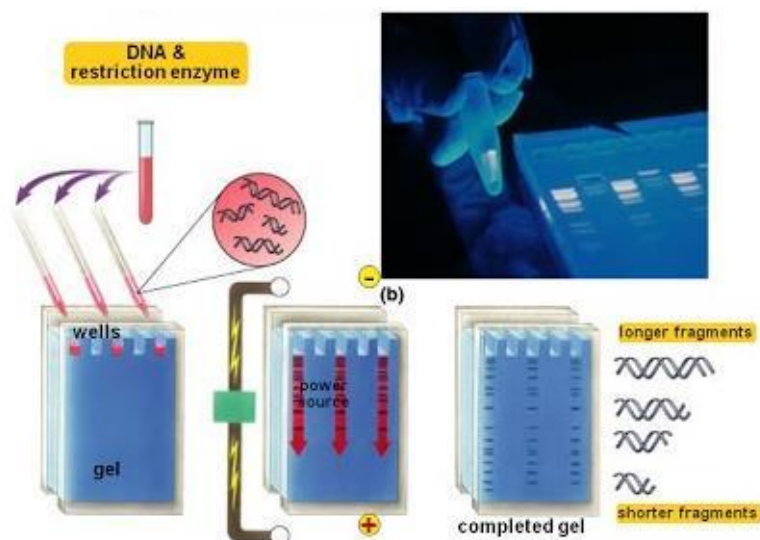
- 1) Denaturazione iniziale del DNA, i due filamenti della doppia elica che servono da stampo si separano mediante incubazione della soluzione a 95° per un tempo di circa 5 minuti,
- 2) Appaiamento dei Primers (Annealing), ottenuto tramite il raffreddamento della soluzione a una temperatura di 37 - 55 °C che consente a ciascuno dei primers di ibridizzarsi con la sequenza
- 3) specifica sul template di DNA;
- 4) Estensione, la soluzione viene riscaldata a 72° per circa 10 minuti ottenendo l'optimum di temperatura per la Taq Polimerasi e quindi la sintesi di DNA.

Le tre fasi si ripetono per diversi cicli (35-40) e a ogni ciclo il numero di copie della sequenza specifica compresa tra i due primers raddoppia. Il DNA genomico del campione e il DNA neo-amplificato fungono entrambi da filamento stampo per i cicli successivi, pertanto la PCR procede in maniera esponenziale. Negli ultimi cicli l'efficienza della reazione si riduce sempre di più in quanto la quantità di enzima diventa insufficiente per estendere il grande numero di ibridi primer-stampo e allo stesso tempo l'elevata concentrazione di singole catene del filamento stampo favorisce la riassociazione delle catene per complementarietà con conseguente sottrazione delle stesse alla reazione di PCR.



Elettroforesi su gel di agarosio

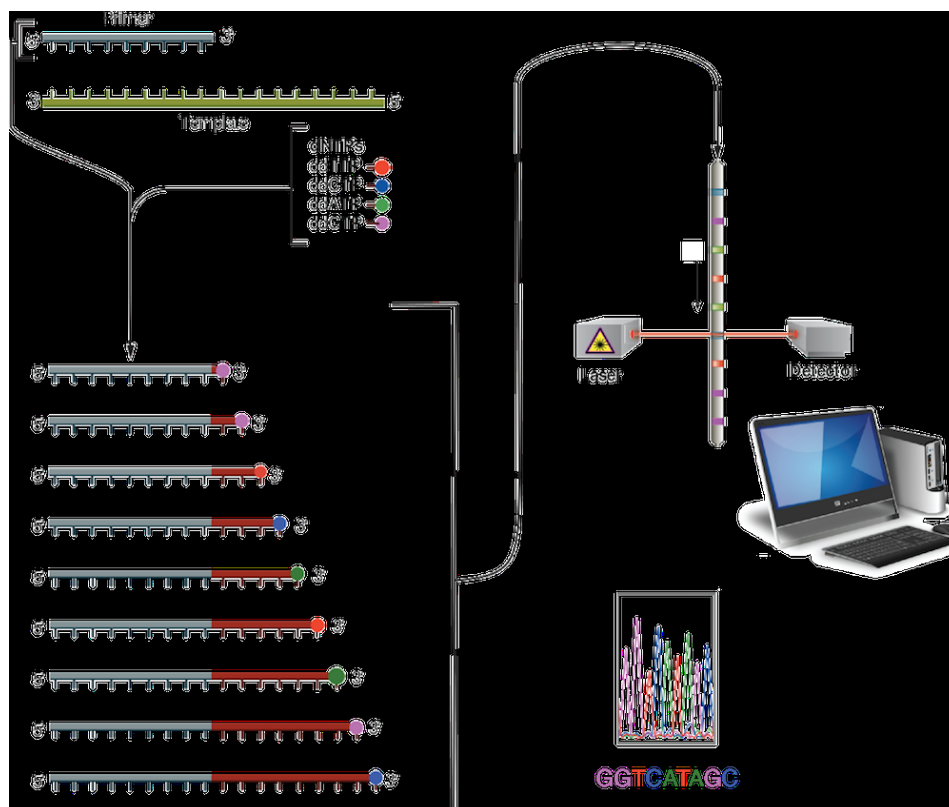
Agarose gel electrophoresis), tramite il meccanismo di elettroforesi, i campioni (ionizzati in base al pH della soluzione), sottoposti all'azione di un campo elettrico vengono fatti correre insieme a uno standard (marcatore di peso molecolare noto). Nel passare attraverso i pori del gel le molecole di DNA subiscono un "effetto setaccio", in base alla loro dimensione e una volta separate vengono visualizzati mediante opportuni metodi di colorazione (Bromuro di Etidio) o di rivelazione. Il pattern di migrazione viene poi specificatamente fotografato e quindi studiato comparando con lo standard di riferimento oppure il gel viene introdotto e analizzato in un sequenziatore automatico.



Sequenziamento del DNA

Le molecole di DNA si distinguono principalmente per la loro particolare sequenza di coppie di basi da cui l'importanza di identificare tale sequenziamento.

Tutti i protocolli per il sequenziamento prevedono la generazione, mediante elettroforesi su particolari gel o matrici, di una serie di molecole di DNA a filamento singolo ognuna con una lunghezza superiore di una sola base rispetto alla precedente. Nella matrice si evidenzia, tramite specifiche reazioni colorimetriche, una "scala" graduate di bande di lunghezze crescente che consentono di "leggere" i nucleotidi ottenendo così la sequenza del DNA. Oggi il gel viene introdotto in un sequenziatore automatico, scannerizzato e, tramite fascio di luce laser, viene prodotta un'immagine a monitor sotto forma di bande fluorescenti di colori diversi che consente l'immediata identificazione grafica degli alleli presenti per ciascun individuo e quindi specifiche mutazioni puntiformi e polimorfismi.



Microarray

I Microarray s di DNA (geni chip, chip a DNA, biochip o matrici ad alta densità) sono dei piccoli supporti solidi suddivisi in celle (vetrino da microscopia di dimensioni 75x25x1mm, chip di silicio, sottili membrane di nylon) sui quali vengono immobilizzate, in posizioni prefisse e note, migliaia di sequenze di DNA fungendo così da sonde (probe). Tali array permettono di esaminare simultaneamente la presenza di moltissimi geni all'interno di un campione di DNA (che spesso può rappresentare anche l'intero genoma o trascrittoma di un organismo).

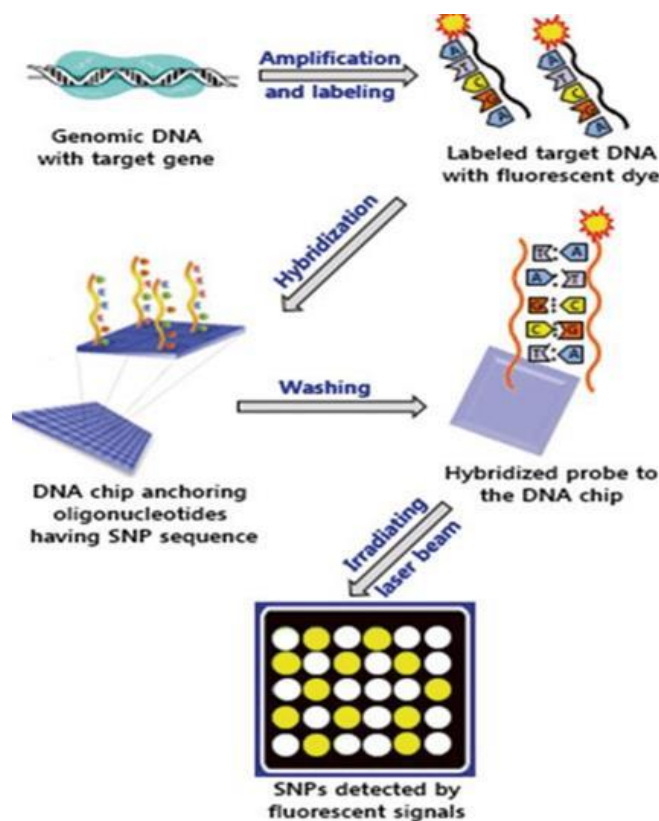
Il Microarray si basa sull'ibridazione inversa molecolare (il segmento del DNA target viene marcato e scisso e in seguito unito a un segmento di diversa origine) fra sequenze nucleotidiche complementari ossia fra le sonde fisse e la sequenza di acido nucleico bersaglio mobile in soluzione e marcata con un fluorocromo. Quando due sequenze complementari si "riconoscono" si formano legami idrogeno fra basi complementari e se la complementarità è completa la doppia elica viene mantenuta anche innalzando di poco la temperatura. Mediante una luce laser si evidenzia la fluorescenza che viene rilevata ed elaborata sotto forma di un'immagine dai sistemi informatici collegati, i quali in tal modo misurano con precisione la quantità di sonda legata in ciascuna posizione del vetrino e generano un profilo di espressione

genica per ogni tipo cellulare.

La misura dell'espressione genica mediante microarray riveste un notevole interesse sia nel campo della ricerca di base sia nella diagnostica medica in particolare di malattie a base genetica dove l'espressione genetica di cellule sane viene comparata con quella delle cellule malate.

Il DNA bersaglio può essere anche un cDNA (DNA complementare) ossia DNA a doppia elica sintetizzato a partire da un campione di RNA messaggero maturo. In tal modo i microarray permettono l'analisi dell'espressione genica monitorando in una sola volta gli RNA prodotti da migliaia di geni. Gli mRNA vengono prima estratti dalle cellule, convertiti in cDNA tramite l'enzima trascrittasi inversa per poi proseguire nel solito procedimento di marcatura e ibridazione inversa con sonda fissa e nota.

Le principali applicazioni dei microarray sono l'analisi dei polimorfismi SNP, il confronto di popolazioni di RNA di cellule diverse, lo screening di sequenze senso e antisenso nella ricerca degli oligonucleotidi usati in campo farmaceutico, utilizzo in nuove metodologie di sequenziamento del DNA.



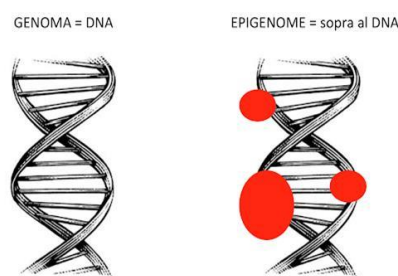
Epigenetica, nutrigenetica e nutrigenomica

Epigenetica

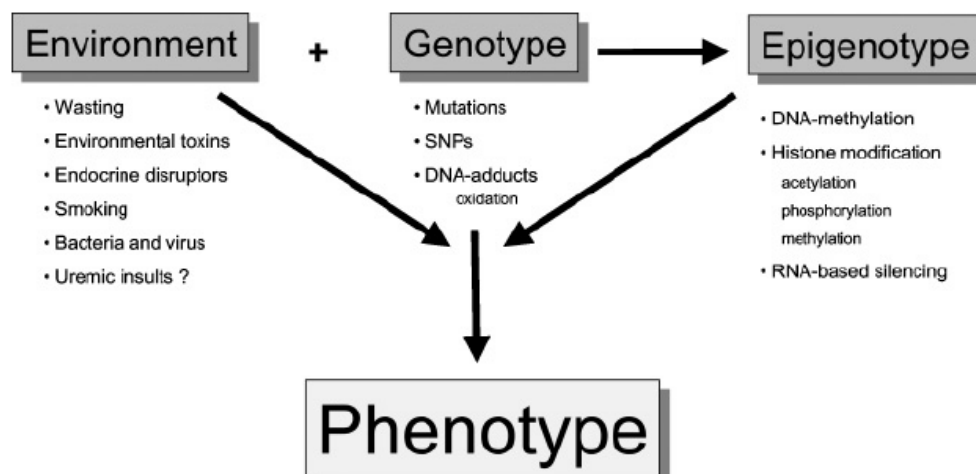
Descrizione

L'epigenetica rappresenta una scienza in continua evoluzione dall'inizio del nuovo secolo grazie a innumerevoli studi scientifici. C.H. Waddington e D.L. Nanney hanno definito l'epigenetica: " Lo studio dei cambiamenti dell'espressione genica, reversibili o irreversibili, che non dipendono da mutazioni del DNA e che possono essere anche ereditabili (eredità di tipo mitotico o, se riguardanti le cellule germinali, di tipo meiotico); l'assetto del DNA resta tale ma varia l'espressione genica ". L'epigenetica rappresenta quindi una branca della genetica che si occupa dei cambiamenti fenotipici ereditabili da una cellula o un organismo, in cui non si osserva una variazione del genoma (si hanno modificazioni chimiche che avvengono principalmente "sopra", alle estremità, di alcuni suoi elementi). Intendiamo infatti oggi per epigenetica lo studio della diversità fenotipica che non comporta differenze del relativo genotipo, quindi rappresenta lo studio dei meccanismi di ereditarietà dove l'informazione genetica non è soltanto dovuta alla sequenza del DNA.

Nell'uomo sono presenti circa 200 tipi di cellule diverse per forma, funzione, struttura. I tipi cellulari condividono quasi tutti lo stesso genoma ma rispondono a stimoli interni ed esterni in modo estremamente diverso quindi presentano una identità diversa pur avendo lo stesso genoma ossia possiedono epigenomi che permettono di effettuare programmi di espressione genica differenti. Se il genoma è l'insieme delle istruzioni che consentono la costruzione e il funzionamento di un organismo vivente, l' epigenoma è l'insieme dei processi che consentono a queste istruzioni di essere lette nei tessuti giusti e nel



momento opportuno, anche in risposta a stimoli che provengono dall'ambiente. Con epigenoma si intende quindi l'insieme dei fenomeni che comportano e regolano questo tipo di modifiche del DNA ossia della sua espressione e non della sua sequenza. In un certo senso, l'epigenoma rappresenta il software di controllo del "hardware genoma", ossia il flusso di informazioni, provenienti dall'ambiente o dall'interno dell'organismo, che interagisce con le informazioni codificate nei geni. La segnatura epigenetica descrive i meccanismi, reversibili o irreversibili, ereditari o non ereditari, attraverso i quali l'espressione di un gene viene favorita o inibita; è l'epigenoma a regolare quale gene debba essere attivato o silenziato e questo è di grande interesse sia nell'ambito della prevenzione (es. delle patologie cronico-degenerative) sia terapeutico. Le modifiche epigenetiche sono quindi specifiche "impronte" che coinvolgono meccanismi molecolari in grado di alterare o determinare l'attività di un gene ma non la sua sequenza nucleotidica definita nel DNA. Il fenotipo è quindi determinato non dal genotipo in sé, ma dalla sovrapposizione a esso di "un'impronta" che ne influenza il comportamento funzionale. Il meccanismo epigenetico che porta dal genotipo al fenotipo è sotteso a un complesso network di concatenati fattori e reazioni chimico-fisiche.



Solo una piccola parte del genoma umano codifica direttamente proteine. Una quota rilevante del DNA non codificante interviene nella regolazione dell'espressione genica, nell'organizzazione della cromatina e nella stabilità dei cromosomi; per altre regioni la funzione rimane da chiarire. Definire indistintamente tutto questo materiale come "DNA spazzatura" è dunque fuorviante. Anche la formula "un gene, una proteina" descrive solo in parte la realtà biologica: splicing alternativo, regolazione trascrizionale e modificazioni post-traduzionali moltiplicano i possibili prodotti funzionali.

I fattori ambientali giocano un ruolo essenziale all'interno di questo equilibrio dinamico definito "omeoresi": equilibrio tra fattori endogeni ed esogeni che porta all'espressione fenotipica finale. Le potenzialità rappresentate dal genotipo si possono quindi esprimere concretamente solo mettendosi in relazione con l'ambiente (anche cellulare ed extracellulare); per ogni ambiente sarà così possibile una diversa e specifica manifestazione fenotipica.

La membrana cellulare svolge un ruolo essenziale nella ricezione e nella trasduzione dei segnali provenienti dall'ambiente, mentre il nucleo conserva e rende accessibile l'informazione genetica. La funzione cellulare deriva dall'integrazione dinamica tra membrana, citoplasma, organelli, citoscheletro e nucleo. Il contributo genetico alla salute e alla malattia varia secondo la condizione considerata e interagisce con ambiente, stile di vita e regolazione epigenetica. Esperienze precoci, stress, relazioni, attività fisica e pratiche contemplative possono influenzare comportamento, plasticità nervosa e fisiologia; non è però dimostrabile un controllo diretto e generalizzato del DNA da parte delle convinzioni inconsce. Nell'essere umano la trasmissione epigenetica transgenerazionale resta un'area di ricerca complessa: le evidenze sono più solide nei modelli animali e richiedono prudenza interpretativa nella nostra specie.

Esistono quindi diversi fattori in grado di modulare l'espressione genica:

- stato psico-emotivo
- inquinanti ambientali
- nutrienti e integratori

Alcuni processi cellulari, modulabili epigeneticamente da nutrienti, sono fondamentali per la salute cellulare nonché per prevenire e combattere i processi degenerativi:

autofagia: processo fisiologico che, contrastando l'accumulo età-dipendente di proteine e organelli alterati, rinnova il citoplasma favorendo la depurazione dei tessuti (drenaggio naturale) e quindi la longevità; si manifesta grazie all'attivazione di proteine come le sirtuine e può essere stimolata anche dalla restrizione calorica.

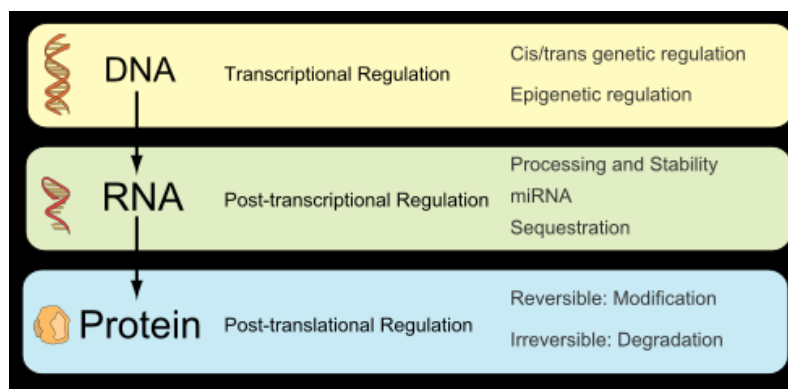
apoptosi cellulare programmata: evento fisiologico di morte cellulare programmata, ben distinto dalla necrosi cellulare, che garantisce l'omeostasi tissutale portando alla eliminazione delle cellule in cui le funzioni degli acidi nucleici si svolgono in modo anomalo, contribuisce inoltre al mantenimento del numero di cellule proprio di un sistema, consente quindi la rigenerazione tissutale e il disegno della corretta architettura dei tessuti in via di sviluppo (è favorita dall'espressione di proteine pro-apoptotiche come Bax e dall'azione dell'enzima caspasi).

Autofagia, apoptosi e sintesi anabolica devono alternarsi e coordinarsi. mTOR è indispensabile per crescita, sintesi proteica, adattamento e sopravvivenza cellulare; una sua attivazione fisiologica e intermittente non rappresenta quindi un evento negativo. L'iperattivazione persistente o inappropriata può invece ridurre l'autofagia e contribuire, in specifici contesti, a infiammazione, insulino-resistenza e processi degenerativi.

Meccanismi epigenetici

Comprendere la diversità dei tessuti umani risulta quindi fondamentale nello studio della malattia e richiede il collegamento tra informazioni genetiche, identiche nella maggior parte delle cellule di un individuo, e meccanismi epigenetici che potrebbero avere ruoli specifici per ogni tessuto. La metilazione del DNA nei tessuti umani presenta una situazione complessa, con modelli di metilazione specifici per il tessuto.

La regolazione dell'espressione genica negli Eucarioti agisce a vari livelli.



La regolazione epigenetica consiste in cambiamenti della struttura della cromatina in seguito a:

Associazione con proteine e RNA non codificanti;

Metilazione;

Varanti istoniche all'interno del nucleosoma;

Modificazioni post traduzionali delle code istoniche.

ncRNA - RNA non codificante è un trascritto genico che non va incontro a traduzione; il gene che codifica per tale RNA non codifica per una proteina ma semplicemente per una molecola di RNA (e non un mRNA). RNA non codificante può svolgere diverse funzioni: RNA ribosomiale (rRNA), RNA transfer (tRNA), RNA componente di complessi enzimatici implicati nei processi di trascrizione, replicazione, splicing e in altri processi riguardanti l'espressione genica.

Tra gli RNA non codificanti vi sono i Long Non Coding RNA (lncRNA), trascritti lunghi più di 200 nucleotidi, che sembrano essere coinvolti in molti meccanismi biologici (splicing, stoccaggio di mi-RNA, processi trascrizionali e post-trascrizionali) e tutta una serie di patologie a essi associate. In particolare, riferendosi ai meccanismi epigenetici, essi sono in grado di reclutare DNA-metiltransferasi e modificare in questo modo il pattern epigenetico a vari livelli. Questo limite alquanto arbitrario di 200 nucleotidi distingue ncRNA lunghi da piccoli RNA non codificanti (Short o Small non coding RNA - sncRNA) come microRNA (miRNA), piccoli RNA interferenti (siRNA), RNA che interagiscono con Piwi (piRNA) e altri RNA corti. RNA interference (RNAi) rappresenta un fenomeno naturale (avviene sia in piante e animali) di regolazione dell'espressione genica mediato da alcuni frammenti di RNA in grado di interferire e "spegnere" l'espressione genica. La RNAi si distingue da altri fenomeni di silenziamento genetico, dal momento che in *Caenorhabditis elegans* (verme nematode

fasmidario) e nelle piante è stata osservata essere in grado di diffondere da cellula a cellula e di essere ereditabile. Ciò è stato osservato anche nei mammiferi ma con minore efficienza e solo nei primi stadi dello sviluppo embrionale. È stato ipotizzato che RNAi possa stabilizzare i genomi regolando le sequenze ripetute come gli elementi mobili (trasposoni) prevenendone la loro trasposizione ed espressione e quindi i potenziali problemi genomici derivabili.

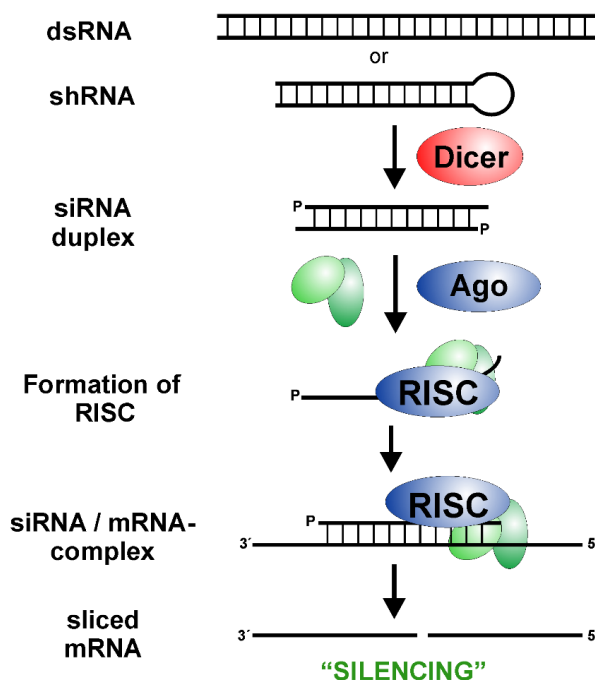
Si distingue tra meccanismi coinvolgenti molecole a doppio filamento, RNA interference in senso stretto, mediate da molecole come short interfering RNA (siRNA), e fenomeni coinvolgenti RNA a singolo filamento.(miRNA, piRNA).

I siRNA (Short or Small Iterfering RNA) sono molecole di natura esogena, (proveniente dall'esterno della cellula tramite vettori) a doppio filamento lunghe 21- 25 nucleotidi di cui due protrudenti all'estremità 3'. I siRNA derivano da precursori ds RNA più lunghi che vengono riconosciuti e tagliati dall'enzima endonucleasi Dicer (coinvolto anche nel processamento dei miRNA). In seguito a tale processamento i siRNA sono incorporati nel complesso multiproteico RISC (RNA Induced Silencing Complex) che guida il legame tra il siRNA e lo specifico mRNA con conseguente degradazione di quest'ultimo. L'effetto finale di tale processo è il silenziamento dell'espressione di un determinato gene. In questo caso si parla di silenziamento post-trascrizionale (PTGS - Post Transcriptional Gene Silencing). In alcuni casi i siRNA possono regolare l'espressione genica anche attraverso l'inibizione della trascrizione inducendo modificazioni epigenetiche del DNA (TGS - Transcriptional Gene Silencing).

Le funzioni principali dei siRNA sono di difesa contro le infezioni considerate virali e di regolazione degli elementi trasponibili (tramite l'appaiamento perfetto con i trasposoni).

I siRNA sono quindi coinvolti anzitutto nel pathway della RNA interference, conducendo all'interferenza dell'espressione di specifici geni con sequenze nucleotidiche complementari, degradando l'mRNA dopo la trascrizione impedendo la traduzione, silenziando elementi genetici mobili, modellando la struttura della cromatina ecc.

I siRNA posso derivare anche dagli shRNA (Short or Small Hairpin RNA), piccole molecole di RNA artificiale a forma di forcina per capelli. L'espressione di shRNA, a scopo medico, nelle cellule viene tipicamente ottenuta mediante il rilascio di plasmidi o attraverso vettori virali o batterici.



I miRNA (micro-RNA) sono piccole molecole (lunghe circa 20-22 nucleotidi) a singolo filamento non codificanti sintetizzate in forma non matura, da specifici geni appartenenti a introni (la loro trascrizione avviene sotto controllo della RNAPolimerasi), e subiscono un processo di maturazione in parte nel nucleo e in parte nel citosol.

I miRNA sono principalmente attivi nella regolazione dell'espressione genica, a livello trascrizionale e post-trascrizionale, inducendone un silenziamento. I miRNA vengono inglobati nel complesso multiproteico di silenziamento indotto da RNA (RISC - RNA Induced Silencing Complex) il cui legame al mRNA target, tramite sovrapposizione per complementarità parziale nella regione 3', ne comporta una repressione della traduzione o la degradazione della molecola tramite:

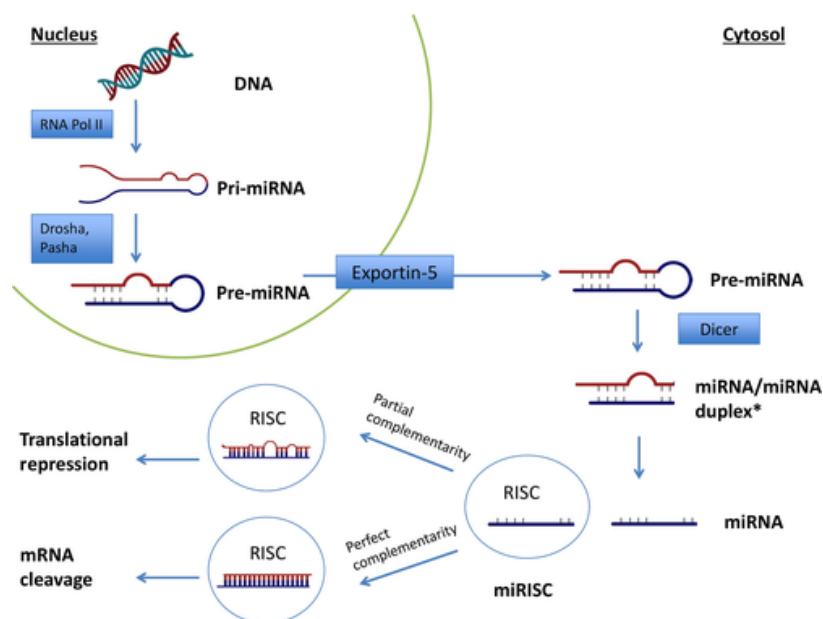
1. taglio della molecola di mRNA;
2. destabilizzazione della molecola di mRNA per accorciamento della coda di poli(A);
3. diminuzione dell'efficienza di traduzione del RNA messaggero

I miRNA ricordano i siRNA (small interfering RNA) ma ne differiscono perché derivano da regioni di RNA che si ripiegano autonomamente a formare corte forcine, mentre i siRNA derivano da sequenze di dsRNA più lunghe. I miRNA sono abbondanti in tutti i tipi di cellule dei mammiferi. Non agendo per complementarità perfetta (come invece tendono a fare gli siRNA) possono inibire la traduzione di numerose diverse sequenze di mRNA e ciascuno di

essi può avere diversi mRNA bersaglio.

Attualmente sono stati descritti nelle cellule umane ca. 2000 miRNA che, a loro volta, regolano l'espressione di numerosi RNA messaggeri bersaglio riducendone i livelli di espressione. I miRNAs sono di fatto essenziali per il normale sviluppo di tutti i tessuti in quanto controllano i più importanti processi biologici quali la crescita cellulare, il differenziamento, il metabolismo e l'apoptosi. In *Drosophila* il miR-14 previene la morte cellulare ed è richiesto per un normale metabolismo dei lipidi, miR-125b e il miR let-7 controllano la proliferazione cellulare, miR-181 è coinvolto nello sviluppo della linea ematopoietica dei linfociti B, miR-15a e miR-16-1 promuovono la sopravvivenza delle cellule immunitarie B, miR-375 è coinvolto nella secrezione dell'insulina e il miR-143 promuove lo sviluppo degli adipociti.

I miRNA sono implicati in numerose patologie e possono essere usati a scopo terapeutico. Essendo siRNA e miRNA infatti in grado di svolgere un ruolo epigenetico tramite il processo di silenziamento trascrizionale indotto dal RNA (RITS) e quindi nel controllo dell'espressione genica, risultano essere obiettivi importanti per l'uso terapeutico. I microRNA possano infatti diventare dei bersagli terapeutici o essere utilizzati come farmaci per un largo spettro di patologie. In recenti studi nei topi, la somministrazione di oligoribonucleotidi modificati complementari alla sequenza del microRNA (antagomir) ha inibito l'espressione del microRNA con promettenti risvolti terapeutici. Inoltre in futuro potranno essere utilizzati anche come marker prognostici di patologie.



Nutrigenetica e Nutrigenomica

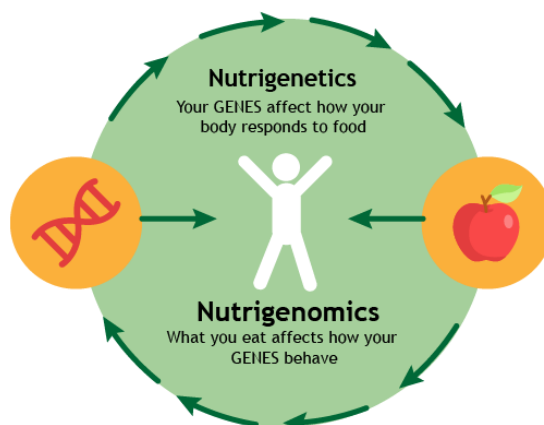
Introduzione

Il rapporto tra cibo e medicina è stato da sempre oggetto di studio. La conoscenza delle esigenze alimentari umane è cresciuta enormemente dall'inizio del XX secolo. I prodotti alimentari sono diventati sempre più funzionalizzati e realizzati su misura per gruppi specifici. Il progetto Genoma e il progetto SNPs hanno chiarito che tra i genomi dei singoli individui esistono milioni di piccole differenze che condizionano fortemente le caratteristiche dei tessuti, degli organi e delle cellule umane e che determinano la predisposizione di un soggetto a rispondere ad una determinata dieta con influenze più o meno positive.

Descrizione

La nutrigenetica studia l'influenza della variabilità genetica ossia dei polimorfismi sul metabolismo dei nutrienti.

La nutrigenomica o genomica nutrizionale studia come i nutrienti influenzano l'attività del genoma regolando in maniera "up" o



“down” alcuni geni (includere le modifiche che l'alimentazione della madre apporta al metabolismo del feto e quindi nascituro).

