



# UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI MESSINA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE, BIOLOGICHE, FARMACEUTICHE ED  
AMBIENTALI

*CORSO DI DOTTORATO IN BIOLOGIA APPLICATA  
E MEDICINA SPERIMENTALE*

*XXXVII CICLO*

FSE FONDO SOCIALE EUROPEO  
**SICILIA 2020**  
PROGRAMMA OPERATIVO



---

## **Effetti dell'estratto di bacche ad alto contenuto di polifenoli monomeric (HMPBE) sul danno cerebrale secondario acuto e cronico: modulazione dei percorsi Nfkb/Nrf2/Bax**

SSD:

BIOS-06/A

BIOS-07/A

Candidata:

**Dott.ssa Livia Interdonato**

Correlatore:  
**Ch.ma Prof.ssa  
Marika Cordaro**

Relatore:  
**Ch.ma Prof.ssa  
Rosanna Di Paola**

Coordinatore:  
**Ch.ma Prof.ssa Emanuela Esposito**

---

ANNO ACCADEMICO 2023/2024

*Alla mia piÙ grande sostenitrice,  
Nonna Maria*

## Sommario

<b>ABSTRACT</b> .....	- 1 -
<b>ABBREVIAZIONI</b> .....	- 2 -
<b>1. TRAUMA CRANICO O TRAUMATIC BRAIN INJURY (TBI)</b> .....	- 4 -
1.1 Epidemiologia, incidenza e cause .....	- 5 -
1.2 Trattamenti farmacologici.....	- 8 -
1.2.1 N-acetilcisteina.....	- 9 -
1.2.2 Minociclina.....	- 9 -
1.2.3 (-)-Fenserina.....	- 10 -
<b>2. IL MORBO DI PARKINSON (PD)</b> .....	- 11 -
2.1 Epidemiologia, incidenza e cause.....	- 12 -
2.2 Trattamenti farmacologici.....	- 14 -
2.2.1 Farmaci dopaminergici .....	- 15 -
2.2.2 Inibitori delle monoamino ossidasi, inibitori della catecolo O-metiltransferasi e antagonisti del recettore N-metil D-aspartato .....	- 15 -
2.2.3 Anticolinergici per la fase iniziale.....	- 16 -
<b>3. NEUROINFIAMMAZIONE</b> .....	- 17 -
3.1 Fattore nucleare-kappa B (NF-κB).....	- 20 -
3.1.1 NF-κB e TBI .....	- 20 -
3.1.2 NF-κB e PD.....	- 21 -
3.2 La via del fattore nucleare eritroide 2-correlato (Nrf2).....	- 22 -
3.2.1 Nrf2 e TBI.....	- 23 -
3.2.2 Nrf2 e PD .....	- 24 -
3.3 APOPTOSI.....	- 25 -
3.3.1 Apoptosi e TBI.....	- 26 -
3.3.2 Apoptosi e PD .....	- 27 -
<b>4 ESTRATTO DI BACCHE AD ALTO CONTENUTO DI POLIFENOLI MONOMERICI O HIGH MONOMERIC POLYPHENOLS BERRIES EXTRACT (HMPBE)</b> .....	- 29 -
<b>5 SCOPO DELLA TESI</b> .....	- 31 -
<b>6 MATERIALI E METODI</b> .....	- 32 -
6.1 Animali.....	- 32 -
6.2 Gruppi e disegno sperimentale .....	- 32 -

<b>6.3</b>	<b>Analisi comportamentale.....</b>	<b>- 33 -</b>
6.3.1	Test di nuoto forzato o forced swim test (FST).....	- 34 -
6.3.2	Test del campo aperto o open field test (OFT) .....	- 34 -
6.3.3	Test del labirinto a croce elevato o Elevated Plus-Maze test (EPM) .....	- 34 -
6.3.4	Test del labirinto acquatico di Morris o Morris Water Maze test (MWM).....	- 34 -
6.3.5	Test di catalessi (CT).....	- 35 -
6.3.6	Test del Rotarod (RT) .....	- 35 -
6.3.7	Test del palo o pole test (PT) .....	- 35 -
6.3.8	Riconoscimento di oggetti nuovi o novel object recognition test (NOR).....	- 35 -
6.3.9	Test di interazione sociale o social interaction test (SIT) .....	- 36 -
<b>6.4</b>	<b>Analisi istologica del danno cerebrale.....</b>	<b>- 36 -</b>
<b>6.5</b>	<b>Analisi Western Blot degli estratti citosolici e nucleari .....</b>	<b>- 36 -</b>
<b>6.6</b>	<b>Misurazione delle citochine .....</b>	<b>- 38 -</b>
<b>6.7</b>	<b>Localizzazione immunistoichimica del TH.....</b>	<b>- 38 -</b>
<b>6.8</b>	<b>Immunofluorescenza di Ikb-<math>\alpha</math> e Nrf-2 .....</b>	<b>- 38 -</b>
<b>6.9</b>	<b>Misurazione della malondialdeide .....</b>	<b>- 39 -</b>
<b>6.10</b>	<b>Stress ossidativo e difesa antiossidante .....</b>	<b>- 39 -</b>
<b>6.11</b>	<b>Reagenti e standard.....</b>	<b>- 39 -</b>
<b>6.12</b>	<b>Estrazione del campione e analisi cromatografica .....</b>	<b>- 39 -</b>
<b>6.13</b>	<b>Condizioni MS e convalida del metodo .....</b>	<b>- 40 -</b>
<b>6.14</b>	<b>Materiali.....</b>	<b>- 40 -</b>
<b>6.15</b>	<b>Valutazione statistica .....</b>	<b>- 41 -</b>
<b>7</b>	<b><i>RISULTATI</i>.....</b>	<b>- 42 -</b>
<b>7.1</b>	<b>Analisi comportamentale della somministrazione a lungo termine di HMPBE. -</b>	<b>- 42 -</b>
<b>7.2</b>	<b>Effetti dell'HMPBE sull'apprendimento spaziale, sulla funzione di memoria e sulle alterazioni dell'attività locomotoria indotte dalla TBI. ....</b>	<b>- 43 -</b>
<b>7.3</b>	<b>L'HMPBE limita le alterazioni istologiche indotte dal TBI .....</b>	<b>- 45 -</b>
<b>7.4</b>	<b>Effetti della somministrazione di HMPBE sulle vie infiammatorie e antiossidanti ..</b>	<b>- 46 -</b>
<b>7.5</b>	<b>Effetti dell'HMPBE su apoptosi, perossidazione lipidica e rilascio di citochine .....</b>	<b>- 48 -</b>

<b>7.6 Effetti della somministrazione di HMPBE sulle alterazioni comportamentali a lungo termine e sui danni istologici indotti dal TBI .....</b>	<b>- 49 -</b>
<b>7.7 La somministrazione di HMPBE ha ridotto l'attivazione delle vie Nf-kb. ....</b>	<b>- 51 -</b>
<b>7.8 Influenza dell'HMPBE sullo stress ossidativo dopo TBI cronico .....</b>	<b>- 53 -</b>
<b>7.9 Impatto della somministrazione di HMPBE sui cambiamenti dei markers del PD durante TBI cronico .....</b>	<b>- 55 -</b>
<b>8. DISCUSSIONE .....</b>	<b>- 56 -</b>
<b>9. CONCLUSIONI .....</b>	<b>- 59 -</b>
<b>10. Prospettive future.....</b>	<b>- 59 -</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>/</b>

## ABSTRACT

L'estratto di bacche ad alto contenuto di polifenoli monomerici (High Monomeric Polyphenols Berries Extract o HMPBE) è una formula altamente ricca di polifenoli, la cui efficacia nell'apprendimento e nella memoria è stata clinicamente dimostrata. Attualmente viene utilizzato per migliorare le prestazioni cognitive, tra cui la precisione, la memoria di lavoro e la concentrazione. In questo studio abbiamo valutato per la prima volta gli effetti benefici dell'HMPBE in un modello murino di lesione cerebrale traumatica acuta e cronica (traumatic brain injury o TBI) con un modello consolidato di impatto corticale controllato (controlled cortical impact o CCI). L'HMPBE, alla dose di 15 mg/kg, è stato in grado di ridurre le alterazioni istologiche, l'infiammazione e la perossidazione lipidica. L'HMPBE ha avuto effetti positivi sul TBI, modulando la via Nrf-2, riducendo la traslocazione nucleare di NF- $\kappa$ B e l'apoptosi e migliorando le alterazioni comportamentali come ansia e depressione. Inoltre, nel modello cronico di TBI, la somministrazione di HMPBE ha ripristinato il declino della tirosina idrossilasi (tyrosine hydroxylase o TH), del trasportatore della dopamina (dopamine transporter o DAT) e l'accumulo di  $\alpha$ -sinucleina nella regione del mesencefalo. Questo risultato accomuna l'effetto benefico della somministrazione di HMPBE con l'insorgenza del parkinsonismo correlato al danno cerebrale traumatico. Questi dati possono dare inizio a nuovi studi per lo sviluppo di strategie di supporto per limitare la neuroinfiammazione del TBI acuto e cronico.

## **ABBREVIAZIONI**

HMPBE: estratto di bacche ad alto contenuto di polifenoli monomerici

TBI: lesioni cerebrali traumatiche

mTBI: TBI lieve

BBB: barriera ematoencefalica

CCI: impatto corticale controllato

TH: tirosina idrossilasi

DAT: trasportatore dopamina

ROS: specie reattive dell'ossigeno

TNF- $\alpha$ : fattore di necrosi tumorale alfa

COOX-2: ciclossigenasi-2

NF- $\kappa$ B: fattore nucleare-kappa B

TRAF-6: fattore 6 associato al recettore del fattore di necrosi tumorale

TLR-4: recettore Toll-like 4

Keap1: proteina 1 associata a ECH simile a Kelch

$\alpha$ -syn: alfa sinucleina

SOD: superossido dismutasi

HO-1: eme ossigenasi-1

GSH: glutatione

CAT: catalasi

NAC: N-acetilcisteina

MINO: minociclina

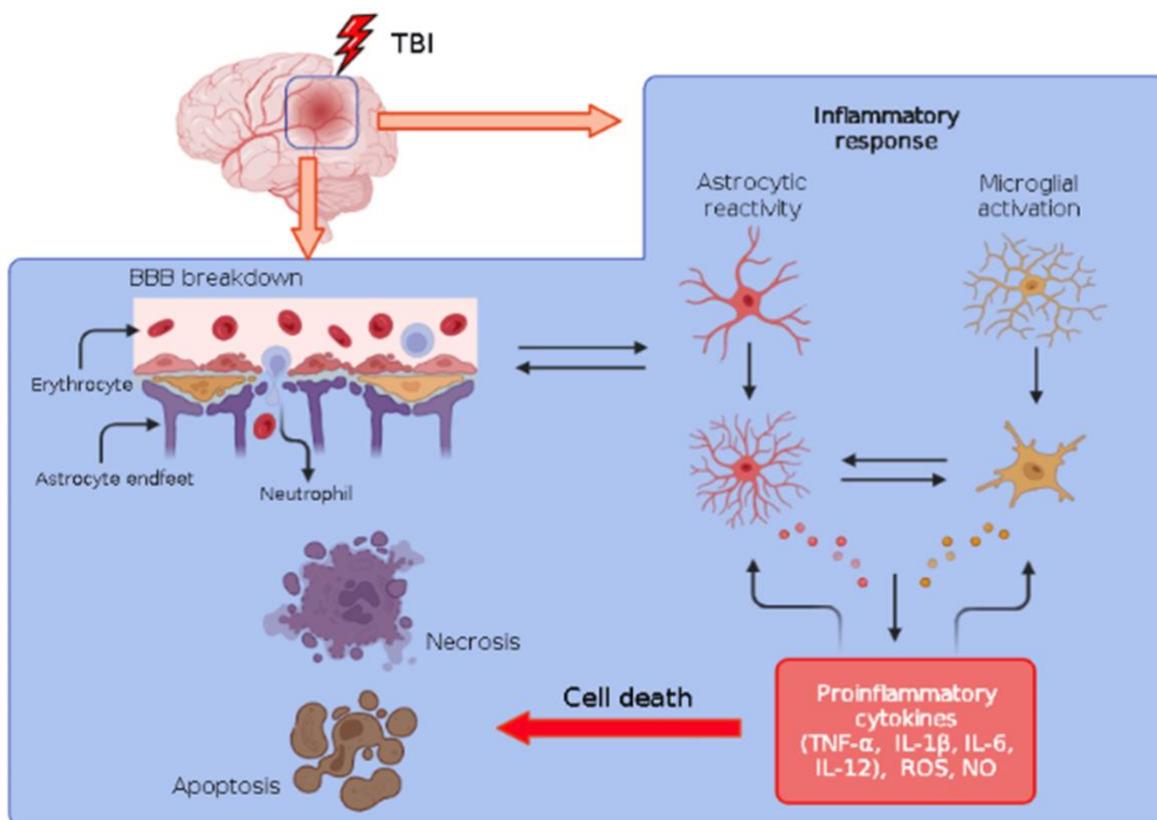
IMAO: inibitori delle monoamino ossidasi

COMT: catecol-O-metiltransferasi

## **1. TRAUMA CRANICO O TRAUMATIC BRAIN INJURY (TBI)**

Il cervello è senza dubbio la struttura più complessa dell'organismo umano. La sua organizzazione è caratterizzata da una miriade di cellule con caratteristiche morfofisiologiche distinte che stabiliscono un'intricata rete di connessioni che originano e modulano tutti i comportamenti dell'individuo. Tuttavia, nonostante le informazioni sempre più numerose su quest'organo, molto resta ancora da determinare, soprattutto per quanto riguarda le risposte dei tessuti e delle cellule in seguito a disturbi di qualsiasi natura, meccanici (traumatici), chimici o fisiologici. Il trauma cranico è un danno non degenerativo e non congenito al cervello causato da una forza meccanica esterna, che può portare a un deterioramento permanente o temporaneo delle funzioni cognitive, fisiche e psicosociali, con uno stato di coscienza ridotto o alterato associato, verificato a causa di un impatto diretto o di un colpo alla testa, provocato da vari fattori, tra cui veicoli a motore, schiacciamenti e aggressioni. [1]. La lesione primaria è il risultato di un impatto meccanico diretto che comporta deficit strutturali e porta a diffusa lacerazione, strappo o stiramento degli assoni, definita lesione assonale, oltre a contusioni, emorragie. Una caratteristica cruciale del TBI è la fase acuta, in cui si verifica un immediato e intrattabile rilascio eccessivo di neurotrasmettitori eccitatori che deriva dallo stiramento e dalla lacerazione del tessuto cerebrale (Figura 1). Tutto ciò culmina nell'apoptosi e nella necrosi e nella morte cellulare. Il danno secondario, che inizia pochi minuti dopo l'infortunio, è un processo complesso ritardato che porta a cambiamenti neuropatologici cronici, tra cui perturbazioni metaboliche, neuroinfiammazione, stress ossidativo, lesioni assonali diffuse, cambiamenti neurovascolari e potrebbe infine comportare un processo neurodegenerativo, a seconda della gravità della lesione [2-4]. Le lesioni cerebrali secondarie possono derivare da vari meccanismi, tra cui ischemia, eccitotossicità, infiammazione e disfunzione mitocondriale sia nei modelli animali che nell'uomo. Questi processi possono causare una miriade di eventi dannosi, come l'edema cerebrale, l'interruzione della BBB, l'aumento della pressione intracranica, la disfunzione metabolica, l'eccitotossicità, l'apoptosi ossidativa e cellulare o la necrosi, portando infine a disfunzioni neurologiche [5, 6]. Il TBI aumenta anche il rischio di alcune condizioni neurodegenerative. Ad esempio, il TBI ripetuto e concussivo è stato associato allo sviluppo di encefalopatia traumatica cronica negli atleti. Inoltre, sia il TBI ripetuto che quello singolo mostrano una forte associazione con un rischio aumentato di malattia di Alzheimer o un esordio precoce della malattia. Sono state segnalate anche correlazioni con il PD e la sclerosi

laterale amiotrofica, ma le prove a supporto non sono così forti come per l' encefalopatia traumatica cronica e la malattia di Alzheimer [7].



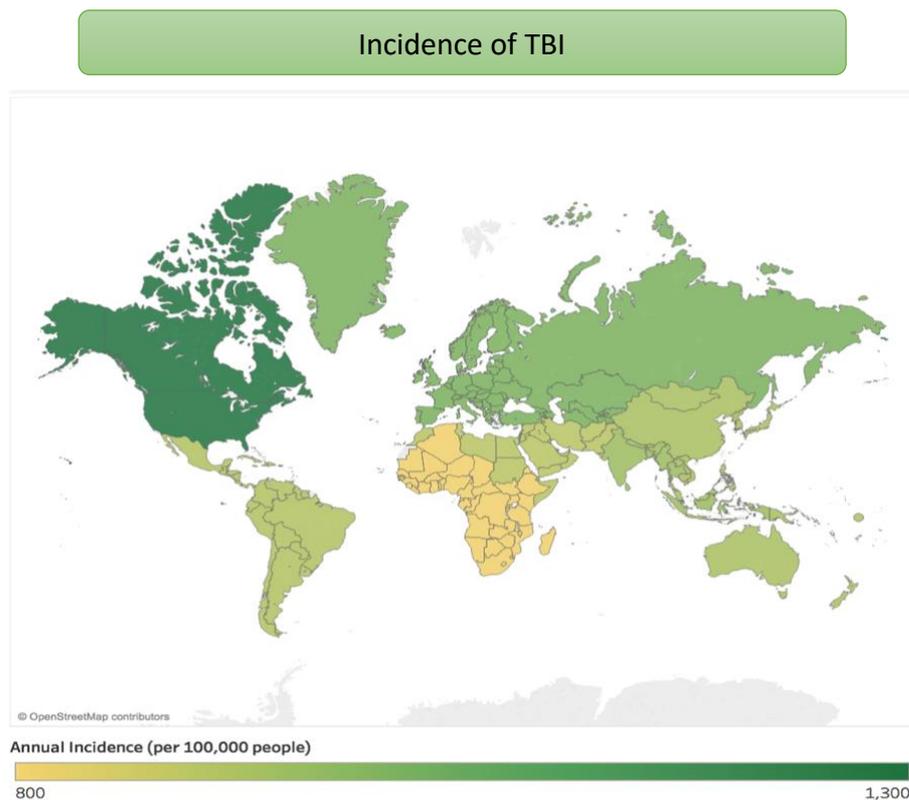
**Figura 1:** Fisiopatologia del TBI (<https://doi.org/10.3390/biology12081139>)

## 1.1 Epidemiologia, incidenza e cause

Il TBI è un problema di salute pubblica globale e una delle principali cause di morte e disabilità, con una stima di 64-74 milioni di persone che subiscono un TBI ogni anno (Figura 2). Solo negli Stati Uniti si registrano ogni anno circa 1.600.000-3.800.000 commozioni cerebrali/ TBI lievi [8]. Il TBI è tradizionalmente identificato come lieve, moderato o grave al momento della lesione da una misura chiamata Glasgow Coma Scale (GCS). Sebbene la maggior parte della letteratura sugli esiti e gli effetti a lungo termine del TBI si concentri sui casi moderati-gravi, il TBI lieve o mild Traumatic Brain Injury (mTBI) è quello con il più alto tasso di visite al pronto soccorso. In particolare, i termini "mTBI", "commozione cerebrale" e "trauma cranico minore" sono spesso usati in modo intercambiabile. A livello internazionale, la maggior parte dei TBI (75-90% dei casi segnalati secondo la GCS) tende a essere lieve [9]. A livello globale, i casi totali sono probabilmente sottostimati, dato che

molti mTBI non vengono rilevati, trattati e registrati a causa della mancanza di un registro nazionale del TBI che possa essere utilizzato per ottenere dati completi sul TBI. Sebbene la prevalenza nell'arco della vita del mTBI sia difficile da valutare, il tasso di incidenza globale è stimato in 100-749 casi per 100.000 persone, ovvero ~55,9 milioni di persone [10]. Negli Stati Uniti, si stima che nel 2014 siano stati registrati 2,87 milioni di accessi al pronto soccorso per TBI (~2,5 milioni di accessi al pronto soccorso per TBI, di cui ~1% per mTBI, 288.000 ospedalizzazioni per TBI e 56.000 decessi per TBI); ~43% di questi andranno incontro a disabilità a lungo termine [11]. Al TBI sono attribuiti diverse cause, tra cui le cadute, i veicoli a motore o altri tipi di lesioni stradali, le lesioni legate allo sport e la violenza fisica interpersonale o la violenza con altri mezzi (ad esempio, le lesioni da esplosione). Queste cause variano in base alla regione geografica, ai fattori socioeconomici, all'età e al sesso. Infatti, la stratificazione per regione geografica può evidenziare chiare differenze nel tipo di lesione e nell'onere complessivo della malattia [12]. Ad esempio, l'incidenza delle TBI - di tutte le gravità - è più alta negli Stati Uniti e in Canada, ma le regioni del Sud-Est asiatico e del Pacifico occidentale registrano il maggior carico complessivo di malattia. I Paesi a basso e medio reddito registrano in proporzione quasi 3 volte più casi di TBI rispetto ai Paesi ad alto reddito; ciò è attribuito a una maggiore prevalenza di fattori di rischio per le cause di TBI (ad esempio, incidenti automobilistici) e a differenze nei sistemi sanitari che consentono ai pazienti di rivolgersi alle cure mediche e di affrontare gli effetti sulla salute associati. Per quanto riguarda l'età, il TBI mostra una distribuzione bimodale con l'incidenza più alta nelle fasce di età più giovani e più anziane. Queste fasce d'età sono probabilmente più soggette a TBI a causa dell'aumento del rischio di varie cause di lesioni, come le cadute nei bambini di età inferiore ai 4 anni (839 per 100.000) e le cadute negli anziani di età superiore ai 75 anni (599 per 100.000), nonché gli incidenti automobilistici negli adulti di età compresa tra 15 e 24 anni (236 per 100.000). [13]. Il TBI lieve costituisce il 10-15% di tutti gli infortuni legati allo sport in tutte le fasce d'età; ~283.000 bambini si rivolgono ogni anno a un Pronto Soccorso a causa di una TBI legata allo sport, con i tassi più alti tra i maschi e i bambini tra i 10 e i 17 anni. Sebbene le lesioni da attività non sportive si verificano in tutto l'arco della vita dei bambini, quelle legate allo sport aumentano intorno ai 6 anni e raggiungono il picco durante l'adolescenza, un periodo in cui i bambini si impegnano più frequentemente in sport organizzati. I maschi rappresentano una percentuale significativamente maggiore di tutte le TBI rispetto alle femmine, con tassi di incidenza annuali di 388 per 100.000 maschi contro 195 per 100.000 femmine a tutte le età. Mentre i maschi hanno un'incidenza maggiore di commozione cerebrale in alcuni sport di contatto,

come il calcio, le femmine hanno un tasso più elevato in sport comparabili per sesso, come il calcio [14-16]. L'incidenza di TBI è più elevata nelle forze armate rispetto alla popolazione civile. Ciò è attribuibile, in parte, alle attività operative e di addestramento fisicamente impegnative e potenzialmente pericolose e al rischio associato di esposizione a esplosioni da ordigni esplosivi improvvisati, attentatori suicidi, mine terrestri, colpi di mortaio e granate a propulsione di razzi [17]. L'incidenza è più alta per i militari dell'Esercito rispetto a quelli della Marina, dei Marines e dell'Aeronautica e più alta per quelli in servizio attivo rispetto a quelli non in servizio attivo. Dal 2000 al terzo trimestre del 2019, oltre 413.000 militari statunitensi in tutto il mondo hanno ricevuto una diagnosi di TBI; l'83% dei casi è stato considerato lieve, il 10% moderato e l'1% penetrante o grave. Analogamente alle popolazioni civili, le donne nelle forze armate sperimentano TBI a un tasso inferiore, ma riportano più sintomi neurocomportamentali dopo mTBI rispetto alle loro controparti maschili, probabilmente, in parte, perché spesso sperimentano TBI secondarie a violenza interpersonale o a traumi sessuali militari, ma anche perché hanno più probabilità di essere sottoposte a screening per TBI rispetto ai maschi [18-20]. Le principali cause di ricoveri ospedalieri correlati a TBI sono state cadute, incidenti stradali e aggressioni. Per i decessi correlati a TBI, le principali cause sono state incidenti stradali, suicidi e cadute. La percentuale di TBI che si verificano durante attività sportive e ricreative non è determinata a causa delle limitazioni della fonte dei dati. Tuttavia, secondo il National Electronic Injury Surveillance System – All Injury Program, nel periodo 2001- le attività associate al maggior numero stimato di visite al pronto soccorso correlate a TBI sono state ciclismo, football, attività di gioco, basket e calcio tra le persone di età inferiore ai 19 anni [21].



**Figura 2:** Incidenza mondiale annuale del TBI. (DOI: 10.3171/2017.10. JNS17352).

## 1.2 Trattamenti farmacologici

I casi di TBI sono comunemente classificati come: lievi (svegli e orientati); moderati (significativamente confusi ma in grado di seguire i comandi). La maggior parte dei casi è di gravità lieve, consentendo l'opportunità di riprendersi dai sintomi iniziali. Tuttavia, nonostante la ripresa iniziale, i pazienti rimangono a rischio di sviluppare disturbi neurodegenerativi secondari tardivi come il morbo di Alzheimer (AD) (ad esempio, perdita di memoria) e il PD (ad esempio, tremore e andatura trascinata). I farmaci utilizzati nel trattamento del TBI possono agire per proteggere le aree cerebrali a maggior rischio in fase acuta e tardiva. I meccanismi di lesione conseguenti all'impatto corticale coinvolgono percorsi neuroinfiammatori, morte cellulare apoptotica e tossicità glutammica. La natura multiforme e indefinita del TBI rende difficile, dispendioso in termini di tempo e costoso sviluppare nuove strategie di trattamento. Il riutilizzo dei farmaci può fornire una via rapida verso lo sviluppo di terapie efficaci per il TBI. Diversi farmaci in fase di studio includono N-acetilcisteina (NAC), minociclina (MINO), (-)-fenserina, [22, 23].

