



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI GENOVA

**DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA TERRA, DELL'AMBIENTE
E DELLA VITA**

CORSO DI LAUREA IN BIOLOGIA APPLICATA E SPERIMENTALE
Curriculum alimenti e nutrizione

**Caratterizzazione dell'attività neuroprotettiva di estratti di sansa ottenuti a
diverse temperature**

Relatrice:

Monica Averna

Correlatrice:

Ilaria Demori

Candidata:

Maria Demontis

Anno accademico 2022/2023

Sommario

1. Introduzione	5
1.1 Benefici della Dieta Mediterranea e dell'olio extra vergine di oliva.....	5
1.2 Recupero del materiale residuo in seguito al processo di produzione di olio di oliva	6
1.3 Attività biologiche dei composti fenolici presenti nell'olio extra vergine di oliva	8
1.4 Composti fenolici e neuroprotezione.....	9
1.5 Omeostasi del Ca ²⁺ nelle malattie neurodegenerative	10
1.6 Trasmissione glutammatergica ed eccitotossicità	16
1.7 Il sistema proteolitico Ca ²⁺ -dipendente: la calpaina e suoi substrati	19
1.7.1 Struttura della calpaina e meccanismo di attivazione.....	19
1.7.2 Meccanismo d'azione della calpaina in condizioni fisiologiche	21
1.7.3 Spettrina: una componente essenziale delle membrane cellulari	22
1.7.4 Attivazione della calpaina e morte neuronale	23
2. Scopo del lavoro	26
3. Materiali e metodi	26
3.1 Reagenti e anticorpi.....	26
3.2 Colture cellulari.....	27
3.3 Estrazione delle molecole polifenoliche dalla sansa di oliva	27
3.4 Saggio di vitalità cellulare.....	28
3.5 Tecnica immunochimica Western Blotting	29
3.5.1 Preparazione dei campioni (estrazione e dosaggio proteine)	29
3.5.2 Elettroforesi su gel di poliacrilammide	29
3.5.3 Western Blotting.....	30
3.6 Saggio per valutare le variazioni di Ca ²⁺ all'interno della cellula	30
3.7 Analisi statistica.....	31
4. Risultati	31
4.1 Effetto sulla vitalità cellulare e valutazione della variazione di Ca ²⁺ intracellulare su cellule bEnd5 trattate con l'estratto di sansa ottenuto alle diverse temperature.....	31
4.2 Effetto sulla vitalità neuronale e valutazione della variazione di Ca ²⁺ intracellulare su neuroni corticali murini trattati con l'estratto di sansa ottenuto alle diverse temperature	34

4.3 Effetto dell'attivazione della proteasi calpaina.....	36
5. Discussione.....	38
Bibliografia	41

1.Introduzione

1.1 Benefici della Dieta Mediterranea e dell'olio extra vergine di oliva

I benefici per la salute associati alla dieta mediterranea sono ben noti e documentati grazie ad un'abbondante letteratura nel campo dell'epidemiologia nutrizionale [1]; [2]. Questo modello alimentare, tradizionalmente, è caratterizzato da un abbondante consumo di alimenti vegetali, frutta fresca, verdura, cereali, patate, fagioli, noci e semi e come fonte principale di grassi l'olio d'oliva; prodotti lattiero-caseari composti principalmente da formaggio e yogurt; un consumo di pesce da basso a moderato a seconda della vicinanza del mare; un consumo piuttosto moderato di pollame; meno di quattro uova consumate a settimana ed infine bassa quantità di carne rossa e vino consumato in modo limitato di solito durante i pasti [3]. Tuttavia, non esiste un'unica dieta mediterranea, ma diverse definizioni, perché le abitudini alimentari variano considerevolmente tra i paesi che si affacciano sul Mar Mediterraneo [4]. Al di là del potenziale impatto di nutrienti specifici come antiossidanti, acidi grassi polinsaturi n-3 e vitamine correlate all'omocisteina (vitamina B12 e folati), i modelli dietetici consentono di studiare i loro effetti aggiuntivi o sinergici nel favorire un maggiore stato di salute e benessere. È ormai noto che la dieta mediterranea è associata ad una diminuzione dei rischi collegati alle malattie croniche come le malattie cardiovascolari, l'obesità, l'ipertensione e il diabete [5]. Inoltre, più recentemente, è stata collegata ad un ridotto rischio di declino cognitivo e demenza [6]. Quindi, grazie ad un numero crescente di prove è poi emerso il concetto di dieta mediterranea come modello alimentare sano ampiamente riconosciuto. Solo di recente si è iniziato a valutare se l'aderenza alla dieta mediterranea potesse essere associata alla salute cerebrale, sebbene questo modello presenti la caratteristica importante di combinare diversi alimenti e sostanze nutritive già proposti separatamente come potenziali fattori protettivi contro le disfunzioni cognitive [7]. Si deve necessariamente considerare che le scelte e le abitudini alimentari contribuiscono ad una migliore salute generale in concomitanza ad un complesso insieme di diversi fattori e variabili.

L'olio extravergine di oliva che deriva dalla spremitura esclusivamente meccanica dei frutti di *Olea europaea L.*, in questo modello dietetico, come detto in precedenza, risulta essere la fonte di grasso più utilizzata e apprezzata dai paesi che seguono questa dieta. A livello di composizione chimica è costituito principalmente da triacilgliceroli (98-99%) e l'acido grasso predominante in questi ultimi è sicuramente l'acido oleico monoinsaturo, a seguire sono presenti acidi grassi saturi come l'acido palmitico, acido stearico e inoltre sono presenti anche acidi grassi polinsaturi essenziali come acido linoleico e linolenico [8]. Oltre a questi componenti principali, l'olio di oliva extravergine è caratterizzato anche da costituenti minori che includono idrocarburi, tocoferoli, polifenoli, alcoli, steroli e pigmenti [9]. Questi componenti costituiscono l'1-2% del totale e comprendono più di duecento sostanze diverse. Questi composti bioattivi svolgono funzioni molto importanti

all'interno dell'organismo e la maggior parte di essi è responsabile anche del sapore, degli aromi e in generale delle proprietà organolettiche dell'olio di oliva. La quantità di questi composti può variare in base a diversi fattori, come le diverse cultivar, la fase di maturazione, fattori ambientali, sistemi di estrazione utilizzati e le condizioni di conservazione [10]. I polifenoli sono, tra i componenti minori, la frazione più d'interesse e, come suggerisce il nome sono composti organici naturali prodotti dal metabolismo secondario delle piante che presentano più gruppi fenolici nella loro struttura [11]. Le fonti naturali dove si possono trovare sono diverse e sono caratterizzati da un ampio spettro di attività biologiche [12]. I polifenoli, infatti, presentano un effetto nella riduzione della morbilità e nel rallentare la progressione delle malattie cardiovascolari, neurodegenerative e tumorali. Il meccanismo d'azione dei polifenoli è fortemente correlato alla loro attività antiossidante; infatti, sono noti per ridurre il livello di specie reattive dell'ossigeno nel corpo umano. Oltre a questo, le proprietà salutari dei polifenoli vegetali comprendono effetti antinfiammatori, antiallergici, antiaterogeni, antitrombotici e antimutageni [13]. Inoltre, è stata anche rilevata la loro capacità di modulare il sistema immunitario umano, influenzando la proliferazione e l'attività dei globuli bianchi, nonché la produzione di citochine o altri fattori che partecipano alla difesa immunologica [14].

1.2 Recupero del materiale residuo in seguito al processo di produzione di olio di oliva

Il ciclo di lavorazione per ottenere l'olio d'oliva si può riassumere in sette differenti fasi essenziali: la raccolta, il lavaggio, la frangitura, la gramolatura, la centrifugazione, lo stoccaggio e infine l'imbottigliamento. Le olive, trasportate inizialmente in appositi contenitori, vengono riversate nella tramoggia da cui, con apposito nastro trasportatore, passano nel raggio d'azione del defogliatore che provvede ad eliminare foglie e rametti. Successivamente nella vasca di lavaggio le olive vengono lavate e poi asciugate attraverso lo sgrondo dell'acqua. La molitura è la prima vera fase di estrazione dell'olio; quindi, attraverso un secondo nastro le olive lavate vengono prima frante da macine in granito e successivamente la pasta ottenuta viene opportunamente franta, con una granulometria regolare, da un frangitoio meccanico. La fase successiva è la gramolatura della pasta ottenuta, il cui scopo è quello di far aggregare le micro-gocce di olio presenti nella pasta attraverso il continuo rimescolamento a temperatura compresa dai 20 ai 27 °C, per un tempo non superiore ai 60 minuti. Terminata questa fase la pasta passa attraverso una centrifuga orizzontale, detta decanter, che separa dalla pasta tre frazioni principali: la sansa vergine di oliva, l'acqua di vegetazione che viene utilizzata come fertilizzante agricolo e il mosto oleoso. Quest'ultimo viene inviato ad un separatore centrifugo verticale che attraverso la rotazione, separa l'olio dai residui solidi ancora presenti. [15]

In particolare, gli scarti solidi e liquidi ottenuti da questo processo di produzione, cioè la sansa vergine e le acque di vegetazione rispettivamente, sono dei veri e propri rifiuti in quanto non possono essere dispersi nell'ambiente ma vanno smaltiti correttamente. Quindi, considerando che alla fine le sansa costituiscono il 30-50 % in peso delle olive lavorate, il loro smaltimento risulta un problema rilevante sia dal punto di vista ambientale sia anche economico, soprattutto per i paesi produttori, in quanto smaltire correttamente questi sottoprodotti presenta un costo piuttosto elevato [16]. Questi rifiuti solidi sono di natura eterogenea e possono essere trovati insieme a molti composti chimici, come alcalini (potassio) e alcalino-terrosi (metalli di calcio e magnesio), zuccheri e polifenoli, che provengono dall'acqua di vegetazione [17]. Tradizionalmente, questi residui solidi vengono sfruttati, ad esempio, come concime direttamente espanso in modo controllato sul terreno, mangime per animali come bovini e ovini ma anche come combustibile solido o per la produzione di biogas ed infine dalla sansa, tramite estrazione chimica con solvente, si può ottenere un olio di sansa grezzo che per risultare edibile deve essere necessariamente raffinato e che presenta caratteristiche decisamente più scadenti dell'olio extra vergine.

Negli ultimi anni, sono stati condotti diversi studi mirati ad esplorare la possibilità di recuperare dalle sansa delle molecole funzionali, come quelle citate nel paragrafo precedente. Queste molecole, che possiamo definire ad alto valore aggiunto, trovano applicazione in diversi ambiti, tra cui quello alimentare, cosmetico e farmaceutico. Questi principi costituiscono i pilastri dell'economia circolare, un modello di economia che si sta affermando recentemente, in cui i sottoprodotti non sono rifiuti ma risorse da valorizzare e riutilizzare [18]. L'importanza e l'uso dei rifiuti della produzione di olio, come risorsa e fonte di polifenoli, è stata descritta in un recente studio, [19] che ha dimostrato che solo tra lo 0,5-2% dei polifenoli totali presenti nelle olive viene trasferito nell'olio estratto, mentre fino al 98%, quindi, viene trattenuto negli scarti che possono essere utilizzati per diversi scopi. Pertanto, è di grande interesse valutare la possibilità di recuperare un estratto arricchito con composti fenolici, da un sottoprodotto a basso costo e ampiamente disponibile, soprattutto nell'area mediterranea [20].

Poiché l'estrazione è una fase molto importante nell'isolamento e nel recupero dei composti fenolici, molti autori hanno studiato diverse tecniche di estrazione da diverse matrici [21]. L'estrazione di questi composti dalla sansa di oliva viene effettuata mediante metodiche che generalmente sfruttano diverse miscele di solventi come metanolo/acqua o acetato di etile, anche se l'ausilio di questi solventi potrebbe compromettere la stabilità delle molecole polifenoliche presenti nell'estratto. Pertanto, recentemente l'interesse si è maggiormente rivolto allo sviluppo di nuovi processi basati su tecniche di estrazione più selettive, sostenibili e a basso costo. In questo studio si fa riferimento all'utilizzo di un reattore ad alta pressione-alta temperatura come tecnica di estrazione innovativa, che ha il vantaggio dell'effetto simultaneo di una temperatura di estrazione e di una pressione

di reazione più elevate sull'estrazione fenolica della sansa di oliva [22]. I parametri di estrazione sono stati selezionati sulla base di lavori precedenti. Durante l'estrazione la pressione e la temperatura all'interno del reattore hanno raggiunto rispettivamente valori di 25 Bar e 180°C. Le alte temperature diminuiscono la viscosità dei solventi liquidi, consentendo così una migliore penetrazione delle particelle della matrice e migliorando l'estrazione. L'aumento delle temperature può anche interrompere le forti interazioni tra soluto e matrice causate dalle forze di Van der Waals, dal legame idrogeno e dalle attrazioni di dipolo tra le molecole di soluto e i siti attivi sulla matrice. L'uso dell'alta pressione dovrebbe facilitare le estrazioni da campioni in cui gli analiti sono rimasti intrappolati nei pori della matrice. La pressione forza il solvente in aree della matrice che normalmente non sarebbero raggiunte dai solventi in condizioni atmosferiche.

1.3 Attività biologiche dei composti fenolici presenti nell'olio extra vergine di oliva

La dieta mediterranea è caratterizzata da un consumo giornaliero di olio extravergine di oliva in quantità comprese tra 25 e 50 g/giorno [23], per cui è stato ipotizzato che i fenoli, presenti nell'olio di oliva, possano essere in parte responsabili dell'effetto benefico determinato dalla dieta mediterranea [24]. L'olio extra vergine di oliva è un prodotto di grande interesse scientifico e salutistico e può essere definito come un vero e proprio alimento funzionale. Le attività biologiche e biomediche di molti metaboliti secondari di *Olea europaea* L. sono state scientificamente dimostrate [25]. Le malattie cronico-degenerative (CDD), rappresentate principalmente da obesità, malattie cardiovascolari (CVD), diabete, malattie renali croniche (CKD), malattie infiammatorie intestinali, osteoporosi, sarcopenia, malattie neurodegenerative, artrite reumatoide (RA), malattie respiratorie croniche e molti tumori, sono state finora le cause più frequenti di disabilità prolungata e morte in tutto il mondo [26]. Circa 17 milioni di persone muoiono prematuramente ogni anno a causa di una CDD e il numero è destinato a crescere. Sulla base delle diverse evidenze è emerso che la transizione nutrizionale degli ultimi decenni, caratterizzata dal passaggio dal consumo di alimenti a base di cereali, frutta e verdura a cibi ricchi di grassi saturi e zuccheri semplici, associata ad una dieta caratterizzata da un maggiore apporto energetico, rappresenta il principale fattore di rischio nell'insorgenza di queste patologie.

Infatti, secondo il Global Burden of Disease, le principali cause sono legate a fattori di rischio comportamentali come una cattiva alimentazione, l'elevato indice di massa corporea (BMI), l'abitudine al fumo di sigaretta, l'elevato consumo di alcol e il basso livello di attività fisica [27]. Una serie di articoli esposti in questo numero speciale ha evidenziato l'effetto positivo della dieta mediterranea (MD), caratterizzata dall'ampio uso di olio d'oliva, per prevenire e gestire l'obesità e altre patologie cronico-degenerative. Il

ruolo della dieta mediterranea nel trattamento di queste patologie e delle loro comorbidità è soprattutto legato agli effetti antiossidanti e antinfiammatori che caratterizzano l'olio extravergine di oliva [28]. Le principali attività biologiche associate riguardano la protezione delle LDL dal danno ossidativo, il mantenimento delle normali concentrazioni di colesterolo HDL nel sangue, il mantenimento della pressione sanguigna normale, le proprietà antinfiammatorie, il contributo alla salute del tratto respiratorio superiore, il mantenimento della normale funzione del tratto gastrointestinale e la difesa contro gli agenti esterni [29]. Quindi, è stato confermato che il contenuto fenolico evita il danno ossidativo lipidico e migliora il profilo lipidico. Diversi studi hanno anche dimostrato che un consumo costante di olio EVO è associato a una riduzione delle molecole coinvolte nei processi infiammatori legati all'aterosclerosi a partire dalla down-regolazione di NF-kB, infatti, la stretta correlazione tra infiammazione, disfunzione endoteliale e malattie cardiovascolari è ben nota [30].

Lo studio EPIC (*European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition*) ha indicato la possibile correlazione tra cancro e nutrizione, esaminando stile di vita, stato nutrizionale, tipo di dieta, anamnesi, parametri antropometrici e campioni biologici [31]. Ad oggi, i dati raccolti indicano che il modello alimentare più efficace nella prevenzione del cancro è proprio la dieta mediterranea. Inoltre, si è evidenziato come i composti polari minori presenti nell'olio EVO siano in grado di modulare positivamente il microbiota intestinale [32]; perciò, risulta essenziale capire come i diversi nutrienti influenzano la composizione del microbiota intestinale che a sua volta influenza l'insorgenza e la progressione delle malattie croniche non trasmissibili. L'incidenza di queste patologie legate all'invecchiamento e agli stili di vita malsani è in aumento, ma dati crescenti stanno mostrando come l'assunzione di olio EVO, ricco di polifenoli, possa aiutare a prevenire o addirittura curare le malattie croniche non trasmissibili, in cui la componente infiammatoria è direttamente coinvolta nella loro insorgenza e progressione [33].

