

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI GENOVA**



**SCUOLA DI SCIENZE MEDICHE E FARMACEUTICHE**

**Corso di Laurea Magistrale a Ciclo Unico in “Chimica e Tecnologia  
Farmaceutiche”**

Tesi di Laurea

**Acido ellagico e urolitine come modulatori del sistema noradrenergico**

**Relatore:**

Prof.ssa Anna Maria Pittaluga

**Candidata:**

Silvia Dogliolo

Anno accademico 2023-2024

# INDICE

Acronimi .....	3
1.Introduzione .....	4
2.L'acido ellagico.....	8
2.1 Fonti naturali di acido ellagico.....	8
2.2 Struttura e caratteristiche chimiche dell'acido ellagico .....	10
3.Le urolitine .....	12
3.1 Dall'acido ellagico alle urolitine.....	12
3.2 L'acido ellagico e le urolitine: l'attività cellulare e molecolare.....	15
4.Il sistema noradrenergico .....	20
5. I recettori $\alpha_2$ della noradrenalina .....	24
5.1 Caratterizzazione farmacologica e strutturale dei recettori $\alpha_2$ .....	24
5.2 Ruolo dei recettori $\alpha_2$ .....	26
6. Scopo della tesi sperimentale .....	29
7. Materiali e metodi .....	31
7.1 Animali.....	31
7.2 Preparazione di sinaptosomi ippocampali.....	31
7.3 Esperimento di rilascio di neurotrasmettitori da sinaptosomi in superfusione .....	33
7.3.1 Analisi statistica: esperimento di Rilascio .....	35
7.4 Analisi Western Blot .....	36
7.4.1 Analisi statistica: Western Blot .....	36
7.5 Prodotti chimici.....	37

8. Risultati e Discussione .....	38
8.1 Esistenza di autorecettori $\alpha_2$ presinaptici in terminazioni nervose di ippocampo di topo adulto e loro ruolo nel controllo della esocitosi di noradrenalina: caratterizzazione con clonidina e yohimbina.....	38
8.2 L'acido ellagico mima clonidina e inibisce la liberazione di noradrenalina indotta da stimolo depolarizzante in terminazioni nervose di ippocampo di topo adulto: effetto di yohimbina. ....	42
8.3 Effetto delle Urolitine A, B e C sulla liberazione di noradrenalina indotta da stimolo depolarizzante in terminazioni nervose di ippocampo di topo adulto: confronto con clonidina ed effetto di yohimbina. ....	45
9. Conclusioni e ipotesi future .....	49
Bibliografia .....	52

## **Acronimi**

cAMP= adenosina monofosfato ciclico

COX-2 = ciclossigenasi 2

DHA = acido docosaesenoico

EPA = acido eicosapentaenoico

IL-beta = interleuchina beta

iNOS = ossido nitrico sintasi inducibile

JAK/STAT = Janus Chinasi/ Proteine trasduttrici del segnale e attivatore della trascrizione

MAPK= protein-chinasi attivate da mitogeni

Nf-kB = fattore nucleare kB

NRF2 = fattore di trascrizione nucleare eritroide-2

PKA = protein-chinasi A

TNF-alfa = fattore di necrosi tumorale

## **1.Introduzione**

*“Lasciate che il cibo sia la vostra medicina e che la vostra medicina sia il cibo” –*

Ippocrate (V secolo a.C).

Quest frase, che sempre viene citata quando si parla di nutraceutica, serve soprattutto per ricordare che già nei tempi antichi veniva riconosciuto un ruolo fondamentale dell'alimentazione nel favorire il benessere delle persone ed aumentare la loro resilienza verso malattie e/o patologie acute / croniche.

Negli ultimi anni l'interesse per questo argomento è tornato alla ribalta anche trainato dal notevole interesse verso i prodotti di origine naturale sia in utilizzi dietetici che terapeutici. Purtroppo, l'interesse verso i prodotti naturali è spesso accompagnato da un sentimento di delusione / disinteresse per le terapie farmacologiche disponibili. I due atteggiamenti sono in un certo senso “pericolosi” e vanno monitorati per evitare un abuso di automedicazione con utilizzo non motivato a scopo pseudo-terapeutico di alimenti e contemporaneamente l'abbandono di terapie riconosciute ed efficaci necessarie per il controllo di condizioni patologiche acute / croniche conclamate.

Queste criticità impongono anche di definire l'efficacia e l'ambito di applicazione delle integrazioni dietetiche, e, contemporaneamente, di definire l'attività molecolare / cellulare dei principi attivi e dei preparati in utilizzo sia per chiarire con accuratezza gli effetti sia per evidenziare possibili effetti collaterali e avversi che potrebbero manifestarsi nell'individuo.

Vi è quindi la necessità di approfondire la conoscenza dell'impatto di alimenti, integratori, principi attivi nei mammiferi, con particolare attenzione a possibili azioni sia cellulari che molecolari sia in un'ottica salutistica che preventiva.

Non vi è dubbio che in questo contesto vi sia anche la speranza di individuare molecole e aggregati molecolari naturali che possano rappresentare possibili candidati per lo sviluppo di molecole terapeutiche (1).

Questa speranza è però accessoria alla necessità primaria di definire l'ambito di applicazione e la potenziale tossicità di una integrazione dietetica.

In questo contesto è nato il termine “nutraceutico”, un neologismo derivato dall'unione di due parole: “nutrizione” e “farmaceutico”. Coniato circa 30 anni fa, questo resta un termine che nasconde ad oggi ancora molte insidie; in quanto non è stata proposta e adottata dalla comunità scientifica una sua definizione univoca e appropriata. A rendere ancora maggiormente critica la situazione, aumentando la “zona grigia” in cui si inseriscono i nutraceutici, vi è la carenza di chiare indicazioni normative riguardanti la definizione delle caratteristiche, degli effetti e dei parametri di sicurezza ed attività di questa categoria di prodotti.

Volendo fare un riferimento ad una definizione che sia proposta da un ente abilitato per fare questo, possiamo fare riferimento a quanto definito dalla la Società Italiana di Farmacologia, che ha dichiarato che con il termine “nutraceutico” si intende *“una serie di prodotti il cui scopo principale è quello di favorire i processi fisiologici dell'organismo. Sono sostanze perlopiù di origine naturale, in particolare vegetale, ma si possono trovare anche vitamine, sali minerali e altre sostanze di sintesi chimica. Nella maggior parte dei casi non possono essere assimilati ai farmaci perchè le azioni che svolgono sono generalmente molto blande e non sufficienti a risolvere eventuali patologie. Vanno però assunti con molta attenzione perchè possono causare effetti avversi e molti di essi possono interferire con l'azione dei comuni farmaci”* (2).

Particolarmente importante, per spiegare la complessità e il vuoto regolatorio presente, è il fatto che i “nutraceutici” possono essere commercializzati come integratori

alimentari, alimenti, o alimenti a fini medici speciali. Questo aspetto rende ancora più ardua la possibilità di conciliare il concetto di alimentazione con quello di intervento salutistico ed espone a criticità. Infatti, l'efficacia salutistica deve essere provata in maniera corretta, con studi scientificamente controllati che seguano linee guida condivise a livello comunitario. Non si deve negare che gli articoli scientifici dedicati all'argomento siano in forte crescita, ma questa materia necessita di un'analisi corretta e precisa, onde evitare falsi entusiasmi e conclusioni non corrette(3).