La nutrigenetica riguarda quindi principalmente l'interazione tra i geni di un individuo e la sua dieta. La nutrigenomica studia l'effetto del cibo e dei suoi costituenti sull'espressione genica. Ciò significa che la

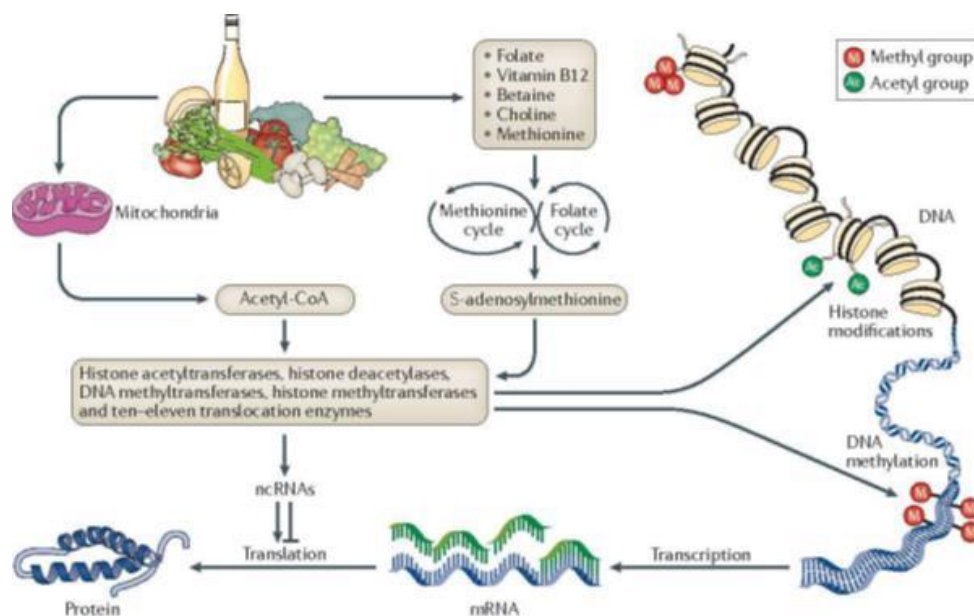
nutrigenomica è la ricerca che si focalizza sull'identificazione e la comprensione dell'interazione a livello molecolare tra sostanze nutritive e altri bioattivi alimentari con il genoma. I nutrienti, oltre che esplicare un effetto nutritivo, influenzano l'espressione di geni, la sintesi o la demolizione di proteine, attivando o inibendo vie metaboliche. Compito della nutrigenomica è quello di esaminare tali processi. La nutrigenomica è quindi una scienza multidisciplinare che combina la genetica con la nutrizione cercando di svolgere un attivo ruolo preventivo in difesa dell'organismo tramite appunto l'applicazione di tecniche genomiche a problemi nutrizionali e alimentari. Questa scienza ha in definitiva aperto una nuova frontiera e ha creato un nuovo approccio scientifico imperniato sulla prevenzione e sulla diagnosi genetica combinate insieme.

Nutrigenetica e nutrigenomica possono essere utilizzate per guidare le decisioni riguardanti l'integrazione dei nutraceutici nelle diete personalizzate. Ciò è prezioso soprattutto per aiutare

a superare specifici deficit nutrizionali associati ad anomalie genetiche. L'emergere di nutrigenetica e nutrigenomica ha offerto enormi opportunità per la traduzione del progresso scientifico in benefici per il consumatore. Una corretta e mirata nutrizione unita alla diversità genotipica di ciascun individuo ha chiarito le linee guida per la prevenzione a un vasto numero di patologie e ha permesso lo sviluppo di nuove terapie sperimentali coadiuvanti la cura e il miglioramento di malattie complesse. Nell'ultimo decennio si sono moltiplicati gli studi e le ricerche in campo nutrigenetico e nutrigenomico attraverso l'elaborazione di test genetici volti a svelare le mutazioni responsabili di alcune delle più comuni e gravi patologie, quale diabete, ipercolesterolemia, intolleranze alimentari e il cancro, ma anche attraverso un'attenta indagine sui benefici che alcune categorie di alimenti apportano se introdotti preferenzialmente nella dieta. Il continuo studio dell'impatto della composizione genetica umana sul cibo e degli effetti dei costituenti alimentari sull'espressione genica rafforza le basi genetiche delle diete personalizzate.

Effetti della dieta sui principali processi epigenetici

La regolazione epigenetica dell'espressione genica può verificarsi a livello della trascrizione, tramite metilazione del DNA e/o modificazioni dell'istone, e livello della traduzione tramite RNA non codificanti.



Nutraceutici

Il nutraceutico è una sostanza alimentare che aiuta a mantenere la salute e prevenire le malattie.

Il termine nutraceutico è stato introdotto nel 1989 dal medico americano Stephen L. DeFelice. I nutraceutici sono fondamentali per il concetto scientifico di dieta personalizzata, in cui fattori come l'età, la composizione corporea, lo stato nutrizionale e l'attività fisica vengono considerati insieme alla costituzione genetica quando si valutano le esigenze nutrizionali di un individuo. Quest'area di ricerca è strettamente legata alla nutrigenetica e alla nutrigenomica.

Il termine nutraceutico viene talvolta usato in modo intercambiabile con i termini “cibo funzionale” e “integratore alimentare” sebbene esistano distinzioni fra essi. Gli alimenti funzionali sono alimenti normalmente consumati nella dieta con che scientificamente comprovati benefici per la salute. Gli integratori alimentari sono preparati ingeribili appositamente aggiunti alla dieta a beneficio della salute senza essere necessariamente derivati dagli alimenti. I nutraceutici sono prodotti con funzioni biologiche che derivano solo dagli alimenti e che in genere vengono consumati, come per gli integratori, in una forma che ricorda un medicinale. Queste distinzioni tuttavia sono complicate dal fatto che molte sostanze rientrano in tutte e tre le categorie (es. beta-carotene).

Una vasta gamma di prodotti viene commercializzata come nutraceutici, questi includono vitamine e minerali essenziali, acidi grassi polinsaturi e monoinsaturi e una varietà di prodotti a base di erbe (es. fitoestrogeni), cibi con aggiunta di nutrienti o "funzionalizzati" (es. latte con aggiunta di vitamina D, yogurt probiotico e prebiotico, prodotti progettati per determinati gruppi, quali atleti, donne in gravidanza e in allattamento ecc.) e, secondo alcuni, anche alcuni alimenti geneticamente modificati.

Una critica fondamentale ai nutraceutici è legata al loro potenziale utilizzo come sostituto di dieta e stile di vita sani. L'aggiunta di nutraceutici alla dieta può essere un modo per sviluppare una dieta sana. Tuttavia aggiungere nutraceutici alla dieta è tutt'altro che banale. Lo sviluppo e l'uso dei nutraceutici rientrano in un più ampio dibattito sull'adattamento dell'apporto alimentare del genere umano al cambiamento delle condizioni ambientali, degli stili di vita e del crescente scambio globalizzato di prodotti e idee.

Obiettivi

Glossario 1

Nutrigenomica: Studio dell'effetto della dieta sulla stabilità del DNA e sull'espressione genica.

Nutrigenetica: Studio dell'effetto delle differenze genetiche tra individui nella loro risposta a specifici pattern dietetici

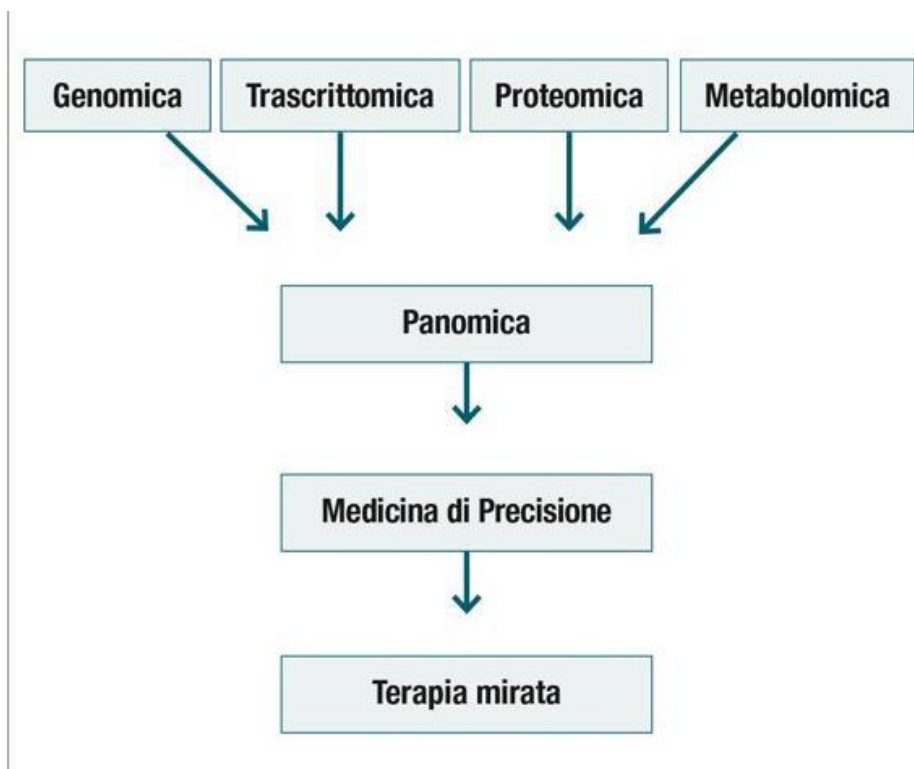
Nutritrascrittomica: Studio genomico dei livelli di espressione dell'mRNA in una cellula o in una popolazione di cellule in un determinato set di condizioni nutrizionali.

Nutriproteomica: analisi su larga scala di struttura e funzione di proteine e della loro interazione in una cellula per identificare i target molecolari dei componenti della dieta

Nutrimetabolomica: misurazione di tutti i metaboliti per definire la completa risposta metabolica di un organismo ad uno stimolo nutrizionale

6

La Nutrigenomica quindi, insieme alle altre scienze -omiche, mira a chiarire l'interazione tra geni e composti bioattivi provenienti da fonti esterne (alimentar, farmacologiche, ambientali). Gli SNP, o più in generale gli SNV (varianti di singolo nucleotide), termine che comprende sia alleli comuni sia a bassa frequenza, sono di gran lunga le variazioni genetiche più studiate nel campo della nutrizione e medicina di precisione.



Dieta ad personam (dieta personalizzata)

Elaborare una dieta ad personam (dieta personalizzata) ossia un regime alimentare adatta a un preciso soggetto in relazione ai suoi geni e in difesa del suo organismo, corrisponde a una dieta nutrigenetica.

Elaborare una lista degli alimenti in base alle seguenti caratteristiche:

- intolleranza genetica al lattosio;
- predisposizione alla celiachia (controllare graminacee, kamut, farro ecc.):
- utilizzo di crucifere;
- eliminare o diminuire i grassi saturi;
- limitare caffeina (per problemi cardiovascolari e osteoporosi);
- limitare zuccheri e aumentare le fibre ➡ aumentare antiossidanti.



Geni	Fattori Nutrizionali	Variante testata	Fenotipo intermedio	Patologie con cui associate nella letteratura
5HTT (5C6A4)	Adattamento allo stress	44bp ins	- Disturbi di sonno - Ansia - Irritabilità	- Depressione - Disturbo ossessivo compulsivo - Anorexia - Alcolismo
ACE	Sensibilità al sale	T / D	Iperensione	Malattie cardiovascolari
ADH1C	Sensibilità al alcool	8e3499a	Ulivelli di HDL	Riduzione di malattie cardiovascolari
APOC3	Olio d'oliva (utilizzo)	C3375G	Ulivelli dei lipidi e TG	Malattie cardiovascolari
CYP1A2 *1F	Sensibilità caffeina	-163A>C	Metabolismo di : affenna lento	Infarto
VDR	Sensibilità cottura	-163A>C	Densità ossea	Osteoporosi
GSTM1	Crucifere (utilizzo)	deletion	Aumento nel danno al DNA - Aumento dei radicali liberi	- Tumori - Asma
IL6	Infiammazione generale	G	Ulivelli di citochine	Malattie cardiovascolari
TNF		G-308A		- Diabete tipo 2 - Artrite - Allergie, asma - Osteoporosi
APOC3	Sensibilità grassi saturi	C3375G	Ulivelli dei lipidi e TG	Malattie cardiovascolari
LPL		C3595G		
MTHFR	Metabolismo Vitamine B	C677T	Ulivelli omocisteina	- Malattie cardiovascolari - Alzheimer - Depressione - Tumori - Osteoporosi
ACE	Sensibilità agli zuccheri e carboidrati raffinati	T / D	Glucosio ed insulina	- Diabete tipo 2 - Sindrome metabolica
PPARG		Pro32A (12)		
SOD2	Stress ossidativo - protezione dai radicali liberi	C-28T	- Livelli di radicali liberi - Danno al DNA	- Tumori
VDR	Metabolismo Vitamina D	C>T (8eq1)	Densità ossea	- Osteoporosi
LCT	Sensibilità lattosio	-13920-C/T	Resistenza all' insulina	- Diabete tipo 2
	Sensibilità glutine (intolleranza)		Metabolismo del lattosio	Intolleranza al lattosio

Nel genoma umano, un numero elevato di geni viene coinvolto nell'obesità, ma il gene FTO (Fat mass and obesity-associated gene) è sicuramente uno dei più importanti. FTO è considerato il primo gene dell'obesità. Questo gene, ampiamente espresso in diversi tessuti fetali e adulti, si trova sul cromosoma 16 (16q12.2) e codifica per l'enzima diossigenasi dipendente dall'alfa-chetoglutarato. Questo enzima è coinvolto nella regolazione sia del controllo della termogenesi degli adipociti sia della loro differenziazione, contribuendo notevolmente all'accumulo di grasso corporeo. Esso inoltre contribuisce alla regolazione dell'omeostasi energetica e del metabolismo, aumentando anche l'assunzione di cibo. Fra le altre attività, infine, tale enzima è coinvolto nella riparazione del DNA e del RNA tramite demetilazione ossidativa. La variante FTO rs9939609 è una delle più note, 'è localizzata nel primo introne del gene, nel 2007, è stato associata per la primasa corporea. Studi hanno dimostrato che l'allele A di FTO rs9939609 è correlato sia a un indice di massa corporea sia a una circonferenza corporea maggiore. Inoltre, questo SNP è incluso tra i fattori etiologici genetici nello sviluppo sia della sindrome metabolica sia del diabete di tipo 2. Uno studio successivo ha evidenziato il fatto che i soggetti portatori di varianti alleliche di FTO rs9939973, rs8050136, rs1781749 e rs3751812 presentano un rischio inferiore di obesità seguendo un regime alimentare mediterraneo rispetto ai portatori del genotipo omozigote wild type.

OBESITY PANEL

GENE FUNZIONE BIOLOGICA POSSIBILI ALIMENTI/INTEGRATORI UTILIZZABILI 5HTT 44bp ins

ALIMENTI E FORMULE VITAMINICHE E MINERALICHE SPECIFICHE PER ADATTATORE SS, LL, LS DIO1 rs 2235544

VALUTAZIONE DELLO STRESS ALIMENTARE/AMBIENTALE CONTROLLO DELLA FAME

UTILIZZARE ALIMENTI CHE FAVORISCONO LA FUNZIONALITA' TIROIDEA (es. alimenti ricchi di omega 3 e vitamina D, alimenti ricchi di beta- carotene, mentre a es. evitare glutine, proteine della soia che possono ostacolare la funzionalità della ghiandola) FTO rs9939609

VALUTAZIONE DELLA FUNZIONALITA' TIROIDEA VALUTAZIONE DEI METABOLISMI

DIETA MIRATA ATTIVITA' FISICA MIRATA ADRB3 rs4994

VALUTAZIONE DELLA PREDISPOSIZIONE ALL'OBESITA'

VALUTAZIONE DELLA PREDISPOSIZIONE ALLA IPERLIPIEMIA, OBESITA' ADDOMINALE, INSULINO RESISTENZA RIDUZIONE DELLA SPESA ENERGETICA DEL TESSUTO ADIPOSO

ALIMENTI A BASSO INDICE GLICEMICO DIETA MIRATA

TCF7L2 rs7903146

ALIMENTI A BASSO INDICE GLICEMICO DIETA MIRATA ADRB2 Arg16Gly (A>G)

VALUTAZIONE DELLA PREDISPOSIZIONE AL DIABETE

VALUTAZIONE DELLA PREDISPOSIZIONE A: IPERLIPIDEMIA, OBESITA', INSULINO RESISTENZA

ALIMENTI A BASSO INDICE GLICEMICO DIETA MIRATA

Ippocrate: "Il cibo sia la tua medicina"

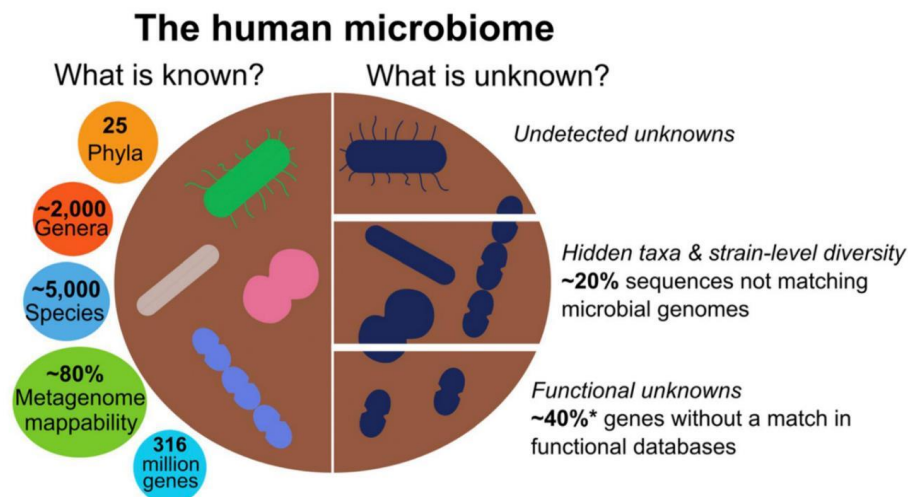
La nutrigenomica non può prescindere dallo studio del microbiota e del relativo microbioma.

Microbiota e Microbioma

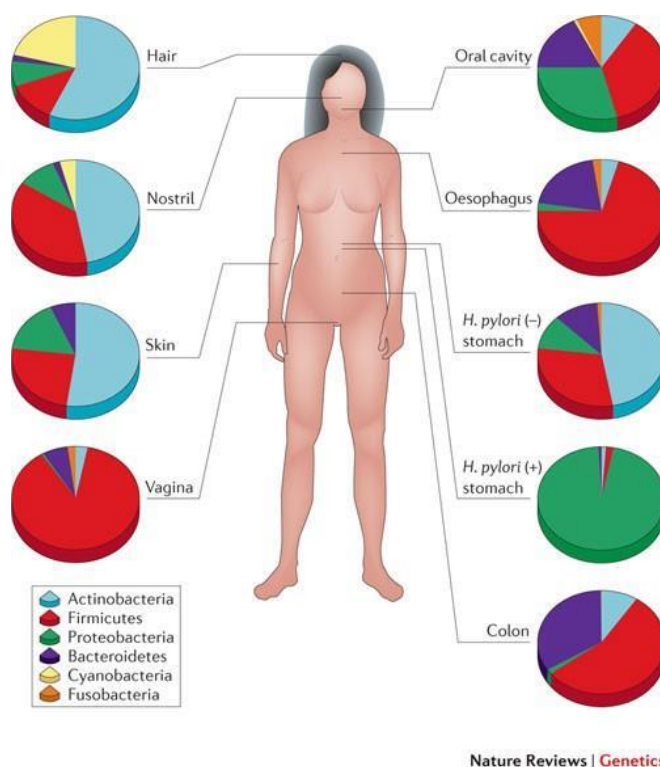
Descrizione

Gli esseri umani sono stati definiti organismi olobionti cioè entità biologiche risultanti dalla somma di contributi diversi: cellule umane e cellule microbiche, quest'ultime denominate microbiota e i relativi geni microbioma. L' ologenoma è l'insieme di genoma più microbioma. Il microbiota è rappresentato dall'insieme dei microrganismi (batteri, archei, virus ed eucarioti unicellulari) che convivono con l'organismo umano senza danneggiarlo (saprofiti) in condizioni di normale funzionamento del sistema immunitario. Fino a poco tempo fa la comunità scientifica ha sostenuto che, dal punto di vista numerico, gli organismi unicellulari che colonizzano l'Homo sapiens fossero in netta maggioranza rispetto alle cellule umane: circa 10.000 miliardi di cellule umane contro i circa 100.000 miliardi di cellule microbiche nel solo intestino (rapporto 1:10), Secondo un recente studio (Sender R., Fuchs S. et al, 2016),, in una persona adulta di 70 Kg, il numero di cellule umane è dell'ordine di 3.0×10^{13} mentre i batteri presenti sono 3.8×10^{13} , con una massa totale di 0.2 Kg (rapporto ca. 1:1) ossia il nr. di cellule umane è ca. uguale al nr. di cellule microbiche.

Il microbiota umano è composto da una serie di ecosistemi presenti in varie regioni del corpo ognuno costituito da una o più comunità di diverse popolazioni di specie di organismi viventi che interagiscono reciprocamente tra loro e l'intero organismo realizzando un equilibrio dinamico. 316 milioni di geni complementare ai 40.000 del genoma umano con il quale si integrano realizzando un sinergismo mutualistico. Esiste una continua interazione tra noi e il microbioma che può fortemente influenzare il nostro stato di salute. Vari ricercatori ritengono che questi microrganismi possiedano una tale influenza sulla nostra fisiologia che dovrebbero essere considerati parte integrante del stesso genoma. Di certo, comunque lo si voglia definire, molto della nostra fisiologia e della nostra salute dipende dal microbiota o microbioma, data l'impressionante quantità di sostanze da esso prodotte e/o metabolizzate.



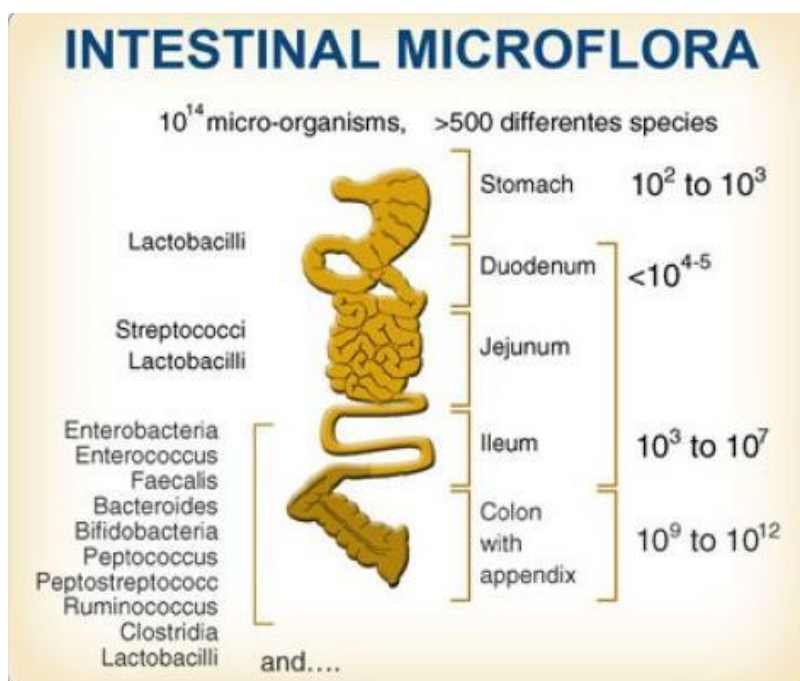
Il microbiota colonizza praticamente ogni superficie dell'organismo umano in qualche modo in contatto con l'ambiente esterno: pelle (strati esterni e profondi), vie aeree, canale alimentare, vie urinarie.



L'apparato di gran lunga più ampiamente colonizzato è il quello digerente: si stima che il colon da solo contenga più del 70% dei microbiota totale. Ciò si deve sia alla sua estensione (l'intestino tenue è lungo circa 4-5 metri con una superficie di circa 300 metri quadrati) sia perché rappresenta un ambiente ideale per la colonizzazione di microrganismi contenendo tutti i tipi di substrato utili per la loro sopravvivenza e crescita.

La distribuzione e la composizione della microflora batterica è diversa nei diversi tratti del tubo gastroenterico. La carica microbica aumenta man mano che si avanza dallo stomaco verso il retto parallelamente alla componente anaerobica mentre diminuisce quella aerobica. Stomaco e duodeno sono relativamente poveri di germi, nell'intestino tenue il loro numero aumenta fino a raggiungere il massimo della colonizzazione, sia per numero sia per varietà, nel colon. Il tenue e le prime porzioni di colon sono colonizzate da specie batteriche aerobiche, nelle porzioni più distali del colon si trovano batteri anaerobi stretti o facoltativi che costituiscono la maggior parte del microbiota del sistema digerente.

La flora batterica intestinale è quindi composta principalmente da microrganismi anaerobi obbligati (che vivono esclusivamente in ambienti privi di ossigeno) e in misura minore da anaerobi facoltativi (che possono vivere con e senza ossigeno) e aerobi (che vivono solo in presenza di ossigeno). A oggi ne sono state individuate ca. 35.000 specie diverse di cui le colonie più numerose sono rappresentate dalle specie Bacteroidetes e Firmicutes e, in misura minore, Actinobacteria, Fusobacteria e altre.



Ogni individuo possiede una sua specifica “ impronta digitale batterica ”, cioè un proprio profilo di specie. Esiste tuttavia un core di almeno 57 specie batteriche che può essere considerato comune a tutti. Nonostante le differenze infatti, alcuni ceppi batterici sono comuni alla maggioranza dell'umanità: Lactobacillus, Bifidobacteria, Escherichia, Bacterioides,

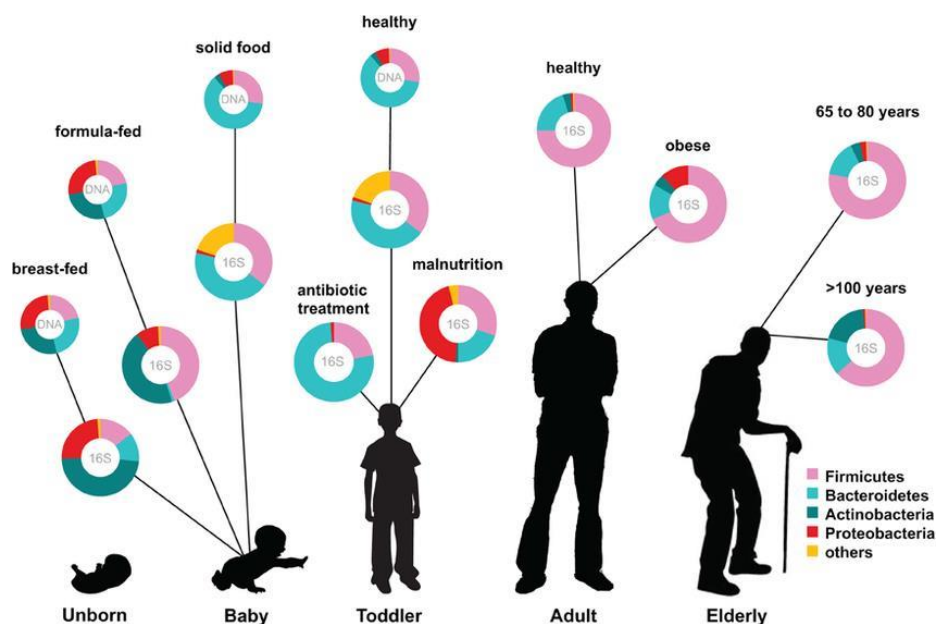
Eubacteria, Clostridium.

Rispetto al genoma il microbioma risulta molto più dinamico, cambia da individuo a individuo e nello stesso individuo nel tempo continuando a evolvere in tutto il corso della vita in base ai cambiamenti che si susseguono nella composizione della flora batterica dovuti a numerosi fattori quali: tipo di parto e allattamento, antibiotici (in particolare nei primi 3 anni di vita), corredo genetico, alimentazione, età, patologie, terapie farmacologiche, situazione ormonale, stress, stile di vita, inquinanti ambientali, posizione geografica.

Il microbiota è assente nel feto, poco prima della nascita alcune specie di microrganismi acidofili provenienti dalla flora batterica intestinale materna colonizzano l'intestino del feto ma la vera e propria colonizzazione batterica inizia solo dopo la nascita (microbiota precoce); il microbiota del figlio è legato alla madre in quanto questa sua parte iniziale resterà immutabile per tutta la vita. L'arricchimento del microbiota continua se il nascituro si allatta al seno. Il latte materno contiene una serie di oligosaccaridi del latte materno (HMO - Human Milk Oligosaccharides) che l'intestino del neonato non è in grado di metabolizzare e di cui si nutrono i batteri del suo intestino. Tali oligosaccaridi inoltre preparano il terreno per la successiva colonizzazione ad opera degli altri batteri intestinali che si verificherà con lo svezzamento. Tra questi i più importanti sono i Bacteroides che comprendono la maggior parte dei batteri che producono acidi grassi a catena corta (SCFA) a partire da fibre vegetali. Nei primi 4-36 mesi di vita, a seguito del contatto con i genitori, l'ambiente esterno e il cibo, il microbiota si sviluppa cambiando rapidamente. Ecco perché qualsiasi intervento sulla flora batterica in questa età, sia positivo sia negativo, assume un significato determinante in quanto lascia un segno indelebile su quello che sarà il microbiota dell'adulto (una specie di imprinting).

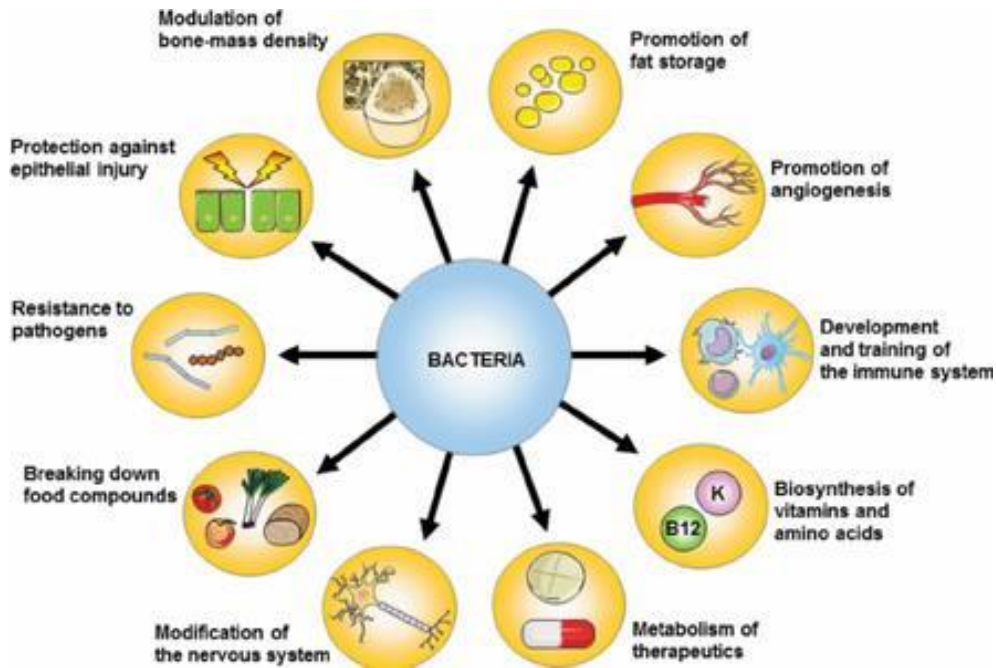
A seguito del parto cesareo il microbiota risulta molto più simile a quello della pelle della madre (presenza di Stafilococchi) ed è molto più facile che il bambino presenti immaturità del sistema immunitario e disturbi digestivi. Il microbiota di neonati partoriti con parto cesareo e/o di allattati artificialmente oltre ad apparire profondamente diverso impiega più tempo a stabilizzarsi; il microbioma acquisito diviene stabile a 1-2 anni. Esso arriva allo stato di massimo sviluppo tra i 20 ed i 40 anni di età per poi iniziare un lento processo di involuzione con il sopraggiungere della vecchiaia in cui il microbiota presenta bassa biodiversità, aumento dei Patobionti proinfiammatori e dei Batteri proteolitici (e del con conseguente fenomeno della

putrefazione), diminuzione dei Batteri saccarolitici. Negli anziani diminuiscono i Bifidobatteri, aumentano i Staphylococcus, Enterobacteriacee, Bacteroides, Streptococcus, Clostridiu

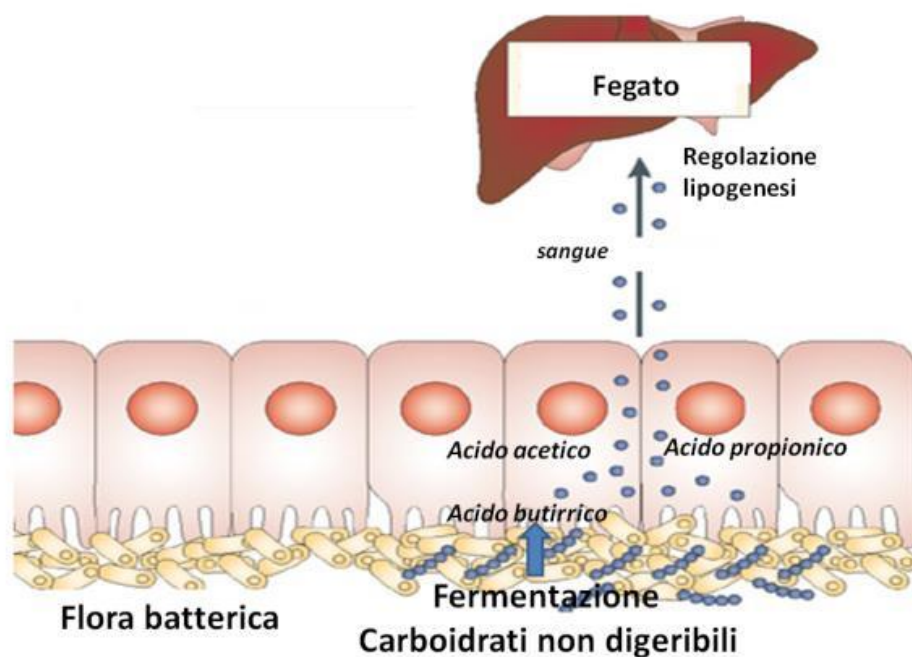


Funzioni del microbiota

In genere i vari germi presentano funzioni diverse e complementari, anche batteri della stessa specie però possono svolgere funzioni molto diverse. Addirittura all'interno della stessa specie possiamo ritrovare ceppi molto patogeni e ceppi assolutamente salutari, Un esempio interessante è l'*Escherichia coli* Nissle 1917: oltre a non essere patogeno, risulta essere l'unico in grado di contrastare direttamente ed efficacemente i numerosi ceppi patogeni della sua stessa specie.