1.4 Composti fenolici e neuroprotezione

Le malattie neurodegenerative, sia croniche, come il morbo di Alzheimer (AD) e il morbo di Parkinson (PD), sia acute come ictus e lesioni del midollo spinale (SCI), sono associate ad alta morbilità e mortalità e poche o nessuna opzione efficace sono disponibili per il loro trattamento. Queste malattie, quindi, rappresentano un problema primario di salute soprattutto nella popolazione anziana, anche a causa dell'aumento dell'aspettativa di vita osservato nei paesi sviluppati [34]. Ad esempio, il morbo di Alzheimer è la forma più comune di demenza e colpisce circa 27 milioni di persone in tutto il mondo, con una prevalenza che aumenta con l'età da circa l'1,0% nel gruppo di età compresa tra 65 e 69 anni fino al 30% in soggetti con più di 90 anni [35]. Il PD, la seconda malattia neurodegenerativa più diffusa, colpisce dall'1% al 2% della popolazione di età superiore

ai 65 anni. I principali fattori di rischio per il morbo di Alzheimer sono l'età e il possesso dell'allele $\epsilon 4$ del gene dell'apolipoproteina E (ApoE) e questi sono necessariamente fattori predisponenti che non offrono alcuna possibilità di prevenzione. A causa dell'efficacia attualmente limitata delle terapie farmacologiche, la ricerca di strategie preventive per il declino cognitivo o la demenza sembra essere della massima importanza. Ad esempio, il farmaco denominato memantina è un antagonista del recettore NMDA ed è usato per i pazienti con sintomi da moderati a gravi. Tuttavia, nonostante sia stato approvato dalla FDA, non è in grado di curare la malattia o di invertire sulla sua progressione ma permette soltanto di alleviare i sintomi dei pazienti. Tra i fattori legati allo stile di vita recentemente proposti come prima linea di difesa contro lo sviluppo e la progressione del deterioramento cognitivo, l'alimentazione costituisce un approccio interessante [36]. Diversi meccanismi biologici potrebbero essere descritti per spiegare l'associazione tra alimenti o sostanze nutritive della dieta mediterranea e il miglioramento della salute del cervello. Questi disturbi neurodegenerativi condividono caratteristiche patologiche comuni come l'induzione di stress ossidativo, l'aggregazione proteica anomala, la perturbazione dell'omeostasi del Ca^{2+} , l'eccitotossicità, l'infiammazione e l'apoptosi e infine anche la proteostasi perturbata, in quanto questa rete comprende diversi percorsi legati alla sintesi proteica, al ripiegamento, al traffico, alla secrezione e alla degradazione localizzata in diversi compartimenti all'interno della cellula. Il tessuto cerebrale, a causa del suo elevato fabbisogno energetico, è caratterizzato da un elevato consumo di ossigeno e tasso metabolico. Inoltre, le cellule del tessuto cerebrale presentano un contenuto molto elevato di acidi grassi polinsaturi (PUFA) e sono note per avere basse difese antiossidanti [37]. Tutti questi elementi insieme rendono il cervello incline allo stress ossidativo. Lo stress ossidativo consiste in uno squilibrio tra la produzione di radicali liberi e lo scavenging che porta a una generazione anormale di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e danno ossidativo. Negli ultimi anni, molti studi si sono concentrati sui fitocomponenti naturali presenti negli alimenti come importanti molecole bioattive e un ampio corpo di prove supporta gli effetti benefici della dieta mediterranea (MD) nella prevenzione della neurodegenerazione, probabilmente grazie alla sua ricchezza in fenoli. È stato dimostrato che i fenoli naturali hanno molte attività biologiche, in quanto sono in grado di modulare lo stato redox cellulare attraverso l'azione diretta su enzimi, proteine, recettori e diverse vie di segnalazione, nonché di interferire con l'omeostasi biochimica.

1.5 Omeostasi del Ca^{2+} nelle malattie neurodegenerative

Le proprietà delle molecole fenoliche non risiedono solo nella loro attività antiossidante, ma anche in altre proprietà biologiche, tra cui quelle coinvolte nella regolazione della dinamica del Ca^{2+} [26]. Il calcio è uno dei più importanti secondi messaggeri che regolano numerosi processi cellulari. Probabilmente, l'esempio più importante di processo mediato dal calcio nel cervello è il rilascio di neurotrasmettitori, tuttavia, non solo i

neuroni, ma anche le cellule della glia, che si stima siano 10 volte più frequenti dei neuroni nel sistema nervoso centrale (SNC), dipendono dal calcio [38]. Gli oligodendrociti sono essenziali per la funzione e la sopravvivenza dei neuroni, in quanto il loro scopo principale è la formazione della guaina mielinica [39], che è complessa e richiede diversi stimoli. L'afflusso di calcio è importante per la maturazione delle cellule precursori degli oligodendrociti e per favorire il processo di mielinizzazione [40]. Gli astrociti sono cellule della glia a forma di stella presenti nel cervello e all'inizio si pensava che fossero importanti soprattutto per fornire un supporto strutturale passivo ai neuroni, ma ad oggi è nota la loro partecipazione attiva alla regolazione delle funzioni cerebrali [41]. Gli astrociti, infatti, fanno parte della barriera emato-encefalica (BBB) [42] e sono in grado di assorbire sodio e glutammato dalla fessura sinaptica in seguito all'insorgere di un potenziale d'azione [43]. È stato descritto che l'aumento del calcio intracellulare astrocitario innesca il rilascio di gliotrasmettitori (neurotrasmettitori secreti dalle cellule della glia) come l'adenosina trifosfato (ATP), glutammato, D-serina e acido gamma-aminobutirrico (GABA) [44]. Tuttavia, la segnalazione del calcio negli astrociti è rimasta oggetto di dibattito e ci sono alcune controversie che non sono ancora state chiarite. Le microglia sono le cellule immunitarie del sistema nervoso centrale e svolgono un ruolo cruciale dopo un danno tissutale, mediando i processi infiammatori. Un aumento della concentrazione di calcio extracellulare può essere riconosciuto dalla microglia attraverso canali specifici ed innescare la loro migrazione verso il sito della lesione [45]. Oltre ai neuroni e alla glia, molte altre cellule del SNC dipendono dal calcio, come la permeabilità della BBB, composta non solo da astrociti ma anche da cellule endoteliali e giunzioni strette, è regolata dai livelli di calcio intracellulare [46]. Inoltre, altre cellule immunitarie come i linfociti T, che popolano fisiologicamente il cervello umano, si affidano al calcio come secondo messaggero per i processi intracellulari [47]. Quindi, è chiaro che l'omeostasi del Ca^{2+} intracellulare è un passaggio cruciale in diverse vie di trasduzione del segnale, poiché una serie di eventi fisiologici Ca^{2+} -dipendenti sono legati alla sopravvivenza cellulare. Nella cellula in condizioni normali la $[\text{Ca}^{2+}]$ a livello citosolico è mantenuta bassa, tra i 50 e i 300 nM ma può aumentare rapidamente fino a diverse micromoli dopo l'attivazione cellulare. Variazioni controllate della $[\text{Ca}^{2+}]$ sono legate a funzioni cellulari come la proliferazione cellulare, la motilità, la secrezione e l'espressione di geni specifici; invece, alterazioni prolungate e anomale sono state messe in relazione con una serie di malattie acute e croniche, infatti, questo squilibrio è coinvolto in una serie di condizioni patofisiologiche quali necrosi, apoptosi, deficit di autofagia e degenerazione [48]. L'ipotesi che l'alterazione del Ca^{2+} possa provocare una neurodegenerazione è stata proposta per la prima volta dal dottor Zaven Khachaturyan a metà degli anni '80. Egli, infatti, sosteneva che uno squilibrio importante a livello intracellulare di Ca^{2+} potrebbe interrompere le normali funzioni neuronali e alla fine portare a malattie neurodegenerative tra cui AD [49]. I neuroni forniscono meccanismi

elaborati per mantenere l'omeostasi cellulare del Ca^{2+} , infatti la grande differenza nella sua concentrazione, presente fra il reticolo endoplasmatico (ER) ed il citoplasma, è dovuta all'azione della pompa ATPasica (SERCA) che appunto consumando attivamente ATP sequestra Ca^{2+} nel lume del ER dove le proteine che legano il Ca^{2+} quali calsequestrina e la calretinina sono immagazzinate [50]. Insieme a questo meccanismo, il Ca^{2+} intracellulare in eccesso può essere estruso dalle cellule mediante la membrana plasmatica tramite una Ca^{2+} ATPasi (PMCA) e lo scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX). Grazie a questo insieme di processi armonici si mantiene la giusta concentrazione citoplasmatica di Ca^{2+} . La disregolazione di questa omeostasi è stata proposta nella patogenesi di diverse malattie del sistema nervoso centrale e uno dei concetti generali di morte cellulare, indotta dal calcio dopo un danno, è l'eccitotossicità. Il termine descrive la morte cellulare indotta da un sovraccarico di agenti stimolanti, come il glutammato, il conseguente aumento della concentrazione intracellulare di calcio e infine la morte delle cellule. Il ruolo del Ca^{2+} nella neurotossicità indotta dal glutammato è stato dimostrato da Berdichevsky e collaboratori (1983) e da Choi e collaboratori (1988) che osservarono che mentre la rimozione del Na^+ extracellulare preveniva il rigonfiamento neuronale in colture di neuroni corticali, ma non preservava dai processi degenerativi, la rimozione del Ca^{2+} extracellulare attenuava la degenerazione neuronale. Queste osservazioni suggeriscono che il processo di eccitotossicità è caratterizzato da due fenomeni principali: il rigonfiamento immediato, dipendente dal Na^+ e dal Cl^- e una degenerazione cellulare tardiva dipendente dal Ca^{2+} [51]. Concentrazioni tossiche di Ca^{2+} citoplasmatico possono derivare dal rilascio da parte dei depositi interni a seguito di danni ai mitocondri o essere una conseguenza dell'attivazione dei recettori metabotropici per il glutammato che, accoppiati a proteine G, stimolano il rilascio di inositolo trifosfato che attiva i canali del Ca^{2+} presenti sul reticolo endoplasmatico; ma anche il malfunzionamento di recettori e canali presenti sulla membrana di tali organuli cellulari possono contribuire a questo fenomeno. L'aumento delle concentrazioni di Ca^{2+} citoplasmatico può portare ad una cascata di effetti neurotossici a valle, suggerendo che i mitocondri giocano un ruolo centrale nella biologia cellulare sia in quanto produttori di ATP sia come regolatori dei segnali di Ca^{2+} che normalmente è trasportato al loro interno. L'uptake mitocondriale di Ca^{2+} regola la produzione e l'attivazione di tre enzimi metabolici [52], e in condizioni normali la depolarizzazione indotta dal calcio attiva tali deidrogenasi e l'ATP sintasi [53]. Come detto precedentemente, durante la normale attività fisiologica la concentrazione di Ca^{2+} intracellulare aumenta solo transientemente (da secondi a pochi minuti) e non ha effetti avversi sui neuroni [54], tuttavia in condizioni di stress neuronale la capacità dei neuroni di controllare i flussi di Ca^{2+} e di recuperare da un carico di Ca^{2+} è compromessa; è infatti noto che l'uptake eccessivo di Ca^{2+} in mitocondri isolati, a seguito della formazione del poro di transizione di permeabilità (PTP) e alla perdita del potenziale di

membrana mitocondriale, è responsabile dell'aumentata formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) quali l'anione superossido (O_2^-), il radicale idrossilico (OH), e il perossido d'idrogeno (H_2O_2), che a loro volta inibiscono la piruvato deidrogenasi e gli enzimi del ciclo degli acidi tricarbossilici nonché il complesso I della catena respiratoria. Inoltre, la disfunzione mitocondriale causata da un lieve insulto eccitotossico può portare alla morte cellulare dipendente o meno dall'attivazione delle caspasi a cui contribuiscono anche proteasi chiamate calpaine che sono capaci di degradare una varietà di substrati incluso proteine citoscheletriche, recettori di membrana, ed enzimi metabolici [55]. La disfunzione mitocondriale, il sovraccarico di calcio e l'attivazione di enzimi Ca^{2+} -dipendenti, attraverso l'aumentata produzione di radicali liberi causano danno a proteine, carboidrati, acidi nucleici e lipidi, un aspetto quest'ultimo particolarmente importante nello stress ossidativo dei neuroni, in quanto la perossidazione dei lipidi di membrana determina la formazione di aldeidi tossiche, che compromettono il funzionamento di trasportatori di membrana come ATPasi, trasportatori del glucosio e trasportatori del glutammato, aumentando ulteriormente lo squilibrio omeostatico del Ca^{2+} [56]. Tra le specie radicaliche generate in risposta all'aumentato influsso di Ca^{2+} indotto dal glutammato, l'ossido nitrico (NO) riveste una particolare importanza in quanto è una molecola messaggero a livello del sistema nervoso centrale sintetizzata dall'ossido nitrico sintasi. I danni cellulari associati ad alterazioni dell'omeostasi del Ca^{2+} sono generalmente attribuiti infatti ad un'alterata attivazione della proteolisi Ca^{2+} -dipendente e ad una produzione anomala di ossido nitrico (NO) [57]; [58]. L'attivazione della calpaina, la proteasi del sistema proteolitico Ca^{2+} -dipendente [59] e delle NO sintasi sono considerati gli eventi scatenanti che portano alla morte cellulare tipica dei diversi disturbi neurodegenerativi umani. La neurotossicità è principalmente dipendente dalla formazione di radicali perossinitrito ($ONOO^-$), che si formano in seguito all'interazione tra NO e O_2^- , nonché dall'over stimolazione dei recettori NMDA conseguente al rilascio massivo di glutammato indotto dallo stesso NO in quanto modulatore del rilascio di neurotrasmettitori.

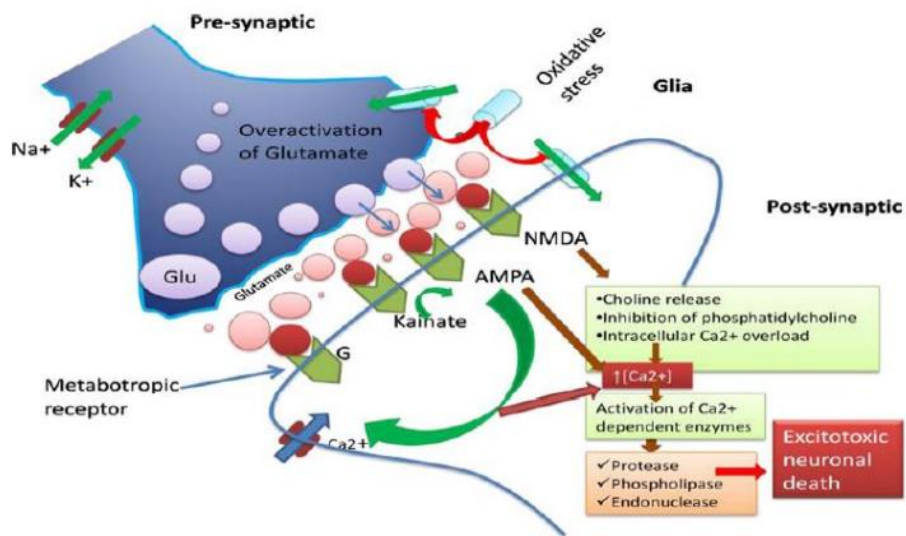


Figura 1 Rappresentazione della morte neuronale eccitotossica. L'overattivazione dei recettori del glutammato presenti sui terminali post-sinaptici dei neuroni innesca una cascata di eventi caratterizzata dal rilascio di colina, eccessivo influsso di Ca^{2+} e attivazione di vari enzimi Ca^{2+} - dipendenti con conseguente morte neuronale. [60]

Dosi elevate di NO sono responsabili dell'apoptosi che è innescata soprattutto a seguito dei danni a carico del DNA con accumulo di p53 e stimolazione dell'espressione della proteina p21, direttamente coinvolta nell'arresto del ciclo cellulare; tuttavia l'effetto citotossico dell'ossido nitrico è soprattutto a carico dei mitocondri dove inibisce la respirazione mitocondriale inattivando la citocromo c ossidasi, i complessi della catena respiratoria e gli enzimi del ciclo di Krebs, e favorisce la formazione del PTP con rilascio del citocromo c e conseguente attivazione della caspasi, rilascio di ROS e di Ca^{2+} che attiva proteine Ca^{2+} -dipendenti, come le calpaine che, a loro volta, degradano le pompe di membrana responsabili dell'estrusione di Ca^{2+} . Questo evento potrebbe spiegare il legame tra eccitotossicità e necrosi nonostante un'iniziale attivazione dei meccanismi apoptotici [61]. La tossicità indotta dal glutammato induce quindi sia morte apoptotica che necrotica, e le cellule seguono la strada necrotica, come seconda scelta, quando la via apoptotica non è più disponibile a causa dei bassi livelli di ATP [62].