### **1.2.1 N-acetilcisteina**

È stato dimostrato che la N-acetilcisteina ha effetti neuroprotettivi significativi in vari modelli animali, in particolare nel migliorare gli effetti del danno neuronale secondario come risultato di TBI. Modelli sperimentali di ratti hanno confermato le proprietà antiossidanti benefiche della NAC quando utilizzata per trattare il danno cerebrale. La NAC agisce regolando positivamente il livello di GSH, una combinazione di acido L-glutammico, L-cisteina e glicina, all'interno del cervello. La somministrazione di NAC mantiene alti livelli di GSH nel cervello che agisce come uno scavenger di radicali liberi e come antiossidante stesso [24]. La NAC riduce anche la deposizione di tau e beta-amiloide e agisce come agente antinfiammatorio nel trattamento dell'AD tramite la regolazione positiva del GSH, dimostrando la sua efficacia non solo nel trattamento del trauma cranico stesso, ma anche delle successive condizioni neurodegenerative associate al trauma cranico nei modelli di ratto e topo [25]. È stato utilizzato uno studio clinico in doppio cieco controllato con placebo sull'uomo per valutare l'efficacia della NAC nei pazienti con TBI lieve indotto da esplosione. Il gruppo di trattamento ha ricevuto 2 g di NAC due volte al giorno per i primi 4 giorni, seguiti da 1,5 g di NAC due volte al giorno per 3 giorni. Tutti i pazienti sono stati valutati per vertigini, mal di testa, perdita dell'udito, perdita di memoria, disturbi del sonno e disfunzione neurocognitiva dopo 7 giorni di trattamento. Un miglioramento significativo ( $p < 0,01$ ) per quanto riguarda questi sintomi è stato osservato 7 giorni dopo il trattamento in coloro che hanno ricevuto NAC entro 24 ore dalla lesione. Inoltre, il gruppo di trattamento aveva l'86% di possibilità di recupero. I risultati di questo studio giustificano ulteriori indagini sui risultati a lungo termine del trattamento con NAC nel TBI [26].

### **1.2.2 Minociclina**

È stato dimostrato che la minociclina (MINO), un antibiotico tetraciclinico, offre proprietà neuroprotettive da sola e in combinazione con NAC e NACA. I modelli di ratto hanno supportato l'efficacia di MINO nel trattamento del danno neurologico derivante da TBI. In un modello di impatto corticale controllato lieve, MINO + NAC hanno migliorato la memoria e la cognizione nei ratti e riparato i danni alla sostanza bianca proteggendo gli oligodendrociti. In un modello di CCI di TBI, è stata osservata anche la perdita di oligodendrociti. MINO + NAC hanno fornito protezione contro l'apoptosi degli oligodendrociti durante i giorni 2-14 quando dosati a 12 ore dopo il TBI. MINO da solo non ha protetto contro il danno iniziale degli oligodendrociti quando dosato 12 ore dopo il TBI; tuttavia, è stato osservato un recupero completo il giorno 14, suggerendo che MINO da solo

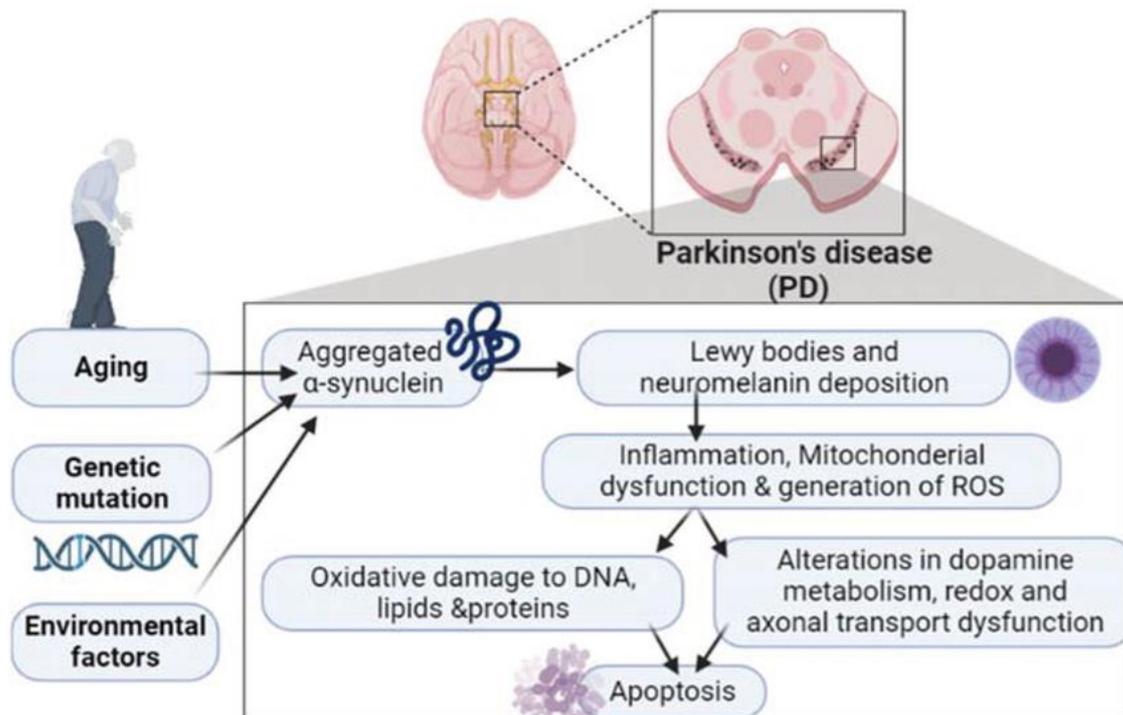
opera tramite un meccanismo diverso da MINO + NAC [27, 28]. MINO da solo agisce inibendo temporaneamente l'attivazione microgliale e riducendo l'attività locomotoria indotta da TBI, portando a risultati migliori a lungo termine post-TBI. Nonostante MINO abbia dimostrato di essere sicuro nel trattamento del TBI negli studi di fase 1, uno studio sull'uomo su 15 pazienti con più di 6 mesi di TBI moderato/grave, che hanno ricevuto 100 mg di MINO due volte al giorno, ha indicato l'inibizione dell'attivazione microgliale cronica che può avere effetti riparativi ma che alla fine ha portato a una maggiore neurodegenerazione indicata da livelli aumentati di catena leggera dei neurofilamenti plasmatici. Sebbene MINO da solo possa non essere efficace nel trattamento del TBI, potrebbero essere giustificati studi sull'uomo che coinvolgano MINO e NAC insieme [29, 30].

### **1.2.3 (-)-Fenserina**

La fenserina (PHEN) è un agente anti-acetilcolinesterasi con proprietà non colinergiche aggiuntive, originariamente sviluppato per trattare l'AD. Tuttavia, la PHEN ha il potenziale per essere riutilizzata per trattare il TBI. È stato dimostrato che l'attività anti-acetilcolinesterasi della PHEN riduce la neuroinfiammazione, allevia la deposizione di amiloide e previene l'apoptosi, oltre ad attenuare molteplici meccanismi diversi di danno secondario [31]. Uno studio di Lecca et al. ha esaminato gli effetti di PHEN (5 mg/kg) nell'attenuazione dell'apoptosi e della neuroinfiammazione sia nei topi AD di tipo selvatico (WT) che in quelli che esprimono la proteina precursore dell'amiloide (APP)/presenilina 1 (PSEN1) (topi APP/PS1) quando esposti a TBI lieve (mTBI). PHEN è risultato ben tollerato nei topi esposti. L'esposizione a mTBI ha determinato un aumento delle dimensioni dei corpi cellulari microgliali e una maggiore produzione di IB1A1 e TNF- $\alpha$ . PHEN ha ridotto l'infiammazione diminuendo la produzione di IB1A1 e TNF- $\alpha$  nelle cellule microgliali in modo dose-dipendente dopo l'esposizione a mTBI sia nei topi WT che APP/PS1. Questa azione antinfiammatoria è stata osservata sia nelle aree ippocampali che corticali nei topi WT e APP/PS1 [32]. Dati simili sono stati osservati anche in seguito a lesione da impatto corticale controllata in TBI moderata. Oltre a trattare la morte cellulare, PHEN ha anche avuto effetti positivi sulla riduzione della pressione intracranica, misurata con le dimensioni del ventricolo laterale e il volume della contusione. Il trattamento di 2,5 mg/kg due volte al giorno per 5 giorni dopo la lesione da impatto corticale controllata nei topi ha ridotto sia il volume della contusione che la pressione intracranica [31].

## 2. IL MORBO DI PARKINSON (PD)

Il PD è una patologia neurodegenerativa progressiva caratterizzata dalla perdita di neuroni dopaminergici nella substantia nigra e dalla presenza di inclusioni proteiche denominate corpi di Lewy. In precedenza, la malattia era considerata in gran parte un disturbo del movimento, classicamente caratterizzato da una tetradе di deficit motori, tra cui tremore a riposo, instabilità posturale e rigidità del collo, del tronco e degli arti. Tuttavia, il PD è ora considerato un disturbo multisistemico con una notevole neuroinfiammazione e disfunzione immunitaria che è stata implicata nello sviluppo di vari sintomi non motori, come il sonno e la disfunzione gastrointestinale, che possono precedere di decenni la diagnosi della malattia [33, 34]. Il PD è caratterizzato da una serie di sintomi motori, tra cui tremori, bradicinesia, rigidità e instabilità posturale. Inoltre, sono prevalenti anche sintomi non motori, come il deterioramento cognitivo, la depressione e i disturbi del sonno [35]. Il Parkinson è un' $\alpha$ -sinucleinopatia multisistemica che porta alla morte dei neuroni dopaminergici nel mesencefalo. Oltre all'età avanzata, che è un noto fattore di rischio della malattia, anche i fattori ambientali e le carenze genetiche contribuiscono alla degenerazione dei neuroni dopaminergici (Figura 3). Negli ultimi due decenni, l'infiammazione nel PD ha ricevuto grande interesse da parte di molti ricercatori, evidenziando l'attivazione microgliale, la produzione di citochine e il danno ossidativo nel modello in vivo e post-mortem. Pertanto, la neuroinfiammazione rappresenta un ruolo chiave nella progressiva degenerazione dei neuroni dopaminergici e nella patogenesi della malattia [36]. La sua presenza è dimostrata dalla scoperta di alti livelli di alcune citochine proinfiammatorie, come l'IL-1 $\beta$ , il TNF- $\alpha$  e molte altre, nei campioni del parenchima cerebrale e del liquido cerebrospinale dei pazienti affetti da PD rispetto ai campioni di controllo. Inoltre, diverse ricerche hanno dimostrato che i neuroni dopaminergici sono particolarmente sensibili ai ROS a causa della loro ridotta capacità antiossidante e dell'aumento degli accumuli di ferro. Negli ultimi anni sono stati fatti molti progressi per quanto riguarda i meccanismi che portano alla disfunzione e alla perdita di cellule nel PD [37, 38].



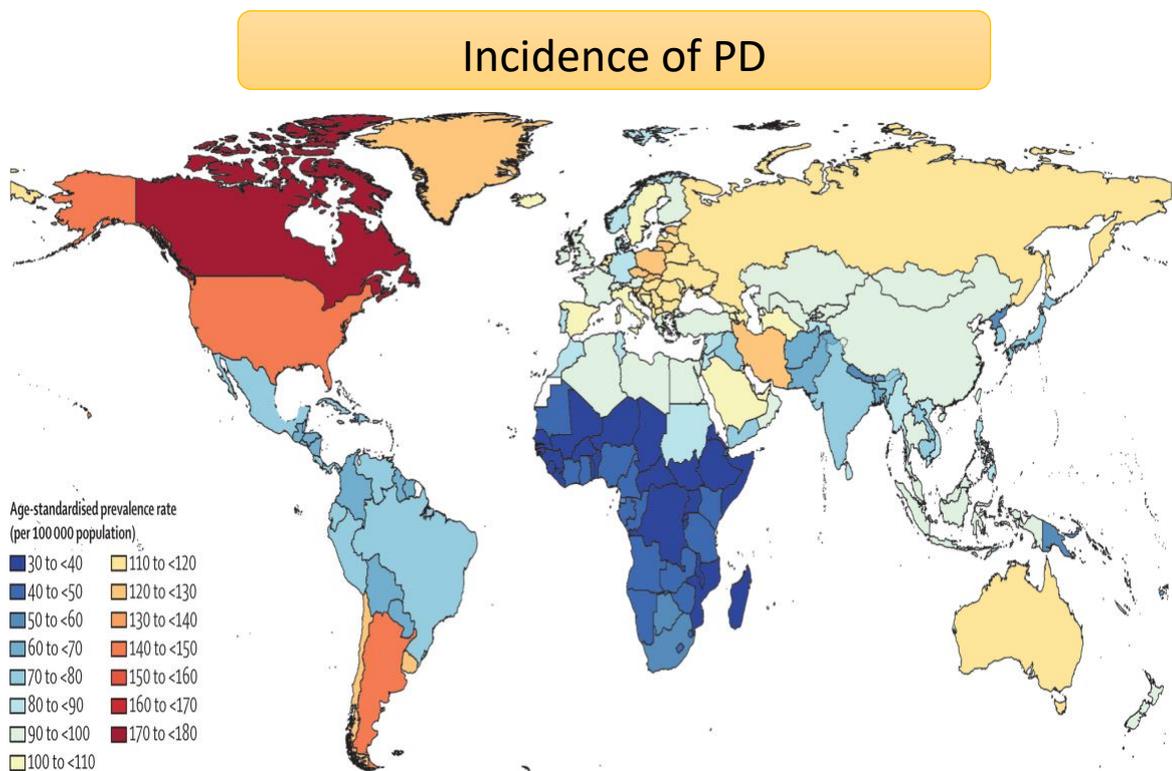
**Figura 3:** Fisiopatologia del PD (DOI: 10.1002/prp2.1063)

## 2.1 Epidemiologia, incidenza e cause

La causa del PD rimane attualmente sconosciuta. Sono stati condotti numerosi studi epidemiologici in tutto il mondo per accertare il peso della malattia e i possibili fattori di rischio. Tremore a riposo, bradicinesia, rigidità muscolare e instabilità delle posture: i sintomi cardine del PD sono indicati collettivamente come "parkinsonismo", spesso usato anche come termine generale per quei disturbi neurologici che comportano problemi di movimento. Oltre a essere considerate le caratteristiche più comuni, il parkinsonismo si presenta anche con demenza, declino cognitivo e allucinazioni nel corso delle diverse fasi della malattia [39]. Nella popolazione generale, alcuni fattori di rischio modificabili, tra cui l'ipertensione, il diabete, l'obesità e l'ipercolesterolemia, sono stati associati al deterioramento cognitivo e alla demenza [40]. La prevalenza complessiva del PD sembra essere più bassa negli studi orientali rispetto a quelli occidentali. Ciò potrebbe essere dovuto a una combinazione di fattori genetici e ambientali, oltre che a differenze metodologiche. In una meta-analisi di 19 studi asiatici dal 1965 al 2008, il tasso di prevalenza (standardizzato per età alla popolazione dell'OMS del 2000) è stato di 51,3-176,9/100.000 nelle indagini porta a porta, escludendo uno studio più vecchio con una bassa prevalenza di 16,7/10.000. Gli studi basati su registri hanno mostrato un tasso di prevalenza inferiore (35,8-68,3/100.000). Una recente meta-analisi di 15 studi asiatici sui cinesi (10 in Cina, due a

Hong Kong, tre a Taiwan) ha mostrato un tasso di prevalenza di 16-440,3/100.000 (età standardizzata alla popolazione OMS del 2000) [41]. Il tasso di incidenza annuale grezzo complessivo è stato di 12,3 per 100.000, mentre per le persone di età superiore a 50 anni l'incidenza grezza è stata di 44,0 per 100.000. Complessivamente, il tasso di incidenza corretto per età e sesso è stato di 13,4 per 100.000 (intervallo di confidenza del 95%: 11,4, 15,5). Il tasso di incidenza aggiustato per età per gli uomini è stato di 19,0 per 100.000 (95% CI: 16,1, 21,8) e per le donne di 9,9 per 100.000 (95% CI: 7,6, 12,2) (rapporto maschi/femmine = 1,9) [42] (Figura 4). Per comprendere meglio la patogenesi del PD è importante considerare possibili fattori contributivi inerenti al processo di invecchiamento, poiché i cambiamenti legati all'età in diversi sistemi fisiologici (forse verificatisi in particolari ambienti) sembrano influenzare l'insorgenza e la progressione di disturbi neurodegenerativi. Di conseguenza, ipotizziamo che un meccanismo principale alla base del PD sia l'inflammaging, ossia il processo infiammatorio cronico caratterizzato da uno squilibrio di meccanismi pro- e anti-infiammatori che è stato riconosciuto come operativo in diverse malattie legate all'età e in particolare neurodegenerative [43]. Esistono molteplici fattori ambientali che influenzano il rischio di PD, tra cui veleni mitocondriali come MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina) [44], esposizione a pesticidi [45], lesioni cerebrali traumatiche [46] e invecchiamento [47]. Oltre ai fattori ambientali, anche le varianti genetiche possono influenzare il rischio di PD. Queste varianti vanno da alleli comuni con bassa penetranza ad alleli più rari altamente penetranti che aumentano notevolmente il rischio o causano forme autosomiche dominanti della malattia [48]. I fattori di rischio comuni per il PD sono le mutazioni nel gene della glucocerebrosidasi (GBA), un gene che codifica per l'enzima lisosomiale. Durante uno studio clinico su pazienti con malattia di Gaucher, una rara malattia da accumulo lisosomiale, è stato identificato questo fattore di rischio. È stato scoperto che le mutazioni nel gene GBA sono più evidenti rispetto a qualsiasi altro gene implicato, tra cui la dardarina, l' $\alpha$ -sinucleina e la parkina, nella maggior parte della popolazione con PD [49]. Sebbene il TBI sia considerato un fattore di rischio per diverse malattie neurodegenerative come il morbo di Alzheimer, la sclerosi laterale amiotrofica e il PD, le prove più evidenti di casi di TBI sono state collegate allo sviluppo del PD. Uno studio fondamentale condotto da Gardner et al. nel 2018 su veterani militari ha riportato un aumento del rischio di sviluppare PD del 56% per le TBI lievi e per quelle da moderate a gravi dell'83% [50]. Un recente studio di Morissette et al. ha riportato che una singola commozione cerebrale aumenta il rischio di sviluppare la PD del 57% [51]. Il trauma cranico commotivo che causa un TBI lieve può colpire anche i pugili e gli atleti, come i giocatori di calcio, i cui

sintomi neurologici e problemi comportamentali possono progredire significativamente nel tempo [52, 53]. I dati neuropatologici aggregati raccolti da diversi studi prospettici hanno dimostrato l'associazione della TBI con lo sviluppo di parkinsonismo, l'accumulo di corpi di Lewy, la fuoriuscita dalla BBB, il danno neuronale e assonale, l'upregulation dell'alfa sinucleina ( $\alpha$ -syn) e l'edema cerebrale [54, 55]. La cascata di lesioni croniche secondarie indotte dalla TBI è stata identificata come il fattore più importante che scatena lo sviluppo di una patologia simile al PD [56].



**Figura 4:** Incidenza mondiale PD (DOI: 10.1016/S1474-4422(18)30295-3)

## 2.2 Trattamenti farmacologici

Sebbene la causa esatta del morbo di Parkinson non sia stata identificata, le scoperte sui trattamenti sono state progressive. Non esiste una cura nota per la malattia, quindi i trattamenti cercano di gestire i sintomi piuttosto che prevenire o rallentare la progressione della malattia. I trattamenti possono variare da farmaci, interventi chirurgici, terapia o una combinazione di trattamenti diversi.

### **2.2.1 Farmaci dopaminergici**

I farmaci dopaminergici sono il metodo di trattamento tipico per i sintomi motori nel PD e la L-DOPA, il farmaco antiparkinsoniano più potente attualmente disponibile, rimane il "gold standard" per la terapia del PD. Poiché la mancanza di dopamina disponibile per la comunicazione nel percorso nigrostratale è alla base di molti sintomi del PD, in particolare quelli basati sul movimento, i farmaci dopaminergici vengono utilizzati per aiutare ad aumentare o imitare i livelli di dopamina. La dopamina non attraversa facilmente la barriera ematoencefalica, ma il suo precursore, la L-DOPA, può. Viene metabolizzato nell'intestino tenue e convertito in dopamina dalla decarbossilasi degli L-amminoacidi aromatici (AADC) e dalla catecol-O-metiltransferasi (COMT), che può quindi essere immagazzinata nei terminali nigrostratali. Al contrario, gli agonisti della dopamina agiscono direttamente sui recettori postsinaptici, mitigando la necessità di produzione di dopamina [57].

### **2.2.2 Inibitori delle monoamino ossidasi, inibitori della catecolo O-metiltransferasi e antagonisti del recettore N-metil D-aspartato**

Gli inibitori delle monoamino ossidasi (IMAO), come rasagilina o selegilina, e gli inibitori delle COMT, come l'entacapone, agiscono inibendo la degradazione della dopamina e della L-DOPA per prolungarne gli effetti. Gli IMAO riducono la quantità di dopamina degradata nella sinapsi. Gli inibitori delle COMT impediscono alle COMT di convertire prematuramente la L-DOPA in dopamina. Riducono la perdita periferica di L-DOPA prima che possa raggiungere il cervello [58]. Il trattamento con inibitori della colinesterasi, come la rivastigmina, può aiutare con il declino cognitivo o allucinazioni/deliri associati a stadi avanzati o avanzati del PD. Anche i presunti antagonisti del recettore N-metil-D-aspartato (NMDA), come l'amantadina e la memantina, sono farmaci assunti come coadiuvanti di altri trattamenti. Bloccano i recettori dell'acetilcolina e NMDA, il che ha due effetti: il primo è che agiscono in sinergia con gli agenti dopaminergici, migliorando il rilascio e il turnover della dopamina nei neuroni striati; il secondo, il PD interrompe le trasmissioni glutammatergiche causando un'iperattivazione dei recettori NMDA, che può causare un peggioramento delle discinesie. Gli agonisti riducono le quantità di segnalazione anomala del glutammato nel nucleo subtalamico. In uno studio, l'amantadina è stata in grado di ridurre

la gravità della discinesia del 60% nel PD in stadio avanzato, se assunta con dosi regolari di L-DOPA [59, 60].

