



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MESSINA**

**DIPARTIMENTO DI  
SCIENZE CHIMICHE, BIOLOGICHE, FARMACEUTICHE ED AMBIENTALI**

*CORSO DI DOTTORATO IN  
BIOLOGIA APPLICATA E MEDICINA SPERIMENTALE  
XXXVIII CICLO*

---

**PATHWAY MOLECOLARI CHIAVE NELL'ENDOMETRIOSI:  
DALLA PROLIFERAZIONE CELLULARE ALLA  
SENSIBILIZZAZIONE DEL SISTEMA NERVOSO CENTRALE**

SSD:  
BIOS-07/A

Candidata:  
Dott.ssa Ylenia Marino

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

Co-Relatore:  
**Chiar.ma Prof.ssa Roberta Fusco**

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

---

**Anno Accademico 2024/2025**



*Ai miei genitori*

<b>INDICE</b>	1
<b>Abstract</b>	3
<b>1. L'Endometriosi</b>	4
1.1. Epidemiologia e fattori di rischio	6
1.2. Eziologia	6
1.3. Sintomatologia	9
1.4. Trattamenti terapeutici	10
<b>2. Meccanismi biochimici coinvolti</b>	12
2.1. Infiammazione	14
2.1.1. Infiammazione acuta	14
2.1.2. Infiammazione cronica	17
2.2 Stress ossidativo	19
2.3. Apoptosi	21
2.4. Fibrosi	24
2.5. Neuroinfiammazione	26
2.6. Dolore	28
<b>3. Nutrizione ed Endometriosi</b>	32
3.1. Hericium erinaceus	34
3.1.1. Composti bioattivi	35
3.1.2 Proprietà terapeutiche	37
<b>4. Scopo della tesi</b>	39
<b>5. Materiali e Metodi</b>	40
5.1. Animali	40
5.2. Protocollo sperimentale	40
5.3. Gruppi sperimentali	40
5.4 Analisi istologiche	41
5.5 Analisi immunoistochimica	42
5.6 Analisi di Western Blot	43
5.7 Analisi biochimiche di stress ossidativo	44
5.8 Saggio di immunoassorbimento enzimatico ELISA	44
5.9 Estrazione dell'RNA e sintesi del cDNA	44
5.10 Real-time PCR	45
5.11. Analisi comportamentali	45
5.11.1 Test in campo aperto	45
5.11.2 Test della piastra calda	46
5.11.3 Test del labirinto multiplo sopraelevato	46
5.11.4 Contrazioni addominali indotte dall'acido acetico	46
5.12 Preparazione della biomassa di Hericium Erinaceus	47

5.13 Materiali	47
5.14 Analisi statistiche	47
<b>6. Risultati</b>	48
6.1. Effetto della somministrazione di HER sulla crescita delle lesioni endometriosiche	48
6.2. Effetto della somministrazione di HER sulla morfologia della lesione e sulla proliferazione cellulare	49
6.3. Effetto della somministrazione di HER sull'apoptosi	51
6.4. Effetto della somministrazione di HER sullo stress ossidativo e sull'infiammazione	52
6.5. Effetto della somministrazione di HER sulla soglia di sensibilità al dolore	54
6.6. Effetto della somministrazione di HER sulla neuroinfiammazione	56
<b>7. Discussione</b>	58
<b>8. Conclusioni</b>	62
<b>9. Bibliografia</b>	63
<b>10. Ringraziamenti</b>	82

## ABSTRACT

L'endometriosi è una malattia ginecologica gravemente invalidante caratterizzata dallo sviluppo di tessuto endometriale in maniera eccessiva con sintomi molto dolorosi. A livello molecolare vi sono infiammazione, stress ossidativo, neuroinfiammazione e dolore cronico. Questo studio si propone di indagare i meccanismi molecolari alla base della patologia e come questi possano essere modulati dalla somministrazione di un composto di origine naturale, *Hericium erinaceus* (HER). Per il nostro studio abbiamo utilizzato un modello in vivo: l'endometriosi è stata indotta tramite la somministrazione per via intraperitoneale di frammenti uterini provenienti da animali donatori. Per tutta la durata dell'esperimento, gli animali sono stati tenuti sotto stretto monitoraggio. L'HER, somministrato per via orale, è stato in grado di ridurre le dimensioni e la morfologia istologica delle lesioni. A livello molecolare, l'estratto ha limitato la proliferazione cellulare, riducendo i livelli di alcuni marker come di Ki-67 e PCNA e l'attivazione della via di segnalazione MAPK. Inoltre è stata ripristinata l'apoptosi, come dimostrato dall'analisi quantitativa RT-PCR per i livelli di Bax, Bcl-2 e Caspasi. Non solo, l'HER ha anche importanti proprietà antiossidanti e antinfiammatorie: agisce, infatti, riducendo l'espressione di Nox, l'attività MPO e i livelli di MDA, ripristinando l'attività di SOD e i livelli di GSH, oltre a ridurre i livelli delle citochine infiammatorie. Inoltre, l'HER è in grado di modulare i comportamenti dolorosi associati alla patologia, agendo sull'espressione dei mediatori neurosensibilizzanti c-FOS e NGF, riducendo anche l'attivazione degli astrociti come dimostrato dall'espressione di GFAP nel midollo spinale, nella corteccia cerebrale e nell'ippocampo. Nel complesso, i dati da noi ottenuti in questo studio hanno dimostrato come la somministrazione dell'estratto di origine naturale sia in grado di modulare le diverse vie molecolari coinvolte nella progressione dell'endometriosi.

## 1. L'ENDOMETRIOSI

L'endometriosi è una patologia ginecologica gravemente invalidante, una sindrome complessa caratterizzata da un processo infiammatorio cronico estrogeno-dipendente che colpisce principalmente i tessuti pelvici [1, 2]. L'endometriosi è la causa più comune di dolore pelvico cronico nelle donne ed è molto spesso associata anche all'infertilità [3]. La caratteristica principale di questa patologia è lo sviluppo di tessuto endometriale al di fuori dell'utero. Normalmente l'endometrio, vale a dire il tessuto di rivestimento dell'utero, periodicamente viene modificato ed eliminato con il ciclo mestruale. Nelle donne affette da endometriosi il tessuto endometriale non viene eliminato come dovrebbe e questo porta alla formazione di lesioni e tessuto cicatriziale. Nella maggior parte dei casi il tessuto si sviluppa principalmente nella regione pelvica e gli organi interessati sono: l'utero, le ovaie, le tube di Falloppio, il retto e la vescica; ma nei casi più gravi questo può riguardare anche gli altri organi come l'intestino e il diaframma [4].

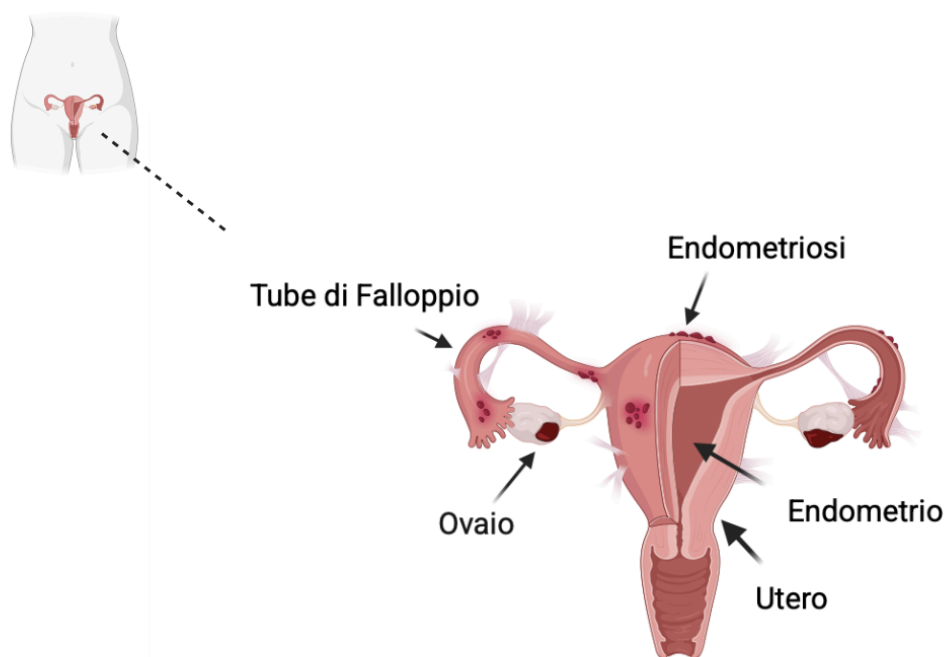


Figura 1 Cavità pelvica con endometriosi

La sua eziologia multifattoriale e l'alta prevalenza assomigliano ad altri disturbi infiammatori cronici associati al dolore. L'endometriosi può insorgere a partire già dalla prima mestruazione fino alla menopausa, oppure può insorgere in una fase più tardiva.

Purtroppo ancora oggi le cause responsabili del suo sviluppo non si conoscono ma negli ultimi anni sono state ipotizzate diverse teorie ed una classificazione della patologia in base alla gravità [5].

Proprio per far fronte alla difficoltà di identificare questa malattia è stato messo a punto un sistema di classificazione secondo cui esistono 4 stadi di sviluppo dell'endometriosi: viene fatta una valutazione con un punteggio e sulla base dello stesso si assegna uno stadio di sviluppo. Gli stadi vengono distinti in:

- lieve,
- moderato,
- grave,
- esteso.

I parametri che vengono presi in considerazione sono le dimensioni delle lesioni a livello delle ovaie, delle tube di Falloppio e del peritoneo e la gravità della loro adesione: dalla somma dei punteggi si ottiene uno stadio patologico [5].

Inoltre, sono stati identificati 4 gradi di endometriosi:

- Endometriosi superficiale, interessa la superficie o i tessuti molli e si sviluppa solo a livello della pelvi;
- Endometriosi ovarica cistica, si sviluppa a carico delle ovaie;
- Endometriosi profonda, il suo sviluppo interessa organi come retto, vagina, vescica ed anche intestino;
- Endometriosi al di fuori del bacino, il suo sviluppo si estende fino alla cavità addominale.

## **1.1 Epidemiologia e fattori di rischio**

L'endometriosi è una malattia invalidante, la quale a causa dei disturbi che la accompagnano e della sua natura cronica, rappresenta un problema medico, sociale ed economico molto importante. Colpisce circa il 10-15 % della popolazione mondiale, il picco dello sviluppo di questa malattia si ha tra i 20 e i 45 anni di età [6]: i primi segni dello sviluppo dell'endometriosi si hanno dopo il menarca ed iniziano a diminuire dopo la menopausa. Sebbene le cause dell'insorgenza dell'endometriosi non siano ancora chiare, va sicuramente tenuto presente che esistono diversi fattori di rischio che giocano un ruolo importante nel suo sviluppo. Tra le donne affette dall'endometriosi circa il 30% soffre anche di infertilità, dovuta a diversi fattori come: anatomia distorta della pelvi, aderenze, tube di Falloppio cicatrizzate, infiammazione delle strutture pelviche, alterazione del funzionamento del sistema immunitario, cambiamenti nell'ambiente ormonale degli ovuli, impianto compromesso di una gravidanza e qualità degli ovuli alterata [7]. I fattori di rischio correlati allo sviluppo dell'endometriosi comprendono la predisposizione genetica, l'esposizione ad interferenti endocrini, fattori immunologici e microbici, l'utilizzo di contraccettivi orali, l'esposizione durante la vita prenatale e anche postnatale a molecole che inducono alterazioni genetiche [8]. È stato suggerito che, sebbene l'uso di contraccettivi sopprima temporaneamente l'endometriosi, l'uso precedente di questi potrebbe aumentare il rischio di malattia: gli impianti endometriali ectopici sopravvivono, anche se in forma atrofica, e si riattivano quando l'utilizzo viene interrotto [9]. Anche le caratteristiche biologiche della donna, come un menarca troppo precoce e cicli mestruali troppo brevi e abbondanti, sono considerate fattori di rischio [10]. Oltre a questi fattori, uno stile di vita non sano con un consumo costante di caffeina e alcol, e una dieta non salutare e sono considerati fattori di rischio [11].

## **1.2 Eziologia**

Nel corso degli anni sono state messe a punto quattro teorie diverse per spiegare l'insorgenza ed il successivo sviluppo dell'endometriosi: la teoria della mestruazione

retrograda, la teoria della metaplasia celomica, la teoria dei resti embrionali mülleriani e la teoria della proliferazione delle cellule precursori [12].

Secondo la teoria della mestruazione retrograda, il sangue mestruale defluisce in senso contrario attraverso le tube di Falloppio per giungere nella cavità pelvica, dove frammenti di tessuto mestruale si attaccano agli organi peritoneali e sviluppano lesioni: questa teoria è supportata dalla presenza di sangue nel liquido peritoneale [13]. A confermare questa teoria si aggiunge la distribuzione anatomica asimmetrica delle lesioni endometriose superficiali, con una proporzione maggiore localizzata sul lato destro della cavità peritoneale a causa delle correnti peritoneali in senso orario [14]. Secondo la teoria della metaplasia celomica, gli stimoli induttivi causano la trasformazione del tessuto peritoneale in tessuto endometriale: in particolare si ha la transizione di cellule non ancora identificate, capaci di differenziarsi in endometrio, presenti tra le cellule mesoteliali che rivestono l'ovaio e il peritoneo pelvico [15]. Lo sviluppo dell'endometriosi si ha per una metaplasia dovuta all'attivazione aberrante di geni nel peritoneo normalmente attivi durante lo sviluppo embrionale del tratto genitale femminile, compreso lo sviluppo della ghiandola uterina. Il concetto di metaplasia si riflette anche nella teoria del riposo embrionale, in quanto il tessuto mülleriano/endometriale mal posizionato dal punto di vista dello sviluppo potrebbe essere stimolato a subire una metaplasia [16].

La teoria dei resti embrionale spiega come, dopo uno stimolo ormonale, i resti cellulari provenienti dal dotto mülleriano potrebbero proliferare e portare alla formazione di lesioni endometriali. Questo avviene perché durante il processo di formazione dell'apparato genitale femminile la porzione più caudale dei dotti mülleriani si fonde con la porzione del bulbo sinovaginale del seno urogenitale per formare la placca vaginale. Successivamente, il setto mediano tra le due strutture tubulari mülleriane si riassorbe, creando una cavità uterina, una cervice e una vagina superiore libere. Le restanti componenti mülleriane non fuse formano superiormente le tube di Falloppio appaiate. Quando durante questo processo le componenti non si formano come dovrebbero o si ha un'interruzione, si ha la formazione di endometrio funzionante ma mal collegato alla via di deflusso [17].

Nella teoria delle cellule precursori, in cui si prendono in considerazione le linee cellulari mesenchimali ed endoteliali, si mette in evidenza come le cellule che derivano

dal midollo osseo vengono differenziate in cellule endometriali che portano quindi allo sviluppo di tessuto [18, 19]. Inoltre è stato dimostrato che la mestruazione retrograda delle cellule staminali contribuisce all'instaurarsi dell'endometriosi, mentre le cellule staminali del midollo osseo contribuiscono alla crescita continua delle lesioni endometriotiche [20, 21].

Ma non solo, sono state osservate alterazioni a carico del sistema immunitario: le cellule dell'endometrio di donne affette dalla patologia sono in grado di eludere la normale clearance immunitaria, continuando così a crescere e svilupparsi. Inoltre l'endometriosi è chiamata anche malattia estrogeno-dipendente, in quanto le alterazioni ormonali possono essere responsabili della proliferazione cellulare e quindi del continuo sviluppo di lesioni.

A questo si aggiunge il fatto che le fluttuazioni ormonali, fisiologiche nella donna, inducono episodi ciclici di proliferazione cellulare, infiammazione, lesione e riparazione all'interno delle lesioni: ciò favorisce la differenziazione da fibroblasti a miofibroblasti e quindi l'instaurarsi di una condizione fibrotica [22].

Inoltre la produzione intracellulare di estrogeni ha un ruolo chiave nella patogenesi dell'endometriosi. È stato osservato come vi siano elevati livelli dell'aromatasi, l'enzima responsabile della conversione del testosterone in estrogeni, che solitamente non è espresso nell'endometrio: questo comporta la produzione di estrogeni a livello locale e la perdita dei meccanismi di controllo con conseguente aumento dei livelli dell'estradiolo [23]. Gli elevati livelli di estrogeni sono in grado di attivare i macrofagi, i quali a loro volta inducono la produzione di citochine pro-infiammatorie. Si sviluppa così un ambiente infiammatorio, di cui ancora non è chiaro se questo sia una causa o un effetto della malattia [24]: un'eccessiva produzione di citochine infiammatorie può essere dovuta anche all'accumulo del tessuto endometriale. Inoltre, questi meccanismi inducono l'espressione del fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF), l'attivazione del ciclo cellulare e l'attivazione del gene anti-apoptotico Bcl-2 [25]. L'attivazione di questo gene è correlata alle disfunzioni legate ai meccanismi dell'apoptosi: infatti si è visto che nell'endometriosi vi è una disregolazione dell'espressione delle proteine apoptotiche, le quali inducono una maggiore sopravvivenza cellulare che comporta quindi la proliferazione del tessuto endometriale [26].

Le alterazioni a livello molecolare non sono solo dovute all'infiammazione cronica che insorge ma anche allo squilibrio ossidativo: una alterazione dell'espressione degli enzimi ossidanti e antiossidanti, si hanno maggiori livelli di anione superossido e di perossido di idrogeno, e ridotti livelli di catalasi e superossido dismutasi: questo porta ad una ridotta attività antiossidante [27, 28].

Non solo è difficile diagnosticare e capire come trattare l'endometriosi ma vi possono essere anche dei problemi correlati alla presenza di questa patologia: uno di questi è l'infertilità. Infatti molte donne che sono affette da endometriosi non sono fertili: probabilmente questo è dovuto all'infiammazione e all'alterazione ormonale che influenzano l'ambiente follicolare e la funzione ovarica [29, 30].

### **1.3 Sintomatologia**

L'endometriosi è una patologia caratterizzata da numerosi sintomi più o meno gravi: la gravità dei sintomi è correlata alla quantità di tessuto endometriale che si è sviluppato con il tempo. Questi influiscono in generale sulla salute e sul benessere mentale e anche sociale della donna: causando un significativo deterioramento della qualità della vita [31]. I sintomi più comuni che caratterizzano l'endometriosi comprendono: dolore premestruale acuto e in graduale aumento, dolore pelvico, dolore nella regione sacrale della colonna vertebrale, dismenorrea, ovulazione dolorosa, dolore durante i rapporti sessuali, dolore durante la defecazione e la minzione, dolore che si irradia alla schiena, mestruazioni abbondanti e irregolari, sangue nelle feci, diarrea o costipazione, stanchezza cronica ed infertilità [32] [33] [34]. A questi sintomi tipici dell'endometriosi si aggiungono nausea, vertigini e mal di testa, ipoglicemia, sanguinamento rettale e suscettibilità a infezioni e allergie. I primi sintomi compaiono solitamente intorno ai 20 anni e sono paragonabili a delle mestruazioni dolorose: il dolore precede la comparsa del sanguinamento, poi con il tempo si intensifica e la sua localizzazione riguarda il basso addome e le zone pelviche più profonde. Con il progredire della malattia il dolore si estende anche oltre il periodo di sanguinamento ed inizia ad essere presente durante tutto il ciclo mestruale [35]. I sintomi si cronicizzano e si instaura una condizione di dolore cronico, questo spesso porta poi

all'instaurarsi di sintomi psichici, in quanto le donne che ne sono affette hanno molta difficoltà a svolgere le normali attività quotidiane: infatti oltre ad i sintomi fisici si aggiungono depressione, ansia e quindi disagi psicologici [36]. Ad aggravare la condizione patologica si aggiunge la difficoltà di diagnosticare la malattia in tempi brevi. Il dolore e le disfunzioni corporee associate peggiorano la qualità della vita e riducono la produttività professionale. Nei casi in cui non esiste una causa chiara o un farmaco, la malattia può essere cronica e ricorrente. A causa del suo impatto sulla sessualità e sulla fertilità, può avere un'influenza negativa anche sulle relazioni di coppia [37].

#### **1.4 Trattamenti terapeutici**

Come abbiamo detto, le cause dell'endometriosi sono ancora oggi poco chiare, per questo motivo i trattamenti utilizzati sono solo mirati alla cura dei sintomi: cercando di tenerli sotto controllo. Sicuramente bisogna distinguere tra trattamenti farmacologici e chirurgici. Una differenza ulteriore si può fare tra i trattamenti farmacologici di tipo sintomatico e di tipo ormonale. Il trattamento farmacologico sintomatico prevede l'utilizzo di farmaci antidolorifici e antiinfiammatori [38]. I farmaci antinfiammatori non steroidei inibiscono la sintesi delle prostaglandine, contribuiscono a ridurre il processo infiammatorio e a risolvere il dolore [39]. A questi si aggiungono trattamenti di tipo ormonali per limitare le alterazioni che caratterizzano la malattia: tra i farmaci ormonali vi sono i contraccettivi orali, che agiscono sull'endometrio procurando atrofia del tessuto e influenzando il normale ciclo dell'ovulazione; i progestinici che mimano l'effetto del progesterone sull'endometrio, inducendo la decidualizzazione del tessuto e successivamente atrofia, riducendo i livelli di GnRH, di FSH, di LH e degli estrogeni; gli analoghi del GnRH, l'ormone che induce il rilascio delle gonadotropine, questi farmaci agiscono sull'ipofisi impedendo la secrezione delle gonadotropine con effetti simili alla menopausa, vale a dire atrofia e amenorrea; e infine gli inibitori delle aromatasi che agiscono riducendo i livelli degli estrogeni [40, 41]. Nei casi più gravi al trattamento farmacologico viene aggiunto anche il trattamento chirurgico: si procede all'eliminazione delle aderenze che si sono

formate nel tempo per limitare l'infiammazione ed il dolore cronico [42]. È bene tenere presente che entrambi i tipi di trattamenti non sono curativi e definitivi, ma tengono unicamente sotto controllo i sintomi. Proprio per far fronte ai diversi sintomi dolorosi che affliggono le donne affette da endometriosi, spesso si suggerisce di affiancare alle terapie farmacologiche e chirurgiche anche la fisioterapia: questa ha lo scopo di trattare i disturbi del pavimento pelvico cercando di ripristinare la struttura funzionale [43].

## 2. MECCANISMI MOLECOLARI

### 2.1 Infiammazione

L'infiammazione è un processo fisiologico di difesa messo in atto dall'organismo in seguito ad un danno che può essere indotto da un trauma o dal contatto con microrganismi patogeni. L'endometriosi è una condizione patologica associata ad infiammazione, ancora però non è chiaro se l'infiammazione può essere considerata una tra le cause della malattia o semplicemente una conseguenza. L'attivazione della risposta infiammatoria è mediata dall'attivazione di particolari recettori di membrana denominati PRR (Pattern Recognition Receptors) espressi sulle cellule immunitarie innate: cellule dendritiche, cellule Natural Killer (NK), macrofagi e neutrofili, che riconoscono due pattern molecolari PAMP (pattern molecolari associati ai patogeni) e i DAMP (modelli molecolari associati al pericolo). L'interazione di questi recettori con gli stimoli appropriati porta alla trasmissione di segnali al nucleo, dove avviene l'attivazione di una serie di geni attraverso meccanismi sia trascrizionali che post-trascrizionali: le risposte infiammatorie sono coordinate dai prodotti di tali geni [44]. L'interazione PRR-PAMP/DAMP determina il reclutamento di varie proteine citoplasmatiche, che determinano l'attivazione del fattore nucleare NF-κB. Questo è il principale fattore di trascrizione nucleare responsabile del rilascio dei diversi mediatori chimici dell'infiammazione [45] (Figura 2).

L'infiammazione viene riconosciuta da cinque segni tipici:

- calor, ovvero aumento della temperatura dovuto all'aumento del flusso ematico;
- rubor, ovvero arrossamento dovuto alla vasodilatazione;
- dolor, ovvero dolore dovuto all'aumento del reclutamento di cellule;
- tumor, ovvero gonfiore dovuto alla vasodilatazione alla formazione di essudato;
- functio laesa; ovvero perdita della funzione.