Nel suo ruolo epigenetico il microbiota influenza l'espressione di un'ampia gamma di geni dell'ospite. Attraverso il tessuto mucoso intestinale alcune specie di batteri possono influenzare l'espressione di geni coinvolti nell'assorbimento dei nutrienti o nella funzione immunitaria. Alcune sostanze generate dai batteri intestinali possono entrare nel flusso sanguigno: ad esempio, gli acidi grassi a catena corta (prodotti dalla fermentazione dei polisaccaridi) possono regolare l'espressione genica della lipogenesi nel fegato e le tossine come i lipopolisaccaridi (LPS) possono influenzare i geni correlati all'infiammazione.



Dal punto di vista metabolico, il microbiota svolge un importante ruolo nell'assimilazione dei carboidrati non digeribili (fibre vegetali: pectine, oligofruttosio, inulina, cellulosa, amido resistente e betaglucani) tramite la fermentazione operata dagli enzimi batterici da cui derivano acidi grassi a catena corta, quali acido acetico, propionico, valerico, isobutirrico e butirrico (oltre ai gas CO_2 , CH_4 , H_2), che prevengono l'atrofia della mucosa e potrebbero avere effetti positivi nella prevenzione del cancro al colon. Studi recenti hanno evidenziato che gli acidi a catena corta, dopo essere stati assorbiti a livello intestinale, esercitano ruoli fisiologici anche nel fegato e nei tessuti extraepatici.

L'acido acetico, utilizzabile come substrato per lipogenesi e gluconeogenesi e come regolatori dell'introito e del metabolismo energetico (Lin et al. 2012), è un precursore del colesterolo e favorisce la produzione del colesterolo LDL. L'acido propionico annulla l'effetto ipercolesterolemizzante dell'acetato inibendo l'HMG-coenzima-A-sintetasi e l'HMG-coenzima-A-riduttasi.

Si è dimostrato che l'acido butirrico esercita diversi ruoli, sia a livello intestinale sia extra-intestinale, correlati in parte alla regolazione epigenetica dell'espressione genica (azione nutrigenomica):

- è il principale substrato energetico delle cellule epiteliali;
- regola il trasporto di fluidi;

- protegge i colonociti (le cellule del colon)) dallo stress ossidativo;
- influenza la motilità lungo il tratto gastrointestinale;
- modula la proliferazione cellulare e il differenziamento cellulare;
- regola l'espressione genica;
- esercita effetti migliorativi su molte patologie metaboliche come ipercolesterolemia, insulino-resistenza e patologie ischemiche.

Sulla base di numerosi studi si è così ipotizzato che l'effetto protettivo esercitato dalle fibre alimentari contro l'insorgenza di alcuni tumori intestinali sia dovuto non solo alla riduzione del tempo di transito intestinale, che riduce l'esposizione della mucosa intestinale a carcinogeni, tossine batteriche e amine biogene, ma anche alla produzione di acido butirrico.

Il microbiota inoltre effettua la decomposizione di alcune sostanze cancerogene (nitrosamine), la produzione di sostanze antibatteriche (ac. lattico, ac. solfidrico, H_2O_2 , batteriocine) e la sintesi di vitamine (B1, B2, B6, B12, K)

Vitamina K *Escherichia coli*

Folati *Bifidobacterium bifidum* *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*

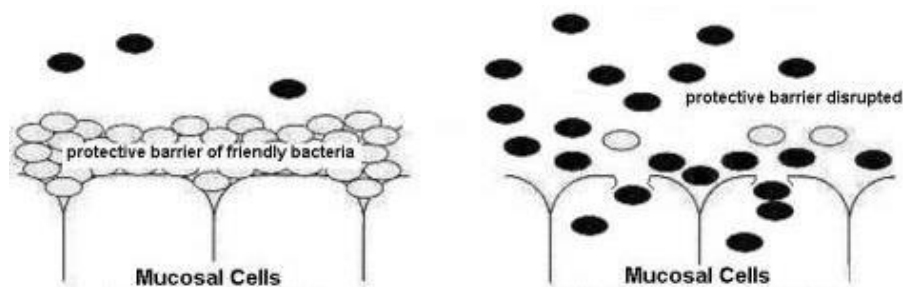
Riboflavina *Bacillus subtilis* *Escherichia coli*

Cobalamina *Lactobacillus reuteri* CRL1098

Niacina Piridossina

Streptococcus thermophilus ST5 *Lactobacillus helveticus* R0052 *Bifidobacterium longum* R0175

Relativamente alle funzioni protettive del microbiota, si possono distinguere dei meccanismi diretti e indiretti. I primi sono rappresentati dalla disposizione fisica delle cellule della mucosa, dalla produzione di sostanze microbicide o microstatiche (batteriocine, acidi grassi a catena corta, acido solfidrico, perossido di idrogeno) e di metaboliti tossici nonché dalla deplezione di nutrienti essenziali.



Meccanismi indiretti (funzione immunomodulatoria) sono invece: aumento della produzione anticorpale, stimolazione fagocitaria e della produzione di citochine (TNF, IFNs).

Il microbiota svolge un ruolo fondamentale nell'induzione e modulazione del sistema immunitario dell'ospite, il sistema immunitario di quest'ultimo, a sua volta, sviluppa nel tempo molteplici mezzi per mantenere la sua relazione simbiotica con il microbiota (omeostasi immunologica intestinale).

Il termine MALT – Mucose Associated Lymphoid Tissue (tessuto linfoide associato alla mucosa) indica un tessuto linfoide diffuso a livello delle mucose dell'organismo (del tratto gastrointestinale e uro-genitale, tiroide, polmoni, occhi, pelle ecc.), organizzato non a formare un organo ma sotto forma di noduli e cellule isolate, il cui ruolo è assicurare una completa risposta immunitaria ossia sia umorale (linfociti B - anticorpi) sia cellulo-mediata (linfociti T) in risposta in seguito a stimoli antigenici locali e sistemici. Il MALT può essere schematizzato in vari comparti, fra essi il GALT (Gut-Associated Lymphoid Tissue) ossia il tessuto linfoide associato all'intestino, assume una particolare importanza. Il GALT infatti ospita la maggior parte del sistema immunitario (80% in età pediatrica, 60-65% in età adulta. Una delle funzioni dinamiche del microbiota è lo sviluppo del sistema immunitario (innato e adattativo) e il mantenimento della tolleranza immunitaria.

Uno sbilanciamento del microbiota, in particolare nei primi 1000 gg di vita (gravidanza e I e II anno di vita) ma anche dopo, può comportare infiammazioni croniche con produzione incontrollata di citochine (es. Interleuchina 6) in grado di provocare cambiamenti di umore e stress con conseguente ulteriore alterazione del microbiota. Lo sviluppo di questo "circolo vizioso" può determinare un'alterazione della mucosa, a livello delle giunzioni serrate: aumento della permeabilità intestinale, ulteriore attivazione del GALT causato dall'ingresso di elementi estranei. Questa infiammazione può col tempo trasferirsi a livello sistemico fino a indurre patologie autoimmuni. Influenza asse cervello) – intestino (si può alterare barriera emato-

encefalica. Di fatto esiste quindi un'influenza reciproca dell' asse cervello – intestino. Lo stesso meccanismo coinvolge l'asse ipotalamo-ipofisi-surrene con possibili conseguenze quali, stati ansiosi, depressivi, alterazioni delle attività biologiche di tiroide, ormoni sessuali ecc.

È ormai noto che la sola predisposizione genetica non è sufficiente allo sviluppo di malattia ma è condizionata da fattori ambientali (esposoma). In questa ottica il microbioma potrebbe agire da “trasduttore” ambientale. Il razionale di questa ipotesi si basa proprio sull'azione di modulazione del GALT da parte del microbioma.

Ricerca

La ricerca in questo campo incontra la difficoltà di raccogliere campioni rappresentativi e di creare modelli di laboratorio rappresentativi dell'ambiente intestinale. Uno dei progetti più importanti volti allo studio del microbiota è lo Human Microbiome Project (HMP).

Benché non vi siano parametri per definire le caratteristiche di un microbiota umano “normal healthy”, studi osservazionali mostrano che alterazioni quali-quantitative del microbiota sono associate a varie malattie croniche non trasmissibili.

Alterazioni del microbiota (es. in animali germ free) sono state chiaramente correlate a squilibri nella risposta immunitaria e in disturbi comportamentali. La rottura della relazione simbiotica tra microbiota e tratto gastrointestinale, legata a “dismicrobismo” o a trattamenti antibiotici prolungati, perturba le funzioni dell'ospite e in alcuni casi, provoca la manifestazione di malattie gravi e conclamate come le MICI (Malattie Infiammatorie Croniche Intestinali) e la colite da *Clostridium difficile*. Ulteriori promettenti indagini stanno riguardando il possibile coinvolgimento del microbiota in patologie nervose come morbo di Parkinson, sclerosi multipla, demenze, sindrome da fatica cronica, ADHD (sindrome iperattività bimbi), autismo, encefalopatie varie. I batteri commensali possono influenzare l'espressione di geni che controllano e regolano la funzione del Sistema Nervoso. Essi inoltre sono in grado di influenzare le cellule enteroendocrine che secernono il triptofano.

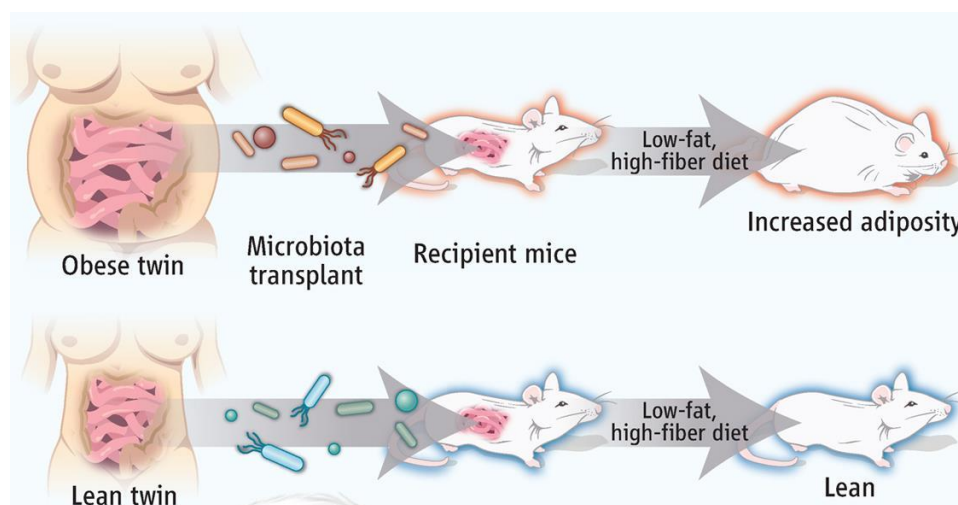
Tutto ciò apre ovviamente interrogativi su tanti farmaci che si prescrivono forse con troppa leggerezza, a es. gli antibiotici. La somministrazione di antibiotici a livello sperimentale solleva pesanti interrogativi sulle possibili conseguenze anche sulla specie umana. Come se non bastasse, un recente studio pubblicato su Nature nel 2013 da Lisa Maier e coll. “Blooming in the gut: how dysbiosis might contribute to pathogen evolution”, segnalerebbe come almeno il

25 % dei farmaci impiegati in terapia (antipsicotici e antidepressivi, antiulcera, chemioterapici) possa agire sul microbiota umano con almeno tre spiacevoli conseguenze:

- 1) Induzione di resistenze batteriche;
- 2) Variabilità e imprevedibilità nella risposta alla terapia;
- 3) Ulteriori possibili conseguenze di medio lungo periodo sull'organismo riguardanti il metabolismo e lo sviluppo del sistema immunitario e di quello nervoso.

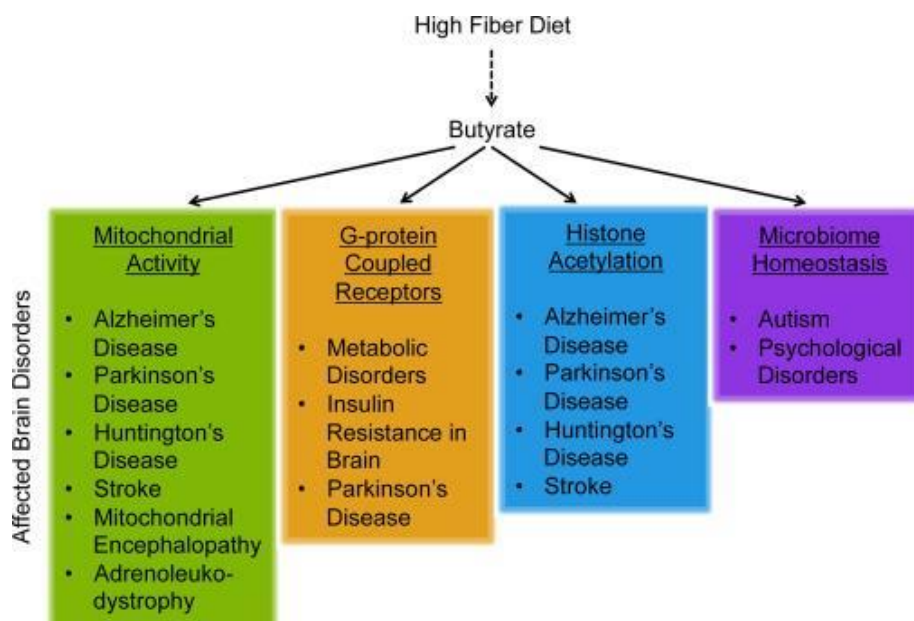
La dieta, sia a breve sia a lungo termine, può modificare il microbioma selezionando specifiche famiglie batteriche a scapito di altre. Solo un intervento dietetico di lunga durata permette un vero e proprio cambiamento di stato del microbiota.

Nei soggetti obesi è presente una maggiore quantità di Firmicuti i quali hanno la capacità di aumentare al massimo le capacità di assorbimento intestinale diminuendo al minimo la quantità di calorie espulse con le feci. Questo riscontro conferma che lo sviluppo di obesità o diabete di tipo 2 non è determinato esclusivamente dal corredo genetico. Si è visto infatti che se si trapiantano i batteri prelevati dall'intestino di un topo obeso in un topo sterile (GF - Germ Free) il topo sterile continua a crescere di peso sempre di più fino a diventare obeso egli stesso.

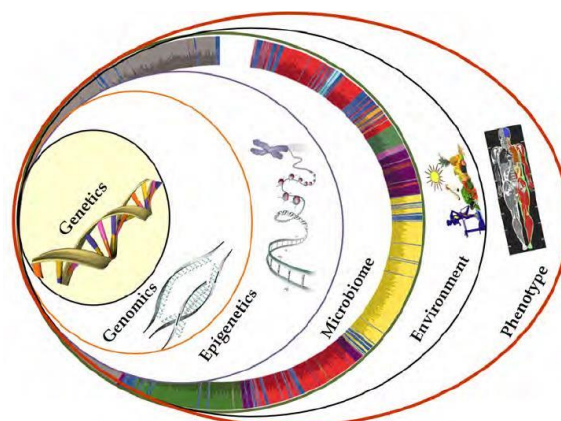


Topi GF inoculati con microbiota da gemelli umani obesi o magri assumono le caratteristiche del microbiota del donatore.

Da quanto descritto si desume inoltre che una dieta ad alta concentrazione di fibre risulta inoltre importante per la salute del nostro cervello.



Ulteriore elemento in grado di influenzare in maniera reciproca il microbiota è l'esercizio fisico (come approfondito nel relativo capitolo).



Nei fitocomplessi sono spesso presenti sostanze modulatorie e/o favorenti il corretto sviluppo e differenziazione del microbiota (prebiotici) quali: polisaccaridi non assimilabili (es. pentosani), polifenoli con azione di substrati o chelanti metallici, acidi organici, olii essenziali, varie sostanze antiossidanti, colagoghe e coleretiche. D'altro canto, studi dimostrano l'inefficacia dell'approccio fitoterapeutico in caso di disbiosi del microbiota intestinale in quanto non più in grado di attivare i principi attivi delle piante.

Fitoterapia

Introduzione

Fin dalla preistoria l'uomo ha imparato a curarsi con le piante, che rappresentano quindi la forma più antica di medicina. Indiscutibilmente la fitoterapia rappresenta ancora oggi una disciplina medica importante nonché quella più utilizzata dalla popolazione. Pochi sono ancora gli studi rigorosamente clinici ma esistono importanti esempi di rimedi naturali in biomedicina o medicina allopatrica.

La “restitutio ad integrum” dovrebbe essere fra gli obiettivi della medicina. Il ragionamento a monte degli interventi nella medicina naturale non è tanto usare rimedi più o meno vegetali ma osservare, rispettare e, se possibile, favorire le risposte omeostatiche e allostatiche (quelle più generali ossia dei vari sistemi dell'organismo nel loro insieme) dell'organismo, per favorire i processi di riparazione e autoguarigione.

L'organismo va valutato secondo tre differenti punti di vista:

- 1) Assetto strutturale potenziale e geneticamente determinato (genotipo);
- 2) Espressione concreta funzionale, frutto degli equilibri raggiunti (fenotipo);
- 3) Condizioni ambientali, stile di vita, “abitudini psichiche” (ambiente).

L'equilibrio di un sistema organico è infatti dinamico e metastabile, frutto di continui successivi aggiustamenti, nel caso di organismi complessi come l'essere umano, di complicati e sofisticati sistemi di regolazione. Lo stato di salute è quindi la risultante finale di un certo numero di aggiustamenti determinati da fattori quali:

- stato fisiologico e relativo livello di efficienza nel funzionamento di cellule od organi;
- condizione nutrizionale generale (riguardante macro e micronutrienti);
- energia/lavoro di adattamento richiesto da stress fisico/fisiologico e/o psichico.

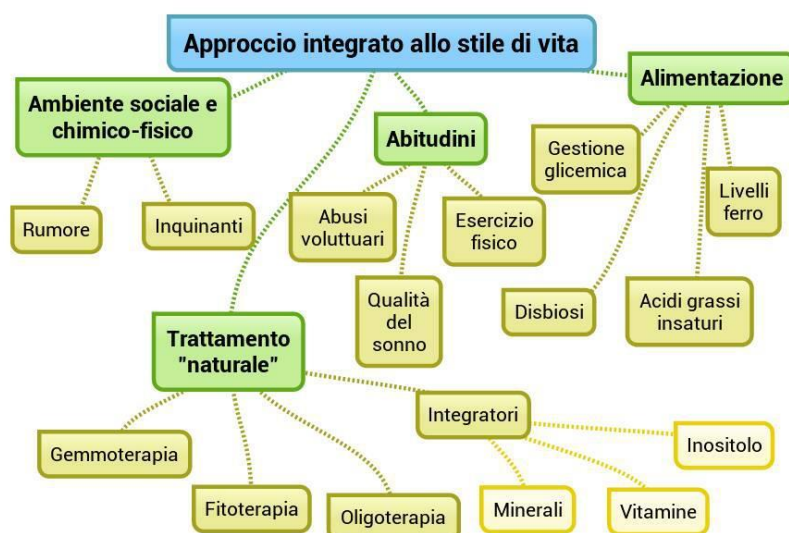
Ogni equilibrio raggiunto possiede un suo preciso costo metabolico. Quando tale costo diviene insostenibile si rompe lo stato di equilibrio e inizia il processo morboso.

Ogni patologia risulta pertanto la manifestazione di almeno tre fattori:

- aggressività del fattore esogeno inducente;
- efficienza difensiva complessiva dei sistemi endogeni;
- situazione genetica attuale.

La combinazione/interazione di questi elementi determina la situazione risultante.

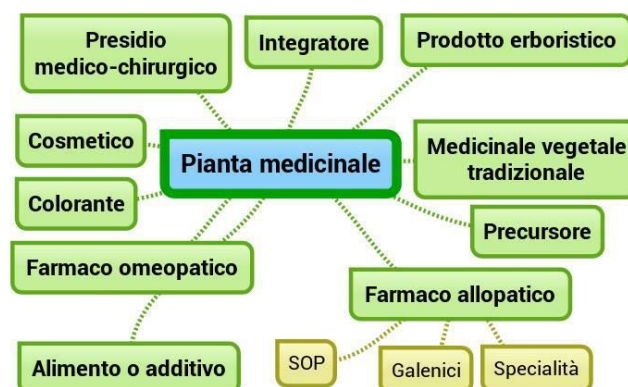
Salvo rari casi, non si effettua una corretta terapia solo individuando e agendo su un “organo bersaglio”, occorre preservare/sostenere il sistema definito “terreno”. Terreno è l’insieme dei fattori costituzionali e acquisiti che preesistono alla comparsa della malattia e che possono favorirne l’insorgenza o condizionarne la prognosi (previsione sul decorso e soprattutto sull'esito di un determinato quadro clinico). Il terreno funge di fatto da sistema “tampone” riguardo tutto ciò che è in grado di apportare qualche effetto sul nostro essere. Intervenire sullo stile di vita (e sull’ambiente) deve essere parte integrante dell’atto terapeutico; a es. in caso di patologie croniche del benessere non si ottiene di norma un miglioramento senza una modifica dello stile di vita.



O.M.S. (Organizzazione Mondiale della Sanità) definisce una pianta medicinale; “qualsiasi vegetale che contiene in uno o più dei suoi organi sostanze che possono essere utilizzate come tali a fini terapeutici o che sono i precursori di emisintesi chemio-farmaceutiche”

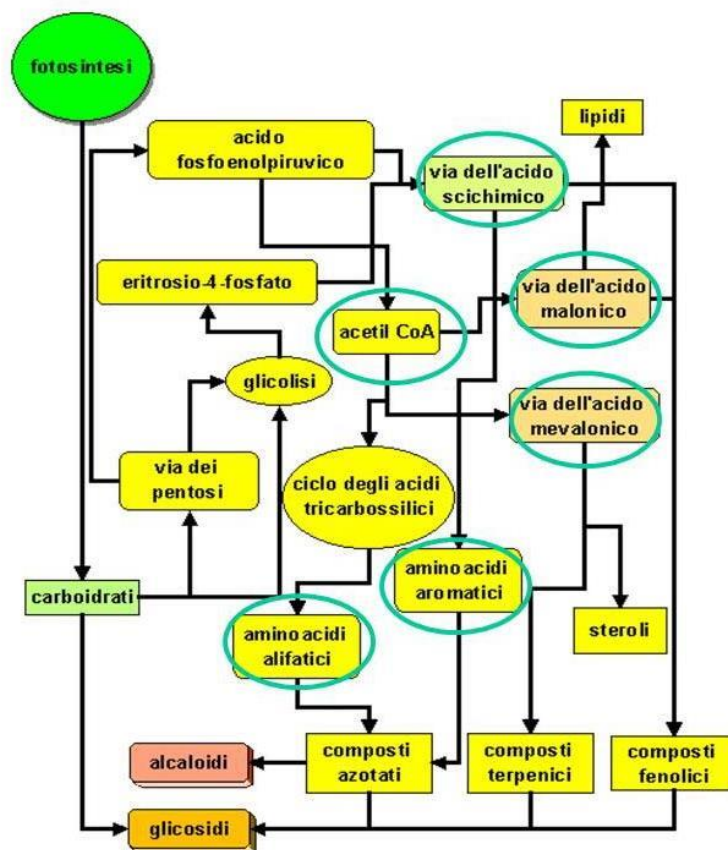
Secondo una moderna visione epigenetica una pianta medicinale è:

“Una sostanza naturale che agisce a livello genomico favorendo la sintesi di enzimi coadiuvanti le fisiologiche funzioni dell’organismo”. Gli estratti vegetali possono interferire col nostro metabolismo, esistono recettori di membrana cellulare e intracellulari per i relativi principi attivi e pertanto possono attivare cascate di reazioni biochimiche.



Le vie metaboliche generali del metabolismo primario, ossia atte a modificare e sintetizzare i metaboliti necessari alla crescita e sviluppo, e per questo definiti metaboliti primari (carboidrati, grassi, proteine e acidi nucleici), sono essenzialmente le stesse in tutti gli organismi viventi (presentano solo piccole variazioni).

I metaboliti secondari (derivati dal metabolismo secondario) sono di norma presenti solo in determinate cellule specializzate e differenziate, non sono indispensabili alla cellula stessa ma all'organismo nel suo insieme. I ruoli più comuni per i metaboliti secondari delle piante sono di tipo ecologico ossia governano le interazioni fra la pianta e gli altri organismi: pigmenti dai colori brillanti che colorano i fiori attraendo gli impollinatori e i dispersori di semi, composti tossici di difesa da erbivori e microbi, altri composti con funzioni diverse e non tutte ancora chiarite. I metaboliti secondari compongono il fitocomplesso della matrice vegetale che risulta essere l'insieme delle sostanze presenti in maniera sinergica nella droga attiva.



Preparati fitoterapici

Descrizione

I preparati fitoterapici, denominati anche rimedi o medicinali fitoterapici, sono i farmaci adoperati in fitoterapia ottenuti in varie forme tramite numerose metodologie. In linea generale si tende a preferire i preparati industriali in quanto rispetto a quelli artigianali presentano di norma una riproducibilità superiore, un più rigoroso controllo di qualità e un costo minore. Di norma inoltre va ricercata con i fitoterapici, oltre a una certa specificità qualitativa e quantitativa, l'azione graduale, molteplice e regolativa sull'omeostasi: come dei "diesel" funzionano in maniera progressiva (pertanto occorre costanza e pazienza del paziente). La scelta del preparato da utilizzare in fitoterapia deve tener conto delle specificità dei vari estratti e del quadro clinico del soggetto.

Vi è un'ampia scelta di preparati fra cui: pianta in toto assunta come alimento, polvere, pianta secca o fresca, succhi, estratti semplici (tinture madri, tinture FU, macerati glicerici, estratti secchi), frazioni di estratti, molecole singole originali o derivate di emisintesi (più attinenti alla biomedicina che alla fitoterapia).

L'alimento presenta il vantaggio dell'assunzione di tutti o quasi tutti i componenti della pianta. Inoltre questa modalità fa sentire il paziente non medicalizzato. L'impossibilità di poter standardizzare l'aspetto quantitativo e qualitativo dei componenti dell'alimento rende però difficile dimostrarne il livello di efficacia clinica nonché una adeguata personalizzazione della terapia. Va tenuto anche presente l'importante impoverimento di principi nutritivi negli alimenti a causa della modalità di raccolta, lavorazioni industriali, catena di distribuzione, metodi di cottura ecc. L'importanza della sana alimentazione resta ovviamente sempre uno dei pilastri fondamentali su cui si basa la nostra salute e il nostro intero essere. Si presume che circa il 50% della popolazione dei paesi industrializzati vive in uno stato di carenza vitaminica subclinica in grado di determinare una maggiore vulnerabilità di apparati e organi, in particolare delle mucose. Le stesse RDA (Recommended Daily Allowance) ossia le dosi giornaliere raccomandate, soprattutto riguardo gli antiossidanti, sono ritenute da molti studiosi autorevoli generalmente insufficienti.

Dato che le dosi terapeutiche efficaci per i fitoterapici oscillano tra i 200 e i 600 mg, le capsule e le pillole appaiono spesso la soluzione più comoda e ragionevole. Inoltre, come abbiamo visto, la possibilità di proteggere i principi attivi a livello gastrico risulta molto importante sia per i principi attivi gastrolesivi sia per quelli che vengono danneggiati dall'acidità gastrica.

Gemmoterapia

Si deve a Georges Netien, professore dell'università di Lione, la nascita della gemmoterapia negli anni '50 che successivamente fu ripresa e sviluppata dal medico belga Paul Henry. Le relative definizioni e fasi di preparazione sono descritte in Farmacopea francese (F.F.), la quale riporta anche l'elenco dei 55 macerati ammessi. Essi sono fitoembrioestratti il cui materiale di partenza, sempre appunto di origine embrionale e fresco (meristemi ossia gemme e meno frequentemente radichette, giovani getti, scorze e mai tessuti o droghe adulti), viene raccolto nel periodo di ripresa della vita vegetativa (tardo inverno/inizio primavera o in autunno per i semi), rapidamente ripulito, tritato e poi estratto tramite macerazione (quindi a freddo) per tre settimane utilizzando come solvente una miscela in parti uguali di alcol e glicerolo. Il macerato glicerico "madre" così ottenuto subisce una diluizione finale di dieci volte (1DH ossia prima decimale); il rapporto droga secca/solvente nel prodotto finale è 1:20.

La normale posologia è 30-50 gocce (10-15 gocce giornaliere per ogni 10 kg di peso), 3 volte

al giorno, diluite in poca acqua, mantenute per un lasso di tempo in bocca (per favorire l'assorbimento sublinguale) e poi ingerite in genere a stomaco vuoto (come per tutti i rimedi omeopatici). Nel caso acuto si può aumentare la frequenza (il dosaggio può essere raddoppiato e diviso in 3-4 assunzioni). In commercio sono presenti anche presenti macerati glicerici, denominati FEE, non sottoposti alla diluizione finale. La maggiore concentrazione di questi ultimi consente di ridurre la posologia a 1/5 rispetto allo standard (essendo 5 volte più concentrati); ciò risulta utile per ridurre i danni da alcol. Date le dosi ponderali utilizzate, non si tratta di rimedi omeopatici ma di fitoterapici veri e propri.

L'utilizzo dei meristemi si giustifica col fatto che essi sono ricchi di fattori di crescita che poi scompaiono nei tessuti adulti. Da una loro analisi dei contenuti risultano:

- scarsi metaboliti secondari (tipici dei composti fitoterapici);
- scarsi carotenoidi e clorofille;
- fitormoni (auxine, gibberelline, citochinine, acido abscissico, acido indol-3-acetico ecc.);
- pigmenti fotosintetici;
- proteine (enzimi);
- aminoacidi (asparagina, glutammina, triptofano, alanina, metionina ecc.).

I gemmoterapici permettono di avere risultati terapeutici sicuri e documentati e risultano essere orientati in particolare al drenaggio, al rinnovamento tissutale e al "terreno" in generale del paziente. Essi sono meno indicati in caso di patologie specifiche se non come "sponda" ad altri rimedi). Fra gli effetti loro riconosciuti troviamo:

- azione drenante;
- azione rigenerante e organotrofica specifica;
- attivazione del SRE- Sistema Reticolo-Endoteliale (chiamato a neutralizzare sostanze e organismi estranei);
- azione riequilibrante (es. riequilibrio minerale).

Preparati di nuova generazione

Con l'avanzare della tecnologia si affacciano nuovi prodotti che vantano particolari caratteristiche. Spesso però non presentano una sufficiente documentazione scientifica su sicurezza ed efficacia. Per tale motivo la maggior parte di loro vanno utilizzati in campo salutistico e non terapeutico. Di seguito una breve descrizione di alcuni dei più rilevanti.

Estratti con solventi costituiti da gas compressi in fase liquida: facili da allontanare e capaci di lavorare a bassissime temperature.

Estratti idro-enzimatici EIE: impiegano processi enzimatici sequenziali per eliminare in modo mirato le macrostrutture molecolari vegetali (polisaccaridiche e proteiche) che racchiudono i principi attivi; si dovrebbe così ottenere un fitocomplesso più fedele all'originale della pianta stessa.

SIPF - Sospensione Integrale di Pianta Fresca

La pianta fresca, entro 6 – max. 24 h dalla raccolta, viene portata a – 50° utilizzando azoto liquido (con temperatura - 196°) ottenendo così il blocco di tutte le attività enzimatiche. Si sottopone poi a crio-frantumazione (evitando così il calore normalmente prodotto per attrito durante la triturazione) ottenendo una pasta omogenea che si sospende in alcol (fino a una concentrazione alcolica del 30% in peso) così da conservare l'arresto dell'attività enzimatica anche a temperatura ambiente. Tramite il processo brevettato di "ultrapressione molecolare" si giunge a una micro-sospensione stabile (per ca. 3 anni) che rappresenta il prodotto fitoterapico.

Si somministra durante i pasti con dosi da 5 ml diluiti in poca acqua, ciò riattiva l'attività enzimatica; il preparato contiene in tal modo il contenuto originale della matrice vegetale di provenienza (senza alcuna degradazione enzimatica dovuta a estrazioni, essicazioni ecc.).

Essendo un processo piuttosto costoso viene applicato a poche specie con principi attivi poco solubili e molto delicati (drenanti, rilassanti, circolatori): equiseto, bardana, carciofo, ippocastano, eucalipto, fucus, meliloto, melissa, spirea, ortica, passiflora, ribes nero, tarassaco.

Si commercializzano accompagnate da certificato di analisi.

Liposomi e fitosomi: sono formati con una sonificazione (specifico utilizzo di ultrasuoni) di fosfolipidi in una soluzione acquosa contenente il principio attivo. Si ottengono così dei complessi (micelle di grasso) formati da 1/3 di derivato vegetale e 2/3 di matrice fosfolipidica in cui fosfolipidi formano delle membrane sferiche bilamellari intorno ai principi attivi nella soluzione acquosa (il diametro di tali sfere risulta variabile tra i dieci nanometri e i dieci micron). Le membrane formate sono simili alle membrane cellulari del corpo umano. Tale somiglianza consente loro di trasportare le sostanze bioattive direttamente nella cellula, questo è possibile grazie a una fusione tra liposoma/fitosoma e cellula senza che si usufruisca dei ricettori cellulari. Ciò incrementa l'assorbimento, la concentrazione plasmatica, la durata e

l'efficacia di principi attivi erballi altamente idrofili. A parità di dosaggio in principi attivi la biodisponibilità orale della forma lipo e fitosomiale è almeno 3 volte superiore rispetto alla forma libera. I fitosomi sono delle strutture in cui il principio attivo è ancorato alla testa polare del fosfolipide e diventa parte integrante della membrana micellare, diversamente dai liposomi in cui il principio attivo è generalmente contenuto all'interno della struttura micellare formata dai fosfolipidi.