### **2.2.3 Anticolinergici per la fase iniziale**

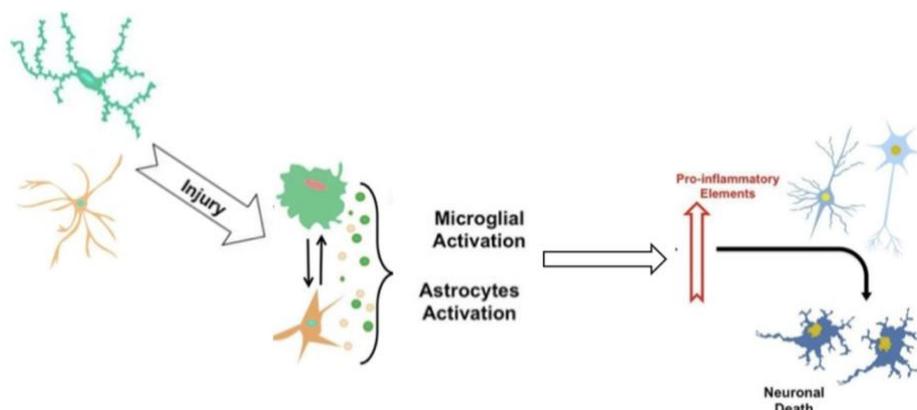
I primi agenti farmacologici utilizzati nella terapia del PD sono stati i farmaci anticolinergici. Riducono l'attività dell'acetilcolina agendo come antagonisti dei recettori della colina, nella speranza di ripristinare l'equilibrio tra i livelli di dopamina e acetilcolina che era stato disturbato dal PD. Questi farmaci sono stati ampiamente sostituiti da L-DOPA e altri agonisti dopaminergici ad azione centrale, ma rimangono ancora disponibili per l'uso nel trattamento del PD. Benzotropina, biperiden, difenidramina, etopropazina, orfenadrina, prociclidina e trihexyphenidyl sono inclusi in questa classe terapeutica di farmaci, sebbene vi siano poche informazioni farmacocinetiche disponibili su di essi a causa delle loro basse concentrazioni plasmatiche di farmaco. In genere, i farmaci anticolinergici hanno un ruolo maggiore nel PD a predominanza di tremore e possono essere una monoterapia nelle fasi iniziali, ma di solito vengono eseguiti in aggiunta a L-DOPA o altri farmaci prescritti [61, 62]

### 3. NEUROINFIAMMAZIONE

L'infiammazione è definita come un meccanismo di difesa cardinale costituito da una serie di risposte fisiologiche umorali e cellulari indotte da disturbi dell'integrità dell'omeostasi tissutale mediati da agenti patogeni, agenti fisici (ustioni, radiazioni, lesioni traumatiche), tossine, alterazioni vascolari, necrosi tissutale e/o reazioni immunologiche. La risposta infiammatoria vede la partecipazione di componenti umorali (citochine, fattori di crescita), cellulari (linfociti, macrofagi, cellule endoteliali vascolari, fibroblasti) e della matrice extracellulare (collagene, elastina, fibronectina) [63, 64]. La neuroinfiammazione può essere indotta da una serie di fattori tra cui l'invecchiamento, l'autoimmunità, l'infezione e le lesioni. L'infiammazione acuta emerge poco dopo la lesione; è caratterizzata principalmente dall'infiltrazione di leucociti e dalla vasodilatazione, mentre l'infiammazione cronica nasce più tardi da una risposta immunitaria più specifica. Tuttavia, in alcune condizioni patologiche, una risposta infiammatoria esacerbata, sia essa acuta o cronica, può aumentare il danno tissutale. In questo scenario, una corretta comprensione dei meccanismi di base della risposta infiammatoria è fondamentale per una migliore caratterizzazione della fisiopatologia specificamente associata al TBI [65]. Diversi mediatori infiammatori, come chemochine, proteasi, citochine e ROS, vengono sintetizzati in seguito al TBI, contribuendo alla diffusione della lesione, con conseguente danno cellulare secondario. Nel sistema nervoso, queste sostanze sono sintetizzate e rilasciate durante il processo infiammatorio da astrociti e microglia, che contribuiscono in modo significativo all'espansione della lesione osservata dopo il trauma primario nei modelli animali, generando un processo di amplificazione della lesione [66]. Gli astrociti, una componente della macroglia, sono direttamente coinvolti nel mantenimento dell'omeostasi del tessuto nervoso regolando i livelli ionici e idrici e contribuendo al mantenimento strutturale della BBB attraverso l'interazione tra le terminazioni astrocitarie e le cellule endoteliali [67]. Inoltre, queste cellule svolgono un ruolo fondamentale nell'assorbimento del glutammato e nella regolazione della segnalazione intracellulare del calcio ( $Ca^{2+}$ ) [68]. In seguito al TBI, gli astrociti si attivano rapidamente, subendo cambiamenti strutturali significativi, con accorciamento dei processi e rigonfiamento del corpo cellulare, assumendo una forma ipertrofica. Nello stato di attivazione, gli astrociti agiscono fagocitando detriti e rilasciando citochine, chemochine e mediatori infiammatori come il fattore di necrosi tumorale alfa ( $TNF-\alpha$ ), la ciclossigenasi-2 (COOX-2) e la MMP-9 per sostenere il processo infiammatorio [69]. La microglia, una classe di cellule residenti del sistema nervoso, svolge un ruolo critico durante la risposta

infiammatoria rilasciando mediatori pro-infiammatori in seguito a insulti nocivi. Le cellule microgliali sono molto sensibili ad una minima perturbazione dell'ambiente extracellulare, rispondendo rapidamente allo stato alterato (Figura 5) [70]. L'attivazione microgliale alla base di un TBI determina un'amplificazione della risposta infiammatoria, poiché induce la sintesi e il rilascio di TNF- $\alpha$  e di interleuchine come IL-1 $\beta$  e IL-6. Il TNF- $\alpha$ , in particolare, ha un ruolo importante durante il processo infiammatorio acuto, in quanto induce l'espressione di IL-1 e IL-6; l'IL-1, a sua volta, induce sia il TNF- $\alpha$  che l'IL-6. Di conseguenza, dopo un TBI, un'iniziale upregulation delle citochine porta all'attrazione di altri mediatori infiammatori verso il nucleo del tessuto lesionato, innescando un loop infiammatorio [71]. IL-1 $\beta$  è un membro della famiglia IL-1 ed è stato associato all'attivazione neurotossica della microglia nella risposta al TBI. In uno studio sul modello di TBI nei topi, la neutralizzazione di IL-1 $\beta$  nel globo pallido ha determinato una riduzione dell'attivazione della microglia, che ha ridotto l'intensità del danno post-lesione da percussione di fluidi. In uno studio clinico condotto su 53 pazienti con TBI grave, i livelli plasmatici di IL-1 $\beta$  misurati nelle prime 24 ore (fase acuta) sono risultati più alti rispetto alle misurazioni effettuate nel periodo di 6 mesi (fasi croniche). Ciò suggerisce che IL-1 $\beta$  può svolgere un ruolo significativo nella comprensione della gravità del danno acuto post-TBI. Nella fase cronica del TBI, i livelli di IL-1 $\beta$  possono essere diminuiti a causa della soppressione del sistema immunitario. Tuttavia, un altro studio clinico ha mostrato una forte correlazione tra i livelli di IL-1 $\beta$  e il danno neuronale cronico a 6 mesi dal TBI [72, 73]. La citochina IL-6 può svolgere un ruolo pro- e/o antinfiammatorio dopo un trauma ed è stata considerata un indicatore/biomarcatore precoce per determinare la gravità della lesione dopo un trauma cranico. Come citochina neuroprotettiva, è stato dimostrato che l'IL-6 protegge dai danni neuronali post-lesione aumentando la proliferazione microgliale nel sito leso [74]. Al contrario, come citochina neurotossica, alti livelli plasmatici di IL-6 dopo un grave trauma cranico hanno dimostrato di essere associati a scarsi risultati clinici a lungo termine, in particolare disfunzione cognitiva. Analogamente, i livelli sierici di IL-6 misurati nei pazienti con trauma cranico grave possono essere associati a insufficienza multiorgano, sepsi e scarsi risultati neurologici. Questi effetti indicano che l'IL-6 extracellulare può indurre edema cerebrale, disfunzione della barriera ematoencefalica e danni neuronali (un'azione pro-infiammatoria), mentre nel sito cerebrale leso può suscitare un'azione antinfiammatoria [75, 76]. Il TNF- $\alpha$  può svolgere un ruolo centrale nell'inizio e nella regolazione della maggior parte della cascata di citochine. È stato dimostrato che il TNF- $\alpha$  è importante per vari meccanismi neuronali, tra cui la neurogenesi, la formazione e la regolazione delle sinapsi,

nonché per l'infiammazione neuronale, dove il TNF- $\alpha$  può mediare la gliosi, la demielinizzazione, la morte cellulare e la rottura della BBB dopo la lesione, suggerendo un duplice ruolo del TNF- $\alpha$ . Nei pazienti maschi adulti con TBI grave, gli aumenti del TNF- $\alpha$ , insieme ad altre citochine pro-infiammatorie (IL-6, IL-10) e alla molecola di adesione intracellulare solubile (sICAM-1), sono stati associati a una prognosi sfavorevole dopo la lesione. Inoltre, l'aumento del TNF- $\alpha$  insieme ai cortisoli rilasciati dall'attivazione del sistema simpatico dopo la lesione può anche promuovere danni neuronali e quindi una prognosi sfavorevole [77, 78]. L'apoptosi può essere innescata da una varietà di elementi tra cui citochine, danno infiammatorio, danno da radicali liberi ed eccitotossicità. Il processo apoptotico dopo TBI viene attivato nei neuroni, negli oligodendrociti, nella microglia e negli astrociti; l'apoptosi nella microglia contribuisce al danno secondario infiammatorio [79]. Meccanismi estrinseci o intrinseci possono innescare l'apoptosi dipendente dalla caspasi. I recettori della superficie cellulare presenti in vari tipi di cellule, in particolare i neuroni, sono coinvolti in percorsi estrinseci. Quando il TNF- $\alpha$  della superficie cellulare interagisce con i recettori extracellulari del TNF o del Fas interagiscono con il ligando esterno del Fas, i recettori diventano trimerizzati, formando insieme con molecole di segnalazione intracellulari. Questo complesso di segnalazione interagisce quindi con la caspasi-8 o la caspasi-10, causandone l'auto-scissione e l'attivazione. Queste caspasi iniziatrici alla fine inducono la scissione e l'attivazione della caspasi-3, causando l'irreversibilità del processo di apoptosi [80]. Il pathway apoptotico intrinseco è innescato da segnali di stress intracellulare che possono includere stress ossidativo, danni al DNA, sovraccarico di  $Ca^{2+}$  citosolico. Il passaggio cruciale per l'apoptosi intrinseca è la permeabilizzazione generalizzata e irreversibile della membrana mitocondriale esterna, che è finemente regolata dall'equilibrio tra membri pro- e anti-apoptotici BAX e Bcl-2 [81].



**Figura 5:** Neuroinfiammazione. (doi: 10.1016/bs.pbr.2020.07.004)

### **3.1 Fattore nucleare-kappa B (NF-κB)**

Una complessa cascata di eventi molecolari e cellulari contribuisce alla neuropatologia e alla disfunzione neurologica osservate in seguito al TBI. Queste vie svolgono ruoli critici nella sopravvivenza cellulare, nell'infiammazione, nello stress ossidativo, nella plasticità neuronale e nella funzione cognitiva. Nei mammiferi, la famiglia del fattore di trascrizione NF-κB è composta da cinque membri denominati p65 (RELA), RELB, REL, NF-κB1 (p105/p50) e NF-κB2 (p100/p52). Tra questi membri, NF-κB1 e NF-κB2 sono sintetizzati come preforme, p105 e p100, che vengono poi elaborate rispettivamente in p50 e p52, due repressori trascrizionali privi del dominio di transattivazione. Tutti e cinque i membri formano omo- o eterodimeri, tra cui p65/p50 è il più comune [82, 83]. Tutti i fattori NF-κB presentano un dominio di omologia Rel (RHD) costituito da 300 amminoacidi nella regione N-terminale, responsabile della dimerizzazione, del legame a regioni specifiche del DNA, della traslocazione nucleare e dell'interazione con le proteine regolatrici IκB. Il complesso multi-subunità IκB chinasi (IKK), contenente due subunità catalitiche IKKα (IKK1) e IKKβ (IKK2) e almeno una subunità regolatrice non catalitica, il modulatore essenziale NF-κB, fosforila gli inibitori IκB, che, a loro volta, vengono poliubiquitinati e successivamente degradati dal proteasoma 26S. Di conseguenza, i complessi p65/p50 vengono rilasciati e sono liberi di traslocare nel nucleo. Normalmente, NF-κB è inattivo in molte cellule. In presenza di alcuni stimoli esterni come fattori virali e batterici, l'attivazione di alcuni recettori cellulari da parte di ligandi, fattori di crescita o altri tipi di stress biochimico, NF-κB viene attivato. L'attivazione di NF-κB è strettamente monitorata a livello di trascrizione, o la sua interazione con inibitori di NF-κB (IκB), ad esempio, IκBa, IκBb, IκBg, IκBe, NF-κB culmina nella trascrizione di chemochine inducibili, recettori immunitari, molecole di adesione cellulare, molecole vasoattive, fattori di crescita e proteine anti-apoptotiche, tutte importanti nella risposta allo stress cellulare. Questi eventi portano alla fase successiva della cascata, che coinvolge la secrezione di citochine pro-infiammatorie, come l'IL-1β, IL-6 e TNF-α [84].

#### **3.1.1 NF-κB e TBI**

Un'importante via di segnalazione implicata nel TBI è la via di NF-κB. NF-κB è un fattore di trascrizione che regola l'espressione di geni coinvolti nell'infiammazione e nella sopravvivenza cellulare, agendo come elemento a valle per la stimolazione di diversi recettori, come il fattore 6 associato al recettore del fattore di necrosi tumorale (TRAF-6) e

il recettore Toll-like 4 (TLR-4) nell'uomo e negli animali che hanno subito TBI; con la sua inibizione riduce la morte cellulare apoptotica e i livelli di infiammazione dopo la lesione. L'attivazione di NF- $\kappa$ B nelle cellule neuronali e gliali è associata all'attività neuroinfiammatoria e alle malattie neurodegenerative, compreso il TBI [85, 86]. Il passaggio cruciale nell'attivazione di NF- $\kappa$ B è la fosforilazione delle proteine I $\kappa$ B da parte del complesso inibitore della chinasi NF- $\kappa$ B (IKK), che determina la loro degradazione proteasomale. Questo processo induce la traslocazione nucleare e la regolazione trascrizionale dei geni bersaglio. Il complesso IKK contiene 2 proteine chinasi, IKK1 (IKK $\alpha$ ) e IKK2 (IKK $\beta$ ), nonché la proteina regolatrice NF- $\kappa$ B essential modulator (IKK $\gamma$ ). IKK2 è la subunità critica della chinasi che induce il percorso di segnalazione canonico, essenzialmente coinvolto nella regolazione dell'infiammazione e della sopravvivenza cellulare. Nel sistema nervoso centrale, una varietà di stimoli, come modelli molecolari associati a danni e patogeni, attività sinaptica, stress ossidativo, citochine, chemiochine, neurotrasmettitori, fattori neurotrofici e neurotossine inducono NF- $\kappa$ B [87]. Le citochine come TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  sono tipicamente sovraregolate dall'induzione di TBI. Sono entrambi geni bersaglio di NF- $\kappa$ B, ma possono anche attivare NF- $\kappa$ B, dando origine a un circolo vizioso auto-propagante. In modo coerente, NF- $\kappa$ B è risultato elevato nei ratti dopo un impatto corticale controllato, nonché in biopsie di tessuto cerebrale umano contuso [88]. Arumugam R et al. hanno indagato l'attivazione di NF- $\kappa$ B dopo un trauma agli astrociti messi in coltura; trauma che ha condotto al rigonfiamento astrocitario. Inoltre, è stata rilevata un'attivazione aumentata di NF- $\kappa$ B negli astrociti dopo TBI nei ratti e BAY 11-7082, un inibitore di NF- $\kappa$ B, ha ridotto significativamente il contenuto di acqua nel cervello dopo TBI. Questi risultati suggeriscono che NF- $\kappa$ B svolge un ruolo centrale nello sviluppo del rigonfiamento degli astrociti/edema cerebrale associato a TBI [89].

### **3.1.2 NF- $\kappa$ B e PD**

Molti studi hanno dimostrato che livelli alterati di espressione di NF- $\kappa$ B e la sua traslocazione nucleare sono associati alla degenerazione dei neuroni dopaminergici nel PD. Studi post-mortem su pazienti con PD hanno dimostrato che la percentuale di neuroni dopaminergici con immunoreattività nucleare positiva per NF- $\kappa$ B, specialmente nel sistema nervoso centrale e periferico, è 70 volte superiore rispetto ai soggetti di controllo. Tali prove indicano che la traslocazione nucleare di NF- $\kappa$ B è fondamentale per il suo ruolo nella neurodegenerazione dei neuroni dopaminergici nel PD [90]. Inoltre, Ghosh e coautori hanno

trovato l'attivazione di NF- $\kappa$ B nella substantia nigra dei topi trattati con MPTP. Il trattamento dei topi con un peptide corrispondente al dominio di legame di IKK $\alpha$  o IKK $\beta$ , che agisce come un inibitore selettivo di NF- $\kappa$ B, ha ridotto l'attivazione della microglia nella substantia nigra, ha prevenuto sia la degenerazione dell'asse nigrostriatale, sia la perdita di DA e ha migliorato le funzioni motorie. Questi risultati hanno confermato che, modulando l'attivazione della microglia, la deregolazione di NF- $\kappa$ B può svolgere un ruolo nel modello murino di MPTP. Altri studi supportano il fatto che la disregolazione di NF- $\kappa$ B possa svolgere un ruolo nel controllo dell'espressione di  $\alpha$ -syn. In particolare, si è scoperto che il blocco della segnalazione NF- $\kappa$ B in un modello MPTP di ratto riduce significativamente l'acetilazione dell'istone H3 nella regione del promotore di  $\alpha$ -syn, attenuando così  $\alpha$ -syn nella substantia nigra e consentendo il recupero della disfunzione motoria [91]. I recettori Toll-like appartengono alla famiglia dei recettori di riconoscimento dei pattern (PRR), fondamentali per il riconoscimento di patogeni extracellulari o intracellulari in base al riconoscimento di pattern molecolari associati ai patogeni (PAMP) o pattern molecolari associati ai danni (DAMP). Nella malattia di Parkinson, l' $\alpha$ -sinucleina mal ripiegata rilasciata dai neuroni viene riconosciuta come PAMP o DAMP dal TLR2 microgliale. Dopo la stimolazione del TLR2, vengono attivati i percorsi di NF- $\kappa$ B, con conseguente produzione di TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ . Il CXCL12 è stato sovraregolato nel tessuto SN di pazienti con PD post-mortem e di topi A53T (mutanti  $\alpha$ -sinucleina). L' $\alpha$ -sinucleina potrebbe promuovere la secrezione di CXCL12 da parte della microglia tramite il percorso TLR4/I $\kappa$ B- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B. Di conseguenza, l'accumulo microgliale indotto dall' $\alpha$ -sinucleina, propagando così la neuroinfiammazione [90, 92].

### **3.2 La via del fattore nucleare eritroide 2-correlato (Nrf2)**

Nrf2, un membro della famiglia dei fattori di trascrizione Cap'n'collar (CNC), è costituito da 605 aminoacidi ed è suddiviso in sette domini funzionali altamente conservati, noti come Neh1-Neh7. Il dominio Neh1 ha una porzione che regola il legame al DNA e un segnale di localizzazione nucleare NLS che è responsabile della traslocazione nucleare di Nrf2 [93]. Il percorso di segnalazione KEAP1-NRF2-ARE svolge un ruolo centrale nella mediazione della risposta cellulare adattativa allo stress da sostanze chimiche ossidative ed elettrofile. Nel citoplasma, l'emivita di Nrf2 è inferiore a 20 min, a causa del suo legame con l'inibitore proteina 1 associata a ECH simile a Kelch (Keap1). In condizioni di stress, KEAP1 viene modificata su alcune specifiche frazioni di cisteina e, di conseguenza, NRF2 viene stabilizzato e aumentato tramite sintesi proteica de novo. Quando l'abbondanza di NRF2

supera l'abbondanza di KEAP1, sfuggirà al sequestro da parte di KEAP1 e traslocherà nel nucleo. Nrf2 forma un eterodimero nel nucleo con il suo partner muscoloaponeurosi fibromatosa (sMaf) che si lega all'elemento antiossidante responsivo a Nrf2 (ARE) [94]. Nrf2 controlla l'espressione di componenti chiave del sistema antiossidante del glutatione (GSH) e della tioredossina (TXN), nonché di enzimi coinvolti nella rigenerazione del NADPH, nella detossificazione dei ROS e degli xenobiotici, svolgendo così un ruolo fondamentale nel mantenimento dell'omeostasi redox della cellula. Inoltre, è coinvolto nel controllo di superossido dismutasi (SOD), eme ossigenasi-1 (HO-1), catalasi (CAT) e uridina 5'-difosfo-glucuronosiltransferasi (UDP-glucosiltransferasi). [95]. Il fattore di trascrizione NRF2 si lega ad ARE nella regione promotore di molti geni di difesa cellulare per attivare la loro trascrizione. Il gene NFE2L2 contiene ARE nella sua regione promotore che conferisce a NRF2 la capacità di attivare direttamente la propria trascrizione, fornendo un meccanismo di feedback positivo per amplificare gli effetti di NRF2. Inoltre, la trascrizione NFE2L2 è regolata da diversi fattori di trascrizione, tra cui il recettore degli idrocarburi arilici (AhR) e il fattore nucleare NF- $\kappa$ B [93, 96].

### **3.2.1 Nrf2 e TBI**

Lo stress ossidativo è l'attore chiave nel danno secondario del TBI; Nrf2 è un importante meccanismo di difesa che regola l'espressione di diversi geni detossificanti, ossidativi e antinfiammatori e, per questo motivo, è stata identificata come un potenziale bersaglio terapeutico per mitigare i danni secondari causati da TBI. Dopo il TBI, il livello della proteina nucleare Nrf2 è risultato significativamente aumentato e anche i livelli di mRNA di entrambi i prodotti di attivazione della trascrizione HO-1 e NQO1 sono aumentati. Ciò suggerisce che esiste una correlazione tra TBI e aumento dell'attività di questa via, che potrebbe essere un meccanismo di difesa contro lo stress ossidativo e l'infiammazione causati dalla lesione [97]. Nel TBI, lo stress ossidativo causa la disfunzione della BBB tramite la downregulation delle proteine della giunzione stretta e causa la permeabilità della BBB e la perdita di cellule del sangue nella parte cerebrale. Lo stress ossidativo causa anche danni strutturali o perdita di cellule nell'unità neurovascolare. l'attivazione del pathway di segnalazione Nrf2 sarebbe una strategia terapeutica per proteggere il cervello dai danni neurologici indotti da TBI. Ci sono pochi report sull'attivazione di Nrf2 e sulla protezione BBB dopo TBI. Una somministrazione sistemica di sulforafano, un isotiocianato abbondante nelle verdure crocifere (ad esempio, broccoli) aumenta l'espressione dei geni guidati da Nrf2 nel tessuto cerebrale e nei microvasi. L'attivazione post-lesione indotta da sulforafano dei

geni guidati da Nrf2 attenua la morte delle cellule endoteliali e la perdita di proteine della giunzione stretta e riduce la permeabilità BBB [98, 99]. Lo stress ossidativo, l'attivazione del Fattore di crescita trasformante beta (Transforming growth factor beta o TGF- $\beta$ 1) e delle Metalloproteinasi della matrice (Matrix metalloproteinases o MMPs), la segnalazione di  $Ca^{2+}$  e la neuroinfiammazione sono i principali meccanismi che contribuiscono alla neurodegenerazione post-traumatica. È stata dimostrata l'importanza della segnalazione ossidativa nel TBI e proposto cascate infiammatorie e apoptotiche come meccanismi effettori nel TBI lieve. Saurav Bhowmick et al. hanno dimostrato che la downregulation di Nrf2 indotta da TBI attiva la caspasi-3, una delle principali caspasi coinvolte nell'apoptosi [100].

### 3.2.2 Nrf2 e PD

L'aumentato stress ossidativo nel PD è stato correlato alla produzione di ROS indotta dal metabolismo della dopamina e degli amminoacidi eccitatori ( $H_2O_2$ , radicale anione superossido, radicale NO e radicale OH). Di conseguenza, i neuroni dopaminergici sono specificamente sottoposti a elevato stress ossidativo a causa del loro contenuto di dopamina. In condizioni di stress, evocano anche la produzione di superossido e ossido nitrico da parte della microglia, aumentando così il danno ossidativo. Inoltre, mutazioni patogene in diversi geni tra cui  $\alpha$ -sinucleina, LRRK2, parkin, DJ-1 e PINK-1 svolgono anche un ruolo importante nella disfunzione mitocondriale nei pazienti con PD. L'accumulo di Nrf2 e l'attivazione di NQO1 e HO-1 sono osservati nella substantia nigra dei pazienti con PD [101]. Prove convincenti indicano che lo stress ossidativo e la neuroinfiammazione svolgono un ruolo centrale nella fisiopatologia del PD; le proteine nucleari sinaptiche sono i componenti principali del corpo di Lewy e una caratteristica importante del PD. L'aggregazione dell' $\alpha$ -sinucleina è indotta dalla downregulation di Nrf2 e Hmox1. L'aumento delle proteine nucleari sinaptiche mutanti induce la disfunzione mitocondriale e i livelli elevati di ROS. La traslocazione di Nrf2 attivato al nucleo riduce il danno cellulare da stress ossidativo e migliora la compromissione della funzione mitocondriale, e ha anche effetti modulatori sugli ioni nel cervello, sulla neuroinfiammazione e sulla genetica ambientale, alleviando così i sintomi associati al PD [102]. I meccanismi antiossidanti endogeni resistono alle conseguenze negative dello stress ossidativo. Enzimi come catalasi, superossido dismutasi, glutazione perossidasi, glutazione reduttasi, ecc., e antiossidanti non enzimatici come glutazione, acido lipoico, L-arginina, melatonina, ecc., sono alcuni esempi di antiossidanti endogeni. Nel caso del PD, questi sistemi antiossidanti vengono sopraffatti,

portando alla patogenesi della malattia. Nrf2 è il regolatore principale del sistema antiossidante endogeno ed è diventato un bersaglio popolare per malattie neurodegenerative, tra cui il PD [103].

### 3.3 APOPTOSI

I meccanismi coinvolti nell'apoptosi non sono completamente compresi. Tuttavia, una componente chiave è l'attivazione delle caspasi, una famiglia di proteasi che partecipano a una cascata di eventi che, in ultima analisi, scindendo un set di proteine, causando la disgregazione delle cellule. Sebbene la cascata proteolitica delle caspasi rappresenti un punto centrale nella risposta apoptotica, il suo inizio è strettamente regolato da una varietà di altri fattori. Tra questi, è noto che le proteine della famiglia Bcl-2 svolgono un ruolo fondamentale nell'induzione dell'attivazione delle caspasi e nella regolazione dell'apoptosi, ma le loro funzioni non sono ancora del tutto definite. Come suggerisce il nome, il gene bcl-2 è stato scoperto per la prima volta nei linfomi umani a cellule B dove, tramite traslocazioni cromosomiche, è stato modificato. Sulla base di questa considerazione, bcl-2 è stato stabilito essere un proto-oncogene che prolunga la sopravvivenza cellulare inibendo l'apoptosi. L'azione principale delle proteine Bcl-2 avviene nei mitocondri [104]. La proteina X associata a BCL-2 (BAX) e l'antagonista/killer di BCL-2 (BAK) sono proteine proapoptotiche che contengono domini BH1–3. Sebbene BAK sia normalmente localizzata nei mitocondri, BAX è presente nel citoplasma in una forma inattiva e viene traslocata nei mitocondri in risposta a segnali proapoptotici come danni al DNA, stress ossidativo e carenza nutrizionale. Entrambe le proteine vengono attivate sotto stress e formano un omodimero o eterodimero che viene inserito e interrompe la membrana esterna mitocondriale, portando al rilascio di fattori proapoptotici e all'induzione dell'apoptosi. Nelle cellule sane, Bax e Bak si spostano tra il citosol e la membrana esterna mitocondriale (MOM) con velocità diverse. In condizioni apoptotiche, Bax e Bak vengono attivati e si accumulano nella MOM, dove si oligomerizzano e mediano la MOMP, che porta al rilascio di fattori proapoptotici, come il citocromo c. In condizioni normali, Bax è in gran parte citosolico attraverso la costante retrotraslocazione dai mitocondri al citosol mediato da Bcl-xL, che evita l'accumulo di livelli tossici di Bax al MOM [105].