L'infiammazione viene distinta in due processi metabolici diversi a seconda della durata del processo stesso [46]:

- Infiammazione acuta
- Infiammazione cronica.

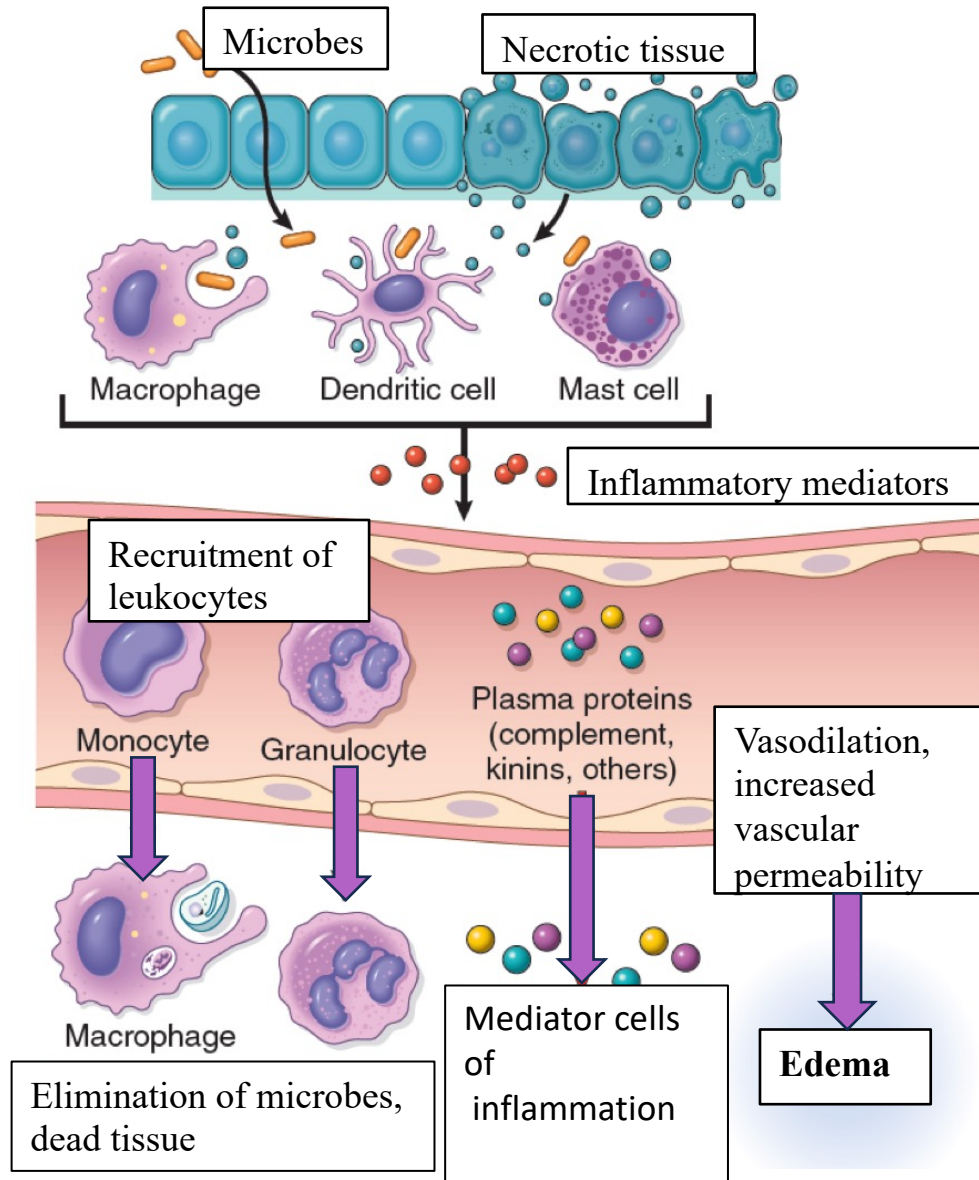


Figura 2 Meccanismi di infiammazione acuta e cronica

### 2.1.1 Infiammazione acuta

L'infiammazione acuta è un processo metabolico caratterizzato da breve durata e dal coinvolgimento di diversi tipi di cellule. La via infiammatoria coinvolge induttori,

sensori, mediatori ed effettori. Gli induttori sono quelli che danno inizio al processo infiammatorio.

La vasodilatazione è il primo step del processo infiammatorio ed è caratterizzata da rossore e calore nel sito della lesione. Lo scopo principale è quello di facilitare il rilascio locale di mediatori solubili e cellule infiammatorie. La vasodilatazione indotta dall'infiammazione è mediata principalmente dall'ossido nitrico (NO) e dalle prostaglandine vasodilatatrici. I leucociti attivati producono NOS inducibile (iNOS) dopo l'esposizione a prodotti microbici o a citochine pro-infiammatorie. L'NO prodotto provoca il successivo rilassamento della muscolatura liscia attraverso meccanismi dipendenti dal GMP ciclico. Accanto al NO sono protagoniste le prostaglandine vasodilatatorie primarie: queste sono la prostaciclina-2 (PGI<sub>2</sub>), la prostaglandina-2 (PGD<sub>2</sub>), la prostaglandina-E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) e la prostaglandina-F<sub>2</sub>  $\alpha$  (PGF<sub>2</sub> $\alpha$ ). Questi mediatori lipidici sono prodotti dall'acido arachidonico attraverso l'azione della ciclo-ossigenasi (COX). Successivamente alla vasodilatazione si ha la formazione di edema. Questo è dovuto al flusso di fluidi ricchi di proteine dal compartimento intravascolare al sito infiammato in seguito all'azione di istamina, bradichinina, leucotrieni, componenti del complemento, sostanza P e fattore attivante le piastrine. Questi fattori alterano così le funzioni di barriera dei piccoli vasi sanguigni e aumentano la permeabilità. A questi due meccanismi poi si aggiungono la marginazione, l'adesione e la migrazione dei leucociti: i primi ad essere rilasciati sono i neutrofili. La marginazione è il processo di spostamento dei neutrofili dal flusso sanguigno centrale alla periferia del vaso. Questo fenomeno è facilitato dalla stasi conseguente all'essudazione di liquidi nel sito dell'infiammazione e dalle interazioni fisiche tra eritrociti e neutrofili. Dopo la marginazione, si sviluppa una debole interazione adesiva tra i neutrofili e le cellule endoteliali vascolari, che fa sì che i neutrofili rimangano in stretta prossimità dell'endotelio vascolare. Il rotolamento dei neutrofili è facilitato dallo shear stress degli eritrociti in transito, la velocità di rotolamento è proporzionale alla velocità dei globuli rossi. Le interazioni adesive che permettono il rotolamento dei leucociti sono facilitate dalle selectine e dai loro ligandi. L'aderenza è necessaria per la successiva diapedesi e chemiotassi dei neutrofili ed è mediata dall'azione delle integrine e dei loro ligandi. Successivamente a questo i neutrofili attraverso l'endotelio e la membrana basale entrano nel sito infiammato. La

vasodilatazione, l'aumento della permeabilità vascolare e l'infiltrazione cellulare fanno parte della risposta immunitaria innata. I componenti cellulari principali del sistema immunitario innato sono macrofagi, cellule dendritiche, cellule Natural Killer (NK) e neutrofili. Le principali cellule secernenti citochine del sistema immunitario innato sono i macrofagi. Anche le cellule dendritiche sono importanti cellule effettrici per la produzione di citochine durante l'immunità innata. Queste cellule non solo sono responsabili della produzione dei mediatori chimici dell'infiammazione ma anche della formazione del fagolisosoma per inglobare il patogeno ed eliminarlo. Il riconoscimento avviene grazie alla presenza di molecole presenti sulla superficie del patogeno, queste vengono riconosciute e aderiscono alla superficie del fagocita inducendo l'attivazione del processo: infatti la membrana esterna del fagosoma, si fonde con la membrana dei lisosomi per formare il fagolisosoma, all'interno del quale sono riversati gli enzimi responsabili della digestione del materiale da fagocitare, contenuti nei granuli dei macrofagi e dei neutrofili [47].

L'attività delle citochine e dei mediatori non citochinici dell'infiammazione determina in larga misura l'entità della risposta innata. Le citochine sono polipeptidi prodotti dalle cellule del sistema immunitario in risposta ad un danno.

Accanto a questi vi sono i Toll-like receptors (TLR), fondamentali per il riconoscimento di pattern molecolari associati a patogeni e per la successiva segnalazione intracellulare. La loro azione è data dal legame del ligando al complesso TLR, questo induce il reclutamento di diverse proteine di segnalazione citoplasmatiche, tra cui la proteina adattatore MyD88 e la chinasi associata al recettore dell'IL-1 (IRAK). Il reclutamento di IRAK causa l'autofosforilazione e la dissociazione di IRAK da MyD88. L'IRAK fosforilato induce l'attivazione del fattore 6 associato al TNF-R (TRAF-6), che attiva la cascata dell'inibitore di NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B), con conseguente degradazione della proteina inibitoria I $\kappa$ B e il successivo rilascio di NF- $\kappa$ B citoplasmatico. Il fattore di trascrizione NF- $\kappa$ B trasloca quindi nel nucleo per regolare la trascrizione di geni che codificano mediatori pro-infiammatori come TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e iNOS [48].

Inoltre l'attivazione di TRAF-6 provoca anche l'induzione delle vie della proteina mitogeno-attivata (MAP) chinasi, con l'attivazione finale del fattore di trascrizione AP-1. Come NF- $\kappa$ B, AP-1 lega la regione promotrice di geni che codificano mediatori

chimici pro-infiammatori e promuove la produzione di citochine pro-infiammatorie [49].

Questi vengono classificati in sette gruppi sulla base delle loro caratteristiche biochimiche: ammine vasoattive e peptidi vasoattivi, coinvolti nelle prime fasi del processo infiammatorio favorendo la permeabilità vascolare e la vasodilatazione;

frammenti del complemento, coinvolti nel reclutamento dei monociti ed influenzano il flusso sanguigno;

mediatori lipidici, derivano dai fosfolipidi e sono coinvolti nella vasodilatazione infiammatoria;

chemochine, controllano la fuoriuscita dei leucociti e il loro spostamento verso i tessuti danneggiati; enzimi proteolitici, coinvolti nella degradazione delle proteine e della membrana basale;

e per finire le citochine, prodotte principalmente dai macrofagi, sono ubiquitarie e possono avere attività pro-infiammatoria e attività anti-infiammatoria, tra queste distinguiamo le interleuchine (IL), gli interferoni (INF) e il fattore di necrosi tumorale (TNF- $\alpha$ ).

Il principale responsabile del rilascio di questi fattori dell'infiammazione è il fattore di trascrizione nucleare NF- $\kappa$ B: esso è localizzato nel nucleo ed agisce inducendo la trascrizione e quindi il successivo rilascio dei mediatori dell'infiammazione [50].

Il fattore di necrosi tumorale  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) è prodotto dai fagociti mononucleati, dai linfociti e dalle cellule Natural Killer. Esso fa in modo che l'infiammazione rimanga localizzata: induce l'attivazione vascolare, il rilascio dell'ossido nitrico (NO) che media la vasodilatazione e aumenta la permeabilità vascolare. È stato dimostrato che esso è coinvolto nello sviluppo dell'endometriosi, infatti la sua concentrazione nel fluido peritoneale è elevata, ed agisce sulle cellule del tessuto endometriale favorendo la loro proliferazione [51].

L'interleuchina 1 (IL-1) viene prodotta dai monociti e dai macrofagi, e si distingue in: l'interleuchina 1 $\alpha$  e l'interleuchina 1 $\beta$ , sono prodotte da due geni diversi ma agiscono allo stesso modo, infatti entrambe inducono la proliferazione dei linfociti T helper e dei linfociti B, e agiscono sulle prime fasi dell'infiammazione. Nell'endometriosi si è visto che l'IL-1 stimola la proliferazione dei fibroblasti e l'adesione del collagene

favorendo così lo sviluppo delle aderenze e del tessuto fibrotico, infatti la sua concentrazione è elevata nel fluido peritoneale di donne affette da endometriosi [52]. L'interleuchina 2 (IL-2) favorisce la proliferazione e il rilascio dei linfociti T, stimolando la proliferazione delle cellule Natural Killer (NK) e la loro azione citotossica.

L'interleuchina 4 (IL-4) è in grado di agire sia sulle cellule immunitarie, come i linfociti T e B, che sulle cellule endoteliali: inibisce la sintesi di interleuchina 6 e del fattore di necrosi tumorale.

L'interleuchina 6 (IL-6) è prodotta da diversi tipi di cellule tra cui i fagociti mononucleati, i linfociti T e i linfociti B e le cellule endoteliali; ha un'azione pro-infiammatoria infatti favorisce il reclutamento dei macrofagi. Nelle pazienti affette da endometriosi si è visto che le concentrazioni di IL-6 favoriscono la proliferazione cellulare dell'endometrio [52].

L'interleuchina 7 (IL-7) è prodotta dalle cellule stromali ed agisce come fattore stimolante ed antiapoptotico dei linfociti T e B.

L'interleuchina 8 (IL-8) può avere sia azione pro-infiammatoria che angiogenica. I suoi livelli sono aumentati nel caso di donne affette da endometriosi, infatti contribuisce allo sviluppo di cellule di adesione e di conseguenza allo sviluppo della patologia infiammatoria cronica tipica dell'endometriosi.

L'interleuchina 10 (IL-10) è prodotta dai linfociti T, ha azione antiinfiammatoria infatti favorisce la distruzione e l'allontanamento dell'agente patogeno [53].

### **2.1.2 Infiammazione cronica**

Il processo infiammatorio di tipo cronico è caratterizzato da una durata maggiore e coinvolge principalmente eventi cellulari. Solitamente il processo di tipo cronico insorge per uno stimolo infiammatorio persistente ed una mancata eliminazione di questo durante la fase acuta, che quindi cronicizza. L'infiammazione cronica è un processo lento, può durare per periodi prolungati che si estendono anche per anni [54]. Inizialmente si ha il reclutamento di macrofagi e linfociti, che cercano di riparare il danno tissutale che si determina. I macrofagi sono le cellule principalmente coinvolte

e una volta attivati si distinguono in macrofagi M1 e macrofagi M2: i primi sono responsabili della produzione di citochine e chemochine a favore del processo infiammatorio, così come di specie reattive all'ossigeno, mentre i secondi sono specializzati nella produzione di citochine antinfiammatorie [55]. Essi assumono un ruolo nella riparazione del danno, in quanto determinano la formazione di nuovi vasi mediante il processo di angiogenesi e stimolano la sintesi del collagene [56].

Le caratteristiche principali dell'infiammazione cronica sono l'infiltrazione di cellule infiammatorie primarie come macrofagi, linfociti e plasmacellule nel sito danneggiato: questi producono citochine infiammatorie, fattori di crescita ed enzimi, contribuendo così alla progressione del danno tissutale e alla riparazione secondaria, compresa la fibrosi e la formazione di granulomi. Le principali citochine che vengono rilasciate dai macrofagi sono IL-1 e TNF- $\alpha$ : queste stimolano le cellule endoteliali a rilasciare selectine e integrine, le quali a loro volta inducono la chemiotassi e la diapedesi dei leucociti circolanti [55]. Questi, nello specifico i neutrofili, contengono granuli ricchi di lisozima, metalloproteinasi di matrice, mieloperossidasi, vengono rilasciati sull'antigene estraneo o auto-antigene e ne provocano la distruzione, attraverso la fagocitosi. I linfociti, compresi i linfociti T e i linfociti B, sono la linea di difesa successiva e svolgono un ruolo cruciale nel mediare l'infiammazione attraverso diversi meccanismi complessi, tra cui la secrezione di citochine, la costimolazione dei linfociti e la produzione di anticorpi e immunocomplessi. Anche le piastrine circolanti possono svolgere un ruolo nell'infiammazione attraverso l'aggregazione piastrinica, la formazione di trombi e la degranolazione, rilasciando chemochine e mediatori infiammatori [57] [58].

L'infiammazione cronica è una caratteristica essenziale dell'endometriosi; tuttavia, non è ancora noto se l'infiammazione sia parte del processo che istiga la malattia o il fattore che la perpetua. Si è visto che l'estradiolo aumenta la produzione di prostaglandine E2, attivando la ciclossigenasi-2 all'interno delle cellule endoteliali uterine [57].

## **2.2 Stress ossidativo**

Lo stress ossidativo è una condizione che si genera dal mancato equilibrio tra la produzione di sostanze ossidanti e sostanze antiossidanti, questo induce lo sviluppo di alterazioni a carico dei processi biologici con effetti dannosi a carico delle cellule [59] (Figura 3). Normalmente il nostro organismo produce specie reattive, note come radicali liberi, necessarie in alcuni processi fisiologici, ma quando i livelli di queste aumentano considerevolmente si va incontro a danni biologici [60]. Il termine “specie reattive dell'ossigeno” si applica sia ai radicali liberi che ai loro intermedi non radicali. I radicali liberi sono definiti come specie contenenti uno o più elettroni spaiati, ed è questo guscio elettronico incompleto che conferisce loro un'elevata reattività. I radicali liberi possono essere generati da molti elementi, ma nei sistemi biologici i più importanti sono quelli che coinvolgono l'ossigeno e l'azoto.

Normalmente nel nostro organismo la produzione di radicali liberi avviene a partire dall'attivazione dell'ossigeno in presenza di ferro, con la liberazione dell'anione superossido [60]. In condizioni fisiologiche, il radicale più comune è l'anione superossido  $O_2^{\cdot-}$  e i mitocondri sono considerati la fonte principale. Il trasferimento di elettroni lungo gli enzimi della catena respiratoria non è totalmente efficiente e la perdita di elettroni sull'ossigeno molecolare, porta alla formazione di  $O_2^{\cdot-}$ . A causa della sua carica, l' $O_2^{\cdot-}$  è impermeabile alla membrana e quindi rimane all'interno della matrice mitocondriale [28]. L'allontanamento, o meglio, la detossificazione di questo radicale avviene grazie agli enzimi superossido dismutasi, che lo convertono in perossido di idrogeno. Il perossido di idrogeno non è un radicale libero e quindi è meno reattivo; e successivamente questo viene detossificato in acqua dagli enzimi catalasi e glutazione perossidasi. La catalasi catalizza la conversione del perossido di idrogeno in acqua ( $H_2O$ ) e ossigeno ( $O_2$ ). Mentre la glutazione perossidasi converte il perossido di idrogeno in acqua, ma in più catalizza la conversione di glutazione nella sua forma ridotta [61].

La particolarità di questi radicali è quella di indurre la perossidazione dei lipidi nella membrana plasmatica o in quella di qualsiasi organello che contenga grandi quantità di catene laterali di acidi grassi polinsaturi. Ma sono anche in grado di danneggiare le proteine: ciò può avvenire per ossidazione degli amminoacidi liberi o delle proteine inducendo un danno nella struttura e quindi nelle funzioni, ma anche all'aggregazione proteica e alla morte cellulare.

Un altro tipo di radicale libero è l'anione ossidrilico che è il principale responsabile della perossidazione lipidica [62]. Questo radicale invece danneggia principalmente il DNA, causando rotture di filamenti, oppure ossidazione delle proteine istoniche e può portare a legami incrociati che interferiscono con il ripiegamento della cromatina, la riparazione del DNA e la trascrizione. Possono quindi verificarsi mutazioni o espressioni geniche aberranti.

L'equilibrio ossidativo viene mantenuto grazie all'attività del fattore di trascrizione Nrf2, questo in condizioni normali è legato alla sua proteina inibitrice Keap-1, mentre in condizioni di stress ossidativo trasloca nel nucleo e induce la trascrizione ed il rilascio di enzimi antiossidanti come la superossido dismutasi (SOD), la catalasi (CAT) e la glutatione perossidasi (GPX) [63].

Nrf2 è il regolatore trascrizionale principale delle risposte cellulari contro lo stress ossidativo: regola l'espressione di una moltitudine di geni antiossidanti e di enzimi di fase II ed è regolato negativamente dalla proteina Keap1, questa è una proteina adattatrice del substrato che si lega a Nrf2 nel citosol per facilitarne la poliubiquitinazione da parte della ligasi di ubiquitina E3 Cullin 3 (Cul3) per la degradazione proteasomica [64]. La degradazione costitutiva di Nrf2 consente una bassa espressione basale in condizioni di non stress. Invece, in condizioni di stress ossidativo, specifici residui di cisteina sensibili allo stress in Keap1 vengono modificati, portando ad un cambiamento conformazionale: ciò determina la stabilizzazione, l'accumulo e la traslocazione nucleare di Nrf2, che si lega all'ARE per la robusta induzione di geni citoprotettivi per enzimi coinvolti nella detossificazione dei ROS e di altri ossidanti [65].

Anche per quanto riguarda lo stress ossidativo si è visto che svolge un ruolo chiave nella progressione dell'endometriosi: l'aumento dei livelli di molecole pro-ossidanti induce la proliferazione cellulare e lo sviluppo delle lesioni endometriali. Inoltre i livelli di radicali liberi sono aumentati, mentre i livelli di enzimi antiossidanti sono ridotti nei soggetti affetti da endometriosi [66]. Ed ancora, i ROS sono in grado di influenzare i processi riproduttivi femminili, come l'ovulazione, la fecondazione, lo sviluppo dell'embrione e l'impianto [67].

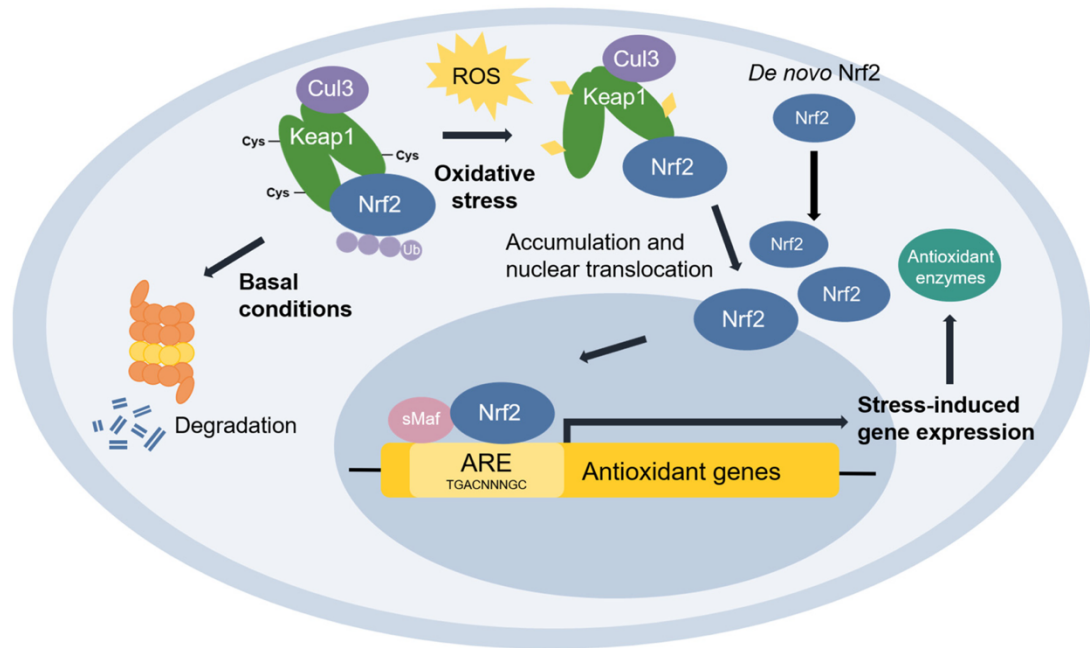


Figura 3 Meccanismi molecolari dello stress ossidativo(10.3390/antiox11122345)

## 2.3 Apoptosi

L'apoptosi, chiamata anche morte cellulare programmata, è il processo attraverso il quale le cellule danneggiate o malfunzionanti vengono eliminate [68]. Nell'apoptosi le principali proteine coinvolte sono le caspasi e le Bcl-2 [69].