In generale, nella categoria dei nutraceutici sono inclusi diversi prodotti contenenti fibre, amminoacidi, minerali, vitamine e minerali(4). Questi possono essere ottenuti da parti di pianta o parti di piante, da tessuti sia animali che vegetali, da minerali o da scarti di lavorazione per la produzione di cibi (l'estrazione del succo dagli agrumi) o di altri prodotti. L'eterogeneità delle fonti e dei processi di lavorazione è a sua volta un'ulteriore variabile che deve essere considerata e che può aumentare la criticità del prodotto è data dalle tecniche estrattive / di concentrazione applicate nella lavorazione della droga primaria(5).

Tra i più noti principi attivi alle cui fonti si attribuisce attività nutraceutica abbiamo gli omega-3, EPA e DHA, le cui fonti più comuni sono i pesci (pesce azzurro, salmone, tonno) e alcune alghe marine (6). Gli omega-3 sono composti che appartengono al gruppo degli acidi grassi o lipidi. Vengono definiti comunemente "grassi buoni", per le loro proprietà benefiche e essenziali poiché l'organismo non è in grado di produrli e per questo motivo devono necessariamente essere assunti attraverso la dieta. Questi prodotti sono noti avere azione antiinfiammatoria ed è riconosciuta la loro capacità in supplementazione dietetica di contribuire all'efficienza della funzione cardiaca. Inoltre, alcuni dati sembrano supportare l'ipotesi che il DHA possa partecipare allo sviluppo e al mantenimento delle funzioni cerebrali.

Un altro gruppo di nutraceutici sono i flavonoidi, componenti principali delle piante, presenti in ogni parte incluse le infiorescenze, le foglie e il tronco nonché la parte radicale, cui conferiscono caratteristiche organolettiche e visive alle piante stesse (7).

Tra le proprietà benefiche di questi composti si riconoscono attività antiinfiammatorie, antiossidanti, e per questo molti di questi prodotti sono suggeriti per favorire il benessere cardiovascolare (8).

L'attività antiossidante è caratteristica anche del co-enzima Q10 e degli isoflavonoidi. Il co-enzima Q10 si trova sia nei cibi (carne, in particolare nel fegato, pesci come tonno e sardine, cereali, spinaci, germe di grano e frutta secca) sia viene prodotto dalle cellule, ragione per cui è definito "vitamino-simile"(9).

Gli isoflavoni sono un altro tipo di nutraceutici impiegati non solo per l'azione antiossidante ma anche per l'attenuazione dei sintomi della menopausa e per il mantenimento del benessere cardiaco e delle ossa; appartengono alla classe dei fitoestrogeni e si possono trovare nelle piante della famiglia delle leguminosae<sup>1</sup> (10) (8).

Un ambito speciale è poi quello dei probiotici che contribuiscono al mantenimento della salute intestinale e al buono stato del sistema immunitario (8).

Qui troviamo batteri, che appartengono alla famiglia dei Lactobacilli e dei Bifidobatteri, e lieviti, come il *Saccharomyces boulardii* che con il loro tropismo per la flora batterica intestinale possono ricolonizzare l'intestino e favorire lo sviluppo di una flora che abbia un impatto positivo nei meccanismi intestinali che controllano l'ADME. Gli alimenti fermentati sono la classe all'interno dei quali si trovano questi nutraceutici (11). Sempre con attività antiinfiammatoria vi sono sali, quali i sali di selenio, un componente che oltre all'azione antiossidante e di controllo della funzione del sistema immunitario è importante per il

---

<sup>1</sup> Soia, fagioli e lenticchie

corretto funzionamento della tiroide (8). Più comunemente si trova nel pesce, nelle frattaglie, nei cereali e nelle verdure (12).

Tra le sostanze che rientrano nei nutraceutici, è presente anche l'acido ellagico sostanza su cui si è basato il lavoro di tesi sperimentale da me svolto; in particolare sui possibili effetti molecolari dell'acido ellagico e delle urolitine, prodotti del suo metabolismo, e sulle loro potenziali azioni a livello del sistema nervoso centrale (1,13).

## **2.L'acido ellagico**

### **2.1 Fonti naturali di acido ellagico**

Tra i diversi tipi di frutta (fragole, lamponi, more), erbe (camellia sinensis), semi e noci (mandorle, arachidi, pistacchi), il melograno è una delle fonti da cui si estrae maggiormente l'acido ellagico(1).

Oggi, la coltivazione della pianta di melograno, originaria del Medio Oriente e del Nord Africa, viene praticata in molte regioni tropicali e subtropicali <sup>2</sup>e da questa attività si ricavano ogni anno circa 2 milioni di tonnellate di frutti all'anno(14).

Questa pianta mostra una notevole capacità di adattamento a condizioni ambientali molto varie, resiste alla mancanza di acqua e a sbalzi di temperatura significativi e tutto questo è possibile grazie a sue particolari caratteristiche che determinano la sua significativa resilienza (15).

Il melograno gode di un elevato interesse economico per la sua adattabilità e per la vasta applicabilità a livello industriale; infatti, viene consumato come tale o sotto forma di succo, ottenuto dalla premitura degli arilli<sup>3</sup>. Dal frutto si ottiene anche l'olio, prodotto molto utilizzato (14).

---

<sup>2</sup> in particolare, Iran, India, Cina, Turchia, Stati Uniti, Spagna, Sud Africa, Perù, Cile e Argentina

<sup>3</sup> La parte esterna del seme

Recentemente si è cercato di valorizzare i prodotti di scarto della lavorazione, in particolare la buccia del frutto, dal momento che le parti non edibili contengono una buona quantità di composti bioattivi rispetto al frutto (14).

Già nel passato, i popoli dell'oriente e dell'Africa riconoscevano l'elevato valore nutrizionale di questa pianta (14).

In particolare, grazie alle conoscenze acquisite nel tempo, il potere nutrizionale è stato attribuito ai polifenoli e, specificamente, alla classe di composti preponderante all'interno del frutto ed in genere nella pianta che sono i tannini idrolizzabili, tra i quali l'acido ellagico, la punicalgina e l'acido gallagico (16,17).

Il colore rosso caratteristico del melograno maturo è dovuto alla presenza di antocianine mentre il giallo della buccia è dato dagli ellegitannini, che costituiscono il 70% dei polifenoli estratti e responsabili delle proprietà antiossidanti (14).

Un aspetto interessante è che l'efficacia antiossidante del frutto di melograno e dei suoi derivati, si è mostrata nettamente superiore quando confrontata con quelle di alcuni prodotti come il vino rosso e il tè verde, noti per questa proprietà (14).

Si deve tenere in considerazione che, in base alla parte del frutto e della pianta, la procedura di estrazione porta al recupero di principi attivi caratterizzati da una variabilità sia qualitativa che quantitativa. Inoltre, se si confronta il valore nutrizionale del succo con quello dell'omogenato è possibile osservare che nel secondo le proprietà antiossidanti sono 20 volte superiori, grazie alla presenza preponderante di diversi composti attivi; che nel caso del succo corrispondono alle antocianine, mentre nell'omogenato constano di tannini idrolizzabili e punicalgina (18).