### 3.3.1 Apoptosi e TBI

Sia l'apoptosi dipendente dalle caspasi che quella indipendente dalle caspasi sono regolate dalla famiglia di proteine Bcl-2, che include sia membri pro-morte che pro-sopravvivenza. Le proteine della famiglia Bcl-2 regolano la permeabilità della membrana esterna mitocondriale e la formazione del poro di transizione della permeabilità. Contengono domini di omologia Bcl-2 altamente conservati (BH 1–4) essenziali per la formazione di omocomplessi ed eterocomplessi. I complessi formati tra proteine contenenti domini BH-3 come Bax, Bid troncato e Bad, possono facilitare il rilascio del citocromo c dai mitocondri. La sovraregolazione di Bax con successiva traslocazione mitocondriale può essere indotta dal soppressore tumorale p53, che aumenta nelle regioni ferite dopo TBI nei ratti [79]. La conoscenza dei cambiamenti biomolecolari come conseguenza dell'impatto meccanico del TBI, in particolare i percorsi regolatori dell'apoptosi e della neuroinfiammazione, può migliorare l'attuale comprensione del carico di danno secondario con l'obiettivo di identificare ulteriori obiettivi di trattamento ottimale. C'è un crescente interesse nella letteratura per chiarire ulteriormente il Bcl-2, una proteina pro-sopravvivenza nel tessuto neuronale, come potenziale bersaglio diagnostico e terapeutico nel periodo acuto post-lesione nel TBI [106]. È stato dimostrato che nel sistema nervoso, Bcl-2 protegge le cellule nervose da vari stimoli che causano la morte per apoptosi neuronale. L'obiettivo della terapia di neuroprotezione nel trauma cranico è quello di proteggere il cervello e ridurre il danno cerebrale secondario e prevenire la morte neurologica [107]. La formazione di questi complessi può causare il rilascio di proteine apoptotiche dai mitocondri dopo TBI nei ratti. La proteina anti-apoptotica Bcl-2 può inibire la formazione di pori e il rilascio mitocondriale; pertanto, nei soggetti umani, si è scoperto che BCL-2 e i suoi prodotti genici sono sovraregolati nella corteccia danneggiata e associati a cellule che sono state in grado di sopravvivere, oltre a essere associati a esiti più favorevoli dopo TBI. Nei modelli sperimentali del sistema nervoso, si è scoperto che l'espressione di mRNA di Bcl-2 e la proteina Bcl-2 sono aumentate nei neuroni sopravvissuti [106]. Un ruolo di Bcl-2 nella morte delle cellule neuronali a seguito di TBI è stato ulteriormente supportato da recenti osservazioni secondo cui i topi transgenici che sovraesprimono la proteina umana Bcl-2 hanno mostrato una perdita neuronale significativamente inferiore nella corteccia e nell'ippocampo danneggiati a seguito di TBI sperimentale. I membri della famiglia Bcl-2 possono probabilmente controllare la morte cellulare regolando il rilascio di citocromo c dai mitocondri. Una volta nel citosol, il citocromo c aiuta nell'attivazione della famiglia di

proteasi della cisteina che promuove l'apoptosi, le caspasi [108]. La proteina pro-morte della famiglia Bcl-2 Bax è rilevabile anche nel tessuto cerebrale contuso nei pazienti con TBI. I pazienti con Bax rilevabile ma non Bcl-2 hanno avuto un esito meno favorevole rispetto ai pazienti in cui sia Bax che Bcl-2 erano rilevabili. Sebbene questi studi dimostrino l'inizio acuto dell'apoptosi nel cervello umano dopo una lesione, si verifica anche un'apoptosi prolungata.

### 3.3.2 Apoptosi e PD

Il pathway apoptotico è innescato da segnali di stress intracellulare che possono includere stress ossidativo, danni al DNA, sovraccarico di  $Ca^{2+}$  citosolico e stress del reticolo endoplasmatico. Il passaggio cruciale per l'apoptosi intrinseca è la permeabilizzazione generalizzata e irreversibile della membrana mitocondriale esterna, che è finemente regolata dall'equilibrio tra membri pro- e anti-apoptotici della famiglia di Bcl-2 che può condividere da uno a quattro domini di omologia Bcl-2 (BH) che consentono interazioni omotipiche. La MOMP guidata dall'apoptosi è principalmente mediata tramite la formazione di pori nella membrana mitocondriale esterna (OMM) da parte di BAX e Bcl-2-antagonista/killer 1 (BAK) [109]. Al contrario, i membri anti-apoptotici della famiglia Bcl-2, come Bcl-2 e Bcl-XL, sono proteine integrali di membrana inserite nell'OMM che inibiscono MOMP contrastando BAX e BAK o sequestrando i membri della famiglia Bcl-2 contenenti un singolo dominio BH3 in grado di attivare MOMP mediata da BAX/BAK, come il modulatore sovraregolato dell'apoptosi p53 (PUMA) [110]. Nel contesto del PD, ci sono ampie prove da pazienti e modelli sperimentali che supportano un ruolo dell'apoptosi intrinseca nella neurodegenerazione dopaminergica. Ad esempio, i livelli di espressione di BAX e caspasi-9 sono stati significativamente aumentati nei neuroni dopaminergici nigrali dei cervelli dei pazienti con PD. Inoltre, nel SN dei topi esposti a MPTP, BAX è sovraregolato e localizzato preferibilmente nei mitocondri, mentre Bcl-2 è sottoregolato, con conseguente rilascio del citocromo c e successiva attivazione di caspasi-9 e -3. Di conseguenza, l'ablazione di BAX o la sovraespressione di Bcl-2 proteggono dalla neurodegenerazione indotta da MPTP [111]. La prova dell'aumento associato all'apoptosi nel rapporto Bax/Bcl-2 è stata osservata in studi in vivo sui topi, dove il trattamento con 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina (MPTP) è stato utilizzato per indurre un modello di PD [112]. L'espressione anomala delle proteine BCL-2 può contribuire alla patogenesi del PD, sebbene i dettagli molecolari siano ancora dibattuti. I livelli di BCL-2 erano notevolmente diminuiti nei pazienti con PD, il che era negativamente correlato alla durata e alla gravità

della malattia. Analogamente, è stato osservato un accumulo di membri proapoptotici BAX nei neuroni di cervelli post-mortem di pazienti con PD e inclusioni ricche di BAX sono state rilevate nei neuroni contenenti corpi di Lewy [113].

#### **4 ESTRATTO DI BACCHE AD ALTO CONTENUTO DI POLIFENOLI MONOMERICI O HIGH MONOMERIC POLYPHENOLS BERRIES EXTRACT (HMPBE)**

Gli alimenti di origine vegetale contengono naturalmente polifenoli; questi composti hanno un'ampia gamma di strutture complesse. Il monomero di base dei polifenoli è l'anello fenolico e generalmente sono classificati come acidi fenolici e alcoli fenolici. A seconda della forza dell'anello fenolico, i polifenoli possono essere classificati in molte classi, ma le principali classi di polifenoli sono gli acidi fenolici, i flavonoidi, le stibline, gli alcoli fenolici e i lignani. I composti bioattivi sono sostanze fitochimiche coinvolte nella protezione della salute umana contro le malattie cronico-degenerative. I polifenoli sono un gruppo di composti biologicamente attivi presenti negli alimenti di origine vegetale. Questi composti sono presenti nella dieta umana e provengono da piante come frutta, verdura, cereali e caffè. I polifenoli sono noti anche come prevenzione delle malattie degenerative. Le ricerche sui polifenoli hanno subito ritardi a causa della loro particolare caratteristica, la complessità strutturale. Gli antiossidanti più frequenti nella nostra dieta sono i polifenoli [114]. I composti flavanolicci sono presenti in un'ampia gamma di alimenti. Le principali fonti di flavanoli sono il cacao (3411 mg 100 g<sup>-1</sup>) e il cioccolato fondente (1590 mg 100 g<sup>-1</sup>). Anche i frutti di bosco sono un'importante fonte di flavanoli, con 659, 330 e 139 mg 100 g<sup>-1</sup> rispettivamente per aronia nera, mirtillo e ribes nero. Altre fonti importanti sono le fragole (148 mg 100 g<sup>-1</sup>) e le mele (111 mg 100 g<sup>-1</sup>), oltre a nocciole, noci pecan, pistacchi e mandorle (181-496 mg 100 g<sup>-1</sup>). Il tè nero, il tè verde e il vino rosso contengono alti livelli di flavanoli, in particolare catechine e dimeri di proantocianidine, con quantità medie stimate di 18-50 mg nella dieta quotidiana (Figura 6) [115]. Negli ultimi decenni sono stati isolati in natura diversi flavanoli. Poiché sono state riconosciute le loro potenziali proprietà benefiche, sono stati sempre più studiati dagli scienziati di tutto il mondo. Finora i flavanoli sono stati trovati in alimenti comuni, tra cui cereali, legumi, frutta, verdura, foraggi, luppolo, birra, vino rosso, tè, cacao, uva e mele [116]. I polifenoli e i loro metaboliti sono stati descritti anche come efficaci nell'aumentare la vitalità cellulare, riducendo i livelli di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e modulando positivamente l'equilibrio delle proteine anti-/pro-apoptotiche e del metabolismo del glutatione sia nei modelli in vitro che in quelli in vivo di malattie neurodegenerative [117]. I polifenoli esercitano effetti protettivi sul TBI tramite il ripristino dei pathway dell'NF-κB, del TLR4 e delle proteine della famiglia dei recettori Nod-like (NLRP). Inoltre, questi fitochimici e i loro derivati regolano positivamente i



## **5 SCOPO DELLA TESI**

Il TBI è una lesione fisica causata più spesso da sport, incidenti automobilistici e combattimenti; tra le complicazioni ritroviamo neuroinfiammazione e neurodegenerazione con sintomatologie riconducibili al PD. Alimenti ricchi in polifenoli risultano possedere azioni antinfiammatorie ed antiossidanti; per questo motivo lo scopo della tesi è stato quello di valutare l'azione dell'HMPBE sulla modulazione dei pathway molecolari coinvolti nel TBI.

## **6 MATERIALI E METODI**

### **6.1 Animali**

I topi maschi CD1 (8 settimane di età, 18-24 g) sono stati acquistati da Envigo (Milano, Italia), collocati in un ambiente controllato e provvisti di cibo standard per roditori (dieta standard Teklad acquistata da Envigo) e acqua disponibile ad libitum. Sono stati alloggiati 5 topi per gabbia e mantenuti in un ciclo luce-buio di 12:12 ore a  $21 \pm 1^\circ\text{C}$  e  $50 \pm 5\%$  di umidità. Il comitato di revisione per la cura degli animali dell'Università di Messina (OPBA) ha approvato lo studio.

### **6.2 Gruppi e disegno sperimentale**

- Primo disegno sperimentale.

Per trovare la dose più bassa con un effetto significativo abbiamo somministrato l'HMPBE disciolto in soluzione fisiologica per via orale a tre diverse concentrazioni crescenti (5-15-30 Mg/kg) per un periodo di 3 mesi. Al termine del periodo, gli animali sono stati sottoposti ad analisi comportamentale come descritto di seguito. Alla fine del primo esperimento, 15mg/kg è stata scelta come dose minima per avere un effetto.

- Secondo disegno sperimentale.

Il dispositivo Impact One™ per impatto corticale controllato (CCI9 (Leica, Milano, Italia) è stato utilizzato per creare una contusione corticale sulla corteccia esposta dopo una craniotomia (diametro della punta: 4 mm; profondità della contusione corticale: 3 mm; velocità di impatto: 1,5 m/s). I topi Sham sono stati sottoposti alla stessa identica procedura chirurgica, ma non è stato indotto loro il trauma cranico [121-123].

I topi sono stati suddivisi come segue:

- Gruppo Sham + veicolo: i topi sono stati sottoposti alle procedure chirurgiche come sopra, tranne che non è stato applicato l'impatto e gli animali sono stati trattati o.s. con il veicolo (dati non mostrati);
- Sham + HMPBE: i topi sono stati sottoposti alle procedure chirurgiche come sopra, tranne che non è stato applicato l'impatto e gli animali sono stati trattati con una somministrazione orale di HMPBE;
- TBI: i topi sono stati sottoposti a CCI più la somministrazione del veicolo (soluzione fisiologica);

- TBI + HMPBE: come per il gruppo TBI + veicolo, ma l'HMPBE è stato trattato con una somministrazione orale di HMPBE alla dose di 15 mg/kg in soluzione salina 1 ora dopo trauma cranico;
- Terzo disegno sperimentale.

I topi sono stati sottoposti a TBI come precedentemente descritto, ma sono stati sacrificati 30 giorni dopo le procedure chirurgiche [124].

I topi sono stati suddivisi come segue:

- Gruppo Sham + veicolo: i topi sono stati sottoposti alle procedure chirurgiche come sopra, tranne che non è stato applicato l'impatto e gli animali sono stati trattati utilizzando somministrazioni orali con veicolo per 30 giorni (dati non mostrati);
- Sham + HMPBE: i topi sono stati sottoposti alle procedure chirurgiche come sopra, tranne che non è stato applicato l'impatto e gli animali sono stati trattati tramite somministrazioni orali di HMPBE per 30 giorni;
- TBI: i topi sono stati sottoposti a CCI più somministrazione di veicolo (salina) per 30 giorni;
- TBI + HMPBE: come per il gruppo TBI + veicolo, ma gli animali sono stati trattati tramite somministrazioni orali di HMPBE per 30 giorni;

Considerando che non abbiamo riscontrato alcuna differenza significativa tra il gruppo Sham e Sham+HMPBE, abbiamo scelto di mostrare solo Sham+HMPBE.

### **6.3 Analisi comportamentale**

Durante i diversi esperimenti, gli animali suddivisi nei differenti gruppi sperimentali sono stati sottoposti a test comportamentali a 1 e 30 giorni. I topi sono stati trasferiti nella stanza dei test comportamentali 30 minuti prima dell'inizio della prima prova, in modo che potessero abituarsi all'ambiente. Sulla base dei test comportamentali utilizzati per mantenere l'ambiente il più possibile uniforme, gli animali sono stati addestrati a utilizzare l'apparecchiatura prima di ogni registrazione. I test comportamentali sono stati condotti da tre diversi esperti di fiducia. Di seguito una breve descrizione dei test:

### **6.3.1 Test di nuoto forzato o forced swim test (FST)**

Il metodo si basa su quello descritto da Porsolt et al. [125]. In breve, il FST viene utilizzato per valutare le condizioni depressive. I topi vengono posti in una vasca trasparente e impenetrabile riempita d'acqua e viene registrato il loro comportamento di movimento legato alla loro condizione, più o meno grave, di stato depressivo. In questo esperimento, per sei minuti, ogni topo è stato delicatamente collocato nel cilindro e la durata del galleggiamento è stata registrata. Durante gli ultimi 4 minuti del test è stata esaminata l'immobilità [126].

### **6.3.2 Test del campo aperto o open field test (OFT)**

L'OFT, creato da Calvin S. Hall, è un test che misura i livelli generali di attività locomotoria, l'ansia e la volontà di esplorazione dei roditori. Ogni topo di questo esperimento è stato addestrato prima di essere messo al centro della scatola, dove è stata registrata l'attività per cinque minuti di esplorazione [127]. Sono stati cronometrati il tempo trascorso nel quadrato centrale ed il tempo trascorso nei quadrati più esterni.

### **6.3.3 Test del labirinto a croce elevato o Elevated Plus-Maze test (EPM)**

Con il test EPM si valuta il comportamento ansioso dei roditori. Il dispositivo EPM è costituito da una regione centrale, due bracci aperti posizionati in modo opposto, due bracci chiusi posizionati in modo opposto, con un labirinto elevato a forma di "+". Una videocamera posta sopra il labirinto registra le azioni dei soggetti mentre lo percorrono liberamente e le loro azioni vengono analizzate. Dopo l'addestramento, è stato contato quante volte i topi sono entrati in ogni braccio e quanto tempo hanno trascorso nelle braccia aperte [128].

### **6.3.4 Test del labirinto acquatico di Morris o Morris Water Maze test (MWM)**

L'apprendimento e la memoria spaziale dipendenti dall'ippocampo sono stati valutati con il test MWM [129, 130]. Il protocollo prevede che il topo venga posto in una grande piscina circolare ed è necessario trovare una piattaforma invisibile o visibile che gli permetta di sfuggire all'acqua utilizzando vari segnali. Dopo il periodo di addestramento, il topo è stato posizionato nell'acqua in ciascuno dei tre diversi quadranti e gli è stato permesso di nuotare per 1 minuto ogni volta. Un giorno dopo, la piattaforma è stata rimossa per il test ed è stato registrato il tempo trascorso nel quadrante target.

### **6.3.5 Test di catalessi (CT)**

Il test standard di catalessi consiste nel mettere un animale in una posizione insolita e nel cronometrare il tempo che l'animale impiega a correggerla. Questo periodo di tempo è ritenuto un indicatore dell'intensità della catalessi [131]. In particolare, In questo esperimento è stato utilizzato il test bar, in cui l'animale è stato posto con gli arti su una barra alta 4 cm. Abbiamo misurato il tempo in cui i topi sono rimasti in questa posizione.

### **6.3.6 Test del Rotarod (RT)**

La capacità di coordinare i movimenti dei topi è valutata di routine con il test del rotarod, particolarmente adatto a identificare le disfunzioni cerebellari [132]. In breve, dopo essersi abituato, il topo veniva posto su un cilindro rotante orientato orizzontalmente (asta) sospeso sopra il pavimento della gabbia. I roditori cercano naturalmente di rimanere sul cilindro rotante, o rotarod, ed evitare di cadere a terra. La velocità del rotarod viene azionata meccanicamente e può essere mantenuta costante o accelerata. Ogni animale veniva posto sull'asta fino a 5 cadute, ed il tempo di permanenza sulla stessa veniva registrato.

### **6.3.7 Test del palo o pole test (PT)**

Un test comportamentale di base, chiamato "pole test", viene utilizzato per valutare la disabilità motoria in seguito a un danno cerebrale. I topi vengono posizionati in cima a un palo verticale alto 50-60 cm e con un diametro di 1 cm. Per incoraggiare i topi a scegliere di cadere sul pavimento della gabbia, il palo viene fissato su un supporto a base triangolare e collocato all'interno della gabbia domestica. Vengono misurati sia l'intero tempo necessario per cadere a terra sia il tempo necessario per ruotare completamente verso il basso [133, 134].

### **6.3.8 Riconoscimento di oggetti nuovi o novel object recognition test (NOR)**

Il test NOR è stato utilizzato per determinare se i topi avessero una tendenza naturale a dedicare tempo allo studio di oggetti non familiari o familiari. I topi sono stati messi nella scatola per 5 minuti dopo una sessione di addestramento, durante la quale l'esaminatore ha sostituito uno degli oggetti familiari con uno nuovo a caso. Per ogni oggetto è stato registrato il tempo totale di esplorazione del topo [135, 136].

### **6.3.9 Test di interazione sociale o social interaction test (SIT)**

Per condurre il test di interazione sociale è stato utilizzato un apparecchio a tre camere. Sono state effettuate tre prove di dieci minuti in totale. Un topo è stato inizialmente acclimatato in un'arena vuota per 5 minuti. Nella seconda fase, il topo sperimentale è stato esposto a un oggetto. Nella terza fase il topo sperimentale è stato esposto all'interazione con un nuovo animale[137, 138].

### **6.4 Analisi istologica del danno cerebrale**

Dopo l'esperimento, il tessuto cerebrale è stato rimosso, fissato a temperatura ambiente in una soluzione di formaldeide tamponata (10% in soluzione salina tamponata con fosfato), disidratato con etanolo graduato e quindi incorporato in paraffina. La microscopia ottica è stata utilizzata per esaminare sezioni di tessuto di 7  $\mu\text{m}$  di spessore dopo essere state deparaffinate con xilene e colorate con ematossilina/eosina (Bio-Optica, Milano, Italia). È stato contato il numero di neuroni danneggiati e le alterazioni istopatologiche della materia grigia sono state classificate su una scala a 6 punti: Nessuna lesione, 1; 1-5 neuroni eosinofili presenti nella materia grigia, 2; 5-10 neuroni eosinofili, 3; più di 10 neuroni eosinofili, 4; un piccolo infarto (meno di un terzo dell'area della materia grigia), 5; un infarto moderato (da un terzo a metà dell'area della materia grigia) e 6, un grande infarto (più di metà dell'area della materia grigia). Per determinare il punteggio finale di ciascun topo, i risultati di ogni parte del cervello sono stati mediati. Le fette sono state poi analizzate da un istopatologo in cieco al microscopio ottico Leica DM6 (Leica Microsystems Spa, Milano, Italia) [139].

### **6.5 Analisi Western Blot degli estratti citosolici e nucleari**

Per l'analisi di Western blot, i topi sono stati anestetizzati con xylazina e chetamina (0.16 e 2.6 mg/kg, rispettivamente, somministrati per via intraperitoneale) e sacrificati. I campioni prelevati sono stati sospesi in un tampone di estrazione A (il volume del tampone è proporzionale al peso di ogni campione), contenente: 20 mM di leupeptina, 0.15 mM di pepstatina A, 0.2 mM di PMSF, 1 mM di sodio ortovanadato; sono stati omogeneizzati con l'omogeneizzatore T10 basic (Ultra Turrax), e centrifugati a 12.000 rpm per 4 min a 4°C. I surnatanti rappresentano la frazione citosolica. I pellets, ricchi in proteine nucleari, sono stati risospesi in un buffer B contenente 10 mM di Tris-HCl a pH 7.4, 150 mM di NaCl, 1 mM di EGTA, 1% di Triton X-100, 1 mM di EDTA, 0.2 mM di PMSF, 20 mM di leupeptina e 0.2 mM di sodio ortovanadato, e centrifugati per 10 min a 12.000 rpm e a 4°C. I surnatanti

rappresentano la frazione nucleare. Successivamente è stata determinata la concentrazione proteica del lisato citoplasmatico e nucleare attraverso il saggio proteico Bradford, un metodo colorimetrico che prevede l'utilizzo del BIO-Rad Protein Assay (Bio-Rad). La quantità di proteine, espressa in  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , è stata calcolata tramite l'utilizzo dello spettrofotometro JENWAY Genova (Biogenetica), adoperando come punto di riferimento una curva standard realizzata con BSA (Bovine Serum Albumine). I campioni sono stati bolliti per 5 min a  $100^{\circ}\text{C}$  e le proteine sono state separate in base al peso molecolare mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide (12%) in condizioni denaturanti (SDS-PAGE). L'apparato usato per la corsa elettroforetica è il Power Pac Basic (Bio-Rad). Utilizzando i giusti sostegni (Trans-Blot SD Semy Dry Transfer Cell, Bio-Rad) è stato assemblato un "sandwich" costituito dal gel di poliacrilammide e da una membrana di PVDF (Immobilon-P) perfettamente aderenti, posti tra due foglietti di carta da filtro e due cartoncini spessi, precedentemente imbevuti nel tampone di trasferimento (glicina 2,93 g/l, Tris base 5,81 g/l, SDS 10%, metanolo 20%, portato ad un litro con acqua distillata). L'assemblato è stato inserito in un Trans-Blot ad un amperaggio costante di 0,26 mA per 30 min. E' stato così ottenuto il trasferimento e l'ancoraggio delle proteine al filtro di PVDF. Al termine del processo l'avvenuto trasferimento delle proteine è stato controllato immergendo per 3 min la membrana in una soluzione di rosso Ponceau (polvere Ponceau S 20 mg/ml, acido tricloroacetico 30 mg/ml, acido sulfosalicilico 30 mg/ml) che colora in modo reversibile tutte le proteine. La membrana di PVDF del blotting è stata incubata per 60 min, in blanda agitazione, in una soluzione di quenching contenente 5% latte senza grassi (Applichem) in fosfato buffer salino (PBS-1X) (PM). Questo passaggio ha lo scopo di saturare con le proteine del latte tutti i siti del filtro non occupati dalle proteine durante il blotting, favorendo così il riconoscimento della banda della proteina d'interesse da parte dell'anticorpo. Sono stati usati i seguenti anticorpi primari: anti-I $\kappa$ b- $\alpha$  (1:500; Santa Cruz Biotechnology (SCB), H-4 sc-1643), anti-Nf-kb p65 (1:500; SCBF-6: sc-8008), anti-Bax (1:500; SCB, B-9 sc-7480), anti-Bcl-2 (1: 500; SCB, C-2 sc-7382), anti-a-syn(1:500SCB, LB509 sc-58480), anti-Nrf-2 (1:500; SCB, A-10 sc-365949), anti-HO-1 (1:500; SCB, A3 sc-136960), anti-DAT (1:300; SCB, 65G10 sc-32258) in  $1\times$  PBS, 5% w/v latte secco non grasso, 0. 1% Tween-20 per una notte. 1% Tween-20 a  $4^{\circ}\text{C}$  per una notte. I blot sono stati ulteriormente testati con un anticorpo anti-b-actina (1:500; SCB) per la frazione citosolica o un anticorpo anti-lamina A/C (1:500 Sigma-Aldrich Corp., Milano, Italia) per la frazione nucleare, per assicurarsi che fossero caricati con un numero equivalente di proteine [140, 141]. Come indicato dal produttore, i segnali sono stati valutati utilizzando un reagente del sistema di rivelazione a

chemiluminescenza potenziata (ECL) (Thermo, Monza, Italia). Utilizzando il software BIORAD ChemiDoc TM XRS+ e la densitometria, è stata misurata l'espressione relativa delle bande proteiche, che è stata standardizzata rispetto ai livelli di b-actina e lamin A/C.