Anche i lisosomi risentono dell'alterazione dell'omeostasi del Ca^{2+} e di conseguenza contribuiscono ai processi di neurodegenerazione. Essi sono componenti chiave del sistema endolisosomiale e sono organelli acidi importanti per la degradazione autofagica e l'immagazzinamento intracellulare di Ca^{2+} in quanto possono contenere diverse centinaia di micromoli di Ca^{2+} paragonabili a quelli dell'ER [63]. L'autofagia è una via di degradazione cellulare conservata importante per il riciclo dei costituenti cellulari e la degradazione di organelli danneggiati o proteine mal ripiegate [64]. Poiché l'autofagia è

un processo dinamico, lo spostamento di Ca^{2+} dentro e fuori dal lume lisosomiale probabilmente fornisce segnali che modulano la fusione di autofagosomi e lisosomi. Inoltre, ci sono prove che suggeriscono che il Ca^{2+} lisosomiale regola l'acidità del lisosoma e avvia l'attivazione trascrizionale di importanti proteine autofagiche [65]. Analogamente all'ER e alla membrana plasmatica, anche i lisosomi presentano una serie di proteine che mantengono l'omeostasi del Ca^{2+} che fornisce un ambiente ottimale per le corrette funzioni lisosomiali. Infatti, sono state segnalate una fusione autofagica difettosa e/o flusso autofagico quando il rilascio lisosomiale di calcio attraverso questi canali regolatori viene alterato [66].

È passato più di un secolo da quando AD è stato identificato, ma l'esatto meccanismo patogenetico della malattia rimane ancora poco chiaro. Sebbene si ritenga che l'origine della malattia sia l'accumulo extracellulare di placche amiloidi e grovigli neurofibrillari intracellulari, prove più recenti hanno suggerito che la disomeostasi del calcio citosolico sia la causa più proximale della malattia. Il Ca^{2+} citoplasmatico elevato è implicato nell'elaborazione della cosiddetta proteina precursore dell'amiloide, nella fosforilazione della tau, nella generazione di ROS e nella compromissione della plasticità sinaptica che sono i principali eventi che caratterizzano la patogenesi nel morbo di Alzheimer. Anche l'alterata clearance delle proteine mal ripiegate che porta all'accumulo di placche amiloidi e grovigli nel cervello potrebbe essere alla base delle conseguenze di un'alterata omeostasi del Ca^{2+} [46]; [67]. I meccanismi responsabili di queste alterazioni neuronali relative all'età non sono completamente capiti, tuttavia, probabilmente sono coinvolte più proteine che legano il Ca^{2+} che risiedono su differenti organelli/compartimenti cellulari, come il ER, i lisosomi ed i mitocondri.

In alcuni studi, invece, è stato visto che il peptide $\text{A}\beta$ sembra essere capace di indurre il rilascio del calcio dal reticolo endoplasmatico, determinandone l'aumento a livello intracellulare [68]. Le sinapsi rappresentano il sito primario di disregolazione della concentrazione del Ca^{2+} . Numerose evidenze hanno dimostrato che il peptide $\text{A}\beta$ interagisce direttamente con il recettore per il glutammato NMDAR attivandolo. L'attivazione dei recettori NMDAR indotta dall' $\text{A}\beta$ si traduce in uno stato eccitatorio cronico (eccitotossicità), che aggrava il danno neuronale soprattutto nelle fasi avanzate della patologia [69]. Farmaci mirati ad $\text{A}\beta$ però sono stati per lo più senza successo, e inoltre l'alterazione dell'omeostasi del calcio potrebbe verificarsi prima della deposizione di placche e grovigli. Quindi, i farmaci che mirano a correggere l'anomalia del Ca^{2+} possono fornire una strategia terapeutica alternativa per il trattamento della neurodegenerazione come AD.

1.6 Trasmissione glutammatergica ed eccitotossicità

L'eccitotossicità è nota in diverse malattie neurodegenerative, tra cui il morbo di Parkinson, il morbo di Alzheimer e il morbo di Huntington [70]. L'eccitotossicità si riferisce agli effetti tossici derivati da un'eccessiva e prolungata attivazione di recettori per specifici aminoacidi eccitatori [55], e nelle ultime decadi è stato ipotizzato, in particolare, che l'aminoacido eccitatorio glutammato, svolgesse un ruolo essenziale nella patogenesi della morte neuronale [71]. L'acido glutammico è un aminoacido proteinogenico non essenziale principalmente presente nel sistema nervoso centrale dei mammiferi dove svolge il ruolo di messaggero o neurotrasmettitore agendo principalmente su tre compartimenti, ovvero a livello di neuroni presinaptici, postsinaptici e all'interno delle cellule gliali, lavorando non solo come trasmettitore da punto a punto, ma anche come molecola di segnalazione extra sinaptica. Il glutammato media la maggior parte della neurotrasmissione rapida eccitatoria nel sistema nervoso centrale (SNC), si tratta del principale mediatore dell'informazione sensoriale, della coordinazione motoria, dei processi emozionali e cognitivi, ed è responsabile anche dei cambiamenti plastici che si sviluppano più lentamente e che sono connessi con i processi di plasticità sinaptica, della formazione e del recupero della memoria e dello sviluppo neuronale. Nonostante queste caratteristiche, se rilasciato nel tessuto cerebrale in quantità elevate, il glutammato può portare ad un danno massivo [72]. In condizioni di normalità esistono dei meccanismi cellulari responsabili del mantenimento di basse concentrazioni extracellulari di glutammato, che sono essenziali per le corrette funzioni cerebrali; quindi, è essenziale che il glutammato sia presente nelle giuste concentrazioni e nel luogo corretto, in quanto in quantità troppo elevate risulta dannoso, ma nello stesso tempo anche quantità troppo basse risultano inadeguate considerato il suo ruolo essenziale. Solo le cellule che esprimono sulla loro superficie recettori per il glutammato sono sensibili ad esso e capaci di rispondere alla stimolazione attivando canali ionici ad essi accoppiati o delle cascate di segnalazione intracellulare.

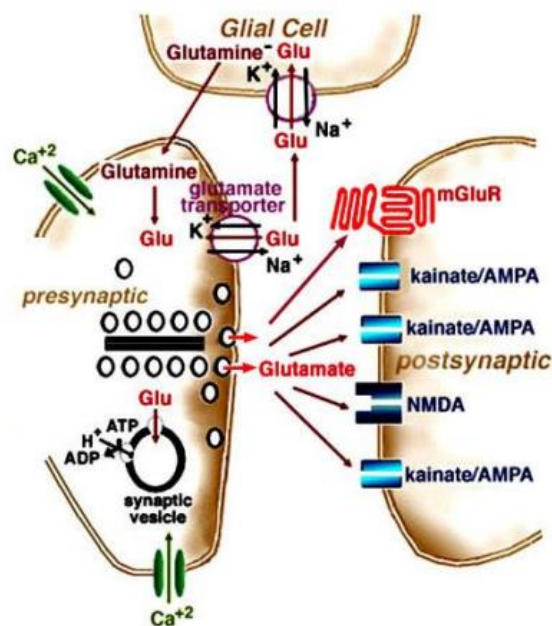


Figura 2 Rappresentazione schematica di una sinapsi glutamatergica. Sono mostrati i meccanismi responsabili del mantenimento di basse concentrazioni intracellulari del neurotrasmettitore e i recettori post-sinaptici cui il glutammato si lega.

Il glutammato può esercitare i suoi effetti attraverso il legame sia di recettori ionotropici (iGluRs), anche noti come canali ionici modulati dal glutammato, che di recettori metabotropici accoppiati a proteine G (mGluRs). Il gruppo dei recettori iGluRs comprende tre principali classi recettoriali ovvero i recettori α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate (AMPA), i recettori kainato (KA), e i recettori N-Methyl-D-aspartato (NMDA), così denominati in accordo ai loro agonisti selettivi [73]. I recettori AMPA e kainato, entrambi permeabili al sodio (Na⁺), sono coinvolti nelle risposte postsinaptiche eccitatorie rapide, i recettori NMDA, permeabili a Ca²⁺ e Na⁺, nella generazione lenta di potenziali postsinaptici. I recettori AMPA sono generalmente coespressi con i recettori NMDA a livello delle sinapsi glutamatergiche, dove in maniera congiunta contribuiscono ai processi di plasticità sinaptica che sono coinvolti nei fenomeni di apprendimento, memoria, eccitotossicità e neuroprotezione. I recettori AMPA mediano risposte postsinaptiche rapide anche a potenziali molto negativi o in assenza di potenziali d'azione, e la rapida desensitizzazione di tali recettori è responsabile delle correnti postsinaptiche eccitatorie (EPSCs); i recettori NMDA, invece, sono caratterizzati da una cinetica più lenta in quanto contengono i siti di legame per agonisti specifici da cui dipende la loro attivazione e la cui presenza rende i recettori capaci di agire da rilevatori della depolarizzazione di membrana e del legame del ligando.

I recettori NMDA sono costituiti da diverse subunità raggruppabili in tre categorie, NR1, NR2 e NR3, a loro volta comprendenti una varietà di subunità, che si organizzano a formare il recettore completo costituito da un set di quattro subunità (due NR1 e due NR2 oppure occasionalmente NR3) [74]. La diversa localizzazione dei recettori NMDA a livello sinaptico ed extra-sinaptico genera anche una diversità nelle risposte derivanti dalla stimolazione in questi diversi distretti; è stato infatti riportato che l'influsso di Ca^{2+} indotto dalla stimolazione di recettori extra-sinaptici sia responsabile di morte neuronale, mentre quello conseguente la stimolazione dei recettori sinaptici non lo sia [75]. Questa differenza potrebbe essere in realtà dovuta alle diverse risposte da parte dei mitocondri agli influssi di Ca^{2+} nelle diverse sedi anche se sembra che sia l'intensità sia la durata dell'influsso di Ca^{2+} mediato dai recettori NMDA, indipendentemente dalla localizzazione, siano fattori critici per il tipo di risposta generata con una segnalazione pro-sopravvivenza indotta da un segnale di Ca^{2+} moderato e una segnalazione pro-morte in risposta ad un influsso di Ca^{2+} intenso e prolungato [76]; [77]. L'attivazione dei recettori NMDA richiede la stimolazione di siti recettoriali ovvero il sito di riconoscimento del glutammato o dei suoi agonisti specifici, posizionato sulla subunità NR2, il sito modulatore per il legame della glicina, localizzato sulla subunità NR1, nonché la rimozione dello ione magnesio (Mg^{2+}) che esercita un blocco voltaggio-dipendente del canale [78]; solo dopo l'attivazione dei recettori AMPA, che è accompagnata da ingresso di ioni Na^+ , a livello dei recettori NMDA si verifica la rimozione del blocco da Mg^{2+} , indotta da un aumento del valore del potenziale di membrana e i canali acquistano permeabilità ai cationi Ca^{2+} e Na^+ [79]. Durante l'eccitazione glutammatergica, la cooperazione tra i recettori AMPA e NMDA rappresenta dunque un requisito fondamentale per il funzionamento dell'intero sistema di trasmissione che in qualche modo si autoregola visto che l'attivazione dei recettori NMDA innesca vie di segnalazione intracellulari Ca^{2+} -dipendenti che modulano l'espressione superficiale di recettori AMPA [80] e che tutti i recettori, lavorando in correlazione, partecipano al rilascio di glutammato [81]. La regolazione e il corretto funzionamento dell'intero sistema sono inoltre garantiti dalla presenza di speciali pompe presenti sulla superficie di membrana che rimuovono il glutammato dagli spazi extracellulari evitando che i livelli diventino troppo elevati e che il neurotrasmettitore si trasformi in una tossina capace di uccidere gli stessi neuroni. Sebbene le pompe lavorino meticolosamente per mantenere i livelli di glutammato nella giusta concentrazione, in alcuni casi i trasportatori di membrana non riescono a gestire la situazione per lungo tempo e il glutammato di conseguenza libera la sua forza distruttiva, non uccidendo i neuroni direttamente, ma eccitando le cellule eccessivamente e causando l'apertura di canali che mediano l'ingresso massivo di ioni che normalmente entrano nella cellula in quantità limitate [82].

1.7 Il sistema proteolitico Ca²⁺-dipendente: la calpaina e suoi substrati

1.7.1 Struttura della calpaina e meccanismo di attivazione

L'attivazione delle calpaine è finemente controllata all'interno di un piccolo intervallo, tuttavia, la stabilità di questo sistema di regolazione tende ad essere compromessa con l'aumento dell'età con conseguente attivazione incontrollata della calpaina, [83] implicando questi enzimi in molte condizioni di malattia, tra cui patologie neurodegenerative. Le calpaine, in generale, sono una famiglia di proteasi cisteiniche citoplasmatiche calcio-dipendenti che sono ubiquitariamente espresse in diversi tipi di tessuti e organismi. Le calpaine sono un gruppo di specie ampiamente distribuito con omologia altamente conservata, scoperto per la prima volta nel 1964 [84]. Le è stato dato il nome "calpaina" per riportare la sua somiglianza con altri due enzimi, la proteina di segnalazione regolata dal Ca²⁺, calmodulina "cal" e la idrolasi presente nella papaia, papaina "dolore" ("cal" + "dolore" = "calpaina"). Quindici membri della famiglia delle calpaine sono stati identificati fino ad oggi [85], e generalmente possono essere classificati in tipi classici e non classici in base alla struttura del loro IV dominio [86]; [85]. Le due isoforme meglio caratterizzate nel sistema nervoso centrale e anche quelle che hanno attirato maggiormente l'attenzione dei ricercatori, sono di due distinti sottotipi eterodimerici che differiscono per la loro sensibilità al calcio: μ -calpaine e m-calpaine, note anche come calpaina-1 e calpaina-2, sebbene anche molte altre calpaine (calpaina-3, calpaina-5 e calpaina-10) siano espresse nel sistema nervoso [86]. Queste calpaine convenzionali presentano una distribuzione ubiquitaria, a differenza di alcuni altri tipi non convenzionali, la cui espressione è limitata a particolari tessuti. L'attivazione della calpaina-1 richiede 3-50 μ M di calcio mentre l'attivazione della calpaina-2 ne richiede 0,4-0,8 mM [85]. Entrambi sono eterodimeri composti da una grande subunità catalitica di circa 80 kDa (codificata rispettivamente dai geni capn1 e capn2) e da una comune subunità regolatoria di circa 30 kDa (codificata dal gene capn4) [87]; La subunità grande può essere suddivisa in quattro (I-IV) e la piccola in due domini (V e VI). Il dominio II della proteasi è composto da due sottodomini (II α e II β) che contengono rispettivamente i siti attivi Cys-105 e His 262/Asn-268, indicando che lo stato inattivo della proteasi in assenza di Ca²⁺ è causato dalla separazione della triade catalitica.

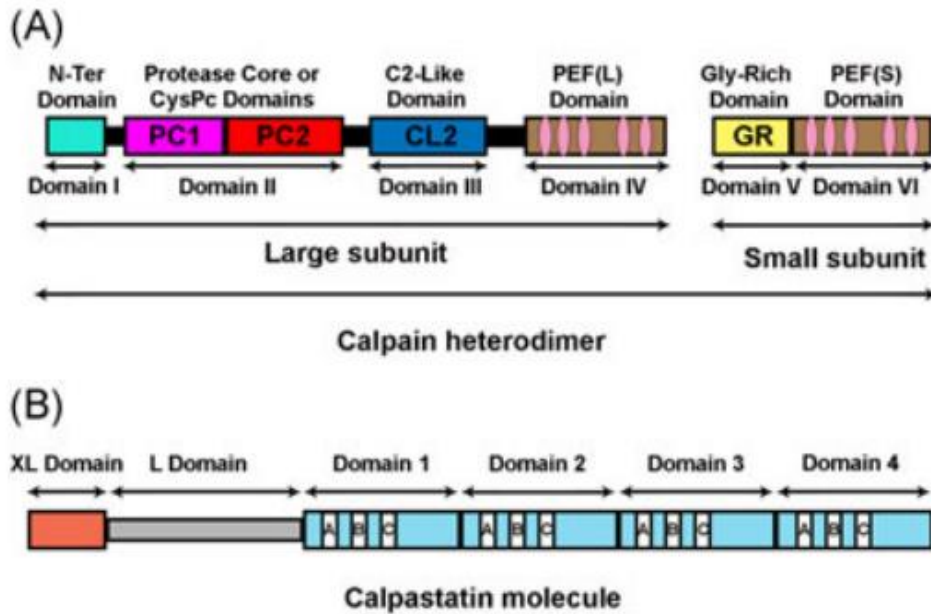


Figura 3 (A) Rappresentazione schematica della struttura di calpaine convenzionali. Le calpaine convenzionali sono eterodimeri costituiti da una grande subunità catalitica e da una piccola subunità regolatrice. La grande subunità contiene quattro domini che includono: l'elica di ancoraggio all'N-terminale chiamato anche dominio N-terminale o dominio I, il dominio catalitico CysPc costituito da due domini del nucleo della proteasi (PC1 e PC2) che insieme costituiscono il dominio II, il dominio C2-like e il dominio penta-EF-hand (PEF[L]), che contengono i siti di legame del calcio, svolgono un ruolo regolatorio e costituiscono rispettivamente i domini III e IV. La subunità piccola contiene un dominio ricco di glicina (GR) e un dominio PEF(S) simile alla subunità grande, e insieme costituiscono i domini V e VI della molecola completa dell'eterodimero di calpaina.