Nanoparticelle: le nanotecnologie, che identificano oggetti e particelle con grandezze comprese tra 1 e 100 nm circa, sono sempre più pervasive dei vari settori industriali e aiutano a sviluppare materiali sempre più avanzati e performanti. Di solito si pensa alle nanoparticelle come a qualcosa di artificiale, ma le stesse molecole biologiche alla base della vita, dai costituenti molecolari del corpo umano, animale e delle piante a forme viventi semplici come i virus, o a materiali inorganici naturali (es. polveri vulcaniche), rientrano nell'ordine di grandezza che identifica questa classe di materiali. A livello di processo di sviluppo, le nanotecnologie potrebbero aiutare a migliorare la texture e il sapore degli alimenti e a ottimizzare la biodisponibilità di nutrienti essenziali (quali vitamine, minerali o enzimi) e principi attivi, che potrebbero venire nano-incapsulati per preservarne le caratteristiche durante la cottura e la successiva metabolizzazione.

A fianco di queste significative potenzialità, occorre però considerare che i nanomateriali sono una tipologia relativamente recente e ancora largamente inesplorata dal punto di vista della potenziale tossicità per l'uomo e per l'ambiente, soprattutto a lungo termine.

Meccanismo d'azione

Oggi sappiamo che le molecole fitoterapiche possono agire, oltre che tramite il classico meccanismo allopatico "chiave-serratura", come veri e propri interferenti metabolici. La cellula infatti possiede verso queste molecole sia recettori di membrana sia recettori intracellulari; pertanto gli estratti sono in grado di indurre cascate di trasduzione nonché attivare o inibire enzimi e proteine,

Sono poche in genere le molecole che agiscono sulla regolazione epigenetica negli integratori, se ne trovano di più negli alimenti sia come varietà sia come quantità. Tra le molecole attive (secondo IEO - Istituto Europeo di Oncologia di Milano) troviamo sostanze di tipo polifenolico quali antocianine, flavonoidi e catechine:

Antocianine o antociani

Flavonoidi poliaromatici poliossidrilati molto diffusi in frutta e verdura, pigmentano di colore rosso-blu fiori e frutta, presenti in arance rosse, frutti di bosco, ciliegie, fragole, albicocche, cachi, melanzane, prugne nere, patate viola, radicchio ecc.; in linea generale quanto più presentano colore rossastro o bluastrò tanto maggiore sarà il contenuto in antociani. Si conoscono più di 500 antocianine composte da circa 20 antocianidine (porzione non zuccherina ossia aglicone) combinate in vario modo tra di loro e con molecole zuccherine a formare glicosidi antocianici.

Sono molecole antiossidanti e antinfiammatorie, presentano azione anti-aging, migliorano il microcircolo e la salute cardio e cerebrovascolare.

A livello epigenetico consentono una migliore attivazione dei meccanismi DNA-repair, modulano la via di segnalazione Akt/HOTAIR (HOX transcript antisense RNA). Inoltre inibiscono la proliferazione di cellule tumorali, a es. nel tumore al colon, tramite l'attività di scavenger delle molecole reattive dell'ossigeno (ROS), l'attivazione della caspasi-3 (e la conseguente apoptosi) e up-regulation dell'espressione di p21Waf/Cif1 (con conseguente interruzione del ciclo cellulare).

Tramite la capacità degli antociani di inibire il fattore di trascrizione NF-κB, ne risulta un loro potere antinfiammatorio e un effetto di modulazione positiva della flora batterica (aumento dei ceppi di bifidobacter).

Inoltre inducono l'espressione dell'enzima AMPK: la proteina chinasi AMPK è una proteina che ha il compito di monitorare lo stato energetico della cellula) che porta al silenziamento di Tor (gerontogene) e a una migliore manutenzione cellulare (favoriscono quindi il prolungamento della vita cellulare).

Sono termolabili quindi è opportuna la consumazione a crudo oppure una breve cottura al vapore. L'assunzione quotidiana di antocianina è relativamente alta tra la popolazione, tra 500mg e 1g, anche solamente 100 mg in più possono aumentare l'effetto antiossidante e antinfiammatorio.

Curcumina

Definita E100 nella codifica europea degli additivi alimentari, è un pigmento polifenolico estratto perlopiù dalla radice della Curcuma longa (curcuma domestica), di cui la curcumina

risulta essere il principale curcuminoide, utilizzato principalmente come colorante alimentare (presenta un colore giallo-arancione simile allo zafferano).

La curcumina è però anche in grado di intervenire su varie patologie grazie a diversi meccanismi di modulazione epigenetica; inibizione della DNA-metiltransferasi DNMT (agente ipometilante), modificazione degli istoni tramite regolazione di istone acetiltransferasi HAT e deacetilasi HDAC, modulazione di microRNA (miR-15a, miR-16, miR-21, miR-22, miR-101, miR-146, miR-200, miR-203, let-7), attivazione di citochine, chemochine, fattori di trascrizione, geni oncosoppressori.

Riguardo l'importante effetto antinfiammatorio, in fase sia acuta sia cronica, la curcumina ha dimostrato essere una molecola altamente pleiotropica (fa sì che un unico gene determini effetti fenotipici multipli), in grado di interagire con numerosi bersagli molecolari implicati nei processi infiammatori. I curcuminoidi hanno inoltre dimostrato azione antiossidante bloccando i radicali liberi circolanti e inibendone la neoformazione.

Proprietà neuroprotettive e neurotrofiche sono state dimostrate per la curcumina. In particolare per la malattia di Alzheimer (AD), essa ostacolerebbe la formazione e l'aggregazione della proteina beta-amiloide implicata nella tipica degenerazione progressiva delle cellule cerebrali. Svolge un ruolo di primo piano contro le patologie neurodegenerative (bypassano la barriera emato-encefalica agendo così in loco). A tale riguardo ottimizza la sua azione se associata a fonti di grassi (combinazione con omega 3 e Vit. D).

In ambito oncologico inibisce l'angiogenesi (che favorisce sviluppo e proliferazione delle cellule neoplastiche), è un potente inibitore del fattore di trascrizione NF-κB inducendo l'apoptosi cellulare, stimola l'espressione della proteina pro-apoptosi Bax e inibisce l'attivazione delle proteine anti-apoptosi Mcl-1 e Bcl-2, inibisce la via di segnalazione PI3K/AKT.

Relativamente al tumore al seno inoltre sembra che la curcumina moduli i processi che coinvolgono il recettore degli estrogeni (ER), il fattore di crescita epidermico del recettore 2 (HER2).

Recentemente uno studio indica come la supplementazione con curcuminoidi possa ridurre significativamente la malondialdeide sierica (MDA) e aumentare le attività di SOD in pazienti con diabete mellito tipo 2. La MDA è una molecola elettrofila altamente reattiva che viene prodotta in seguito alla degradazione degli acidi grassi polinsaturi. La catena di reazioni

ossidative, forma una serie di composti chiamati ALEs o Prodotti Finali della Lipossidazione Avanzata, che possono essere paragonati agli AGEs o Prodotti Finali della Glicazione Avanzata. La produzione di queste aldeidi è impiegata come biomarker per misurare il livello di stress ossidativo nell'organismo.

Il limite della curcumina in vivo è la sua biodisponibilità molto bassa. Seppur la sua idrofobicità le consente il superamento della barriera emato-encefalica (e quindi un certo accumulo nelle cellule neuronali) al contempo rende la molecola alquanto instabile, inoltre il suo assorbimento intestinale e la sua metabolizzazione epatica sono rapidi. La ricerca punta a ottenere molecole che superino questo limite intrinseco di biodisponibilità. Utile risulta essere a es. la combinazione con enhancer (intensificatori), come la piperina, che ne aumentano la capacità di assorbimento da parte dell'organismo.

Data la sua bassa tossicità, la curcumina consente alti dosaggi: 500-1500 mg/die divisi in 2-3 razioni risulta essere la posologia terapeutica consigliata. Poiché l'azione epatotossica inizialmente correlata alla curcumina si è dimostrata in realtà dovuta solo alle sostanze utilizzate per sua integrazione, risulta importante accertarsi sulla composizione dei prodotti).

Quercetina

Flavonoide (appartenente al gruppo dei flavonoli) presente in capperi, cipolle rosse, asparagi, lattuga, sedano, scalogno, pomodori, cioccolato, cruciferee o brassicaceae (es. erisimo), frutti di bosco, uva nera e quindi vino rosso, melograno, agrumi, mele, noci, pistacchi, tè verde, propoli, abbonda negli estratti di ippocastano, biancospino, ginkgo biloba, iperico, calendula; non è presente in natura nella forma isolata bensì come aglicone (parte non zuccherina) di vari glicosidi tra cui rutina e quercitrina. Agisce similmente alle antocianine amplificando la risposta ad AMPK nel tessuto adiposo; pertanto la quercetina si assorbe meglio in presenza di grassi, è termolabile; ne occorrono dosi giornaliere piuttosto cospicue (1 grammo eventualmente frazionato contro i 30 mg mediante assunti giornalmente con la dieta occidentale), se in forma glicosidica presenta una migliore biodisponibilità rispetto alla forma isolata (quindi è da preferirsi la via alimentare). Ben tollerata, tuttavia evidenze preliminari in vitro suggeriscono cautela in gravidanza per possibili effetti teratogeni (favorenti lo sviluppo anormale di alcuni organi del feto). Le vengono attribuite le seguenti azioni:

antiossidanti dirette e indirette: rigenera il tocoferolo (Vit. E), elimina l'anione superossido e

limita la biosintesi dell'ossido nitrico NO durante i processi infiammatori; potenzia e protegge il pool di enzimi antiossidanti endogeni (catalasi, superossido dismutasi, glutazione perossidasi e reduttasi);

antiinfiammatorie: inibisce vie preinfiammatorie che portano alla biosintesi di prostaglandine infiammatorie (inibizione delle reazioni della 5-lipossigenasi, della fosfolipasi A2, interferendo sulla biosintesi di leucotrieni, prostaglandine e altri mediatori);

antiaggregante e cardioprotettiva (possibile interferenza con farmaci anticoagulanti quali i dicumarolici);

antitumorale: mediante modulazione epigenetica e inibizione di vari enzimi endocellulari quali tirosin-chinasi TK (incluso il recettore del fattore di crescita epidermico EGFR), protein-chinasi calcio-fosfolipidi dipendenti PKC e in particolare ornitina decarbossilasi ODC (che produce le poliammine coinvolte nella proliferazione cellulare) e chinasi di fosfoinositidi PI3K e PI4K-5K (famiglia di enzimi coinvolti in complessi meccanismi cellulari come la crescita cellulare, la proliferazione, la differenziazione, la motilità e la sopravvivenza intracellulare; meccanismi questi coinvolti anche nello sviluppo del cancro), viene inoltre soppressa l'espressione del gene JAK2 (contrastando la proliferazione e metastatizzazione delle cellule neoplastiche e stimolando i processi di autofagia e apoptosi programmata);

blanda inibizione delle aromatasi (sistema enzimatico deputato alla conversione degli ormoni androgeni in estrogeni)

azione neuroprotettiva e neurotrofica: coadiuvante nelle terapie delle patologie neurodegenerative e nella prevenzione delle stesse, viene proposta come composto anti-invecchiamento in sinergia con altri antiossidanti (es. Vit. C).

Resveratrolo

Polifenolo non flavonoide (la sua molecola 3,5,4'-triidrossi-trans-stilbene è simile a quella degli estrogeni sintetici) presente in uva, vino rosso, cacao, arachidi, alcune bacche e in alcune piante fra cui il *Polygonum cuspidatum* che ne è una ricca fonte.

Come antiossidante il resveratrolo risulta più efficace di Vitamina C ed E oltre che dei flavonoidi in quanto agisce anche a monte della reazione chelando il rame CU inattivandolo. Il resveratrolo inoltre regola l'espressione genica di enzimi pro-ossidanti (soppressione tramite la down-regulation di NADPH-ossidasi con conseguente riduzione delle specie reattive

dell'ossigeno) e antiossidanti (induzione di SOD1 e GPX1). La sua attività diretta di scavenging (trasformazione dei radicali liberi dell'ossigeno in composti privi di reattività e quindi di tossicità) risulta invece ridotta data la breve emivita della molecola di resveratrolo. Questo stilbene svolge un ruolo fondamentale nella modulazione dell'apoptosi cellulare tramite svariati meccanismi: attivazione dei mitocondri e della cascata delle caspasi, up-regulation degli inibitori delle chinasi ciclina-dipendenti, delle citochine apoptosi-inducenti e dei relativi recettori, down-regulation di proteine di sopravvivenza cellulare (survivina, cFLIP, cIAP, XIAP, Bcl-2, Bcl-XL), delle chinasi di sopravvivenza cellulare (MAPK, PI3K, PKC, EGFR chinasi) e di fattori di sopravvivenza della trascrizione (NF-kB, AP-1, HIF-1-alpha ecc.). Esso induce anche autofagia, inibendo direttamente la via mTOR (comportandosi da antagonista del ATP), e la morte di cellule tumorali, inibendo la via mTORC1.

La capacità del resveratrolo di regolare la sintesi del DNA e del ciclo cellulare fanno di lui un "epidrug dietetico" (farmaco epigenetico) in grado di esercitare attività antitumorale modificando lo stato di metilazione di geni correlati a vari tipi di tumore. Esso oltre a modulare le informazioni genetiche, interviene sulle tre fasi della carcinogenesi (iniziazione, promozione e progressione); presenta inoltre effetto chemiosensibilizzante.

Il resveratrolo stimola la produzione di sirtuine in sinergia con la melatonina; se si considera che spesso questi 2 elementi si trovano negli stessi alimenti sembra suggerire un loro utilizzo combinato in terapia e prevenzione.

Il resveratrolo induce effetti neuroprotettivi e neurotrofici (dimostrati sia in vitro sia in vivo) trovando quindi impiego anche nell'ambito delle malattie neurodegenerative (risulta molto efficace nel mantenere in vita le cellule neuronali).

Occorre considerare nell'utilizzo di questo prezioso principio attivo la sua bassa biodisponibilità dovuta all'alta velocità di metabolizzazione. La biodisponibilità del resveratrolo è aumentata dai succhi gastrici pertanto ne è consigliata l'assunzione durante i pasti. Dati gli ampi margini di scurezza e non tossicità in vivo, la posologia consiglia per un utilizzo clinico è di 250-500 mg/die (quantità non sempre riscontrabili negli integratori). La polidatina ossia il resveratrolo in forma glicosilata risulta molto più biodisponibile. Va ricordato che come sempre occorre liberare la parte zuccherina per rendere il principio attivo libero di agire; ciò viene eseguito dal microbiota intestinale (da cui l'importanza cruciale di evitare la

disbiosi intestinale in quanto non consente l'efficacia delle molecole delle piante⁹.

Dato il suo potere fluidificante, sembra che il resveratrolo interferisca con i farmaci fluidificanti (es. warfarin) e con farmaci antinfiammatori non steroidei (aspirina, ibuprofene) aumentando il rischio di sanguinamento.

Fisetina

Flavonolo (polifenolo flavonoide) presente in svariate verdure e frutti (cetriolo, cipolla, fragole, mele, cachi), stabilizza e amplifica gli effetti del resveratrolo. È un potente attivatore delle sirtuine mimando gli effetti della restrizione calorica agendo come anti-aging. Ha dimostrato (in coltura e in vivo) di inibire o ritardare la crescita di cellule tumorali agendo su molteplici vie di segnalazione intracellulare. Una delle sue vie di modulazione epigenetica consiste nell'inibire la cascata di mTOR e PI3K/AKT (meccanismo di base dello sviluppo e proliferazione delle cellule neoplastiche) mentre l'inibizione della via di mTORC1 contrasta lo sviluppo di obesità causata da alimentazione scorretta. Contrasta inoltre il diabete, la glicazione (glicosilazione non-enzimatica ossia legame covalente monosaccaride-proteina o lipide senza l'azione di controllo di un enzima, trattata nel relativo paragrafo) e l'infiammaging (infiammazione cronica di grado basso legata all'invecchiamento) inoltre l'aumento dell'espressione delle proteine P53 e P21 evidenzia che è in grado di ridurre i danni al DNA. Il dosaggio standard è di 100 mg/die aumentabili secondo necessità.

Licopene

Carotenoide (idrocarburo isomero aciclico del beta-carotene) presente in natura nella struttura isometrica trans (forma più stabile termodinamicamente) e in massima quantità nel pomodoro rosso maturo (50mg/kg contro i 5 mg/kg della varietà gialla) e in misura inferiore in albicocca, uva, anguria, pompelmo rosa, papaia, guava, funghi.

La sua biodisponibilità è maggiore nel prodotto trattato termicamente in quanto vengono dissociati i complessi proteici che lo incorporano e vi è la dispersione degli aggregati cristallini dei carotenoidi. Alcuni trattamenti termici inoltre aumentano il rapporto cis/trans tra gli isomeri del licopene (gli isomeri cis sono più biodisponibili rispetto ai trans). Anche la triturazione dei tessuti ne aumenta la biodisponibilità. Passate e concentrati di pomodoro sono quindi caratterizzati da una maggiore biodisponibilità di licopene rispetto al pomodoro crudo e al succo di pomodoro. Il licopene in tutte le sue forme risulta idrofobo (non si dissolve in acqua) e

liposolubile. Pertanto la dieta mediterranea utilizzando pomodori cotti e olio d'oliva, oltre a essere una valida fonte di licopene, ne favorisce il suo assorbimento intestinale; il licopene risulta così il carotenoide maggiormente presente nell'organismo umano, seguito da beta-carotene, luteina, zeaxantina e astaxantina. L'organismo umano non è in grado di sintetizzare il licopene e lo contiene sia nel plasma (concentrato nella frazione lipidica delle alle LDL - Low Density Lipoprotein - e VLDL - Very Low Density Lipoprotein – proteggendole da fenomeni ossidativi) sia nei tessuti di vari organi e ghiandole (fegato, testicoli, ghiandole surrenali, prostata, cute), principalmente in forma cis 5,6-diidrossi-5,6-diidrossi-licopene. Presenta un tempo di emivita di 2-3 giorni.

Studi dimostrano la sua capacità di ridurre il rischio di tumore alla prostata grazie ai suoi effetti modulatori sull'espressione di geni associati a progressione del tumore, infiammazione e apoptosi; epigeneticamente down-regola l'espressione di AKT2 e up-regola quella di miRNA. Il licopene presenta effetti citotossici su una grande varietà di tipi di tumore.

Il licopene risulta altamente efficace contro l'intossicazione da glutammato monosodico MSG tramite: inibizione della perossidasi lipidica, modifiche dell'attività della colinesterasi, modulazione di percorsi epigenetici antiossidanti (glutathione-S-transferasi GST, superossido dismutasi SOD, catalasi CAT). Sono stati dimostrati gli effetti protettivi del licopene contro le malattie cardiovascolari (CVD) in cui l'ossidazione delle LDL svolge un ruolo chiave nello sviluppo delle lesioni aterosclerotiche. Ulteriori effetti benefici dei carotenoidi a tale riguardo sono: abbassamento della pressione sanguigna, riduzione della biosintesi di citochine pro-infiammatorie e marker infiammatori (es. proteina C-reattiva), miglioramento della sensibilità all'insulina di muscoli, fegato, tessuto adiposo.

Grazie sempre alle sue proprietà antiossidanti, il licopene protegge da malattie neurodegenerative (demenze, Parkinson, Alzheimer) specie in combinazioni con gli altri carotenoidi.

I carotenoidi e i loro metaboliti e prodotti di ossidazione migliorano la comunicazione intercellulare attraverso le Gap-Junction (che risultano deficitarie in presenza di tumore e la cui rigenerazione frena la moltiplicazione cellulare).

Riguardo la posologia, si può arrivare in tutta sicurezza fino a 100 mg/die (a partire da almeno 20 mg/die). Il licopene in commercio può essere prodotto per sintesi chimica da materie prime

sintetiche (licopene sintetico) oltre che estratto dai vegetali.

Il licopene viene utilizzato anche come colorante per uso alimentare (E 160 D LICOPENE) e per altre applicazioni cosmetiche e farmaceutiche.

Epigallocatechina-3-gallato (EGCG)

È la più abbondante catechina di tipo tanninico presente nel tè in particolare verde. Si trova anche in altri alimenti ma in minore quantità (more, lamponi, mele, prugne, pesche, avocado, carrube, noci, nocciole, pistacchi). È un polifenolo con azione antiossidante e antinfiammatoria. Le catechine del tè sono in grado di modulare vari utili processi epigenetici. In particolare esse sono in grado di invertire la metilazione a livello dei geni oncosoppressori aumentandone al contempo la loro trascrizione. Fra le altre cose i polifenoli del tè verde, EGCG in primis, mediano l'induzione epigenetica degli inibitori delle metalloproteasi (TIMP). In qualità di modulatore delle metalloproteasi (descritte nel par. MEC), EGCG può agire a vari livelli: oncologici (es. modulando TIMP-3 che svolge un ruolo chiave nel sopprimere l'attività gelatinolitica degli enzimi MMP-2 e MMP-9 e il relativo effetto metastatico), mantenimento dell'omeostasi endoteliale (e conseguente contrasto dello sviluppo della disfunzione endoteliale ED implicata nella patogenesi di molte malattie e complicazioni metaboliche fra cui malattia coronarica, malattia arteriosa periferica, ictus, neuropatie e retinopatie del diabete, nefropatia, sindrome metabolica), estetici (anti skin aging). Oltre all'attività antiossidante e di modulazione epigenetica, EGCG è un potente antinfiammatorio (es. inibisce le interleuchine-6 e -8) trovando così applicazione in problematiche quali inflamming, colon irritabile, morbo di Crohn, colite ulcerosa ecc. Sopprimendo la neuroinfiammazione esso potenzia le funzioni mnesiche (memorizzazione) dell'apprendimento e quelle cognitive in generale proteggendo anche dalle lesioni neuronali indotte da neurotossine.

Secondo il ministero della Salute Italiano, l'apporto massimo giornaliero di assunzione di EGCG è di 300 mg/die, nelle donne in gravidanza e durante l'allattamento la dose scende a 120 mg. In entrambi i casi gli apporti indicati vanno frazionati in almeno due assunzioni da effettuare dopo i pasti. Secondo l'Efsa, l'Agenzia europea per la sicurezza alimentare, dosi di 800 mg al giorno o superiori potrebbero costituire un rischio per la salute in particolare legato a patologie epatiche. È possibile trovare tali quantità in alcuni integratori (che sono quindi pericolosi) mentre il contenuto medio di catechine assunto con il consumo di bevande a base di

tè si aggira tra i 90 e i 300 mg. Efsa ha di fatto scagionato le bevande a base di tè verde, quali infusi, tisane o bevande istantanee, in quanto anche se consumate in dosi elevate non hanno provocato alcun danno al fegato, mentre invece mette in guardia dagli integratori che eccedono la soglia indicata.

Capsaicina o capsicina

Alcaloide del gruppo dei capsaicinoidi dal caratteristico potere irritante, contenuto nelle piante del genere *Capsicum*, fra le quali il peperoncino ne rappresenta la principale fonte. I

capsaicinoidi presentano vari interessanti effetti fisiologici e farmacologici. Sono stati infatti dimostrati gli effetti analgesici, antitumorali, antiossidanti, antinfiammatori, anti-obesità della capsaicina. Nello specifico la capsicina si lega ai recettori nervosi periferici vanilloidi di tipo 1 (TRVP1), localizzati perlopiù su fibre nervose sensoriali polimodali di tipo C, con ruolo primario nell'iperalgisia e allodinia (dolore suscitato da uno stimolo che normalmente non provoca sensazioni dolorose). La capsaicina manifesta la sua attività antitumorale modulando delicati processi epigenetici stimolando l'apoptosi e inibendo l'espressione del VEGF (Vascular-Endothelial Growth Factor) che svolge un ruolo di grande importanza nella determinazione dell'angiogenesi e della vascolarizzazione della massa tumorale. Inoltre è in grado di inibire la NADH ossidasi tumore-associata tNOX (idrochinone ossidasi implicata nello sviluppo e crescita delle cellule tumorali). A livello endoteliale alcuni studi hanno dimostrato che l'afflusso di calcio, innescato dall'attivazione dei canali recettoriali TRPV1 (Transient Receptor Potential Vanilloid 1 mediano il flusso transmembrana di cationi secondo il loro gradiente elettrochimico), porta all'aumento dell'espressione dell'enzima eNOS (Ossido Nitrico Sintasi endoteliale), di COX-2 (prostaglandina-endoperossido sintasi 2), trombomodulina (CD 141 o BDCA-3 proteina integrale di membrana delle cellule endoteliali, cofattore della trombina nel processo di espressione della proteina C che funge da anticoagulante) e di enzimi antiossidanti Nrf2-reattivi, riducendo la presenza di proteine pro- e cardioinfiammatorie con conseguente beneficio sulla vasodilatazione endotelio-dipendente. L'azione anti-obesità sarebbe da collegare sia all'attivazione delle proteine disaccoppianti mitocondriali (UCP) sia all'attivazione del sistema nervoso simpatico, azioni entrambe in grado di incrementare la termogenesi. Inoltre i capsinoidi, ulteriori metaboliti secondari presenti (differiscono dai capsaicinoidi in quanto presentano un legame estereo al posto di quello

ammidico), aumentano il senso di sazietà e riducono l'intake dei grassi.

La posologia indicata è 1 g di peperoncino ogni 10 kg di peso corporeo o 0,6-10 mg/die del principio attivo (estratto secco titolato al 2%) suddiviso in 3 somministrazioni per evitare il rischio dose-dipendente di pirosi gastrica ("bruciore di stomaco").

Indolo-3-carbinolo (I3C), diindolimetano (DIM) e sulforafano

L'indolo-3-carbinolo e il suo derivato di condensazione acida diindolimetano sono principi attivi presenti nelle Brassicaceae o Cruciferae (broccoli, cavoli, verze ecc.); il loro precursore è il glucosinolato (glucoside contenente zolfo) glucobrassicina.

Il sulforafano è un isotiocianato forma attiva della glucorafanina, un altro glucosinolato delle cruciferae (germogli di broccoli e cavolfiori ne sono particolarmente ricchi).

I3C arresta la crescita delle cellule tumorali umane nella fase riproduttiva G1, è un potente induttore degli enzimi del citocromo P450 (CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1).

I3C e DIM modulano il metabolismo degli estrogeni incrementando la 2-idrossilazione che a sua volta comporta un aumento del rapporto fra gli estroni 2-OH (2-idrossiestrone)/16-OH (16 α -idrossiestrone) proteggendo così da sviluppi tumorali. A tale riguardo occorre notare che il Lupus eritematoso sistemico (LES) rappresenta una malattia autoimmune che si caratterizza per una forte associazione col metabolismo degli estrogeni: nelle donne affette da LES è orientato verso la sintesi di 16 α -idrossiestrone. Indolo-3-carbinolo può alterare il metabolismo degli estrogeni, che nelle donne affette da LES è orientato verso la sintesi di 16 α -idrossiestrone, favorendo la sintesi di metaboliti dotati di minore attività estrogenica ha dimostrato, in uno studio sperimentale su animali, di prolungarne la vita oltre che limitare i segni di questa patologia.

Sempre I3C e DIM sono in grado di stimolare i geni antitumorali p21, p27 e p53, ottenendo così un effetto preventivo aspecifico attivo anche contro i virus herpes simplex e human papilloma virus. Inoltre entrambi stimolano la produzione di enzimi detossificanti da parte del fegato in grado di neutralizzare i metaboliti dannosi di estrogeni e xenoestrogeni.

Il sulforafano manifesta una chiara azione epigenetica, agisce come inibitore dell'istone deacetilasi HDAC dimostrandosi agente chemioterapico preventivo e curativo. È un antiossidante, un induttore della fase II della disintossicazione (vedi paragrafo relativo) e protegge contro i danni vascolari da diabete. È infatti un attivatore del fattore di trascrizione

nucleare eritroide 2 - Nrf2 – che regola l'espressione genica di una grande varietà di enzimi citoprotettivi, antiossidanti e della fase II di disintossicazione attraverso una sequenza nota come "elemento di risposta antiossidante" (ARE); tale meccanismo è da attribuire in parte il potere neuroprotettivo di questo principio attivo. Il sulforafano in vitro inibisce la formazione degli AGE (prodotti finali della glicazione avanzata), sopprime le reazioni infiammatorie AGE-indotte, riduce l'espressione dei rAGE (recettori degli AGE); questi risultati indicano come il blocco dello stress ossidativo e/o dell'asse AGE-rAGE da parte del sulforafano possa risultare una via terapeutica e di prevenzione contro le complicanze vascolari da diabete. Uno studio di 12 settimane condotto su 97 persone con diabete di tipo 2, ha esaminato gli effetti sui livelli di glucosio nel sangue durante un consumo quotidiano di estratto di germogli di broccolo equivalente a 150 μmol di sulforafano; lo studio ha rilevato che il sulforafano ha ridotto efficacemente i livelli di zuccheri nel sangue del 6,5% e ha migliorato la concentrazione dell'emoglobina glicata (HbA1c), la quale risulta essere un marker di identificazione della concentrazione plasmatica del glucosio nel lungo termine (questi effetti sono stati particolarmente consistenti nei partecipanti obesi con scarso controllo del diabete). Altra proprietà del sulforafano è la capacità di indurre autofagia consentendo l'eliminazione degli aggregati proteici anomali e tossici (in grado di provocare stress e necrosi cellulare); a livello neuronale ciò attribuisce al sulforafano anche un'intrinseca azione contro le patologie neurodegenerative.

Riguardo la loro biodisponibilità, va osservato che la glucobrassicina è il precursore del glucosinolato dell'I3C, quest'ultimo è ottenuto tramite l'idrolisi catalizzata dall'enzima mirosinasi (β -tioglucosidasi). L'enzima mirosinasi è fisicamente separato dai glucosinolati nelle cellule vegetali intatte mentre quando le verdure crocifere crude vengono tritate o masticate le cellule vegetali vengono danneggiate e la glucobrassicina si espone all'azione della mirosinasi. L'idrolisi della glucobrassicina inizialmente produce una molecola di glucosio e l'aglicone instabile (tioidrossimato-O-solfonato), il rilascio spontaneo di uno ione solfato porta a formazione di un'altra forma intermedia instabile, il 3-indolilmetilisotiocianato, che si scinde facilmente in ione tiocianato e I3C. Nell'ambiente acido dello stomaco, le molecole I3C possono combinarsi tra loro per formare una complessa miscela di composti aromatici policiclici, noti collettivamente come "prodotti di condensazione acida" in cui sono presenti il 3,3'-

diindolilmetano (DIM), 5,11-diidroindolo- [3,2-b] carbazolo (ICZ) e un triindolo ciclico (CT). Quando le verdure crocifere vengono cotte, la mirosinasi vegetale viene inattivata ma la generazione di I3C può ancora verificarsi, in misura minore, nell'intestino crasso, tramite la mirosinasi prodotta dai batteri del colon, mentre i prodotti di condensazione acida derivati dall'I3C hanno meno probabilità di formarsi nell'ambiente più alcalino dell'intestino. Non è stato possibile rilevare I3C nel plasma dopo somministrazione orale di dosi singole di I3C, comprese tra 200 e 1.200 mg, in donne sane ad alto rischio di carcinoma mammario, tuttavia DIM è stato rilevato nel plasma, con picco circa due ore dopo l'ingestione di I3C, a concentrazioni da 100 nanogrammi per millilitro con dosi orali da 400 a 600 mg di I3C, fino a 500-600 ng/ml con dosi orali di 1.000-1.200 mg. Tutti i DIM sono scomparsi dal sangue entro 24 ore; normalmente gli individui consumano tra 20 e 120 mg di I3C al giorno attraverso la dieta.

Strategie di formulazione, come l'incapsulamento di I3C e DIM in nanoparticelle o liposomi, vengono sviluppate allo scopo di aumentare la biodisponibilità e valutare la sicurezza e l'efficacia di questi composti nell'uomo.

Anche l'attivazione del sulforafano avviene per azione dell'enzima mirosinasi. Quando la mirosinasi opera sulla glucorafanina produce un intermedio instabile: se ciò avviene in presenza della "epithiospecifier protein" (ESP), essa interagisce con la mirosinasi facendo sì che l'intermedio sia convertito in sulforafano nitrile (5methylsulfinylpentane nitrile) che non ha alcuna attività antineoplastica. Se la ESP è inattiva, l'unica via biosintetica possibile risulta quella che porta l'intermedio a sulforafano. La cottura per tempi brevi porta alla denaturazione e quindi inattivazione della ESP con conseguente aumento della quantità di sulforafano mentre una eccessiva cottura può portare alla denaturazione anche dell'enzima mirosinasi e conseguente abbattimento del contenuto di sulforafano come è stato dimostrato nei broccoli; questo livello di cottura eccessiva viene raggiunto molto facilmente: 3 minuti di cottura nel microonde a 800 watt si sono dimostrati in grado di abbattere il contenuto di sulforafano, idem per 1 minuto a 900 W, 1 minuto di bollitura, 5 minuti per la cottura a vapore (che pertanto risulta il miglior metodo di cottura per preservarne l'azione). Anche qui va però ricordato che parte della sua biodisponibilità può comunque essere garantita grazie alla mirosinasi generata dalla microflora intestinale.

Il prodotto fresco contiene in media 10 volte il contenuto di sulforafano rispetto ai broccoli congelati (la congelazione sembra inattivare le mirosinasi).

Il consumo di sulforafano nelle quantità riscontrate nelle verdure crocifere è considerato sicuro, senza effetti collaterali. Gli integratori di sulforafano sono in genere composti da estratti di broccolo o di germogli di broccolo e di norma contengono concentrazioni di sulforafano superiori a quelle degli alimenti. Anche la glucorafanina (precursore del sulforafano) è disponibile come integratore alimentare in combinazione con l'enzima mirosinasi per la sua attivazione.