Le caspasi hanno un'azione pro-apoptotica, la loro attivazione è mediata da un meccanismo a cascata che coinvolge caspasi iniziatrici e caspasi effettrici: le iniziatrici presentano una regione N-terminale in cui è contenuto il dominio effettore DED, responsabile del legame con altre proteine coinvolte nell'attivazione di altre caspasi; le effettrici invece sono costituite da una regione N-terminale più piccola.

Le vie di attivazione della caspasi sono due: via estrinseca e via intrinseca [70] (Figura 4).

Nella via estrinseca per l'attivazione si ha il coinvolgimento dei recettori transmembrana: questi appartengono alla famiglia dei recettori per il TNF- $\alpha$ . Strutturalmente presentano domini extracellulari simili, ricchi di cisteina con un dominio citoplasmatico di circa 80 aminoacidi chiamato "dominio della morte", questo è il dominio coinvolto nella via di segnalazione. L'attivazione della via estrinseca

inizia con un raggruppamento dei recettori e il legame con il ligando trimerico omologo. Il legame del ligando Fas al recettore Fas determina il legame della proteina adattatrice FADD e il legame del ligando TNF al recettore TNF determina il legame della proteina adattatrice TRADD con il reclutamento di FADD e RIP. Successivamente FADD si associa alla procaspasi-8 attraverso la dimerizzazione del dominio dell'effettore di morte. Ed a questo punto, si ha la formazione del complesso di segnalazione che induce la morte (DISC), con conseguente attivazione autocatalitica della procaspasi-8 [71]. Lo step successivo all'attivazione della pro-caspasi-8 è la fase esecutiva dell'apoptosi. Nella via di segnalazione estrinseca vi sono alcuni punti in cui l'apoptosi può essere controllata e bloccata: può essere inibita da una proteina chiamata c-FLIP che si lega a FADD e alla caspasi-8, rendendoli inefficaci; oppure una proteina chiamata Toso, blocca l'apoptosi indotta da Fas nelle cellule T attraverso l'inibizione dell'elaborazione della caspasi-8 [72].

Nella via di segnalazione intrinseca si hanno una serie di stimoli che inducono l'attivazione di segnali intracellulari i quali agiscono direttamente all'interno della cellula e sono avviati dai mitocondri. Tutti questi stimoli causano cambiamenti nella membrana mitocondriale interna che si traducono nell'apertura del poro di transizione della permeabilità mitocondriale (MPT), nella perdita del potenziale transmembrana mitocondriale e nel rilascio di due gruppi principali di proteine pro-apoptotiche normalmente sequestrate dallo spazio intermembrana al citosol. Queste proteine attivano il percorso mitocondriale caspasi-dipendente [73]. Il citocromo c si lega e attiva Apaf-1 e la procaspasi-9, formando un "apoptosoma": il raggruppamento della procaspasi-9 in questo modo porta all'attivazione della caspasi-9 [74].

Il secondo gruppo di proteine pro-apoptotiche, AIF, endonucleasi G e CAD, vengono rilasciate dai mitocondri durante l'apoptosi, ma si tratta di un evento tardivo che si verifica dopo che la cellula si è impegnata a morire. L'AIF trasloca nel nucleo e provoca la frammentazione del DNA e la condensazione della cromatina nucleare periferica. Anche l'endonucleasi G trasloca nel nucleo dove taglia la cromatina nucleare per produrre frammenti di DNA oligonucleosomico [75]. L'AIF e l'endonucleasi G funzionano entrambi in modo indipendente dalle caspasi. CAD viene successivamente rilasciato dai mitocondri e trasloca nel nucleo dove, dopo il clivaggio da parte della caspasi-3, porta alla frammentazione del DNA oligonucleosomico e a

una condensazione cromatinica più pronunciata e avanzata. Il controllo e la regolazione di questi eventi apoptotici mitocondriali avvengono attraverso i membri della famiglia di proteine Bcl-2. La famiglia di proteine Bcl-2 regola la permeabilità della membrana mitocondriale e può essere pro-apoptotica o anti-apoptotica [76].

Si ritiene che il principale meccanismo d'azione delle proteine della famiglia Bcl-2 sia la regolazione del rilascio di citocromo c dai mitocondri attraverso l'alterazione della permeabilità della membrana mitocondriale [77].

Negli ultimi anni è stata studiata anche una via di attivazione dell'apoptosi indipendente dalla caspasi. Ad esempio l'aumento della produzione di ROS e i ROS stessi possono essere il fattore principale per indurre questo tipo di apoptosi. Anche il GSH, l'NO o altri gruppi di radicali liberi possono prendere parte a questo tipo di morte cellulare. In questo modo, si hanno alcune proteine modificate dal GSH o dall'NO che possono prendere parte alla via dell'apoptosi: in quanto si generano delle modifiche che possono influenzare le funzioni della proteina e portare la cellula all'apoptosi. È importante ricordare però che i ROS sono coinvolti anche nell'apoptosi dipendente dalla caspasi e per questo motivo potrebbero rappresentare il punto di unione tra le due vie di morte cellulare [78].

Nell'endometriosi è stato osservato che il meccanismo dell'apoptosi non funziona come dovrebbe, infatti vi è una mancata eliminazione delle cellule, e questo induce l'eccessiva proliferazione e quindi la progressione della patologia [26]. In particolare si ha una maggiore espressione di fattori anti-apoptotici e una minore espressione di fattori pro-apoptotici: soprattutto vi è una maggiore espressione delle proteine appartenenti alla famiglia di Bcl-2, questo induce la sopravvivenza delle cellule endometriali e quindi lo sviluppo dell'endometriosi [79]. Inoltre l'aumento dell'apoptosi delle cellule immunitarie portatrici di Fas nella cavità peritoneale potrebbe portare a una diminuzione della loro attività di scavenger che alla fine si traduce in una sopravvivenza prolungata delle cellule endometriali nell'endometriosi [80].

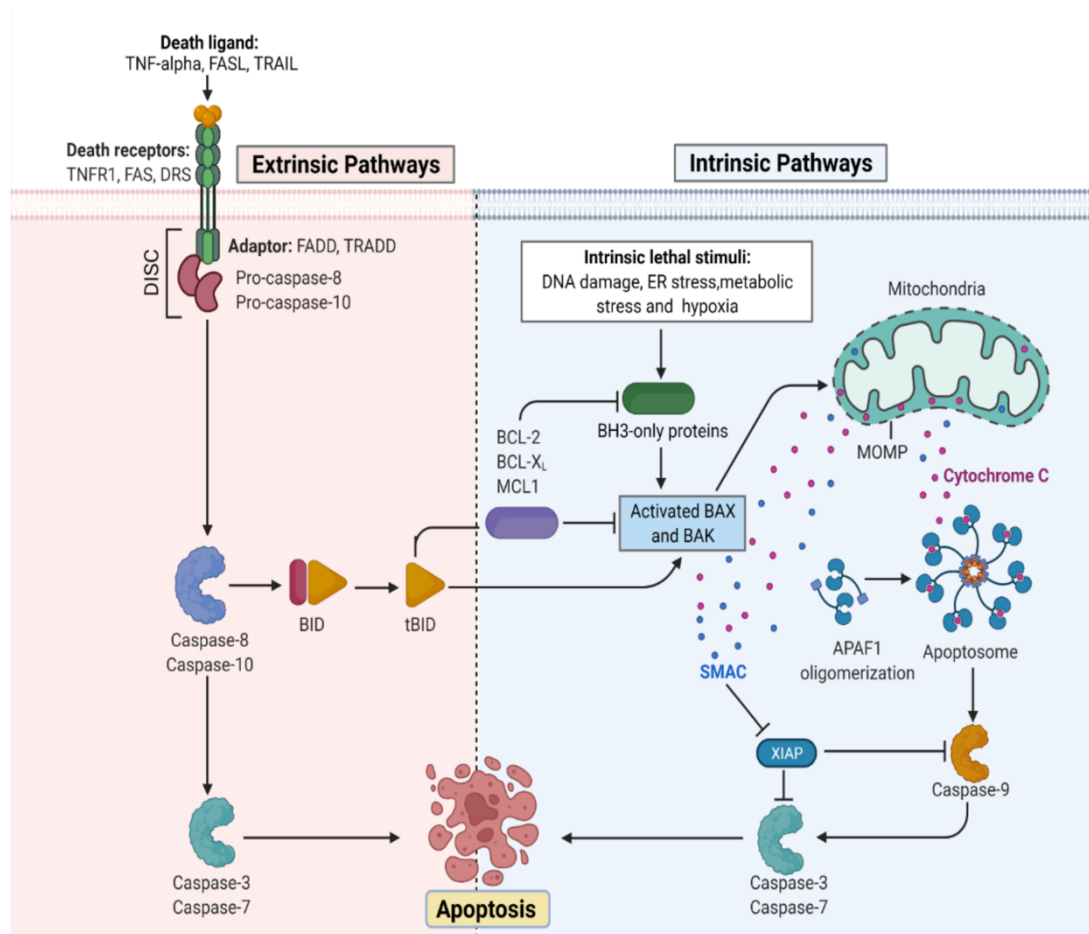


Figura 4 Via estrinseca ed intrinseca nell'apoptosi (<https://doi.org/10.3390/biom13020194>)

## 2.4 Fibrosi

Lo sviluppo di tessuto fibrotico e la sintesi di collagene a carico di un organo o di un tessuto, con conseguenze sia sul meccanismo che sulla funzionalità dell'organo stesso è chiamata Fibrosi. La formazione di tessuto fibrotico è caratterizzata dall'accumulo eccessivo di componenti della matrice extracellulare (ECM), all'interno e intorno a un tessuto infiammato o danneggiato, e rappresenta una fase abituale e significativa della riparazione tissutale in tutti gli organi. Il processo biologico della fibrosi richiede il coinvolgimento di piastrine, macrofagi e miofibroblasti attivati, che a loro volta contribuiscono ad alti livelli di fattore di crescita trasformante (TGF)- $\beta$  e alla deposizione di collagene [81] (Figura 5). In seguito al processo infiammatorio spesso

il nostro organismo va incontro allo sviluppo di tessuto fibrotico [82]. Il TGF- $\beta$  secreto è una delle principali citochine pro-fibrogene. Il meccanismo più studiato per l'attivazione del TGF- $\beta$ 1 è l'interazione del complesso latente del TGF- $\beta$ 1 con il sottogruppo di integrine: si legano a un frammento N-terminale del prodotto genetico del TGF- $\beta$ 1 che forma un complesso non covalente con la citochina attiva. Altri fattori responsabili della formazione di tessuto fibrotico sono le citochine infiammatorie: queste sono in grado di stimolare la produzione e la stabilizzazione di TGF- $\beta$  sui fibroblasti. Un altro meccanismo che coinvolge le citochine nella fibrosi è dato dall'infiltrazione di eosinofili e macrofagi nel sito [83].

Nell'endometriosi questa è una condizione fortemente sviluppata, infatti le aderenze e il tessuto cicatriziale tipico di questa malattia non sono altro che tessuto fibrotico [84, 85]. Le cellule responsabili di questo sono le cellule Th-2 le quali inducono il rilascio di citochine e poi la formazione del tessuto fibrotico [86]. Le citochine, oltre ad essere coinvolte nell'infiammazione sono anche in grado di attivare i fibroblasti. Lo sviluppo del tessuto fibrotico può anche avvenire in seguito al coinvolgimento dei macrofagi, i quali attivano la proliferazione dei fibroblasti e la sintesi del collagene. Inoltre la sintesi di collagene può essere attivata in seguito alla produzione dei fibrociti dalle cellule ematopoietiche [87].

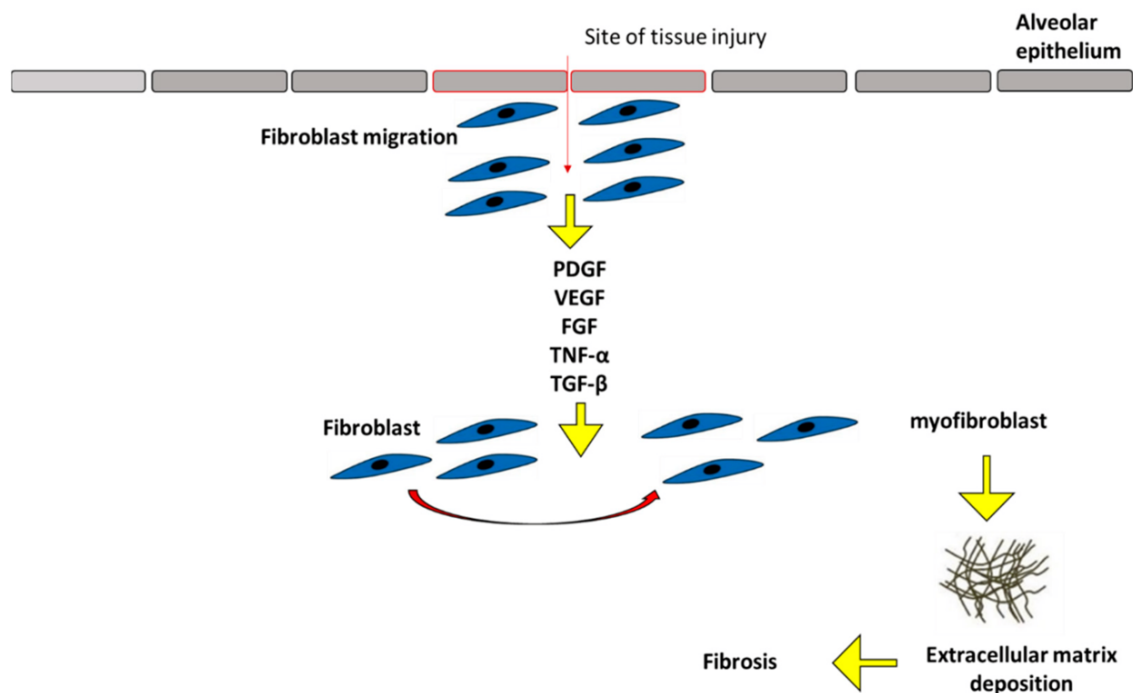


Figura 5 Meccanismo molecolare della fibrosi (<https://doi.org/10.3390/ijms24044004>)

## 2.5 Neuroinfiammazione

La neuroinfiammazione è il processo di tipo infiammatorio che coinvolge il sistema nervoso centrale, esso differisce dal normale processo infiammatorio in quanto sono coinvolte le cellule nervose: neuroni, microglia e macroglia (Figura 6). Le cellule della microglia sono i macrofagi cerebrali residenti che svolgono un ruolo critico nella difesa dell'organismo e nella riparazione dei tessuti: la loro attivazione è il primo indicatore della presenza di un processo neuroinfiammatorio [88]. Per capire come l'infiammazione periferica induce la neuroinfiammazione bisogna chiarire che la barriera emato-encefalica e il trasporto delle molecole attraverso questo svolgono un ruolo importante: infatti le molecole infiammatorie sono in grado di attraversare la barriera e giungere a livello centrale.

Le cellule microgliali svolgono un ruolo cruciale nel processo di neuroinfiammazione: queste in risposta alle citochine e ad altre molecole di segnalazione dell'infiammazione acuta si trasformano da uno stato ramificato e inattivo ad uno stato fagocitico attivato, rilasciando mediatori pro-infiammatori nel processo. In termini di

neuroinfiammazione cronica, queste cellule possono rimanere attivate per periodi prolungati, rilasciando quantità di citochine e molecole neurotossiche che contribuiscono alla neurodegenerazione a lungo termine. In seguito all'attivazione le cellule della microglia possono subire anche riarrangiamenti citoscheletrici che alterano l'espressione dei recettori sulla superficie e ciò le rende più efficienti facendole migrare verso il sito danneggiato. Nella neuroinfiammazione i macrofagi una volta attivati vengono distinti in M1 e M2: i primi sono stimolati dall'IFN- $\gamma$  e da TNF- $\alpha$ , mentre i secondi sono stimolati da IL-4. Accanto alle cellule della microglia vi sono gli astrociti che rilasciano altre molecole di segnalazione pro-infiammatorie, come il TNF- $\alpha$ , quando vengono stimulate nella corteccia e nel mesencefalo, essi sono anche coinvolti nella funzione e nella regolazione sinaptica. Gli astrociti e le microglia esprimono una serie di recettori Toll-like (TLR) che attivano queste cellule e danno inizio a una reazione neuroinfiammatoria: come sappiamo i TLR sono importanti proteine di trasduzione del segnale nel sistema immunitario innato e nella risposta infiammatoria [88]. Il rilascio iniziale di citochine può avviare l'ulteriore produzione di molecole di segnalazione e stimolare la produzione di altri marcatori infiammatori, la produzione di citochine e chemochine può facilitare, inoltre, il reclutamento di leucociti nel cervello [89, 90].

In generale nella neuroinfiammazione vi è il coinvolgimento di diverse citochine pro-infiammatorie come IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ , chemochine come CCL2, CCL5, CXCL1, messaggeri secondari come NO e prostaglandine e specie reattive dell'ossigeno: questi mediatori sono prodotti da cellule residenti del SNC attivate, tra cui microglia e astrociti [91]. Queste cellule possono rimanere attivate per periodi prolungati, rilasciando citochine e molecole neurotossiche che contribuiscono alla neurodegenerazione a lungo termine [89]: causando disfunzione neuronale e morte cellulare [92].

Nell'endometriosi il coinvolgimento della neuroinfiammazione è ancora poco studiato. Negli ultimi anni è stato dimostrato che vi è un'eccessiva attivazione delle cellule gliali e delle cellule della microglia: questo induce una modifica a livello del sistema nervoso centrale [93]. Inoltre si è visto che l'attivazione della neuroinfiammazione è correlata anche ad un aumento della sensibilizzazione centrale, questo spiegherebbe la cronicizzazione del dolore neuronale e periferico [94]. Questo

è legato al fatto che l'infiammazione stimola le terminazioni nervose periferiche e le fibre nervose inducendo il reclutamento di macrofagi e l'infiltrazione delle fibre nervose aggravando così le condizioni infiammatorie [94, 95].

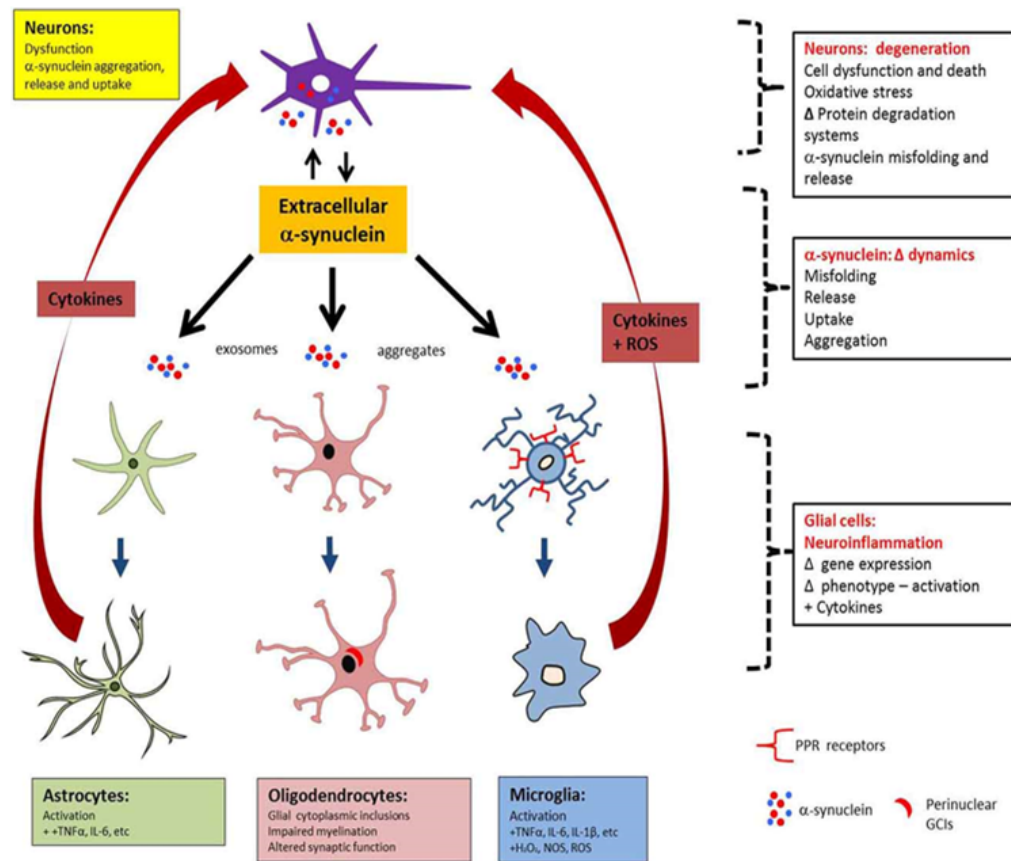


Figura 6 Principali cellule coinvolte nella neuroinfiammazione (<https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00437>)

## 2.6 Dolore

Il dolore viene definito come un'esperienza sensoriale spiacevole associata ad un danno tissutale reale o potenziale ed è distinto in acuto o cronico. Il dolore acuto è causato da uno stimolo nocivo dovuto a una lesione, ad un processo patologico o ad un malfunzionamento di muscoli o visceri. Il dolore cronico, invece, persiste oltre il decorso previsto di un processo patologico acuto ed è solitamente definito come dolore che dura più di sei mesi [96]. I meccanismi esatti coinvolti nella fisiopatologia del

dolore cronico non sono ben compresi, ma si ritiene che si verifichino cambiamenti rapidi e a lungo termine in parti del sistema nervoso centrale coinvolte nella trasmissione e nella modulazione del dolore a seguito di una lesione. I processi dolorosi sono plastici e il dolore non alleviato può portare a cambiamenti nella struttura neurale coinvolta nella generazione del dolore. Il dolore nocicettivo annuncia la presenza di uno stimolo potenzialmente dannoso che si verifica quando gli stimoli nocivi attivano i neuroni afferenti primari. Il dolore neuropatico può essere causato da una lesione o disfunzione primaria del sistema nervoso dovuta a traumi o patologie preesistenti. La sensibilizzazione sia periferica che centrale delle fibre nervose sensoriali è la causa principale dell'ipersensibilità al dolore dopo una lesione e si verifica soprattutto nel dolore infiammatorio e neuropatico [97]. Nella percezione del dolore distinguiamo sensibilizzazione periferica quando un segnale biochimico viene convertito in un segnale neurale: sensibilizzazione delle fibre nervose sensoriali attraverso l'attivazione dei nocicettori. A livello spinale, il segnale viene modulato e rimandato al cervello, dove avviene la percezione del dolore: sensibilizzazione centrale [98]. I neuroni sensoriali che proiettano dai tessuti periferici al sistema nervoso centrale (SNC) sono il primo passo nella via del dolore.

Nella fisiopatologia del dolore vi è il coinvolgimento di diverse regioni cerebrali, che producono stimoli dolorosi i quali a loro volta convergono verso i centri di controllo del dolore del tronco encefalico: a questo punto vi è la trasmissione di messaggi discendenti al midollo spinale, che possono essere inibitori o facilitatori, per ridurre o aumentare i messaggi nocicettivi in arrivo dalla periferia. Le vie del dolore possono quindi essere attivate dal cervello al tronco encefalico, oppure in senso inverso dal midollo spinale e periferico al tronco encefalico [99]. In seguito all'attivazione delle vie del dolore si è visto che vi è anche il coinvolgimento dei neurotrasmettitori nello sviluppo del dolore, in particolare si è visto che BDNF rilasciato dal midollo spinale può formare vie di segnalazione legandosi a TrkB, attivando così l'espressione della proteina chinasi C spinale nei neuroni spinali, che può regolare l'ipersensibilità al dolore e influenzare ulteriormente la progressione del dolore neuropatico [100].