## 2.2 Struttura e caratteristiche chimiche dell'acido ellagico

All'interno della categoria dei polifenoli ci sono i tannini, sostanze debolmente acide caratterizzate da una struttura amorfa, la cui caratteristica più nota è il sapore astringente, dovuto in gran parte dalla capacità di interagire con le proteine salivari, ricche di prolina (13).

I tannini vengono suddivisi in tannini idrolizzabili, classe a cui appartengono gli ellegitannini e i gallotannini, e i tannini condensati, polimeri di flavon-3-oli, anche definiti proantocianidine (13).

Gli ellegitannini rappresentano circa il 20% dei metaboliti secondari delle piante e nella cellula vegetale si possono trovare sia nel citoplasma che nel vacuolo cellulare (4).

Sono composti C-glicosidici o O-glicosidici costituiti da una o più unità di acido gallico e acido esaidrossifenico uniti tramite legame estereo con un residuo zuccherino, prevalentemente il  $\beta$ -D-glucosio (1,13,19).

Il peso molecolare, compreso tra 300 e i 20.000 Da, dipende dal numero di unità monomeriche da cui sono composti; infatti, possono presentarsi, oltre che come monomeri, anche come dimeri e oligomeri (13).

La molecola dell'acido ellagico, scoperta nel 1831 da Braconnot<sup>4</sup> costituisce la componente agliconica degli ellegitanini, dai quali viene ottenuta per idrolisi con la produzione di due prodotti intermedi, la punicalgina<sup>5</sup> e l'acido gallagico (1,19).

L'acido ellagico può anche essere ottenuto tramite una reazione di lattonizzazione spontanea dell'acido esaidrossifenico ed è caratterizzato dalla struttura di un cromene-dione che sembra essere un dimero dell'acido gallagico (20).

---

<sup>4</sup> Chimico francese (1780-1855)

<sup>5</sup> Grossa molecola formata da acido gallagico ed ellagico uniti da un'unità di glucosio

Per quanto concerne le proprietà-chimico fisiche, esso si presenta come una polvere di colore giallo e inodore che si comporta come un acido debole, termostabile, come è possibile evincere dal punto di fusione di 450°C e da quello di ebollizione di 796,5°C. Inoltre, il peso molecolare è di 302,194g/mol, la densità è di 1,667 a 18°C e la pressione di vapore è di  $2,81 \times 10^{-15}$  a 25°C (13).

La molecola, in quanto anfifilica, è costituita da una parte lipofila, che comprende 4 anelli aromatici a sei termini, e un dominio idrofilo, costituito da quattro gruppi idrossile e due lattoni che rispettivamente prendono parte a legami a idrogeno e agiscono da accettori di elettroni (19).

Circa la reattività chimica dell'acido ellagico, esso si presenta incompatibile con forti agenti riducenti, prende parte a reazioni acido-base e può essere facilmente sottoposto a solfonazione e nitratura (13).

Per quanto riguarda la solubilità, è debolmente solubile in acqua e alcol e insolubile in etere, mentre è solubile in dimetilsolfossido molto diluito, in basi e in piridina, ma se disciolto nell'ultimo solvente perde le sue proprietà antiossidanti (13).

Dal momento che la solubilità concorre a determinare la biodisponibilità della molecola, è importante valutare due fattori fortemente influenzanti quali il mezzo di dissoluzione e la forma sotto la quale si presenta l'acido ellagico; infatti, sia nelle preparazioni che nelle parti vegetali può trovarsi in forma libera, negli ellegitannini o nei polimeri (13).

A tal proposito sono stati studiati in ambito farmaceutico diversi solventi per capire come ottenere una migliore somministrazione della molecola. Tra i molti disponibili, gli studiosi hanno osservato che l'N-metil-2- pirrolidone ne migliora la penetrazione transdermica, il polietilen glicole 400 è indicato per le preparazioni iniettabili e la trietanolamina, è un buon veicolo per le formulazioni iniettabili e per via topica (1).

## **3.Le urolitine**

### **3.1 Dall'acido ellagico alle urolitine**

Nonostante l'elevato contenuto di ellegitannini in alcuni alimenti, i livelli ematici di acido ellagico, rinvenuti successivamente alla sua assunzione, sono molto bassi se non addirittura inesistenti; questo a causa della bassa biodisponibilità della molecola. Infatti, gli ellegitannini sono molecole che in virtù delle loro proprietà chimiche si presentano stabili in presenza del pH acido dello stomaco e chelano facilmente ioni metallici, due condizioni che fanno sì che solo una piccola quota della frazione totale riesca ad essere assorbita a livello dell'intestino tenue (13,21).

Nella stessa maniera, l'acido ellagico libero è stabile in ambiente acido il suo assorbimento avviene prevalentemente nello stomaco, ma come nel caso degli ellagitannini, questo evento è limitato dalla scarsa solubilità e dalle proprietà chimiche (bassa solubilità in acqua e forte legame con DNA proteine) dell'acido che ne riducono la biodisponibilità.

Queste constatazioni fanno sì che, volendo sfruttare le attività nutraceutiche di questa sostanza, si rende necessario mettere a punto formulazioni innovative che permettano di migliorarne la biodisponibilità (13).

Un altro aspetto molto importante in grado di influenzare il profilo farmacocinetico degli ellagitannini e dell'acido ellagico è rappresentato dal metabolismo ad opera di enzimi epatici e del microbiota intestinale (13,21).

Negli anni più recenti, è emerso il ruolo fondamentale svolto dalla flora batterica intestinale nel concorrere a mantenere lo stato di salute del paziente e nell' influenzare i profili farmacocinetici e la biodisponibilità di principi attivi di prodotti naturali ed alimenti importanti per la salute dell'individuo. La fermentazione di nutrienti è considerata uno dei principali processi di produzione di metaboliti rilevanti per la salute dell'individuo. I

meccanismi e i prodotti derivanti dall'azione batterica non sono eventi comuni a tutti gli individui ma piuttosto è stato osservato che la loro produzione e distribuzione è strettamente individuale perché dipende dalla elevata variabilità interindividuale e intra-individuale del microbioma ed in genere del patrimonio batterico dell'individuo (13,22).

Questa osservazione aumenta la criticità e l'eterogeneità delle risposte del paziente alla somministrazione di nutraceutici.

Il metabolismo dei polifenoli ad opera degli enzimi batterici (come esterasi, glucosidasi, deidrossilasi, demetilasi e decarbossilasi) porta alla formazione di PPMs (metaboliti microbici dei polifenoli), piccole molecole, tra cui acidi fenolici e acidi grassi a catena corta; in questa classe sono inclusi l'acido ellagico e i suoi derivati (1).

L'acido ellagico e gli ellegitannini sono metabolizzati ad urolitine, derivati del dibenzopirano-6-one, che per il peso molecolare di 212-228 Da, sono le molecole più grosse tra i PPMs (21,23).

Recentemente sono state caratterizzate le due specie batteriche capaci di convertire l'acido ellagico in urolitine, i "Gordonibacter" e gli "Ellagibacter" (23).