Anche se non esistono raccomandazioni per l'assunzione giornaliera di sulforafano, la maggior parte dei marchi di integratori suggerisce di assumerne circa 400 mcg al giorno, che corrispondono generalmente a 1-2 capsule. Nonostante la loro crescente popolarità, sono necessarie ulteriori ricerche per determinare la dose giornaliera ideale e l'efficacia degli integratori di sulforafano nell'essere umano. Lievi effetti collaterali sono stati associati al consumo di integratori di sulforafano: aumento dei gas intestinali, costipazione e la diarrea. Altri principi attivi si stanno aggiungendo, man mano che le ricerche procedono. Va comunque tenuto presente che in linea generale sono sostanze con scarsa biodisponibilità e/o termolabili, sensibili non solo alla cottura ma anche alle ordinarie condizioni di conservazione, la reale utilità in vivo è quindi spesso da dimostrare e l'apporto di molte di queste sostanze deve essere cospicuo a meno che non si combinino con degli intensificatori (enhancer) che ne aumentano la capacità di assorbimento da parte dell'organismo.

Altri rimedi fitoterapici di cui si cominciano a evidenziare effetti di modulazione genica sono l'uncaria tomentosa, lo zenzero, il cardo mariano, la bacopa monnieri, vari adattogeni (come panax ginseng, rodiola rosea, withania somnifera).

Drenaggio

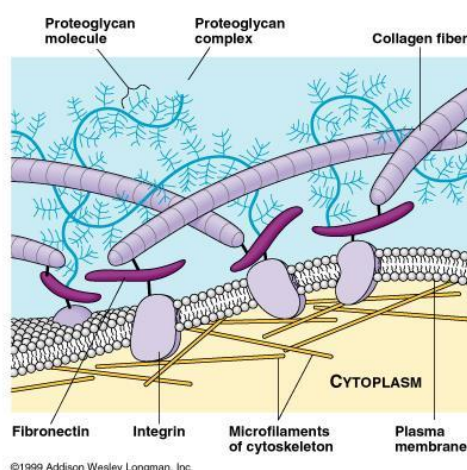
Nella tradizione fitoterapica, il termine “drenaggio” indica l'impiego temporaneo di piante scelte per sostenere funzioni fisiologiche precise, a esempio diuresi, secrezione biliare, transito intestinale o digestione. Non equivale a una generica eliminazione di “tossine” e non dimostra una presunta congestione d'organo. In termini biomedici è preferibile descrivere l'azione di ciascuna pianta attraverso parametri definiti, valutando indicazioni, controindicazioni, interazioni farmacologiche e solidità delle prove disponibili. Scelta e durata dell'intervento dipendono dalla funzione interessata e dalle condizioni cliniche individuali.

Linfra di betulla, *Betula pubescens*, *Vaccinium vitis-idaea*, *Fraxinus excelsior*, *Juniperus communis* e *Rosmarinus officinalis* sono tradizionalmente impiegati con finalità differenti. Il loro utilizzo non è intercambiabile e richiede una valutazione specifica. Il drenaggio resta pertanto una categoria tradizionale della fitoterapia: in un volume scientifico è più corretto ricondurlo alle azioni documentabili dei singoli fitocomplessi, evitando di attribuirgli una detossificazione generale non misurabile.

Terapie Connettivali

Matrice extracellulare (MEC)

Descrizione



Ogni cellula, come ogni organismo vivente pluricellulare, necessita di “sentire” e interagire col proprio ambiente per poter esplicare le funzioni vitali e sopravvivere. In un organismo pluricellulare le cellule devono coordinare i diversi comportamenti come in una comunità di esseri umani. Negli organismi pluricellulari infatti le cellule adoperano centinaia di molecole extracellulari (proteine, peptidi, amminoacidi, nucleotidi, steroidi, derivati dagli acidi grassi, gas in soluzione ecc.) per inviarsi continuamente messaggi, sia ravvicinati che a distanza. In ogni organismo pluricellulare ogni cellula si trova così esposta a centinaia di diverse molecole-segnale presenti

al suo interno e al suo esterno, legate alla sua superficie e libere o legate nella MEC. Le cellule entrano in contatto col complicatissimo ambiente esterno attraverso la loro superficie, la membrana plasmatica, tramite numerose aree specializzate (da poche decine a oltre 100.000 per ogni cellula). Gli svariati recettori di membrana sono sensibili a molti segnali provenienti sia dall'interno che dalla MEC e sono soggetti a profonde variazioni durante tutto l'arco della vita cellulare.

I recettori di superficie sono in grado di riconoscere e legare una molecola segnale (es. ormone peptidico, neurotrasmettitore) innescando così specifiche reazioni all'interno della cellula (es. secrezione, divisione cellulare, reazioni immunitarie). Il segnale proveniente da un recettore di superficie si trasmette all'interno della cellula attraverso una serie di componenti intracellulari capaci di produrre effetti a "cascata controllata" che variano in base alla specializzazione cellulare. In questo modo, cellule differenti possono rispondere con modalità e tempi diversi al medesimo segnale; a es. l'esposizione all'acetilcolina della cellula miocardica ne dirada le sue contrazioni, mentre nella cellula paratiroide stimola la secrezione dei componenti della saliva (Gennis, 1989).

La cellula pertanto continuamente combina, coordina, controlla, attiva e cessa numerose e differenti informazioni provenienti dal suo interno e dalla MEC processandole nel modo e momento giusto attivando la specifica reazione (vivere, morire, dividersi, muoversi, modificarsi, secernere qualcosa nella MEC o immagazzinarlo al suo interno ecc.). Le risposte che comportano un cambiamento genico possono richiedere parecchi minuti o ore (i geni devono essere trascritti e poi l'RNA messaggero deve essere tradotto in proteina), quando invece la cellula deve rispondere in pochi minuti o secondi utilizza sistemi di attivazione enzimatica diretta.

La MEC è generalmente descritta come composta da alcune grandi classi di biomolecole:

- ☐ Proteine strutturali (collageni ed elastina)
- ☐ Proteine specializzate (fibrillina, fibronectina, laminina ecc.)
- ☐ Proteoglicani (aggrechini, sindecani) e glicosaminoglicani (ialuronani, condroitinsolfati,eparansolfati ecc.)

Proteine strutturali

Fra le proteine strutturali, i collagene formano la famiglia di glicoproteine più rappresentata nel

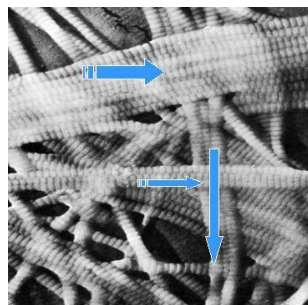
regno animale. Sono le proteine più presenti nella MEC (ma non le più importanti) e sono i costituenti fondamentali dei tessuti connettivi propriamente detti (cartilagine, osso, fasce, tendini, legamenti).

Esistono almeno 16 diversi tipi di collagene di cui i tipi I, II e III sono quelli più presenti a livello delle tipiche fibrille (il tipo IV forma una specie di reticolo che rappresenta il maggior componente delle lamine basali).

I collagene vengono perlopiù sintetizzati dai fibroblasti ma anche le cellule epiteliali sono in grado di sintetizzarli.

Le fibre collagene interagiscono continuamente con un'enorme quantità di altre molecole della MEC costituendo un continuum biologico fondamentale per la vita della cellula. I collagene associati in fibrille occupano un ruolo predominante nella formazione e mantenimento di strutture in grado di resistere a forze di tensione essendo quasi anelastiche (i glucosaminoglicani esplicano azione di resistenza a compressioni). In qualche modo il collagene viene prodotto e rimetabolizzato in funzione del carico meccanico e le sue proprietà visco-elastiche comportano, come vedremo nel paragrafo “Viscoelasticità della fascia”, un grosso impatto sulla postura dell'uomo. A ulteriore dimostrazione della capacità del collagene di modificarsi in base alle influenze ambientali, assumendo a es. gradi variabili di rigidità, elasticità e resistenza, vi sono collagene, definiti col termine FACIT (Fibril Associated Collagen with Interrupted Triple helices) in grado di agire funzionalmente come i proteoglicani (descritti di seguito nel paragrafo “Glucosaminoglicani e Proteoglicani”).

Le fibre collagene grazie al loro rivestimento di PG/GAG (proteoglicani/glucosaminoglicani) possiedono proprietà di biosensori e bioconduttori: le relative cariche elettriche comportano una maggior capacità di legare acqua e scambiare ioni e quindi una maggior capacità elettrica. Sappiamo che qualunque forza meccanica in grado di generare una



deformazione strutturale sollecita i legami inter-molecolari producendo un leggero flusso elettrico ossia la corrente piezoelettrica (Athenstaedt, 1969). In tali casi, le fibre collagene distribuiscono le cariche positive sulla propria superficie convessa e le negative su quella concava trasformandosi così in semiconduttori (consentono il flusso di elettroni sulla loro superficie a senso unico). Poiché l'energia piezoelettrica (così come quella piroelettrica generata da sollecitazioni termiche) viene neutralizzata dagli ioni circolanti in tempi brevissimi (ca. 10^{-7} – 10^{-9} secondi), per la propagazione del segnale risulta decisiva la disposizione dei PG/GAG sulla superficie delle fibrille tale da fungere da "ripetitori" dell'impulso elettrico. In particolare, una periodicità longitudinale di ca. 64 nm (che al microscopio ottico appare come una striatura) consente una velocità di propagazione dell'impulso pari a circa di 64 m/s corrispondente alla velocità di conduzione delle fibre nervose veloci (Rengling, 2001). Il forte momento dipolare delle fibrille collagene e la loro capacità di risonanza (proprietà comune a tutte le strutture peptidiche) nonché la bassa costante dielettrica della MEC facilitano la trasmissione dei segnali elettromagnetici. Pertanto la tridimensionale e ubiquitaria rete di collagene possiede anche la peculiare caratteristica di condurre segnali bioelettrici nelle tre dimensioni dello spazio, in base alla disposizione relativa tra fibrille collagene e cellule, in direzione afferente (dalla MEC alle cellule) o, viceversa, efferente.

Tutto ciò rappresenta un sistema di comunicazione in tempo reale MEC-cellula e tali bio-segnali elettromagnetici possono comportare importanti modifiche biochimiche, a esempio, nell'osso, gli osteoclasti non possono "digerire" osso piezoeletticamente carico (Oschman, 2000).

Va infine sottolineato che la cellula, non a caso, produce continuamente e con notevole dispendio di energia (ca. il 70%) materiale che deve necessariamente estromettere tramite

perlopiù lo stoccaggio esclusivo di protocollagene (precursore biologico del collagene) in specifiche vescicole (Albergati, 2004).

La stragrande maggioranza dei tessuti dei vertebrati necessita della presenza contemporanea di due caratteristiche vitali: robustezza ed elasticità. Un vero e proprio network di fibre elastiche, localizzate all'interno della MEC di questi tessuti, consente di ritornare alle condizioni iniziali dopo forti trazioni. Le fibre elastiche sono in grado di incrementare l'estensibilità di un organo o di una sua porzione di almeno cinque volte. Fibrille collagene lunghe, anelastiche, si intervallano fra le fibre elastiche col preciso compito di limitare un'eccessiva deformazione per trazione dei tessuti. L' elastina rappresenta la maggior componente delle fibre elastiche. Essa è una proteina estremamente idrofobica, della lunghezza di circa 750 aminoacidi, come il collagene ricca in prolina e glicina ma, a differenza del collagene, non è glicosata e contiene molti residui di idrossiprolina e non di idrossilisina. L'elastina si presenta come un vero e proprio network biochimico di forma irregolarmente tridimensionale composto da fibre e lamelle che permeano la MEC di tutti i tessuti connettivi. Si trova in quantità particolarmente abbondanti nei vasi sanguinei a caratteristiche elastiche (è la proteina della MEC più presente nelle arterie e rappresenta più del 50% del peso secco totale dell'aorta), nei legamenti, nel polmone e nella cute. Nel derma, contrariamente a quanto accade per il collagene, la densità e il volume dell'elastina tende ad aumentare col passare del tempo ma l'elastina vecchia appare in genere ingrossata, quasi tumefatta, spesso con aspetto frammentato e con una riduzione della componente "amorfa" (Pasquali Rochetti et al, 2004). Cellule muscolari lisce e fibroblasti sono i maggiori produttori del suo precursore, la tropoelastina, secreta negli spazi extracellulari

Proteine specializzate

La MEC contiene un elevato (e ancora non ben definito) numero di proteine specializzate non collagene che tipicamente presentano domini multipli provvisti di specifici siti di legame per altre molecole della MEC e per i recettori presenti sulla superficie cellulare. In questo modo ogni singolo componente di tali proteine funge da "amplificatore" di contatti, sia tra molecole analoghe che diverse, realizzando un infinito network biochimico in grado di generare, modulare, variare e propagare anche a distanza milioni e milioni di informazioni biochimiche (ed energetiche).

Un'importante proteina specializzata della matrice extracellulare è la fibronectina, glicoproteina

ad alto peso molecolare rinvenibile in tutti i vertebrati. Essa è un dimero glicoproteico composto da due larghe subunità unite da ponti disulfidrici. La fibronectina appare in grado di influenzare in diversi modi la crescita cellulare, l'adesione intercellulare e con la MEC (possiede la capacità di legarsi alle cellule e ad altre molecole della MEC, es. collagene, fibrina, eparina), la migrazione cellulare (la cellula può spostarsi fino a 5 cm al giorno - Albergati, 2004) ecc. L'isoforma più conosciuto, tipo III, si lega alle integrine, importanti meccanorecettori di membrana (descritti in seguito).

Infine, appare veritiero che le fibrille di fibronectina si dispongano e si formino correttamente solo in presenza di tensione; tale stiramento è generato dalle cellule stesse (Alberts, 2002).

GAG e PG

Glucosaminoglicani (GAGS) e proteoglicani (PGs) formano all'interno dei tessuti connettivi una sostanza definita "fondamentale" simil-gel altamente idratata, all'interno della quale le proteine fibrillari risultano ospitate e imbricate. Tale forma di gel polisaccaridico è in grado da un lato di permettere alle MEC di resistere a notevoli forze compressive e dall'altro di consentire una rapida e costante diffusione delle sostanze nutritizie, dei metaboliti e degli ormoni tra sangue e tessuti.

I GAGs si legano di norma covalentemente a un nucleo (core) proteico dando origine ai proteoglicani (PGs). GAGs e PGs sono in grado di agire da soli o in gruppo come recettori per molecole di adesione o come catalizzatori di processi biochimici su molecole circolanti come i fattori di crescita, le citochine e gli enzimi coagulativi.

I glucosaminoglicani (GAGs) sono rappresentati da catene polisaccaridiche composte da unità disaccaridiche ripetute numerose volte. Uno dei due zuccheri è sempre rappresentato da un aminozucchero (n-acetilglucosamina o n-acetilgalattosamina) quasi sempre solfato. Il secondo zucchero è di solito l'acido glucuronico o il suo isomero L iduronico. Si riconoscono 4 maggiori gruppi di GAGs: ialuronani, condroitinsolfati e dermatansolfati, eparansolfati, keratansolfati. Le catene polisaccaridiche dei glucosaminoglicani sono volumetricamente troppo rigide per ripiegarsi all'interno delle compatte strutture globulari tipiche delle catene polipeptidiche, in più esse sono altamente idrofile. Per queste ragioni (e probabilmente anche per altre a noi ignote) i GAGs tendono ad assumere conformazioni estremamente estese occupando un grande volume in rapporto alla loro massa e formando così quantità notevoli di gel anche a basse

concentrazioni. L'elevata quantità di cariche negative (i GAGs rappresentano le più numerose cellule anioniche, essendo di norma solfate, prodotte dalle cellule animali) attrae numerosi cationi; tra questi un ruolo predominante lo svolge il Na^+ che conferisce all'insieme capacità osmotiche e intrappola un'enorme quantità di acqua nella MEC. In tal modo si generano rigonfiamenti (turgori) che consentono alla MEC di opporsi a forze compressive anche importanti (grazie a ciò, a es., la cartilagine dell'anca può, in condizioni fisiologiche, resistere perfettamente a una pressione di diverse centinaia di atmosfere).

All'interno del tessuto connettivo, i GAGs rappresentano meno del 10-12% del peso globale, essi però, grazie alle loro caratteristiche, riempiono molti degli spazi extracellulari formando dei pori di gel idratato di varie dimensioni e densità di cariche elettriche fungendo così da punti chiave selettivi o "server" attraverso i quali viene regolato il traffico di molecole e cellule all'interno della MEC, in base alle loro dimensioni, peso e carica elettrica.

L'acido ialuronico (ialuronano, ialuronato) rappresenta forse il più semplice dei GAGs.

Nell'uomo è costituito da circa 25.000 disaccaridi uguali non solfati e non si mostra di solito collegato ad alcun "core proteico", pertanto presenta una struttura atipica. Dati sperimentali e biologico-molecolari confermano che esso gioca un ruolo fondamentale a livello delle ossa e delle articolazioni riguardo la resistenza a notevoli pressioni. Inoltre ricopre un importantissimo compito di riempimento di spazi nella MEC durante lo sviluppo embrionale: crea spazi vuoti fra le cellule in cui le stesse, in fasi successive, migreranno (Albergati, 2004).

GAGs e PGs associandosi tra loro possono dare origine ad enormi complessi polimerici nella MEC. Ad esempio le molecole di aggrecano, che rappresentano la maggioranza dei PGs a livello articolare, si combinano tramite legami non covalenti con l'acido ialuronico dando origine ad aggregati delle dimensioni di un batterio. Non tutti i PGs sono secreti dalla MEC, alcuni sono componenti integrali delle membrane plasmatiche. Tra i PGs di membrana più conosciuti, i sindecani presentano un dominio extracellulare costituito da tre catene di GAGs mentre quello intracellulare è ritenuto in grado di reagire con l'actina del citoscheletro cellulare (Alberts, 2002).

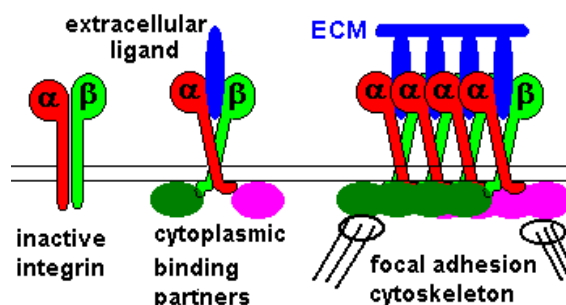
Citoscheletro

L'avanzamento tecnico della microscopia elettronica ha dimostrato che la cellula è tutt'altro che un sacco membranoso contenente una soluzione di molecole, come si credeva in passato.

La cellula è in realtà piena di filamenti, tubicini, fibre e trabecole formanti una struttura definita matrice citoplasmatica o citoscheletro. Vi è ben poco spazio a disposizione per consentire la casuale diffusione di molecole, inoltre pochissima acqua è presente allo stato libero essendo quasi totalmente in stato di solvazione, così come accade per la matrice extracellulare e il tessuto connettivo. Il citoscheletro è in massima parte costituito dai microfilamenti di actina, una proteina globulare, e dai microtubuli di tubulina, una proteina tubulare. Microtubuli e microfilamenti si formano una struttura di tensegrità (descritta in seguito) e si disgregano spontaneamente al presentarsi di particolari condizioni ambientali (es.: presenza di Ca^{2+} e Mg^{2+}).

Già all'inizio degli anni ottanta si era compreso il ruolo del citoscheletro nel sostegno della cellula, nel consentire gli spostamenti della stessa cellula e delle vescicole e la sua implicazione nei processi di divisione cellulare. Inoltre si era evidenziato come la matrice extracellulare risulta legata al sistema del citoscheletro così da tenere assieme il nostro corpo. Oggi sappiamo che tali legami incidono su processi fisiologici quali lo sviluppo embrionale, la coagulazione del sangue, la guarigione delle ferite ecc.

Integrine



Le integrine sono una famiglia di glicoproteine di membrana a struttura bicaenaria che effettuano l'adesione delle cellule alla matrice extracellulare attraverso il riconoscimento della sequenza RGD.

I peptidi RGD sono catene aminoacidiche di varia lunghezza a partire da semplici tripeptidi, caratterizzate dalla sequenza aminoacidica Arginina-Glicina-Acido Aspartico. Questa sequenza aminoacidica è presente

ubiquitariamente nell'organismo ed è coinvolta in numerose funzioni fisiologiche. Tale sequenza RGD rappresenta una delle strutture che permettono l'adesione di particolari linee cellulari (es. le cellule infiammatorie) così che possano svolgere la loro funzione. Il legame tra integrine e RGD induce una serie di reazioni nel citoplasma che coinvolgono il citoscheletro e altre proteine che regolano l'adesione, la crescita e la migrazione cellulare. Le integrine fungono pertanto da meccanorecettori: trasducono, interagendo con le proteine della matrice extracellulare, fattori del Complemento ecc., selettivamente e in maniera modulabile, trazioni e spinte meccaniche dalla MEC all'interno della cellula e viceversa (Hynes, 2002). Le integrine appaiono virtualmente su ogni tipo di cellule animali in qualità di versatili molecole in grado di giocare un ruolo chiave in vari processi cellulari sia durante lo sviluppo sia nell'organismo adulto: adesione e migrazione cellulare, crescita e divisione cellulare, sopravvivenza, apoptosi e differenziazione cellulare, sostegno al sistema immunitario ecc. Varie malattie genetiche umane dimostrano l'importanza di queste molecole in vari processi fisiologici e patologici. Vi sono quindi connessioni meccanicamente mutuamente attive tra l'interno della cellula e la MEC. Tutto ciò cancella del tutto l'idea che le cellule fluttuino indipendenti fra loro all'interno di una sostanza "amorfa". Il doppio involucro della membrana fosfolipidica cellulare infatti oltre a essere costellato, sia esternamente che internamente, da chemiorecettori (proteine globulari con siti recettoriali per specifici agenti chimici capaci di modificare l'attività della cellula), presenta meccanorecettori costituiti da specifiche proteine transmembrana. La meccanica delle connessioni tra la matrice extracellulare e quella intracellulare è raggiunta attraverso una numerosa serie di legami deboli (non covalenti) e indiretti, tramite proteine "armatura" (talina, paxillina, alpha-actinina ecc.), che si connettono o disconnettono in maniera rapida (una specie di effetto velcro). Le cellule sono quindi tra loro connesse attraverso una matrice che comunica con loro attraverso attivi legami deboli secondo anch'essa una geometria di tensegrità che varia costantemente in base all'attività della cellula, del corpo, e alla condizione della matrice stessa. La connessione della cellula alla matrice extracellulare è un requisito base per formare un organismo pluricellulare. Essa rende la cellula in grado di resistere alle forze tiranti senza essere sbalzata fuori dalla MEC. Inoltre le integrine rappresentano i piedi che consentono alla cellula la migrazione nel substrato extracellulare.

Attraverso il citoscheletro la comunicazione meccanica raggiunge anche il nucleo. Queste connessioni agiscono cambiando la forma della cellula e quindi le proprietà fisiologiche. Gli studi effettuati da Ingber D. e pubblicati sulla rivista "Scientific American" nel 1998, infatti, hanno dimostrato che semplicemente modificando la forma cellulare è possibile innescare diversi processi genetici. Forzando le cellule viventi a prendere diverse forme piazzandole su "isole adesive" composte da matrice extracellulare, risultò che le cellule piatte, stirate, avevano più probabilità di dividersi, interpretando tale stato come bisogno di fornire più cellule per riempire lo spazio circostante (come a es. nel caso di ferite), quella rotondeggianti, a cui veniva impedito di propagarsi comprimendole, attivavano un programma di morte per apoptosi (morte funzionale programmata) per evitare un sovraffollamento in grado di generare tumori. Quando invece le cellule non erano né troppo espanse né troppo compresse eseguivano specifiche fisiologiche attività in base alla loro provenienza e differenziazione (le cellule capillari formavano tubi capillari cavi, le epatiche secernevano le tipiche proteine fornite dal fegato al sangue ecc.).

La maggior parte degli studi sul cancro si concentra sui segnali chimici ma i legami fra il microambiente tissutale e l'oncogenesi potrebbero permettere l'identificazione di nuovi target terapeutici; i tessuti tumorali sono più rigidi dei tessuti normali e la palpazione di una massa rigida è talvolta un utile metodo per individuarne la presenza. Uno studio, incentrato sulle integrine e pubblicato sulla rivista "Cancer Cell" nel 2005, ha messo in luce un legame fra la rigidità dei tessuti e la formazione dei tumori evidenziando come le forze meccaniche possono regolare il comportamento cellulare influenzando i segnali molecolari che governano la diffusione delle cellule cancerose. I ricercatori hanno esaminato cellule cancerose in sviluppo all'interno di un sistema gelatinoso tridimensionale, nel quale la rigidità poteva essere controllata accuratamente. Essi hanno scoperto che anche un leggero aumento di durezza della matrice extracellulare circostante perturba l'architettura dei tessuti e ne favorisce la crescita promuovendo l'adesione focale e l'attivazione dei fattori di crescita. Mentre, un calo di attività Rho o ERK (enzimi costituenti fattori oncogeni in quanto frequentemente coinvolti nel processo di metastatizzazione), nelle cellule cancerose, è stato associato a un susseguente declino di adesione focale e all'inversione delle modifiche morfologiche. Tuttavia la relazione fra la rigidità tissutale e il comportamento delle cellule tumorali non è ancora del tutto chiara.

Metalloproteasi (MMP)

La MEC va considerata come una struttura in perenne e costante “rimodellamento” morfo-funzionale, sia in condizioni fisiologiche che patologiche, in base alle richieste funzionali provenienti sia dal proprio interno (mediante l'azione delle metalloproteasi) sia dalle cellule (per l'azione delle numerose frazioni proteiche di adesione). Una ridotta o assente capacità di rimodellamento della MEC è letale per la cellula. Come abbiamo visto, tutte le funzioni cellulari si esprimono in virtù della corrispondente funzione delle strutture della MEC e i processi patologici possono risultare primari o secondari alle modifiche della MEC.

Chiari esempi di rimodellamento della MEC sono la riparazione degli strati dermo-ipodermici (tale processo richiede precise sequenze di degradazione della matrice, migrazione di specifiche cellule in tale sede, sintesi di una matrice provvisoria composta da fibronectina, fibrine e grandi quantità di collagene tipo III, fase di rimodellamento della matrice provvisoria fondamentale per il ripristino funzionale dei suoi componenti e di conseguenza del ripristino strutturale del tessuto stesso) e la neoangiogenesi (fisiologico processo di formazione di nuovi capillari in tessuti e organi in varie situazioni patologiche, fra cui quella oncologica). La neoangiogenesi viene studiata a scopo terapeutico con l'obiettivo di ripristinare la corretta irrorazione in tessuti ischemici, a es. nel muscolo cardiaco o nel circolo periferico, così come per inibirne il processo, a es. in campo tumorale (Shishido et al, 2003).

Le metalloproteasi (MMPs) sono una famiglia di endopeptidasi contenenti zinco e calcio che mostrano la capacità potenziale di degradare tutte le proteine e i componenti proteoglicani della MEC. Esse possiedono sequenze analoghe al collagene interstiziale e si collocano sul versante esterno della membrana cellulare in forma inattiva (attivata al bisogno). La loro attività è inibita tramite uno specifico agente definito TIMP (Tissue Inhibitors of MetalloProteases). In passato denominate collagenasi o gelatinasi per la loro caratteristica di denaturare il collagene nativo o quello denaturato (gelatina) – Birkedal-Hansen (1993), le metalloproteasi sono implicate in numerosi processi fisiologici e patologici inclusi angiogenesi, embriogenesi, risposte infiammatorie, arterosclerosi e numerose patologie artroreumatiche (artrite reumatoide inclusa (Dieppe, 1995). L'attività delle metalloproteasi (MMPs) viene regolata in maniera molto fine durante il fisiologico rimodellamento dei tessuti. Tale regolazione sembra essere persa o drammaticamente ridotta in situazioni patologiche quali la crescita tumorale. La bilancia

proteasica-antiproteasica possiede anche una sorta di controllo spaziale nel senso che i tessuti si organizzano creando una “muraglia” di inibitori che circonda l'area ove sono presenti le metalloproteasi attivate (pertanto le cellule che producono le proteasi sono differenti da quelle che producono i relativi inibitori). Tutto questo sistema è ovviamente sottoposto a numerose influenze. In particolare lo stress ossidativo è in grado di modificare profondamente la bilancia proteasi-antiproteasi tramite i radicali liberi (ROS Reactive Oxygen Species o ROTS Reactive Oxygen Toxic Species) prodotti dagli “insulti” ambientali e metabolici e capaci di determinare vari danni ubiquitari in quanto non neutralizzati dai normali sistemi di difesa (scavengers): danneggiamento del DNA (spesso per mancata riparazione da parte della DNA-polimerasi e per apoptosi), necrosi cellulare, lipoperossidazione lipidica, disgregazione della matrice e quindi perdita funzionale dei recettori (integrine), danno mitocondriale e di altri organuli cellulari, blocco della catena respiratoria e quindi della produzione energetica, morte cellulare con sostituzione di collagene ossia fibrosi (Izzo, 2001).

Stress ossidativo → attivazione MMPs e blocco TIMPs (inibitori delle MMPs) → Danno matriciale globale.

La MEC è una sostanza fondamentale e vitale per gli scambi metabolici cellulari, un tipo di materia composita e viva che, pur variando spesso il proprio status da sol a gel, resta pur sempre una specie di “mare interno”, ricco, molto complesso e sensibile ai fenomeni di base quali tossicosi intestinali, alterate fasi di depurazioni epatico-renale, acidificazioni e alterazioni vascolari o dei sistemi di ossidoriduzione.

L'equilibrio strutturale e metabolico del compartimento extracellulare risulta fondamentale nella regolamentazione degli scambi vitali di base. E' tramite l'alterazione di questi meccanismi di equilibrio dell'omeostasi fisiologica che praticamente quasi tutte le malattie croniche e degenerative iniziano nella MEC. Molte malattie genetiche sono il risultato finale di mutazioni primitive di numerose molecole della MEC (Albergati, Bacci, 2004).

Numerose patologie croniche e degenerative (tipiche malattie della nostra società) presentano una tendenza all'acidosi e all'aumento dei radicali liberi, da cui l'importanza di mantenere il pH corporeo a ca. 7,4 cioè leggermente alcalino tramite, in maniera particolare, una corretta alimentazione. A tale riguardo va sottolineato che non si tratta sempre di un problema sistemico ma talvolta anche di un'acidosi e/o uno stato ossidativo locale tissutale. Mentre nei grandi vasi

le alterazioni ossidative e del pH vengono facilmente tamponate, nei tessuti e nei capillari invece l'acido viene spinto immediatamente fuori dalla cellula, attraverso le specifiche pompe, alterando i delicati scambi di gas e sostanze nutritive (Worlitschek, 2002).

Nel neurone, la mielina esercita una protezione dell'assone quasi completa ad eccezione di brevi spaziature, nodi di Ranvier, in cui l'assone si trova a diretto contatto con la MEC. A livello dei nodi sono quasi esclusivamente presenti i canali del Na⁺; da cui anche qui l'importanza del pH extracellulare per la salute del neurone. Quando riversati nello spazio intersinaptico, i neurotrasmettitori, es. acetilcolina, vengono legati da canali di Na⁺ o K⁺; l'idrolisi dell'acetilcolina in colina e acetato, da parte della colinesterasi, libera rapidissimamente lo spazio intersinaptico consentendo il ripristino dello stato primitivo della MEC (Bloom, 1988). La riduzione del flusso microcircolatorio inibisce la lipolisi e l'uscita di grassi liberi e glicerolo, cioè produce lipogenesi. Tramite le osservazioni ultrastrutturali risulta facile osservare la connessione strutturale e funzionale degli adipociti e dei fibroblasti con i canali precollettori linfatici. Quando è presente una lipolisi, l'adipocita diminuisce di volume e il fibroblasto può contrarsi lasciando spazio al passaggio dell'acqua di derivazione metabolica che, assieme alle macromolecole proteiche, grassi ecc., forma in tal modo la linfa che depura cellula e tessuto. In caso di lipogenesi o di alterazione metabolica tissutale, fibroblasti e relative fibrille si decontraggono e la linfocinetica viene rallentata associando così al lipoedema (caratterizzato da iperpressione tissutale per aumento di acqua legata) il linfedema (caratterizzato da iperpressione interstiziale e vasale di acqua libera e proteine, ossia di linfa, con pressioni osmotiche maggiori) (Campisi, 1997). È quindi possibile definire un " sistema linfoadiposo cellulare " che potrebbe costituire la chiave di lettura dell'iniziale etiologia di tutte le alterazioni edematose che avrebbero così origine proprio nelle alterazioni della MEC (Curri, 1990). A tutto ciò concorre l'eccesso di zuccheri introdotti con la dieta (che provoca uno stoccaggio di lipidi, lipogenesi, nel tessuto adiposo periferico), lo stile di vita e l'habitat moderni (con le sue implicazioni posturali descritte nel paragrafo "Vita artificiale") nonché l'assunzione di estrogeni tramite gli alimenti (estrogeni vengono utilizzati nell'industria alimentare e nel trattamento dei terreni) e i farmaci (a esempio con la terapia estroprogestinica molto diffusa in particolare fra le giovani donne). Gli ormoni estrogeni esogeni entrano nell'organismo come pool che non viene legato alle proteine epatiche e che non viene riconosciuto dai meccanismi di feed-back

ipofisario (gli estrogeni endogeni continuano quindi a essere prodotti). Essi vengono trasportati in forma libera dal sistema vascolare e di norma distribuiti a livello del tessuto adiposo periferico provocando lipogenesi e ritenzione idrica nella MEC favorendo in tal modo i lipoedemi superficiali nelle ben note zone corporee (Fain & Sheperd, 1979). A ciò sembrano aggiungersi le alterazioni disbiotico-fermentative intestinali che avvengono in particolare a livello del colon per cattiva alimentazione, che produrrebbero tossine che, attraverso il sistema vascolare, si fisserebbero nella MEC. Le tossine assorbite a livello ipodermico provocherebbero alterazioni metaboliche a causa della loro azione acidificante e di ossidazione cellulare con conseguente rallentamento degli scambi metabolici e ritenzione idrica interstiziale. Le conseguenze potenziali sono un aumento di ioni intracellulari e delle macromolecole e quindi del carico da drenare per via linfatica (Bacci, 1997).