Entrambi i domini IV e VI contengono cinque motivi in tandem analoghi alla struttura denominata EF hand della calmodulina. Gli ultimi motivi EF hand di ciascun dominio interagiscono tra loro per formare un eterodimero [87]. La calpaina è presente in condizioni normali nel citosol nella sua forma latente ed in seguito trasloca nelle membrane in risposta all'afflusso di Ca^{2+} . Quindi la proteasi viene attivata dall'elaborazione autolitica del dominio I e dalla successiva dissociazione della subunità piccola da quella più grande [88].

I cambiamenti strutturali indotti dal calcio sono un prerequisito fondamentale per l'attivazione e la formazione di un centro catalitico funzionale. Nella prima fase, infatti, il legame del Ca^{2+} ai domini IV, VI e III porta alla dissociazione del dimero. La seconda fase consiste nel riarrangiamento della fessura del sito attivo causato dal legame di due ioni Ca^{2+} (uno legato al sottodominio $\text{II}\alpha$ e uno al $\text{II}\beta$). La concentrazione richiesta per l'attivazione di μ -calpaina e m-calpaina, rispettivamente, è stata riportata intorno a 3-50 μM e da 0,4 a 0,8 mM che sono significativamente superiori alla concentrazione citosolica trovata nelle cellule viventi ($<0,05 \mu\text{M}$), [89] suggerendo che anche altri meccanismi (interazione con fosfatidilinositolo o processi di fosforilazione) sono

coinvolti nell'attivazione di queste proteasi. Le calpaine sono inibite da sostanze che reagiscono con la cisteina a livello della triade catalitica in modo aspecifico, come ad esempio sostanze ossidanti [90]; sono invece più specifici gli agenti che inibiscono la calpaina interagendo con il dominio della calmodulina. In vivo l'attivazione della calpaina è regolata dal suo inibitore endogeno peptidico, la calpastatina (CAST). Ciascuno dei suoi quattro domini può legare specificamente e inibire efficacemente una molecola di calpaina, mentre il dominio XL e il dominio L sono privi di qualsiasi potenziale inibitorio. Il singolo gene della calpastatina può produrre otto o più polipeptidi che vanno da 17 a 85 kDa mediante l'uso di diversi promotori ed eventi di splicing alternativi. Il significato fisiologico di queste diverse calpastatine non è ancora chiaro, sebbene tutte si leghino a tre punti diversi sulla molecola della calpaina; il legame ad almeno due dei siti è Ca^{2+} dipendente. Un ulteriore punto di controllo nell'attività della calpaina è la sua fosforilazione da parte di una proteina chinasi A che porta alla restrizione del movimento del dominio III e all'arresto dell'enzima in una forma inattiva [91].

1.7.2 Meccanismo d'azione della calpaina in condizioni fisiologiche

Le calpaine hanno un'attività ottimale intorno a pH neutro e sono proteasi regolatorie piuttosto che digestive. In condizioni cellulari fisiologiche normali, la concentrazione di Ca^{2+} è inferiore a $0,05 \mu\text{M}$ [89]; [92], una condizione in cui le calpaine agiscono come biomodulatori per i processi regolati dal Ca^{2+} , tra cui la trasduzione del segnale, la proliferazione cellulare, la progressione del ciclo cellulare, la differenziazione, l'apoptosi, l'apprendimento, la memoria e il potenziamento a lungo termine. La calpaina aderisce preferenzialmente ai residui amminoacidici di Valina, Leucina o Isoleucina nella posizione P2 delle sue proteine bersaglio, mentre gli amminoacidi a livello del sito P1 sono meno determinati. Pertanto, molte proteine dovrebbero presentare siti suscettibili all'attività della calpaina, ma è stato riportato che solo un piccolo sottogruppo di proteine intracellulari va incontro a proteolisi mentre la maggior parte di esse risulta resistente. Infatti, studi successivi hanno messo in luce il fatto che il troncamento mediato dalla calpaina dei suoi substrati non è specifico della sequenza amminoacidica ma piuttosto è determinato dalla conformazione tridimensionale proteica [93]. Inoltre, la calpaina scinde i suoi substrati in frammenti limitati resistenti a ulteriori degradazioni. In condizioni fisiologiche normali, quando la concentrazione di Ca^{2+} oscilla sui 100 nM , una lieve modificazione proteolitica di alcuni substrati della calpaina è associata al normale funzionamento cellulare. Ciò può portare ad un segnale cellulare, innescare la fusione della membrana o la diffusione cellulare. Ad esempio, durante lo sviluppo precoce del cervello l'azione della calpaina, che tende ad associarsi maggiormente alle membrane, favorisce la creazione di nuovi contatti sinaptici e la formazione di coni di crescita assonali [93]. La stimolazione fisiologica del recettore N-metil-D-aspartato (NMDA) induce la comparsa di prodotti caratteristici della

degradazione dell' α II-spettrina che sono l'effetto dell'idrolisi catalizzata dalla calpaina. Il processo è collegato ai cambiamenti sinaptici che si traducono in un potenziamento a lungo termine e nella formazione della memoria [94]. I substrati della calpaina includono proteine del citoscheletro (ad es. spettrina, proteine dei neurofilamenti), proteine associate alla membrana (ad es. canali ionici e pompe, recettori del fattore di crescita epidermico (EGF), enzimi coinvolti nella trasduzione del segnale, fattori di trascrizione e altri [95]; [96]. Pertanto, durante il suo funzionamento, la calpaina ha la capacità di influenzare notevolmente la fisiologia cellulare o addirittura di partecipare direttamente ai processi degenerativi. Tecniche genetiche hanno dimostrato la relazione causa-effetto tra un deficit di calpaina e una funzione difettiva dei tessuti. Queste condizioni, definite "calpainopatie" sono spesso incompatibili con la sopravvivenza cellulare, dimostrando l'importanza fisiologica delle calpaine.

1.7.3 Spettrina: una componente essenziale delle membrane cellulari

La spettrina è una proteina citoscheletrica presente sul versante interno della membrana citoplasmatica delle cellule eucariotiche. È stata scoperta per la prima volta negli eritrociti umani [97]. La disposizione unica di spettrina, F-actina, proteina 4.1 e anchirina, attraverso connessioni dirette e indirette sulla membrana, crea una rete filamentosa cruciale per il mantenimento della forma e dell'elasticità dei globuli rossi. Ulteriori indagini, successivamente, hanno confermato la presenza della spettrina nelle cellule non eritroidi dei mammiferi [98] e nella maggior parte delle altre cellule eucariotiche. La spettrina nella sua forma più semplice è un eterodimero antiparallelo composto da una subunità α di peso molecolare 240 kDa e da una subunità β di 220 kDa. Tuttavia, all'interno dello scheletro è presente come un tetramero formato dall'interazione testa a testa di due eterodimeri [99]. Generalmente, la spettrina e le relative proteine citoscheletriche condividono tre principali elementi strutturali e funzionali, vale a dire la struttura EF hand, un dominio di legame per l'actina comprendente domini CH e un segmento ripetuto di 106 amminoacidi. È interessante notare che le ripetizioni della spettrina sono state recentemente caratterizzate per la loro capacità di dispiegarsi e ripiegarsi in modo reversibile quando sottoposte a forze meccaniche [100]. Quindi proteine con domini a tripla elica hanno il potenziale per funzionare come delle molle, in quanto presentano la capacità di immagazzinare energia e ridurre le deformazioni derivanti da sollecitazioni meccaniche. L'enorme assortimento di diverse isoforme di spettrina, caratterizzato da una localizzazione specifica in varie cellule e persino in compartimenti cellulari specifici, fornisce un'ampia gamma di attributi alla membrana cellulare [101]. La struttura multi-dominio delle molecole di spettrina fornisce come delle ancore di adesione per un gruppo specifico di proteine (sopra citate), così come anche per i lipidi. Questa caratteristica, insieme ai domini responsabili del legame delle proteine regolatrici (ad esempio la calmodulina) o dei domini omologhi nelle proteine di trasduzione del segnale può suggerire la

partecipazione della spettina nei processi di trasduzione del segnale e nella propagazione e regolazione di molti processi cellulari.

1.7.4 Attivazione della calpaina e morte neuronale

Le calpaine presentano più di cento diversi substrati, tuttavia, la loro attivazione in condizioni fisiologiche è controllata finemente per prevenire le conseguenze devastanti della massiccia proteolisi di questi numerosi substrati. Sfortunatamente, questi meccanismi regolatori diminuiscono con l'aumentare dell'età portando a un'attività aberrante delle calpaine che sono implicate, infatti, in molteplici condizioni patologiche che vanno dalla distrofia muscolare, al diabete, alla lesione cerebrale traumatica (TBI) alle malattie neurodegenerative. Con l'età il sistema nervoso centrale diventa sempre più suscettibile allo stress ossidativo con conseguenze diffuse su proteine, lipidi e acidi nucleici [102], poiché il glutammato è il principale neurotrasmettitore eccitatorio nel SNC, l'eccitotossicità glutammatergica indotta dallo stress ossidativo porta all'iperattivazione incontrollata dei recettori NMDA, come visto nei capitoli precedenti, che causano l'aumento della permeabilità dei neuroni al Ca^{2+} . L'afflusso di Ca^{2+} risultante nei neuroni induce un aumento dell'attivazione della calpaina che attraverso una maggiore produzione di $\text{A}\beta$ aumenta anche lo stress ossidativo provocando così un circolo vizioso che danneggia sempre più neuroni con conseguente neurodegenerazione osservata nella fase avanzata dell'AD. Queste proteasi, normalmente regolate, vengono attivate in modo anomalo ed elevato nel cervello dei pazienti con AD, in quanto si è visto che il rapporto tra calpaine autolisate e non autolisate risulta tre volte più alto mentre, la quantità di CAST risulta abbassata nella corteccia prefrontale rispetto ad una condizione normale [103]; [104]. Questa diminuzione di CAST, che deriva dalla calpaina e dalla proteolisi delle caspasi, ha portato, quindi, ad una successiva diminuzione del rapporto CAST/calpaina, aumentando così l'attivazione di quest'ultima. L'incremento della concentrazione di Ca^{2+} intracellulare che si verifica in queste condizioni patologiche generalmente non è sufficiente a indurre l'attività proteolitica delle calpaine, specialmente per l'alta richiesta di Ca^{2+} della calpaina-2. In alcuni casi, il Ca^{2+} potrebbe raggiungere i livelli che porterebbero all'attivazione della calpaina-1 ma, piuttosto che attivare la calpaina direttamente, sembrerebbe che l'alterazione dell'omeostasi del Ca^{2+} colpisca la regolazione dell'attività della calpaina. Studi precedenti dimostrano che tra i vari substrati della calpaina troviamo l'ossido nitrico sintasi neuronale (nNOS), che è una sintasi costitutiva Ca^{2+} -dipendente, ampiamente espressa nel sistema nervoso centrale e regolata finemente dal recettore NMDAR, la quale promuove la produzione di ossido nitrico (NO). L'ossido nitrico (NO), molecola gassosa a diffusione libera, svolge un ruolo fisiologico come secondo messaggero, specialmente nel sistema nervoso centrale. È stato dimostrato che nNOS subisce un taglio proteolitico da parte della calpaina, con un meccanismo Ca^{2+} -dipendente, passando da una forma nativa di 160 kDa ad una forma attiva di 130 kDa. Questo evento è un esempio dell'attività proteolitica fisiologica che

coinvolge la calpaina, la quale è direttamente coinvolta nella modulazione della produzione di ossido nitrico. nNOS è correlata a danni cellulari associati alla produzione anormale di NO, proprio a causa dell'alterazione dell'omeostasi del calcio e della successiva proteolisi aberrante da parte della calpaina. Infatti, l'attivazione non necessaria della calpaina e della NO sintasi sono considerati gli eventi cruciali che portano alla morte cellulare e, per questo motivo, comuni in diverse malattie neurodegenerative umane.

La spettina, come substrato della calpaina, ha attratto un numero rilevante di ricercatori interessati alla fisiologia e alla patologia della funzione cerebrale. Questa proteina è stata la prima descritta durante l'evento proteolitico mediato dalla calpaina nelle cellule neuronali, ed è particolarmente sensibile ad essa [105], con una crescente suscettibilità in presenza di calmodulina [106] (Fig. 4B). La α II spettina, in particolare è il principale bersaglio dell'attacco delle calpaine in tutte queste condizioni patologiche e la sua scissione è stata ampiamente utilizzata come misura sensibile del rimodellamento neuronale, della neurodegenerazione e della neurotossicità. In questi processi, il legame peptidico della spettina viene scisso tra Tyr 1176 e Gly 1177 dell'undicesima unità di ripetizione, vicino al dominio di legame della calmodulina [107], causando la formazione di due frammenti proteolitici di mobilità elettroforetica quasi uguale (~ 150 kDa). Successivamente, la calpaina attacca nuovamente questa regione, producendo un frammento leggermente più piccolo (~145 kDa) (Fig. 4C) [108]. Questi frammenti sono il risultato esclusivo dell'azione proteolitica della calpaina e possono essere rilevati dagli anticorpi anti-spettrina.

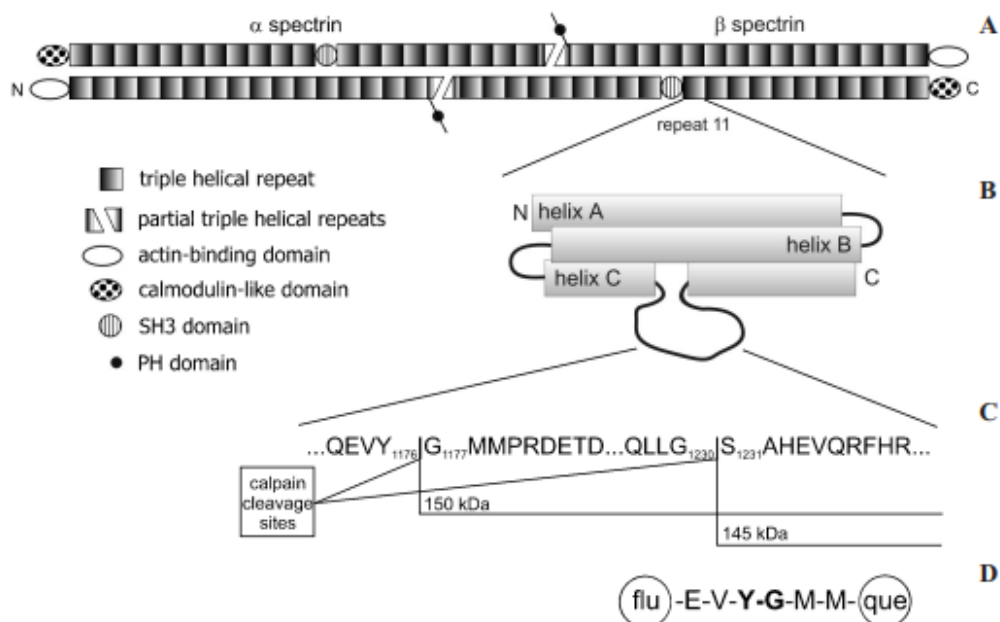


Figura 4 Caratteristiche strutturali della spettina e dei suoi siti di riconoscimento della calpaina. **(B)** Rappresentazione dell'undicesimo dominio ripetuto dell' α -spettina dei vertebrati che contiene un'ansa esposta di 35 residui all'interno dell'elica C con dominio di legame per la calmodulina e siti di scissione della calpaina [109]. **(C)** La calpaina scinde α II-

spettrina tra Y e G, producendo un frammento di 150 kDa e successivamente scinde nuovamente la regione, tra G e S, producendo un frammento leggermente più piccolo di 145 kDa.

Inoltre, anche la catena β della spettrina mostra una certa suscettibilità alla calpaina, e richiede anch'essa la presenza della calmodulina [110], ma ha un significato minore negli studi di patologia neuronale. L'aumento della proteolisi della spettrina accompagna la stimolazione intensiva dei recettori NMDA neuronali [111], che permettono agli ioni Ca^{2+} di entrare nella cellula e attivare la calpaina. Il processo di stimolazione intensiva di questi ultimi recettori porta alla morte necrotica dei neuroni nel processo chiamato eccitotossicità, definito nei capitoli precedenti. Esperimenti condotti su neuroni ippocampali in coltura hanno rivelato che i prodotti di degradazione della spettrina compaiono già due minuti dopo l'esposizione all'agonista NMDA [112] e la loro quantità è proporzionale al numero di recettori stimolati [113]. D'altra parte, i primi sintomi di degenerazione cellulare si osservano molto più tardi rispetto all'inizio dell'esposizione all'NMDA. Quindi, sebbene la proteolisi della spettrina, mediata dalla calpaina, possa non essere un evento critico nel percorso che porta alla morte neuronale, è indubbiamente uno dei tratti distintivi della sua fase iniziale. La morte cellulare necrotica è, quasi senza eccezioni, legata al massiccio afflusso di Ca^{2+} e, di conseguenza, all'attivazione della calpaina. La necrosi e l'apoptosi sono due forme distinte di morte cellulare e hanno implicazioni diverse per il tessuto circostante [114]. La necrosi di solito si verifica quando le cellule sono danneggiate fisicamente o chimicamente fino al punto in cui risultano irreparabili ed è caratterizzata da un massiccio afflusso di ioni, rigonfiamento cellulare, rottura aspecifica del DNA ed infine fuoriuscita del contenuto intracellulare nell'ambiente extracellulare, provocando danni all'intero tessuto circostante. Sebbene un'altra proteasi Ca^{2+} -dipendente, come la caspasi, svolga un ruolo primario nell'apoptosi, prove sostanziali indicano che anche le calpaine partecipino a tale processo, il taglio proteolitico della spettrina avviene sempre a livello dell'undicesima ripetizione, producendo anche qui un frammento di 150 kDa e un ulteriore frammento, in questo caso di 120 kDa [115]. Quindi, si può affermare che i ruoli delle calpaine, con i loro substrati specifici, sono importanti per l'induzione o la repressione di diversi modelli di morte cellulare, come l'apoptosi, l'autofagia e la necrosi regolata. È stato dimostrato che l'attivazione della calpaina è, in molte circostanze, un evento precoce che contribuisce allo sviluppo della morte cellulare e della patologia, con un aumento dei prodotti di degradazione dell' α II-spettrina come marcatore precoce della sua azione [116]. Pertanto, i processi calcio-dipendenti rappresentano un punto di convergenza in un insieme eterogeneo di meccanismi degenerativi e sono quindi bersagli logici per strategie di intervento, oltre che rappresentare un potenziale di partenza per generare preziosi markers di patogenesi.