Il dolore infiammatorio induce cambiamenti persistenti a livello cellulare e molecolare, consentendo anche a un danno tissutale o nervoso transitorio di provocare cambiamenti nelle cellule che contribuiscono allo sviluppo del dolore cronico e dei

sintomi associati [101] (Figura 7). Nel dolore infiammatorio vi è il coinvolgimento di diversi tipi di cellule, le quali sono responsabili della sensibilità al dolore. In particolare i macrofagi attivati contribuiscono agli stati dolorosi e successivamente rilasciano molti mediatori infiammatori, come ad esempio l'ossido nitrico il quale si è visto essere un importante mediatore dell'iperalgisia.

Il dolore infiammatorio deve essere distinto da quello neuropatico, il quale è dato da un danno a livello dei nervi periferici: questo è un tipo di dolore persistente e quindi cronico. Il dolore neuropatico insorge in seguito a molte forme di danno nervoso. E si è visto che i neutrofili potrebbero avere un ruolo importante nella fase iniziale dello sviluppo del dolore neuropatico [102]. Nel dolore neuropatico quello che avviene è un'alterazione a carico delle proprietà elettriche dei nervi sensoriali, che induce degli squilibri tra segnalazione centrale eccitatoria e inibitoria, il che si traduce in una compromissione dei neuroni e dei sistemi di controllo. Nello specifico la trasmissione dei segnali sensoriali e i meccanismi di disinibizione o di facilitazione sono alterati a livello dei neuroni del corno dorsale del midollo spinale: questi cambiamenti portano le vie sensoriali a uno stato di ipereccitabilità e a una perdita di inibizione. Successivamente quello che si osserva è un cambiamento nella sensibilizzazione periferica che contribuisce a rendere cronico lo stato di dolore. Inoltre l'ipereccitabilità che si registra consente alle fibre afferenti mecano-sensibili di attivare i neuroni nocicettivi di secondo ordine. Questo si traduce in un'alterazione dei messaggi che vengono inviati al cervello, i quali sono anormali. Infatti il talamo, la corteccia e le regioni limbiche proiettano messaggi alterati con un'elevata valutazione del dolore [103].

Anche se negli ultimi anni la ricerca ha fatto dei passi avanti nella comprensione del dolore cronico, ancora oggi il modo in cui i neuroni sensoriali rilevano e trasmettono il dolore dagli organi pelvici colpiti dall'endometriosi rimane poco chiaro. L'attivazione di queste afferenze sensoriali pelviche porta all'attivazione di neuroni nel corno dorsale del midollo spinale e a comportamenti legati al dolore [104]. I meccanismi periferici del dolore associato all'endometriosi sono numerosi, con un'interazione tra lesioni endometriosiche, sistema immunitario, fibre nervose periferiche sia nelle lesioni che nel peritoneo adiacente e neuroni periferici: in particolare i mediatori chimici dell'infiammazione possono sensibilizzare direttamente

i nervi periferici attraverso specifici recettori della superficie cellulare o evocare complessi circuiti di feedback, che amplificano la risposta infiammatoria microambientale e la generazione del dolore. È il dolore stesso che modifica anche la struttura e la funzione del sistema nervoso centrale, portando spesso a una “sensibilizzazione centrale”: meccanismo importante nel dolore associato all'endometriosi. La sensibilizzazione centrale può diventare indipendente dagli stimoli periferici attraverso meccanismi neurali simili a quelli alla base della generazione della memoria e per questo motivo il suo sviluppo può portare alla generazione del dolore senza un input nocivo periferico [105].

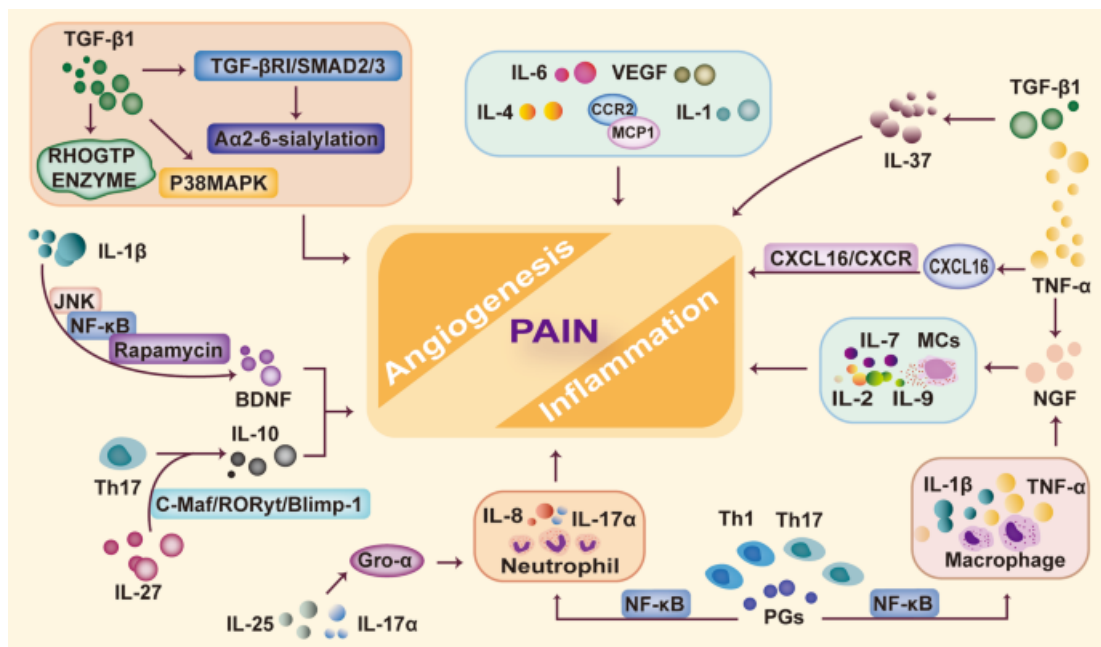


Figura 7 Meccanismo e mediatori del dolore (10.1186/s12974-020-01752-1)

### 3. ENDOMETRIOSI E NUTRIZIONE

L'endometriosi è una malattia di tipo cronico a carattere doloroso e infiammatorio in cui influisce fortemente lo stile di vita e di conseguenza anche l'alimentazione che viene seguita. I principali processi fisiopatologici dell'endometriosi sono l'infiammazione, lo stress ossidativo e il dolore a cui si aggiungono l'attività degli estrogeni e la regolarità mestruale: la dieta influisce quindi in maniera integrante su questi fattori, avendo anche un ruolo nello sviluppo e nella progressione di questa malattia. La dieta rientra tra i fattori legati allo stile di vita, a questi si aggiungono il consumo di alcol o caffeina, il fumo e la scarsa attività fisica, in quanto influenzano il livello di estrogeni nell'organismo e possono quindi influenzare lo sviluppo della malattia. Il consumo di cibi che favoriscono l'infiammazione e lo squilibrio ossidativo danneggia ulteriormente l'organismo favorendo la progressione della malattia. Gli acidi grassi saturi i quali sono contenuti nella carne rossa e lavorata, nel burro, nei latticini grassi (formaggio, panna) e nell'olio di cocco e di palma [106], possono provocare un aumento dell'infiammazione nell'organismo. Gli acidi grassi saturi possono stimolare direttamente l'espressione di geni infiammatori inducendo l'attivazione dei recettori TLR4, l'attivazione di lipopolisaccaridi pro-infiammatori e stimolando il rilascio di citochine proinfiammatorie TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 e IL-8. Quindi un consumo eccessivo di acidi grassi saturi può anche aumentare il rischio di endometriosi producendo estrogeni endogeni e aumentando l'ambiente infiammatorio [107]. Allo stesso modo il consumo di acidi grassi trans aumenta i livelli di IL-6 e TNF- $\alpha$  e contribuisce a ridurre i livelli di lipidi buoni: questo induce un aumento dell'infiammazione [108]. L'assunzione di zuccheri semplici può portare a rapide fluttuazioni dei livelli di glucosio nel sangue che, a loro volta, stimolano la secrezione di insulina e allo stesso tempo possono portare all'insulino-resistenza, che può alterare l'equilibrio ormonale dell'organismo: di conseguenza si va incontro ad alterazioni dei livelli di estrogeni e progesterone, ormoni fondamentali per la salute riproduttiva [109].

Allo stesso modo la dieta può svolgere un ruolo importante come fattore non farmacologico nella gestione dell'endometriosi: alcuni aspetti nutrizionali possono sostenere la salute generale e ridurre i sintomi della malattia.

Una dieta ricca di cibi con proprietà antiinfiammatorie può contribuire a ridurre questa condizione e ad alleviare i sintomi. Una dieta sana dovrebbe essere ricca di ingredienti antinfiammatori come verdure a foglia, bacche, noci, pesci grassi e olio di semi di lino, e dovrebbe limitare i potenziali ingredienti pro-infiammatori come i grassi saturi, gli zuccheri più semplici e i prodotti alimentari elaborati. La dieta può aiutare a regolare i livelli ormonali. Assumere alimenti ricchi di fibre alimentari, può contribuire a regolare i livelli di estrogeni favorendo un metabolismo sano. Allo stesso tempo, è bene ricordare che i prodotti altamente elaborati possono contenere sostanze chimiche che influiscono sull'equilibrio ormonale. Anche la salute dell'intestino è importante per mantenere la salute generale del corpo, compresa la regolazione dell'infiammazione e del metabolismo ormonale. Il dolore è uno dei sintomi principali dell'endometriosi, e può essere parzialmente alleviato dalla dieta. La dieta contiene ingredienti ricchi di antiossidanti e acidi grassi omega-3 e può alleviare l'infiammazione e il dolore. In alcuni casi, può essere utile un'integrazione con vitamina D, acidi grassi omega-3 o altri ingredienti. La dieta può svolgere un ruolo fondamentale nella gestione dei sintomi e del decorso della malattia, una buona dieta che può essere definita antiinfiammatoria e antiossidante deve contenere diversi cibi. Tra questi ci sono gli acidi grassi omega-3, i quali sono precursori di eicosanoidi con proprietà antinfiammatorie: infatti competono con gli acidi grassi omega-6 per i siti degli enzimi ciclossigenasi e lipossigenasi questo induce la riduzione della produzione di prostaglandine e leucotrieni pro-infiammatori derivati dall'acido arachidonico [110]. Anche cibi ricchi di antiossidanti come la vitamina C, la vitamina E ed il betacarotene, il selenio o i polifenoli, svolgono un ruolo protettivo nell'endometriosi, in quanto sono in grado di neutralizzare i radicali liberi, ridurre lo stress ossidativo e alleviare l'infiammazione. La loro azione viene svolta soprattutto nei confronti del DNA, il quale può essere danneggiato inducendo così la crescita incontrollata delle cellule endometriali. Si è visto che migliorano anche l'azione degli antiossidanti che si riflette sul sistema immunitario, migliorandone

la risposta [107]. Alcuni alimenti funzionali sono noti per la loro capacità di modulare i livelli degli estrogeni, in particolare le fibre. Le fonti naturali di fibre includono verdura, frutta, cereali integrali, legumi, semi e noci. Negli ultimi anni è stato dimostrato come le fibre sono capaci di legare gli estrogeni liberi ed eliminarli dal nostro organismo, questo è un aspetto importante per la modulazione dell'endometriosi, in quanto ridotti livelli di estrogeni limitano lo sviluppo del tessuto endometriale e quindi della malattia [111]. Le fibre contenute negli alimenti vengono fermentate dai batteri dell'intestino portando alla produzione degli acidi grassi a catena corta, i quali possono avere un effetto antiinfiammatorio [112]. Inoltre, l'assunzione di cibi ricchi di fibre favorisce anche il benessere del microbiota intestinale del nostro organismo, il quale è fondamentale per gli stati infiammatori e ossidanti dell'organismo. Un microbioma sano influenza l'attività di macrofagi e linfociti, i quali possono contribuire a controllare l'infiammazione associata all'endometriosi. Ma non solo, in quanto il microbioma intestinale si è visto essere collegato allo sviluppo dell'endometriosi: nello specifico influenza il metabolismo degli estrogeni [113]. Mangiare verdura, frutta, cereali integrali e legumi favorisce un microbioma intestinale sano: l'integrazione con probiotici e il consumo di prebiotici possono sostenere un microbioma sano e migliorare i sintomi dell'endometriosi [114].

Gli effetti di uno stile di vita sano possono avere un impatto positivo sulla percezione del dolore e portare a una migliore qualità di vita delle donne affette da endometriosi: l'assunzione di cibi funzionali, ricchi di sostanze fitochimiche come carotenoidi, flavonoidi e isotiocianati, con note proprietà antiproliferative e antinfiammatorie e neuroprotettive di proprietà te, può rappresentare un valido aiuto nella modulazione della patologia [115, 116].

### **3.1 Hericium Erinaceus**

L'*Hericium erinaceus* (HER) è un fungo medicinale, conosciuto anche come “criniera del leone”, viene utilizzato da secoli nella medicina tradizionale asiatica ed oggi è oggetto di un crescente interesse scientifico per i suoi benefici

neuroprotettivi, antinfiammatori e immunomodulatori [117, 118]. Questo fungo si presenta con un corpo fruttifero globoso di colore bianco che diventa brunastro con la maturazione. La sua caratteristica principale è la presenza di lunghi aculei pendenti, che ricoprono l'intera superficie [119, 120]. È un fungo saprotrofo e debolmente parassita che colonizza principalmente alberi come querce, faggi, aceri, noci e betulle [121]. Cresce tipicamente su alberi morti o morenti in foreste temperate del Nord America, dell'Europa e dell'Asia, prosperando in regioni con umidità elevata e temperature moderate. In natura, si trova comunemente durante la tarda estate e l'autunno, quando le condizioni ambientali favoriscono la fruttificazione [122].

### **3.1.1 Composti bioattivi**

I principali composti bioattivi presenti nell'*Hericium erinaceus* comprendono polisaccaridi, terpenoidi, composti fenolici e proteine bioattive. Ciascuno di questi composti svolge un ruolo fondamentale nel definire le caratteristiche di questo fungo medicinale. Grazie alla presenza di tali composti, l'*Hericium erinaceus* è caratterizzato da diverse proprietà benefiche per l'organismo: l'attività antiossidante, l'azione antinfiammatoria, e l'effetto neuroprotettivo.

I polisaccaridi, in particolare i  $\beta$ -glucani, sono tra i composti bioattivi più studiati, sono noti per i loro effetti immunomodulatori, antimicrobici e antitumorali [123]: infatti i  $\beta$ -glucani possono stimolare il sistema immunitario attivando macrofagi, cellule natural killer (NK) e linfociti T, migliorando la capacità dell'organismo di combattere le infezioni e persino le cellule tumorali [124]. Altri polisaccaridi presenti nell'*Hericium Erinaceus* includono eteropolisaccaridi composti da glucosio, mannosio, galattosio e arabinosio: questi composti sono in grado di ridurre lo stress ossidativo, regolare i livelli di zucchero nel sangue e migliorare il microbiota intestinale agendo come fibre prebiotiche [125, 126].

I terpenoidi sono un'altra classe significativa di composti bioattivi dell'*Herium erinaceus*, di cui si conoscono principalmente due gruppi: gli ericenoni e le erinacine [127]. Questi composti sono noti soprattutto per le loro proprietà

neurorigenerative e neuroprotettive, in quanto stimolano la sintesi del fattore di crescita nervoso (NGF), una proteina essenziale per la crescita, il mantenimento e la sopravvivenza dei neuroni, rendendoli particolarmente importanti nelle malattie neurodegenerative. Inoltre, le erinacine sono state studiate per la loro capacità di attraversare la barriera emato-encefalica e di esercitare potenti effetti neuroprotettivi. Gli ericenoni, invece, hanno dimostrato un potenziale effetto nel miglioramento sia cognitivo che della memoria [127, 128]. Accanto alle proprietà neuroprotettive questi composti presentano anche un'azione antinfiammatoria e antimicrobica: la loro capacità di modulare le principali vie infiammatorie contribuisce a ridurre la neuroinfiammazione, l'infiammazione sistemica cronica e le malattie associate, compresi i disturbi autoimmuni [129, 130].

Insieme a questi composti sono presenti anche alcune proteine come le lectine, le quali sono in grado di legare i carboidrati dando un'attività immunomodulatoria e antimicrobica, e le glucanasi e chitinasi, enzimi in grado di degradare i polisaccaridi fungini e stimolare le risposte immunitarie [131, 132]. Gli enzimi ossidativi, le laccasi e le perossidasi, coinvolti nella degradazione e disintossicazione della lignina, hanno dimostrato proprietà antiossidanti e antibatteriche [133]. La capacità antiossidante è rinforzata dalla presenza di composti fenolici, tra cui l'acido gallico, l'acido caffeico e l'acido p-cumarico [134]: questi sono in grado di neutralizzare le specie reattive dell'ossigeno e indurre la sintesi di enzimi antiossidanti endogeni [135].

Ad incrementare le capacità antiossidanti vi è l'ergotioneina, un aminoacido derivato dall'istidina, in grado di neutralizzare i ROS e ridurre lo stress ossidativo nelle cellule neuronali [136, 137]. Ancora le proteine inattivanti il ribosoma (RIP), presenti in questo fungo possono inibire la sintesi proteica nelle cellule bersaglio, mostrando potenziali effetti citotossici [138, 139]. Le idrofobine, proteine tensioattive che svolgono un ruolo nella formazione di biofilm, possono essere sfruttate per applicazioni biomediche emergenti [139].

Ed infine l'*Hericium erinaceus* è anche una ricca fonte di nutrienti essenziali, tra cui proteine, fibre alimentari, vitamine del complesso B (B1, B2, B3, B5, B6) e precursori della vitamina D, e minerali, che contribuiscono a diversi processi fisiologici, tra cui la difesa antiossidante e la funzione nervosa [140].

### 3.1.2 Proprietà terapeutiche

I principali effetti terapeutici di questo fungo sono l'attività antiossidante, la modulazione delle risposte immunitarie e la riduzione dell'infiammazione sia a livello periferico che nel sistema nervoso centrale, è in grado di agire anche sulla neuroinfiammazione riducendo la neurodegenerazione [141, 142]. Inoltre è stato osservato che l'HER può influenzare il ciclo cellulare, promuovere l'apoptosi delle cellule anomale e contrastare lo stress ossidativo [143].

Gli effetti antinfiammatori dell'HER sono attribuiti ai suoi composti bioattivi che interagiscono e modulano le principali vie infiammatorie, regolando la produzione di citochine, lo stress ossidativo e l'equilibrio del microbiota intestinale [144, 145]. In particolare i polisaccaridi sono in grado di sopprimere la segnalazione di NF- $\kappa$ B nei macrofagi, riducendo il rilascio di mediatori infiammatori [146]. Questa inibizione della segnalazione NF- $\kappa$ B è particolarmente rilevante nel contesto della neuroinfiammazione: infatti sopprimendo la neuroinfiammazione, l'HER può contribuire a rallentare il declino cognitivo e a proteggere l'integrità neuronale nei disturbi neurodegenerativi [147]. Inoltre, i polisaccaridi contenuti nell'HER riducono i livelli di citochine pro-infiammatorie (IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) e aumentano quelli delle citochine anti-infiammatorie (IL-10) [148]. Le erinacine hanno mostrato un potenziale nella neuroinfiammazione, sopprimendo l'attivazione delle cellule gliali e riducendo l'espressione di IL-1 $\beta$  [149]. L'HER è anche in grado di inibire la COX-2 (cicloossigenasi-2) e l'iNOS (ossido nitrico sintasi inducibile) [140]. Inoltre si è visto che i composti bioattivi contenuti nell'HER sono in grado di modulare anche la via di segnalazione p38 MAPK, la quale sappiamo essere coinvolta nella neuroinfiammazione e nella sopravvivenza neuronale [127].

Le proprietà antiossidanti dell'HER sono dovute sia alla sua capacità di attivare la via Nrf2, aumentando sia l'espressione di enzimi antiossidanti come la superossido dismutasi (SOD), la catalasi (CAT) e la glutatione perossidasi (GPx) [150] [151], che l'eliminazione dei ROS e la riduzione della perossidazione lipidica [152, 153].

Oltre alle proprietà neuroprotettive, antiossidanti, antinfiammatorie e antimicrobiche, l'HER presenta altre attività, che possono essere sfruttate nella pratica terapeutica, come la capacità di legare il calcio [154]. Studi recenti suggeriscono che specifici polisaccaridi e proteine presenti possono interagire con gli ioni calcio, influenzando le vie di segnalazione calcio-dipendenti [155]: queste sono fondamentali per la sopravvivenza dei neuroni e la funzione sinaptica e la loro interruzione è stata associata al declino cognitivo e alla neurodegenerazione. È stato dimostrato che alcuni polisaccaridi fungini modulano l'afflusso e l'efflusso di calcio, riducendo potenzialmente l'eccitotossicità, una condizione caratterizzata dall'ingresso eccessivo di calcio che porta a danni neuronali e apoptosi [156, 157]. La capacità di legare gli ioni calcio si riflette anche nel mantenimento della produzione di ATP e nella regolazione dell'apoptosi: si è visto che alcuni composti contenuti in questo estratto sono in grado di garantire un buono stato mitocondriale e di conseguenza un buon metabolismo energetico [158, 159]. L'HER mostra anche un'attività chelante degli ioni metallici, quest'azione può contribuire alla neuroprotezione: gli ioni metallici come il ferro ( $\text{Fe}^{2+}$ ), il rame ( $\text{Cu}^{2+}$ ) e lo zinco ( $\text{Zn}^{2+}$ ) svolgono un ruolo essenziale nella normale funzione cerebrale, ma possono diventare neurotossici quando sono disregolati [160, 161]. Infine recenti ricerche suggeriscono anche la sua possibile utilità nel migliorare le alterazioni neuroendocrine post-menopausali [162].

#### 4. SCOPO DELLA TESI

L'endometriosi è una malattia ginecologica gravemente invalidante, nonostante i numerosi studi condotti negli ultimi anni, le cause esatte della sua insorgenza rimangono ancora poco chiare. Ad oggi sicuramente sono stati fatti dei passi in avanti in merito ai meccanismi molecolari che la contraddistinguono. È ormai noto che tra i tratti distintivi dell'endometriosi vi è un'intensa infiammazione cronica, evidenziata da livelli significativamente elevati di citochine pro-infiammatorie. A questo si aggiunge uno stato di stress ossidativo, con una produzione eccessiva di marker ossidativi e un sistema antiossidante endogeno che non funziona correttamente. L'altro aspetto rilevante di questa malattia è la neuroinfiammazione: l'attivazione degli astrociti a livello cerebrale e spinale può contribuire all'insorgenza del dolore cronico, uno dei sintomi più debilitanti della malattia. I trattamenti attualmente disponibili e utilizzati sono unicamente mirati a tenere sotto controllo i sintomi che la caratterizzano, non sono però in grado di agire sulle cause alla base della patologia.

Per questo motivo l'obiettivo del nostro lavoro è stato quello di valutare come l'utilizzo dell'*Hericium erinaceus*, il quale è caratterizzato da diversi componenti bioattivi, può modulare i principali meccanismi molecolari che sono alla base di questa malattia: in particolare il dolore e la neuroinfiammazione, correlati a loro volta ad infiammazione e stress ossidativo.

## **5. MATERIALI E METODI**

### **5.1 Animali**

Per questo studio sono stati utilizzati ratti femmina Sprague-Dawley (Envigo, Milano-Italia), e sono stati posti in un ambiente controllato con cibo e acqua ad libitum. Lo studio è stato approvato dalla Commissione di revisione dell'Università di Messina per la cura degli animali (OPBA). Tutti gli studi effettuati sugli animali sono conformi alle normative italiane, ai regolamenti dell'Unione Europea e alle linee guida ARRIVE.