Questi batteri, tramite il loro correndo enzimatico fanno in modo che si verifichi una serie di reazioni a cascata. Il primo passaggio metabolico di questa catena metabolica è la conversione dell'acido ellagico in Uro-M5 (pentaidrossi urolitine) ad opera di lattonasi e decarbossilasi. I prodotti subiscono poi successive reazioni di deidrossilazione che portano alla produzione di Uro-D, Uro-E, Uro-M6 (tetraidrossi urolitine) e Uro-C, Uro-M7, UroG (triidrossi urolitine) e, alla fine, si formano Uro-A e isoUro-A (diidrossi urolitine) e Uro-B (monoidrossi urolitine) (24).

I diversi prodotti di queste reazioni sono stati utilizzati per individuare tre diverse popolazioni nei pazienti trattati, corrispondenti ai tre principali metabotipi<sup>6</sup> delle urolitine, indicati con i termini UM O, UM A e UM B (25).

In particolare: il fenotipo UM O è capace di produrre solo il precursore Uro-M5, che non viene assorbito a livello intestinale, il fenotipo UM A è in grado di sintetizzare diversi intermedi della via ma l'unica assorbita è l'urolitina A la quale, per altro, rappresenta il prodotto principale rinvenuto nelle urine dopo l'assunzione di acido ellagico ed ellegitannini. Il fenotipo, UM B è caratterizzato dalla produzione di urolitine A e/o B e isoA, tra le quali l'urolitina B è la sola assorbita (23,25).

E' importante sottolineare che comunque il fenotipo dei pazienti è altamente variabile, in quanto le sue caratteristiche dipendono dalla composizione del microbiota intestinale; a tal proposito, la specie "Gordonibacter" è associata al metabotipo UM-A, mentre la specie "Ellagibacter" al metabotipo UM-B, e sembra non essere influenzato da età, genere, BMI o localizzazione geografica (23,25,26).

Nel plasma, la concentrazione massima di urolitine si raggiunge dopo 24-48 ore, dall'assunzione dell'alimento ricco di acido ellagico, e questi livelli rimangono più o meno stabili nel plasma e nelle urine fino a 72 ore; inoltre, questi composti sono rilevati nelle feci, negli organi e nei fluidi biologici rispettivamente come agliconi e derivati solfonati o glucuronidi (25).

---

<sup>6</sup> Fenotipi del metabolismo

### **3.2 L'acido ellagico e le urolitine: l'attività cellulare e molecolare**

Il nostro organismo è in grado di proteggersi dal danno da parte delle specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto<sup>7</sup>, tramite la produzione di molecole antiossidanti e sistemi di riparazione dei danni indotti dai radicali. Però, quando il sistema di difesa non è sufficiente si verifica una produzione eccessiva di questi intermedi reattivi con la conseguente manifestazione di stress ossidativo e infiammazione, ai quali, nei peggiori casi, conseguono danni alle macromolecole dell'organismo, condizioni che preludono e sono responsabili di patologie e disturbi degenerativi (27).

In qualità di sostanze antiossidanti, gli ellegitannini contribuiscono al miglioramento dello stato di salute degli individui; questo aspetto è stato collegato all'acido ellagico, ovvero al frammento bioattivo al quale vengono riconosciute, inoltre, proprietà anti-angiogenetiche, anti-aterogenetiche, anti-carcinogenetiche e antitrombotiche (13,28).

La capacità di inibizione dei radicali liberi e l'azione antiossidante sono le caratteristiche che rendono più interessante l'acido ellagico, rivelatosi più efficace della vitamina E e della melatonina per il potere antiossidante (29).

In aggiunta a tale aspetto, le proprietà anti-radicaliche non vengono inficiate dal metabolismo, anche se è stato osservato in alcune condizioni sperimentali che l'efficienza d'azione aumenta per la produzione di metaboliti più efficaci dell'acido ellagico stesso; inoltre esso può essere rigenerato, in seguito alla reazione con i radicali liberi, così da poter mantenere le proprietà iniziali (30).

Riguardo al meccanismo tramite il quale l'acido ellagico contrasta lo sviluppo di radicali liberi, sono state proposte tre possibili alternative: trasferimento di un atomo di idrogeno,

---

<sup>7</sup> Sono normalmente prodotti dal metabolismo aerobico

trasferimento di un elettrone seguito dal protone, trasferimento sequenziale di protoni seguito dagli elettroni (30).

Nel contrastare il processo di ossidazione, favorito da metalli come il rame o il ferro, i composti fenolici, tra cui l'acido ellagico, agiscono anche come chelanti di questi elementi, riducendone la potenziale reattività (30).

A questo si aggiungono le evidenze di studi in cui l'acido ellagico si è mostrato capace di agire schermando il DNA, offrendo protezione nei confronti dello stress ossidativo, e di aumentare l'espressione di NRF2, un fattore di trascrizione sensibile alle reazioni di ossidoriduzione (30).

L'acido ellagico gioca anche un'importante azione antinfiammatoria di cui è stato individuato il meccanismo cellulare: inibisce 3 vie del segnale responsabili della risposta infiammatoria (Nf-kB<sup>8</sup>, MAPKs<sup>9</sup> e JAK/STAT<sup>10</sup>), quindi previene l'espressione di geni a valle della via e blocca il rilascio di fattori pro-infiammatori come TNF-alfa, IL-1beta, iNOS, ecc (29)

Talvolta, l'infiammazione e lo stress ossidativo compiono un'azione chiave nel determinare l'insorgenza di patologie neurodegenerative, tra cui ad esempio il morbo di Alzheimer e il morbo di Parkinson. In virtù delle proprietà antinfiammatorie e antiossidanti, l'acido ellagico è stato considerato come un possibile adiuvante nelle terapie contro la neurodegenerazione che caratterizza questa patologia (29)

Il morbo di Alzheimer, una tra le più comuni cause di demenza, è caratterizzato da sintomi quali la perdita della memoria, del linguaggio e della capacità di compiere le attività quotidiane; inoltre, nella maggiore parte dei casi i segni della malattia si manifestano in età

---

<sup>8</sup> È un fattore di trascrizione coinvolto nella risposta a stimoli da parte di agenti esterni (come radiazioni UV) o interni (come le citochine)

<sup>9</sup> È una famiglia di enzimi coinvolti nel controllo di diversi processi cellulari, tra cui crescita, differenziamento e proliferazione.

<sup>10</sup> Via del segnale che partecipa alle risposte cellulari verso citochine e fattori di crescita

senile. (31) I meccanismi che conducono alla perdita di neuroni a livello dell'ippocampo e della corteccia sono piuttosto complessi e ancora oggi oggetto di studio, al fine di comprendere come poter ottenere una diagnosi precoce e quindi contrastare il progredire dei sintomi. L'acido ellagico, insieme alle proprietà antiossidanti e antinfiammatorie, ha la capacità di proteggere i neuroni dai danni indotti dai metalli, come l'arsenico, e contribuisce a ridurre l'attivazione delle cellule della microglia, la componente del sistema nervoso centrale responsabile della difesa immunitaria (29).