## **6.6 Misurazione delle citochine**

Utilizzando i kit per il test di immunoassorbimento enzimatico (ELISA) disponibili in commercio (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) secondo le istruzioni del produttore, i livelli di TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 nel cervello sono stati misurati come precedentemente descritto [142]. In breve, il surnatante dell'omogenato del tessuto cerebrale è stato centrifugato e misurato. I valori di assorbanza di ciascun pozzetto sono stati misurati a 450 nm da un lettore di micropiastre.

## **6.7 Localizzazione immunostochimica del TH**

Le tecniche immunostochimiche utilizzate sono state precedentemente descritte [143]. In breve, dopo la deparaffinizzazione e la reidratazione, il rilevamento di TH è stato effettuato dopo l'ebollizione in tampone citrato 0,1 M per 1 min. L'adsorbimento non specifico è stato ridotto al minimo incubando la sezione in siero di capra normale al 2% (vol/vol) in PBS per 20 min le sezioni sono state incubate con anti-TH (Millipore, 1:500 in PBS, v/v) per tutta la notte. Successivamente, le sezioni sono state trattate con anticorpi secondari anti-topo bovino IgG (1:2000 Jackson Immuno Research, West Grove, PA, USA). Un anticorpo anti-topo IgG di capra biotincongiugato (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) ha permesso di identificare la marcatura specifica. Le foto digitali sono state prima aperte in ImageJ, quindi è stato utilizzato il plug-in di deconvoluzione del colore per deconvolverle. L'immagine DAB deconvoluta viene automaticamente tracciata in un profilo di istogramma quando si utilizza il plug-in IHC profiler e viene mostrato un registro di punteggio corrispondente. Il valore positivo dell'intensità dei pixel restituito dal software corrisponde al profilo dell'istogramma. [144, 145].

## **6.8 Immunofluorescenza di Ikb- $\alpha$ e Nrf-2**

Le sezioni cerebrali sono state incubate per una notte con gli anticorpi primari anti-Ikb- $\alpha$  (1:50; (SCB), H-4 sc-1643) e anti-Nrf-2 (1:50; SCB, A-10 sc-365949) in PBS, v/v come precedentemente descritto [134, 146-150]. Il giorno successivo, le sezioni sono state lavate con PBS e incubate con anticorpo secondario FITC coniugato anti-mouse AlexaFluor-488

(1:2000 v/v Molecular Probes, Regno Unito) e 40,60-diamidino-2-fenilindolo (DAPI; Hoechst, Francoforte; Germania). Le fette sono state osservate e fotografate con un microscopio Leica DM6 (Leica MicrosystemsSpA, Milano, Italia) [122, 151].

### **6.9 Misurazione della malondialdeide**

La soluzione salina bilanciata di Hank è stata omogeneizzata a 3000 rpm con i tessuti cerebrali presenti. Per un'ora a 95 gradi, i pellet sono stati incubati in una soluzione contenente acqua, acido acetico, sodio dodecil solfato e acido tiobarbiturico. Dopo il raffreddamento, la miscela è stata combinata con acqua, n-butanolo e piridina, quindi centrifugata a 3000 rpm. L'assorbanza è stata misurata a 532 nm [152, 153].

### **6.10 Stress ossidativo e difesa antiossidante**

SOD, CAT, GSH, GSH-Px e GPx sono stati analizzati nel mesencefalo come precedentemente descritto [154, 155]. Il contenuto di ROS è stato misurato utilizzando kit commerciali secondo le linee guida del produttore [156]. In breve, Il saggio di attività della SOD è stato misurato secondo il metodo di Marklund e Marklund a 420 nm. I risultati sono presentati come unità di SOD/mg di proteine. Inoltre, l'attività della CAT è stata valutata secondo il metodo dell'Aebi in termini di mole di perossido di idrogeno consumate per minuto per mg di proteine. I risultati sono presentati come unità CAT/mg proteina. Inoltre, il livello del glutatione anti-ossidante cellulare non enzimatico è stato misurato secondo il metodo di Moron et al. I risultati sono presentati come unità GSH/mg di proteine.

### **6.11 Reagenti e standard**

Gli standard analitici di acido gallico, acido clorogenico, catechina, acido caffeico, acido siringico, rutina, ellagico, esperidina, acido ferulico, miricetina, quercetina, apigenina, naringenina, kaempferolo sono stati acquistati da Merck (Darmstadt, Germania). L'acetonitrile e l'acido formico 99,9% (grado LC-MS), l'acqua (grado HPLC gradiente) sono stati forniti da VWR (VWR International PBI Srl Milano, Italia). Acetone e HCl sono stati acquistati da Merck (Darmstadt, Germania). Tutti i reagenti erano di grado HPLC (>99,9%).

### **6.12 Estrazione del campione e analisi cromatografica**

L'estrazione dei campioni è stata effettuata secondo il protocollo proposto da Puigventós et al. [157]. In breve, 0,1 g di campioni sono stati mescolati in 10 mL di soluzione di

acetone/acqua/acido cloridrico (70:29,9:0,1 v/v/v) e sonicati per 30 minuti. Successivamente, la miscela è stata centrifugata a 3500 rpm per 15 min e conservata a -4°C prima dell'analisi. La separazione cromatografica è stata effettuata con una colonna Raptor C18 (100x2,1 mm, 2,7 µm) mantenuta a 25°C. Le fasi mobili consistevano in H<sub>2</sub>O + 1% di acido formico (A) e acetonitrile + 1% di acido formico (B), con una portata di 0,3 mL/min. Il volume di iniezione è stato di 10 µL e tutti gli analiti sono stati eluiti con gradienti dal 5 al 95% di A, per una corsa totale di 13,63 minuti.

### **6.13 Condizioni MS e convalida del metodo**

Come spettrometro di massa è stato utilizzato un Q Exactive™ Plus Hybrid Quadrupole-Orbitrap™ (Thermo Fisher Scientific, California, U.S.A.) con sorgente di ionizzazione electrospray riscaldata (HESI-II). L'analisi è stata effettuata in modalità polarità positiva e negativa. Tutti i dati sono stati acquisiti utilizzando la modalità Full MS scan/dd-MS2. I parametri operativi erano conformi a D'Amico et al. [124]: quantità di flusso del gas di copertura, 35 (unità casuali); quantità di flusso del gas ausiliario, 10 (unità casuali); tensione di spruzzo, 3,50 kV; temperatura del capillare, 300 °C; tensione della lente del tubo, 55 V; temperatura del riscaldatore, 305 °C; modalità di scansione: scansione completa; intervallo di scansione (m/z) 100-1000; microscansioni, 1 m/z; risoluzione positiva: 70.000; obiettivo del controllo automatico del guadagno (AGC) della trasformata di Fourier (FT): 3 × 10; risoluzione negativa: 35.000; obiettivo del controllo automatico del guadagno (AGC): 1 × 106; IT massimo: 100 ms. Gli analiti sono stati identificati in base al tempo di ritenzione (tR), alla massa precisa e alla frammentazione caratteristica. Ogni giorno, prima dell'analisi, è stata eseguita una calibrazione esterna per l'accuratezza della massa. I dati di acquisizione sono stati registrati ed elaborati con il software Xcalibur™ versione 4.0 di Thermo. Le prestazioni del metodo sono state valutate in conformità alla decisione della Commissione 2002/657 per linearità, specificità e veridicità. Il LOQ è stato determinato come la più bassa quantità di standard necessaria per produrre un S/N > 5 pur rientrando nell'intervallo lineare della curva di calibrazione (residuo retrocalcolato < 20%). Il test di linearità ha fornito valori soddisfacenti per tutti gli analiti esaminati ( $r^2 > 0,996$ ).

### **6.14 Materiali**

Salvo diversa indicazione, tutti i composti sono stati acquistati da Sigma-Aldrich.

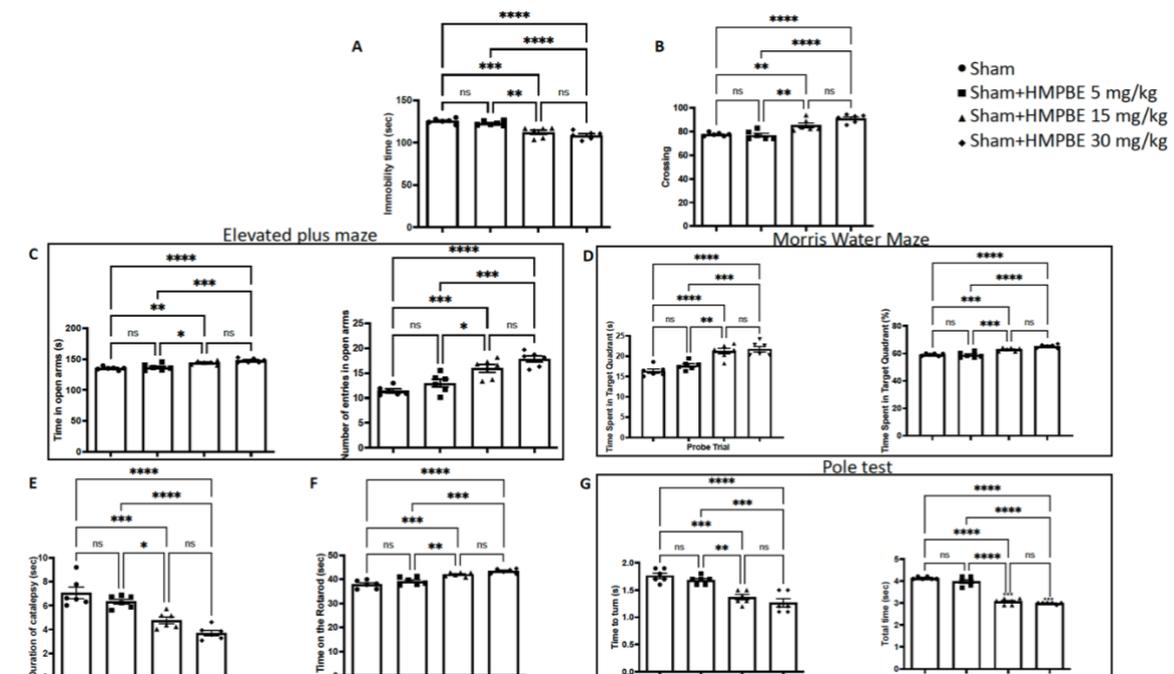
## **6.15 Valutazione statistica**

I dati di questo studio sono presentati come  $\text{media} \pm \text{SEM}$  e rappresentano almeno tre esperimenti condotti in vari giorni. N indica il numero di animali utilizzati negli esperimenti in vivo. Per calcolare il numero di animali utilizzati nella ricerca in vivo è stato utilizzato il software G\*Power 3.1 (Die Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Düsseldorf, Germania). Un istopatologo competente ha esaminato i dati, senza conoscere i trattamenti. Per tutti gli studi statistici è stato utilizzato il software GraphPad Prism 8 (La Jolla, CA, USA). Per l'esame dei dati è stata utilizzata l'analisi ANOVA a una via e poi il test post-hoc di Bonferroni per i confronti multipli. Un valore di p pari o inferiore a 0,05 è stato considerato significativo.

## 7 RISULTATI

### 7.1 Analisi comportamentale della somministrazione a lungo termine di HMPBE

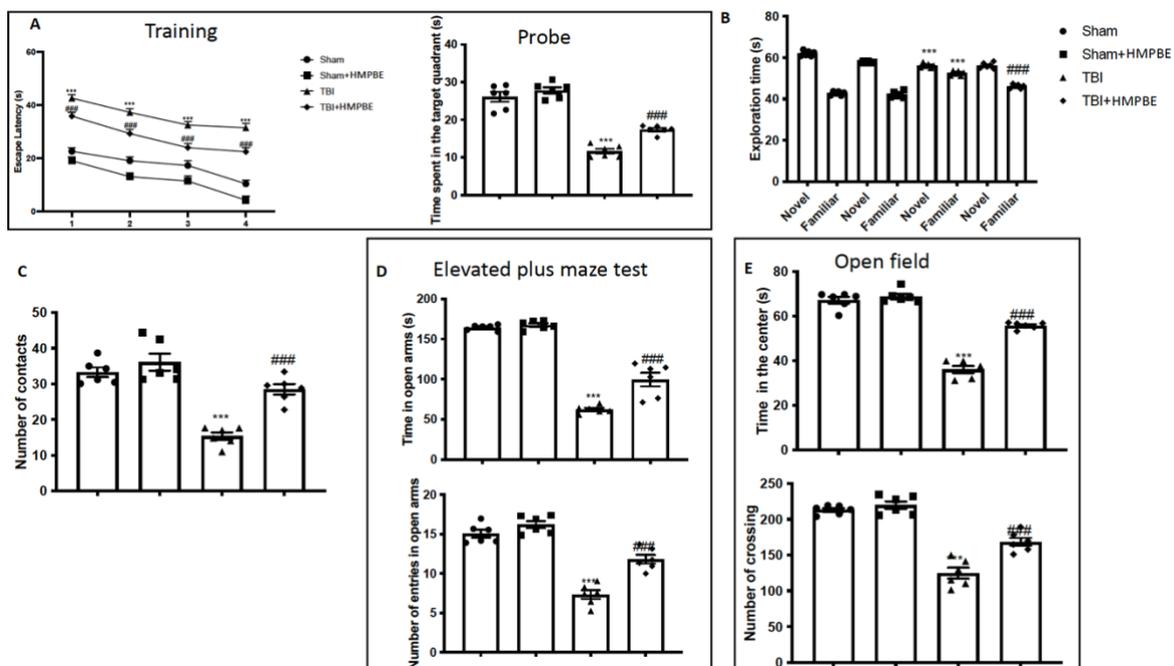
Per trovare la dose adatta ai nostri studi, abbiamo scelto di somministrare ai topi l'HMPBE per via orale a tre diverse concentrazioni crescenti (5-15-30 mg/kg) per un periodo di 3 mesi. L'analisi dei dati dei test di nuoto forzato (Figura 7A), campo aperto (Figura 7B), Test del labirinto a croce elevato (Figura 7C), Test del labirinto acquatico di Morris (Figura 7D), catalessi (Figura 7E), Rotarod (Figura 7F) e palo (Figura 7G) ha mostrato che la concentrazione più bassa di HMPBE non ha alcun effetto significativo sul comportamento, rispetto agli animali sham, mentre 15 e 30 mg/kg migliorano significativamente la memoria e l'apprendimento spaziale e migliorano l'ansia e la depressione. Inoltre, durante il primo esperimento effettuato, non sono stati osservati casi di mortalità, aggressività o variazioni significative del peso.



**Figura 7:** Analisi comportamentale della somministrazione a lungo termine di HMPBE. Nuoto forzato (A), Campo aperto (B), Test del labirinto a croce elevato (C), Test del labirinto acquatico di Morris (D), Catalessi (E), Rotarod (F) e test del palo (G) L'analisi statistica effettuata con GraphPad mostra la valutazione tra tutti i gruppi. \*p < 0,5; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001; \*\*\*\*p < 0,0001. I valori sono rappresentativi di almeno tre esperimenti eseguiti in giorni sperimentali diversi. Ogni dato è espresso come media±S.E.M. da n=6 topi maschi per ogni gruppo.

## **7.2 Effetti dell'HMPBE sull'apprendimento spaziale, sulla funzione di memoria e sulle alterazioni dell'attività locomotoria indotte dalla TBI.**

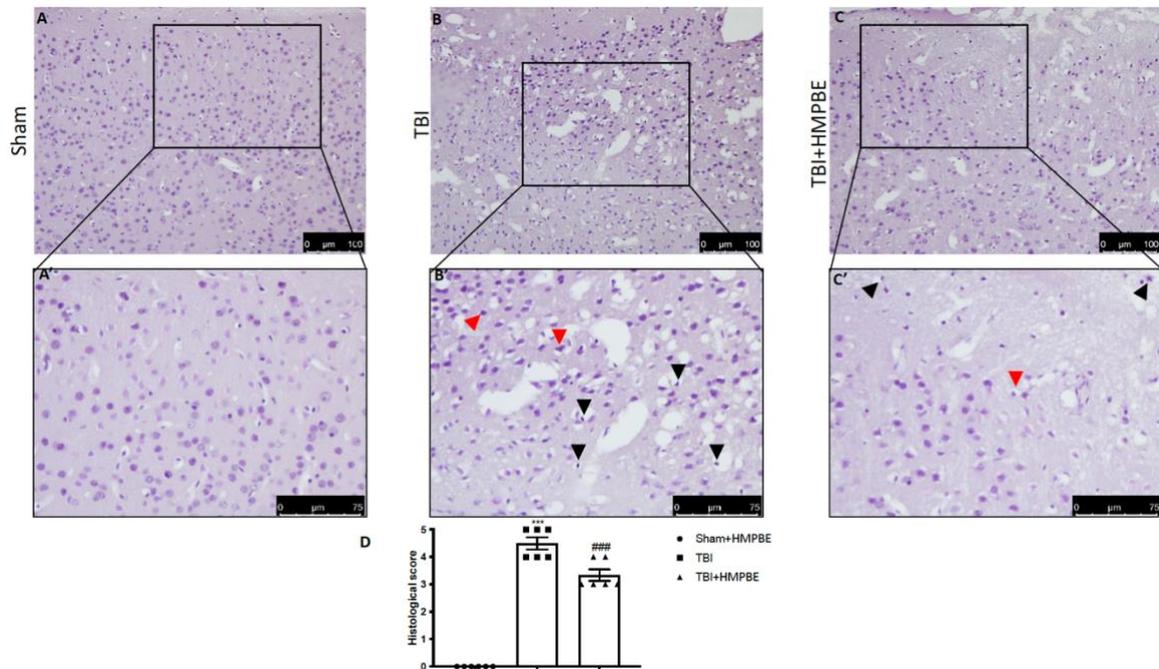
Il test MWM è stato eseguito per valutare se l'HMPBE potesse avere effetti positivi sulle alterazioni della memoria indotte dal TBI. Il tempo impiegato per trovare la piattaforma durante l'allenamento è aumentato negli animali sottoposti a TBI rispetto ai controlli (Figura 8A). Inoltre, il tempo trascorso nel quadrante di destinazione della piattaforma durante la prova era ridotto negli animali sottoposti al trauma (Figura 8A). La somministrazione orale di HMPBE alla dose di 15 mg/kg ha ridotto significativamente la latenza di fuga e aumentato il tempo trascorso nel quadrante di destinazione, indicando un miglioramento dei deficit cognitivi indotti dal trauma (Figura 8A). Abbiamo utilizzato i test NOR (Figura 8B) e SIT (Figura 8C) per valutare eventuali deficit nell'interazione sociale e nel comportamento esplorativo. In entrambi i test, abbiamo riscontrato che, dopo il TBI, il tempo di esplorazione dedicato a oggetti nuovi o conosciuti e il numero di contatti erano statisticamente più bassi (Figura 8B e C, rispettivamente), suggerendo una funzione cognitiva compromessa e una propensione a sviluppare sintomi simili alla demenza. La somministrazione di HMPBE, invece, migliora notevolmente la funzione di memoria danneggiata dal trauma. Inoltre, per valutare i comportamenti a rischio e l'ansia post-trauma nei topi, è stato utilizzato il test EPM. Secondo la bibliografia, gli animali sham trascorrono più tempo nella parte aperta, mentre gli animali sottoposti a trauma trascorrono più tempo nella parte chiusa (Figura 8D), riducendo anche il numero di entrate (Figura 8D). Tuttavia, gli animali che hanno ricevuto la somministrazione orale di HMPBE hanno trascorso più tempo nella parte aperta (Figura 8D) rispetto al gruppo TBI, aumentando anche il numero di ingressi (Figura 8D). L'OFT è stato utilizzato per valutare ulteriormente l'attività locomotoria. A differenza del gruppo sham, abbiamo scoperto che dopo le lesioni da TBI i topi trascorrevano meno tempo al centro (Figura 8E), riducendo anche il numero di attraversamenti (Figura 8E). L'HMPBE ha avuto successo anche in questo caso nel ripristinare l'attività locomotoria (Figura 8E) e il numero di incroci (Figura 8E).



**Figura 8:** Effetti dell'HMPBE sull'apprendimento spaziale, sulla funzione mnemonica, sull'ansia e sull'attività locomotoria. Addestramento e Test del labirinto acquatico di Morris (A); riconoscimento di nuovi oggetti (B); test di interazione sociale (C); test del labirinto elevato (D); campo aperto (E) \*\*\* $p < 0,001$  vs sham; ### $p < 0,001$  vs TBI. Le figure sono rappresentative di almeno tre esperimenti eseguiti in giorni sperimentali diversi. Ogni dato è espresso come media $\pm$ S.E.M. da  $n=6$  topi maschi per ogni gruppo.

### 7.3 L'HMPBE limita le alterazioni istologiche indotte dal TBI

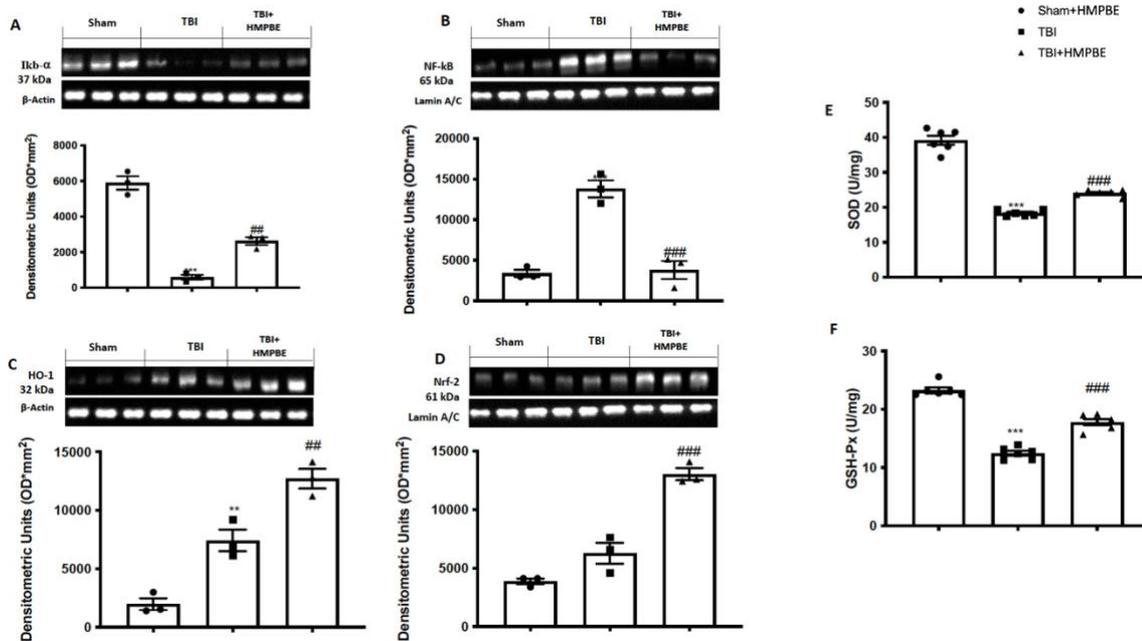
Rispetto al cervello del gruppo sham, l'indagine istologica del campione a livello dell'area perilesionale ha rivelato un notevole danno tissutale, infiammazione e alterazioni dell'architettura nel gruppo TBI 24 ore dopo il trauma (Figura 9A, A' per lo sham e Figura 9B, B' per il TBI, vedi punteggio istologico 9D). Rispetto al gruppo TBI, la somministrazione di HMPBE alla dose di 15 mg/kg ha ridotto notevolmente la gravità del danno cerebrale (Figura 9C, C', vedi punteggio istologico Figura 9D).



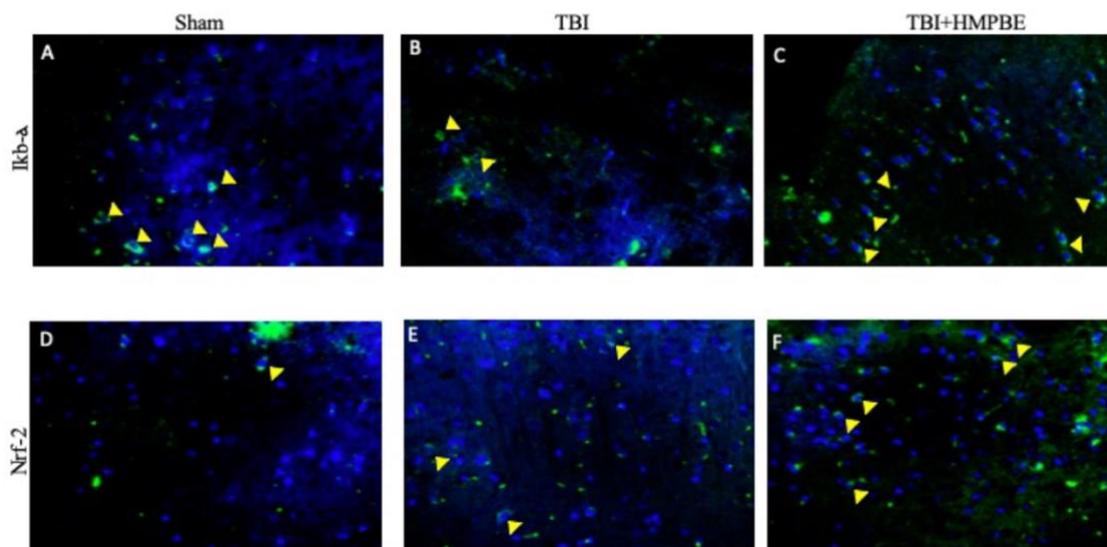
**Figura 9:** L'HMPBE limita l'alterazione istologica indotta da TBI. Immagini rappresentative della struttura istologica di: Sham (A e ingrandimento maggiore A') TBI (B e ingrandimento maggiore B') e TBI+HMPBE (C e ingrandimento maggiore C'). Le frecce rosse indicano i neuroni danneggiati, le frecce nere indicano l'infiltrazione eosinofila. Punteggio istologico (D) \*\*p < 0,01 vs sham; \*\*\*p < 0,001 vs sham; ###p < 0,01 vs TBI; ####p < 0,001 vs TBI. Le figure sono rappresentative di almeno tre esperimenti eseguiti in giorni sperimentali diversi. Ogni dato è espresso come media±S.E.M. da n=6 topi maschi per ogni gruppo.