### **5.2 Protocollo sperimentale**

Gli animali sono stati divisi in modo casuale in due gruppi, uno di donatori e l'altro di riceventi, e l'endometriosi è stata indotta secondo il metodo precedentemente descritto [163, 164]. Per garantire livelli uniformi di estrogeni nei ratti, agli animali donatori è stata somministrata una dose di 10 UI di gonadotropina da siero di cavalla gravida. Al termine delle 41 ore, i ratti sono stati sacrificati per asfissia e i loro uteri sono stati prelevati. Il tessuto è stato finemente sminuzzato con le forbici e posto in una provetta da centrifuga della capacità di 1,5 mL contenente PBS. Il tessuto di tutti i ratti donatori è stato unito e una quantità equivalente a un utero per 500  $\mu$ L di PBS, è stata somministrata tramite iniezione intraperitoneale lungo la linea medioventrale dei ratti riceventi. Il tempo di sviluppo dell'endometriosi è stato di sette giorni. È stata osservata una percentuale di successo del 70% per lo sviluppo delle lesioni [165].

### **5.3 Gruppi sperimentali**

Gli animali sono stati divisi in tre gruppi sperimentali:

1. Gruppo Endo: i ratti sono stati sottoposti all'induzione dell'endometriosi sperimentale, il settimo giorno e per i sette giorni successivi è stato somministrato per via orale il veicolo (soluzione fisiologica);
2. Gruppo Endo + HER: i ratti sono stati sottoposti all'induzione dell'endometriosi sperimentale, il settimo giorno e per i sette giorni successivi è stato somministrato per via orale l'HER alla dose di 200 mg/Kg;
3. Gruppo di controllo: i ratti sono stati sottoposti a un'iniezione intraperitoneale di 500 µl di PBS al posto del tessuto endometriale, il settimo giorno e per i sette giorni successivi hanno ricevuto per via orale il veicolo (soluzione fisiologica).

La dose di HER è stata scelta sulla base di studi precedenti [166, 167]. Per valutare l'impatto della somministrazione di HER sulle lesioni endometriose, gli animali sono stati sacrificati 14 giorni dopo l'induzione. Successivamente, è stata eseguita una laparotomia per recuperare gli impianti endometriosi, utilizzati per effettuare le analisi istologiche e molecolari. Sono stati anche prelevati il cervello ed il midollo spinale per effettuare le analisi istologiche e molecolari.

#### **5.4 Analisi istologiche**

Per poter effettuare le analisi istologiche le lesioni endometriose sono state fissate con formaldeide e PBS al 10% a temperatura ambiente, successivamente sono state incluse in paraffina [168]. Dopo di che sono state ricavate le sezioni su cui effettuare le analisi. Sono state effettuate due tipi diversi di colorazioni:

- Ematossilina-Eosina, per valutare il grado delle lesioni;
- Masson Tricromica, per valutare il grado della fibrosi;

L'Ematossilina è un colorante basico, che colora le componenti acide che si trovano a livello del nucleo di blu-violetto; l'Eosina è un colorante acido, che colora le componenti con carica positiva di rosso-arancio. La colorazione Ematossilina-Eosina prevede la disidratazione attraverso la scala degli alcoli (xilolo, etanolo 100%, etanolo 95%, etanolo 70%, etanolo 50%) fino ad acqua distillata, la colorazione con ematossilina e successivamente con eosina, dopo di che si montano i vetrini e si

procede alla valutazione con il microscopio (Leica Microsystems SpA, Milano, Italia). Il volume delle lesioni si calcola seguendo la formula secondo cui  $V = (\text{lunghezza} \times \text{larghezza}^2) \times 0.5$ . L'analisi istologica è stata eseguita con una procedura in doppio cieco. I punteggi istopatologici sono stati assegnati secondo la formula P (persistenza di cellule epiteliali negli espianti)  $\times$  I (intensità delle ghiandole), come descritto [169]. Il volume della lesione è stato calcolato secondo la formula  $V = (\text{lunghezza} \times \text{larghezza}^2) \times 0,5$ .

La colorazione Masson Tricromica è stata effettuata seguendo il protocollo ed è stata utilizzata per valutare la presenza di tessuto fibrotico (Bio-Optica, Milano, Italia) [27]. Anche in questo caso la colorazione prevede la disidratazione attraverso la scalata degli alcoli, la colorazione secondo il protocollo e successivamente il montaggio vetrini e l'analisi al microscopio (Leica Microsystems SpA, Milano, Italia).

## **5.5 Analisi immunoistochimica**

L'analisi immunoistochimica è stata utilizzata per valutare la neuroinfiammazione sfruttando la localizzazione degli anticorpi anti-GFAP (Proteintech, numero di catalogo 16825-1-AP, diluizione 1:5000) e anti-IBA1 (Proteintech, 10904-1-AP, diluizione 1:1000) nel midollo spinale, nella corteccia cerebrale e nell'ippocampo come già descritto [167, 170] [171]; e per valutare la proliferazione cellulare con l'anticorpo Ki67. Le lesioni endometrioidiche, il cervello e il midollo spinale sono stati fissati con formaldeide e PBS al 10% a temperatura ambiente, successivamente sono state incluse in paraffina per poter ricavare le sezioni su cui effettuare l'analisi. Tutte le sezioni sono state incubate con l'anticorpo primario overnight, quindi lavate con PBS e incubate per 1 ora con l'anticorpo secondario specifico; a questo punto è stato utilizzato il complesso Avidina-Biotina, che induce un'amplificazione del segnale legandosi all'anticorpo secondario, per aggiunta del cromogeno DAB si ha la formazione di un precipitato di colore marrone in corrispondenza del complesso antigene-anticorpo. Successivamente le sezioni sono state osservate al microscopio (Leica Microsystems SpA, Milano, Italia) [172]. L'area proporzionale

dell'immunoreattività è stata quantificata come numero di pixel positivi espressi in percentuale dell'area totale del tessuto (indicata dalla colorazione rossa).

## 5.6 Analisi Western Blot

Le analisi di western blot sono state effettuate sulle proteine precedentemente estratte dai tessuti. Il protocollo di estrazione prevede l'utilizzo di due diverse soluzioni Buffer A e Buffer B: il buffer A è utilizzato per l'estrazione delle proteine citosoliche, mentre il buffer B è utilizzato per l'estrazione delle proteine nucleari.

Il buffer A è costituito da: Acqua distillata 4,8931 mL; Saccarosio 1 M, 3,200 mL; Tris HCl pH 7,4 10 mM, 0,100 mL; EGTA 100 Mm, 0,100 mL; EDTA 100 nM, 0,200 mL; NaN<sub>3</sub> 100 mM, 0,500 mL; B-mercaptanolo 14,3 M, 6,9 µL; NAF 0,5 M, 1 mL; Leupeptina 5 mg/mL, 20 µL; Pepstatina A 15 µM, 0,1 mL; Sodio ortovanadato 100 mM, 0,1 mL; Felinmetilsulfonil fluoride 10 mM, 20 µL.

Il buffer B è costituito da: Acqua distillata 9,399 mL; Triton-X 100 1%, 0,100 mL; NaCl 5 M, 0,300 mL; Tris HCl pH 7,4 10 mM, 100 µL; EGTA 100 mM, 0,100 mL; EDTA 100 Mm, 0,100 mL; Sodio ortovanadato 100 mM, 20 µL; Leupeptina 5 mg/mL, 20 µL; PMSF 100 nM, 20 µL.

I tessuti vengono sospesi con il buffer A e omogenati, si effettua una centrifugazione a 12000 rpm per 10 minuti a 4°C, a questo punto si separa il surnatante, in cui sono contenute le proteine citosoliche, dal pellet, in cui sono contenute le proteine nucleari. Il pellet viene risospeso con il buffer B e centrifugato a 12000 rpm per 10 minuti a 4°C, a questo punto le proteine nucleari si trovano nel surnatante. Per effettuare l'analisi western blot sono stati utilizzati anticorpi primari i quali sono stati preparati in soluzione con PMT (PBS 1%, tween-20, latte disidratato 5% w/v) [173]. Gli anticorpi primari specifici anti-PCNA (sc-56, Heidelberg, Germania), anti-p-ERK (sc-7383, Heidelberg, Germania), anti-p38 (sc-166182, Heidelberg, Germania), anti-Nox-1 (PA5-103220) e anti-Nox-4 (PA5-72816) sono stati incubati a 4 °C per una notte. Il giorno dopo sono stati incubati con un anticorpo secondario anti-IgG di capra coniugato con perossidasi (Jackson Immuno Research) o con un anticorpo secondario anti-IgG di topo bovino coniugato con perossidasi per 1 ora a temperatura ambiente

[174]. Per confermare l'uguale quantità di proteine, le membrane sono state incubate anche con l'anticorpo contro la  $\beta$ -actina (sc-47778). I segnali sono stati rilevati con un sistema di rivelazione a chemiluminescenza potenziata (Super-Signal West Pico Chemiluminescent Substrate) [175]. L'espressione relativa delle bande proteiche è stata quantificata mediante densitometria con il software Bio-Rad ChemiDoc XRS, #1708265 [176]. Le immagini dei segnali delle membrane sono state importate nel software di analisi (Image Quant TL, Amersham Biosciences, Freiburg, Germany, v2003) [177].

### **5.7 Analisi biochimiche di stress ossidativo**

Il test TBARS è stato utilizzato per valutare la perossidazione lipidica misurando i livelli di MDA a 535 nm [178]. L'attività della SOD è stata valutata utilizzando del nitroblu del tetrazolo, questo viene usato come indicatore perché la SOD inibisce la sua riduzione, come già descritto [179] ed è espressa come U/g di proteina [166]. I livelli di GSH sono stati determinati seguendo il protocollo della reazione di Ellman e utilizzando un lettore di micropiastre che assorbe a 412 nm, i livelli sono stati espressi come ng/mg di tessuto [180]. L'attività della catalasi è stata misurata sulla frazione citosolica, del cervello monitorando la diminuzione dell'assorbanza a 240 nm dovuta alla decomposizione del perossido di idrogeno da parte del frazionamento citosolico del cervello nel tempo [181].

### **5.8 Saggio di assorbimento immunoenzimatico ELISA**

I livelli di IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6 e TNF- $\alpha$  sono stati misurati nel liquido peritoneale, sono stati determinati utilizzando un kit ELISA (BioLegend, San Diego, California; R&D Systems, Milano, Italia) [182].

### **5.9 Estrazione dell'RNA e sintesi del cDNA**

È stato utilizzato un kit RNeasy (Qiagen, Milano, Italia) per estrarre l'RNA da analizzare con la reazione a catena della polimerasi in tempo reale (RT-PCR). La quantificazione è stata eseguita sull'RNA con uno spettrofotometro (NanoDrop Lite). Per sintetizzare il cDNA è stato utilizzato il kit iScript RT-PCR (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) [183].

## 5.10 Real-time PCR

In totale, 1 µL di cDNA totale è stato utilizzato per eseguire l'analisi RT-PCR con il metodo SYBR Green (Applied Biosystems) [184, 185]. Sequenze dei primer: Bax F:5'-GGTTGCCCTCTTCTACTTT-3' R:5'-AGCCACCCTGGTCG-3'; Bcl-2 F:5'-ACTTTGCAGAGATGTCCAGT-3' R:5'-CGGT- TCAGTACTCAGCAT-3'; Caspasi-8 F:5'-GCACAGGTTACAGCTCTCC R: 5'-ATCAAG-CAGGCTCGAGTTGT-3'; Caspasi-9 F:5'-CTCAGGCCAGGTTTAC-3' R:5'-CAGGA- ACCGCTCTTTGTC-3'; Caspasi-3 F:5'-GGCCTGAAATACGAAGTCA-3' R:5'-GGCAGT- AGTCGCCTCTGAAG-3'; GAPDH (F:5'-CCATCAACGACCCCTTCATT-3' R:5'-CACGACATACT- CAGCACCAGC-3') è stato impiegato come controllo interno [186]. Oltre ai replicati biologici, sono state effettuate tre replicati tecnici per ciascun gene target. Per verificare la potenziale contaminazione del DNA genomico nei campioni, in tutte le analisi è stato utilizzato l'RNA come controllo negativo.

## 5.11 Analisi comportamentali

Le analisi comportamentali sono state eseguite 14 giorni dopo l'induzione dell'endometriosi, per valutare come le alterazioni molecolari hanno anche delle ripercussioni sul comportamento, alterandolo.

### 5.11.1 Test in campo aperto

L'attività locomotoria e il comportamento esplorativo sono stati rilevati utilizzando un'arena quadrata in campo aperto.

Il ratto è stato posto al centro di una gabbia esterna di 50 x 50 x 60 cm. Durante il test, i ratti sono stati lasciati liberi di vagare ed esplorare il campo aperto per cinque minuti. Dopo ogni test, è stato utilizzato etanolo al 70% per pulire adeguatamente l'arena prima di sciacquarla con acqua. Il numero di cicli di sollevamento, i cicli di grooming, la deambulazione, la locomozione totale, i pellet fecali e le attività centrali sono stati registrati per 10 minuti per ogni animale [187, 188].

#### *5.11.2 Test della Piastra calda*

Il test della piastra calda è stato utilizzato per valutare la soglia del dolore agli stimoli termici. Ai ratti è stato permesso di camminare su una piastra calda (a una temperatura di  $53,0 \pm 0,1$  per un massimo di 45 secondi [189].

#### *5.11.3 Test del labirinto multiplo sopraelevato*

Due bracci chiusi e due bracci aperti costituivano l'equipaggiamento dell'elevated plus maze, unito da un quadrato centrale [190]. Dopo essere stato inserito nel dispositivo, il ratto ha avuto a disposizione cinque minuti per muoversi. Dopo ogni analisi, l'apparecchiatura è stata pulita con una soluzione contenente etanolo al 20%. Le percentuali di tempo trascorso nei bracci aperti, gli ingressi totali e gli ingressi nei bracci aperti sono stati annotati e presentati rispettivamente come % di tempo nei bracci aperti e % di ingressi aperti.

#### *5.11.3 Contrazioni addominali indotte dall'acido acetico*

Agli animali è stato somministrato per via intraperitoneale acido acetico allo 0,6% e il numero di scricchioli indotti dall'acido è stato osservato per 20 minuti, a partire da 5 minuti dopo l'iniezione. Lo stiramento degli arti posteriori seguito da una contrazione dell'addome è stato definito come un writhe [191].

## 5.12 Preparazione della biomassa di *Hericium Erinaceus*

La biomassa di HER utilizzata in questo studio è stata ottenuta come prodotto commerciale dalla Mycology Research Laboratories Ltd (MRL, Luton, Regno Unito). La dose efficace di 200 mg/kg è stata scelta sulla base di studi clinici condotti su pazienti affetti da cancro e HPV, in cui è stata somministrata una dose giornaliera di 3 grammi [192]; questo dosaggio è stato confermato anche da studi preclinici sui ratti. Il materiale fungino è stato analizzato mediante cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa Orbitrap (LC-Orbitrap-MS) e alla gascromatografia-tandem (GC-MS/MS), seguendo i protocolli delineati in lavori precedenti. I dati completi di caratterizzazione sono riportati da D'Amico R. et al. [166].

## 5.13 Materiali

Tutti i materiali e i composti utilizzati per l'analisi, eccetto dove specificato, sono stati acquistati da Sigma-Aldrich Company Ltd. L'HER è stato acquistato come prodotto commerciale dalla Mycology Research Laboratories Ltd (MRL, Luton, Regno Unito).

## 5.14 Analisi statistica

Nell'analisi statistica dei dati sono stati utilizzati il test di Kolmogorov-Smirnov per verificare la distribuzione normale dei dati, ed il t-test per confrontare i due gruppi (Prism 8 per macOS versione 8.2.1 (279)). Nelle analisi con tre gruppi, i risultati sono stati analizzati mediante ANOVA a una via seguita da un test post hoc di Bonferroni per i confronti multipli. Un valore di  $p$  inferiore a 0,05 è stato considerato significativo. #  $p < 0,05$  vs. CTL, ##  $p < 0,01$  vs. CTL, ###  $p < 0,001$  vs. CTL, \* $p < 0,05$  vs. Endo, \*\* $p < 0,01$  vs. Endo, \*\*\* $p < 0,001$  vs. Endo.

## 6. RISULTATI

### 6.1 Effetto della somministrazione di HER sulla crescita delle lesioni endometriotiche

Dopo il sacrificio degli animali è stata eseguita un'indagine macroscopica. Rispetto ai campioni prelevati dai ratti a cui è stata somministrata l'HER (Figura 8B, C e Figura 8C), le lesioni del gruppo Endo (Figura 8A) presentavano un'area (Figura 8C) e un volume (Figura 8D) maggiori.

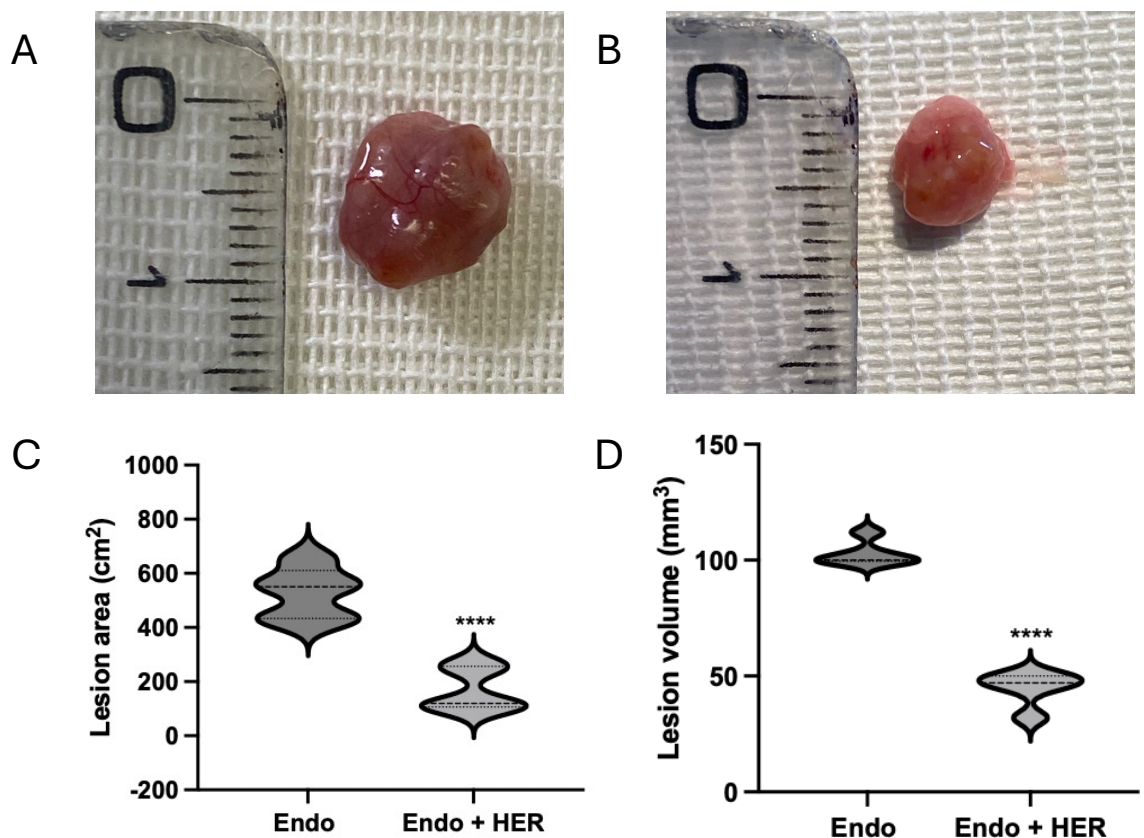


Figura 8 La somministrazione di HER ha ridotto la crescita delle lesioni endometriotiche. Analisi macroscopica: Endo (A), Endo + HER (B), area della lesione (C), volume della lesione (D). È stato applicato il test di Kolmogorov-Smirnov per verificare la distribuzione normale dei dati, quindi è stato applicato il t-test. Un valore di  $p$  inferiore a 0,05 è stato considerato significativo. \*\*  $p < 0,01$  vs. Endo; \*\*\*  $p < 0,001$  vs. Endo.

## **6.2 Effetto della somministrazione di AR sulla morfologia della lesione e sulla proliferazione cellulare**

Per valutare la morfologia e la proliferazione cellulare delle lesioni abbiamo effettuato l'analisi istologica con colorazione di ematossilina-eosina. Questa ha mostrato ghiandole epiteliali e stroma in una volta del gruppo Endo (Figura 9A), mentre la somministrazione di HER ha ridotto il punteggio istopatologico (Figura 9B, C). Successivamente abbiamo valutato la fibrosi del tessuto, utilizzando la colorazione tricromica di Masson. A differenza dei ratti Endo (Figura 9 D, F), il gruppo Endo + HER ha mostrato una deposizione di collagene molto minore (Figura 9 E, F). Per valutare la proliferazione cellulare sono state utilizzate l'analisi Western blot e l'immunoistochimica. A differenza del gruppo Endo (Figura 9 G, I), il trattamento con HER ha ridotto drasticamente il marker di proliferazione cellulare Ki-67 (Figura 9 H, I). Lo stesso andamento è stato seguito dal livello di PCNA, più alto nel gruppo Endo e ridotto dalla somministrazione di HER (Figura 9 J). L'analisi Western blot è stata utilizzata anche per valutare le MAPK. Abbiamo riscontrato una ridotta fosforilazione di ERK (Figura 9 K) e p38 (Figura 9 L) nei campioni del gruppo Endo + HER rispetto al gruppo Endo.

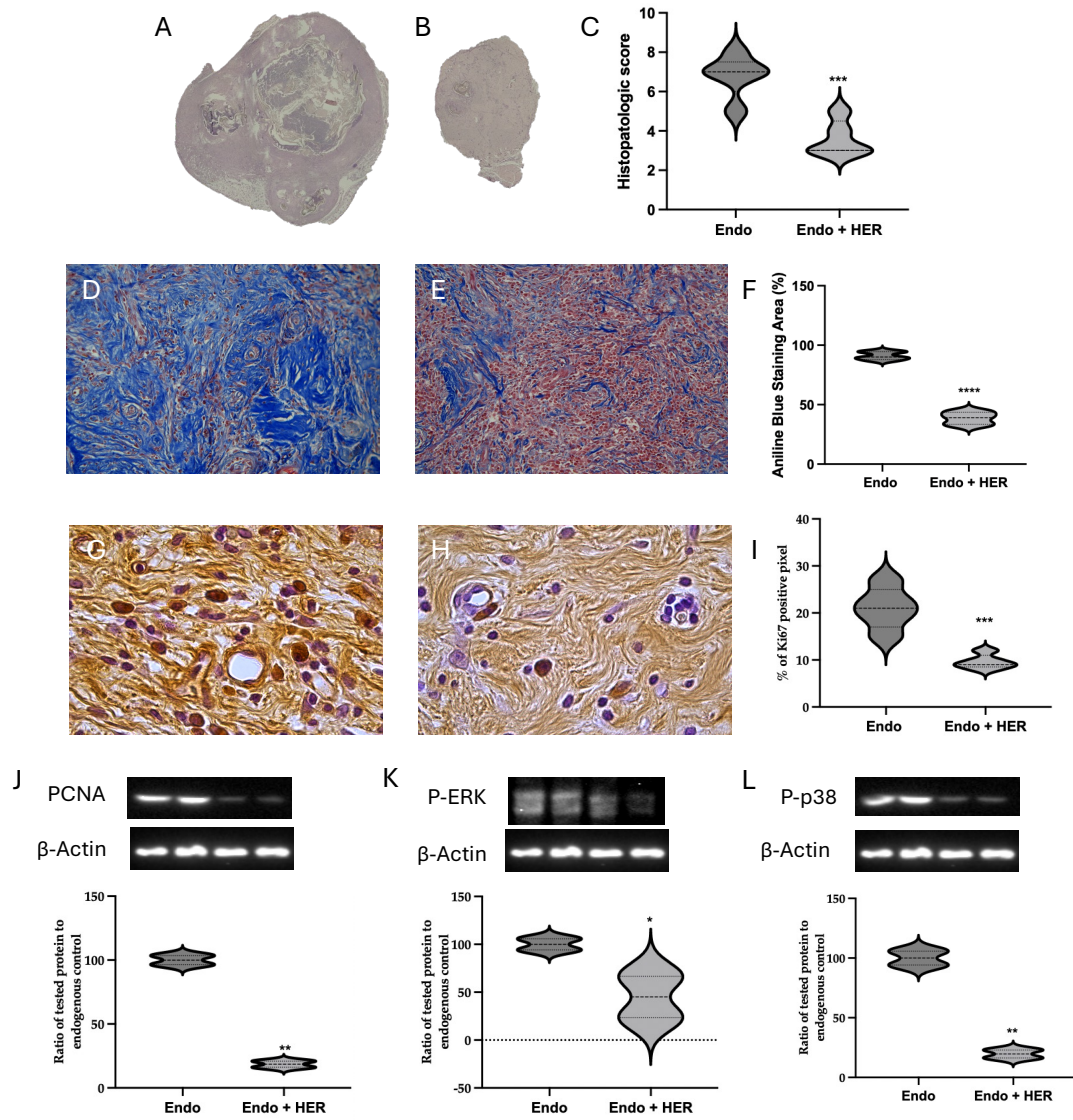


Figura 9 La somministrazione di HER sulla morfologia della lesione, sulla fibrosi e sull'iperproliferazione cellulare: Analisi istologica: Endo (A), Endo + HER (B), punteggio istopatologico (C); colorazione tricromica di Masson (ingrandimento 20x): Endo (D), Endo + HER (E), area colorata con blu di anilina (F); analisi immunohistochemica dell'espressione di Ki-67 (ingrandimento 40x): Endo (G), Endo + HER (H), quantificazione grafica dell'espressione di Ki-67 (I); analisi Western blot di PCNA (J), p-ERK (K), p-p38 (L). Il test di Kolmogorov-Smirnov è stato applicato per verificare la distribuzione normale dei dati, quindi è stato applicato il t-test. Un valore di p inferiore a 0,05 è stato considerato significativo. \* p < 0,05 vs. Endo; \*\* p < 0,01 vs. \*\*\* p < 0,001 vs. Endo.