2. Scopo del lavoro

È ormai noto, che l'olio extravergine di oliva è ricco di molecole bioattive con funzione protettiva, soprattutto antiossidante e antiinfiammatoria, in cui, tra i composti più abbondanti di questa frazione minore, troviamo i polifenoli. Oggetto di questo studio è un estratto ottenuto dalla sansa di oliva taggiasca, con metodiche che sfruttano alta pressione e temperatura che in ricerche precedenti si è rivelato essere ricco di molecole in grado di regolare la concentrazione intracellulare di Ca^{2+} , proteggendo il neurone dalla morte indotta da una overstimolazione del recettore NMDA. Essendo questa una condizione correlata alla patogenesi di molte neurodegenerazioni, l'attività protettiva dell'estratto potrebbe assumere un ruolo molto importante nel contrastare l'insorgenza o la progressione di tali patologie. L'obiettivo di questa tesi è quello di caratterizzare ulteriormente questo estratto, valutandone l'attività protettiva cellulare e la capacità di regolazione del Ca^{2+} intracellulare, variando la temperatura di estrazione. La necessità di provare ad utilizzare temperature al di sotto dei 180°C (37°C e 120°C) deriva dal fatto che l'esposizione alle alte temperature, durante il processo di estrazione, potrebbe portare alla formazione di composti dannosi per la salute [117], rendendo poco utilizzabile l'estratto per un eventuale approccio terapeutico. Il modello cellulare utilizzato, oltre alla linea di endotelioma murino (bEnd5), è stato il neurone corticale murino. In parallelo ai test di vitalità e alla misurazione del Ca^{2+} intracellulare, abbiamo analizzato l'attività proteolitica della calpaina, una proteasi Ca^{2+} -dipendente che, in condizioni di alterata omeostasi del Ca^{2+} , assume un ruolo patologico degradando in modo aberrante i suoi substrati. In particolare, la letteratura riporta varie ricerche riguardanti il ruolo della calpaina nella morte del neurone associata alla degradazione della spettina, una proteina citoscheletrica di particolare importanza per il mantenimento della struttura e conformazione della cellula. Oltre all'ulteriore caratterizzazione dell'estratto, questi studi hanno lo scopo di fornire importanti informazioni utili per l'identificazione delle molecole bioattive contenute nell'estratto di sansa, responsabili dell'effetto protettivo nei confronti del neurone. La loro identificazione, infatti, consentirebbe la possibilità di procedere verso il loro impiego nella formulazione di integratori ad uso terapeutico contro le patologie neurodegenerative indotte dall'alterazione intracellulare del Ca^{2+} .

3. Materiali e metodi

3.1 Reagenti e anticorpi

Il reagente di rilevazione ECL Select™ per il Western Blot e la nitrocellulosa $0.45\ \mu\text{m}$ Amersham™ Protran® Premium sono stati ottenuti da GE Healthcare (Chicago, IL, USA). Calcium-Green™ - 1AM, t-butilossicarbonile (t-BOC), medium Neurobasal™, supplemento B-27, Glutamax®, penicillina e streptomina sono stati acquistati

dall'azienda Life Technologies Italia (Milano, Italia). L'anticorpo monoclonale anti-spettrina è stato acquistato dall'azienda EMD Millipore (Burlington, Massachusetts, Stati Uniti). L'anticorpo monoclonale anti- β -actina arriva dall'azienda Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Germania). L'anticorpo secondario anti-mouse è stato acquistato dalla Cell Signalling (Danvers, MA, USA). Per il gel di poliacrilammide sono stati utilizzati i seguenti reagenti: Acrilammide/bis-acrilammide, Tris-HCl 1M pH 6.8, Tris-HCl 1.5M pH 8.8, SDS 10%, APS, TEMED (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, Stati Uniti).

3.2 Colture cellulari

Le colture di neuroni sono state preparate a partire dalla corteccia cerebrale di embrioni di topo E-18 recuperati da un topo femmina gravida (C57BL/6) anestetizzata con CO₂. Rapidamente, gli embrioni sono stati rimossi, micro-sezionati e pezzi di corteccia di cervello sono stati dissociati mediante digestione enzimatica con tripsina 0.25% per 20 min a 37 °C e successivamente triturati con una pipetta Pasteur. Una volta dissociati, i neuroni sono stati seminati in un supporto per colture cellulari con 0.1 mg/mL di poli-L-lisina. Le cellule sono state mantenute in coltura a 37 °C, in incubatore con CO₂ al 5%, nel medium Neurobasal™, al quale è stato addizionato B-27 (1:50 v/v), Glutamax® (1% v/v), 10 U/mL di penicillina e 100 µg/mL di streptomina. Ogni settimana è stato cambiato il 50% del terreno. Alla coltura non è stato aggiunto un agente antimitotico per controllare la proliferazione gliale perché l'utilizzo di un medium di coltura senza siero limita la crescita delle cellule non neuronali. I neuroni hanno maturato la loro piena funzionalità e struttura dopo 14 giorni in vitro.

3.3 Estrazione delle molecole polifenoliche dalla sansa di oliva

I campioni sgrassati, essiccati e macinati sono stati estratti con metanolo tramite un rapporto solido-liquido costante di 1:10 [118]. Le molecole bioattive sono state estratte mediante un reattore ad alta pressione e temperatura (HPHT) (modello 4560, PARR Instrument Company, Moline, IL, USA) che conteneva valvole appropriate per consentire l'introduzione e la rimozione di gas all'interno della camera di reazione. In questo processo, per evitare il fenomeno di ossidazione fenolica, come condizione operativa aggiuntiva, tutti i test sono stati eseguiti in atmosfera di azoto, facendo passare quest'ultimo attraverso il reattore per due minuti. Il reattore è stato chiuso ermeticamente, quindi la pressione risulta direttamente proporzionale alla temperatura. L'estrazione, in questo caso, è stata eseguita a diverse temperature, a partire da 37°, 120° e infine 180°C e una pressione massima corrispondente di 25 Bar. Questi estratti, ottenuti a diverse temperature, sono stati inoltre portati dopo l'estrazione ad una temperatura più

elevata di 180°C per valutare se l'effetto protettivo fosse dovuto ad una trasformazione delle molecole in questione, grazie appunto ad un aumento della temperatura successivamente al processo di estrazione. Dopo l'estrazione la fase liquida ricca di polifenoli è stata separata dalla sansa esausta mediante centrifugazione a 6000×g per dieci minuti (ALC, Alberta, Canada). Successivamente 10 ml di estratto di sansa sono stati essiccati con evaporatore rotante (Laborota, Heidolph, Germania) e il campione così essiccato è stato risospeso con 1 ml di etanolo/acqua 1:1 (v/v). Questo estratto conservato a -20°C è risultato stabile in termini di concentrazione di polifenoli totali e attività biologica fino a 6 mesi [118].

3.4 Saggio di vitalità cellulare

La vitalità cellulare è stata valutata sia sui neuroni corticali descritti in precedenza sia su cellule bEnd5 mediante il saggio del Rosso Neutro, il quale fornisce una stima della vitalità delle cellule in coltura. Si basa sulla capacità cellulare di internalizzare il Rosso Neutro nei lisosomi per diffusione passiva. I neuroni e le cellule bEnd5 sono stati seminati in piastre da 96 pozzetti con 200 µL di terreno completo (per i neuroni in particolare Neurobasal) ed esposte ai diversi stimoli indicati nel capitolo Risultati. Successivamente dopo diversi lavaggi, sono state incubate con 100 µL di colorante Rosso Neutro in ogni pozzetto a 37 °C, in atmosfera umidificata al 5% di CO₂, per 1 ora e mezza.

Solo dopo le cellule sono state lavate con 150 µL di terreno Neurobasal e lisate con una soluzione di lisi (Destain solution) contenente 51% acqua, 48% etanolo e 1% acido acetico. In questo modo il colorante è comparso nel pozzetto in seguito alla lisi cellulare e l'assorbanza è stata rilevata da uno spettrofotometro, utilizzando una lunghezza d'onda di 540 nm.

Questo saggio di vitalità cellulare eseguito con il Rosso Neutro si basa sul principio secondo il quale questo colorante sia in grado di penetrare nelle cellule vitali, nelle quali si posiziona a livello dei lisosomi tramite diffusione passiva. La successiva lisi delle cellule indotta dall'utilizzo della "Destain Solution" determina la fuoriuscita del colorante accumulato all'interno delle stesse cellule; perciò, i pozzetti appariranno di colore rosa più o meno intenso in base alla quantità di cellule vitali che sono state in grado di trattenere il colorante. Le letture allo spettrofotometro permettono di misurare la vitalità cellulare in rapporto all'intensità del colorante che si trova nel pozzetto dopo la lisi, azzerando il valore sempre prima della lettura tramite il pozzetto di controllo cioè il bianco.

3.5 Tecnica immunochimica Western Blotting

3.5.1 Preparazione dei campioni (estrazione e dosaggio proteine)

Le cellule bEnd5 sono state seminate in 1 ml di terreno completo presente in ogni pozzetto, all'interno di una piastra da sei pozzetti (28x86mm, volume utile pozzetto 3ml). In seguito ad un lavaggio tramite tampone Quin Ca^{2+} , sono stati aggiunti gli stimoli e le cellule sono state lisate con 200 μL di soluzione Sample buffer 6X tramite movimenti circolari. In seguito, recuperato questo volume, le cellule sono state ulteriormente lisate tramite un sonicatore. I campioni sono stati bolliti nel termo blocco a 95 °C per 5 minuti per favorire la denaturazione delle proteine, dopo sono stati centrifugati per qualche secondo a 12000 rpm per raccogliere sul fondo il liquido contenuto nella provetta e infine il campione è stato posto a -80°C in aliquote da 30 μL che poi verranno caricate, in seguito, nei pozzetti del gel. I neuroni corticali murini (3 x 10⁵), seminati in piastre da 35 mm, sono stati lisati mediante sonicazione in 150 μL di 50 mM Tris/HCl, pH 7.4, contenente 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, cocktail di inibitori di proteasi e fosfatasi 1:100. Il lisato è stato centrifugato a 10.000 xg per 10 minuti a 4 °C, è stato prelevato il surnatante e la quantificazione proteica è avvenuta mediante metodica Lowry. I campioni sono stati bolliti a 95 °C per 5 minuti.

3.5.2 Elettroforesi su gel di poliacrilammide

L'elettroforesi è una tecnica che permette di separare tra loro particelle cariche in un campo elettrico: le molecole cariche migrano o verso il catodo (polo negativo) o verso l'anodo (polo positivo) a seconda della loro carica. L'elettroforesi delle proteine viene condotta su un supporto poroso o gel in modo che le molecole rimangano separate in bande strette. La carica delle molecole guida la direzione di migrazione; il peso molecolare delle molecole e la dimensione dei pori del gel, determinano la velocità di migrazione e la posizione sul gel al termine della corsa elettroforetica. L'elettroforesi su gel di poliacrilammide con sodio-dodecil-solfato è una tecnica di separazione elettroforetica delle proteine in condizioni denaturanti e consente di separare le proteine in base al loro peso molecolare grazie alla presenza dell'SDS, un detergente anionico che annulla la carica propria delle proteine e le carica negativamente. In questo modo tutte le proteine avranno carica negativa netta e migreranno verso il polo positivo; la velocità di migrazione delle singole proteine dipenderà così solo dal loro peso molecolare. Un tipico allestimento di un gel per elettroforesi in SDS, posto tra due lastre di vetro, prevede la preparazione di uno "stacking" gel (o gel di impaccamento) di acrilammide al 5% che è la parte superiore del gel e la sua funzione è quella di concentrare il campione proteico caricato nei pozzetti. L'altra parte è costituita dal "running" gel (gel di separazione) di acrilammide a percentuale maggiore, in questo caso al 6% che è invece la parte inferiore e la sua funzione è quella di separare le proteine del campione in base al loro peso molecolare. Stacking gel e running gel hanno gli stessi ingredienti ma in quantità diverse e con un pH diverso.

3.5.3 Western Blotting

Le proteine separate mediante elettroforesi sono trasferite dal gel su una membrana per rendere accessibili le proteine ad uno specifico anticorpo ed essere così esaminate singolarmente. Le proteine sono quindi trasferite elettricamente su un foglio di nitrocellulosa, il quale poi viene incubato con un anticorpo specifico diretto contro la proteina di interesse (anticorpo primario) e l'immunocomplesso proteina-anticorpo è evidenziato utilizzando un anticorpo secondario (che riconosce il primo anticorpo) in grado di conferire una chemiluminescenza che può essere facilmente rilevata.

Quindi dopo il trasferimento (blotting) su membrana di nitrocellulosa, si effettuano diversi passaggi, tra cui una fase di saturazione, in cui vengono bloccati i siti liberi presenti sulla membrana rivestendola con una miscela di proteine non specifiche, in questo caso utilizzando una soluzione al 10% di polvere di latte diluita in PBS Tween, lasciandola in agitazione lenta per mezz'ora. Dopo una serie di lavaggi con PBS Tween, la membrana viene immersa in una soluzione che contiene l'anticorpo primario per 16 ore, in agitazione su una piastra basculante a 4°C. In questo lavoro sono stati utilizzati gli anticorpi primari anti-spettrina (1:500) e anti-β-actina (1:1000) diluiti in 0.1% Tween/PBS. Poiché tutti i siti della membrana che legano proteine sono bloccati, l'anticorpo aderisce alla membrana solo se si lega con il suo antigene specifico. Dopo questo passaggio, i lavaggi permettono di eliminare dalla membrana l'anticorpo in eccesso che non ha legato il proprio antigene.

In seguito, la membrana viene immersa per un'ora a temperatura ambiente in una soluzione contenente un anticorpo secondario, in questo caso (HRP)-linked anti-Mouse (1:5000) diluito in 0.1% Tween/PBS, in grado di reagire con qualunque anticorpo della stessa fonte biologica del primario, e dopo ulteriori lavaggi che permettono di eliminare dalla membrana l'anticorpo in eccesso che non ha legato l'anticorpo primario, si procede con la rilevazione della proteina. Il segnale immunoreattivo è stato sviluppato con il reagente ECL Select™ per Western Blotting ed è stato acquisito mediante lo strumento ChemiDoc XRS con il software Quantity One Image 4.6.1 (Bio-Rad, Segrate (MI), Italia).

3.6 Saggio per valutare le variazioni di Ca²⁺ all'interno della cellula

Le cellule bEnd5 e i neuroni corticali sono stati seminati in piastre da 96 pozzetti (25000 cellule/pozzetto) e sono stati incubati in HEPES buffer contenente 10 μM Calcium Green™-1AM, sonda provvista di un gruppo acetossimetil (AM) estere, che consente l'ingresso nella cellula attraverso la membrana plasmatica. Nella cellula la sonda subisce un taglio da parte di fosfodiesterasi e resta all'interno della cellula. Qualora il Ca²⁺ aumenti in seguito a specifica stimolazione, questa sonda diventa fluorescente e consente di rilevare le variazioni di Ca²⁺ intracellulare in relazione alla fluorescenza. Dopo 30 min

a 37 °C, fase di loading in cui avviene l'ingresso della sonda nelle cellule, le cellule sono state lavate due volte con HEPES buffer e successivamente esposte agli stimoli specifici (vedi capitolo Risultati). L'intensità di fluorescenza (eccitazione 485 nm; emissione 535 nm) è stata misurata ogni 10 secondi per 20 min utilizzando la modalità "top reading" nel lettore di piastre LB 940 Mithras (Bertod Technologies, Baden Wurttemberg, Germania). I diversi valori di fluorescenza sono stati calcolati come la differenza tra ogni valore di fluorescenza registrato e quello registrato al tempo zero. I valori ottenuti sono stati sottratti dai valori di controllo (cellule esposte non agli stimoli specifici, ma al solo solvente in cui sono disciolti).

3.7 Analisi statistica

Prima di procedere all'analisi statistica delle differenze riscontrate negli esperimenti riportati in questa tesi, si è proceduto alla verifica del tipo di distribuzione dei dati tramite il test di Kolmogorov-Smirnov, al fine di poter applicare il test statistico corretto nella valutazione delle differenze tra le medie di più di due gruppi. Nel caso dei dati riportati nella tesi si è potuto verificare che sono distribuiti normalmente per cui è stato utilizzato il test parametrico ANOVA seguito dal test post hoc di Tukey; con livello di significatività $p < 0.05$.