Nonostante i meccanismi alla base della malattia siano molteplici, due tra questi sono i principali a cui si attribuiscono le cause della neurodegenerazione nel morbo di Alzheimer: il primo consiste in un aumentata deposizione di beta-amiloide e il secondo è l'iperfosforilazione della proteina Tau. Entrambi gli eventi sono ridotti, se non inibiti, in seguito a somministrazione di acido ellagico (29).

Il morbo di Parkinson si caratterizza da un altrettanto complesso quadro patologico, alla cui base si identifica la perdita di neuroni dopaminergici a livello della *Substantia nigra*, e la cui sintomatologia si manifesta principalmente con l'anomalia del controllo dei movimenti. (32). Anche in questo caso, lo stress ossidativo e l'infiammazione, soprattutto a carico della via dopaminergica, sono inclusi nelle possibili cause responsabili dello sviluppo della patologia. Grazie alla somministrazione dell'acido ellagico si può osservare una riduzione dei livelli di malondialdeide, indicatore dello stress ossidativo, prodotto derivante dal processo di perossidazione lipidica. In aggiunta, l'acido ellagico è in grado di aumentare l'espressione di macromolecole deputate a contrastare l'azione dei radicali liberi come il glutatione, la catalasi e il superossido dismutasi, ed interviene nel ridurre l'espressione di alcune citochine endogene <sup>11</sup>, COX-2, e iNOS (29).

---

<sup>11</sup> Molecole proteiche prodotte in seguito a stimoli di diverso tipo e coinvolte nel controllo di crescita, proliferazione e morte cellulare.

Sia l'acido ellagico che la punicalgina si sono rivelati buoni candidati per il supporto alle tradizionali terapie con antidepressivi come dimostrato da studi condotti su modelli animali. Nello specifico, lo studio degli effetti conseguenti alla privazione del sonno nel topo, ha dimostrato che gli individui a cui venivano somministrati acido ellagico e punicalagina presentavano minori disturbi di ansia e compromissione della memoria, rispetto agli animali controllo (28).

Un altro aspetto interessante collegato a tali molecole è che gli estratti di melograno, ricchi di acido ellagico ed ellegitannini, hanno contribuito alla riduzione del dolore sia centrale che periferico, con un'efficienza d'azione strettamente correlata alla componente della pianta da cui i principi attivi sono stati ricavati. Alcuni studiosi hanno ipotizzato che gli ellegitannini siano anche coinvolti nella modulazione delle vie del dolore e che quindi gli stessi possano avere azione antinocicettiva (28).

Infine, riguardo alla proprietà benefiche sull'organismo, si è ipotizzato che l'acido ellagico possa contribuire a contenere la formazione di tumori grazie alla capacità di bloccare la proliferazione cellulare e modulare l'apoptosi; queste azioni, che si sviluppano concomitantemente alle proprietà antiossidanti e antiinfiammatorie, sono utili a ridurre il danno al DNA e l'angiogenesi (28).

Nell'ipotizzare i meccanismi d'azione dell'acido ellagico e considerando la sua scarsa biodisponibilità è generalmente riconosciuto che le molecole bioattive responsabili delle azioni sopra indicate siano i suoi metaboliti e cioè le urolitine (13,33)

Anche per queste molecole l'azione salutare viene attribuita principalmente alle proprietà antiossidanti e alla capacità di inibizione dei radicali liberi, in grado di ridurre o prevenire lo stress ossidativo. È importante sottolineare come nel caso delle urolitine la potenza d'azione sia strettamente correlata al numero di gruppi idrossile presenti nella molecola. Tra le diverse

urolitine prodotte, quelle caratterizzate da una attività antiossidante maggiore sono l'urolitina C (triidrossibenzopiranone) e la D (tetraidrossibenzopiranone) (13,22).

In accordo con questa ipotesi, l'urolitina A (diidrossibenzopiranone) deve essere somministrata a concentrazioni più elevate per osservare una attività comparabile a quella determinata dalle urolitine C e D, mentre l'urolitina B (monoidrossibenzopiranone), così come i suoi derivati metilati, non si è rivelata efficace come antiossidante (22).

In saggi cellulari è stata studiata la potenziale azione pro-ossidante delle urolitine, che è una caratteristica generica dei polifenoli e la cui efficacia è inversamente proporzionale al peso molecolare degli stessi. Questa proprietà dipende dalla concentrazione e dalla presenza di ioni come il rame o il ferro, metalli che sono importanti affinché si verifichino reazioni di ossido-riduzione (27).

Infine, nonostante le urolitine possano effettivamente rappresentare la chiave per comprendere gli effetti positivi sulla salute, non bisogna trascurare la loro potenziale azione tossicologica esercitata sull'organismo, aspetti che necessitano di essere approfonditi (33).

## 4. Il sistema noradrenergico

Nel sistema nervoso umano sono state rinvenute più di cento molecole responsabili del processo di neurotrasmissione e, tra queste, vi sono le ammine biogene, categoria a cui appartengono alcune catecolamine come dopamina, serotonina e (nor)adrenalina (34). Nel sistema nervoso simpatico (anche detto “toraco-lombare”), la noradrenalina, scoperta da Ulf von Euler<sup>12</sup> nel 1940, è il neurotrasmettitore post-sinaptico per eccellenza, mentre l’acetilcolina è il neuro-trasmettitore presinaptico.

La noradrenalina viene biosintetizzata a partire dall’aminoacido L-tirosina per azione della tirosina idrossilasi che produce L-DOPA, a sua volta convertita in dopamina ad opera della DOPA-decarbossilasi; nelle terminazioni noradrenergiche la dopamina diviene substrato della beta-idrossilasi e si ottiene la sintesi di noradrenalina.

Il neurotrasmettitore, in seguito a rilascio e a compimento della propria azione, viene ricaptato ad opera dei trasportatori presinaptici e/o metabolizzato per azione delle COMT e delle MAO in 3-metossi-4-idrossifenilglicole e in 3,4-diidrossifenilglicole, rispettivamente. La biosintesi delle catecolamine avviene prevalentemente nei corpi cellulari; localizzati in particolare per la noradrenalina nel *Locus ceruleus*, per la dopamina nella *Substantia nigra* e nell’*Area tegmentale ventrale* e per la serotonina nei *Nuclei del Rafe*. Si ha però anche una produzione nelle terminazioni nervose, seppur in minima percentuale, e questa componente si inserisce nel ciclo virtuoso di economia energetica che vede la ricaptazione delle bioamine e dei suoi metaboliti dallo spazio sinaptico (34).

Si deve notare che, seppure i neuroni del *Locus ceruleus* siano caratterizzati da elevata complessità d’azione, gli studiosi sono concordi circa la comune origine embrionale delle cellule che lo costituiscono e che sono tutte caratterizzate dalla capacità di sintetizzare e

---

<sup>12</sup> Medico e fisiologo svedese (Stoccolma, 7 febbraio 1905 – Stoccolma, 9 marzo 1983)

immagazzinare noradrenalina. Nonostante le sue dimensioni ridotte, il nucleo è costituito da cellule che inviano le proiezioni assonali a proencefalo, cervelletto, tronco encefalico e midollo spinale, controllando una vasta tipologia di risposte dell'organismo. Questa molteplicità di azioni determina l'ampio coinvolgimento del sistema noradrenergico nel regolare molti comportamenti e risposte fisiologiche, quali l'attenzione, l'eccitazione e l'apprendimento, lo stato di sonno/veglia, la sensazione dolorifica, la frequenza e la pressione cardiaca (34,35).