### 6.3 Effetto della somministrazione di HER sull'apoptosi

Con l'utilizzo della RT-PCR abbiamo analizzato le variazioni dei principali geni coinvolti nell'apoptosi. Abbiamo riscontrato una riduzione dell'espressione del livello di mRNA di Bax nei campioni Endo + HER, rispetto a quelli Endo (Figura 10A), mentre Bcl-2 ha avuto un andamento opposto, (Figura 10 B); pertanto, la somministrazione di HER ha ridotto il rapporto Bax/Bcl-2 (Figura 10 C). Inoltre, abbiamo analizzato l'espressione dell'mRNA della caspasi. In particolare, il gruppo Endo + HER ha mostrato una riduzione della Caspasi-8 (Figura 10 D), Caspasi-9 (Figura 10 E) e Caspasi-3 (Figura 10 F), rispetto al gruppo Endo.

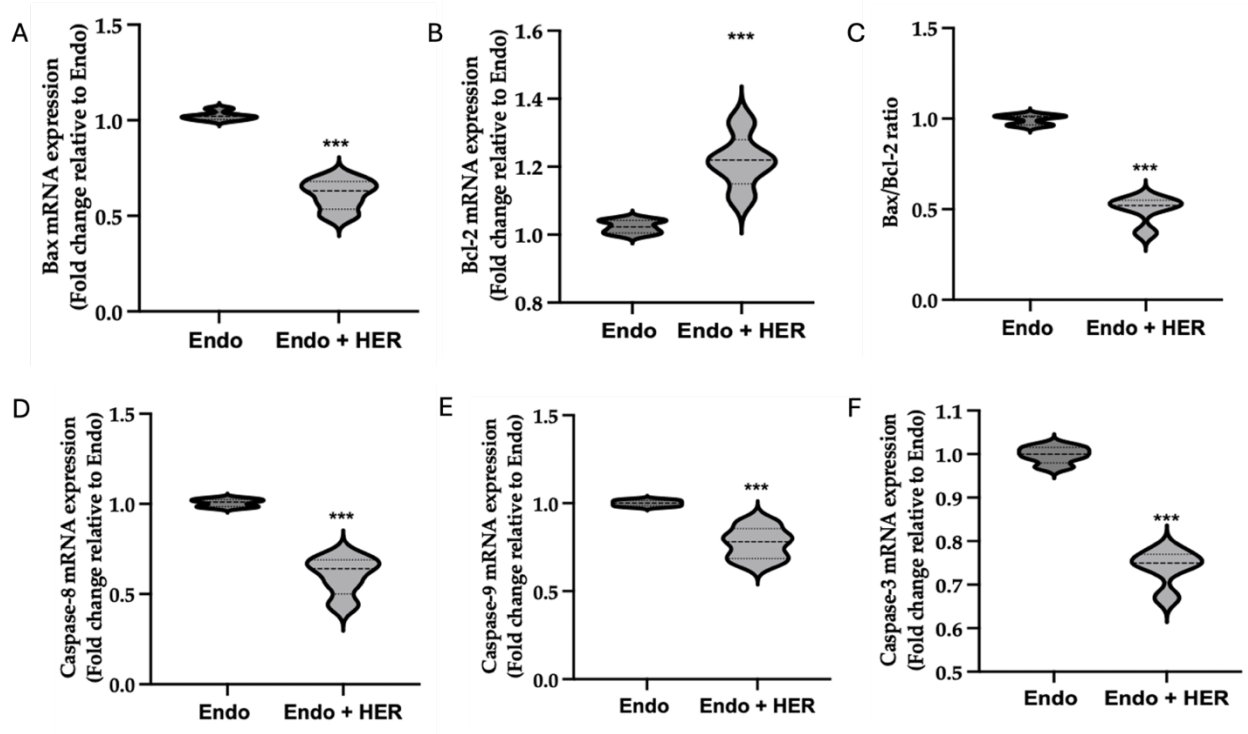


Figura 9 La somministrazione di HER ha ripristinato la via dell'apoptosi: Analisi RT-PCR: Livelli di mRNA di Bax (A), Bcl-2 (B), rapporto Bax/Bcl-2 (C), livelli di mRNA di Caspasi-8 (D), Caspasi-9 (E) e Caspasi-3 (F). È stato applicato il test di Kolmogorov-Smirnov per verificare la distribuzione normale dei dati, quindi è stato applicato il t-test. Un valore di p inferiore a 0,05 è stato considerato significativo. \*\*\*  $p < 0,001$  vs. Endo.

#### **6.4 Effetto della somministrazione di HER sullo stress ossidativo e sull'infiammazione**

Per valutare la modulazione dello stress ossidativo e dell'infiammazione abbiamo effettuato analisi western blot e successivamente saggi per valutare i livelli dei marker di stress ossidativo.

L'analisi Western blot ha mostrato una riduzione dell'espressione di Nox-1 (Figura 11 A) e Nox-4 (Figura 11 B) nel gruppo Endo + HER rispetto al gruppo Endo (Nox-1, Nox-4). Inoltre, la somministrazione di HER ha ripristinato l'attività della SOD (Figura 11 C) e i livelli di GSH (Figura 11 D), che erano stati compromessi nel gruppo Endo. I campioni Endo + HER hanno mostrato anche una riduzione dell'attività MPO (Figura 11 E) e della perossidazione lipidica (Figura 11 F), rispetto al gruppo Endo.

L'HER ha anche ridotto l'infiammazione nelle lesioni, come dimostrato dalla riduzione dei livelli di IL-1 $\beta$  (Figura 11 G), IL-2 (Figura 11 H), IL-6 (Figura 11 I) e TNF- $\alpha$  (Figura 11 J), rispetto al gruppo Endo.

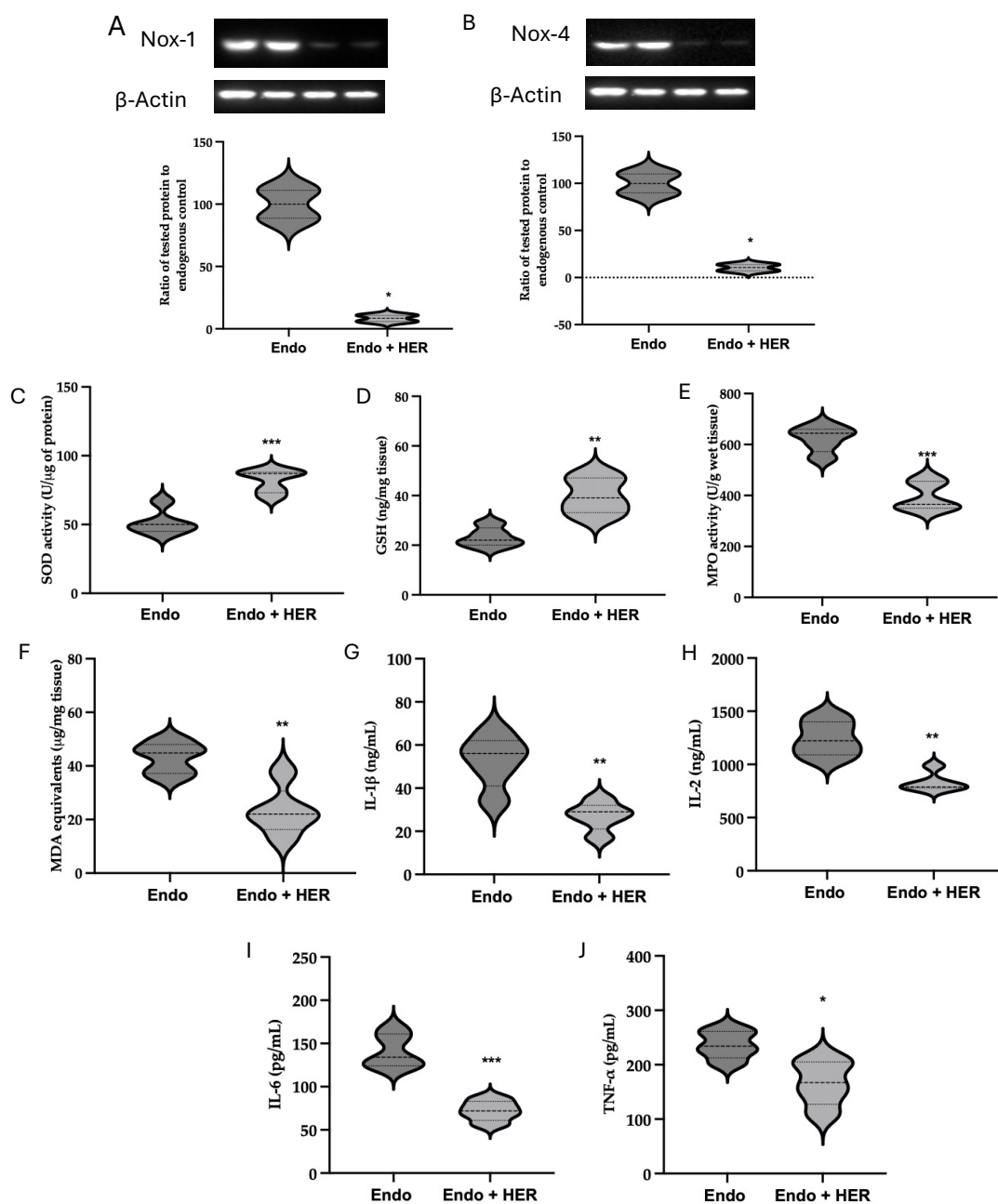


Figura 11 La somministrazione di HER ha ridotto l'ambiente ossidativo e pro-infiammatorio. Analisi in Western blot di Nox-1 (A) e Nox-4 (B); attività SOD (C); livelli di GSH (D); attività MPO (E); MDA (F), livelli di IL-1β (G), IL-2 (H), IL-6 (I) e TNF-α (J). È stato applicato il test di Kolmogorov-Smirnov per verificare la distribuzione normale dei dati, quindi è stato applicato il t-test. Un valore  $p$  inferiore a 0,05 è stato considerato significativo. \*  $p < 0,05$  vs. Endo; \*\*  $p < 0,01$  vs. Endo; \*\*\*  $p < 0,001$  vs. Endo

## **6.5 Effetto della somministrazione di HER sulla soglia di sensibilità al dolore**

Per quanto riguarda la modulazione del dolore abbiamo effettuato diversi test comportamentali: valutando l'attività locomotoria ma anche i disturbi come ansia e depressione.

La somministrazione di HER ha ripristinato il comportamento esplorativo e l'attività locomotoria rispetto ai ratti Endo (Figura 12 A, B e C). Inoltre, nel test del labirinto elevato, i ratti del gruppo Endo + HER hanno mostrato un numero ridotto di ingressi nei bracci chiusi e aperti (Figura 12 D), la percentuale di ingressi aperti (Figura 12 E) e la percentuale di tempo nei bracci aperti (Figura 12 F), rispetto al gruppo Endo. L'endometriosi ha aumentato la sensibilità alle contrazioni addominali indotte dall'acido acetico (Figura 12 G) e agli stimoli termici (Figura 12 H), che sono stati significativamente ridotti in seguito alla somministrazione di HER.

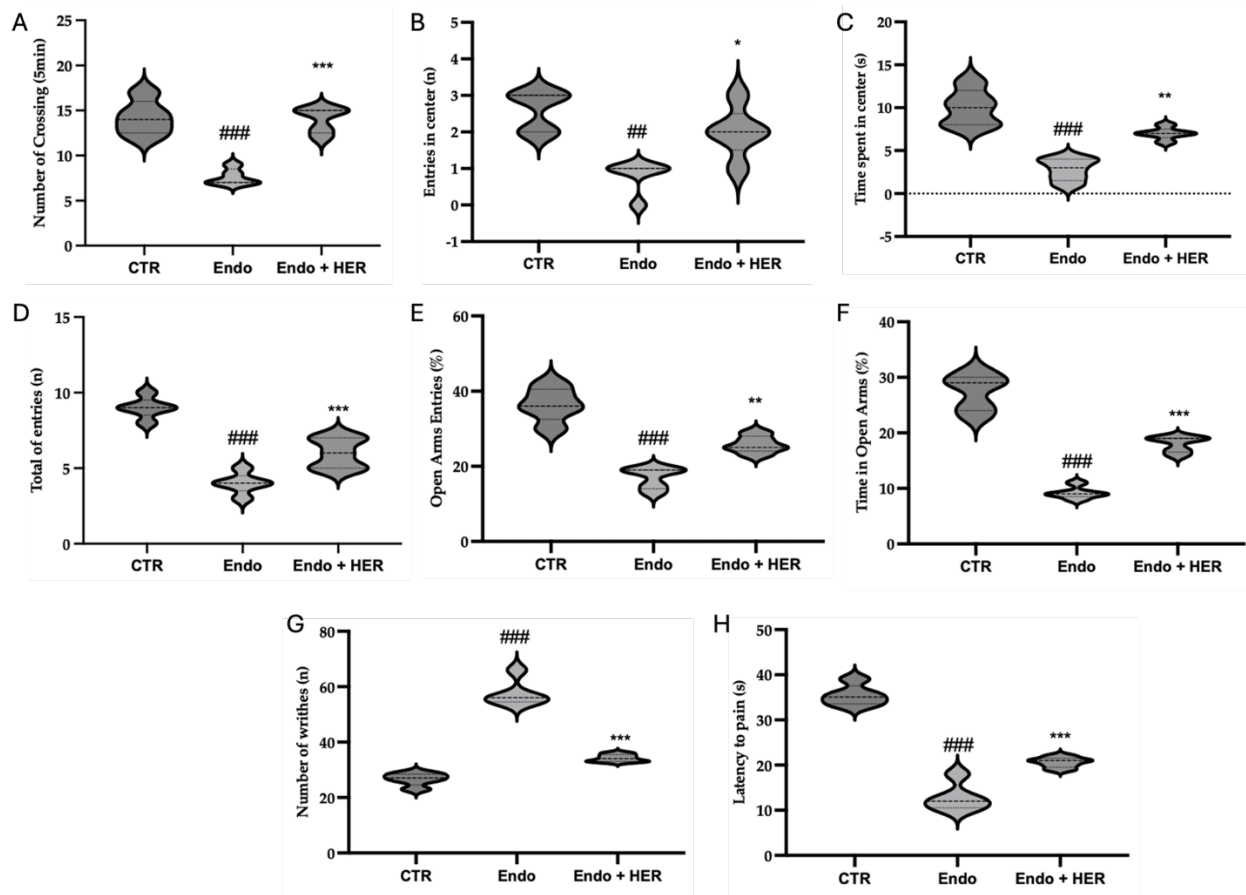


Figura 10 La somministrazione di HER ha ridotto il comportamento doloroso. Test in campo aperto: numero di attraversamenti (A), numero di ingressi nel quadrato centrale (B) e tempo trascorso nel quadrato centrale (C); test del labirinto aumentato: numero di ingressi nei bracci chiusi e aperti (D), % di ingressi aperti (E), % di tempo nei bracci aperti (F), contrazioni addominali indotte da acido acetico (G), test della piastra calda (H). I risultati sono stati analizzati mediante ANOVA a una via seguita da un test post hoc di Bonferroni per confronti multipli. Un valore di  $p$  inferiore a 0,05 è stato considerato significativo. ##  $p < 0,01$  vs CTL; ###  $p < 0,001$  vs CTL; \*  $p < 0,05$  vs Endo; \*\*  $p < 0,01$  vs Endo; \*\*\*  $p < 0,001$  vs Endo.

## **6.6 Effetto della somministrazione di HER sulla neuroinfiammazione**

Per finire abbiamo preso in considerazione la modulazione della neuroinfiammazione: valutando i livelli di GFAP nel midollo spinale, nella corteccia e nell'ippocampo.

L'analisi immunohistochimica è stata eseguita per valutare l'espressione di GFAP. È stato riscontrato un aumento dell'espressione di GFAP nel midollo spinale (Figura 13 B), nella corteccia (Figura 13 G) e nell'ippocampo (Figura 13 L) del gruppo Endo, rispetto al controllo (Figura 13 A, F, K). La somministrazione di HER ha ridotto l'immuno-reattività di GFAP in tutti i tessuti esaminati (Figura 13 C, H, M), rispetto al gruppo Endo.

La RT-PCR ha mostrato un aumento dei livelli di mRNA di c-FOS e NGF nel midollo spinale (Figura 13 D e Figura 13 E), nella corteccia (Figura 13 I e Figura 13 J) e nell'ippocampo (Figura 13 N e Figura 13 O) del gruppo Endo, rispetto al controllo. Il gruppo Endo + HER ha mostrato livelli ridotti di c-FOS e NGF mRNA in tutti i tessuti esaminati, rispetto al gruppo Endo.

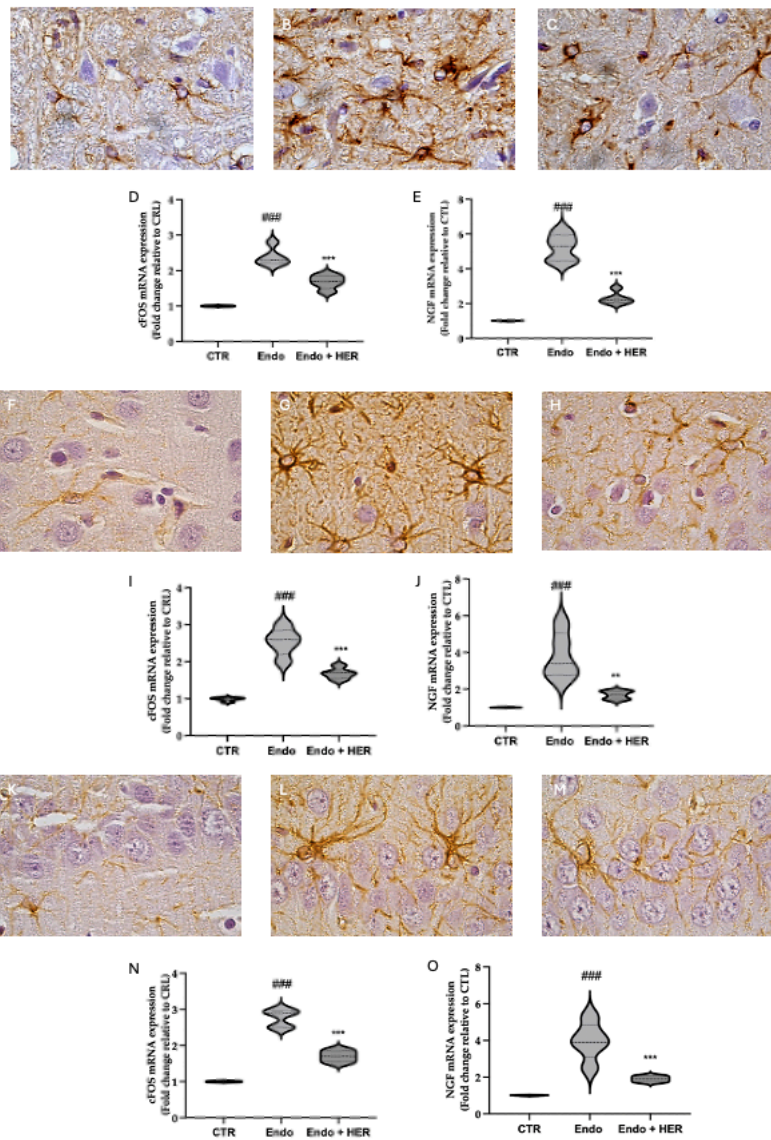


Figura 11 La somministrazione di HER ha ridotto l'infiammazione neurogena. Analisi immunohistochimica dell'espressione di GFAP nel midollo spinale (ingrandimento 100x): Controllo (A), (B), Endo + HER (C); analisi RT-PCR dei livelli di mRNA di c-FOS (D) e NFG (E) nel midollo spinale; analisi immunohistochimica dell'espressione di GFAP nella corteccia cerebrale (ingrandimento 100x): Controllo (F), Endo (G), Endo + HER (H); analisi RT-PCR dei livelli di mRNA di c-FOS (I) e NFG (J) nella corteccia cerebrale; analisi immunohistochimica dell'espressione di GFAP nell'ippocampo (ingrandimento 100x): Controllo (K), Endo (L), Endo + HER (M); analisi RT-PCR dei livelli di mRNA di c-FOS (N) e NFG (O) nell'ippocampo. I risultati sono stati analizzati mediante ANOVA a una via seguita da un test post hoc di Bonferroni per confronti multipli. Un valore di  $p$  inferiore a 0,05 è stato considerato significativo. \*\*  $p < 0,01$  vs. Endo, ###  $p < 0,001$  vs. CTL; \*\*\*  $p < 0,001$  vs. Endo.

## 7. DISCUSSIONE

L'endometriosi, malattia ginecologica invalidante, colpisce circa il 10% della popolazione femminile. È caratterizzata dalla crescita incontrollata di tessuto endometriale e da sintomi molto dolorosi che spesso si accompagnano a disturbi anche di tipo psicologico. La patogenesi di questa malattia è ancora oggi sconosciuta, ma negli ultimi anni la ricerca ha investigato e studiato quello che succede a livello molecolare. L'endometriosi, a livello molecolare, è caratterizzata da infiammazione cronica, stress ossidativo, ridotta apoptosi, neuroinfiammazione e dolore cronico [193].

Con questo lavoro abbiamo voluto valutare la modulazione dei diversi pathway molecolari, coinvolti nell'endometriosi, in seguito alla somministrazione dell'estratto di origine naturale di *Hericium erinaceus*, il quale è noto per avere proprietà neuroprotettive e antiossidanti. I risultati che abbiamo ottenuto dimostrano come la somministrazione giornaliera di questo estratto sia in grado di modulare stress ossidativo, infiammazione, neuroinfiammazione e proliferazione cellulare.