4. Risultati

4.1 Effetto sulla vitalità cellulare e valutazione della variazione di Ca^{2+} intracellulare su cellule bEnd5 trattate con l'estratto di sansa ottenuto alle diverse temperature

Per valutare l'effetto protettivo degli estratti di sansa ottenuti a diverse temperature (37° C, 120° C e 180° C), abbiamo testato la vitalità cellulare di cellule bEnd5 stimulate con una concentrazione di Ca^{2+} -ionoforo in grado di promuoverne la morte, come riportato nella sezione di Materiali e Metodi. Il Ca^{2+} -ionoforo, infatti, è un trasportatore che forma complessi stabili con cationi divalenti, permettendo così a tali ioni di attraversare la membrana cellulare. Maggiore è l'incremento della concentrazione del Ca^{2+} intracellulare maggiore è il danno che può essere provocato alla cellula.

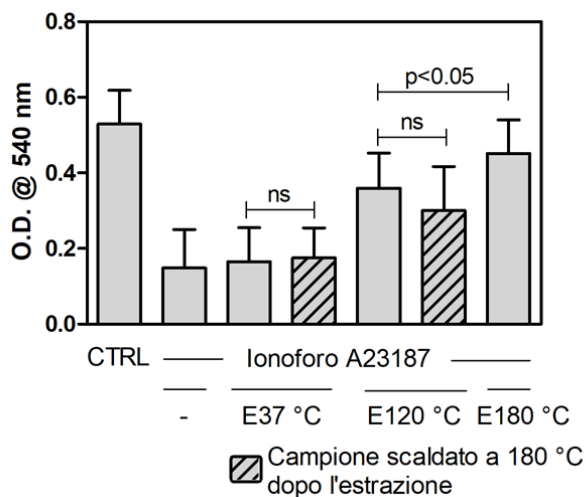


Figura 5 Vitalità delle cellule bEnd5 esposte ai diversi estratti ottenuti alle diverse temperature (37°, 120°, 180°). Vengono rappresentati anche gli estratti portati dopo l'estrazione a 180°C. La vitalità cellulare è stata valutata mediante il saggio di assorbimento del rosso neutro e i risultati sono stati ottenuti tramite l'utilizzo di uno spettrofotometro tramite lettura ad una lunghezza d'onda di 540 nm. $p < 0.05$ secondo ANOVA seguito dal test post-hoc di Tukey.

In Figura 5 sono riportati i valori delle letture allo spettrofotometro del colorante internalizzato nelle cellule trattate con Ca^{2+} -ionoforo in presenza o meno degli estratti a diverse temperature. Maggiore è il valore dell'assorbimento misurato e maggiore è la vitalità cellulare. Come si può vedere, le cellule trattate solo con Ca^{2+} -ionoforo presentano una vitalità particolarmente ridotta a causa dell'alterazione ionica. Quando aggiungiamo gli estratti ottenuti alle temperature più basse (37° e 120°C), nonostante il valore di assorbimento tenda ad aumentare all'aumentare della temperatura di estrazione, solo l'estratto di 180° C è in grado, in modo significativo, di proteggere le cellule dalla morte. Quindi, possiamo confermare che solo l'estratto ottenuto ad una temperatura di 180°C presenta un effetto citoprotettivo. Essendo dunque la temperatura di 180°C quella utile per ottenere le molecole bioattive, abbiamo voluto indagare se questa temperatura fosse importante solo durante l'estrazione oppure se si potesse promuoverne la formazione anche facendo raggiungere i 180°C agli estratti ottenuti alle temperature più basse. A questo scopo abbiamo testato la vitalità cellulare anche su bEnd5 trattate con estratti di 37°C e 120°C entrambi portati a 180°C. Come riportato in Figura 5, la differenza del valore di assorbimento, ottenuto trattando le cellule con gli estratti precedenti e gli stessi portati a 180°C, non risulta statisticamente significativa. Questo risultato sottolinea la necessità di raggiungere i 180°C, durante la prima fase di estrazione, per ottenere le molecole citoprotettive.

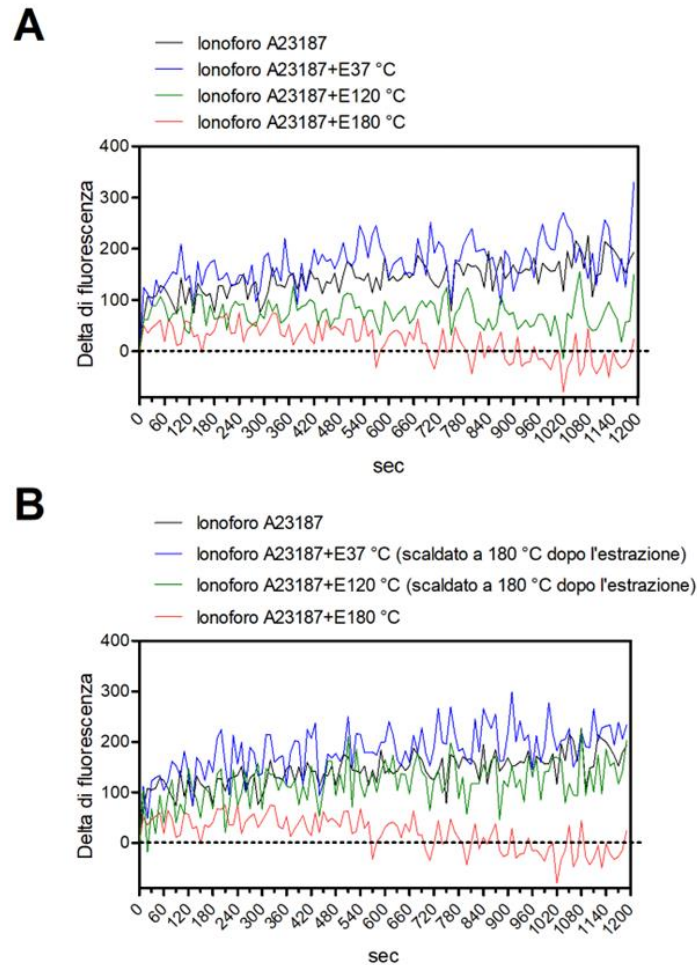


Figura 6 (A) Risultati saggio per la valutazione delle variazioni di Ca^{2+} all'interno di cellule bEnd5 testando l'azione dei diversi estratti ottenuti alle diverse temperature. Nella parte (B) vengono analizzati gli estratti portati dopo l'estrazione ad una temperatura di 180°C. L'intensità di fluorescenza (eccitazione 485 nm; emissione 535 nm) è stata misurata utilizzando la modalità "top reading" nel lettore di piastre LB 940 Mithras (Bertod Technologies, Baden Wurttemberg, Germania).

I dati riportati in una ricerca precedente avevano evidenziato come l'effetto protettivo delle molecole bioattive presenti nell'estratto fosse correlato alla loro capacità di regolare l'omeostasi intracellulare del Ca^{2+} [119]. A questo proposito, abbiamo voluto indagare se il fallimento delle molecole estratte a temperature più basse fosse proprio dovuto alla loro impossibilità di riportare la concentrazione intracellulare del Ca^{2+} sulla soglia dei valori fisiologici. Per ottenere queste informazioni abbiamo misurato la concentrazione intracellulare del Ca^{2+} utilizzando, come riportato nel capitolo Materiali e metodi, una sonda fluorescente (Calcium GreenTM-1AM). La fluorescenza di quest'ultima risulta direttamente proporzionale al valore di calcio presente all'interno della cellula in funzione del tempo di esposizione cellulare agli stimoli. In Figura 6A e B

i dati sono riportati come delta di fluorescenza registrato al tempo di trattamento indicato in ascissa e quello registrato al tempo zero e viene riportata una cinetica da 0-1200 secondi. Come possiamo evidenziare in Figura 6A, le cinetiche di fluorescenza intracellulare misurata, trattando le cellule con gli estratti ottenuti alle temperature di 37°C e 120°C, presentano un andamento del tutto paragonabile a quello ottenuto trattando le cellule con il solo Ca²⁺-ionoforo. Diversamente, la cinetica di fluorescenza misurata nelle cellule trattate con l'estratto ottenuto a 180°C risulta molto simile a quella corrispondente alle cellule non trattate. Questi risultati confermano che l'effetto protettivo delle molecole estratte a 180°C nei confronti delle cellule trattate con quantità tossiche di Ca²⁺-ionoforo sia correlato alla loro capacità di regolare l'omeostasi intracellulare del Ca²⁺. Tale capacità viene completamente a mancare nelle molecole estratte a temperature più basse. Come precedentemente valutato mediante il test di vitalità cellulare, abbiamo voluto studiare l'effetto sulla regolazione del Ca²⁺ intracellulare degli estratti ottenuti a bassa temperatura ma portati a 180°C dopo l'estrazione. Anche in questo caso, il trattamento delle cellule con questi estratti non ha evidenziato alcun effetto di modulazione della concentrazione del Ca²⁺ intracellulare (Figura 6B). Tutti i dati appena riportati confermano che è necessario raggiungere la temperatura di 180°C per estrarre molecole bioattive dalla sansa in grado di proteggere le cellule dalla morte, indotta da una concentrazione tossica di Ca²⁺, ripristinando l'omeostasi fisiologica di questo ione.

4.2 Effetto sulla vitalità neuronale e valutazione della variazione di Ca²⁺ intracellulare su neuroni corticali murini trattati con l'estratto di sansa ottenuto alle diverse temperature

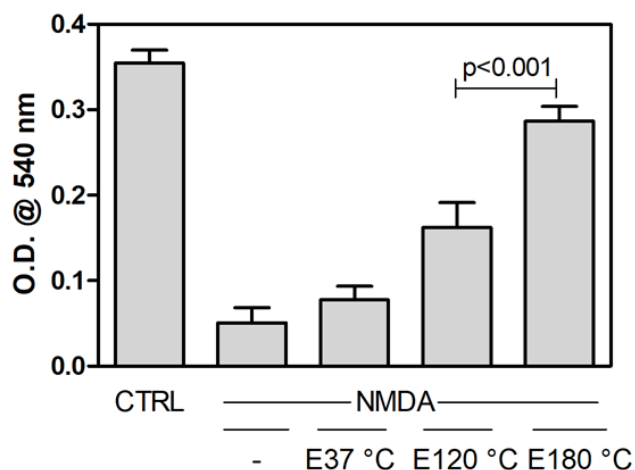


Figura 7 Vitalità cellulare dei neuroni corticali murini esposti ai diversi estratti ottenuti alle diverse temperature (37°, 120°, 180°). La vitalità cellulare è stata valutata mediante il saggio di assorbimento del rosso neutro e i risultati sono stati ottenuti tramite l'utilizzo di uno spettrofotometro tramite lettura ad una lunghezza d'onda di 540 nm. $p < 0.001$ secondo ANOVA seguito dal test post-hoc di Tukey.

Considerando, che lo scopo ultimo di questa tesi è la caratterizzazione dell'effetto neuroprotettivo degli estratti ottenuti alle diverse temperature, è stato necessario utilizzare un modello cellulare più idoneo già utilizzato nelle nostre ricerche precedenti: i neuroni corticali murini. In particolare, abbiamo valutato l'effetto degli estratti ottenuti alle diverse temperature su questi neuroni trattati con una concentrazione tossica di NMDA in grado di indurre un ingresso tossico di Ca^{2+} nella cellula. Come riportato in Figura 7 solo l'estratto ottenuto alla temperatura di 180°C è in grado di proteggere il neurone dalla morte indotta dalla overstimolazione del recettore NMDA in modo significativo. Le molecole estratte alle temperature più basse invece non risultano in grado di contrastare questi eventi tossici. I dati di vitalità neuronale correlavano con i dati ottenuti dalla misurazione del Ca^{2+} intracellulare nelle stesse condizioni di stimolazione cellulare. Come riportato in Figura 8, gli estratti ottenuti alle temperature di 37°C e 120°C non erano in grado di contrastare l'incremento di Ca^{2+} promosso dalla overstimolazione del recettore NMDA. Solo l'estratto ottenuto a 180° è invece capace di ripristinare l'omeostasi del Ca^{2+} anche nel neurone. I dati ottenuti non solo confermano che le molecole in grado di proteggere il neurone dalla morte si estraggono dalla sansa solo a 180°C ma anche che la loro azione si espleta mediante l'interazione col recettore NMDA.

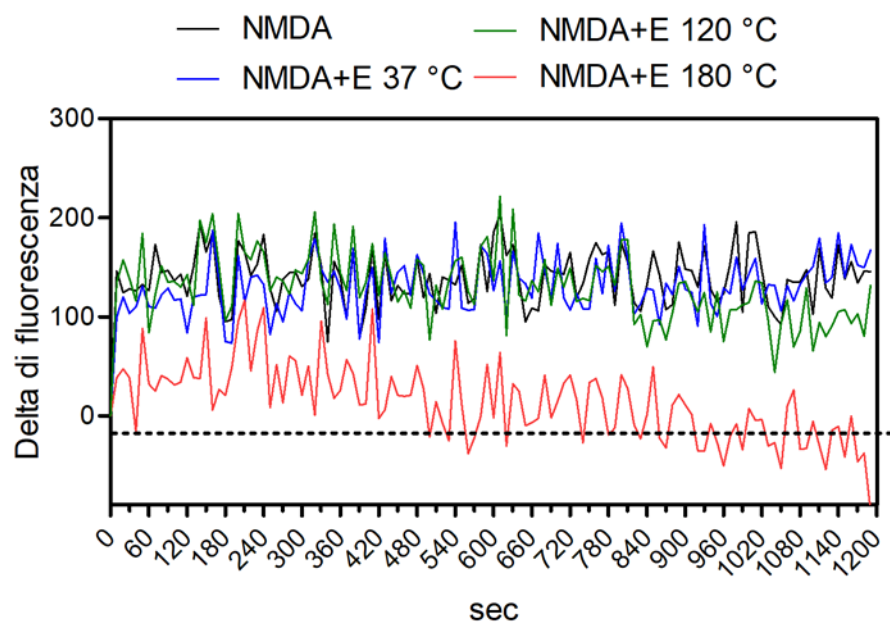


Figura 8 Risultati saggio per la quantificazione della concentrazione di Ca^{2+} all'interno di neuroni corticali murini testando l'azione dei diversi estratti ottenuti alle diverse temperature. L'intensità di fluorescenza (eccitazione 485 nm; emissione 535 nm) è stata misurata utilizzando la modalità "top reading" nel lettore di piastre LB 940 Mithras (Bertod Technologies, Baden Wurttemberg, Germania).

4.3 Effetto dell'attivazione della proteasi calpaina

L'iperattivazione dei recettori NMDA e l'afflusso di Ca^{2+} risultante nei neuroni induce l'attivazione di proteasi Ca^{2+} -dipendenti e in particolare della calpaina. L'analisi dei frammenti dei target molecolari prodotti da questa proteasi si è spesso rivelata utile nell'identificare processi fisiologici o patologici relativi all'attività della calpaina. Tra i suoi substrati, l' α -spettrina risulta particolarmente studiata nella cellula neuronale. Questa proteina, infatti, è una proteina citoscheletrica che riveste un ruolo importante nel mantenimento dell'integrità della membrana plasmatica e della struttura citoscheletrica. Abbiamo quindi voluto analizzare l'effetto dell'azione della calpaina sull' α -spettrina per valutare gli eventi correlati alla morte neuronale e alla sua protezione indotte rispettivamente dalla iperattivazione del recettore NMDA e dal trattamento con l'estratto ottenuto a 180° C.

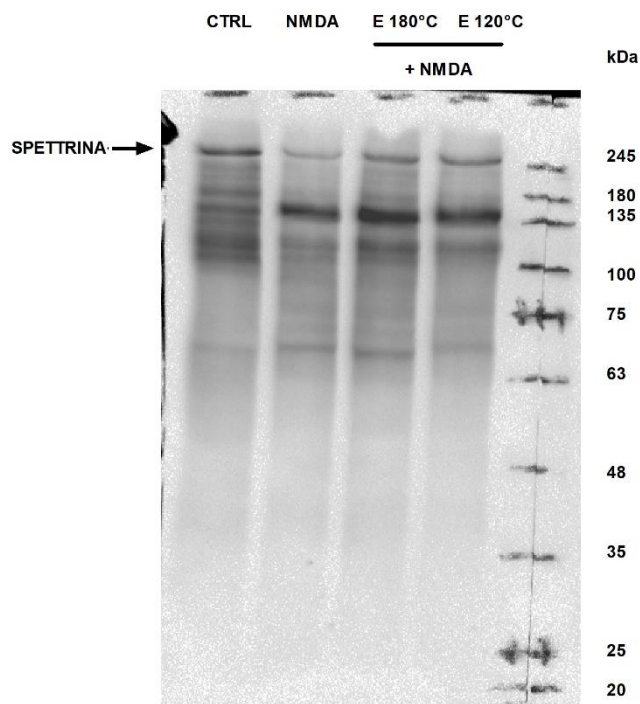


Figura 9 Valutazione della spettrina neuronale in neuroni corticali murini, in seguito a stimolazione eccessiva con NMDA in presenza dei diversi estratti (180°C e 120°C). Dopo 14 giorni, i neuroni sono stati incubati per 4 ore con gli stimoli indicati. Aliquote di proteine totali dai lisati dei neuroni sono state sottoposte a SDS/PAGE all'8 % seguito da immunoblotting per la spettrina.