Raymond P. Ahlquist<sup>13</sup> intuì che la distinzione tra i tipi/sottotipi recettoriali dovesse essere operata in funzione della potenza d'azione generata da un farmaco, piuttosto che secondo le risposte fisiologiche; sulla base di questa conclusione, egli propose di suddividere i recettori noradrenergici in sottotipi  $\alpha$ , cui riconosceva una funzione prevalentemente eccitatoria, e in sottotipi  $\beta$ , ai quali attribuiva un ruolo per lo più di tipo inibitorio ad eccezione del sistema circolatorio (36).

Infatti, la potenza delle risposte indotte dalla somministrazione di agonisti quali adrenalina, noradrenalina e isoproterenolo varia a seconda del sottotipo recettoriale considerato; in particolare, nel caso dei recettori  $\alpha$  adrenergici, la risposta in seguito alla somministrazione di adrenalina è maggiore rispetto a quella originata in seguito all'assunzione di noradrenalina, e questa è ancora minore se l'agonista utilizzato è l'isoproterenolo. I recettori  $\beta$  adrenergici mostrano una tendenza totalmente opposta, per cui la risposta maggiore viene generata da parte dell'isoproterenolo e quella minore dalla nor-adrenalina.

La nota diversità tra i diversi sottotipi recettoriali, che si ripercuote sull'applicabilità terapeutica dei ligandi selettivi per uno o per l'altro tipo, può essere esemplificata per mezzo del confronto tra due antagonisti adrenergici come la fenossibenzamina e il propranololo.

---

<sup>13</sup> Farmacista e farmacologo americano (1914-1983)

La fenossibenzamina, antagonista non selettivo dei recettori  $\alpha$ , viene impiegata per trattare l'aumento di pressione e di sudorazione dovuti al feocromocitoma, un raro tumore della ghiandola surrenale che comporta un'aumentata produzione di ormoni; dall'altra parte, il propranololo, antagonista non selettivo dei recettori  $\beta$ , è indicato per il trattamento dell'ipertensione e di alcune forme di angina pectoris, grazie al suo effetto inotropo negativo. I recettori  $\alpha$ -adrenergici, quando vengono attivati, controllano nell'organismo processi come vasocostrizione, midriasi, rilassamento della muscolatura liscia gastro-intestinale, aumento della glicogenolisi e mantengono lo stato di veglia.

La diversità d'azione connessa al tipo recettoriale  $\alpha$ -adrenergico è dovuta al fatto che, per varietà di distribuzione e d'azione, questo stesso gruppo viene suddiviso a sua volta in due tipologie: i recettori  $\alpha_1$  e i recettori  $\alpha_2$ -adrenergici.

All'interno del gruppo dei recettori  $\alpha_1$  è possibile identificare tre sottotipi:  $\alpha_{1A}$   $\alpha_{1B}$   $\alpha_{1D}$ . In generale, questi recettori sono accoppiati a proteina  $G_{aq}$  che in seguito ad attivazione della fosfolipasi C portano ad un aumento del calcio intracellulare, evento responsabile della contrazione della muscolatura liscia vasale, bronchiale ed uterina.

Benché gli  $\alpha_{1A}$  siano post-sinaptici ed ubiquitari, una buona parte di questi è espressa nel fegato e nei reni e sono ben rappresentati anche nel cuore. Malgrado la buona percentuale di  $\alpha_{1A}$ , a livello del miocardio, il sottotipo più rappresentativo sono gli  $\alpha_{1B}$ . Infine, gli  $\alpha_{1D}$  controllano la vasocostrizione dell'arteria aorta e delle arterie coronarie.

L'altro tipo di recettori  $\alpha$ -adrenergici è formato dai recettori  $\alpha_2$  che sono prevalentemente presinaptici e sono accoppiati a proteina  $G_i$  con azione inibitoria nei confronti dell'adenilato ciclasi. La loro espressione è prevalente nelle terminazioni nervose noradrenergiche, in accordo con il ruolo principale di controllo della liberazione presinaptica del neuromediatore

noradrenalina; inoltre sono coinvolti nel mediare l'aggregazione piastrinica, nell'inibizione della liberazione di insulina e nel rilassamento della muscolatura liscia.

Così come i recettori  $\alpha$  adrenergici, anche i recettori  $\beta$  adrenergici, tutti localizzati a livello post-sinaptico, sono distinti in tre sottotipi differenti:  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ .

I recettori  $\beta_1$ , accoppiati a proteina  $G_{\alpha s}$ , danno come effetto l'attivazione dell'adenilato ciclasi, con conseguente aumento di cAMP, di PKA ed attivazione dei canali di  $Ca^{2+}$  di tipo L; sono principalmente localizzati a livello cardiaco ed hanno un effetto inotropo e cronotropo positivo, nonché dromotropo e batmotropo positivo; in più questo tipo recettoriale media il rilascio di renina a livello del rene.

I recettori  $\beta_2$  provocano le stesse risposte cellulari del sottotipo sopracitato, ma hanno un ruolo preponderante nella broncodilatazione, nell'aumento della gluconeogenesi e nel rilassamento della muscolatura liscia viscerale e urogenitale, nonché nell'ipertrofia del muscolo scheletrico.

Infine, i recettori  $\beta_3$  determinano un meccanismo d'azione e nonostante la loro distribuzione nell'organismo non sia ancora del tutto chiarita, sono prevalentemente localizzati nel tessuto adiposo e producono effetti metabolici, tra cui la lipolisi, per attivazione della PKA (37).

## 5. I recettori $\alpha_2$ della noradrenalina

### 5.1 Caratterizzazione farmacologica e strutturale dei recettori $\alpha_2$

In seguito alla suddivisione, proposta circa 20 anni fa, dei recettori  $\alpha_2$  adrenergici in diversi sottotipi recettoriali, gli studi farmacologici si sono concentrati sullo sviluppo di farmaci selettivi per questi, con lo scopo di ottenere nuove molecole caratterizzate da un'efficace azione terapeutica e da una minor insorgenza di effetti collaterali, (questa ultima spesso dovuta alla non selettività recettoriale) (38).

I recettori  $\alpha_2$ , in maniera analoga a quanto accade per i recettori  $\alpha_1$ - adrenergici, sono suddivisi in tre sottotipi, caratterizzati da una diversa organizzazione topologica e da diversi meccanismi cellulari.

Tra essi si riconosce il sottotipo  $\alpha_{2A}$  che è predominante nel SNC e la cui attivazione determina un effetto anti-nocicettivo, sedativo, ipotensivo accompagnato da ipotermia. Poi, vi è il sottotipo  $\alpha_{2B}$  coinvolto nella modulazione della trasmissione dopaminergica, di alcune risposte comportamentali e della vasocostrizione. Infine, il sottotipo  $\alpha_{2C}$ , che controlla il rilascio di catecolamine da parte midollare del surrene e la regolazione della trasmissione dopaminergica a livello del sistema nervoso centrale.