Il termine IDH (Interstitial Heart Disease) è stato coniato per evidenziare aspetti della genesi di alcuni scompensi cardio-circolatori in cui i miociti sarebbero “innocente bystander” nei confronti di eventi emodinamici con origine nelle cellule della MEC del cuore. Gli IDH sarebbero quindi dovuti ad anomalie strutturali dell'interstizio cardiaco, che rappresenta il 40% del miocardio (Gilbert & Wotton, 1997).

La MEC, e il collagene in modo particolare, giocano un ruolo vitale a carico dei reni. Le lesioni croniche tubulo-interstiziali sono direttamente correlate al declino dell'attività secretoria renale e molto spesso si accompagna a una deposizione di MEC e a una trasformazione di fibroblasti in miofibroblasti (vedi in seguito paragrafo “Miofibroblasti”).

In caso di ipofertilità o sterilità maschile, in assenza di evidenti scompensi endocrino-metabolici, nel testicolo, con o senza la produzione di sperma, il diametro dei tubuli seminiferi risulta molto ridotto in quanto la parete è notevolmente ispessita e il relativo tessuto connettivo prodotto dalla MEC aumenta proporzionalmente al deterioramento della funzione testicolare (incremento di laminina, vimentina e collagene IV) – Ikesen & Erdogan (2002).

Alterazioni morfo-funzionali dei collagene cartilaginei cosiddetti “minori” (III, IX, XI) avvengono durante il processo di invecchiamento e in molte patologie quali osteoartrite, discopatie, distacco di retina e glaucoma (Furth, 2001).

Oggi sappiamo che molte cellule epatiche (in particolare gli epatociti deputati all'immagazzinamento dei grassi, le cellule di Kupfer e gli endotelociti) sono in grado di

produrre “on demand” numerosi componenti della MEC. La fibrosi rappresenta a livello epatico la “via comune” di risposta a insulti epatocellulari (infezioni, disturbi della circolazione epatica, necrosi ecc.).

A livello dell' apparato respiratorio, le ricerche sempre più si orientano sulla MEC. Ad es. in caso di asma sono presenti modifiche strutturali di varie componenti della MEC fra cui collagene e glicoproteine (Boulet, 1999).

Ogni molecola ed elettrone dell'organismo presenta una rotazione e una vibrazione fisiologica propria e tipica che viene alterata in stati patologici, in modo particolare, in quelli cronici e degenerativi. La MEC soggiace pertanto anche a leggi fisiche di tipo elettromagnetico per conservare il suo stato naturale di sol permettendo la circolazione di quell'energia che rappresenta il motore principale di tutti gli scambi cellulari e tissutali di base. Le alterazioni fisico-energetiche associandosi a quelle biochimiche innescano patologie croniche e degenerative tramite lo squilibrio funzionale delle metalloproteasi. Auspicabile è l'applicazione di terapie integrate: chimico-fisiche (nutrizionali-fitoterapiche-farmacologiche) agenti dall'interno, meccanico-energetico (terapie manuali, del movimento, strumentali) agenti dall'esterno (Pischinger, 1996). L' epigallo-catechina-3-gallato (EGCG) è, a es. uno dei principi attivi in grado di modulare le attività delle metalloproteasi.

Network matriciale

La MEC può quindi essere considerata come un complessissimo network in cui proteine, PGS e GAGs forniscono innumerevoli funzioni fra cui quelle di supporto strutturale e regolazione di ogni attività tissutale e organica. Occorre considerare l'omeostasi globale cellulare come un complesso di meccanismi che possono trovare origine e sviluppo all'interno della cellula o all'esterno nella MEC; in quest'ultimo caso, la cellula può rappresentare il bersaglio intermedio o finale. Le componenti extracellulari, oltre a rappresentare strutture di sostegno fisico all'impalcatura cellulare, fungono anche da vere e proprie sedi di inizio, svolgimento e termine di processi vitali riguardanti sia l'ambiente endocellulare sia organi e apparati. Siamo di fronte a un infinito network biochimico in grado di generare, modulare, variare e propagare, anche a distanza, milioni e milioni di informazioni.

Ogni cellula del corpo interagisce costantemente con la MEC, sia sotto l'aspetto meccanico che chimico ed energetico, con effetti “drammatici” sull'architettura statica e dinamica dei tessuti.

I fibroblasti a es. agiscono in modo sostanziale sul collagene da loro prodotto elaborandolo continuamente così da poterlo compattare e predisporre nelle forme e quantità richieste dalla specifica sede funzionale organica. Se si pongono due piccoli frammenti di tessuto embrionale distanti fra loro ma nella medesima coltura di gel di collagene, si assiste dapprima ad una formazione di fibre di neocollagene, perfettamente allineate, che interconnettono i due monconi. Successivamente i fibroblasti migrano al di fuori dei due frammenti lungo le neo-fibre collagene controllandone la deposizione e venendo a loro volta monitorati. Tale sincizio funzionale è verosimilmente presente durante i processi rigenerativi della MEC e costituisce un continuum funzionale perenne in grado di autoregolarsi fronteggiando, in condizioni fisiologiche, le costanti variazioni richieste dalle diverse vitali funzioni tissutali (Albergati, 2004).

Secondo P. A. Bacci (2004) la matrice interstiziale rappresenta veramente la madre delle reazioni vitali, il luogo dove, prima di tutto, avvengono gli scambi tra materia ed energia. Tutti i tessuti sono collegati e funzionalmente integrati fra loro non in sistemi chiusi ma aperti; fra essi avvengono continui scambi, che possono attuarsi sia a livello locale che sistemico, sfruttando messaggi biochimici, biofisici ed elettromagnetici, ossia utilizzando le varie forme di energia. La composizione ionica dello spazio interstiziale extracellulare costituisce una sostanza fondamentale che non solo permette gli scambi e la vita ma che agisce anche sull'espressività genica di ogni cellula.

Come afferma F. G. Albergati (2004), la cellula e la matrice extracellulare rappresentano due mondi solo apparentemente separati che necessariamente per tutta la durata della vita ad ogni istante devono interagire per poter operare in modo corretto e sinergico. Ciò richiede una straordinaria serie di segnali a cui segue un altrettanto incredibile serie di attività biologico-molecolari.

Sistema connettivale

Descrizione

Il tessuto connettivo è parte integrante della MEC e pertanto similmente costituito e strutturato. Esso non presenta soluzioni di continuità: ogni tessuto e organo contiene tessuto connettivo e le loro funzioni dipendono in maniera straordinaria dalle interconnessioni anatomico-funzionali.

Embriologicamente la maggior parte dei tessuti connettivi derivano dal foglietto embrionale intermedio definito mesoderma, molto diffuso nel feto dove circonda gli organi in via di sviluppo compenetrandoli, alcuni tessuti connettivi del cranio derivano direttamente dal neuroectoderma. Dal mesoderma si sviluppa dal tessuto embrionale mesenchima caratterizzato da cellule ramificate comprese in un'abbondante sostanza intercellulare. Una volta formato il tessuto connettivo è morfologicamente caratterizzato da vari tipi di cellule (fibroblasti, miofibroblasti, macrofagi, mastociti, plasmacellule, leucociti, cellule indifferenziate, adipociti, condrociti, osteociti ecc.) sempre immersi in una grande quantità di materiale intercellulare. Cellule e matrice intercellulare caratterizzano vari tipi di tessuto connettivo: tessuto connettivo propriamente detto (fascia connettivale), tessuto elastico, tessuto reticolare, tessuto mucoso, tessuto endoteliale, tessuto adiposo, tessuto cartilagineo, tessuto osseo, sangue e linfa. I tessuti connettivi giocano quindi diversi importanti ruoli: strutturali, difensivi, trofici e morfogenetici organizzando e influenzando la crescita e la differenziazione dei tessuti circostanti.

Le condizioni della parte fibrosa e della sostanza fondamentale del sistema connettivale sono in parte determinate dalla genetica, in parte da fattori ambientali (nutrizione, esercizio ecc.). Le fibre proteiche sono infatti in grado di modificarsi in base alle esigenze ambientali e funzionali. Del loro spettro di variabilità strutturale e funzionale ne sono esempi il tegumento, la membrana basale, la cartilagine, l'osso, i legamenti, i tendini ecc. La sostanza fondamentale varia continuamente il suo stato, divenendo più o meno viscosa (da fluida a collosa fino a solida), in base alle specifiche esigenze organiche; riscontrabile in grandi quantità quale liquido sinoviale articolare e umor vitreo oculare, essa è in realtà presente in tutti i tessuti. La densità della matrice fibrosa e la viscosità della sostanza fondamentale determinano il libero flusso delle sostanze chimiche fra cellule impedendo allo stesso tempo la penetrazione di batteri e particelle inerti. Combinando una piccola varietà di fibre all'interno di una matrice che varia da fluida a collosa a solida, le cellule connettivali rispondono alle esigenze di flessibilità e stabilità, diffusione e barriera. "Ostruzioni" locali, come le aderenze fasciali,



possono derivare da sforzi eccessivi o mancanza di esercizio, traumi ecc. L'eliminazione di tali impedimenti (tramite a es. specifiche terapie manuali e/o elettroterapie) e quindi il ripristino del corretto flusso consente alle cellule interessate di passare da un metabolismo di sopravvivenza a quello fisiologico specifico.

Quello che fino a poco fa era considerato un "banale" tessuto di connessione e riempimento, è in realtà un sistema con innumerevoli fondamentali funzioni fra cui: mantenimento postura, connessione e protezione organi, equilibrio acido-base, metabolismo idrosalino, equilibrio elettrico e osmotico, circolazione sanguinea, conduzione nervosa, propriocezione, coordinazione motoria, barriera all'invasione di batteri e particelle inerti, immunitaria (leucociti, mastociti, macrofagi, plasmacellule), processi infiammatori, riparazione e riempimento zone danneggiate, riserva energetica (lipidi), di acqua ed elettroliti, di ca. 1/3 delle proteine plasmatiche totali, migrazione cellulare, comunicazione intercellulare ed extra-intracellulare ecc. Il tessuto connettivo è quindi un vero e proprio sistema, questa volta fibroso, che connette tutte le varie parti del nostro organismo. Esso forma una rete ubiquitaria, a struttura di tensegrità, che avvolge, sostiene e collega tutte le unità funzionali del corpo, partecipando in maniera importante al metabolismo generale. Come già in parte descritto, esso prende parte alla regolazione dell'equilibrio acido-base, del metabolismo idrosalino, dell'equilibrio elettrico e osmotico, della circolazione sanguinea e della conduzione nervosa (riveste e forma la struttura portante dei nervi). È sede di numerosissimi recettori sensoriali, inclusi gli esterocettori e i propriocettori nervosi, è dotato di capacità contrattile, grazie alla presenza dei miofibroblasti (descritti in seguito), e struttura i muscoli, anatomicamente e funzionalmente, in catene miofasciali, assumendo pertanto un ruolo fondamentale all'interno del sistema dell'equilibrio e

La rete connettivale contribuisce alla meccano-trasduzione, alla propriocezione e all'organizzazione del movimento in stretta integrazione con i recettori articolari, i fusi neuromuscolari, gli organi tendinei del Golgi e il sistema nervoso.

connettivale funge da barriera all'invasione di batteri e particelle inerti, presenta cellule del sistema immunitario (leucociti, mastociti, macrofagi, plasmacellule) ed è frequentemente il luogo di svolgimento dei processi infiammatori. Esso inoltre possiede grandi capacità riparative delle zone danneggiate da infiammazioni e/o traumi riempiendone, se necessario, gli spazi. Nel tessuto adiposo, che costituisce un tipo di tessuto connettivo, si accumulano i lipidi, importanti riserve nutritive mentre nel tessuto connettivo lasso si conserva acqua ed elettroliti (grazie al suo alto contenuto di mucopolisaccaridi acidi) ecc. e oggi sappiamo che, tramite delle specifiche proteine di membrana (integrine), il sistema connettivo è in grado di interagire coi meccanismi cellulari.

È quindi il cristallo del sistema connettivo a determinare ed evidenziare il nostro stato globale.

Network connettivale

La struttura totale costituita da matrice extracellulare, recettori di membrana (integrine) e matrice intracellulare costituisce il nostro corpo spaziale (da cui il concetto di "medicina e salute spaziale"). Ci troviamo di fronte a un vero e proprio network sovramolecolare continuo e dinamico che si estende in ogni angolo e spazio corporeo composto da una matrice nucleare interna a una matrice cellulare immersa in una matrice extracellulare. Il network connettivale è un continuum che connette sia strutturalmente che funzionalmente dando forma e consentendo la vita del nostro organismo.

A differenza dei networks formati dal sistema nervoso, da quello endocrino e da quello immunitario, il sistema connettivo presenta un metodo forse apparentemente più arcaico ma non certo meno importante di comunicazione: quella meccanica. Esso "semplicemente" tira e spinge comunicando così da fibra a fibra, da cellula a cellula e da ambiente interno ed esterno alla cellula e viceversa, tramite la trama fibrosa, la sostanza fondamentale e sofisticati sistemi di trasduzione del segnale meccanico. Questo tipo di comunicazione avviene al di fuori del nostro stato di coscienza ed è stato finora studiato molto meno della comunicazione nervosa e circolatoria.

Occorre inoltre considerare che il sistema connettivo, oltre a rappresentare esso stesso un

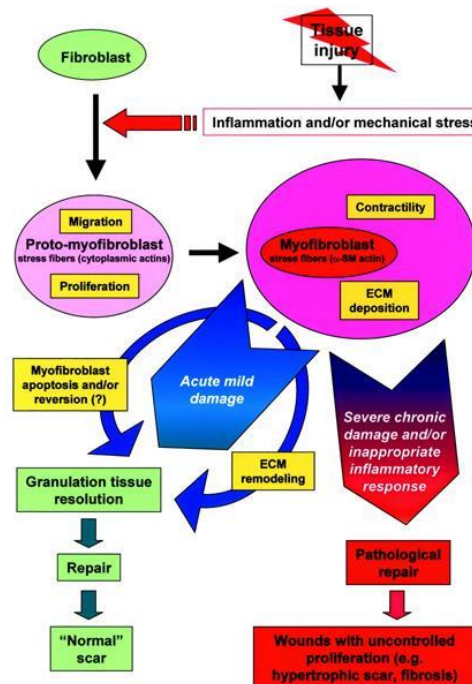
network indispensabile per lo sviluppo e la vita di tutti i componenti dell'organismo, costituisce il substrato integrato che consente agli altri networks (nervoso, endocrino, e immunitario) di esistere, agire e comunicare fra loro. In altre parole, esso è al contempo un sistema di comunicazione integrato con gli altri nonché la struttura fisicamente e funzionalmente portante di essi e quindi della rete globale organica. Al contempo, i sistemi endocrino, immunitario e nervoso sono in grado di comportare profonde modifiche del sistema connettivo come, ad esempio, nei processi di cicatrizzazione e infiammatori o, semplicemente, considerando le modifiche fasciali comportate dai muscoli tramite il sistema nervoso (possiamo considerare in realtà i muscoli come un'unica gelatina, che modifica rapidamente il proprio stato in risposta a uno stimolo nervoso, contenuta all'interno di 650 tasche connettivali). Ulteriore fattore in grado di incidere in maniera preponderante sul sistema connettivo è l'alimentazione (lo scorbuto, ad esempio, è una patologia caratterizzata da un'estesa degenerazione del tessuto connettivo dovuta a carenza di vit. C, in assenza della quale i fibroblasti cessano di sintetizzare il collagene).

Network fasciale

Fra i vari tipi di tessuto connettivo, la fascia connettivale è il "ponte" che ci conduce dalla MEC alla postura e non solo. L'uomo rappresenta il sistema cibernetico per eccellenza: il 97% delle fibre motorie decorrenti nel midollo spinale è coinvolto nella modalità processuale cibernetica e solo il 3% è riservato all'attività intenzionale (Galzigna, 1976). La cibernetica è la scienza del feed-back, il corpo deve conoscere attimo per attimo la condizione ambientale per potersi collocare istantaneamente opportunamente al fine della realizzazione del processo. Il senso non può giammai dissociarsi dal moto: l'ambiente va ininterrottamente sentito e valutato, da cui la necessità della forza di gravità, della sinestesia, della propriocezione. "Essere e funzionare sono inscindibili" Morin (1987); il riflesso è la via maestra.

E' il tessuto miofasciale in realtà a rappresentare il più vasto organo sensorio del nostro organismo, è da esso infatti che il sistema nervoso centrale riceve in massima parte nervi afferenti (sensitivi). La presenza di meccanocettori, in grado di comportare effetti a livello locale e generale, è stata abbondantemente riscontrata nella fascia fin nei legamenti viscerali e nella dura madre cefalica e spinale (sacco durale). Abbiamo visto che l'organismo riserva al sistema di feed-back una grande importanza. Spesso infatti in un nervo misto la quantità di fibre

sensitive supera di gran lunga quelle motorie. Ciò che occorre considerare è che nell'innervazione muscolare tali fibre sensitive derivano solo per ca. il 25% dai ben noti recettori del Golgi, Ruffini, Pacini e Paciniformi (fibre tipo I e II) mentre tutta la restante parte ha origine dai recettori interstiziali (fibre tipo III e IV). Questi piccoli recettori, che perlopiù originano come terminazione nervose libere, oltre a essere i più numerosi nel nostro organismo sono ubiquitari (la loro massima concentrazione è nel periostio) e pertanto sono presenti sia negli interstizi muscolari che nella fascia. Circa il 90% di essi sono demielinizzati (tipo IV) mentre i restanti posseggono una sottile guaina mielinica (tipo III). I recettori "interstiziali" possiedono un'azione più lenta rispetto i recettori tipo I e II e in passato sono stati considerati perlopiù nocicettori, termo e chemiorecettori. In realtà molti di loro risultano multimodali e in maggioranza sono meccanorecettori suddivisibili in due sottogruppi, in base alla loro soglia di attivazione tramite stimoli pressori: low-threshold (LTP) e high-threshold pressure (HTP) - Mitchell & Schmidt, 1977. L'attivazione, in determinati stati patologici di recettori interstiziali sensibili sia a stimoli dolorifici che meccanici (in maggioranza HTP) può generare sindromi dolorose in assenza delle classiche irritazioni nervose (es. compressioni radicolari) – Chaitow & De Lany, 2000. Questo network sensoriale oltre ad avere una funzione di rilevamento afferente del posizionamento e del movimento dei segmenti corporei, influenza, per mezzo di intime connessioni, il sistema nervoso autonomo riguardo funzioni, quali la regolazione della pressione sanguinea, del battito cardiaco e della respirazione, sintonizzandole, in maniera molto precisa, alle esigenze tissutali locali. L'attivazione dei meccanorecettori interstiziali agisce sul sistema nervoso autonomo inducendolo a variare la pressione locale di arteriole e capillari presenti nella fascia, influenzando così il passaggio di plasma dai vasi alla matrice extracellulare variandone quindi la viscosità locale (Kruger, 1987). Inoltre la stimolazione dei recettori interstiziali, così come quella dei recettori di Ruffini, è in grado di incrementare il tono vagale generando cambiamento globali a livello neuromuscolare, corticale ed endocrino ed emozionale concernenti un profondo e benefico rilassamento (Schleip, 2003). Scoperti nel 1970, i miofibroblasti sono



cellule del tessuto connettivo interposte alle fibre collagene fasciali con capacità contrattili simili alla muscolatura liscia (contengono actina). Esse ricoprono un riconosciuto e importante ruolo nella guarigione delle ferite, nella fibrosi dei tessuti, e nelle contratture patologiche. I miofibroblasti si contraggono attivamente in situazioni infiammatorie quali morbo di Dupuytren, artrite reumatoide, cirrosi epatica. In condizioni fisiologiche si trovano nella pelle, milza, utero, ovaie, vasi circolatori, setti polmonari, legamenti periodontali (van den Berg & Cabri, 1999). La loro evoluzione è vista generalmente da normali fibroblasti a proto-miofibroblasti, fino alla completa differenziazione in

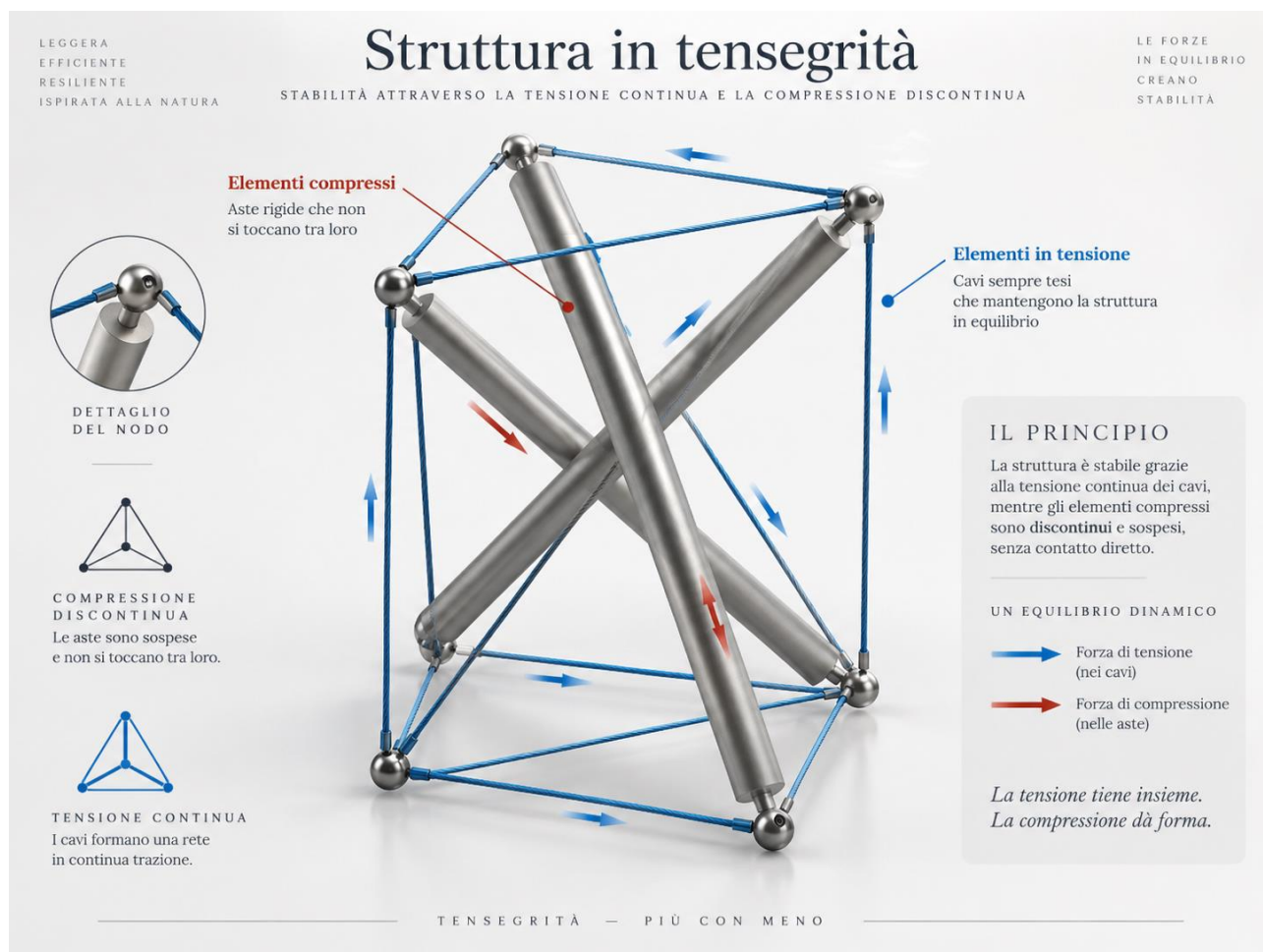
miofibroblasti e a una apoptosi terminale che è influenzata dalle tensioni meccaniche, dalle citochine e da specifiche proteine che provengono dalla matrice extracellulare.

Data anche la favorevole configurazione della distribuzione di tali cellule contrattili all'interno della fascia, il probabile ruolo di queste strutture contrattili è quello di sistema di tensione accessorio tale da sinergizzare la contrazione muscolare fornendo un vantaggio in situazioni di pericolo per la sopravvivenza (lotta e/o fuga). E' inoltre molto probabile che tramite tali fibre muscolari lisce il sistema nervoso autonomo, tramite nervi intrafasciali, possa "pre-tensionare" la fascia indipendente dal tono muscolare (Gabbiani, 2003, 2007). La presenza di tali cellule nelle capsule di rivestimento degli organi spiegherebbe a es. come la milza possa rimpicciolirsi fino a metà del suo volume in pochi minuti - fenomeno osservato nei cani in situazioni di sforzo strenuo in cui viene richiesta l'erogazione della scorta di sangue in essa contenuto nonostante che il rivestimento capsulare sia ricco in fibre collagene che consentono solo piccole variazioni di lunghezza - (Schleip, 2003).

La contrazione delle fibre muscolari lisce è ottenuta tramite l'attivazione del sistema nervoso simpatico così come per mezzo di sostanze vasocostrittrici quali la serotonina e l'anidride carbonica (CO₂). Quest'ultima crea un ulteriore legame fra comportamento della fascia e pH corporeo. Risulta significativo che la maggior parte dei pazienti affetti da fibromialgia o stanchezza cronica presentino una cronica iperventilazione franca o borderline (con conseguente aumento di alcalinità per carenza di CO₂ nel sangue) nonché alti livelli inusuali di serotina nel liquido cerebrospinale. La serotina infine abbassa la soglia di attivazione dei nocicettori interstiziali tipo IV. Ciò indicherebbe che il dolore fibromialgico possa essere causato in parte dalla contrazione della fascia (disfunzione motoria) e ancor più dall'alterazione della sensibilità recettoriale dolorifica (disfunzione sensoriale) - Mitchell & Schmidt, 1977.

Tensegrità

Il termine inglese "Tensegrity", coniato nel 1955 dall'architetto Richard Buckminster-Fuller, dalla combinazione delle parole "tensile" e "integrity", caratterizza la capacità di un sistema di stabilizzarsi meccanicamente tramite forze di tensione e di decompressione che si ripartiscono e si equilibrano fra di loro. Compressioni e trazioni si equilibrano all'interno di un sistema vettoriale chiuso.



Le strutture di tensegrità si ripartiscono in due categorie:

- 1) costituite da barre rigide assemblate in triangoli, in pentagoni o in esagoni;
- 2) costituite da barre rigide e cavi flessibili. I cavi costituiscono una configurazione continua che comprime le barre disposte in maniera discontinua in seno ad essa. Le barre, a loro volta, spingono verso l'esterno i cavi.

I vantaggi della struttura di tensegrità sono:

- la resistenza dell'insieme supera di molto la somma delle resistenze dei singoli componenti;
- la leggerezza: a parità di capacità resistenza meccanica, una struttura di tensegrità presenta un peso ridotto della metà rispetto a una struttura a compressione;
- la flessibilità del sistema è simile a quella di un sistema pneumatico. Ciò consente una grande capacità di adattamento reversibile ai cambiamenti di forma in equilibrio dinamico. Inoltre l'effetto di una deformazione locale, determinata da una forza esterna, viene modulato da tutta

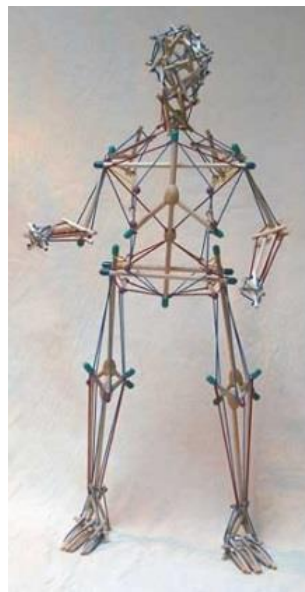
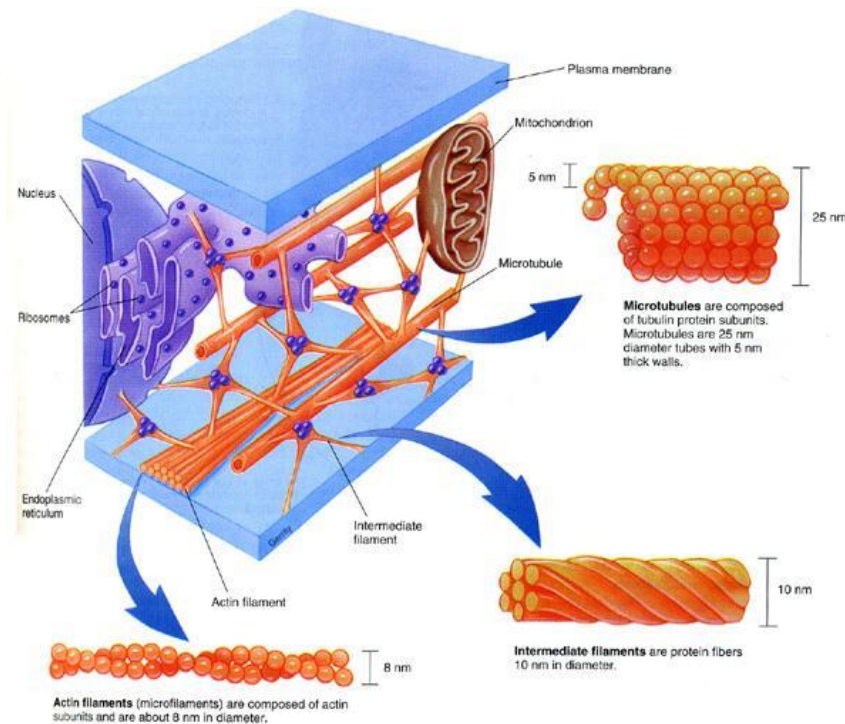


la struttura minimizzandone in tal modo l'effetto.

l'interconnessione meccanica e funzionale di tutti gli elementi costitutivi consente una continua comunicazione bidirezionale al pari di un vero e proprio network.

Questo tipo di strutture presentano una stabilità più elastica rispetto a quelle a compressione continua e diventano tanto più stabili quanto più vengono caricate. Tutti gli elementi interconnessi di una struttura a tensegrità si ridispongono in risposta a una tensione locale.

A partire dal citoscheletro (Ingber, 1998), l'organismo umano è caratterizzato da una struttura di tensegrità.



Dal punto di vista meccanico la MEC si è sviluppata per distribuire le tensioni del movimento e della gravità mantenendo contemporaneamente la forma dei diversi componenti del corpo tramite tutta la gamma di possibilità che va dalla rigidità di una struttura a compressione continua all'elasticità di una struttura a tensegrità.

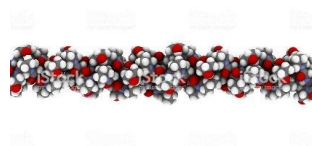
A livello macroscopico gli assi rigidi (le barre) sono costituiti dalle ossa e le strutture flessibili (i cavi) dal sistema miofasciale (Myers, 2002). Così come avviene a livello macroscopico, a livello cellulare i filamenti del citoscheletro (microfilamenti di actina e microtubuli di tubulina) polimerizzano e depolimerizzano in risposta agli stimoli meccanici.

Peculiarità della “tensegrità umana” è quella di funzionare come sistema a “ eliche a passo variabile ” o vortici (spirali). E' infatti sul piano trasverso che soprattutto si sviluppa l'antigravitarietà del sistema cibernetico uomo grazie a un sofisticato sistema di equilibrio neuro-biomeccanico.

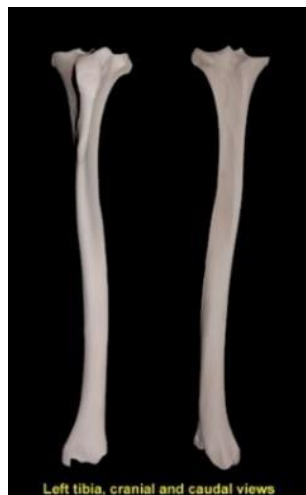
La gravità, nel lungo percorso della morfogenesi, modella



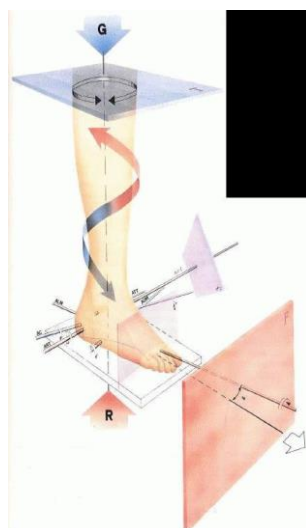
forme elicoidali che nel moto assumono il significato di vincolo determinando le traiettorie elicoidali. È quindi la stessa gravità che provvede nei tempi lunghi (morfogenesi) a modellare quelle forme che nel corso del moto (tempi brevi) assumono il significato di vincolo. Le traiettorie elicoidali introdotte nei moti morfogenetici del campo gravitazionale col



contributo dei vincoli intratessutali convergono nella genesi delle forme: femore, tibia, astragalo ecc. proteine come il collagene fino al DNA presentano forma elicoidale. Le forme in natura altro non sono che moti vorticosi plastificati.