Come vediamo in Figura 9, l' α -spettrina nativa, che presenta un peso molecolare di circa 240 kDa, tende a diminuire nei neuroni stimolati solo con NMDA. Questa diminuzione corrisponde ad un parziale accumulo di un frammento di circa 140 kDa che è stato riportato essere causato dall'azione della calpaina [115]. La lane corrispondente al pattern proteico di α -spettrina, nel neurone sottoposto a stimolazione tossica di NMDAR e concomitante trattamento di estratto a 180° C, rivela come l'effetto protettivo nei confronti della vitalità del neurone corrisponda ad una digestione molto più limitata della proteina nativa citoscheletrica. L'analisi dei frammenti a 140 kDa e la comparsa di frammenti a più alto peso (150 kDa) rivelano un'attivazione molto più regolata della proteasi Ca^{2+} -dipendente. La calpaina, infatti, se attivata in modo regolato degrada l' α -spettrina promuovendo l'accumulo di frammenti di 140 e 150 kDa che, in un processo di attivazione più spinto e non regolato, si accumulano solo parzialmente perché velocemente degradati in frammenti più piccoli e non più visibili dall'anticorpo utilizzato. Analizzando invece l' α -spettrina nativa e i frammenti prodotti nella lane corrispondente al neurone stimolato con NMDA ed estratto a 120° C, in cui abbiamo assistito ad una parziale protezione della vitalità neuronale, possiamo riscontrare una degradazione dell' α -spettrina nativa intermedia. Questi risultati suggeriscono che solo l'estratto ottenuto a 180°C protegge quasi completamente il neurone dalla morte indotta dallo stress da Ca^{2+} rallentando l'attività aberrante della calpaina sull' α -spettrina.

Questo dato però è ancora preliminare, ma vista l'importanza cruciale dell'interazione tra attività di calpaina sul target α -spettrina e la morte del neurone e l'effetto dell'estratto su questo pathway, futuri e maggiormente approfonditi studi rivolti all'analisi dei prodotti di degradazione dell' α -spettrina ad opera della calpaina in neuroni trattati o meno con l'estratto a 180° C risultano prioritari.

5. Discussione

Considerando che la produzione di olio di oliva extravergine provoca la formazione di grandi quantità di sottoprodotti, tra cui la sansa di oliva che può raggiungere anche il 30% della produzione e che gran parte di questi residui solidi rimane senza applicazione effettiva, in collaborazione col Dipartimento di Ingegneria Chimica, abbiamo messo a punto un metodo di estrazione, dalla sansa di oliva della cultivar Taggiasca, di molecole bioattive, tra cui molte di natura polifenolica. È noto da tempo come la maggior parte dei composti fenolici venga trattenuta all'interno della sansa e come questi presentino importanti attività antiossidanti e antinfiammatorie, poco invece si sa sulla loro capacità di controllo e regolazione dell'omeostasi intracellulare del Ca^{2+} . In uno studio precedente [119]; [120] sono state riportate le informazioni riguardanti la tecnica di estrazione definita innovativa, in quanto basata sull'utilizzo di un reattore ad alta pressione e alta temperatura (180° C) che ha il vantaggio dell'effetto simultaneo di una temperatura di estrazione e di una pressione di reazione più elevate sull'estrazione dei fenoli. In generale, un aumento delle temperature e della pressione, durante il processo di estrazione, porta ad una diminuzione della viscosità e della tensione superficiale dei solventi, favorendo una maggiore velocità nel trasferimento dei composti dalla matrice. Con questo sistema, sono state estratte molecole bioattive capaci di proteggere neuroni corticali murini dalla morte indotta da un sovraccarico di Ca^{2+} intracellulare causato dalla over stimolazione del recettore glutammatergico NMDA. In particolare, questo precedente studio ha dimostrato come l'estratto ottenuto a 180° C abbia la capacità di regolare e ripristinare l'omeostasi del Ca^{2+} alterata da un'attivazione di NMDAR nei neuroni stimolati eccessivamente con il suo specifico agonista NMDA, mantenendoli quindi vitali. Inoltre, veniva dimostrato come, una volta ripristinata l'omeostasi del calcio dalle molecole presenti nell'estratto, venissero regolati anche tutti gli eventi alterati dall'aumento persistente della concentrazione di Ca^{2+} intracellulare, tra cui l'attivazione di diverse Ca^{2+} -proteasi in particolare l'attività della calpaina. Quest'ultima, infatti, è una proteasi Ca^{2+} -dipendente che oltre ad essere coinvolta nella fisiologia cellulare svolge anche ruoli patologici se attivata in maniera aberrante da un alterato incremento intracellulare del Ca^{2+} . Si è quindi studiato il coinvolgimento della calpaina nel processo di morte cellulare e in quello di protezione esercitato dall'estratto, monitorando alcuni substrati della calpaina coinvolti negli eventi necrotici. In questo

attuale studio si è voluto caratterizzare ulteriormente questo estratto, indagando principalmente sulla possibilità di ottenere le preziose molecole bioattive estraendo a temperature più basse. Il razionale di questa ricerca è correlato alla possibilità di produrre molecole tossiche durante l'estrazione effettuata ad elevate temperature (180° C). Per questo motivo siamo andati a valutare l'effetto, sia sulla vitalità cellulare che sulla regolazione della concentrazione del Ca^{2+} intracellulare, di estratti ottenuti a 37° C e a 120° C. I nostri risultati hanno però escluso la possibilità di ottenere da questi estratti quantità di molecole bioattive confrontabili con quelle ottenute dall'estratto a 180° C. È comunque importante sottolineare che in un'indagine precedente, condotta tramite analisi in HPLC-MS/MS, non siano state ritrovate tracce di 5-(idrossimetil)furfurale. L'assenza di questo composto, formato durante le prime fasi della reazione di Maillard, potrebbe indicare che durante il processo di estrazione non si verificano reazioni di degradazione con formazione di prodotti tossici [120].

Avendo confermato l'importanza di mantenere la temperatura di 180°C per ottenere un estratto ricco in molecole bioattive, abbiamo voluto ulteriormente indagare se questa temperatura fosse davvero importante nel solo processo estrattivo o se fosse determinante nel convertire molecole inattive in forme attive. Per rispondere a questa domanda abbiamo ripreso gli estratti ottenuti a 37° C e a 120° C e li abbiamo portati dopo estrazione a 180° C. Come riportato nei Risultati l'alta temperatura raggiunta dopo estrazione non arricchiva gli estratti di molecole bioattive. Quindi si è potuto confermare che la temperatura di 180°C è l'unica temperatura che consente di promuovere il passaggio di molecole bioattive dalla sansa all'estratto. L'ulteriore caratterizzazione di questo estratto è molto importante in quanto ci consente di muovere passi importanti verso l'identificazione delle molecole in esso contenute e in grado di ridurre in maniera significativa la morte del neurone indotta da una over-stimolazione del recettore NDMA. La tossicità indotta dalla stimolazione eccessiva di questo recettore è alla base di molte neurodegenerazioni che individuano come uno degli enzimi particolarmente coinvolti la proteasi Ca^{2+} -dipendente calpaina. Nello specifico è stato riportato in letteratura [121] ; [122] che nei processi neurodegenerativi uno dei target dell'attività aberrante di calpaina indotta dall'alterazione dell'omeostasi del Ca^{2+} sia la spettina. I nostri risultati riguardanti l'analisi della spettina nativa e dei frammenti generati dall'attivazione della calpaina ottenuti nella parte finale di questa ricerca ci hanno permesso di formulare una prima ipotesi sul pathway intracellulare che correla con l'attività aberrante dell'enzima, la degradazione della spettina e la morte del neurone. In particolare, l'effetto dell'estratto nel contenere l'attività di calpaina modulandone la sua azione sulla spettina, suggerisce che questo potrebbe essere l'evento cruciale nella protezione del neurone. Risulta quindi molto importante poter proseguire queste ricerche allo scopo di identificare le molecole contenute nell'estratto

ottenuto a 180° C per poter ipotizzare un loro eventuale utilizzo in applicazioni terapeutiche per contrastare l'insorgenza e la progressione delle neurodegenerazioni.

Bibliografia

- [1] C. Galbete, L. Schwingshackl, C. Schwedhelm, H. Boeing e M. Schulze, «Evaluating Mediterranean diet and risk of chronic disease in cohort studies: An umbrella review of meta-analyses,» *Eur. J. Epidemiol.*, pp. 33, 909–931, 2018.
- [2] A. D'Alessandro e G. De Pergola, «The Mediterranean Diet: Its definition and evaluation of a priori dietary indexes in primary cardiovascular prevention,» *Int. J. Food Sci. Nutr.*, pp. 69, 647–659, 2018.
- [3] F. S. A. T. G. D. A. F.-L. E. H. D. T. W C Willett 1, «Mediterranean diet pyramid: a cultural model for healthy eating,» 1995.
- [4] S. F., «The Mediterranean diet revisited: evidence of its effectiveness grows,» *Curr Opin Cardiol*, p. 24:442–446, 2009.
- [5] M. f. p. a. t. p. o. c. d. r. developments, «Miguel Angel Martinez-Gonzalez 1, Maira Bes-Rastrollo, Lluís Serra-Majem, Denis Lairon, Ramón Estruch, Antonia Trichopoulou,» may 2009.
- [6] V. Solfrizzi e F. Panza, «Mediterranean diet and cognitive decline. A lesson from the whole-diet approach: What challenges lie ahead?,» *J. Alzheimer's Dis*, pp. 39, 283–286, 2014.
- [7] C. C. D. A. e. a. Solfrizzi V, «Lifestyle-related factors in predementia and dementia syndromes,» *Expert Rev Neurother*, p. 8:133–158, 2008.
- [8] Boskou, «Other important minor constituents. In Olive Oil: Minor constituents and Health,» *CRC Press: Boca*, p. pp. 45–54, 2009.
- [9] Luchetti, «Importance and future of olive oil in the world market—An introduction to olive oil,» *Eur. J. Lipid*, pp. 104, 559–563, 2002.
- [10] K. Tuck e P. Hayball, «Major phenolic compounds in olive oil: Metabolism and health effects,» *J. Nutr. Biochem.*, pp. 13, 636–644, 2002.
- [11] N. Kalogeropoulos e M. Tsimidou, «Antioxidants in Greek virgin olive oils,» *Antioxidants*, pp. 3-387–413, 2014.
- [12] D. Del Rio, A. Rodriguez-Mateos, J. Spencer, M. Tognolini, G. Borges e Crozier, «Dietary (poly) phenolics in human health: Structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases,» *Antioxid. Redox Signal.*, pp. 18, 1818–1892, 2013.
- [13] L. Ellis, W. Liu, Y. Luo, M. Okamoto, D. Qu, J. Dunn e Fujita, «Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate suppresses melanoma growth by inhibiting inflammasome and IL-1 β secretion,» *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, pp. 414, 551–556, 2011.
- [14] C. John, P. Sandrasaigaran, C. Tong, A. Adam e Ramasamy, «Immunomodulatory activity of polyphenols derived from Cassia auriculata flowers in aged rats,» *Cell. Immunol.*, pp. 271, 474–479, 2011.
- [15] F. n. 1911, «[https://www.frantoionutile.it/fasi-lavorazione.php#:~:text=Fasi%20della%20Lavorazione-,Il%20ciclo%20di%20lavorazione%20per%20ottenere%20l%27olio%20d%27oliva,%2C%20centrifugazione%2C%20stoccaggio%20e%20imbottigliamento.,](https://www.frantoionutile.it/fasi-lavorazione.php#:~:text=Fasi%20della%20Lavorazione-,Il%20ciclo%20di%20lavorazione%20per%20ottenere%20l%27olio%20d%27oliva,%2C%20centrifugazione%2C%20stoccaggio%20e%20imbottigliamento.,,)» Il ciclo di lavorazione per ottenere l'olio d'oliva, Aprile 2011. [Online].
- [16] F. M. S. V. F. & T. L. Pagnanelli, «Heavy metal removal by olive pomace. biosorbent characterisation and equilibrium modeling,» *Chemical Engineering Science*, pp. 58, 4709–4717, 2003.
- [17] P. & R. M. M. V. Sánchez Moral, «Production of pomace olive oil,» *Grasas y Aceites*, pp. 57, 47–55, 2006.
- [18] L. Cecchi, M. Bellumori, C. Cipriani, A. Mocali, M. Innocenti, N. Mulinacci e Giovannelli, «A two-phase olive mill by-product (pâté) as a convenient source of phenolic compounds: Content, stability, and antiaging properties in cultured human fibroblasts,» *J. Funct. Foods*, pp. 40, 751–759, 2018.

- [19] L. Cecchi, M. Migliorini, B. Zanoni, C. Breschi e N. Mulinacci, «An effective HPLC-based approach for the evaluation of the content of total phenolic compounds transferred from olives to virgin olive oil during the olive milling process,» *J. Sci. Food Agric.*, pp. 98, 3636–3643, 2018.
- [20] A. S.-V. R. V. J. B. J. & M. F. Clemente, «Chemical composition of extracted dried olive pomaces containing two and three phases,» *Food Biotechnology*, pp. 11, 273–291, 1997.
- [21] B. P. M. & G. W. A. Lapornik, «Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvent and extraction time,» *Journal of Food Engineering*, pp. 71, 214–222, 2005.
- [22] B. E. J. B. A. E. J. L. & P. N. L. Richter, «Accelerated solvent extraction: a technique for sample preparation,» *Analytical Chemistry*, pp. 68, 1033–1039, 1996.
- [23] V. Pitozzi, M. Jacomelli, D. Catelan, M. Servili, A. Taticchi, A. Biggeri, P. Dolara e Giovannelli, «Long-term dietary extra-virgin olive oil rich in polyphenols reverses age-related dysfunctions in motor coordination and contextual memory in mice: Role of oxidative stress,» *Rejuvenation Res.*, pp. 15, 601–612, 2012.
- [24] S. Rigacci, V. Guidotti, M. Bucciantini, D. Nichino, A. Relini, A. Berti e M. Stefani, «A β (1–42) aggregates into non-toxic amyloid assemblies in the presence of the natural polyphenol oleuropein aglycon,» *Curr. Alzheimer Res.*, pp. 8, 841–852, 2011.
- [25] S. Cicerale, X. Conlan, A. Sinclair e R. Keast, «Chemistry and health of olive oil phenolics,» *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, pp. 49, 218–236, 2008.
- [26] L. Di Renzo, P. Gualtieri, L. Romano, G. Marrone, A. Noce, A. Pujia, M. Perrone, V. Aiello, C. Colica e D. Lorenzo, «A. Role of personalized nutrition in chronic-degenerative diseases,» *Nutrients*, pp. 11, 1707, 2019.
- [27] C. Benziger, G. Roth e A. Moran, «The global burden of disease study and the preventable burden of NCD,» *Glob. Heart*, pp. 11, 393–397, 2016.
- [28] A. Noce, G. Marrone, S. Urciuoli, F. Di Daniele, M. Di Lauro, A. Pietroboni Zaitseva, N. Di Daniele e A. Romani, «Usefulness of extra virgin olive oil minor polar compounds in the management of chronic kidney disease patients,» *Nutrients*, pp. 13, 581, 2021.
- [29] EFSA, «Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to polyphenols in olive and protection of LDL particles from oxidative damage maintenance of normal blood HDL cholesterol concentrations, maintenance of normal blood pressure.,» *pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006.*, 2019.
- [30] D. Tousoulis, M. Charakida e C. Stefanadis, «Endothelial function and inflammation in coronary artery disease,» *Heart*, pp. 92, 441–444, 2006.
- [31] A. Boss, K. Bishop, G. Marlow, M. Barnett e L. Ferguson, «Evidence to support the Anti-Cancer effect of olive leaf extract and future Directions,» *Nutrients*, pp. 8, 513, 2016.
- [32] R. Sender, S. Fuchs e R. Milo, «Are We Really Vastly Outnumbered? Revisiting the Ratio of Bacterial to Host Cells in Humans,» *Cell.*, pp. 164, 337–340, 2016.
- [33] A. De Lorenzo, A. Noce, E. Moriconi, T. Rampello, G. Marrone, N. Di Daniele e V. Rovella, «Syndrome (Male Obesity Secondary Hypogonadism): Clinical Assessment and Possible Therapeutic Approaches,» *Nutrients*, pp. 10, 474, 2018.
- [34] B. C., «The elephant in the room: healthy brains in later life, epidemiology and public health.,» *Nat Rev Neurosci*, p. 8:233–239, 2007.
- [35] L. L. F. L. e. a. Lobo A, «Prevalence of dementia and major subtypes in Europe: a collaborative study of population-based cohorts. Neurologic Diseases in the Elderly Research Group,» *Neurology*, p. 54:54–59, 2000.
- [36] C. C. D. A. e. a. Solfrizzi V, «Lifestyle-related factors in predementia and dementia syndromes,» *Expert Rev Neurother*, p. 8:133–158, 2008.
- [37] D. James, S. Devaraj, P. Bellur, S. Lakkanna, J. Vicini e S. Boddupalli, «Novel concepts of broccoli sulforaphanes and disease: Induction of phase II antioxidant and detoxification enzymes by enhanced-glucoraphanin broccoli,» *Nutr. Rev.*, pp. 70, 654–665, 2012.
- [38] C. Bartheld, J. Bahney e S. Herculano-Houzel, «The search for true numbers of neurons and glial cells in the human brain: A review of 150 years of cell counting,» *J. Comp. Neurol.*, pp. 524, 3865–3895, 2016.
- [39] N. Baumann e D. Pham-Dinh, «Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system,» *Physiol. Rev*, pp. 81, 871–927, 2001.
- [40] V. Cheli, D. Santiago González, V. Spreuer e P. Paez, «Voltage-gated Ca²⁺ entry promotes oligodendrocyte progenitor cell maturation and myelination in vitro,» *Exp. Neurol*, pp. 265, 69–83, 2015.
- [41] M. Sofroniew e H. Vinters, «Astrocytes: Biology and pathology,» *Acta Neuropathol*, pp. 119, 7–35, 2010.