#### **7.4 Effetti della somministrazione di HMPBE sulle vie infiammatorie e antiossidanti**

Per indagare ulteriormente le vie molecolari attraverso le quali l'HMPBE potrebbe agire, abbiamo analizzato mediante western blot due pathway infiammatori e antiossidanti coinvolti nel danno secondario legato alla TBI. Abbiamo riscontrato che dopo il TBI c'è stata una diminuzione significativa di I $\kappa$ b- $\alpha$  (Figura 10A) e di conseguenza un aumento significativo della traslocazione di Nf-kb (Figura 10B) negli animali sottoposti a TBI rispetto al gruppo sham. Inoltre, abbiamo riscontrato un aumento dell'attivazione di Nrf-2 (Figura 10D) e di conseguenza dell'espressione di HO-1 (Figura 10C), rispetto al gruppo di controllo. La somministrazione di HMPBE alla dose di 15 mg/kg è stata in grado di ripristinare la traslocazione di Nf-kb (Figura 10B) e di I $\kappa$ b- $\alpha$  (Figura 10A) quasi ai livelli fisiologici e, inoltre, di migliorare significativamente l'attivazione di Nrf-2 (Figura 10D) e di conseguenza l'espressione di HO-1 (Figura 10C). Per confermare i risultati ottenuti con i western blot, abbiamo deciso di incubare le sezioni con gli anticorpi immunofluorescenti I $\kappa$ b- $\alpha$  e Nrf2- (Figura 11). Un segnale elevato di I $\kappa$ b- $\alpha$  è chiaramente visibile nello sham (Figura 11A), che diminuisce drasticamente negli animali sottoposti a TBI (Figura 11B). In seguito alla somministrazione di HMBPE, il segnale aumenta significativamente (Figura 11C). Inoltre, è possibile osservare un segnale Nrf-2 basale nelle sezioni degli animali sham (Figura 11D), che aumenta fisiologicamente negli animali sottoposti a TBI (Figura 11E) e che, in seguito alla somministrazione di HMBPE, aumenta significativamente (Figura 11F). Il miglioramento del sistema endogeno antiossidante fisiologico si riflette anche nell'aumento dell'attività della SOD (Figura 10E) e della GSH-Px (Figura 10F) ottenuto dopo la somministrazione di HMPBE.



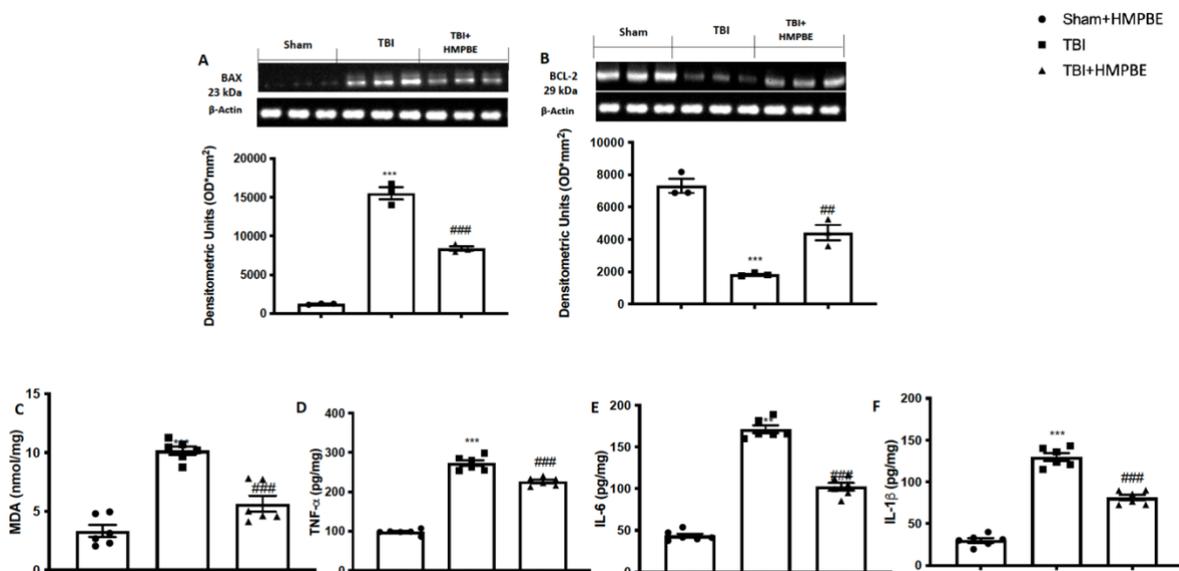
**Figura 10:** Effetti della somministrazione di HMPBE sui percorsi infiammatori e antiossidanti. Immagini rappresentative di western blot e quantificazione relativa di: Ikb- $\alpha$  (A), Nf-kb (B), HO-1 (C) e Nrf-2 (D). Attività SOD (E) e GSH-Px (F). \*\*\*p < 0,001 vs sham; ###p < 0,001 vs TBI. Le figure sono rappresentative di almeno tre esperimenti eseguiti in giorni sperimentali diversi. Ogni dato è espresso come media $\pm$ S.E.M. da n=6 topi maschi per ogni gruppo.



**Figura 11:** Localizzazione immunofluorescente di Ikb-a e Nrf-2 nel TBI acuto. Immagini rappresentative di sezioni cerebrali incubate con l'anticorpo primario Ikb- $\alpha$  di Sham (A), TBI (B) e TBI+HMPBE (C). Immagini rappresentative di sezioni cerebrali incubate con l'anticorpo primario Nrf-2 di Sham (D), TBI (E) e TBI+HMPBE (F). Le figure sono rappresentative di almeno tre esperimenti eseguiti in giorni sperimentali diversi. Ogni dato è espresso come media $\pm$ S.E.M. da n=6 topi maschi per ogni gruppo.

## 7.5 Effetti dell'HMPBE su apoptosi, perossidazione lipidica e rilascio di citochine

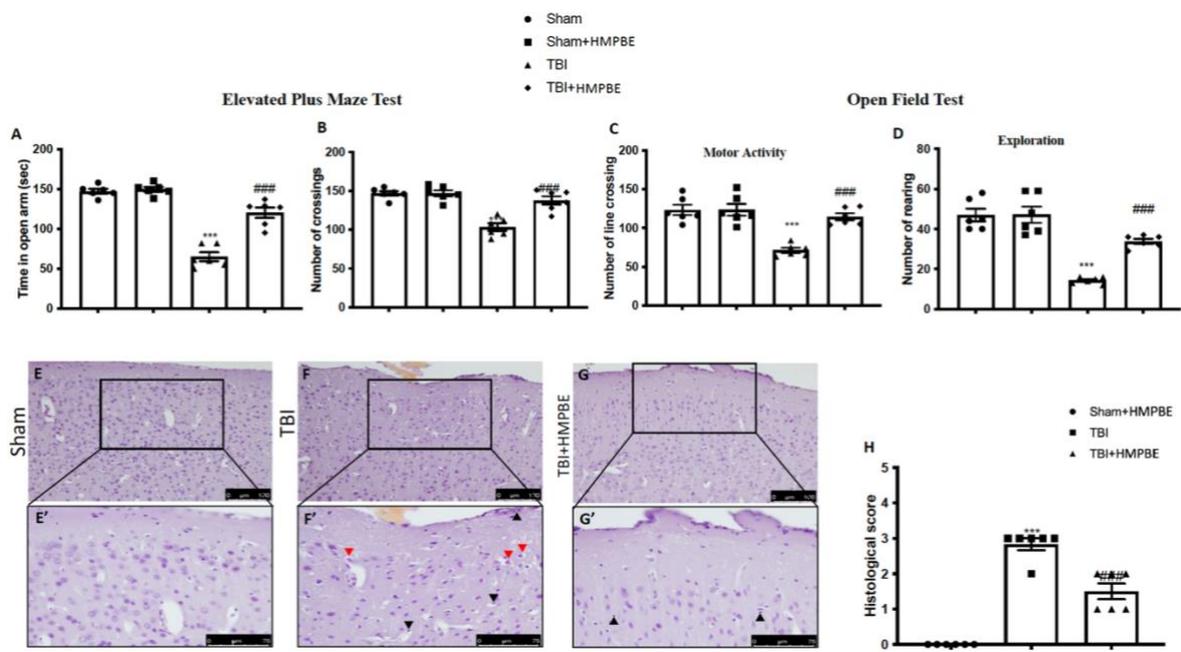
Il TBI ha innescato vie apoptotiche. Per questo motivo, abbiamo identificato i livelli di espressione delle proteine Bax (Figura 12A) e Bcl-2 (Figura 12B), due elementi del meccanismo di morte mitocondriale che sono antagonisti tra loro. Dopo il TBI si nota un aumento significativo dell'espressione di Bax e viceversa una diminuzione significativa dell'espressione di Bcl-2. Data la grande concentrazione di acidi grassi polinsaturi nel cervello, lo stress ossidativo dopo TBI si manifesta principalmente come perossidazione lipidica. Abbiamo riscontrato nel gruppo TBI un aumento significativo della perossidazione lipidica (Figura 12C), rispetto agli animali sham. Inoltre, poiché le citochine sono tra gli ulteriori bersagli genici a valle di Nf-kb, abbiamo utilizzato kit ELISA per misurare i livelli di TNF- $\alpha$  (Figura 12D), IL-6 (Figura 12E) e IL-1b (Figura 12F). Mentre nel gruppo sham sono state identificate basse quantità di queste citochine, i tessuti cerebrali prelevati dai topi TBI hanno mostrato un aumento significativo di tutte le citochine. La somministrazione di HMPBE alla dose di 15 mg/kg riduce significativamente l'apoptosi, la perossidazione lipidica e il rilascio di citochine.



**Figura 12:** L'HMPBE ha ridotto l'apoptosi, la perossidazione lipidica e il rilascio di citochine. Immagini rappresentative di western blot e quantificazione relativa di Bax (A) e Bcl-2 (B); livelli di MDA (C); quantificazione ELISA di TNF- $\alpha$  (D), IL-6 (E) e IL-1b (F). \*\*\*p < 0,001 vs sham; ##p < 0,01 vs TBI; ###p < 0,001 vs TBI. Le figure sono rappresentative di almeno tre esperimenti eseguiti in giorni sperimentali diversi. Ogni dato è espresso come media  $\pm$  S.E.M. da n=6 topi maschi per ogni gruppo.

## **7.6 Effetti della somministrazione di HMPBE sulle alterazioni comportamentali a lungo termine e sui danni istologici indotti dal TBI**

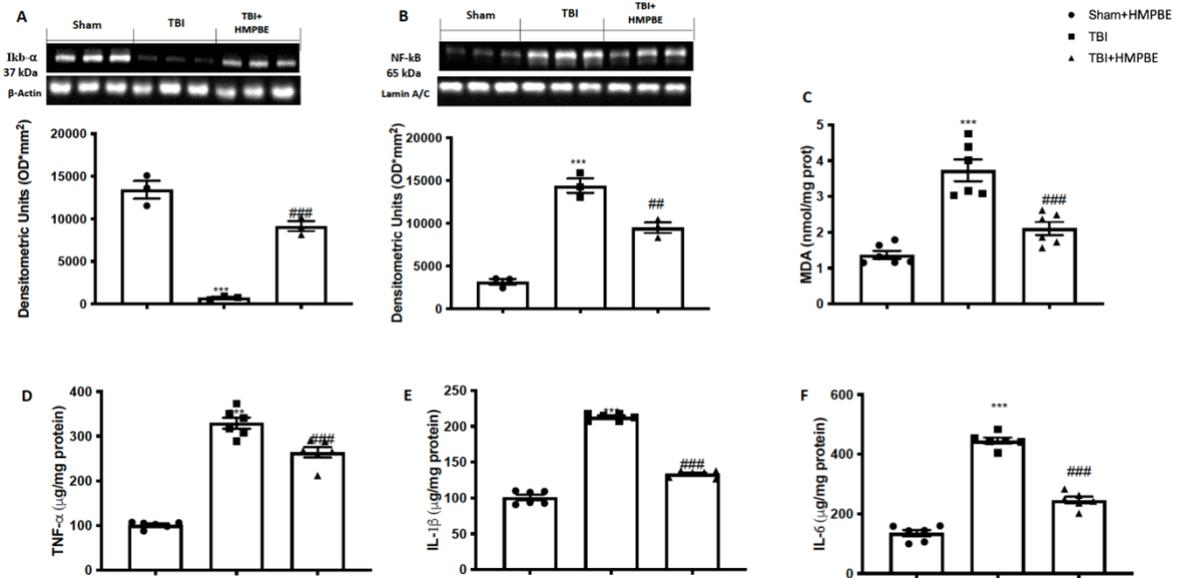
Come fatto in precedenza in acuto, abbiamo confrontato il livello di ansia e la funzione locomotoria nei topi sottoposti a TBI cronica utilizzando i test EPM e OF. Abbiamo notato che gli animali TBI trascorrevano meno tempo nella zona aperta durante il test EPM rispetto ai topi di controllo (Figura 13A) e che il numero di attraversamenti diminuiva (Figura 13B). Inoltre, il test OF ha ulteriormente confermato il livello di ansia riscontrato nei topi con lesioni. Rispetto agli animali Sham, i topi con TBI cronica mostravano una maggiore tigmotassi e una propensione a rimanere vicino al muro (Figura 13C e 13D). Gli animali che hanno ricevuto una somministrazione orale giornaliera di HMPBE alla dose di 15 mg/kg hanno mostrato un comportamento simile a quello del gruppo Sham; infatti, hanno imparato ad avvicinarsi alla zona centrale e ad uscire dal campo aperto con una notevole riduzione della latenza di fuga. 30 giorni dopo l'impatto, l'analisi istologica dei cervelli prelevati dagli animali TBI (Figura 13F e F', vedi punteggio istologico 13H) ha rivelato una notevole modificazione dei tessuti nell'area perilesionale della corteccia rispetto ai topi Sham (Figura 13E e E', vedi punteggio istologico 13H). In questo caso, abbiamo riscontrato che l'HMPBE ha ridotto la gravità del danno cerebrale accelerando il recupero fisiologico (Figura 13G e G', vedi punteggio istologico 13H).



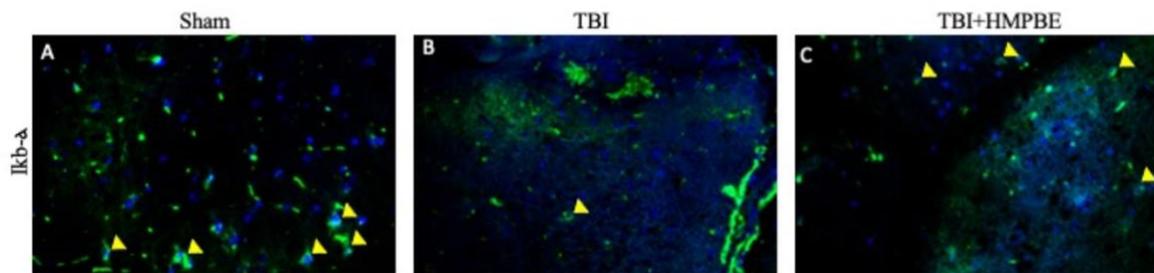
**Figura 13:** Gli HMPBE migliorano l'ansia post-infortunio, l'attività locomotoria e migliorano il recupero istologico dopo TBI cronico. Test del labirinto a croce elevato (A) e (B); test del campo aperto (C) e (D); immagini rappresentative della struttura istologica di: Sham (E e ingrandimento maggiore E') TBI (F e ingrandimento maggiore F') e TBI+HMPBE (G e ingrandimento maggiore G'). Punteggio istologico (H). Le frecce rosse indicano i neuroni danneggiati, le frecce nere indicano l'infiltrazione eosinofila. \*\*\* $p < 0,001$  vs sham; ### $p < 0,001$  vs TBI. Le figure sono rappresentative di almeno tre esperimenti eseguiti in giorni sperimentali diversi. Ogni dato è espresso come media $\pm$ S.E.M. da  $n=6$  topi maschi per ciascun gruppo.

## **7.7 La somministrazione di HMPBE ha ridotto l'attivazione delle vie Nf-kb.**

Abbiamo anche utilizzato l'analisi Western blot per esaminare l'espressione delle vie Nf-kb per determinare come l'HMPBE abbia ridotto i processi neuroinfiammatori che hanno portato allo sviluppo di PD in seguito a TBI. I risultati hanno rivelato che Ikb- $\alpha$  (Figura 14A) era espresso a un livello basso nel gruppo di controllo, mentre una grande quantità di scomposizione di questa proteina è stata osservata in risposta alla TBI. Secondo i nostri risultati, i livelli di traslocazione nucleare di Nf-kb (Figura 14B) erano bassi nel gruppo Sham e significativamente più alti 30 giorni dopo la TBI. Per confermare i risultati ottenuti con i western blot, abbiamo deciso di incubare le sezioni con gli anticorpi immunofluorescenti Ikb- $\alpha$  (Figura 15). Un segnale elevato di Ikb- $\alpha$  è chiaramente visibile nello sham (Figura 15A), che diminuisce drasticamente negli animali sottoposti a TBI (Figura 15B). Dopo la somministrazione di HMBPE, il segnale aumenta in modo significativo (Figura 15C). Inoltre, abbiamo studiato gli stessi parametri presi in considerazione prima e durante la TBI cronica. Abbiamo notato che 30 giorni dopo la TBI si è verificato un aumento dei livelli di MDA (Figura 14C) e di TNF-a (Figura 14D), IL-1b (Figura 14E) e IL-6 (Figura 14F). Come dimostrato dopo una TBI acuta, anche in questo caso la somministrazione di HMPBE ha ridotto significativamente l'attivazione delle vie Nf-kb, la perossidazione lipidica e il rilascio di citochine.



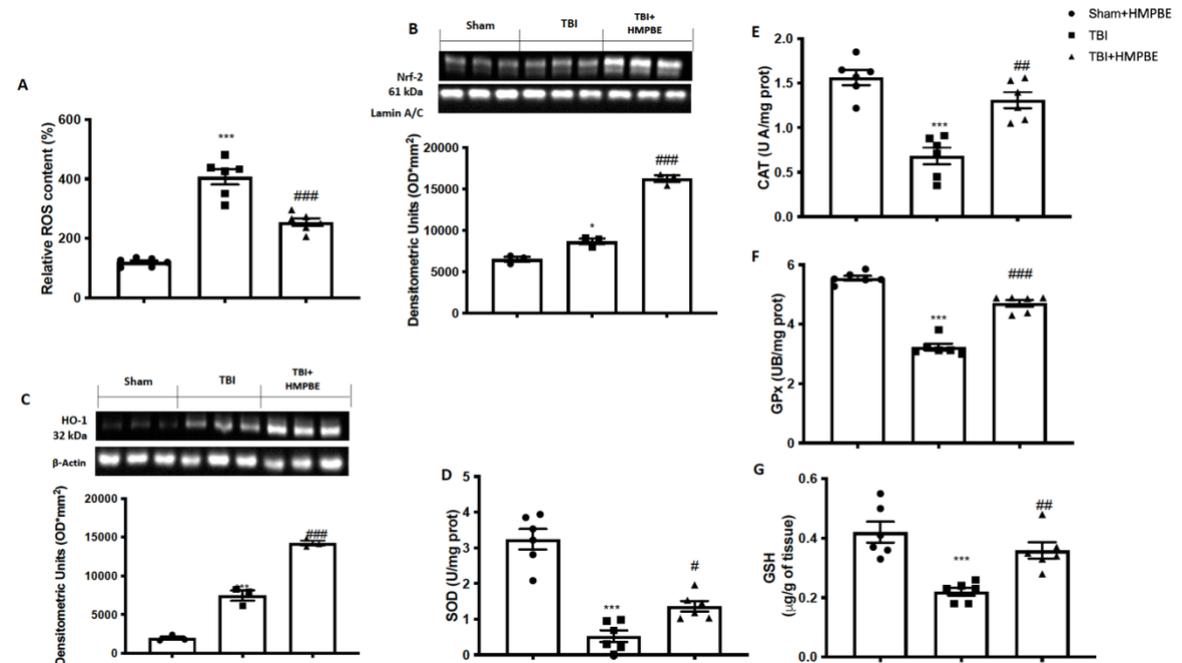
**Figura 14:** L'HMPBE ha ridotto l'attivazione di Nf-κB, la perossidazione lipidica e il rilascio di citochine dopo TBI cronico. Immagini rappresentative di western blot e quantificazione relativa di: Ikb-α (A), Nf-κB (B), livelli di MDA (C); quantificazione ELISA di TNF-α (D), IL-1β (E) e IL-6 (F). \*\*\*p < 0,001 vs sham; ##p < 0,01 vs TBI; ###p < 0,001 vs TBI. Le cifre sono rappresentative di almeno tre esperimenti eseguiti in giorni sperimentali diversi. Ogni dato è espresso come media ± SEM da n=6 topi maschi per ogni gruppo.



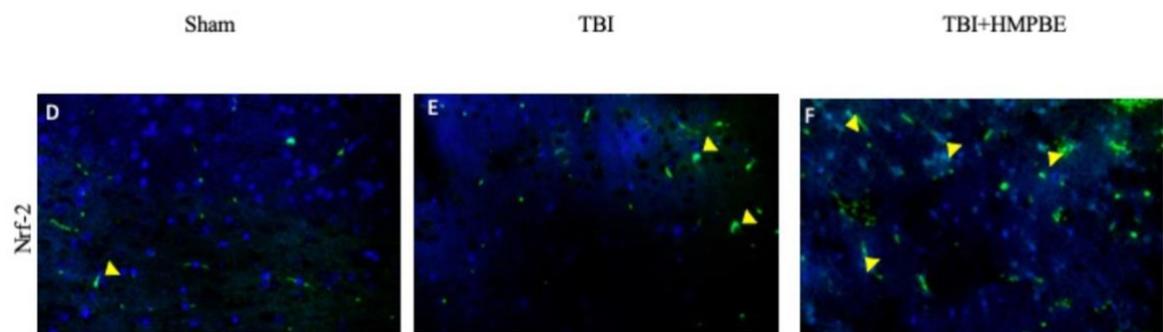
**Figura 15:** Localizzazione immunofluorescente di Ikb-α nel TBI cronico. Immagini rappresentative di sezioni cerebrali incubate con l'anticorpo primario Ikb-α di Sham (A), TBI (B) e TBI+HMPBE (C). Le figure sono rappresentative di almeno tre esperimenti eseguiti in giorni sperimentali diversi. Ogni dato è espresso come media ± S.E.M. da n=6 topi maschi per ogni gruppo.

### **7.8 Influenza dell'HMPBE sullo stress ossidativo dopo TBI cronico**

L'aumento della produzione di geni che aiutano nella rimozione dei radicali liberi, il ripristino della funzione mitocondriale e geni sensibili allo stress per la sopravvivenza cellulare, noti come vitageni, sono tutti collegati allo stress ossidativo nel cervello che si verifica dopo TBI [124]. In questo contesto, abbiamo valutato in che modo il percorso Nrf2/HO-1 fosse influenzato dalla somministrazione di HMPBE. I nostri risultati hanno dimostrato che 30 giorni dopo l'induzione del TBI si è verificato un aumento significativo del contenuto di ROS nel cervello (Figura 16A) e un'attivazione fisiologica dei percorsi Nrf-2 (Figura 16B) fortemente collegati all'espressione di HO-1 (Figura 16C). Inoltre, un segnale Nrf-2 basale può essere osservato nelle sezioni animali Sham (Figure 17D), che aumenta fisiologicamente negli animali sottoposti a TBI (Figure 17E), che a seguito della somministrazione di HMBPE è significativamente aumentato (Figura 17F). D'altra parte, 1 mese dopo il trauma, la difesa antiossidante fisiologica diminuisce significativamente, come dimostrato dalla riduzione dell'attività di SOD (Figura 16D), CAT (Figura 16E), GPx (Figura 16F) e GSH (Figura 16G). La somministrazione giornaliera di HMPBE migliora significativamente la traslocazione di Nrf-2, aumentando il sistema antiossidante endogeno e riducendo lo stress ossidativo nel cervello.