All'elicità delle traiettorie del moto non può non far eco l'elicità delle forme il cui alto contenuto in simmetria propizia la stabilità strutturale (Paparella Treccia, 1988). L'evoluzione infatti ha scelto le configurazioni elicoidali in quanto nel moto esse si evolvono conservando



la stabilità dinamica (momento angolare),
l'energia (potenziale più cinetica) e
l'informazione (topologia). La stabilità, intesa come resistenza alle perturbazioni, rappresenta il traguardo che la natura persegue comunque e dovunque. Le eliche sono curve che si accrescono senza cambiare forma, le loro prerogative di ripetitività e quindi di stabilità ne fanno le espressioni per eccellenza della geometria che sottende i moti naturali. La forza di gravità, sia dal punto vista funzionale che strutturale, non va quindi vista come un nemico;

senza di essa l'uomo non potrebbe esistere-

La struttura e funzione a spirale risulta così onnipresente in natura a partire dalle stesse vie metaboliche.



“ Se una figura è stata prescelta da Dio come fondamento dinamico della sua immanenza nelle forme, ebbene questa figura è l'elica ” (Goethe)

Dalla PNEI alla PNECI

Psico-neuro-endocrino-immunologia

Nel 1981, R. Ader pubblicò il volume "Psychoneuroimmunology" sancendo definitivamente la nascita dell'omonima disciplina poi ribattezzata Psico-Neuro-Endocrino-Immunologia.

L'implicazione fondamentale riguarda l'unitarietà dell'organismo umano, la sua unità

psicobiologica non più postulata sulla base di convinzioni filosofiche o empirismi terapeutici, ma frutto della scoperta che comparti così diversi dell'organismo umano funzionano con le stesse sostanze.

Lo sviluppo delle moderne tecniche di indagini ha permesso di scoprire le molecole che, come le ha definite il famoso psichiatra P. Pancheri, costituiscono: “ le parole, le frasi della comunicazione tra cervello e il resto del corpo ”. Alla luce delle recenti scoperte, oggi sappiamo che queste molecole, definite neuropeptidi, vengono prodotte dai tre principali sistemi del nostro organismo (nervoso, endocrino e immunitario). Grazie ad esse, questi tre grandi sistemi comunicano, al pari di veri e propri networks, tra loro non in modo gerarchico ma, in realtà, in maniera bidirezionale e diffusa; formando, in sostanza, un vero e proprio network globale. Qualunque avvenimento riguardante noi stessi riguarda questi sistemi, i quali agiscono o reagiscono di conseguenza, in stretta e costante integrazione reciproca.

Psico-neuro-endocrino-connettivo-immunologia

Con il termine PNECI propongo un modello interpretativo che include esplicitamente il sistema connettivo nella rete psico-neuro-endocrino-immunitaria. Si tratta di una chiave di lettura sviluppata dall'autore, non di una disciplina formalmente e universalmente riconosciuta.

L'organismo umano funziona quindi come una rete integrata



che unifica i vari organi e sistemi. I codici sono gli stessi e il substrato è comune a tutta la rete. Sia che siano i circuiti cerebrali, attivati da emozioni, pensieri, oppure i circuiti nervosi vegetativi, attivati da sollecitazioni o da feedback di organi o sistemi, sia che siano gli organi endocrini o immunitari, sia che siano tensioni meccaniche connettivali, tramite movimento e attivazione muscolare, a emettere messaggi, questi ultimi, nella loro parte fondamentale, verranno riconosciuti da tutte le

componenti della rete. Il linguaggio è unico, il collegamento è integrato e a doppio senso di marcia.

È evidente che l'approccio terapeutico può sfruttare questa possibilità di pluralità di ingressi alla "grande connessione". Su questa base, infatti, gli interventi possono essere molteplici: educazione alimentare, fitoterapia, farmacoterapia, medicina regolativa e funzionale, terapie strumentali, psicoterapia, tecniche corporee, tecniche ergonomiche ecc. Compito dell'intervento terapeutico è quello di favorire il ripristino della fisiologica comunicazione equilibrata tra i sistemi.

Appare chiara l'importanza della ricerca ulteriore in questo campo. Non si può prescindere dallo studio del sistema connettivale se si vuole comprendere a fondo il comportamento globale e locale fisiologico. Lo studio della biochimica non può più essere semplificato in sequenze lineari di reazioni chimico-fisiche ma occorre considerare l'habitat attivo e dinamico in cui la "chimica della vita" si svolge ossia quel materiale che i biochimici scartano purificando gli enzimi "solubili" e attraverso il quale i chirurghi si fanno strada nei loro interventi: il sistema connettivo. La psiconeuroendocrinomunologia va quindi estesa alla psiconeuroendocrinoconnettivoimmunologia.

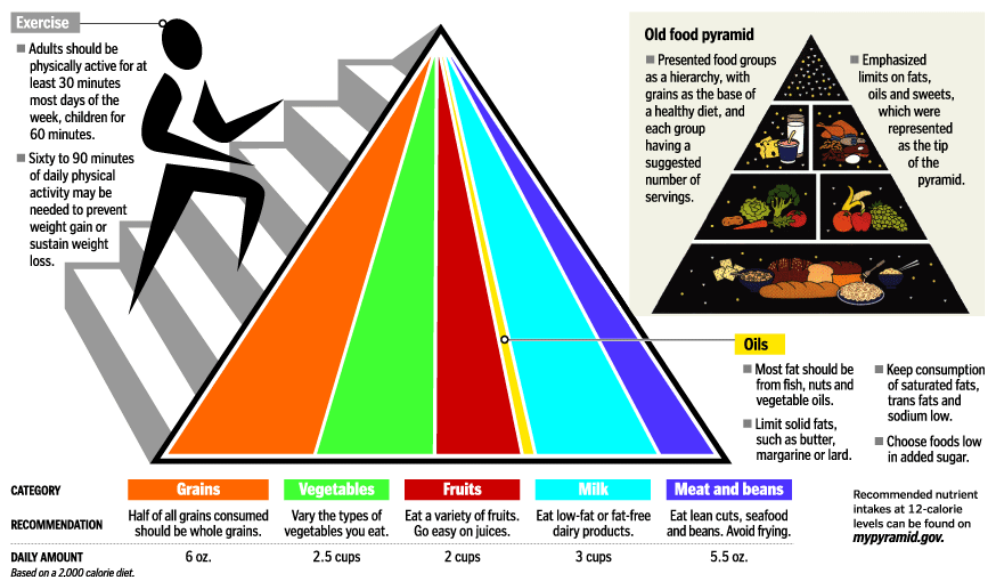
Lo stesso sviluppo delle terapie "energetiche" non può fare a meno dell'analisi approfondita del sistema connettivo al fine di comprendere la fisiologia dei circuiti magnetici prodotti dal fluire delle cariche elettriche nell'organismo.

Nella Medicina Predittiva non si deve quindi dimenticare l'efficacia dell'integrazione con tecniche in grado anch'esse di modificare in maniera importante MEC e tessuto connettivo, riarmonizzandoli in accordo con gli altri sistemi di regolazione: specifiche tecniche manuali, di movimento e posturali, elettroterapie (es. magnetoterapia, laserterapia, tecarterapia), metodiche di medicina regolativa/funzionale (es. ozonoterapia, terapia neurale, agopuntura), tecniche "mentali" (ipnosi, meditazione, PNL) ecc. Sono in corso interessanti validazioni scientifiche comparate di queste tecniche che conquistano giorno dopo giorno sempre maggiore credibilità grazie ai loro importanti effetti, sia immediati sia di lunga durata, sulla salute generale dell'organismo.

Esercizio Fisico

Introduzione

Fra le terapie connettivali merita senz'altro un approfondimento l'attività fisica in quanto elemento essenziale per il benessere in grado di agire, oltre che sul sistema connettivo, su più livelli e in maniera multimodale. L'importanza dell'attività fisica risulta già evidente dalla sua presenza alla base della nuova piramide alimentare.



L'adeguato tono muscolare nei vari distretti corporei è indispensabile per il benessere longevo e la corretta funzionalità del sistema muscolo-fasciale-scheletrico e circolatorio ma non solo. Innumerevoli ricerche scientifiche dimostrano che il deficit muscolare è associato a svariate patologie. I muscoli sono infatti in grado di indurre la produzione di molte biomolecole indispensabile al mantenimento della salute e al contrasto ai processi di invecchiamento. Durante l'esercizio fisico avvengono modificazioni acute che richiedono naturalmente un altrettanto rapido adattamento; questo processo è reso possibile dagli ormoni. Dopo l'esercizio fisico alcune modificazioni scompaiono, altre rimangono o creano i presupposti per cui l'organismo la volta successiva sia più preparato a far fronte all'esercizio fisico purché dello stesso tipo (teoria della supercompensazione). I termini di modificazioni metaboliche ed epigenetiche sono stati proposti per descrivere gli adattamenti a breve e a lungo termine.

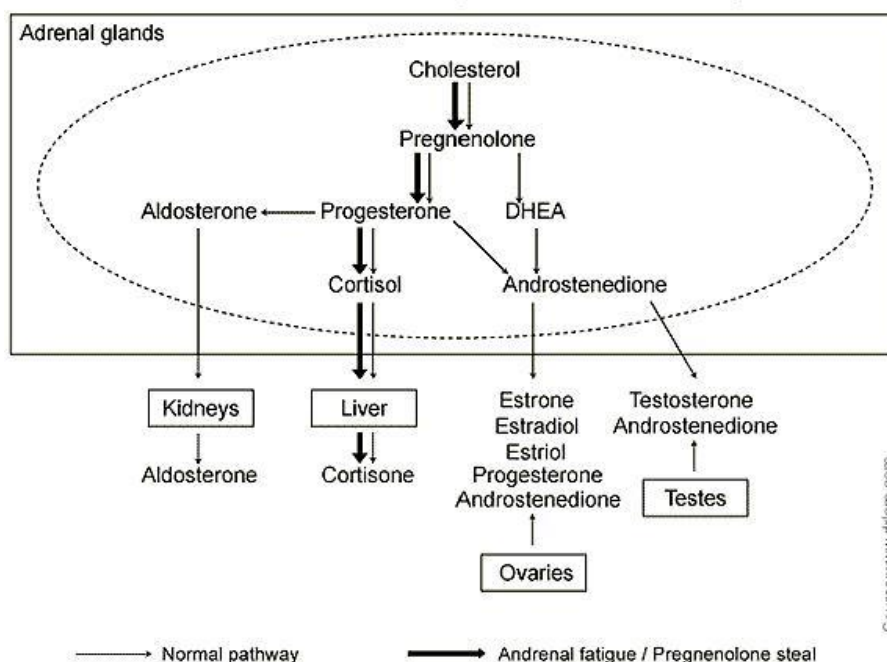
Esercizio fisico e ormoni

Il testosterone è un metabolita steroidei del DHEA (Deidroepiandrosterone), misurabile nella saliva (viene trasmesso alla donna col bacio), è un ormone anabolizzante androgeno ma

importante anche per la donna.

L'ipotalamo libera il GNRH, un ormone che stimola l'ipofisi a secernere l' LH, ormone luteinizzante, e l' FSH, ormone follicolo-stimolante (gonadotropine). L' LH si lega ai recettori delle cellule Leydig del testicolo stimolando la produzione di testosterone. Al vertice di questo asse di regolazione ipotalamo-ipofisi-testicoli vi sono le vie nervose che inviano informazioni derivanti da strutture superiori del sistema nervoso centrale. La secrezione del GNRH si attua quindi mediante un feed-back ormonale e una modulazione da parte di vie nervose. La secrezione del GNRH è condizionata da stimoli esogeni di natura sessuale, luminosa, olfattiva ed emotiva e dai livelli ormonali endogeni. La regolazione della secrezione di GNRH è così assicurata dall'interazione tra i sistemi di controregolazione ormonali periferici, costituiti dalle gonadotropine ipofisarie (LH e FSH), dai prodotti di secrezione gonadica di tipo steroideo (testosterone, estradiolo, progesterone) e sostanze ad attività neurotrasmettitoriale (catecolamine e serotonina). Inoltre altri ormoni, quali CRH (corticotropin realeasing factor), somatostatina, prolattina, melatonina, interferiscono sulla sua produzione.

Steroid Hormone Synthesis Pathways



La secrezione di testosterone ha un picco nelle ore mattutine. le azioni metaboliche del testosterone avvengono direttamente o tramite il suo prodotto di ossidazione, il diidrotestosterone (DHT), un ormone che si lega a recettori specifici intracellulari delle cellule bersaglio situate nel tessuto muscolare, adiposo, epatico, pilifero e cerebrale.

L'aromatasi è un sistema enzimatico, appartenente alla famiglia dei citocromo P450, che catalizza, tramite aromatizzazione (in senso chimico) la conversione degli androgeni (ormoni sessuali tipicamente maschili) in estrogeni (caratteristici dell'organismo femminile): si forma estrone da androstenedione e estradiolo da testosterone. Interferenti endocrini presenti nell'ambiente, eccesso di produzione di cortisolo e insulina, eccesso di consumo di alcool, cibi raffinati ecc.) possono comportare un'iperespressione di aromatasi inducendo il processo di "femminizzazione".

Indicativamente dopo i 50 anni il testosterone nel maschio si riduce del 1% ogni anno portando a una ridotta disponibilità nell'organismo del testosterone totale e soprattutto della quota libera, che rappresenta proprio la forma attiva dell'ormone. Sempre nell'uomo l'attività dell'aromatasi aumenta con l'età. La diminuzione dei livelli di testosterone si ripercuote in primo luogo sulla funzionalità del tessuto erettile. Eccesso di estrogeni nell'uomo è causa di rischio di: prostatite, ipertrofia prostatica, ginecomastia. diminuzione di vitalità e conta degli spermatozoi, aumento di peso.

Nella donna sono molte le condizioni cliniche e sub cliniche di "estrogenodominanza", cioè di produzione eccessiva di estrogeni e/o di bassa produzione di progesterone, sia in periodo perimenopausale sia durante la normale vita fertile: problemi del fegato, cicli anaovulatori, policistosi ovarica, microfollicolosi ovarica ecc. L'obesità ginoide può essere dovuta a dominanza estrogena.

Si può modulare in senso inibitorio l'enzima aromatasi e aumentare la produzione di testosterone, oltre che con i farmaci, modificando l'alimentazione (es. riducendo caffeina, alcol, zuccheri raffinati), introducendo alcune piante e loro principi attivi (es. epilobio foglia, curcuma e salsapariglia / astaxantina, tribulus / saponine steroidee, protodioscina, maca / betasitosterolo, ginseng / ginsenoidi, muira-puama / aminoacidi, acidi grassi polinsaturi, steroidi) e con lo stile di vita ossia riducendo stress ed effettuando l'adeguato esercizio fisico.

Uno studio del 2004 (Tremblay M.S. et al.) ha esaminato gli effetti indotti sul rilascio di ormoni steroidei sia dall'allenamento coi pesi sia da una attività aerobica in una popolazione maschile. Tra i soggetti erano compresi uomini sedentari, esperti atleti di endurance e atleti esperti di allenamento con pesi. Gli ormoni misurati in questo studio includevano il testosterone, il cortisolo, il DHEA-s. Gli ormoni venivano misurati sia prima sia dopo una corsa di 40 minuti

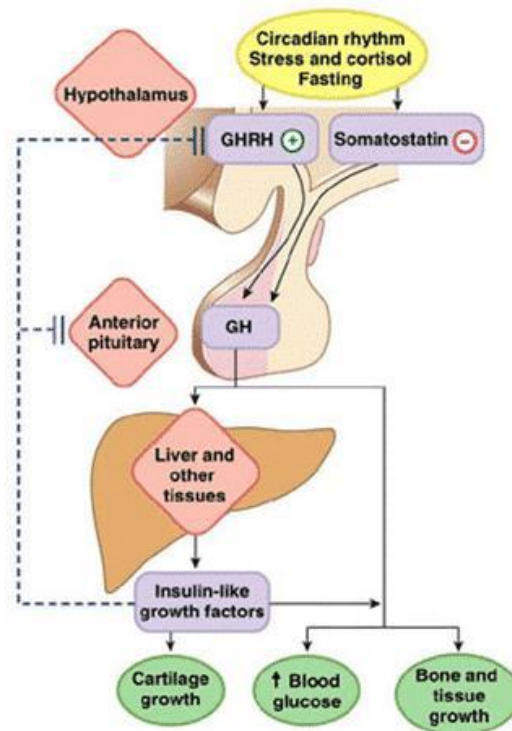
o una sessione di allenamento coi pesi. Entrambe le forme di esercizio erano progettate in modo che i consumi calorici fossero uguali. I soggetti impegnati nell'allenamento con i pesi presentavano livelli di testosterone più elevati rispetto al gruppo di attività di endurance. Inoltre il gruppo di allenamento coi pesi registrava livelli più elevati sia di DHEA-s sia di cortisolo dopo l'allenamento. Gli autori dello studio suggeriscono che avere livelli di cortisolo più elevati dopo l'allenamento con i pesi svolge un'importante funzione di recupero. Il cortisolo infatti, promuovendo il degradamento di grassi e proteine, fornisce energia per i processi vitali di recupero dopo l'esercizio.

Un altro studio del 209 (Spiering B.A. et al) condotto su uomini sani di 27 anni di media ha dimostrato come un allenamento di almeno 3 serie per esercizio, con brevi pause e concentrato sui gruppi muscolari più grandi, riesca ad incrementare i livelli di testosterone del 12% rispetto al valore di riposo e incrementava il numero dei recettori per gli androgeni. Un allenamento che coinvolge tutto il corpo aumenta i livelli di testosterone in misura maggiore rispetto ad esercizi limitati alla parte inferiore del corpo (estensori della gamba). I livelli elevati di testosterone hanno aumentato l'attività dei recettori androgeni durante il recupero dall'allenamento, ciò presumibilmente aumenta la sintesi proteica e la crescita muscolare. Questo studio ha dimostrato che un intenso e completo allenamento innesca tre processi che sono fondamentali per promuovere la sintesi proteica muscolare ossia l'aumento di tensione muscolare, produzione di testosterone e attività del recettore per gli androgeni.

Dati concordi in letteratura indicano come il lavoro con i pesi possa determinare un aumento del testosterone e che gli sport di resistenza (corsa prolungata) al contrario hanno un effetto negativo responsabile della riduzione della testosteronemia. Bisogna comunque riconoscere che gli effetti dell'attività fisica sulla secrezione del testosterone devono tenere conto delle caratteristiche dell'attività svolta (tipologia – intensità – durata) e delle caratteristiche individuali del sistema endocrino del soggetto.

Mentre con pause più lunghe si favorirebbero il ripristino delle fibre veloci ed un'increzione del testosterone (bosco et al, 1995). Con il recupero completo di 3 minuti e ripetizioni condotte con tensioni massimali ma anche submassimali al massimo della potenza, si favorisce un'increzione notevole del testosterone ematico; rispettando pause brevi, si favorisce lo stimolo dell'ormone della crescita (Spiering et al, 2009).

Il GH (Growth Hormone), conosciuto anche come ormone della crescita, somatotropina od



ormone somatotropo (STH), è un peptide prodotto dalla ghiandola pituitaria (ipofisi). Durante l'adolescenza i livelli plasmatici di GH aumentano notevolmente, stimolando la crescita staturale, aumentando la ritenzione di azoto e favorendo l'ossidazione delle scorte lipidiche: azione di stimolo sulla sintesi proteica che si traduce in uno stimolo della crescita corporea, azione sul metabolismo glucidico con stimolo alla neoglicogenesi epatica, la conseguente iperglicemia e l'inibizione della utilizzazione del glucosio a livello muscolare, azione

sul metabolismo lipidico con

l'aumento dei livelli circolanti di acidi

grassi liberi, dei corpi chetonici e della loro utilizzazione e ossidazione a livello dei tessuti.

Tutti questi effetti sono mediati dal IGF-1 (somatomedina o fattore di crescita insuline simile), un potente ormone anabolico prodotto dal fegato in risposta alla somatotropina. Superato questo periodo della vita i livelli di GH diminuiscono ma l'ormone continua comunque a essere prodotto.

Anche in età adulta la somatotropina svolge infatti un'importante azione regolatrice sui vari processi metabolici. Nell'uomo i valori plasmatici di GH variano da 1 a 5 ng/ml, con picchi anche di 10 ng/ml sotto stress o dopo un superallenamento; la secrezione è pulsatile con picchi più frequenti e più ampi nelle prime ore di sonno notturno.

Un deficit di GH nel bambino compromette la crescita corporea (nanismo ipofisario) e lo sviluppo di genitali e tratti somatici; contemporaneamente aumentano anche gli accumuli adiposi nella regione addominale. Se la carenza di ormone della crescita colpisce l'adulto si assiste invece a una riduzione della massa muscolare e a un contemporaneo aumento di quella adiposa, comparsa di alterazioni metaboliche, aumentata fragilità ossea e ridotta tolleranza dell'esercizio fisico.

Indicatori di carenza di GH nell'adulto possono essere: palpebre cadenti, guance molli (segno caratteristico), labbra fini, rughe larghe e profonde (segno caratteristico), dita affusolate, muscoli delle mani sottili con atrofia e ipotono del muscolo del palmo, pelle abbondante sul dorso (se si pizzica con le dita si allunga e stacca facilmente), linee longitudinali delle unghie, sviluppo delle caratteristiche sessuali insufficiente (nell'uomo disfunzione erettile), ventre grosso e pendente, interno cosce rilassato, cuscinetti di grasso sopra le ginocchia, piedi piatti con atrofia muscolare della pianta, mancanza di pace interiore, ansia cronica immotivata, mancanza di autocontrollo con reazioni emotive eccessive, crisi di ansia e attacchi di panico, tendenza alla depressione (cinismo in caso di eccesso di gh), sensazione di inadeguatezza, tendenza a drammatizzare, tendenza all'isolamento, stanchezza rilevante e permanente, sonno leggero o poco profondo, eccessivo bisogno di dormire (nove ore o più) e incapacità di stare sveglio fino a tardi, tendenza a invecchiare velocemente (segno caratteristico), decadimento fisico profondo, osteoporosi.

Dal punto di vista della dieta, per far fronte ai sintomi dovuti a carenza dell'ormone della crescita risulta utile, l'integrazione di sostanze vegetali ad azione stimolante il GH come l'avena ed il fieno greco, di proteine o aminoacidi in forma libera, la privazione di carboidrati e calorie.

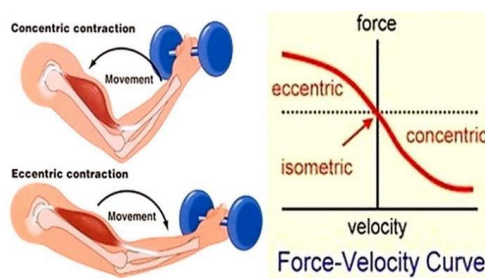
anche il sonno profondo e il caldo favoriscono la produzione di GH.

L'esercizio fisico rappresenta un potente stimolo per la secrezione del GH. Il GH durante l'esercizio possiede un effetto anticatabolico; tende a risparmiare le proteine muscolari contrastando l'azione del cortisolo e delle catecolamine, collaborando con gli ormoni sessuali surrenalici e col testosterone, facilita l'utilizzo a scopo energetico dei grassi provenienti dal tessuto adiposo.

Il picco della risposta del GH all'esercizio fisico viene osservato tra i 20 e i 60 minuti, nel corso degli esercizi di lunga durata e in cui si raggiunge un consumo di ossigeno pari al 40% di quello massimo, o tra la fine del lavoro e i primi 5-15 minuti del periodo di recupero nel caso di esercizi di durata inferiore a 20 minuti. Per gli esercizi ad alto impegno di forza, come il sollevamento pesi e il bodybuilding, la massima risposta del GH viene osservata eseguendo esercizi con una più richiesta a carico della glicolisi anaerobica, quindi con maggior concentrazione di acido lattico. Un'aumentata risposta del GH è stata correlata in maniera inversamente proporzionale al periodo di recupero tra le serie degli esercizi e direttamente proporzionale alla loro durata. Questo fenomeno è stato ulteriormente confermato dai livelli di acido lattico e dalla risposta positiva del GH in caso di esercizio ad alto impegno muscolare. L'infusione endovenosa di lattato ha dimostrato la capacità di aumentare il livello di GH plasmatico. Il GH tende ad aumentare dopo la fine dello sforzo se questo è breve, mentre cala quando è troppo prolungato: dopo una maratona sono stati riscontrati valori più bassi che dopo una gara di 10 e 25 km. Uno studio del 2014 (Nindl B.C. et al) riguardante lunghi allenamenti aerobici e ha dimostrato che l'aumento dell'ormone della crescita risulta maggiore durante un allenamento aerobico di 2 ore rispetto a un allenamento aerobico di 1 ora e o 2 ore di allenamento con pesi. I risultati potrebbero aiutare a spiegare la quantità di esercizio necessario per una perdita di peso corporeo significativa. La maggior parte degli studi mostra che le persone devono correre almeno 20 miglia (ca. 30 Km) a settimana per ottenere una perdita di peso significativa solo tramite questo tipo di allenamento da. Ciò potrebbe avere qualcosa a che fare con la quantità di esercizio necessario per incremento sostanziale del GH

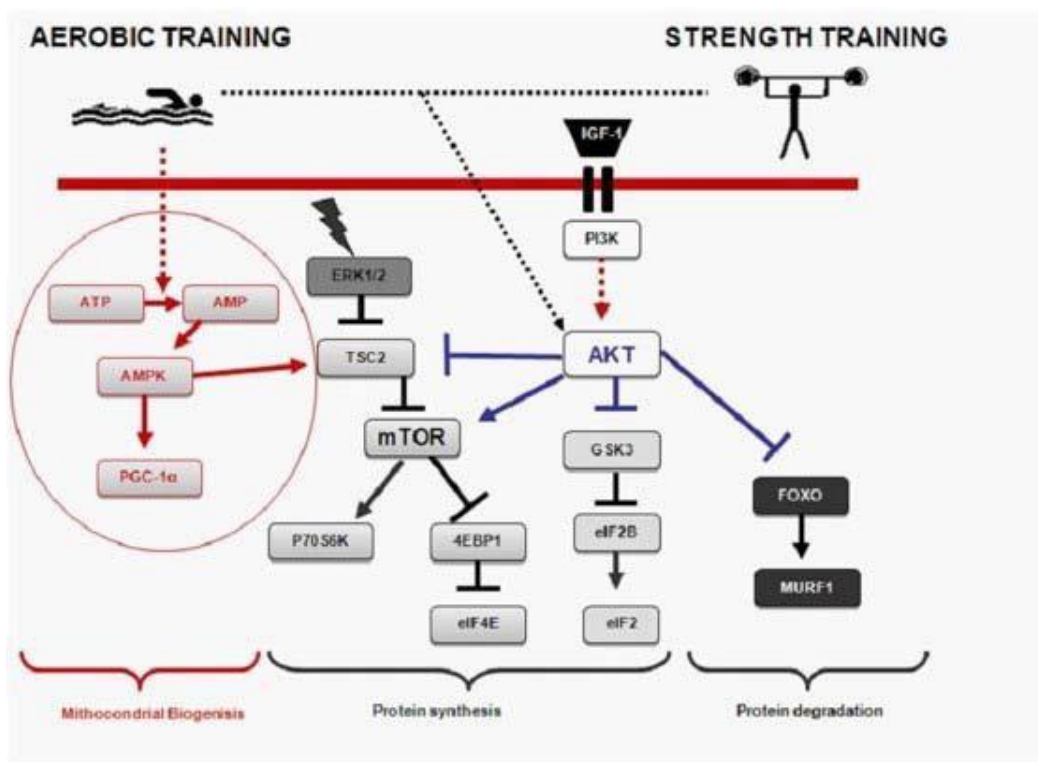
Alcuni studi giapponesi dimostrano che l'allenamento coi pesi prima di un esercizio aerobico aumenta la secrezione di GH al meglio, soprattutto se il riposo tra i pesi e l'aerobica è minimo (meno di 20'). Gli stessi ricercatori hanno dimostrato che eseguire degli sprint prima dell'allenamento coi pesi diminuisce la risposta del GH. Inoltre effettuare attività aerobica prima dei pesi risulta controproducente in quanto causa affaticamento che si traduce in una minore capacità di allenamento ad alta intensità. Risulta pertanto risultare la soluzione migliore eseguire prima l'esercizio coi pesi e poi quello aerobico. Ciò consente anche di utilizzare più grassi a scopo energetico essendo già stati consumati gli zuccheri nei muscoli e nel fegato. I peptidi oppiogeni non mediano la secrezione di GH dovuta all'ipoglicemia insulinica ma sembrano importanti per l'elevazione del GH da esercizio.

I muscoli si contraggono in maniera concentrica, eccentrica e isometrica (statica). Le



contrazioni eccentriche sono in grado di generare più forza delle concentriche e isometriche per cui ci si aspetterebbe un maggior effetto sugli ormoni anabolici. Uno studio dell'università della California (Baldwin K. et al, 2013) ha dimostrato che le contrazioni eccentriche sono in grado di determinare i maggiori incrementi di IGF-1 (somatomedina C, fattore di crescita insulino simile) e MGF (Meccano Growth-Factor) oltre che una maggior inibizione della produzione di miostatina; IGF-1 e MGF sono essenziali per la crescita muscolare mentre la miostatina ne rappresenta un inibitore. In tali situazioni i fattori di crescita aumentano anche nei tendini, ciò suggerisce che le modificazioni strutturali nei tendini sono importanti per i progressi della forza. La figura seguente illustra l'effetto dell'allenamento aerobico e di forza e il signaling intracellulare sulla modulazione del proteoma; stimolazione esterna e relativa risposta su

biogenesi mitocondriale, stress ossidativo, sintesi proteica e degradazione proteica.



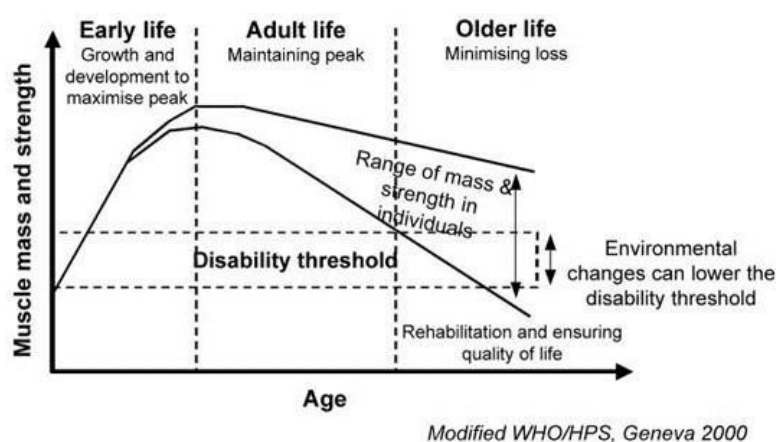
ERK (Extracellular signal-Regulated protein Kinase); mtor (Mammalian Target of Rapamycin); TSC2 (Tuberous Sclerosis Complex 2); PI3K (phosphatidylinositol 3-Kinase); eif2 (Eukaryotic Initiation Factors 2); eif (Eukaryotic initiation factors inclusi 4E and 2B); 4EBP1 (4E Binding protein 1); ATP (Adenosine Triphosphate); AMPK = AMP (Adenosine Monophosphate)-activated protein Kinase); murf1 (Muscle RING Finger 1); FOXO (Forkhead Box); PGC-1α (Peroxisome proliferator-activated receptor-γ coactivator 1α).

Impatto dell'esercizio fisico sulla sarcopenia

L'eziologia della sarcopenia (perdita generalizzata di massa muscolare e relativa forza) è multifattoriale e ancora poco conosciuta mentre le conseguenze di questo fenomeno, ovvero la perdita di indipendenza e le complicanze metaboliche, rappresentano una delle primarie condizioni nella salute pubblica. L'alterazione metabolica più evidente per il declino muscolare negli anziani è lo squilibrio tra la sintesi proteica e i relativi tassi di degradazione ma sono coinvolte altre cause quali: processi neurodegenerativi, riduzione della produzione o sensibilità di ormoni anabolici quali insulina, ormone della crescita e ormoni sessuali, disregolazione delle secrezioni di citochine, modifica della risposta antinfiammatoria, nutrizione inadeguata, stile di vita sedentario. Di conseguenza la perdita di massa muscolare legata all'età potrebbe essere contrastata da adeguati interventi metabolici comprese le integrazioni nutrizionali o

l'allenamento fisico. Recenti osservazioni mostrano chiaramente che i cambiamenti nelle assunzioni quantitative e qualitative delle proteine alimentari sono in grado di contrastare alcuni processi fisiopatologici legati alla progressiva perdita muscolare.

L'impatto benefico dell'allenamento di forza o di resistenza sulla massa muscolare e sulla sua funzionalità viene evidenziato in molti studi che suggeriscono che la potenziale risposta anabolica all'esercizio fisico permane nonostante una minore risposta metabolica ai nutrienti. Quindi un approccio multimodale che combini nutrizione, esercizio fisico, ormoni e farmaci anabolizzanti specifici può essere un trattamento innovativo per limitare lo sviluppo della sarcopenia da invecchiamento.



La sarcopenia presenta il suo esordio all'età di 40-50 anni, colpisce il 30% degli ultra sessantenni e il 50% degli over 80. A 50 anni spesso c'è già un deficit del 10% della forza che a 70 anni supera il 30%.

La bassa forza muscolare è associata alla mortalità presumibilmente a causa della bassa massa muscolare (sarcopenia) e dell'inattività fisica. La forza (con presa in trazione longitudinale) è stata esaminata in 1071 uomini per un periodo di 25 anni. La massa muscolare è stata stimata utilizzando l'escrezione di creatinina nelle 24 ore e i valori di attività fisica sono stati rilevati mediante questionario. L'analisi di sopravvivenza ha esaminato l'impatto della forza e del suo tasso di variazione sulla mortalità per qualunque causa nell'arco di 40 anni. Bassa forza e il suo calo sono associati a un aumento della mortalità indipendentemente dall'attività fisica e dalla massa muscolare. Negli uomini con età ≥ 60 anni, la forza è risultata più protettiva del tasso di perdita di massa muscolare. La forza e il relativo tasso di variazione contribuiscono all'impatto della sarcopenia sulla mortalità. Sebbene la massa muscolare e l'attività fisica siano

importanti, non si ritengono completamente responsabili dell'impatto della forza e dei suoi cambiamenti (Metter E.J. et al, 2002).