Per valutare gli effetti dell'estratto abbiamo iniziato dall'analisi macroscopica e successivamente dall'analisi istologica, infatti abbiamo una riduzione del volume e dell'architettura patologica delle ghiandole, del tessuto stromale e della fibrosi. Le lesioni degli animali trattati presentavano una minore densità di componenti ghiandolari e stromali con una diminuzione della fibrosi, come evidenziato dalla colorazione tri-cromica di Masson. Dal punto di vista molecolare, la riduzione delle lesioni endometriali è stata confermata dalla riduzione dell'espressione di due marker della proliferazione cellulare, coinvolti nel ciclo cellulare Ki-67 e PCNA [194, 195]. Nello specifico Ki-67 è coinvolto in tutte le fasi del ciclo cellulare ad eccezione della fase G1, mentre il PCNA è espresso solo nella fase di sintesi del DNA [196]: suggerendo così un effetto antiproliferativo dell'estratto. L'azione antiproliferativa sembra essere mediata dall'inibizione di cascate di segnalazione intracellulare chiave, in particolare della via della mitogeno-attivata proteina chinasi (MAPK), che è nota per essere disregolata nell'endometriosi e svolge un ruolo centrale nel controllo della progressione del ciclo cellulare. La modulazione della proliferazione cellulare è confermata dalla riduzione dell'espressione di ERK e p38: questa via molecolare

risulta alterata nell'endometriosi e svolge un ruolo chiave nella segnalazione proliferativa [197]. Inoltre, correlata all'eccessiva proliferazione cellulare, vi è una mancata apoptosi: infatti nell'endometriosi vi è un'alterazione dell'espressione delle proteine pro-apoptotiche e anti-apoptotiche. Agendo simultaneamente sulle vie della proliferazione e dell'apoptosi, HER può offrire un approccio multiplo per limitare la crescita del tessuto ectopico. In questo caso la somministrazione di HER ha ripristinato l'espressione di Bax e Bcl-2, portando ad una riduzione del rapporto Bcl-2/Bax, favorendo così la segnalazione pro-apoptotica [194, 198]. Inoltre, l'HER è in grado, non solo di bloccare la proliferazione cellulare, ma riattiva anche i meccanismi endogeni di risoluzione delle lesioni come conferma la riduzione dell'espressione di Caspase-3, Caspase-8 e Caspase-9, confermando ulteriormente la normalizzazione delle vie di morte cellulare programmata. Nell'endometriosi oltre all'alterazione della proliferazione cellulare vi è anche una forte condizione di stress ossidativo, dovuta alla riduzione degli enzimi antiossidanti, al non corretto funzionamento del sistema antiossidante endogeno e all'aumento dei prodotti del metabolismo ossidativo: in particolare dell'attività della SOD, e un aumento delle lipoproteine ossidate [198-200]. In questo contesto, l'HER ha modulato in modo significativo l'omeostasi redox attraverso la downregolazione di Nox-1 e Nox-4, enzimi coinvolti nella generazione di ROS, in particolare nella sintesi di O<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Contemporaneamente, l'HER ha ripristinato l'attività enzimatica della SOD e i livelli intracellulari di GSH, riducendo al contempo l'attività della MPO e la perossidazione lipidica, come indicato dalla diminuzione del contenuto di MDA [201, 202]. L'estratto HER è in grado anche di modulare l'ambiente infiammatorio, riducendo il rilascio dei mediatori chimici dell'infiammazione: i quali in condizioni patologiche sono rilasciati in elevati livelli. Gli animali trattati hanno mostrato una marcata riduzione dei livelli delle principali citochine pro-infiammatorie, tra cui IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6 e TNF- $\alpha$ . Questa riduzione contribuisce probabilmente ai miglioramenti osservati nella morfologia della lesione e nei sintomi sistemici. Gli studi degli ultimi anni hanno dimostrato come vi è una correlazione tra l'infiammazione, lo stress ossidativo e il dolore cronico: la lesione dei tessuti e l'infiammazione sensibilizzano i nocicettori periferici, determinando un abbassamento della soglia del dolore e un aumento della segnalazione afferente al sistema nervoso centrale [203]. Quando tali stimoli persistono, possono indurre

cambiamenti neuroplastici a lungo termine, un fenomeno definito sensibilizzazione centrale [204, 205]. Le regioni cerebrali come l'ippocampo, la corteccia frontoinsulare e le aree somatosensoriali sono coinvolte nella transizione dallo stato di dolore acuto a quello cronico [163, 206, 207]. Per questo motivo abbiamo anche valutato la percezione del dolore nei ratti affetti da endometriosi conducendo diversi test che valutano la sensibilità periferica e viscerale. Come già altri studi hanno dimostrato, nell'endometriosi vi è una maggiore sensibilizzazione sia centrale che periferica, che porta a una maggiore vulnerabilità al dolore. Le vie coinvolte nella sensibilizzazione al dolore vengono modulate in maniera positiva dall'estratto HER: infatti vi è una riduzione dell'iperalgia termica e meccanica, e vi è anche una riduzione della sensibilità al dolore. Coerentemente con le ricerche precedenti, i nostri risultati indicano che i ratti con endometriosi presentano una maggiore sensibilità viscerale. Gli animali sottoposti a endometriosi e trattati con HER hanno mostrato una diminuzione dell'iperalgia termica e meccanica e della sensibilità al dolore ed un miglioramento dell'esplorazione e dell'attività motoria in generale [208]. La maggiore sensibilizzazione a livello centrale è sicuramente correlata al danno tissutale e all'ambiente infiammatorio e ossidante che si crea: questo si traduce in una risposta centrale che spesso non è dovuta allo stimolo nocicettivo periferico ma alla diminuzione della soglia del dolore e all'aumento dell'input sensoriale al sistema nervoso centrale [203]. Proprio per questi motivi nel nostro studio abbiamo anche preso in considerazione il sistema nervoso centrale ed in particolare l'ippocampo e il midollo spinale. Sappiamo che l'ippocampo svolge un ruolo chiave nella modulazione del dolore neuropatico: sia a livello emotivo che cognitivo; la ricerca negli ultimi anni ha evidenziato delle alterazioni tra l'ippocampo e le afferenze della corteccia frontoinsulare e somatosensoriale [163]. È importante prendere in considerazione queste regioni cerebrali in quanto si è visto che queste sono coinvolte nella transizione del dolore da acuto a cronico, condizione evidente nell'endometriosi [207, 209]. Con le nostre analisi abbiamo anche preso in considerazione la modulazione della neuroinfiammazione: l'estratto è in grado di ridurre il rilascio di mediatori neuroinfiammatori; ma non solo, in quanto si è visto che è anche in grado di agire sul midollo spinale e sull'ippocampo impedendo l'attivazione di astrociti e microglia. Le analisi immunohistochimiche hanno mostrato una diminuzione dell'espressione di

GFAP nel midollo spinale, nella corteccia cerebrale e nell'ippocampo, indicando una minore attivazione astrocitaria. Inoltre, HER ha ridotto l'espressione di c-FOS e NGF nei tessuti nervosi centrali, suggerendo la sua capacità di contrastare i meccanismi di sensibilizzazione sia periferici che centrali alla base del dolore pelvico cronico [207]. Questi risultati evidenziano l'azione mirata di HER in un modello sperimentale di endometriosi. Agendo contemporaneamente sull'iperproliferazione, sullo stress ossidativo, sull'attivazione immunitaria e sulla sensibilizzazione centrale, l'HER emerge come un candidato promettente per la gestione integrata dell'endometriosi.

## 8. CONCLUSIONI

In conclusione, nonostante la difficoltà che caratterizza la diagnosi e la gestione terapeutica dell'endometriosi, il nostro studio ha evidenziato come l'impiego di un estratto di origine naturale possa rappresentare una strategia efficace per modulare i principali pathway molecolari coinvolti nello sviluppo e nella progressione della malattia. I risultati ottenuti in questo studio mostrano in maniera significativa una riduzione delle lesioni endometriali, accompagnata da una diminuzione della proliferazione cellulare e da un incremento dei processi apoptotici.

Un altro aspetto importante riguarda l'impatto positivo dell'estratto sull'ambiente infiammatorio e ossidante, che è uno dei principali fattori alla base della patogenesi dell'endometriosi. Abbiamo osservato una significativa riduzione dei livelli di ROS e dei mediatori chimici pro-infiammatori, e contemporaneamente si è riscontrato un aumento dell'attività e del rilascio di enzimi antiossidanti. Questo duplice effetto contribuisce a ristabilire l'equilibrio redox e a mitigare l'infiammazione cronica, condizioni associate alla progressione della malattia e all'acuirsi dei sintomi.

Inoltre, i nostri dati suggeriscono che i composti bioattivi presenti nell'estratto naturale HER non si limitano ad agire a livello delle lesioni endometriali, ma esercitano un'azione anche sul sistema nervoso centrale. In particolare, è stata riscontrata una riduzione della neuroinfiammazione, con un abbassamento dell'attivazione degli astrociti nel midollo spinale, nella corteccia e nell'ippocampo. Questo meccanismo sembra giocare un ruolo cruciale nella diminuzione della sensibilizzazione al dolore, uno dei sintomi più invalidanti per chi soffre di endometriosi.

Alla luce di questi risultati, possiamo concludere che il nostro studio dimostra come seguire una dieta ricca di composti di origine naturale possa essere un approccio complementare nella gestione dell'endometriosi. La presenza di numerosi composti bioattivi in alimenti di origine vegetale potrebbe infatti contribuire a mantenere sotto controllo l'avanzamento della malattia, riducendo l'infiammazione, lo stress ossidativo e il dolore cronico. Pertanto, l'integrazione di questi nutrienti nella dieta quotidiana potrebbe rappresentare una scelta priva di effetti collaterali, migliorando sensibilmente la qualità della vita delle pazienti affette da endometriosi.

## 9. BIBLIOGRAFIA

1. Interdonato, L., et al., *Modulation of the proliferative pathway, neuroinflammation and pain in endometriosis*. International Journal of Molecular Sciences, 2023. **24**(14): p. 11741.
2. Benagiano, G., I. Brosens, and D. Lippi, *The History of Endometriosis*. Gynecologic and Obstetric Investigation, 2014. **78**(1): p. 1-9.
3. Bulun, S.E., et al., *Endometriosis*. Endocrine reviews, 2019. **40**(4): p. 1048-1079.
4. Giudice, L.C., *Clinical practice: endometriosis*. The New England journal of medicine, 2010. **362**(25): p. 2389.
5. Lee, S.-Y., Y.-J. Koo, and D.-H. Lee, *Classification of endometriosis*. Yeungnam University journal of medicine, 2021. **38**(1): p. 10-18.
6. Smolarz, B., K. Szyłto, and H. Romanowicz, *Endometriosis: epidemiology, classification, pathogenesis, treatment and genetics (review of literature)*. International journal of molecular sciences, 2021. **22**(19): p. 10554.
7. Agarwal, S.K., et al., *Clinical diagnosis of endometriosis: a call to action*. American journal of obstetrics and gynecology, 2019. **220**(4): p. 354. e1-354. e12.
8. Interdonato, L., et al., *Endocrine Disruptor Compounds in Environment: Focus on Women's Reproductive Health and Endometriosis*. International Journal of Molecular Sciences, 2023. **24**(6): p. 5682.
9. Nisolle-Pochet, M., F. Casanas-Roux, and J. Donnez, *Histologic study of ovarian endometriosis after hormonal therapy*. Fertility and Sterility, 1988. **49**(3): p. 423-426.
10. Shafrir, A.L., et al., *Risk for and consequences of endometriosis: a critical epidemiologic review*. Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology, 2018. **51**: p. 1-15.
11. Parazzini, F., et al., *Diet and endometriosis risk: a literature review*. Reproductive biomedicine online, 2013. **26**(4): p. 323-336.

12. Burney, R.O. and L.C. Giudice, *Reprint of: Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis*. Fertility and Sterility, 2019. **112**(4): p. e153-e161.
13. Vinatier, D., et al., *Theories of endometriosis*. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology, 2001. **96**(1): p. 21-34.
14. Vercellini, P., et al., *Asymmetry in distribution of diaphragmatic endometriotic lesions: evidence in favour of the menstrual reflux theory*. Human Reproduction, 2007. **22**(9): p. 2359-2367.
15. Maruyama, T. and Y. Yoshimura, *Stem cell theory for the pathogenesis of endometriosis*. Front Biosci, 2012. **4**(8): p. 2754-2763.
16. Klemmt, P.A. and A. Starzinski-Powitz, *Molecular and cellular pathogenesis of endometriosis*. Current women's health reviews, 2018. **14**(2): p. 106-116.
17. Pitot, M.A., C.A. Bookwalter, and K.M. Dudiak, *Müllerian duct anomalies coincident with endometriosis: a review*. Abdominal Radiology, 2020. **45**(6): p. 1723-1740.
18. Lamceva, J., R. Uljanovs, and I. Strumfa, *The main theories on the pathogenesis of endometriosis*. International journal of molecular sciences, 2023. **24**(5): p. 4254.
19. Sourial, S., N. Tempest, and D.K. Hapangama, *Theories on the pathogenesis of endometriosis*. International journal of reproductive medicine, 2014. **2014**(1): p. 179515.
20. Symons, L.K., et al., *The immunopathophysiology of endometriosis*. Trends in molecular medicine, 2018. **24**(9): p. 748-762.
21. Figueira, P.G.M., et al., *Stem cells in endometrium and their role in the pathogenesis of endometriosis*. Annals of the New York academy of sciences, 2011. **1221**(1): p. 10-17.
22. Critchley, H.O., et al., *Menstruation: science and society*. American journal of obstetrics and gynecology, 2020. **223**(5): p. 624-664.
23. TAKAHASHI, K., H. Nagata, and M. Kitao, *Clinical usefulness of determination of estradiol level in the menstrual blood for patients with endometriosis*. Nihon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi, 1989. **41**(11): p. 1849-1850.

24. Ahn, S.H., V. Singh, and C. Tayade, *Biomarkers in endometriosis: challenges and opportunities*. Fertility and sterility, 2017. **107**(3): p. 523-532.
25. Agic, A., et al., *Apoptosis in endometriosis*. Gynecologic and obstetric investigation, 2009. **68**(4): p. 217-223.
26. Taniguchi, F., et al., *Apoptosis and endometriosis*. Frontiers in bioscience (Elite edition), 2011. **3**(2): p. 648-662.
27. Genovese, T., et al., *Molecular and biochemical mechanism of cannabidiol in the management of the inflammatory and oxidative processes associated with endometriosis*. International journal of molecular sciences, 2022. **23**(10): p. 5427.
28. Burton, G.J. and E. Jauniaux, *Oxidative stress*. Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology, 2011. **25**(3): p. 287-299.
29. Muzii, L., et al., *Antimüllerian hormone is reduced in the presence of ovarian endometriomas: a systematic review and meta-analysis*. Fertility and sterility, 2018. **110**(5): p. 932-940. e1.
30. Senapati, S., et al., *Impact of endometriosis on in vitro fertilization outcomes: an evaluation of the Society for Assisted Reproductive Technologies Database*. Fertility and sterility, 2016. **106**(1): p. 164-171. e1.
31. Vessey, M., L. Villard-Mackintosh, and R. Painter, *Epidemiology of endometriosis in women attending family planning clinics*. British Medical Journal, 1993. **306**(6871): p. 182-184.
32. Eskenazi, B. and M.L. Warner, *Epidemiology of endometriosis*. Obstetrics and gynecology clinics of North America, 1997. **24**(2): p. 235-258.
33. Conroy, I., et al., *Pelvic pain: what are the symptoms and predictors for surgery, endometriosis and endometriosis severity*. Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology, 2021. **61**(5): p. 765-772.
34. Carneiro, M.M., et al., *Accuracy of clinical signs and symptoms in the diagnosis of endometriosis*. Journal of Endometriosis, 2010. **2**(2): p. 63-70.

35. Baldi, A., M. Campioni, and P.G. Signorile, *Endometriosis: pathogenesis, diagnosis, therapy and association with cancer*. *Oncology reports*, 2008. **19**(4): p. 843-846.
36. Gambadauro, P., V. Carli, and G. Hadlaczky, *Depressive symptoms among women with endometriosis: a systematic review and meta-analysis*. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 2019. **220**(3): p. 230-241.
37. Nnoaham, K.E., et al., *Impact of endometriosis on quality of life and work productivity: a multicenter study across ten countries*. *Fertility and sterility*, 2011. **96**(2): p. 366-373. e8.
38. Ferrero, S., G. Evangelisti, and F. Barra, *Current and emerging treatment options for endometriosis*. *Expert opinion on pharmacotherapy*, 2018. **19**(10): p. 1109-1125.
39. Horne, A.W., et al., *Surgical removal of superficial peritoneal endometriosis for managing women with chronic pelvic pain: time for a rethink?* *Bjog*, 2019. **126**(12): p. 1414.
40. Bedaiwy, M.A., et al., *New developments in the medical treatment of endometriosis*. *Fertility and sterility*, 2017. **107**(3): p. 555-565.
41. Donnez, J. and M.-M. Dolmans, *Endometriosis and medical therapy: from progestogens to progesterone resistance to GnRH antagonists: a review*. *Journal of Clinical Medicine*, 2021. **10**(5): p. 1085.
42. Olive, D.L. *Medical therapy of endometriosis*. in *Seminars in reproductive medicine*. 2003. Copyright© 2003 by Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New ....
43. Vural, M., *Pelvic pain rehabilitation*. *Turkish Journal of Physical Medicine and Rehabilitation*, 2018. **64**(4): p. 291.
44. Ahmed, A.U., *An overview of inflammation: mechanism and consequences*. *Frontiers in Biology*, 2011. **6**(4): p. 274-281.
45. Ingersoll, M.A., et al., *Monocyte trafficking in acute and chronic inflammation*. *Trends in immunology*, 2011. **32**(10): p. 470-477.

46. Ward, P.A., *Acute and chronic inflammation*. Fundamentals of inflammation, 2010. **3**: p. 1-16.
47. Aderem, A., *Phagocytosis and the inflammatory response*. The Journal of infectious diseases, 2003. **187**(Supplement\_2): p. S340-5.
48. *THE INFLAMMATORY RESPONSE – AN OVERVIEW*, in *Fundamentals of Inflammation*, C.N. Serhan, P.A. Ward, and D.W. Gilroy, Editors. 2010, Cambridge University Press: Cambridge.
49. Sherwood, E.R. and T. Toliver-Kinsky, *Mechanisms of the inflammatory response*. Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology, 2004. **18**(3): p. 385-405.
50. Kumar, A., et al., *Nuclear factor- $\kappa$ B: its role in health and disease*. Journal of molecular medicine, 2004. **82**: p. 434-448.
51. Samimi, M., et al., *The role of inflammation, oxidative stress, angiogenesis, and apoptosis in the pathophysiology of endometriosis: Basic science and new insights based on gene expression*. Journal of cellular physiology, 2019. **234**(11): p. 19384-19392.
52. Jiang, L., et al., *Inflammation and endometriosis*. Front Biosci (Landmark Ed), 2016. **21**(5): p. 941-8.
53. Agic, A., et al., *Is endometriosis associated with systemic subclinical inflammation?* Gynecologic and obstetric investigation, 2006. **62**(3): p. 139-147.
54. Pahwa, R., A. Goyal, and I. Jialal, *Chronic inflammation*. 2018.
55. Murakami, M. and T. Hirano, *The molecular mechanisms of chronic inflammation development*. 2012, Frontiers Media SA. p. 323.
56. Lawrence, T. and D.W. Gilroy, *Chronic inflammation: a failure of resolution?* International journal of experimental pathology, 2007. **88**(2): p. 85-94.
57. Taylor, H.S., A.M. Kotlyar, and V.A. Flores, *Endometriosis is a chronic systemic disease: clinical challenges and novel innovations*. The Lancet, 2021. **397**(10276): p. 839-852.

58. Furman, D., et al., *Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span*. *Nature medicine*, 2019. **25**(12): p. 1822-1832.
59. Halliwell, B.B. and H.E. Poulsen, *Oxidative stress*, in *Cigarette smoke and oxidative stress*. 2006, Springer. p. 1-4.
60. Preiser, J.C., *Oxidative stress*. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 2012. **36**(2): p. 147-154.
61. Ighodaro, O. and O. Akinloye, *First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid*. *Alexandria journal of medicine*, 2018. **54**(4): p. 287-293.
62. Apel, K. and H. Hirt, *Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction*. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 2004. **55**(1): p. 373-399.
63. Lu, M.C., et al., *The Keap1–Nrf2–ARE pathway as a potential preventive and therapeutic target: an update*. *Medicinal research reviews*, 2016. **36**(5): p. 924-963.
64. Ngo, V. and M.L. Duennwald, *Nrf2 and Oxidative Stress: A General Overview of Mechanisms and Implications in Human Disease*. *Antioxidants*, 2022. **11**(12): p. 2345.
65. Hybertson, B.M., et al., *Oxidative stress in health and disease: The therapeutic potential of Nrf2 activation*. *Molecular Aspects of Medicine*, 2011. **32**(4): p. 234-246.
66. Jackson, L., et al., *Oxidative stress and endometriosis*. *Human reproduction*, 2005. **20**(7): p. 2014-2020.
67. Mulgund, A., S. Doshi, and A. Agarwal, *Chapter 25 - The Role of Oxidative Stress in Endometriosis*, in *Handbook of Fertility*, R.R. Watson, Editor. 2015, Academic Press: San Diego. p. 273-281.
68. ARENDS, M.J. and A.H. WYLLIE, *Apoptosis: mechanisms and roles in pathology*. *International review of experimental pathology*, 1991. **32**: p. 223-254.
69. Lawen, A., *Apoptosis—an introduction*. *Bioessays*, 2003. **25**(9): p. 888-896.

70. Hongmei, Z., *Extrinsic and intrinsic apoptosis signal pathway review*, in *Apoptosis and medicine*. 2012, InTechOpen.
71. Wajant, H., *The Fas signaling pathway: more than a paradigm*. *Science*, 2002. **296**(5573): p. 1635-1636.
72. Kelliher, M.A., et al., *The death domain kinase RIP mediates the TNF-induced NF- $\kappa$ B signal*. *Immunity*, 1998. **8**(3): p. 297-303.
73. Saelens, X., et al., *Toxic proteins released from mitochondria in cell death*. *Oncogene*, 2004. **23**(16): p. 2861-2874.
74. Ekert, P.G. and D.L. Vaux, *The mitochondrial death squad: hardened killers or innocent bystanders?* *Current opinion in cell biology*, 2005. **17**(6): p. 626-630.
75. Li, L.Y., X. Luo, and X. Wang, *Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria*. *Nature*, 2001. **412**(6842): p. 95-99.
76. Cory, S. and J.M. Adams, *The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch*. *Nature Reviews Cancer*, 2002. **2**(9): p. 647-656.
77. Elmore, S., *Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death*. *Toxicologic Pathology*, 2007. **35**(4): p. 495-516.
78. Zhao, H., *Extrinsic and Intrinsic Apoptosis Signal Pathway Review*, in *Apoptosis and Medicine*, M.N. Tobias, Editor. 2012, IntechOpen: Rijeka. p. Ch. 1.
79. Garcia-Velasco, J.A. and A. Arici. *Apoptosis and the pathogenesis of endometriosis*. in *Seminars in reproductive medicine*. 2003. Copyright© 2003 by Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New ....
80. Taniguchi, F., et al., *Apoptosis and endometriosis*. *FBE*, 2011. **3**(2): p. 648-662.
81. Henderson, N.C., F. Rieder, and T.A. Wynn, *Fibrosis: from mechanisms to medicines*. *Nature*, 2020. **587**(7835): p. 555-566.
82. Mack, M., *Inflammation and fibrosis*. *Matrix Biology*, 2018. **68**: p. 106-121.
83. Gieseck III, R.L., M.S. Wilson, and T.A. Wynn, *Type 2 immunity in tissue repair and fibrosis*. *Nature Reviews Immunology*, 2018. **18**(1): p. 62-76.
84. Viganò, P., et al., *Cellular components contributing to fibrosis in endometriosis: a literature review*. *Journal of minimally invasive gynecology*, 2020. **27**(2): p. 287-295.