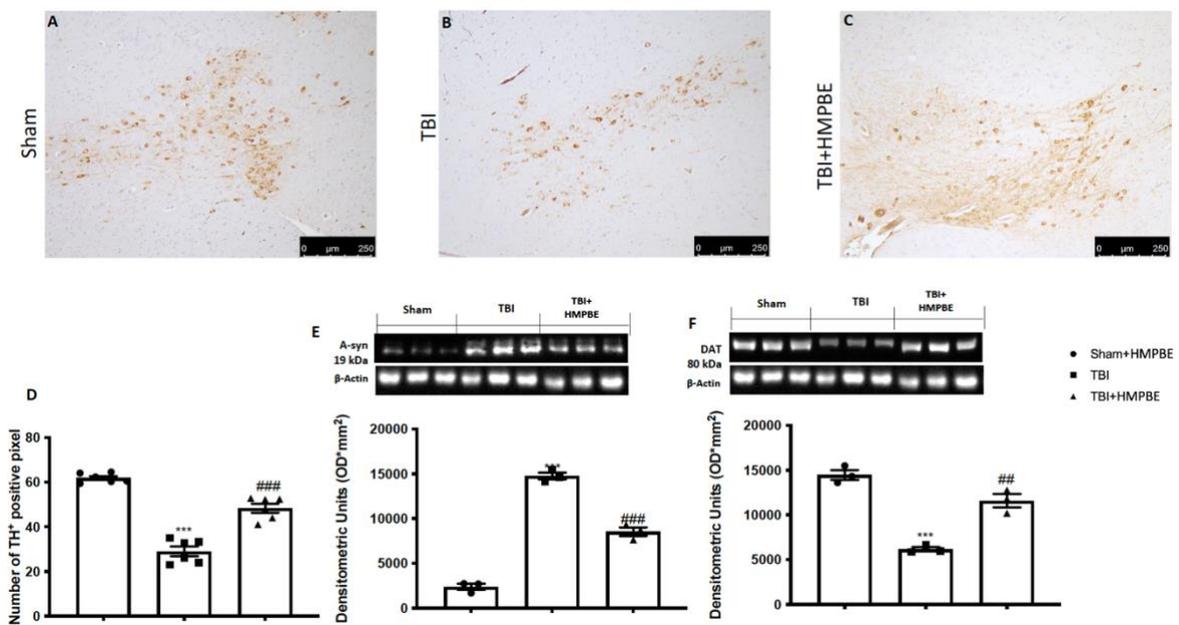
**Figura 16:** Effetti della somministrazione giornaliera di HMPBE contro lo stress ossidativo indotto da TBI cronico. Contenuto di ROS (A); immagini rappresentative di western blot e quantificazione relativa di Nrf-2 (B) e HO-1 (C); SOD (D); CAT (E); GPx (F) e GSH (G). \* $p < 0,05$  vs sham \*\*\* $p < 0,001$  vs sham; # $p < 0,05$  vs TBI; ### $p < 0,01$  vs TBI #### $p < 0,001$  vs TBI. Le cifre sono rappresentative di almeno tre esperimenti eseguiti in giorni sperimentali diversi. Ogni dato è espresso come media $\pm$ SEM da  $n=6$  topi maschi per ogni gruppo.



**Figura 17:** Localizzazione immunofluorescente di Nrf-2 nel TBI cronico. Immagini rappresentative di sezioni cerebrali incubate con l'anticorpo primario Nrf-2 di Sham (D), TBI (E) e TBI+HMPBE (F). Le figure sono rappresentative di almeno tre esperimenti eseguiti in giorni sperimentali diversi. Ogni dato è espresso come media $\pm$ S.E.M. da  $n=6$  topi maschi per ogni gruppo.

## 7.9 Impatto della somministrazione di HMPBE sui cambiamenti dei markers del PD durante TBI cronico

Sezioni di mesencefalo di topi in ciascun gruppo sono state colorate con TH per vedere se il TBI cronico potesse cambiare l'espressione del marker PD-simile. Rispetto al gruppo Sham (Figura 18A), l'espressione dei neuroni TH-positivi è stata significativamente ridotta 30 giorni dopo il TBI (Figura 18B).  $\alpha$ -syn e DAT, due biomarcatori del PD, sono stati anche analizzati tramite Western blot nelle aree del mesencefalo. Abbiamo scoperto che rispetto al gruppo Sham, il TBI cronico ha chiaramente aumentato  $\alpha$ -syn (Figura 18E) e ridotto significativamente l'espressione di DAT (Figura 18F). HMPBE è stato somministrato quotidianamente a una dose di 15 mg/kg e abbiamo osservato un notevole ripristino dei neuroni TH-positivi (Figura 18C) e dell'espressione di DAT (Figura 18F) nonché una riduzione dell'accumulo di  $\alpha$ -syn (Figura 18E).



**Figura 18:** Impatto della somministrazione di HMPBE sui cambiamenti del marker del PD durante TBI cronico. Analisi immunohistochemica di TH nella sezione del mesencefalo da: Sham (A), TBI (B) e TBI+HMPBE (C); quantificazione dei neuroni TH positivi (D). Analisi Western Blot e quantificazione relativa di  $\alpha$ -syn (E) e DAT (F). \*\*\* $p < 0,001$  vs sham; \*\* $p < 0,01$  vs sham; # $p < 0,05$  vs CYP; ### $p < 0,01$  vs TBI; #### $p < 0,001$  vs TBI. I valori sono rappresentativi di almeno tre esperimenti eseguiti in giorni sperimentali diversi. Ogni dato è espresso come media  $\pm$  S.E.M. da  $n=6$  topi maschi per ogni gruppo.

## 8. DISCUSSIONE

Uno dei problemi di salute pubblica più significativi è il TBI, comunemente definito "epidemia silenziosa" poiché le difficoltà che causa richiedono tempo per manifestarsi. I processi alla base della patologia del TBI sono stati ampiamente definiti dalla ricerca. Questi comportano una lesione primaria causata da forze biomeccaniche dirette e una lesione secondaria che segue un trauma cranico e causa danni cerebrali e morte. Un TBI può causare sintomi comportamentali e fisici e può lasciare la vittima completamente guarita o permanentemente disabile. Inoltre, gli eventi secondari correlati al TBI possono influenzare la qualità della vita dei pazienti. I pazienti possono avere deterioramento cognitivo, rischio di demenza e atrofia cerebrale [54]. Nel TBI, ci sono diversi neurotrasmettitori, mediatori biochimici, citochine e cambiamenti genetici che svolgono un ruolo nei meccanismi molecolari del danno tissutale. Alcuni studi segnalano l'eccitotossicità come componente patofisiologica chiave nel TBI, mentre altri studi menzionano il ruolo fondamentale che calcio, ossido nitrico e specie reattive dell'ossigeno svolgono nell'indurre l'apoptosi [158]. Come prima cosa, nel TBI, la microglia viene attivata rapidamente e cambia la sua morfologia per formare corpi cellulari più grandi con strutture cellulari ramificate. Dopo l'attivazione, la microglia prolifera e migra verso la sede della lesione e induce il rilascio di citochine [159]. Il TBI si presenta in varie forme che vanno da lievi alterazioni della coscienza a uno stato comatoso inesorabile e alla morte. Nella forma più grave di TBI, l'intero cervello è interessato da un tipo diffuso di lesione e gonfiore. Le modalità di trattamento variano ampiamente in base alla gravità della lesione e vanno da sedute quotidiane di terapia cognitiva a interventi chirurgici radicali come le craniectomie decompressive bilaterali. Gli studi sui metaboliti secondari delle piante sono aumentati negli ultimi 16 anni e questi composti sono stati seriamente presi in considerazione per la loro capacità di migliorare la salute umana. Numerosi fitochimici sono stati scoperti in piante naturali, tra cui frutta, verdura, cereali e altre erbe terapeutiche, e si è scoperto che stimolano il percorso di segnalazione Nrf2 per avere effetti neuroprotettivi nel TBI. Questi fitochimici organici sono in genere impiegati per ridurre il danno secondario del TBI come attivatori Nrf2 [97]. Gli studi sull'HMPBE sono ancora pochi e limitati, per questo motivo, nel nostro primo step abbiamo voluto dimostrare che la somministrazione prolungata di HMPBE a diverse concentrazioni era in grado di migliorare il comportamento dei topi. Utilizzando 3 dosi diverse abbiamo stabilito che la dose più bassa con un effetto significativo era di 15 mg/kg. Dopo aver identificato la dose minima con un effetto benefico sul comportamento,

abbiamo utilizzato questa dose per pianificare i successivi due studi, TBI acuto e cronico. I modelli animali di trauma sono frequentemente utilizzati per studiare il problema clinico prevalente negli esseri umani. La risposta infiammatoria acuta causa l'attivazione del fattore trascrizionale nucleare, l'assemblaggio del complesso pro-infiammatorio, il rilascio di mediatori dell'infiammazione e un aumento dello stress ossidativo dopo un impatto corticale regolato [123, 124]. Il TBI causa anche processi secondari negli animali che provocano condizioni neurologiche come memoria e apprendimento compromessi e convulsioni. Nel nostro studio, una singola somministrazione orale 1 ora dopo l'induzione del trauma è stata in grado di migliorare l'apprendimento spaziale e la funzione della memoria, nonché l'ansia post-infortunio e l'attività locomotoria alterata dopo il trauma. I percorsi molecolari con cui agisce sono probabilmente dovuti alla sua capacità di modulare Nf-kb e Nrf-2 e i percorsi apoptotici. Secondo la letteratura, modulando questi due percorsi è stata modulata anche l'intera cascata a valle, incluso il rilascio di citochine e la perossidazione lipidica, nonché il potenziamento degli enzimi antiossidanti fisiologici. Il TBI è stato implicato come fattore di rischio per diverse malattie neurodegenerative, ma la prova più forte è legata allo sviluppo di PD. L'mTBI è il più comune ed è definito da una perdita di coscienza minima, se non nulla, e dall'assenza di danni osservabili significativi al tessuto cerebrale. L'mTBI è responsabile di un rischio del 56% più alto di sviluppare PD nei veterani degli Stati Uniti e il rischio aumenta con la gravità della lesione [54]. Date le simili reazioni fisiologiche al PD e al TBI, è possibile che il TBI acceleri la patologia PD di base in modo additivo o sinergico, trasformando la malattia PD preclinica in una patologia PD conclamata. Poiché sia i topi che i ratti hanno risposte fisiologiche comparabili a quelle riscontrate nel tessuto cerebrale umano post-mortem, questi animali costituiscono un'eccellente punto di partenza per studi futuri che chiariranno come l'infiammazione possa influenzare la fisiopatologia del TBI e portare allo sviluppo del PD [160, 161]. Anche 30 giorni dopo il TBI gli eventi neuroinfiammatori e di stress ossidativo erano ancora presenti nel cervello insieme alla riduzione dei neuroni dopaminergici e all'accumulo di proteina  $\alpha$ -sin. In conclusione, è stato dimostrato per la prima volta che l'HMPBE è in grado di agire sui processi molecolari che collegano il TBI cronico e il PD, la nostra scoperta apre la strada ai suoi potenziali trattamenti neuroprotettivi. La neuroinfiammazione del cervello sembra essere ridotta in parte a causa della sua apparente azione sul pathway Nf-kb. Inoltre, gli effetti di questo composto sullo stress ossidativo sono accompagnati da un aumento della risposta antiossidante fisiologica dovuta alla modulazione del pathway Nrf-2. La neuroinfiammazione cronica è venuta alla luce come un potenziale elemento contributivo al cambiamento del comportamento insieme

a queste risposte allo stress cellulare. Studi preclinici hanno dimostrato che un grande carico infiammatorio è collegato al TBI. Inoltre, è stato dimostrato che la neuroinfiammazione nel cervello degli sportivi in pensione può durare per anni dopo un infortunio. Neuroinfiammazione e sintomi neurocomportamentali sono collegati da recenti ricerche cliniche. Supponiamo che la riduzione dello stress cellulare dopo TBI avrà un impatto favorevole sull'ambiente infiammatorio extracellulare, portando a migliori risultati comportamentali [162]. Per questo motivo, oltre ai risultati che dimostrano gli effetti benefici della somministrazione di HMPBE sui processi di apprendimento e memoria, abbiamo dimostrato che era in grado di migliorare le alterazioni comportamentali indotte dal trauma sia durante la fase acuta che cronica, limitando così l'insorgenza di ansia alla depressione. HMPBE può quindi essere utilizzato come integratore alimentare per fermare gli effetti neurodegenerativi del trauma cranico cronico.

## **9. CONCLUSIONI**

Questo studio fornisce la prima prova che l'HMPBE può contrastare l'infiammazione, lo stress ossidativo e l'apoptosi indotti dopo TBI nel topo sia in forma acuta che cronica. Dato che la neuroinfiammazione svolge un ruolo importante nel neurotrauma, l'indagine sulla generazione di radicali liberi, così come la determinazione delle capacità antiossidanti e degli effetti degli antiossidanti, può essere importante per valutare l'equilibrio complessivo dello stress ossidativo dopo una lesione cerebrale acuta e cronica. Inoltre, in questo studio dimostriamo per la prima volta che la somministrazione di HMPBE potrebbe essere utile per migliorare i deficit cognitivi indotti dopo il trauma.

Le terapie neuroprotettive acute mirano a bloccare la cascata molecolare della lesione in seguito a TBI. Sebbene la neuroprotezione sia una strategia importante per il trattamento di tale lesione, ad oggi non sono stati identificati agenti neuroprotettivi efficaci dagli studi clinici su TBI. Un altro aspetto importante è che la maggior parte delle strategie di sperimentazione clinica ha utilizzato composti che hanno come bersaglio un singolo meccanismo patofisiologico, anche se molti meccanismi sono coinvolti nella lesione secondaria dopo TBI, specialmente durante il recupero a lungo termine. Il nostro studio presenta molte limitazioni relative ad altri eventi indotti da TBI, come astrogliosi reattiva, perdita di neuroni, danno assonale, demielinizzazione e microgliosi, che hanno un effetto sull'intero recupero. Inoltre, sono obbligatori altri studi per indagare tutti gli eventi a cascata che iniziano con l'impatto e durano per tutta la vita del paziente. Le prospettive future del nostro studio potrebbero essere testare l'HMBPE su diversi aspetti del trauma che non sono stati presi in considerazione fino ad oggi per indagare se la combinazione unica di questo composto è in grado di agire su più fronti.

## **10. Prospettive future**

Da migliaia di anni è noto che l'alimentazione e la salute sono legate tra loro. Negli ultimi anni, numerosi studi traslazionali hanno esplorato l'uso di polifenoli, composti naturali con potenziali proprietà neuroprotettive, per contrastare i danni neuroinfiammatori associati alla neurodegenerazione, passando da modelli animali a studi clinici umani. La comprensione dei meccanismi con cui i polifenoli agiscono a livello molecolare è fondamentale per poterli

utilizzare come integratori alimentari per prevenire i disturbi neurodegenerativi. In particolare, ratti e topi sono stati utilizzati come modelli per simulare condizioni patologiche come l'Alzheimer, il Parkinson e altre malattie neurodegenerative, in cui i meccanismi di neuroinfiammazione e stress ossidativo giocano un ruolo cruciale. Diversi esperimenti hanno dimostrato che il trattamento con polifenoli, come il resveratrolo, la curcumina e i flavonoidi, riduce la produzione di citochine infiammatorie e il rilascio di specie reattive dell'ossigeno (ROS) nel sistema nervoso centrale, modulando le vie di segnalazione dell'infiammazione e migliorando la funzione cognitiva nei modelli animali. Questi effetti si riflettono in un miglioramento della plasticità sinaptica, nella riduzione della morte cellulare neuronale e nel rallentamento della progressione dei segni comportamentali legati alla neurodegenerazione [163]. L'interesse per il potenziale terapeutico dei polifenoli si è esteso anche agli studi clinici sugli esseri umani, sebbene i risultati siano ancora contrastanti e richiedano ulteriori conferme. Tuttavia, questi studi traslazionali suggeriscono che i polifenoli possano rappresentare una strategia promettente per prevenire o rallentare l'insorgenza e la progressione delle malattie neurodegenerative, grazie alla loro capacità di modulare i processi infiammatori e ossidativi a livello del sistema nervoso centrale. Studi preclinici su modelli animali hanno evidenziato che i polifenoli sono in grado di modulare meccanismi chiave della neurodegenerazione, come l'infiammazione microgliale e l'accumulo di proteine aggreganti, riducendo i danni neuronali e migliorando la funzionalità cognitiva. Tuttavia, la sfida principale per il trasferimento di questi risultati in clinica riguarda la biodisponibilità dei polifenoli, che in molti casi è limitata dalla loro bassa solubilità e velocità di assorbimento. Le future ricerche potrebbero concentrarsi su strategie di miglioramento della biodisponibilità, come l'uso di nanoparticelle o formulazioni lipidiche, per rendere questi composti più efficaci nel raggiungere il sistema nervoso centrale. Inoltre, l'ottimizzazione delle dosi e dei regimi di somministrazione, così come la valutazione degli effetti collaterali a lungo termine, saranno cruciali per l'avanzamento di questi composti come trattamenti terapeutici reali per malattie neurodegenerative nell'uomo. L'approccio traslazionale, che connette studi preclinici e clinici, è quindi fondamentale per comprendere appieno il potenziale terapeutico dei polifenoli, promuovendo un futuro in cui queste sostanze naturali possano essere utilizzate per rallentare o fermare la progressione di malattie come l'Alzheimer e il Parkinson [164]. In conclusione, i polifenoli e i loro metaboliti sono composti essenziali con molteplici attività biologiche. La loro efficacia come antiossidanti e la loro capacità di modulare le vie di segnalazione pro-sopravvivenza o anti-apoptotiche sono essenziali per prevenire e rallentare i disturbi neurodegenerativi. Inoltre,

considerando che sono sicuri e hanno una tossicità molto bassa, è facile testarne l'efficacia in studi preclinici e clinici per il trattamento delle malattie neurodegenerative. Infine, negli ultimi anni diversi polifenoli, o loro derivati sintetici, sono stati brevettati come farmaci contro varie malattie umane. Considerando che molti trattamenti attualmente utilizzati causano effetti collaterali significativi, non sorprende che oggi si ponga molta attenzione agli aspetti positivi che gli alimenti hanno, tra l'altro, anche sulle patologie neurologiche sempre più diffuse nel mondo moderno. Proprio perché le patologie neurodegenerative sono caratterizzate da una lunga fase preclinica, è possibile andare ad agire con l'alimentazione per prevenire l'insorgenza o rallentare la progressione della malattia. I nutrienti, infatti, agiscono come "nutraceutici", cioè come principi alimentari che hanno effetti benefici sulla salute. L'inclusione di polifenoli come supplemento nella dieta, come l'HMPBE, può contribuire a migliorare la salute, sostenere il sistema immunitario e favorire il benessere mentale, grazie alla loro capacità di modulare le risposte cellulari e ridurre lo stress ossidativo. Inoltre, è stato in grado di gestire caratteristiche dell'Alzheimer come cambiamenti comportamentali correlati alle funzioni cognitive e alla memoria, livelli di Tau fosforilata e l'accumulo di  $\beta$ -amiloide e la degenerazione neuronale. Certamente, l'assunzione di polifenoli non può curare la malattia di Alzheimer, ma è un integratore alimentare che può rallentare il decorso della malattia e alleviare i sintomi collegati a questa patologia [165]. In conclusione, l'alimentazione riveste un ruolo cruciale nella salute e nella prevenzione delle malattie. I polifenoli sono riconosciuti per le loro proprietà antiossidanti e neuroprotettive e per questo la ricerca continua a essere fondamentale per ottimizzare il loro impiego terapeutico e migliorare la qualità della vita.

## BIBLIOGRAFIA

1. Lefevre-Dognin, C., et al., *Definition and epidemiology of mild traumatic brain injury*. Neurochirurgie, 2021. **67**(3): p. 218-221.
2. Fesharaki-Zadeh, A. and D. Datta, *An overview of preclinical models of traumatic brain injury (TBI): relevance to pathophysiological mechanisms*. Frontiers in cellular neuroscience, 2024. **18**: p. 1371213.
3. Thapa, K., et al., *Traumatic brain injury: mechanistic insight on pathophysiology and potential therapeutic targets*. Journal of Molecular Neuroscience, 2021. **71**(9): p. 1725-1742.
4. Rauchman, S.H., et al., *Traumatic brain injury: Mechanisms, manifestations, and visual sequelae*. Frontiers in neuroscience, 2023. **17**: p. 1090672.
5. Hakiminia, B., et al., *Oxidative stress and mitochondrial dysfunction following traumatic brain injury: From mechanistic view to targeted therapeutic opportunities*. Fundamental & Clinical Pharmacology, 2022. **36**(4): p. 612-662.
6. Ismail, H., et al., *Traumatic brain injury: oxidative stress and novel anti-oxidants such as mitoquinone and edaravone*. Antioxidants, 2020. **9**(10): p. 943.
7. Gyoneva, S. and R.M. Ransohoff, *Inflammatory reaction after traumatic brain injury: therapeutic potential of targeting cell-cell communication by chemokines*. Trends Pharmacol Sci, 2015. **36**(7): p. 471-80.
8. Sanchez, C.M., et al., *Early life stress exacerbates outcome after traumatic brain injury*. Journal of neurotrauma, 2021. **38**(5): p. 555-565.
9. Lumba-Brown, A., et al., *Diagnosis and management of mild traumatic brain injury in children: a systematic review*. JAMA pediatrics, 2018. **172**(11): p. e182847-e182847.
10. Nguyen, R., et al., *The international incidence of traumatic brain injury: a systematic review and meta-analysis*. Canadian journal of neurological sciences, 2016. **43**(6): p. 774-785.
11. Haarbauer-Krupa, J., et al., *Epidemiology of Chronic Effects of Traumatic Brain Injury*. Journal of Neurotrauma, 2021. **38**(23): p. 3235-3247.
12. James, S.L., et al., *Global, regional, and national burden of traumatic brain injury and spinal cord injury, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016*. The Lancet Neurology, 2019. **18**(1): p. 56-87.
13. Peterson, A.B., et al., *Surveillance report of traumatic brain injury-related emergency department visits, hospitalizations, and deaths, United States, 2014*. 2019.
14. Haarbauer-Krupa, J., et al., *Variations in mechanisms of injury for children with concussion*. The Journal of pediatrics, 2018. **197**: p. 241-248. e1.
15. Mollayeva, T., S. Mollayeva, and A. Colantonio, *Traumatic brain injury: sex, gender and intersecting vulnerabilities*. Nature Reviews Neurology, 2018. **14**(12): p. 711-722.
16. Haarbauer-Krupa, J.K., et al., *Healthcare professional involvement and RTP compliance in high school athletes with concussion*. Brain injury, 2018. **32**(11): p. 1337-1344.

17. Lindquist, L.K., H.C. Love, and E.B. Elbogen, *Traumatic brain injury in Iraq and Afghanistan veterans: new results from a national random sample study*. The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences, 2017. **29**(3): p. 254-259.
18. Defense and V.B.I. Center, *DoD worldwide numbers for TBI*. 2018, Defense Health Agency.
19. Bouldin, E.D., et al., *Health phenotypes and neurobehavioral symptom severity among post-9/11 veterans with mild traumatic brain injury: A Chronic Effects of Neurotrauma Consortium study*. The Journal of head trauma rehabilitation, 2021. **36**(1): p. 10-19.
20. Cogan, A.M., V.K. McCaughey, and J. Scholten, *Gender differences in outcomes after traumatic brain injury among service members and veterans*. Pm&r, 2020. **12**(3): p. 301-314.
21. Coronado, V.G., et al., *Trends in Traumatic Brain Injury in the U.S. and the public health response: 1995-2009*. J Safety Res, 2012. **43**(4): p. 299-307.
22. Djordjevic, J., M. Golam Sabbir, and B. C Albeni, *Traumatic brain injury as a risk factor for Alzheimer's disease: is inflammatory signaling a key player?* Current Alzheimer Research, 2016. **13**(7): p. 730-738.
23. Mendez, M.F., *What is the relationship of traumatic brain injury to dementia?* Journal of Alzheimer's disease, 2017. **57**(3): p. 667-681.
24. Chen, G., et al., *Inhibitory effect on cerebral inflammatory response following traumatic brain injury in rats: a potential neuroprotective mechanism of N-acetylcysteine*. Mediators of inflammation, 2008. **2008**(1): p. 716458.
25. Joy, T., M.S. Rao, and S. Madhyastha, *N-acetyl cysteine supplement minimize tau expression and neuronal loss in animal model of alzheimer's disease*. Brain sciences, 2018. **8**(10): p. 185.
26. Hoffer, M.E., et al., *Amelioration of acute sequelae of blast induced mild traumatic brain injury by N-acetyl cysteine: a double-blind, placebo controlled study*. PloS one, 2013. **8**(1): p. e54163.
27. Zhang, L., et al., *Minocycline attenuates neurological impairment and regulates iron metabolism in a rat model of traumatic brain injury*. Archives of biochemistry and biophysics, 2020. **682**: p. 108302.
28. Haber, M., et al., *Minocycline plus N-acteylcysteine induces remyelination, synergistically protects oligodendrocytes and modifies neuroinflammation in a rat model of mild traumatic brain injury*. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism, 2018. **38**(8): p. 1312-1326.
29. Scott, G., et al., *Minocycline reduces chronic microglial activation after brain trauma but increases neurodegeneration*. Brain, 2018. **141**(2): p. 459-471.
30. Meythaler, J., et al., *Safety and feasibility of minocycline in treatment of acute traumatic brain injury*. Brain Injury, 2019. **33**(5): p. 679-689.
31. Hsueh, S.-C., et al., *(-)-Phenserine ameliorates contusion volume, neuroinflammation, and behavioral impairments induced by traumatic brain injury in mice*. Cell Transplantation, 2019. **28**(9-10): p. 1183-1196.
32. Lecca, D., et al., *(-)-Phenserine and the prevention of pre-programmed cell death and neuroinflammation in mild traumatic brain injury and Alzheimer's disease challenged mice*. Neurobiology of disease, 2019. **130**: p. 104528.