In uno studio della Facoltà delle scienze dell'università del Queensland (Australia), 100 persone (63 donne e 37 uomini di età media 87 anni) sono state allenate con pesi a relativa alta intensità. La loro forza è aumentata in media del 113%.

Uno studio condotto dalla Washington University School of Medicine, ha dimostrato che l'allenamento contro resistenza è in grado di aumentare il grado di sintesi proteica muscolare negli uomini di 76 anni e oltre, aumentando sia la forza che l'ipertrofia.

Stuart Philips della McMaster University ha spiegato come l'allenamento con i pesi e l'assunzione di proteine determinano (causano) la crescita muscolare. La Leucina è un aminoacido chiave per attivare la sintesi proteica muscolare (VIA mTOR) ma l'ipertrofia del muscolo si blocca in assenza della serie completa di aminoacidi essenziali. Le persone oltre i 40 anni rispondono meno agli aminoacidi chiave, per questa ragione dovrebbero consumare spesso proteine durante il giorno così da conservare la massa muscolare e prevenirne l'atrofia. Scienziati canadesi e americani, guidati da Simon Melov, hanno scoperto che l'allenamento con i pesi determina un aumento delle funzioni dei mitocondri, i centri energetici delle cellule, responsabili della perdita di massa muscolare e di funzioni correlate all'invecchiamento. All'inizio dello studio, gli adulti più anziani erano il 59% più deboli degli adulti giovani. L'allenamento con i pesi ha ridotto il deficit al 38%. La funzione cellulare negli adulti più anziani era tornata quasi ai livelli di quella degli adulti giovani. Gli studi hanno dimostrato che l'allenamento con i pesi aveva quasi letteralmente portato indietro l'orologio dell'invecchiamento cellulare.

In uno studio condotto dalla McMaster University e dal Buck Institute for Age Research (California), dopo aver effettuato un allenamento contro resistenza per un'area, 2 volte alla settimana per un periodo di 6 mesi, la forza generale dei partecipanti è aumentata del 36%. La cosa più rimarchevole è che dei 596 geni presi in considerazione durante lo studio, 179 hanno mostrato una inversione relativa alla loro espressione legata all'età.

Relazione tra esercizio fisico e miRNA

Diversi studi indicano che l'esercizio fisico è in grado di suscitare un cambiamento nei livelli di RNA sierici specifici per il tipo di esercizio svolto. Campioni di plasma prelevati da soggetti

umani hanno dimostrato che una singola sessione di allenamento comporta un aumento dei livelli circolanti di miR-146a, miR-222, miR-21 e miR221.

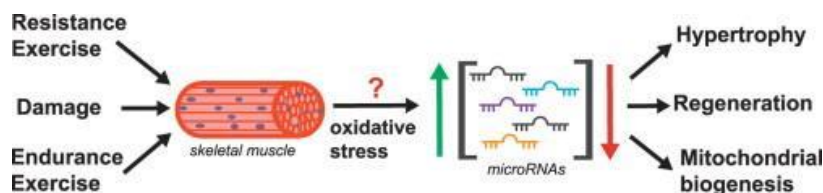
Un possibile meccanismo di rilascio di miRNA spiega che esso sarebbe contenuto in alcune vescicole (esosomi) nel muscolo scheletrico attivo e come un fattore paracrina influenzerebbe l'attività di altri tessuti. I miRNA circolanti potrebbero quindi dimostrarsi utili come biomarker per valutare lo stato dell'allenamento o come predittori della progressione di malattie (es. miopatie). Il fatto che i miRNA siano coinvolti nella risposta allo stress cellulare, li rende ideali per mediare anche la risposta e l'adattamento del muscolo scheletrico ai cambiamenti dell'attività contrattile.

Aoi W et al. (2013) hanno dimostrato che sia nell'esercizio, in fasi sia acute sia aerobiche, diminuivano i livelli circolanti del miR-486 e la sua diminuzione contribuisce all'equilibrio proteico poiché esso sopprime i fattori che promuovono la disgregazione proteica e inibiscono la sintesi proteica.

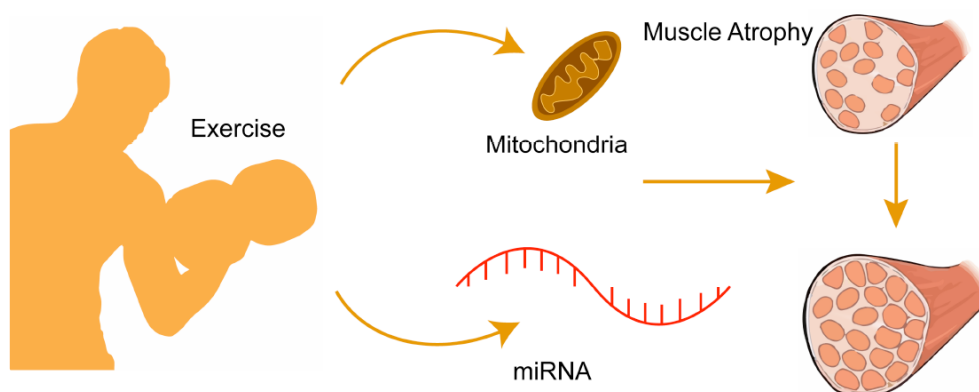
In uno studio di Davidsen e colleghi (2011), un gruppo di 56 maschi adulti ha svolto 12 settimane 5gg/settimana di allenamento contro resistenza (RT - Resistance exercise Training) ossia con i pesi. Si è notato che il cambiamento indotto dall'allenamento nell'abbondanza di miR-378 è correlato positivamente con il guadagno di massa muscolare. L'ipertrofia dei muscoli scheletrici umani indotta da RT è associata quindi a specifici cambiamenti dei livelli di miRNA. Tale analisi inoltre indica che i miRNA possono svolgere un ruolo nel cambiamento fenotipico e nella diversa risposta alla RT.

Diversamente dall'esercizio di forza, l'esercizio aerobico generalmente determina adattamenti metabolici con pochi cambiamenti nella massa muscolare. Questi adattamenti metabolici sono caratterizzati da un aumento dei mitocondri, spostamenti del tipo di fibra verso un profilo più ossidativo e un aumento della densità capillare. Numerosi studi hanno riportato variazioni nell'espressione di miRNA anche in seguito all'esercizio aerobico, suggerendo che i miRNA possono avere un ruolo negli adattamenti metabolici che si verificano con questo tipo di esercizio. Si ritiene che la PGC1- α (proteina coattivatore di trascrizione) abbia un ruolo importante nell'adattamento del muscolo scheletrico all'esercizio in quanto ha dimostrato di essere coinvolto nella biogenesi mitocondriale, nel controllo del dispendio energetico, compresa la gluconeogenesi, glicolisi e ossidazione degli acidi grassi. Si è visto però che

l'espressione di questi adattamenti sono minori man mano che il soggetto diventa più allenato, suggerendo che i livelli di espressione di miRNA possono variare quando cambia lo stato dell'allenamento del soggetto.



Uhlemann e colleghi (2012) hanno scoperto che i livelli circolanti di miR-133a risultano elevati a seguito di un allenamento volto a danneggiare i muscoli scheletrici, il miR-126 invece a dopo un esercizio con danni allo strato endoteliale all'interno del sistema vascolare.



Attività fisica e microbiota

Uno studio del 2012 (Claesson et al) ha dimostrato che la scarsa capacità di esercizio nei pazienti anziani insieme a condizioni di fragilità è legata a una bassa diversità microbica fecale a sua volta correlata a una bassa diversificazione della dieta.

In uno studio del 2014 (Clarke SF et al) eseguito sui rugbisti è risultato che questi rispetto al gruppo di controllo avevano:

livelli più bassi di marcatori infiammatori,

un miglior profilo metabolico,

proporzioni molto elevate di Akkermansiaceae, una specie di batteri nota per essere correlata a bassi tassi di obesità e disturbi metabolici (nonostante questi atleti avessero un elevato introito calorico, con alta percentuale proteica).

Un altro studio (Allen JM et al) ha evidenziato nel 2018 che l'esercizio fisico per indurre effettivi cambiamenti positivi nel microbiota intestinale umano deve essere praticato in modo

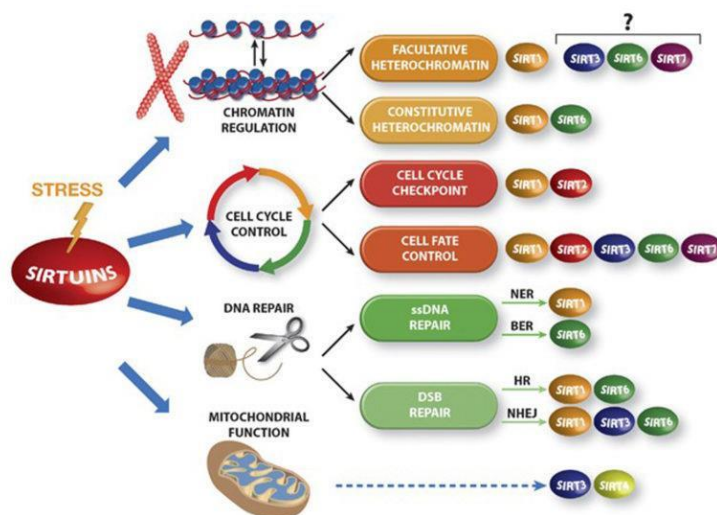
continuativo. I miglioramenti sembrano non dipendere in modo particolare dalla qualità della dieta né dallo stato di allenamento iniziale del soggetto ma dal suo stato di obesità.

Come per tutte le cose la moderazione è la miglior soluzione. Intensità e durate crescenti di esercizio aumentano il rischio di danni alla funzione intestinale. Le persone che si allenano eccessivamente possono essere soggette a problemi intestinali acuti o cronici. Le cellule enteriche infatti sembrano divenire maggiormente permeabili permettendo così a endotossine e ad agenti patogeni di passare nel flusso sanguigno.

Esercizio fisico e sirtuine

L'esercizio fisico rappresenta uno dei mezzi più efficaci nell'attivazione delle sirtuine (SIRT), enzimi a cui sempre più i ricercatori assegnano il ruolo di protezione, regolazione e aumento della longevità del nostro organismo.

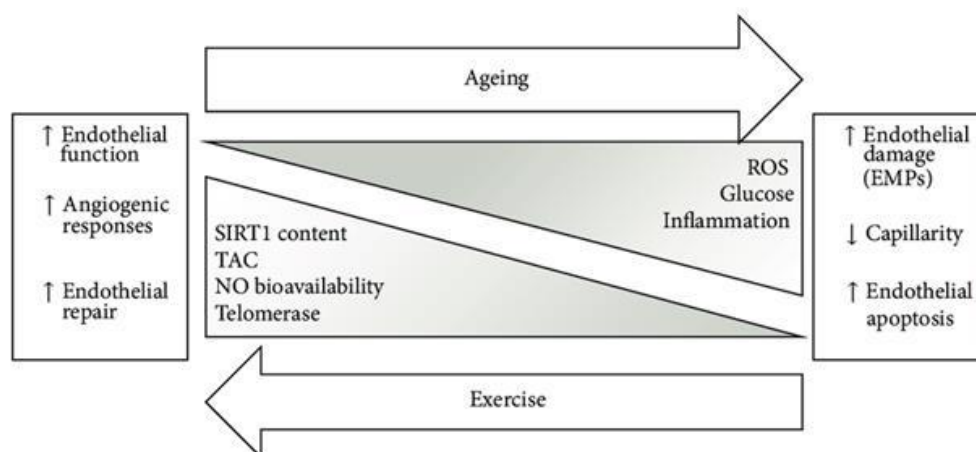
Le sirtuine partecipano alla regolazione del metabolismo energetico, della risposta allo stress cellulare, dell'infiammazione e dell'omeostasi mitocondriale. I risultati sperimentali ne indicano il possibile coinvolgimento nei processi associati all'invecchiamento; nell'essere umano, tuttavia, non è dimostrato che la loro attivazione determini di per sé un effetto anti-aging o impedisca patologie neurodegenerative.



Studi effettuati dal gruppo di ricerca di Costford hanno dimostrato che in soggetti sedentari non obesi, l'esercizio fisico effettuato per 3 settimane, induce un significativo aumento delle molecole necessarie all'attivazione di SIRT1, con conseguente aumento della biogenesi mitocondriale, dimostrando che SIRT1 risulta essere responsiva all'esercizio fisico. Esistono studi effettuati su soggetti umani che dimostrano un ruolo chiave delle SIRTs nel mediare la

risposta adattativa all'esercizio fisico. In particolare durante l'attività fisica nel muscolo scheletrico sono necessari degli adattamenti funzionali e strutturali per migliorare la performance, come la sintesi di nuovi mitocondri con conseguente aumento del consumo di ossigeno e della soglia del lattato, e cambiamento nell'utilizzazione dei substrati orientato verso una maggiore ossidazione degli acidi grassi con uno switch di utilizzo dalle fibre muscolari glicolitiche, a contrazione veloce, a quelle ossidative a contrazione lenta; tutti fattori limitanti per una buona performance. Le SIRT6 potrebbero essere i regolatori primari influenzando la capacità ossidativa dei mitocondri percependo le perturbazioni chimiche indotte dall'esercizio. Infatti le SIRT6 regolano l'attività di molti enzimi metabolici coinvolti nel ciclo di Krebs, nella catena di trasporto dei mitocondri e nel ciclo dell'urea. La SIRT3, che si trova nei mitocondri delle nostre cellule, subisce un significativo incremento in seguito ad attività fisica, prevenendo e rallentando il declino della capacità ossidativa mitocondriale del muscolo scheletrico, tipico processo che avviene con l'invecchiamento o secondariamente all'inattività fisica. Attivando gli enzimi mitocondriali coinvolti nel metabolismo dell'ossidazione degli acidi grassi e nella catena di trasporto degli elettroni, SIRT3 induce un aumento del

L'esercizio fisico può sostenere il metabolismo energetico mitocondriale e la capacità antiossidante attraverso molteplici vie, fra cui quelle associate a SIRT3. Questi meccanismi possono contribuire a contrastare il declino funzionale collegato all'inattività e all'invecchiamento; non è però dimostrato che l'attivazione di una singola via possa impedire le patologie neurodegenerative.



In conclusione gli attori principali dei benefici derivanti da esercizio fisico, restrizione calorica e specifici alimenti (es. polifenoli) sembrano i mediatori biochimici rappresentati dagli enzimi sirtuine.

Animale motorio uomo

L'essere umano è un animale primariamente motorio: siamo soprattutto il risultato del bisogno di camminare in maniera massimamente efficace su due piedi, immersi in un campo gravitazionale e su un terreno naturalmente sconnesso.

Di tutte le strutture del sistema nervoso centrale, più di un quarto partecipano direttamente e più della metà indirettamente alla pianificazione e all'esecuzione dei movimenti; l'uomo quindi, con i suoi 650 muscoli e 206 ossa, è un "animale motorio". Nella fase embrionale, in quella fetale e in quella della prima infanzia, l'azione precede la sensazione: vengono compiuti dei movimenti riflessi e poi se ne ha la percezione. Dai recettori sensoriali dipende la conoscenza su quale è la nostra "conformazione" e posizione spaziale; in qualche misura, per rispondere alla domanda "chi sono io?" occorre anche rispondere alla domanda "dove sono io?". E' dai riflessi propriocettivi che nascono le rappresentazioni mentali (engrammi) che consentono la nascita di abilità motorie complesse e delle stesse idee. Le funzioni motorie e il corpo, considerati in molte culture come entità inferiori e subordinate alle attività cognitive e alla mente, sono invece all'origine di quei comportamenti astratti di cui siamo fieri, compreso lo stesso linguaggio che forma la nostra mente e nostri pensieri. Perdere il controllo sul proprio corpo significa, di conseguenza, perdere il controllo sui propri pensieri ed emozioni. L'aspetto motorio resterà per tutta la vita determinante e preponderante relativamente al benessere fisico e psichico.

Ippocrate: "Se fossimo in grado di fornire a ciascuno la giusta dose di nutrimento e di esercizio fisico né in eccesso né in difetto, avremmo trovato la strada della salute".

Conclusione

Rimettere il paziente al centro significa riconoscerne l'individualità e attribuire il giusto valore alla relazione terapeutica. Osservare, interpretare e collegare informazioni di natura diversa rimane essenziale, soprattutto quando più professionisti intervengono sullo stesso quadro clinico.

Il corpo umano comprende, secondo le stime attuali, circa 3×10^{13} cellule. Cellule nervose, muscolari, epiteliali e connettivali non lavorano come unità isolate, ma formano sistemi interdipendenti. La matrice extracellulare e il tessuto connettivo costituiscono l'ambiente strutturale e funzionale nel quale avvengono comunicazione, scambi metabolici e adattamento meccanico.

La continuità fra DNA, cromatina, citoscheletro, membrana e matrice extracellulare aiuta a comprendere meccano-trasduzione e tensegrità biologica. A un livello ancora più profondo ci si può interrogare sul possibile ruolo dell'entanglement quantistico. Questa possibilità appartiene però al campo delle ipotesi: non discende dalle conoscenze sperimentali sulla tensegrità biologica e non va presentata come un dato acquisito.

Epigenetica, nutrigenetica e nutrigenomica permettono così di osservare da angolazioni diverse la rete che collega cellula, matrice extracellulare, organismo e ambiente. La medicina poggia sulle scienze biologiche, ma nella pratica richiede interpretazione, esperienza e adattamento alla persona. Una visione integrata non attenua il rigore sperimentale; al contrario, ne aumenta la necessità.

Bibliografia

- Ader R., "Psychoneuroimmunology", Academic press, 1981
- Albergati F. G., Bacci A., Mancini S., "La matrice extracellulare", Minelli editore, 2004
- Alberts B. et al, "Molecular Biology of the Cell", Garland Sciences Textbooks, 2002
- Allen J.M., Mailing L.J., Niemi G.M. et al., "Exercise Alters Gut Microbiota Composition and Function in Lean and Obese Humans ", Med Sci Sports Exerc, 50(4):747-757, Apr 2018
- Athenstaedt H, Zellforsch Z., "Permanent Electric Polarisation and Pyroelectric behaviour of the Vertebrate Skeleton", in PubMed, 1969
- Athenstaedt H, "Pyroelectric and piezoelectric properties of vertebrates", Annals of the New York Academy of Sciences, 238, pp 68-110, 1974
- Berg D.E., M. Howe M., "Mobile DNA", American Society for Microbiology, 1989
- Baldwin K.M., Haddad F., Pandorf C.E., Roy R.R., Edgerton V.R., "Alterations in muscle mass and contractile phenotype in response to unloading models: role of transcriptional/pretranslational mechanisms", Physiol., 11 October 2013
- Biondi M., "Mente, cervello e sistema immunitario", McGraw-Hill, 2003
- Birkedal-Hansen H. et al., "Matrix metalloproteinases", Crit. rev. Oral. Biol. Med. pp 329: 530-535, 1993
- Bloom F.E., "Neurotransmitters: past, present and future directions", in FASEBJ, 2, 1988
- Bosco C., Belli A., Astrua M., "Dynamometer for evaluation of dynamic muscle work", European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology, 70(5):379-86,
- Bottaccioli F., "Psiconeuro Endocrino Immunologia", Red studio, 2005
- Bottaccioli F., "Epigenetica e Psiconeuro Endocrino Immunologia", Edra, 2014
- Boulet L.P., "Clinical Asthma Review", in PubMed, May, 1999

- Brigo B., “Salute e benessere con le piante”, Gribaudo, 2009
- Bruni A., “Farmacognosia Generale e Applicata – I farmaci naturali”, Piccin, 1999
- Bukhari A.I., Shapiro J.A., Adhya S.L., “DNA insertion elements, plasmids and episomes”, Cold Spring Harbor, 1977
- Campagna P., “Manuale ragionato di fitoterapia”, Minerva Medica. 2009
- Campagna P., “Gli oli essenziali oggi”, Flora, 2017
- Campisi C., “Il linfedema, aspetti attuali di diagnosi e terapia”, in Flebologia Oggi, Min. Medica Ed., 1: pp 27-41, 1997
- Capasso F., Grandolini G., Izzo A. A., “Fitoterapia – impiego razionale delle droghe vegetali”, Springer, 2006
- Capasso F., De Pasquale R., Grandolini G., “Farmacognosia - Botanica, chimica e farmacologia delle piante medicinali”, Springer, 2011
- Chetta G., “Dalla Mec alla postura”, in siti internet medici listaippocrate.it, my- personaltrainer.it, sportmedicina.com, 2010
- Chetta G., “Il Sistema Connettivo: dalla PNEI alla PNECI”, in sito internet medico www.listaippocrate.it, 2007
- Clarke S.F., Murphy E.F., O'Sullivan O. et al., - “Exercise and associated dietary extremes impact on gut microbial diversity”, Gut, 2014
- Claesson M.J., Jeffery I.B., Conde S. et al., “Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly”, Nature, 488: 178 –84, 2012
- Clienti C., Indelicato C., Marino A., “Modelli viscoelastici del tessuto osseo mediante prove di rilassamento”, in Atti del XXXVI Convegno Nazionale Associazione Italiana per l'Analisi delle Sollecitazioni (AIAS), Napoli, 2007
- Dardevet D., Rieu I., Fafournoux P., Sornet C., Combaret L., Bruhat A., Mordier S., Mosoni L., Grizard J., “Leucine: a key amino acid in ageing-associated sarcopenia?”, Nutr Res Rev, 16(1):61-70, 2003
- Davidsen P.K., Gallagher I.J., Hartman J.W., Tarnopolsky M.A. et al, “High responders to resistance exercise training demonstrate differential regulation of skeletal muscle microRNA expression”, PMID, 2010
- Dieppe P.A., “Rheumatology”, in Journal of Rheumatology 38, pp 338-345, 1995
- Don W. Fawcett, “Bloom & Fawcett Trattato di Istologia”. McGraw-Hill, 1996
- Evans W.J., “Protein nutrition, exercise and aging”, J Am Coll Nutr. 23(6 Suppl), 2004
- Fain J.M., Sheperd R.E., “Hormonal regulation of lipolysis”, in Adv. Exper. Med. Biol. 111, pp 43-79, 1979

- Field et al, "Immune system maintenance requires a steady intake of all the necessary vitamins, minerals, proteins, PUFA", Journal of Leukocyte Biology, 71, 2002
- Fernandes J., Arida R.M., Gomez-Pinilla F., "Exercise as an Epigenetic Modulator of Brain Plasticity and Cognition", PMID, 2017
- Finnegan D.J., "Eukaryotic transposable elements and genome evolution", Trends in Genetics, 5, pp. 103-07, 1989
- Firenzuoli F., "Fitoterapia – Guida all'uso clinico delle piante medicinali", Edra, 2008
- Furth J.J., in J of Gerontology, 2001
- Gabbiani G.; "Evolution of the Myofibroblast Concept", Fascia Research Congress, Boston, 2007
- Gabbiani G.; "The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases", in J of Pathology, 200(4): 500-3, 2003
- Galimberti D., Gidaro G. B., Calabrese V. et al, "Nutrigenomica ed epigenetica – Dalla biologia alla clinica", Edra, giugno 2017
- Gennis R.B., "Biomembranes molecular structure and functions", Springer, Verlag,
- Gilbert S.J., Wotton P.R., in Cardiovascular Research, 34, pp 377-383, 1997
- Grandi M., "Immunologia e fitoterapia", Tecniche nuove, 2008
- Halata Z., Baumann K.I.: "Sensory nerve endings in the hard palate and papilla incisiva of the rhesus monkey"; in Anatomy and Embriology, vol.199, iss.5, pp 427-437, 1999
- Hay E.D., "Extracellular matrix", in J. of Cell.. Biol., 91, pp 205-223, 1980
- Hynes R., "Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines", in Cell 110 (6), pp 673-87, 2002
- Hulmi J.J., Tannerstedt J., Selänne H., Kainulainen H., Kovanen V., Mero A.A., "Resistance exercise with whey protein ingestion affects mTOR signaling pathway and myostatin in men",. Appl Physiol, 106(5):1720-9, 2009
- Ikesen K.H.G., Erdogru T., in Asian J of Andrology, 3, pp 55-60, 2002
- Ingber D., "The architecture of life", in Scientific American, January 1998, pp 48-57
- Izzo M., "Matrix e metalloproteinases and oxydation stress", in Atti congresso UIP, Roma, 2001
- Kingsman S.M., Kingsman A.J., "Ingegneria genetica", ISBN, 1991
- Kirby T.J., McCarthy J.J., "MicroRNAs in skeletal muscle biology and exercise adaptation", Free Radic Biol Med., 64: 95–105, 2013
- Kruger L., "Cutaneous sensory system", in Encyclopedia of Neuroscience, Vol 1 Adelman G., 1987
- La Merrill M.A., Vandenberg N.L., Smith M.T. et al, "Consensus on the key characteristics of endocrine-disrupting chemicals as a basis for hazard identification", Nature Reviews Endocrinology, volume 16, pages45–57, 2020

- Lewin B., "Il gene", Zanichelli, 1990
- Lin C.Y., Lovén J., Orlando D.A., Rahl P.B., Sigova A.A., "Revisiting global gene expression analysis", Cell – Elsevier, Vol 151, Issue 3, pagg. 476-482, 26 October
- Lodish H, Berk A., Matsudaira P., Kaiser C.A., Krieger M., Scott M.P., Zipursky S.L., Darnell J., "Molecular Biology of the Cell", p963. WH Freeman: New York, 2004
- Maier L. et al, " 'Blooming' in the gut: how dysbiosis might contribute to pathogen evolution", Nature, 2013
- Matthew J. Paszek, et al., "Tensional homeostasis and the malignant phenotype". in Cancer Cell, Vol. 8, pp. 241-254, settembre 2005
- Metter E.J., Talbot L.A., Schrager M., Conwit R., "Skeletal muscle strength as a predictor of all-cause mortality in healthy men", J Gerontol A Biol Sci Med Sci., 57(10):B359-65, 2002
- Mitchell J.H., Schmidt R.F., "Cardiovascular reflex control by afferent fiber from skeletal muscle receptors", Sheperd JT et al., Handbook of Physiology, Sect. 2, Vol III,
- Myers T., "Anatomy Trains", Elsevier Science Limited, 2002
- "Monografie ESCOP - Le basi scientifiche dei prodotti fitoterapici", Aboca, 2006
- Morin E., "La vita della vita", Feltrinelli, 1987
- Morosini C., Pacini T., "Pratica posturologica", Ortho2000. 4, 2002
- Nigro C., Leone A., Raciti G.A., Longo M. et al, "Methylglyoxal-Glyoxalase 1 Balance: The Root of Vascular Damage", in PubMed Central, gennaio 2017
- Nindl B.C., Pierce J.R., Rarick K.R., Tuckow A.P., Alemany J.A., Sharp M.A., Kellogg M.D., Patton J.F., "Twenty-hour growth hormone secretory profiles after aerobic and resistance exercise", Med Sci Sports Exerc, 46(10):1917-27, 2014
- Oliverio A.; "La mente, istruzioni per l'uso"; Rizzoli, 2001
- Oschman J.L., "Energy Medicine: the scientific basis", Churchill Livingstone, 2000
- Pammi et al, "Nutrition-Infection Interactions and Impacts on Human Health", CRC Press, 2014
- Panossian A., Wikman G., "Effects of Adaptogens on the Central Nervous System and the Molecular Mechanisms Associated with Their Stress—Protective Activity", in PubMed Central, 2010
- Paparella Treccia R., "L'uomo e il suo moto", Verduci Editore, 1988
- Pasquali Rochetti I., Baccarani Conti M., "Connect Tiss. Res.", 13, pp 237-249, 2004
- Petriz B., Pedrosa da Costa Gomes C., Alves Almeida J., Franco O.L., "The Effects of Acute and Chronic Exercise on Skeletal Muscle Proteome: Muscle proteome in response to exercise training", Journal of Cellular Physiology, 232(2), 2016

- Pischinger A., "Matrice e regolazione della matrice", Haug Int., Simf,1996
- Pitera di Cima F, Nicoletti M., "Gemmoterapia - Fondamenti scientifici della moderna Meristemoterapia", Nuova Ipsa, 2018
- Rengling G.; "Magnetic fields and connective tissue regulation", Electromagnetic Biology and Medicine, Vol 20, Issue 2, giugno 2001
- Sandmeyer S., Hansen I.J., Chalker D.L., "Integration specificity of retrotransposons and retrovirus", Annual Review of Genetics, 24, pp. 491-518,1990
- Schleip R., "Fascial plasticity – a new neurobiological explanation", J of Bodywork and movement therapies, gennaio 2003 pp. 11-19 (part 1), aprile 2003 pp. 104-116 (part 2)
- Schultz M.D. et al., " Human body epigenome maps reveal noncanonical DNA methylation variation, Nature, volume 523, pages 212–216, 09 July 2015
- Sender R., Fuchs S., Milo R., "Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body", PLOS Biology, 2016
- Shishido T. et al, in Jpn J Cancer Res, 2003
- Skehel P.A., Armitage B.A. Bartsch D., et al., "Proteins functioning in synaptic transmission at the sensory to motor synapse of Aplysia". Neuropharmacology, 34:1379–1385, 1995
- Smith R.N1., Agharkar A.S., Gonzales E.B., "A review of creatine supplementation in age-related diseases: more than a supplement for athletes", PubMed, 15;3:222, Sep 2014
- Spiering B.A., Kraemer W.J., Vingren J.L., "Elevated endogenous testosterone concentrations potentiate muscle androgen receptor responses to resistance exercise", The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, Volume 114, issues 3–5, Pages195-199, April 2009
- Tremblay M,S., Copeland J.L., Van Helder W., "Effect of training status and exercise mode on endogenous steroid hormones in men", Journal of applied physiology, 2004
- Uhlemann M., Winkler S.M., Fikenzer S. et al, " Circulating microRNA-126 increases after different forms of endurance exercise in healthy adults ", PMID, 2012
- Uribe A., Alam M., Johansson O., Midtvedt T., Theodorsson E.. "Microflora modulates endocrine cells in the gastrointestinal mucosa of the rat", Gastroenterology, 107:1259– 1269,1994
- Van De Putte P., Goosen N., "DNA inversions in phages and bacteria", Trends in Genetics, 8, pp. 457-62, 1992
- Van der Berg F., Cabri J., "Angewandte Phys – Das Bindegewebe des Bewegungsapparates verstehen und beeinflussen", Georg Thieme Verlag, 1999
- Viidik A., "Functional properties of collagenous tissues", Int Rev Connect Tissue Res 6, pp 127-215, 1973

- Volek J.S., Rawson E.S., "Scientific basis and practical aspects of creatine supplementation for athletes", Nutrition; 20(7-8):609-14, 2004
- Wataru A., Hiroyuki I., Keitaro M. et al, " Muscle-enriched microRNA miR-486 decreases in circulation in response to exercise in young men", Physiol. 2013
- Willard F., "Fascial Continuity: Four Fascial Layers of the Body", Fascia Research Congress, Boston, 2007
- Worlitschek M., "Equilibrio acido-base, fondamenti e terapia", Nanded, 2002
- Yvonne C. et al, "Reactive Oxygen species and regulation of MMP-expression, Progress in Inflammation", M.J. Parnham, Verlag, 1999
- Yui S., Fujiwara S., Harada K., Motoike-Hamura M., Sakai M, Matsubara S., Miyazaki K., "Beneficial Effects of Lemon Balm Leaf Extract on In Vitro Glycation of Proteins, Arterial Stiffness, and Skin Elasticity in Healthy Adults", J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo), 63(1), pp 59-68, 2017

Riferimenti integrativi aggiornati

- Alberts B. et al., Molecular Biology of the Cell, Garland Science, 2022.
- Allis C. D. et al., Epigenetics, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2015.
- ENCODE Project Consortium, Expanded encyclopaedias of DNA elements in the human and mouse genomes, Nature, 2020.
- Lodish H. et al., Molecular Cell Biology, W. H. Freeman, 2021.
- Skvortsova K., Iovino N., Bogdanović O., Functions and mechanisms of epigenetic inheritance in animals, Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2018.

L'Autore

Giovanni Chetta

Biochimico, fisiologo e biofisico, ha maturato una formazione multidisciplinare nelle scienze biomediche e ha seguito percorsi di alta specializzazione in fisiologia, nutrizione, nutraceutica, fitoterapia e biomeccanica.

Ha sviluppato il proprio percorso professionale in ambito medico, collaborando con specialisti e altri professionisti sanitari. Da questa esperienza nasce un metodo di lavoro che unisce il rigore delle scienze di base alle esigenze della pratica clinica e interpreta in modo integrato i meccanismi fisiologici e fisiopatologici dell'organismo umano.

Dal 1988 si dedica allo studio del metabolismo, dell'infiammazione cronica, della bioenergetica cellulare e delle interazioni tra i sistemi che mantengono l'omeostasi.



La sua attività integra le conoscenze della fisiologia classica con le più recenti evidenze della ricerca scientifica e considera terapia farmacologica, alimentazione, attività fisica e interventi sul terreno biologico come strumenti complementari.

Copyright e note legali

Versione 1.0 – Settembre 2026

© 2026 Giovanni Chetta. Tutti i diritti riservati.

È vietata la riproduzione, anche parziale, del presente volume senza preventiva autorizzazione scritta dell'Autore, salvo quanto previsto dalla normativa vigente in materia di diritto d'autore.

Le informazioni contenute nel volume hanno finalità esclusivamente divulgative ed educative e non sostituiscono il parere del medico o di altri professionisti sanitari qualificati. Ogni decisione diagnostica o terapeutica deve essere presa nell'ambito di una valutazione clinica individuale.