85. Garcia Garcia, J.M., et al., *Endometriosis: cellular and molecular mechanisms leading to fibrosis*. *Reproductive Sciences*, 2023. **30**(5): p. 1453-1461.
86. Wick, G., et al., *The immunology of fibrosis*. *Annual review of immunology*, 2013. **31**(1): p. 107-135.
87. Wynn, T., *Cellular and molecular mechanisms of fibrosis*. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*, 2008. **214**(2): p. 199-210.
88. Shabab, T., et al., *Neuroinflammation pathways: a general review*. *International Journal of Neuroscience*, 2017. **127**(7): p. 624-633.
89. Lyman, M., et al., *Neuroinflammation: the role and consequences*. *Neuroscience research*, 2014. **79**: p. 1-12.
90. Jung, Y.D., et al., *Role of P38 MAPK, AP-1, and NF- $\kappa$ B in interleukin-1 $\beta$ -induced IL-8 expression in human vascular smooth muscle cells*. *Cytokine*, 2002. **18**(4): p. 206-213.
91. DiSabato, D.J., N. Quan, and J.P. Godbout, *Neuroinflammation: the devil is in the details*. *Journal of Neurochemistry*, 2016. **139**(S2): p. 136-153.
92. Carson, M.J., J.C. Thrash, and B. Walter, *The cellular response in neuroinflammation: The role of leukocytes, microglia and astrocytes in neuronal death and survival*. *Clinical neuroscience research*, 2006. **6**(5): p. 237-245.
93. Bashir, S.T., et al., *Endometriosis leads to central nervous system-wide glial activation in a mouse model of endometriosis*. *Journal of Neuroinflammation*, 2023. **20**(1): p. 59.
94. Mokhtari, T., E. Irandoost, and F. Sheikhabaei, *Stress, pain, anxiety, and depression in endometriosis—Targeting glial activation and inflammation*. *International Immunopharmacology*, 2024. **132**: p. 111942.
95. Wu, J., et al., *Macrophage and nerve interaction in endometriosis*. *Journal of Neuroinflammation*, 2017. **14**(1): p. 53.
96. Russo, C.M. and W.G. Brose, *Chronic Pain*. *Annual Review of Medicine*, 1998. **49**(Volume 49, 1998): p. 123-133.

97. Fornasari, D., *Pain Mechanisms in Patients with Chronic Pain*. Clinical Drug Investigation, 2012. **32**(1): p. 45-52.
98. Velho, R.V., et al., *Neurogenic Inflammation in the Context of Endometriosis—What Do We Know?* International Journal of Molecular Sciences, 2021. **22**(23): p. 13102.
99. Yarnitsky, D., *Role of endogenous pain modulation in chronic pain mechanisms and treatment*. PAIN, 2015. **156**.
100. Sheng, J., et al., *The Link between Depression and Chronic Pain: Neural Mechanisms in the Brain*. Neural Plasticity, 2017. **2017**(1): p. 9724371.
101. Descalzi, G., et al., *Epigenetic mechanisms of chronic pain*. Trends in Neurosciences, 2015. **38**(4): p. 237-246.
102. Marchand, F., M. Perretti, and S.B. McMahon, *Role of the Immune system in chronic pain*. Nature Reviews Neuroscience, 2005. **6**(7): p. 521-532.
103. Colloca, L., et al., *Neuropathic pain*. Nature Reviews Disease Primers, 2017. **3**(1): p. 17002.
104. Castro, J., et al., *Peripheral and central neuroplasticity in a mouse model of endometriosis*. Journal of Neurochemistry, 2024. **168**(11): p. 3777-3800.
105. Morotti, M., K. Vincent, and C.M. Becker, *Mechanisms of pain in endometriosis*. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology, 2017. **209**: p. 8-13.
106. Field, C.J. and L. Robinson, *Dietary fats*. Advances in Nutrition, 2019. **10**(4): p. 722-724.
107. Abramiuk, M., et al., *How Can Selected Dietary Ingredients Influence the Development and Progression of Endometriosis?* Nutrients, 2024. **16**(1): p. 154.
108. Liu, P., et al., *Association between dietary inflammatory index and risk of endometriosis: A population-based analysis*. Frontiers in Nutrition, 2023. **10**: p. 1077915.

109. Schwartz, N.R., et al., *Glycemic index, glycemic load, fiber, and gluten intake and risk of laparoscopically confirmed endometriosis in premenopausal women*. The Journal of Nutrition, 2022. **152**(9): p. 2088-2096.
110. Sienko, A., et al., *The effect of two anti-inflammatory dietary components, omega-3 and resveratrol, on endometriosis*. Ginekologia Polska, 2024. **95**(7): p. 573-583.
111. Barnard, N.D., et al., *Nutrition in the prevention and treatment of endometriosis: A review*. Frontiers in Nutrition, 2023. **10**: p. 1089891.
112. Habib, N., et al., *Impact of lifestyle and diet on endometriosis: a fresh look to a busy corner*. Menopause Review/Przegląd Menopauzalny, 2022. **21**(2): p. 124-132.
113. Qi, X., et al., *The impact of the gut microbiota on the reproductive and metabolic endocrine system*. Gut microbes, 2021. **13**(1): p. 1894070.
114. Cuffaro, F., E. Russo, and A. Amedei, *Endometriosis, Pain, and Related Psychological Disorders: Unveiling the Interplay among the Microbiome, Inflammation, and Oxidative Stress as a Common Thread*. International Journal of Molecular Sciences, 2024. **25**(12): p. 6473.
115. Szczepanik, J. and M. Dłużewska, *The Importance of Diet in the Treatment of Endometriosis*. Women, 2024. **4**(4): p. 453-468.
116. Tassinari, V., et al., *Endometriosis Treatment: Role of Natural Polyphenols as Anti-Inflammatory Agents*. Nutrients, 2023. **15**(13): p. 2967.
117. Friedman, M., *Chemistry, nutrition, and health-promoting properties of Hericium erinaceus (Lion's Mane) mushroom fruiting bodies and mycelia and their bioactive compounds*. Journal of agricultural and food chemistry, 2015. **63**(32): p. 7108-7123.
118. Contato, A.G. and C.A. Conte-Junior, *Lion's Mane Mushroom (Hericium erinaceus): A Neuroprotective Fungus with Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Antimicrobial Potential—A Narrative Review*. Nutrients, 2025. **17**(8): p. 1307.

119. Qiu, Y., et al., *Bioactive substances in Hericium erinaceus and their biological properties: a review*. Food Science and Human Wellness, 2024. **13**(4): p. 1825-1844.
120. Almjlawi, B.S.A., R.A. Chechan, and A.S.M. Alhesnawi, *Some Applications of Hericium erinaceus Mushrooms: A Review*. South Asian Res J Agri Fish, 2024. **6**(5): p. 92-100.
121. Boddy, L., M.E. Crockatt, and A.M. Ainsworth, *Ecology of Hericium cirrhatum, H. coralloides and H. erinaceus in the UK*. Fungal ecology, 2011. **4**(2): p. 163-173.
122. Kunca, V. and M. Čiliak, *Habitat preferences of Hericium erinaceus in Slovakia*. Fungal Ecology, 2017. **27**: p. 189-192.
123. Cerletti, C., S. Esposito, and L. Iacoviello, *Edible mushrooms and beta-glucans: Impact on human health*. Nutrients, 2021. **13**(7): p. 2195.
124. Boulifa, A., et al., *Role of beta-(1→3)(1→6)-D-glucan derived from yeast on natural killer (NK) cells and breast cancer cell lines in 2D and 3D cultures*. BMC cancer, 2024. **24**(1): p. 339.
125. Arunachalam, K., P.S. Sreeja, and X. Yang, *The antioxidant properties of mushroom polysaccharides can potentially mitigate oxidative stress, beta-cell dysfunction and insulin resistance*. Frontiers in Pharmacology, 2022. **13**: p. 874474.
126. Jayachandran, M., J. Xiao, and B. Xu, *A critical review on health promoting benefits of edible mushrooms through gut microbiota*. International journal of molecular sciences, 2017. **18**(9): p. 1934.
127. Szućko-Kociuba, I., et al., *Neurotrophic and Neuroprotective Effects of Hericium erinaceus*. International Journal of Molecular Sciences, 2023. **24**(21): p. 15960.
128. Bizjak, M.Č., et al., *Effect of erinacine A-enriched Hericium erinaceus supplementation on cognition: A randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study*. Journal of Functional Foods, 2024. **115**: p. 106120.

129. Suleiman, W.B., R.M. Shehata, and A.M. Younis, *In vitro assessment of multipotential therapeutic importance of Hericium erinaceus mushroom extracts using different solvents*. *Bioresources and Bioprocessing*, 2022. **9**(1): p. 99.
130. Wang, M., et al., *Hericium erinaceus (Yamabushitake): a unique resource for developing functional foods and medicines*. *Food & function*, 2014. **5**(12): p. 3055-3064.
131. Drzewiecka, B., et al., *Bioactive peptides and other immunomodulators of mushroom origin*. *Biomedicines*, 2024. **12**(7): p. 1483.
132. García-Carnero, L.C., et al., *Recognition of fungal components by the host immune system*. *Current Protein and Peptide Science*, 2020. **21**(3): p. 245-264.
133. Mwangi, R.W., et al., *The antioxidant potential of different edible and medicinal mushrooms*. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2022. **147**: p. 112621.
134. Sevindik, M., et al., *Biological activities of ethanol extracts of Hericium erinaceus obtained as a result of optimization analysis*. *Foods*, 2024. **13**(10): p. 1560.
135. Juszczak, G., et al., *Chronic stress and oxidative stress as common factors of the pathogenesis of depression and Alzheimer's disease: The role of antioxidants in prevention and treatment*. *Antioxidants*, 2021. **10**(9): p. 1439.
136. Roda, E., et al., *Cognitive healthy aging in mice: boosting memory by an ergothioneine-rich Hericium erinaceus primordium extract*. *Biology*, 2023. **12**(2): p. 196.
137. Roda, E., et al., *Searching for a longevity food, we bump into Hericium erinaceus primordium rich in ergothioneine: The "longevity vitamin" improves locomotor performances during aging*. *Nutrients*, 2022. **14**(6): p. 1177.
138. Wang, S., et al., *Ribosome-inactivating proteins (RIPs) and their important health promoting property*. *RSC Advances*, 2016. **6**(52): p. 46794-46805.
139. Piscitelli, A., et al., *Applications of functional amyloids from fungi: surface modification by class I hydrophobins*. *Biomolecules*, 2017. **7**(3): p. 45.

140. Niego, A.G., et al., *Macrofungi as a nutraceutical source: Promising bioactive compounds and market value*. Journal of Fungi, 2021. **7**(5): p. 397.
141. Li, I.-C., et al., *Neurohealth properties of Hericium erinaceus mycelia enriched with erinacines*. Behavioural Neurology, 2018. **2018**(1): p. 5802634.
142. Mori, K., et al., *Improving effects of the mushroom Yamabushitake (Hericium erinaceus) on mild cognitive impairment: A double-blind placebo-controlled clinical trial*. Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives, 2009. **23**(3): p. 367-372.
143. Yanshree, et al., *The monkey head mushroom and memory enhancement in Alzheimer's disease*. Cells, 2022. **11**(15): p. 2284.
144. Ren, Y., et al., *Polysaccharide of Hericium erinaceus attenuates colitis in C57BL/6 mice via regulation of oxidative stress, inflammation-related signaling pathways and modulating the composition of the gut microbiota*. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2018. **57**: p. 67-76.
145. Hetland, G., et al., *Antitumor, anti-inflammatory and antiallergic effects of Agaricus blazei mushroom extract and the related medicinal basidiomycetes mushrooms, Hericium erinaceus and Grifola frondosa: A review of preclinical and clinical studies*. Nutrients, 2020. **12**(5): p. 1339.
146. Long, T., et al., *Polygonatum sibiricum polysaccharides play anti-cancer effect through TLR4-MAPK/NF- $\kappa$ B signaling pathways*. International journal of biological macromolecules, 2018. **111**: p. 813-821.
147. Rossi, P., et al., *Dietary supplementation of lion's mane medicinal mushroom, Hericium erinaceus (Agaricomycetes), and spatial memory in wild-type mice*. International journal of medicinal mushrooms, 2018. **20**(5).
148. Williams, L.M., et al., *Medicinal mushroom extracts from Hericium coralloides and Trametes versicolor exert differential immunomodulatory effects on immune cells from older adults in vitro*. Nutrients, 2023. **15**(9): p. 2227.
149. Lee, S.-L., et al., *Erinacine A prevents lipopolysaccharide-mediated glial cell activation to protect dopaminergic neurons against inflammatory factor-*

- induced cell death in vitro and in vivo*. International Journal of Molecular Sciences, 2022. **23**(2): p. 810.
150. Fontes, A., et al., *Antioxidant versus pro-apoptotic effects of mushroom-enriched diets on mitochondria in liver disease*. International Journal of Molecular Sciences, 2019. **20**(16): p. 3987.
  151. Lew, S.Y., et al., *Neuroprotective effects of Hericium erinaceus (Bull.: Fr.) Pers. against high-dose corticosterone-induced oxidative stress in PC-12 cells*. BMC Complementary Medicine and Therapies, 2020. **20**: p. 1-16.
  152. Liuzzi, G.M., et al., *Antioxidant compounds from edible mushrooms as potential candidates for treating age-related neurodegenerative diseases*. Nutrients, 2023. **15**(8): p. 1913.
  153. Lu, H., et al., *Hericium erinaceus Protein Alleviates High-Fat Diet-Induced Hepatic Lipid Accumulation and Oxidative Stress In Vivo*. Foods, 2025. **14**(3): p. 459.
  154. Gu, H., et al., *Preparation, characterization, and property evaluation of Hericium erinaceus peptide–calcium chelate*. Frontiers in Nutrition, 2024. **10**: p. 1337407.
  155. Gong, M., et al., *Key metabolism pathways and regulatory mechanisms of high polysaccharide yielding in Hericium erinaceus*. BMC genomics, 2021. **22**: p. 1-19.
  156. Bading, H., *Nuclear calcium signalling in the regulation of brain function*. Nature Reviews Neuroscience, 2013. **14**(9): p. 593-608.
  157. Kim, H.-S., et al., *Roles of three Fusarium oxysporum calcium ion (Ca<sup>2+</sup>) channels in generating Ca<sup>2+</sup> signatures and controlling growth*. Fungal Genetics and Biology, 2015. **82**: p. 145-157.
  158. Wang, X., et al., *Mitochondrial metal ion transport in cell metabolism and disease*. International Journal of Molecular Sciences, 2021. **22**(14): p. 7525.
  159. Akinola, S.A., et al., *Edible Mushroom Bioactive Compounds and Neurogenic Diseases*, in *Bioactive Compounds in Edible Mushrooms: Sustainability and Health Applications*. 2025, Springer. p. 1-37.

160. Krzywoszyńska, K., et al., *General aspects of metal ions as signaling agents in health and disease*. *Biomolecules*, 2020. **10**(10): p. 1417.
161. Sangtitanu, T., et al., *Peptides obtained from edible mushrooms: *Hericium erinaceus* offers the ability to scavenge free radicals and induce apoptosis in lung cancer cells in humans*. *Food & function*, 2020. **11**(6): p. 4927-4939.
162. Trovato, A., et al., *Redox modulation of cellular stress response and lipoxin A4 expression by *Hericium Erinaceus* in rat brain: Relevance to Alzheimer's disease pathogenesis*. *Immunity & Ageing*, 2016. **13**: p. 1-11.
163. Beissner, F., et al., *Psychotherapy with somatosensory stimulation for endometriosis-associated pain: the role of the anterior hippocampus*. *Biological Psychiatry*, 2018. **84**(10): p. 734-742.
164. Cordaro, M., et al., *Hidroxi<sup>®</sup> and endometriosis: Biochemical evaluation of oxidative stress and pain*. *Antioxidants*, 2021. **10**(5): p. 720.
165. Siracusa, R., et al., *Autophagy and mitophagy promotion in a rat model of endometriosis*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021. **22**(10): p. 5074.
166. 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.
167. Cordaro, M., et al., *Key mechanisms and potential implications of *Hericium erinaceus* in NLRP3 inflammasome activation by reactive oxygen species during Alzheimer's disease*. *Antioxidants*, 2021. **10**(11): p. 1664.
168. Cordaro, M., et al., *Cashew (*Anacardium occidentale* L.) nuts modulate the Nrf2 and NLRP3 pathways in pancreas and lung after induction of acute pancreatitis by cerulein*. *Antioxidants*, 2020. **9**(10): p. 992.
169. Di Paola, D., et al., *Environmental Risk Assessment of Oxaliplatin Exposure on Early Life Stages of Zebrafish (*Danio rerio*)*. *Toxics*, 2022. **10**(2): p. 81.
170. 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.

171. Impellizzeri, D., et al., *Protective effect of a new hyaluronic acid-carnosine conjugate on the modulation of the inflammatory response in mice subjected to collagen-induced arthritis*. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2020. **125**: p. 110023.
172. Fusco, R., et al., *Effect of a new formulation of micronized and ultramicronized N-palmitoylethanolamine in a tibia fracture mouse model of complex regional pain syndrome*. PLoS One, 2017. **12**(6): p. e0178553.
173. Di Paola, R., et al., *The antioxidant activity of pistachios reduces cardiac tissue injury of acute ischemia/reperfusion (I/R) in diabetic streptozotocin (STZ)-induced hyperglycaemic rats*. Frontiers in pharmacology, 2018. **9**: p. 51.
174. Fusco, R., et al., *Consumption of Anacardium occidentale L.(Cashew nuts) inhibits oxidative stress through modulation of the Nrf2/HO- 1 and NF-kB pathways*. Molecules, 2020. **25**(19): p. 4426.
175. Peritore, A.F., et al., *Management of acute lung injury: palmitoylethanolamide as a new approach*. International journal of molecular sciences, 2021. **22**(11): p. 5533.
176. Crupi, R., et al., *Protective effect of Hydroxytyrosol against oxidative stress induced by the Ochratoxin in kidney cells: In Vitro and In Vivo study*. Frontiers in Veterinary Science, 2020. **7**: p. 136.
177. Gugliandolo, E., et al., *Protective effect of snail secretion filtrate against ethanol-induced gastric ulcer in mice*. Scientific Reports, 2021. **11**(1): p. 3638.
178. Fusco, R., et al., *Biochemical evaluation of the antioxidant effects of hydroxytyrosol on pancreatitis-associated gut injury*. Antioxidants, 2020. **9**(9): p. 781.
179. 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.
180. Fusco, R., et al., *Effects of hydroxytyrosol against lipopolysaccharide-induced inflammation and oxidative stress in bovine mammary epithelial cells: A natural therapeutic tool for bovine mastitis*. Antioxidants, 2020. **9**(8): p. 693.

181. Fusco, R., et al., *Melatonin plus folic acid treatment ameliorates reserpine-induced fibromyalgia: An evaluation of pain, oxidative stress, and inflammation*. *Antioxidants*, 2019. **8**(12): p. 628.
182. Peritore, A.F., et al., *The role of annexin A1 and formyl peptide receptor 2/3 signaling in chronic corticosterone-induced depression-like behaviors and impairment in hippocampal-dependent memory*. *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders)*, 2020. **19**(1): p. 27-43.
183. Di Paola, D., et al., *Environmental toxicity assessment of sodium fluoride and platinum-derived drugs co-exposure on aquatic organisms*. *Toxics*, 2022. **10**(5): p. 272.
184. Marino, Y., et al., *Aggravation of TGF $\beta$ 1-Smad pathway and autoimmune myocarditis by fungicide (Tebuconazole) exposure*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023. **24**(14): p. 11510.
185. Inferrera, F., et al., *Impaired mitochondrial quality control in fibromyalgia: Mechanisms involved in skeletal muscle alteration*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2024. **758**: p. 110083.
186. Di Paola, D., et al., *Chronic exposure to Vinclozolin induced fibrosis, mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and apoptosis in mice kidney*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022. **23**(19): p. 11296.
187. Fusco, R., et al., *Absence of formyl peptide receptor 1 causes endometriotic lesion regression in a mouse model of surgically-induced endometriosis*. *Oncotarget*, 2018. **9**(59): p. 31355.
188. Siracusa, R., et al., *Neuroprotective effects of temsirolimus in animal models of Parkinson's disease*. *Molecular neurobiology*, 2018. **55**: p. 2403-2419.
189. Impellizzeri, D., et al., *The neuroprotective effects of micronized PEA (PEA-m) formulation on diabetic peripheral neuropathy in mice*. *The FASEB Journal*, 2019. **33**(10): p. 11364-11380.

190. D'Amico, R., et al., *Protective effects of Colomast®*, A new formulation of *adelmidrol and sodium hyaluronate*, in a mouse model of acute restraint stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020. **21**(21): p. 8136.
191. de Carvalho, A.M.R., et al., *Antinociceptive activity of Riparin II from Aniba riparia: Further elucidation of the possible mechanisms*. *Chemico-Biological Interactions*, 2018. **287**: p. 49-56.
192. Monro, J.A., *Treatment of cancer with mushroom products*. *Archives of Environmental Health: An International Journal*, 2003. **58**(8): p. 533-537.
193. Seli, E., M. Berkkanoglu, and A. Arici, *Pathogenesis of endometriosis*. *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America*, 2003. **30**(1): p. 41-61.
194. Genovese, T., et al., *Regulation of Inflammatory and Proliferative Pathways by Fotemustine and Dexamethasone in Endometriosis*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021. **22**(11): p. 5998.
195. Wingfield, M., et al., *Cell proliferation is increased in the endometrium of women with endometriosis\*\*Presented at the 4th World Congress on Endometriosis, Salvador, Brazil, May 25 to 28, 1994*. *Fertility and Sterility*, 1995. **64**(2): p. 340-346.
196. Duchrow, M., et al., *Molecular characterization of the gene locus of the human cell proliferation-associated nuclear protein defined by monoclonal antibody Ki-67*. *Cell proliferation*, 1996. **29**(1): p. 1-12.
197. Genovese, T., et al., *Regulation of inflammatory and proliferative pathways by fotemustine and dexamethasone in endometriosis*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021. **22**(11): p. 5998.
198. Foyouzi, N., et al., *Effects of oxidants and antioxidants on proliferation of endometrial stromal cells*. *Fertility and Sterility*, 2004. **82**: p. 1019-1022.
199. Yi, L., L. Lilan, and Z. Haibo, *Levels of lipid peroxides and superoxide dismutase in peritoneal fluid of patients with endometriosis*. *Current Medical Science*, 2001. **21**(2): p. 166-167.

200. Yi, L., L. Lilan, and Z. Haibo, *Levels of lipid peroxides and superoxide dismutase in peritoneal fluid of patients with endometriosis*. Journal of Tongji Medical University, 2001. **21**: p. 166-167.
201. Van Langendonck, A., F. Casanas-Roux, and J. Donnez, *Oxidative stress and peritoneal endometriosis*. Fertility and sterility, 2002. **77**(5): p. 861-870.
202. Arnhold, J. and J. Flemmig, *Human myeloperoxidase in innate and acquired immunity*. Archives of biochemistry and biophysics, 2010. **500**(1): p. 92-106.
203. Latremoliere, A. and C.J. Woolf, *Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity*. The journal of pain, 2009. **10**(9): p. 895-926.
204. Li, Y., et al., *Progesterone Alleviates Endometriosis via Inhibition of Uterine Cell Proliferation, Inflammation and Angiogenesis in an Immunocompetent Mouse Model*. PLOS ONE, 2016. **11**(10): p. e0165347.
205. Hernandez, S., et al., *Impact of Psychological Stress on Pain Perception in an Animal Model of Endometriosis*. Reproductive Sciences, 2017. **24**(10): p. 1371-1381.
206. Mutso, A.A., et al., *Reorganization of hippocampal functional connectivity with transition to chronic back pain*. Journal of neurophysiology, 2014. **111**(5): p. 1065-1076.
207. Cruz-Mendoza, F., et al., *Immediate Early Gene c-fos in the Brain: Focus on Glial Cells*. Brain Sciences, 2022. **12**(6): p. 687.
208. As-Sanie, S., et al., *Increased Pressure Pain Sensitivity in Women With Chronic Pelvic Pain*. Obstetrics & Gynecology, 2013. **122**(5): p. 1047-1055.
209. Mutso, A.A., et al., *Reorganization of hippocampal functional connectivity with transition to chronic back pain*. J Neurophysiol, 2014. **111**(5): p. 1065-76.