È importante chiarire che i sottotipi recettoriali  $\alpha_2$ -adrenergici sono codificati da geni presenti su diversi cromosomi; l' $\alpha_{2A}$  si trova sul 10,  $\alpha_{2B}$  sul 2 e l' $\alpha_{2C}$  sul 4. Nel caso dei roditori, si identifica anche il sottotipo  $\alpha_{2D}$ , che, nonostante le sequenze siano ben conservate nei mammiferi, nei topi e nei ratti è caratterizzato dalla presenza di una serina al posto della cisteina in posizione 201, ed è considerato l'omologo dell' $\alpha_{2A}$  umano (39).

Dal momento che i ligandi disponibili non hanno elevata selettività per uno specifico sottotipo, la loro caratterizzazione è stata possibile grazie all'uso di animali geneticamente modificati e al contributo della biologia molecolare.

In particolare, due sono state le tecniche utilizzate: la prima la quantificazione del recettore sia come proteina che come gene grazie alla distribuzione tessuto specifica dei sottotipi recettoriali e quindi all'uso di tessuti caratterizzati da un'elevata presenza di quel sottotipo; la seconda che utilizza tecniche del DNA ricombinante per ottenere l'espressione di un sottotipo in linee cellulari, dove questo normalmente non è presente, e studiarne le caratteristiche funzionali. Tra le due, la seconda permette di operare il confronto diretto delle diverse proteine recettoriali in linee cellulari identiche, riducendo gli elementi di variabilità che possono, talvolta, condurre a risultati fuorvianti (40).

Sono disponibili anche diversi metodi per analizzare e determinare la funzione e la distribuzione dei recettori  $\alpha_2$  all'interno dell'organismo. Tra questi abbiamo la determinazione della  $pK_d$  di un ligando verso uno dei tre sottotipi, partendo dal presupposto che quel ligando abbia una maggiore affinità per un definito sottotipo recettoriale e che quindi i valori di affinità di legame così ottenuti possano definire una scala di affinità e quindi differenziare da un punto di vista funzionale i tre sottotipi recettoriali. La definizione della relazione concentrazione-effetto, ad esempio, nell'inibizione del rilascio del neurotrasmettitore può permettere questa valutazione (41,42).

Il secondo approccio prevede il confronto di variazioni /differenze delle caratteristiche di legame con sottotipi non identificati, valutati ed identificati per similitudine confrontando i risultati ottenuti con quelli evidenziati utilizzando linee cellulari transfettate con DNA e quindi obbligate a codificare per uno dei sottotipi recettoriali.

In aggiunta a queste tecniche, l'uso di sonde di RNA e oligonucleotidi per la ricerca di mRNA codificanti uno specifico sottotipo ha permesso la mappatura dei recettori adrenergici nel sistema nervoso centrale.

Grazie a questo lavoro è emerso che il sottotipo recettoriale  $\alpha_{2B}$  si trova solo nel talamo e che i recettori  $\alpha_{2A}$  sono nel tronco encefalico, nella corteccia cerebrale, nel setto, nell'ipotalamo, nell'amigdala e nel midollo spinale, mentre i recettori che appartengono al sottotipo  $\alpha_{2A}$  sono stati tracciati anche nel *Locus coeruleus* e altri corpi cellulari noradrenergici, nonché nei processi assonici e nei terminali dei neuroni noradrenergici, a sostegno del coinvolgimento di questo sottotipo nell'auto-inibizione del rilascio di noradrenalina.

Infine, il sottotipo  $\alpha_{2C}$  è stato trovato essere largamente espresso nel putamen, nel tubercolo olfattivo, nell'ippocampo e nella corteccia cerebrale (43) (44).

Gli studi immunoistochimici con anticorpi monoclonali confermano il ruolo dei recettori adrenergici  $\alpha_{2A}$ , nel mediare il rilascio di noradrenalina e nel regolare la trasmissione simpatica. Gli anticorpi monoclonali permettono di determinare la localizzazione presinaptica o post-sinaptica e individuarne la localizzazione a livello subcellulare; in particolare, gli anticorpi che riconoscono i recettori  $\alpha$  hanno permesso di concludere che il sottotipo  $\alpha_{2C}$  si trova all'interno della cellula così come il sottotipo  $\alpha_{2A}$  che è stato associato a strutture simili a vescicole. Il sottotipo  $\alpha_{2A}$  si localizza anche in cellule gliali (38).

## **5.2 Ruolo dei recettori $\alpha_2$**

Sempre grazie al contributo della biologia molecolare sono stati definiti alcuni effetti dei sottotipi recettoriali  $\alpha$ -adrenergici; per esempio, i recettori  $\alpha_{2A}$  mediano la maggior parte delle risposte che derivano dall'uso di agonisti  $\alpha$ -adrenergici. Il modello mutante D79N è un

topo che presenta nella sequenza del recettore  $\alpha_{2A}$  la sostituzione in posizione 79 dell'amminoacido aspartato con l'asparagina; questa variazione comporta che il recettore perde il controllo sui canali  $K^+$  ma resta comunque attivo verso l'inibizione dell'adenilato ciclasi e dei canali  $Ca^{2+}$  voltaggio-dipendenti. Nel modello mutante D79N, l'effetto antinocicettivo determinato da dexmedetomina si manifesta solo negli animali KO per il sottotipo  $\alpha_{2B}$  e  $\alpha_{2C}$  e non nel topo transgenico D79N e l'azione sedativa non si osserva nel caso degli animali mutati per il sottotipo A (45).

Infine, gli studi di biologia molecolare hanno confermato il ruolo degli  $\alpha_2$  nel controllo del turn-over delle monoammine e nella regolazione della risposta inibitoria dopo somministrazione di agonisti  $\alpha$ -adrenergici; infatti, nel primo caso, il fenomeno era diminuito nella specie KO per il sottotipo  $\alpha_{2C}$ , mentre nel secondo è stata confermata la presenza del sottotipo  $\alpha_{2A}$  nei corpi cellulari dei neuroni adrenergici, per la presenza di mRNA codificante per lo stesso e per la presenza di anticorpi che riconoscono quel sottotipo. Per quanto riguarda i recettori  $\alpha_{2C}$ , questi, sono coinvolti nel sistema nervoso centrale nella regolazione fine degli effetti legati alla somministrazione di agonisti adrenergici  $\alpha_2$  selettivi; infatti, nel confronto tra animali KO per  $\alpha_{2C}$  ed animali knock-in (KI) per questo sottotipo, gli effetti del farmaco sono leggermente diversi, e questo prevalentemente a causa del ruolo svolto da  $\alpha_{2C}$  (38).

Infine, grazie alla conoscenza più approfondita del ruolo di  $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$  e  $\alpha_{2C}$  è stato possibile proporre alcune osservazioni riguardo all'applicazione dei ligandi selettivi per i recettori  $\alpha_2$ -adrenergici. Essi possono essere usati come tali oppure come molecole di riferimento per studi di "relazione struttura-attività", al fine dell'ottimizzarne degli effetti di nuovi potenziali farmaci. Ligandi selettivi per  $\alpha_{2A}$  e  $\alpha_{2B}$  sono proposti come molecole a possibile effetto

antiipertensivo, dal momento che sono caratterizzati da una maggior potenza d'azione rispetto alla clonidina, oppure per supporto all'anestesia, per l'effetto secondario sedativo, anche se questa applicazione è limitata causa il concomitante effetto bradicardizzante (38).