33. Papadopoulos, Z., J. Herz, and J. Kipnis, *Meningeal lymphatics: from anatomy to central nervous system immune surveillance*. The Journal of Immunology, 2020. **204**(2): p. 286-293.
34. Lindqvist, D., et al., *Non-motor symptoms in patients with Parkinson's disease—correlations with inflammatory cytokines in serum*. 2012.
35. Poewe, W., et al., *Parkinson disease*. Nature reviews Disease primers, 2017. **3**(1): p. 1-21.
36. Siracusa, R., et al., *Anti-inflammatory and Anti-oxidant Activity of Hidrox® in Rotenone-Induced Parkinson's Disease in Mice*. Antioxidants, 2020. **9**(9): p. 824.
37. Liu, Y.-Q., et al., *Nanozyme scavenging ROS for prevention of pathologic  $\alpha$ -synuclein transmission in Parkinson's disease*. Nano Today, 2021. **36**: p. 101027.
38. Su, Y., et al., *Dysregulation of peripheral monocytes and pro-inflammation of alpha-synuclein in Parkinson's disease*. Journal of Neurology, 2022. **269**(12): p. 6386-6394.
39. DeMaagd, G. and A. Philip, *Parkinson's disease and its management: part 1: disease entity, risk factors, pathophysiology, clinical presentation, and diagnosis*. Pharmacy and therapeutics, 2015. **40**(8): p. 504.
40. Chahine, L., et al., *Modifiable vascular risk factors, white matter disease and cognition in early Parkinson's disease*. European journal of neurology, 2019. **26**(2): p. 246-e18.
41. Zou, Y.-m., et al., *Systematic review of the prevalence and incidence of Parkinson's disease in the People's Republic of China*. Neuropsychiatric Disease and Treatment, 2015: p. 1467-1472.
42. Ou, Z., et al., *Global trends in the incidence, prevalence, and years lived with disability of Parkinson's disease in 204 countries/territories from 1990 to 2019*. Frontiers in public health, 2021. **9**: p. 776847.
43. Calabrese, V., et al., *Aging and Parkinson's Disease: Inflammaging, neuroinflammation and biological remodeling as key factors in pathogenesis*. Free Radical Biology and Medicine, 2018. **115**: p. 80-91.
44. Langston, J.W., *The MPTP story*. Journal of Parkinson's disease, 2017. **7**(s1): p. S11-S19.
45. Pezzoli, G. and E. Cereda, *Exposure to pesticides or solvents and risk of Parkinson disease*. Neurology, 2013. **80**(22): p. 2035-2041.
46. Gardner, R.C., et al., *Traumatic brain injury in later life increases risk for P arkinson disease*. Annals of neurology, 2015. **77**(6): p. 987-995.
47. Reeve, A., E. Simcox, and D. Turnbull, *Ageing and Parkinson's disease: why is advancing age the biggest risk factor? Ageing research reviews*, 2014. **14**: p. 19-30.
48. Shulman, J.M., P.L. De Jager, and M.B. Feany, *Parkinson's disease: genetics and pathogenesis*. Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease, 2011. **6**(1): p. 193-222.
49. Sidransky, E. and G. Lopez, *The link between the GBA gene and parkinsonism*. Lancet Neurol, 2012. **11**(11): p. 986-98.
50. Gardner, R.C., et al., *Mild TBI and risk of Parkinson disease: a chronic effects of neurotrauma consortium study*. Neurology, 2018. **90**(20): p. e1771-e1779.
51. Morissette, M.P., et al., *Associations between concussion and risk of diagnosis of psychological and neurological disorders: a retrospective population-based cohort study*. Family medicine and community health, 2020. **8**(3).

52. VanItallie, T.B., *Traumatic brain injury (TBI) in collision sports: Possible mechanisms of transformation into chronic traumatic encephalopathy (CTE)*. *Metabolism*, 2019. **100**: p. 153943.
  53. McCrory, P., et al., *What is the definition of sports-related concussion: a systematic review*. *British journal of sports medicine*, 2017. **51**(11): p. 877-887.
  54. Delic, V., et al., *Biological links between traumatic brain injury and Parkinson's disease*. *Acta neuropathologica communications*, 2020. **8**: p. 1-16.
  55. Sharma, A., et al., *Mild traumatic brain injury exacerbates Parkinson's disease induced hemoxygenase-2 expression and brain pathology: Neuroprotective effects of co-administration of TiO<sub>2</sub> nanowired mesenchymal stem cells and cerebrolysin*. *Progress in Brain Research*, 2020. **258**: p. 157-231.
  56. Fiandaca, M.S., et al., *Potential metabolomic linkage in blood between Parkinson's disease and traumatic brain injury*. *Metabolites*, 2018. **8**(3): p. 50.
  57. Koller, W.C. and M.G. Rueda, *Mechanism of action of dopaminergic agents in Parkinson's disease*. *Neurology*, 1998. **50**(6 Suppl 6): p. S11-4; discussion S44-8.
  58. Weis, S., et al., *Effect of Parkinson's disease and related medications on the composition of the fecal bacterial microbiota*. *npj Parkinson's Disease*, 2019. **5**(1): p. 28.
  59. Vanle, B., et al., *NMDA antagonists for treating the non-motor symptoms in Parkinson's disease*. *Transl Psychiatry*, 2018. **8**(1): p. 117.
  60. Dashtipour, K., et al., *Extended-Release Amantadine for Levodopa-Induced Dyskinesia*. *Expert Rev Neurother*, 2019. **19**(4): p. 293-299.
  61. Zahoor, I., A. Shafi, and E. Haq, *Pharmacological Treatment of Parkinson's Disease*, in *Parkinson's Disease: Pathogenesis and Clinical Aspects*, T.B. Stoker and J.C. Greenland, Editors. 2018, Codon Publications
- Copyright: The Authors.: Brisbane (AU).
62. Crispo, J.A., et al., *Associations between Anticholinergic Burden and Adverse Health Outcomes in Parkinson Disease*. *PLoS One*, 2016. **11**(3): p. e0150621.
  63. Postolache, T.T., et al., *Inflammation in traumatic brain injury*. *Journal of Alzheimer's Disease*, 2020. **74**(1): p. 1-28.
  64. Gonzalez, A.C.d.O., et al., *Wound healing-A literature review*. *Anais brasileiros de dermatologia*, 2016. **91**(5): p. 614-620.
  65. Arulselvan, P., et al., *Role of antioxidants and natural products in inflammation*. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016. **2016**(1): p. 5276130.
  66. Shi, K., et al., *Dissemination of brain inflammation in traumatic brain injury*. *Cellular & molecular immunology*, 2019. **16**(6): p. 523-530.
  67. He, L., et al., *The role of astrocyte in neuroinflammation in traumatic brain injury*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 2023: p. 166992.
  68. Verkhatsky, A. and M. Nedergaard, *Physiology of astroglia*. *Physiological reviews*, 2018. **98**(1): p. 239-389.
  69. Linnerbauer, M., M.A. Wheeler, and F.J. Quintana, *Astrocyte crosstalk in CNS inflammation*. *Neuron*, 2020. **108**(4): p. 608-622.
  70. Freire, M.A.M., et al., *Astrocytosis, inflammation, axonal damage and myelin impairment in the internal capsule following striatal ischemic injury*. *Cells*, 2023. **12**(3): p. 457.
  71. Freire, M.A.M., et al., *Cellular and Molecular Pathophysiology of Traumatic Brain Injury: What Have We Learned So Far?* *Biology*, 2023. **12**(8): p. 1139.

72. Vedantam, A., et al., *Early versus Late Profiles of Inflammatory Cytokines after Mild Traumatic Brain Injury and Their Association with Neuropsychological Outcomes*. Journal of Neurotrauma, 2021. **38**(1): p. 53-62.
73. Nwachuku, E.L., et al., *Time course of cerebrospinal fluid inflammatory biomarkers and relationship to 6-month neurologic outcome in adult severe traumatic brain injury*. Clinical Neurology and Neurosurgery, 2016. **149**: p. 1-5.
74. Hergenroeder, G.W., et al., *Serum IL-6: a candidate biomarker for intracranial pressure elevation following isolated traumatic brain injury*. Journal of Neuroinflammation, 2010. **7**(1): p. 19.
75. Ferreira, L.C.B., et al., *Increased levels of interleukin-6, -8 and -10 are associated with fatal outcome following severe traumatic brain injury*. Brain Injury, 2014. **28**(10): p. 1311-1316.
76. Lustenberger, T., et al., *The effect of brain injury on the inflammatory response following severe trauma*. Immunobiology, 2016. **221**(3): p. 427-431.
77. Santarsieri, M., et al., *Variable neuroendocrine-immune dysfunction in individuals with unfavorable outcome after severe traumatic brain injury*. Brain, Behavior, and Immunity, 2015. **45**: p. 15-27.
78. Ziebell, J.M. and M.C. Morganti-Kossmann, *Involvement of Pro- and Anti-Inflammatory Cytokines and Chemokines in the Pathophysiology of Traumatic Brain Injury*. Neurotherapeutics, 2010. **7**(1): p. 22-30.
79. Akamatsu, Y. and K.A. Hanafy, *Cell death and recovery in traumatic brain injury*. Neurotherapeutics, 2020. **17**(2): p. 446-456.
80. Unnisa, A., N.H. Greig, and M.A. Kamal, *Inhibition of caspase 3 and caspase 9 mediated apoptosis: a multimodal therapeutic target in traumatic brain injury*. Current neuropharmacology, 2023. **21**(4): p. 1001.
81. Lee, Y.-S., et al., *BAX-dependent mitochondrial pathway mediates the crosstalk between ferroptosis and apoptosis*. Apoptosis, 2020. **25**: p. 625-631.
82. Hoesel, B. and J.A. Schmid, *The complexity of NF- $\kappa$ B signaling in inflammation and cancer*. Molecular cancer, 2013. **12**: p. 1-15.
83. Liu, T., et al., *NF- $\kappa$ B signaling in inflammation*. Signal Transduct Target Ther, 2017. **2**: p. 17023-.
84. Begalli, F., et al., *Unlocking the NF- $\kappa$ B conundrum: embracing complexity to achieve specificity*. Biomedicines, 2017. **5**(3): p. 50.
85. Kalra, S., et al., *Pathogenesis and management of traumatic brain injury (TBI): role of neuroinflammation and anti-inflammatory drugs*. Inflammopharmacology, 2022. **30**(4): p. 1153-1166.
86. Singh, S. and T.G. Singh, *Role of nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) signalling in neurodegenerative diseases: an mechanistic approach*. Current Neuropharmacology, 2020. **18**(10): p. 918-935.
87. Quillinan, N., P.S. Herson, and R.J. Traystman, *Neuropathophysiology of brain injury*. Anesthesiology clinics, 2016. **34**(3): p. 453-464.
88. Mettang, M., et al., *IKK2/NF- $\kappa$ B signaling protects neurons after traumatic brain injury*. The FASEB Journal, 2018. **32**(4): p. 1916-1932.
89. Jayakumar, A.R., et al., *Activation of NF- $\kappa$ B Mediates Astrocyte Swelling and Brain Edema in Traumatic Brain Injury*. Journal of Neurotrauma, 2014. **31**(14): p. 1249-1257.

90. Dolatshahi, M., et al., *Nuclear factor-kappa B (NF-κB) in pathophysiology of Parkinson disease: Diverse patterns and mechanisms contributing to neurodegeneration*. European Journal of Neuroscience, 2021. **54**(1): p. 4101-4123.
91. Singh, N.K. and A. Singh, *Nuclear Factor Kappa B: A Nobel Therapeutic Target of Flavonoids Against Parkinson's Disease*. Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening, 2024. **27**(14): p. 2062-2077.
92. Li, Y., et al., *CXCL12 is involved in α-synuclein-triggered neuroinflammation of Parkinson's disease*. Journal of Neuroinflammation, 2019. **16**: p. 1-14.
93. Saha, S., et al., *An overview of Nrf2 signaling pathway and its role in inflammation*. Molecules, 2020. **25**(22): p. 5474.
94. Liu, S., J. Pi, and Q. Zhang, *Signal amplification in the KEAP1-NRF2-ARE antioxidant response pathway*. Redox biology, 2022. **54**: p. 102389.
95. Singh, S., et al., *Natural antioxidants for neuroinflammatory disorders and possible involvement of Nrf2 pathway: A review*. Heliyon, 2021. **7**(2).
96. Kwak, M.-K., et al., *Enhanced expression of the transcription factor Nrf2 by cancer chemopreventive agents: role of antioxidant response element-like sequences in the nrf2 promoter*. Molecular and cellular biology, 2002.
97. Wu, A.-G., et al., *Targeting Nrf2-Mediated Oxidative Stress Response in Traumatic Brain Injury: Therapeutic Perspectives of Phytochemicals*. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2022. **2022**(1): p. 1015791.
98. Bhowmick, S., et al., *Impairment of pericyte-endothelium crosstalk leads to blood-brain barrier dysfunction following traumatic brain injury*. Experimental neurology, 2019. **317**: p. 260-270.
99. Abdul-Muneer, P., *Nrf2 as a potential therapeutic target for traumatic brain injury*. Journal of Integrative Neuroscience, 2023. **22**(4): p. 81.
100. Bhowmick, S., et al., *Traumatic brain injury-induced downregulation of Nrf2 activates inflammatory response and apoptotic cell death*. Journal of molecular medicine, 2019. **97**: p. 1627-1641.
101. Saha, S., et al., *A perspective on Nrf2 signaling pathway for neuroinflammation: a potential therapeutic target in Alzheimer's and Parkinson's diseases*. Frontiers in cellular neuroscience, 2022. **15**: p. 787258.
102. Yang, X.-x., R. Yang, and F. Zhang, *Role of Nrf2 in Parkinson's disease: toward new perspectives*. Frontiers in pharmacology, 2022. **13**: p. 919233.
103. Chakkittukandiyil, A., et al., *The principal molecular mechanisms behind the activation of Keap1/Nrf2/ARE pathway leading to neuroprotective action in Parkinson's disease*. Neurochemistry International, 2022. **156**: p. 105325.
104. Green, D.R., *The mitochondrial pathway of apoptosis part II: the BCL-2 protein family*. Cold Spring Harbor perspectives in biology, 2022. **14**(6): p. a041046.
105. Alam, M., et al., *Bax/Bcl-2 cascade is regulated by the EGFR pathway: therapeutic targeting of non-small cell lung cancer*. Frontiers in Oncology, 2022. **12**: p. 869672.
106. Deng, H., et al., *B-Cell Lymphoma 2 (Bcl-2) and Regulation of Apoptosis after Traumatic Brain Injury: A Clinical Perspective*. Medicina, 2020. **56**(6): p. 300.
107. Feng, Y., et al., *Protective role of wogonin following traumatic brain injury by reducing oxidative stress and apoptosis via the PI3K/Nrf2/HO-1 pathway*. International journal of molecular medicine, 2022. **49**(4): p. 1-13.
108. He, C., et al., *Autophagy and apoptosis in acute brain injuries: from mechanism to treatment*. Antioxidants & Redox Signaling, 2023. **38**(1-3): p. 234-257.

109. Luna-Vargas, M.P. and J.E. Chipuk, *Physiological and pharmacological control of BAK, BAX, and beyond*. Trends in cell biology, 2016. **26**(12): p. 906-917.
110. Galluzzi, L., et al., *Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018*. Cell Death & Differentiation, 2018. **25**(3): p. 486-541.
111. Dionísio, P., J. Amaral, and C. Rodrigues, *Oxidative stress and regulated cell death in Parkinson's disease*. Ageing research reviews, 2021. **67**: p. 101263.
112. Bekker, M., et al., *Can the interplay between autophagy and apoptosis be targeted as a novel therapy for Parkinson's disease?* Neurobiology of aging, 2021. **100**: p. 91-105.
113. Liu, J., W. Liu, and H. Yang, *Balancing apoptosis and autophagy for Parkinson's disease therapy: targeting BCL-2*. ACS chemical neuroscience, 2018. **10**(2): p. 792-802.
114. Abbas, M., et al., *Natural polyphenols: An overview*. International Journal of Food Properties, 2017. **20**(8): p. 1689-1699.
115. Di Lorenzo, C., et al., *Polyphenols and Human Health: The Role of Bioavailability*. Nutrients, 2021. **13**(1): p. 273.
116. Luo, Y., et al., *Flavanols from Nature: A Phytochemistry and Biological Activity Review*. Molecules, 2022. **27**(3): p. 719.
117. Carecho, R., et al., *Circulating (Poly) phenol Metabolites: Neuroprotection in a 3D Cell Model of Parkinson's Disease*. Molecular nutrition & food research, 2022. **66**(21): p. 2100959.
118. Khayatan, D., et al., *Protective Effects of Plant-Derived Compounds Against Traumatic Brain Injury*. Molecular Neurobiology, 2024: p. 1-19.
119. Montané, X., et al., *Current perspectives of the applications of polyphenols and flavonoids in cancer therapy*. Molecules, 2020. **25**(15): p. 3342.
120. Singh, A., et al., *Promising polyphenols in Parkinson's disease therapeutics*. Neurochemical Research, 2020. **45**: p. 1731-1745.
121. Campolo, M., et al., *Co-Ultra PEALut enhances endogenous repair response following moderate traumatic brain injury*. International Journal of Molecular Sciences, 2021. **22**(16): p. 8717.
122. Fusco, R., et al., *Formyl peptide receptor 1 signaling in acute inflammation and neural differentiation induced by traumatic brain injury*. Biology, 2020. **9**(9): p. 238.
123. Impellizzeri, D., et al., *N-palmitoylethanolamine-oxazoline as a new therapeutic strategy to control neuroinflammation: Neuroprotective effects in experimental models of spinal cord and brain injury*. Journal of neurotrauma, 2017. **34**(18): p. 2609-2623.
124. D'Amico, R., et al., *Hericium erinaceus and coriolus versicolor modulate molecular and biochemical changes after traumatic brain injury*. Antioxidants, 2021. **10**(6): p. 898.
125. Porsolt, R.D., et al., *Immobility induced by forced swimming in rats: effects of agents which modify central catecholamine and serotonin activity*. European journal of pharmacology, 1979. **57**(2-3): p. 201-210.
126. Genovese, T., et al., *Atrazine inhalation causes neuroinflammation, apoptosis and accelerating brain aging*. International Journal of Molecular Sciences, 2021. **22**(15): p. 7938.

127. Prut, L. and C. Belzung, *The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review*. European journal of pharmacology, 2003. **463**(1-3): p. 3-33.
128. Pellow, S., et al., *Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat*. Journal of neuroscience methods, 1985. **14**(3): p. 149-167.
129. Siebold, L., et al., *Cosyntropin attenuates neuroinflammation in a mouse model of traumatic brain injury*. Frontiers in Molecular Neuroscience, 2020. **13**: p. 109.
130. Zhao, P., et al., *Neuroprotective effects of Lycium barbarum polysaccharide on focal cerebral ischemic injury in mice*. Neurochemical research, 2017. **42**: p. 2798-2813.
131. Araki, T., et al., *Neuroprotective effect of riluzole in MPTP-treated mice*. Brain research, 2001. **918**(1-2): p. 176-181.
132. Fleming, S.M., et al., *A pilot trial of the microtubule-interacting peptide (NAP) in mice overexpressing alpha-synuclein shows improvement in motor function and reduction of alpha-synuclein inclusions*. Molecular and Cellular Neuroscience, 2011. **46**(3): p. 597-606.
133. Sedelis, M., R.K. Schwarting, and J.P. Huston, *Behavioral phenotyping of the MPTP mouse model of Parkinson's disease*. Behavioural brain research, 2001. **125**(1-2): p. 109-125.
134. Cordaro, M., et al., *2-Pentadecyl-2-oxazoline reduces neuroinflammatory environment in the MPTP model of Parkinson disease*. Molecular neurobiology, 2018. **55**: p. 9251-9266.
135. Pan, Z., et al., *Protective effect of anthocyanin on neurovascular unit in cerebral ischemia/reperfusion injury in rats*. Frontiers in neuroscience, 2018. **12**: p. 947.
136. Siracusa, R., et al., *Anti-inflammatory and neuroprotective effects of Co-UltraPEALut in a mouse model of vascular dementia*. Frontiers in neurology, 2017. **8**: p. 233.
137. Srivastava, P., et al., *Neuroprotective and neuro-rehabilitative effects of acute purinergic receptor P2X4 (P2X4R) blockade after ischemic stroke*. Experimental neurology, 2020. **329**: p. 113308.
138. Boccella, S., et al., *Treatment with 2-pentadecyl-2-oxazoline restores mild traumatic brain injury-induced sensorial and neuropsychiatric dysfunctions*. Frontiers in Pharmacology, 2020. **11**: p. 91.
139. Petrosino, S., et al., *2-pentadecyl-2-oxazoline, the oxazoline of pea, modulates carrageenan-induced acute inflammation*. Frontiers in pharmacology, 2017. **8**: p. 308.
140. Di Paola, R., et al., *Ultramicronized palmitoylethanolamide (PEA-um®) in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis*. Pharmacological research, 2016. **111**: p. 405-412.
141. Cordaro, M., S. Cuzzocrea, and R. Crupi, *An update of palmitoylethanolamide and luteolin effects in preclinical and clinical studies of neuroinflammatory events*. Antioxidants, 2020. **9**(3): p. 216.
142. Cordaro, M., et al., *Effect of N-palmitoylethanolamine-oxazoline on comorbid neuropsychiatric disturbance associated with inflammatory bowel disease*. The FASEB Journal, 2020. **34**(3): p. 4085-4106.

143. Cordaro, M., et al., *Adelmidrol, a palmitoylethanolamide analogue, as a new pharmacological treatment for the management of inflammatory bowel disease*. *Molecular pharmacology*, 2016. **90**(5): p. 549-561.
144. Impellizzeri, D., et al., *N-Palmitoylethanolamine-oxazoline (PEA-OXA): A new therapeutic strategy to reduce neuroinflammation, oxidative stress associated to vascular dementia in an experimental model of repeated bilateral common carotid arteries occlusion*. *Neurobiology of disease*, 2019. **125**: p. 77-91.
145. Siracusa, R., et al., *Neuroprotective effects of temsirolimus in animal models of Parkinson's disease*. *Molecular neurobiology*, 2018. **55**: p. 2403-2419.
146. Impellizzeri, D., et al., *2-pentadecyl-2-oxazoline: Identification in coffee, synthesis and activity in a rat model of carrageenan-induced hindpaw inflammation*. *Pharmacological Research*, 2016. **108**: p. 23-30.
147. Cordaro, M., et al., *Cashew (Anacardium occidentale L.) nuts counteract oxidative stress and inflammation in an acute experimental model of Carrageenan-induced Paw edema*. *Antioxidants*, 2020. **9**(8): p. 660.
148. D'Amico, R., et al., *Modulation of NLRP3 inflammasome through formyl peptide receptor 1 (Fpr-1) pathway as a new therapeutic target in bronchiolitis obliterans syndrome*. *International journal of molecular sciences*, 2020. **21**(6): p. 2144.
149. Esposito, E., et al., *A new co-micronized composite containing palmitoylethanolamide and polydatin shows superior oral efficacy compared to their association in a rat paw model of carrageenan-induced inflammation*. *European Journal of Pharmacology*, 2016. **782**: p. 107-118.
150. Impellizzeri, D., et al., *Therapeutic potential of dinitrobenzene sulfonic acid (DNBS)-induced colitis in mice by targeting IL-1 $\beta$  and IL-18*. *Biochemical pharmacology*, 2018. **155**: p. 150-161.
151. Di Paola, R., et al., *Adelmidrol, in combination with hyaluronic acid, displays increased anti-inflammatory and analgesic effects against monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis in rats*. *Arthritis research & therapy*, 2016. **18**: p. 1-12.
152. Genovese, T., et al., *Role of bevacizumab on vascular endothelial growth factor in apolipoprotein E deficient mice after traumatic brain injury*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022. **23**(8): p. 4162.
153. Di Paola, R., et al., *Effect of PD98059, a selective MAPK3/MAPK1 inhibitor, on acute lung injury in mice*. *International journal of immunopathology and pharmacology*, 2009. **22**(4): p. 937-950.
154. Marklund, S. and G. Marklund, *Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase*. *European journal of biochemistry*, 1974. **47**(3): p. 469-474.
155. RajaSankar, S., T. Manivasagam, and S. Surendran, *Ashwagandha leaf extract: a potential agent in treating oxidative damage and physiological abnormalities seen in a mouse model of Parkinson's disease*. *Neuroscience letters*, 2009. **454**(1): p. 11-15.
156. Fan, Y., et al., *Tomentosin reduces behavior deficits and neuroinflammatory response in MPTP-induced Parkinson's disease in mice*. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*, 2021. **40**(1).

157. Puigventós, L., et al., *Determination of polyphenolic profiles by liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry for the authentication of fruit extracts*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2015. **407**: p. 597-608.
158. Ladak, A.A., S.A. Enam, and M.T. Ibrahim, *A review of the molecular mechanisms of traumatic brain injury*. World neurosurgery, 2019. **131**: p. 126-132.
159. Zheng, R.-z., et al., *Neuroinflammation following traumatic brain injury: take it seriously or not*. Frontiers in immunology, 2022. **13**: p. 855701.
160. Luk, K.C., et al., *Pathological  $\alpha$ -synuclein transmission initiates Parkinson-like neurodegeneration in nontransgenic mice*. Science, 2012. **338**(6109): p. 949-953.
161. Calabrese, V., et al., *Redox regulation of cellular stress response in neurodegenerative disorders*. The Italian journal of biochemistry, 2006. **55**(3-4): p. 263-282.
162. Logsdon, A.F., et al., *Salubrinal reduces oxidative stress, neuroinflammation and impulsive-like behavior in a rodent model of traumatic brain injury*. Brain research, 2016. **1643**: p. 140-151.
163. Luca, S.V., et al., *Bioactivity of dietary polyphenols: The role of metabolites*. Crit Rev Food Sci Nutr, 2020. **60**(4): p. 626-659.
164. Grabska-Kobytecka, I., et al., *Polyphenols and Their Impact on the Prevention of Neurodegenerative Diseases and Development*. Nutrients, 2023. **15**(15): p. 3454.
165. Impellizzeri, D., et al., *Memophenol<sup>TM</sup> Prevents Amyloid- $\beta$  Deposition and Attenuates Inflammation and Oxidative Stress in the Brain of an Alzheimer's Disease Rat*. International Journal of Molecular Sciences, 2023. **24**(8): p. 6938.