- [42] P. Ballabh, A. Braun e M. Nedergaard, «The blood-brain barrier: An overview: Structure, regulation, and clinical implications,» *Neurobiol. Dis.*, pp. 16, 1–13, 2004.
- [43] L. Pellerin e P. Magistretti, «Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: A mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization,» *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, pp. 91, 10625–10629, 1994.
- [44] N. Bazargani e D. Attwell, «Astrocyte calcium signaling: The third wave,» *Nat. Neurosci.*, pp. 19, 182–189, 2016.
- [45] P. Tvrđik e M. Kalani, «In vivo imaging of microglial calcium signaling in brain inflammation and injury,» *Int. J. Mol. Sci.*, p. 18, 2017.
- [46] M. Bock, N. Wang, E. Decrock, M. Bol, A. Gadicherla, M. Culot, R. Cecchelli, G. Bultynck e L. Leybaert, «Endothelial calcium dynamics, connexin channels and blood-brain barrier function,» *Prog. Neurobiol.*, pp. 108, 1–20, 2013.
- [47] J. Smolders, K. Heutinck, N. Fransen, E. Remmerswaal, P. Hombrink, I. ten Berge, R. van Lier, I. Huitinga e J. Hamann, «Tissue-resident memory T cells populate the human brain,» *Nat. Commun.*, pp. 9, 4593, 2018.
- [48] I. Bezprozvanny, «Calcium signaling and neurodegenerative diseases,» *Trends Mol Med* 15 (2009) 89–100, pp. 15–89–100, 2009.
- [49] Z. Khachaturian, «Hypothesis on the regulation of cytosol calcium concentration and the aging brain,» *Neurobiol. Aging*, pp. 8-345–346, 1987.
- [50] C. F. C. D. G. F. S. M. A. U. S. C. R. S.K. Danoff, «Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors: distinct neuronal and nonneuronal forms derived by alternative splicing differ in phosphorylation,» *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, pp. 88- 2951–2955, 1991.
- [51] Y. K. G. C. L. R. N. N. L. R. R. E. N. P. Bano D, «Cleavage of the plasma membrane Na⁺/Ca²⁺ exchanger in excitotoxicity,» *Cell.*, pp. 120(2):275-85, 2005.
- [52] S. S. H. A. H. S. S. J. C. K. C. G. S. D. Yacoubian TA, « Differential neuroprotective effects of 14-3-3 proteins in models of Parkinson's disease,» *Cell Death Dis*, p. 1:e2, 2010.
- [53] B. P. W. D. Brandon M, «Mitochondrial mutations in cancer,» *Oncogene*, pp. 25(34):4647-62, 2006.
- [54] C. P. e. a. Takahashi A, «Measurement of intracellular calcium,» *Physiol Rev*, p. 79:1089–1125, 1999.
- [55] L. SA, «NMDA receptor activity regulates transcription of antioxidant pathways,» *Nat Neurosci*, pp. 11(4):381-2, 2008.
- [56] MattsonMP, «Excitotoxic and excitoprotective mechanisms: abundant targets for the prevention and treatment of neurodegenerative disorders,» *Neuromolecular Med*, p. 3:65–94, 2003.
- [57] S. R. D. T. R. B. F. S. F. P. S. M. E. Averna M, «Calpain-mediated activation of NO synthase in human neuroblastoma SK-N-BE cells,» *J Neurochem*, p. 110:412–421, 2009.
- [58] S. R. A. G. Adebayo OL, «Protective roles of selenium and zinc against postnatal protein-undernutrition-induced alterations in Ca²⁺-homeostasis leading to cognitive deficits in Wistar rats,» *Int J Dev Neurosci*, p. 43:1–7, 2015.
- [59] T. V. L. H. W. W. C. J. Goll DE, «The calpain system,» *Physiol Rev*, p. 83:731–801, 2003.
- [60] P. M. K. P. D. R. S. P. Mehta A, «Excitotoxicity: bridge to various triggers in neurodegenerative disorders,» *Eur J Pharmacol*, pp. 698(1-3):6-18, 2013.
- [61] G. D. D. C. B. D. F.-M. E. F. E. T. J. X. D. X. S. N. D. C. E. N. P. Schwab BL, « Cleavage of plasma membrane calcium pumps by caspases: a link between apoptosis and necrosis,» *Cell Death Differ*, pp. 9(8):818-31, 2002.
- [62] C.-M. C. K. M. B.-A. Y. Dessi F, « Glutamate induced neuronal death is not a programmed cell death in cerebellar culture,» *J. Neurochem.*, pp. 60(5):1953-5, 1993.
- [63] J. M. J. S. K.A. Christensen, «pH-dependent regulation of lysosoma calcium in macrophages,» *J. Cell Sci.*, pp. 115- 599–607., 2002.
- [64] R. Nixon, «Autophagy, amyloidogenesis and Alzheimer disease,» *J. Cell Sci.*, pp. 120- 4081–4091, 2007.
- [65] P. N. G. J. T. N. C. Mauvezin, «Autophagosome–lysosome fusion is independent of V-ATPase-mediated acidification,» *Nat. Commun.*, pp. 6-7007, 2015.
- [66] U. G. Y. Z. W. S. S. J. A. D. R. M. J. Y. H. S. L. D.] X. Tian, «A voltage-gated calcium channel regulates lysosomal fusion with endosomes and autophagosomes and is required for neuronal homeostasis,» *PLoS Biol.*, pp. 13-1002103, 2015.
- [67] J. L. A. K. S. L. S. O. R. N. D.M. Wolfe, « Autophagy failure in Alzheimer's disease and the role of defective lysosomal acidification,» *Eur.J. Neurosci.*, pp. 37- 1949–1961, 2013.

- [68] O. C. P. C. Ferreiro E, «The release of calcium from the endoplasmic reticulum induced by amyloid-beta and prion peptides activates the mitochondrial apoptotic pathway,» *Neurobiol Dis.*, pp. 30:331-342, 2008.
- [69] O. J. Rothman SM, «Excitotoxicity and the NMDA receptor - still lethal after eight years,» *Trends Neurosci*, pp. 18:57-8, 1995.
- [70] M. Mattson, «Calcium and neurodegeneration,» *Aging Cell*, pp. 6:337-350, 2007.
- [71] Y. K. G. C. L. R. R. N. N. L. R. R. E. N. P. Bano D, «Cleavage of the plasma membrane Na⁺/Ca²⁺exchanger in excitotoxicity,» *Cell*, pp. 120(2):275-85, 2005.
- [72] S. H. N. S. S. H. I. S. Y. M. W. M. H. K. I. M. Okubo Y, « Imaging extrasynaptic glutamate dynamics in the brain,» *Proc Natl Acad Sci U S A*, pp. 107(14):6526-31, 2010.
- [73] a. S. A. Wollmuth LP, «Structure and gating of the glutamate receptor ion channel,» *Trends Neurosci*, p. 27: 321-328, 2004.
- [74] N. J. Paoletti P, «NMDA receptor subunits: function and pharmacology,» *Curr Opin Pharmacol*, pp. 7(1):39-47, 2007.
- [75] B. H. Hardingham GE, «Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders.,» *Nat Rev Neurosci*, pp. 11(10):682-96, 2010.
- [76] H. G. Soriano FX, «Compartmentalized NMDA receptor signalling to survival and death,» *J Physiol*, pp. 584(Pt 2):381-7, 2007.
- [77] X. R. H. S. e. a. Hou S, «Reciprocal regulation of the Ca²⁺and H⁺ sensitivity in the SLO1 BK channel conferred by the RCK1 domain,» *Nat Struct Mol Biol*, p. 15:403-410, 2008.
- [78] G. MD., «Neuroprotection for ischemic stroke: past, present and future,» *Neuropharmacology*, p. 55: 363-389, 2008.
- [79] a. S. A. Wollmuth LP, «Structure and gating of the glutamate receptor ion channel,» *Trends Neurosci*, p. 27: 321-328, 2004.
- [80] L. S. Chen HS, «The chemical biology of clinically tolerated NMDA receptor antagonists,» *J Neurochem*, pp. 97(6):1611-26, 2006.
- [81] R. J. Maragakis NJ, « Mechanisms of Disease: astrocytes in neurodegenerative disease,» *Nat Clin Pract Neurol*, pp. 2(12):679-89., 2006.
- [82] T. L. Ikonomidou C, « Why did NMDA receptor antagonists fail clinical trials for stroke and traumatic brain injury?,» *Lancet Neurol*, pp. 1(6):383-6, 2002.
- [83] D. T. R. S. F. M. R. P. S. M. E. Averna M, «Age-dependent degradation of calpastatin in kidney of hypertensive rats,» *J Biol Chem.*, p. 276(42):38426-38432, 2001.
- [84] G. G., «A neutral, calcium-activated proteinase from the soluble fraction of rat brain,» *J Biol Chem*, p. 239:149-155, 1964.
- [85] S. I. M. M. C. L. D. C. Curcio M, «Calpains and neuronal damage in the ischemic brain: the swiss knife in synaptic in jury,» *Prog Neurobiol*, pp. 143:1-35, 2016.
- [86] B. M. M. C. L. D. B. V. G. B. G. Singh R, «Calpain 5 is highly expressed in the central nervous system (CNS) carries dual nuclear localization signals, and is associated with nuclear promyelocytic leukemia protein bodies,» *J Biol Chem*, pp. 289:19383-19394, 2014.
- [87] S. H. a. S. K., «The structure of calpain,» *J. Biochem.*, p. 129: 653-664, 2001.
- [88] H. S. K. Y. a. S. H. Suzuki K., «Structure, activation, and biology of calpain,» *Diabetes*, pp. 53:12-18, 2004.
- [89] T. V. L. H. W. W. C. J. Goll DE, «The calpain system,» *Physiol Rev*, p. 83(3):731-801, 2003.
- [90] G. R. P. a. J. G. V., «Oxidative stress inhibits calpain activity in situ,» *Biol. Chem.*, p. 273: 13331-13338, 1998.
- [91] G. A. C. J. J. Z. a. W. A. Shiraha H., «Activation of m-calpain (calpain II) by epidermal growth factor is limited by protein kinase A phosphorylation of m-calpain,» *Mol. Cell. Biol.*, p. 22: 2716-2727, 2002.
- [92] S. H. Ono Y, «Calpains: an elaborate proteolytic system,» *Biochim Biophys Acta.*, p. 1824(1):224-236, 2012.
- [93] G. D. a. S. M. E., « Real time imaging of calcium induced localized proteolytic activity after axotomy and its relation to growth cone formation,» *Neuron*, p. 20: 1123-1135, 1998.
- [94] L. G. a. B. M., «Brain spectrin, calpain and long-term changes in synaptic efficacy,» *Brain Res. Bull*, p. 18:809-815, 1987.
- [95] C. E. a. M. M., «Calpain, a protease in search of a function?,» *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, p. 247:193-203, 1998.

- [96] W. K. K. W., «Calpain and caspase: can you tell the difference?», *Trends Neurosci*, p. 23: 20–26, 2000.
- [97] M. V. T. a. S. E., «Selective solubilization of a protein component of the red cell membrane», *Science*, pp. 159-203–204, 1968.
- [98] Z. I. S. a. K. R. R. Goodman S. R., «Identification of a spectrin-like protein in nonerythroid cells.», *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, p. 78: 7570–7574, 1981.
- [99] B. B. E. a. B. D. Shotton D., «The molecular structure of human erythrocyte spectrin. Biophysical and electron microscopic studies», *J. Mol. Biol.*, p. 131: 303–329, 1979.
- [100] D. D. E. a. C. P., «New insights into red cell network structure, elasticity and spectrin unfolding – a current review», *Cell. Mol. Biol. Lett.*, p. 6: 593–606, 2001.
- [101] B. V. a. B. A. J., «Spectrin and ankyrin-based pathways: metazoan inventions for integrating cells into tissues», *Physiol. Rev.*, p. 81: 1353–1392, 2001.
- [102] H. K. Floyd R., «Oxidative stress in brain aging. Implications for therapeutics of neurodegenerative diseases», *Neurobiol Aging.*, p. 23(5):795-807, 2002.
- [103] E.-S. G. M. G. V. P. L. G. B. M. Najm I., «Changes in polyamine levels and spectrin degradation following kainate-induced seizure activity: effect of difluoromethylornithine», *Exp. Neurol.*, p. 116:345–354, 1992.
- [104] V. P. L. G. a. B. M. Najm I., *J. Neurochem.*, p. 57: 1151–1158, 1991.
- [105] N. R. A., «Fodrin degradation by calcium-activated neutral proteinase (CANP) in retinal ganglion cell neurons and optic glia: preferential localization of CANP activities in neurons», *J. Neurosci*, p. 6: 1264–1271, 1986.
- [106] B. M. D. S. a. L. G. Seubert P., «Calmodulin stimulates the degradation of brain spectrin by calpain», *Synapse*, p. 1: 20–24, 1987.
- [107] C. D. E. a. M. J. S. Harris A. S., «The calmodulin-binding site in a-fodrin is near the calcium-dependant protease-I cleavage site», *J. Biol. Chem.*, pp. 263-15754–15761, 1989.
- [108] W. K. K. W., «Calpain and caspase: can you tell the difference?», *Trends Neurosci*, p. 23: 20–26, 2000.
- [109] C. C. D. G. S. B. Z. Z. a. M. J. S. Stabach P. R., «Site-directed mutagenesis of all spectrin at codon 1175 modulates its m-calpain susceptibility», *Biochemistry*, pp. 36:57-65, 1997.
- [110] H. A. S. a. M. J. S., «Calmodulin and calcium-dependent protease I coordinately regulate the interaction of fodrin with actin», *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, p. 87: 3009–3013, 1990.
- [111] L. J. O. M. J. M. W. B. M. a. L. G. Seubert P., «Stimulation of NMDA receptors induces proteolysis of spectrin in hippocampus», *Brain Res.*, p. 460:189–194, 1988.
- [112] T. S. P. G. Y. a. L. G. Bahr B. A., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, p. 273: 902–908, 1995.
- [113] S. T. C. G. C. A. A. a. L. G. Vanderklish P., «Proteolysis of spectrin by calpain accompanies thetburst stimulation in cultured hippocampal slices», *Brain Res.Mol. Brain Res.*, p. 32: 25–35, 1995.
- [114] J. I. Majno G., «Apoptosis, oncosis and necrosis. An overview of cell death», *Am. J. Pathol.*, p. 146: 3–15, 1995.
- [115] W. K. K. W., «Calpain and caspase: can you tell the difference?», *Trends Neurosci*, p. 23: 20–26, 2000.
- [116] V. P. a. B. B. A., «The pathogenic activation of calpain: a marker and mediator of cellular toxicity and disease states», *Int. J. Exp. Path.*, p. 81: 323–339, 2000.
- [117] N. Huaman-Castilla, M. Martinez-Cifuentes, C. Camilo, F. Pedreschi, M. Mariotti-Celis e J. Pèrez-Correa, «The impact of temperature and ethanol concentration on the global recovery of specific polyphenols in an integrated HPLC/RP process on Carménère pomace extracts», *Molecules*, pp. 24, 3145, 2019.
- [118] A. A. C. P. P. Bahar Aliakbarian, «Valorization of olive oil solid waste using high pressure–high temperature reactor», *Food Chemistry*, 2011.
- [119] M. P. A. A. C. E. M. G. D. A. S. N. L. F. O. A. M. S. C. R. D. T. P. P. a. M. A. Alice Franchi, «A Bioactive Olive Pomace Extract Prevents the Death of Murine Cortical Neurons Triggered by NMDAR Over-Activation», *Molecules*, 2020.
- [120] N. Huaman-Castilla, M. Martinez-Cifuentes, C. Camilo, F. Pedreschi, M. Mariotti-Celis e J. Pèrez-Correa, «The impact of temperature and ethanol concentration on the global recovery of specific polyphenols in an integrated HPLC/RP process on Carménère pomace extracts», *Molecules*, pp. 24, 3145, 2019.

- [121] A. C. a. A. F. Sikorski, «Spectrin and calpain: a 'target' and a 'sniper' in the pathology of neuronal cells,» *CMLS Cellular and Molecular Life Sciences*, 2005.
- [122] F. H. K. A. M. S. M. G. X. W. Yacoubou Abdoul Razak Mahaman, «Involvement of calpain in the neuropathogenesis of Alzheimer's disease,» *Wiley*, 2018.
- [123] A. A. C. P. P. Bahar Aliakbarian, «Valorization of olive oil solid waste using high pressure–high temperature reactor,» *Food Chemistry*, 2011.