Il glaucoma è una patologia caratterizzata da un aumento della pressione intraoculare per un'eccessiva produzione ed un diminuito efflusso di umor acqueo e viene principalmente trattato con farmaci che abbassano la pressione all'interno dell'occhio; in questo caso, è ottimale un antagonista  $\alpha_{2A}$  selettivo, per eliminare l'appannamento della vista dovuto all'uso di molecole meno selettivo (38,46).

Al contrario, l'uso di antagonisti  $\alpha_{2B}$  è ideale nel morbo di Raynaud, patologia dove vi è un'alterazione della circolazione sanguigna alle estremità, spesso a livello di mani e piedi e in cui è importante intervenire al fine di migliorare quanto più possibile la circolazione nel soggetto affetto per evitare danni per la carenza di ossigeno (47).

In fine, nelle terapie delle patologie neurodegenerative, di depressione e di schizofrenia, potrebbero ricoprire un ruolo interessante i ligandi per i recettori  $\alpha_{2C}$  (38).

## 6. Scopo della tesi sperimentale

Il lavoro sperimentale di questa tesi è stato svolto presso il laboratorio diretto dalla Prof.ssa Anna Pittaluga, che da anni studia l'innervazione noradrenergica nel sistema nervoso centrale (SNC), la sua funzione e i sistemi cellulari e molecolari che lo controllano.

In particolare, l'attività di ricerca è stata dedicata a valutare se e in che misura l'acido ellagico e le urolitine A, B e C potessero interagire con i recettori  $\alpha_2$  presinaptici sulle terminazioni nervose noradrenergiche dell'ippocampo di topo adulto, l'area centrale che riceve la più importante innervazione noradrenergica centrale.

L'ipotesi di lavoro origina da dati presenti in letteratura che hanno dimostrato come la somministrazione "*in vivo*" di acido ellagico sia in grado di determinare degli effetti ansiolitici ed antidepressivi, modulando i sistemi aminergici centrali, tra cui il sistema noradrenergico. (48)

In questo lavoro gli autori hanno evidenziato una riduzione del tempo di immobilità (parametro correlato all'ansia) nel test di Porsolt (il test del nuoto forzato) e in quello di sospensione per la coda in animali trattati con una formulazione di acido ellagico. È importante sottolineare che il coinvolgimento dell'innervazione noradrenergica ed in particolare dei recettori di tipo  $\alpha_2$  è stata ipotizzata sulla base dell'osservazione che l'attività ansiolitica determinata dal trattamento con acido ellagico era quasi totalmente impedita dalla concomitante somministrazione dell'antagonista  $\alpha_2$  yohimbina.

Più recentemente, il gruppo della Prof.ssa Pittaluga ha evidenziato una riduzione significativa nella capacità di rilascio di noradrenalina in terminazioni nervose noradrenergiche isolate dalla corteccia di topi anziani rispetto allo stesso parametro in animali adulti. (49)

Questi dati ottenuti con modelli sperimentali di condizioni patologiche diverse (il primo riferito a modelli di ansia, depressione, il secondo riferito all'invecchiamento) supportano la conclusione che la capacità dell'acido ellagico di aumentare la resilienza e quindi di esercitare un'azione benefica in seguito a somministrazione cronica possano dipendere dalla sua efficacia nel modulare l'innervazione noradrenergica *via* recettori  $\alpha_2$ .

Volendo verificare l'ipotesi che l'acido ellagico e /o i suoi principali metaboliti (le urolitine) possano interagire con i recettori  $\alpha_2$  il lavoro da me svolto nel periodo di tesi è stato dedicato a quantificare l'impatto di queste molecole naturali sui recettori  $\alpha_2$  presinaptici sulle terminazioni noradrenergiche ippocampali, valutando se e in che misura fossero in grado di modificare l'efficienza del rilascio di noradrenalina indotto da stimolo depolarizzante.

A questo scopo, la maggior parte degli esperimenti è stata svolta utilizzando una tecnica, la "superfusione di un monostrato di sinaptosomi", messa a punto in questo laboratorio e considerata un approccio di scelta per evidenziare l'interazione di una molecola con un recettore e in caso positivo definire come il ligando si comporti nei confronti di quel recettore.

## **7. Materiali e metodi**

### **7.1 Animali**

Gli animali utilizzati durante gli studi sono topi C57BL/6J di sesso maschile di età compresa tra i 3 e i 4 mesi. Sono stati acquistati presso Charles River (Calco, Italia) e sono mantenuti nello stabulario del Dipartimento di Farmacia, sezione di Farmacologia e Tossicologia, presso la Scuola di Scienze Mediche e Farmaceutiche dell'Università di Genova (autorizzazione n° 484, 8 Giugno 2004).

Gli animali vengono tenuti in condizioni termo-igrometriche costanti: la temperatura è impostata a 22°C e l'umidità relativa al 50%. Lo stabulario presenta inoltre un ciclo luce/buio regolare di 12 ore (luce dalle 7 alle 19).

I topi sono stati sacrificati attraverso dislocazione cervicale e immediatamente decapitati per raccogliere gli ippocampi.

Le procedure sperimentali sono in linea con la legislazione Europea (Direttiva 2010/63/EU), con le indicazioni ARRIVE e con l'ottava edizione della “guida per la cura e l'utilizzo di animali da laboratorio”. Sono state inoltre approvate dall'Organismo per Il Benessere animale dell'Università di Genova e dal Ministero della Salute Italiano (DDL 26/2014 protocolli n°. 50/2011-B and 612/2015-PR).

### **7.2 Preparazione di sinaptosomi ippocampali**

I sinaptosomi sono terminazioni nervose isolate, generalmente utilizzate per analizzare il rilascio di neurotrasmettitori da parte dei neuroni presinaptici.

Essi vengono ottenuti attraverso un processo che determina la frammentazione di tutti i corpi cellulari del tessuto cerebrale precedentemente isolato e il distacco delle

terminazioni nervose dagli assoni, a cui segue la chiusura delle membrane cellulari, a formare delle strutture sferiche.

I sinaptosomi hanno dimensioni comprese tra 1 e 1,5  $\mu\text{m}$  e contengono al loro interno, ma anche sulla membrana, tutte le proteine e gli enzimi che caratterizzavano l'iniziale terminazione sinaptica. Essi, infatti, si mantengono vitali per qualche ora dopo l'omogeneizzazione; pertanto, vengono studiati per valutare fenomeni quali la sintesi, il rilascio, ma anche l'internalizzazione di neurotrasmettitori, attraverso esperimenti di superfusione.

I sinaptosomi purificati sono stati preparati isolando dal tessuto cerebrale di topo le regioni ippocampali. I tessuti sono stati aggiunti ad una soluzione di saccarosio 0,32 M, tamponata fino a pH 7,4 con Tris-(idrossimetil)-amminometano (Tris, concentrazione finale 0,01 M) e successivamente omogeneizzati per ottenere i sinaptosomi.

L'omogenato è stato centrifugato a 1,000 gpm per 5 minuti e il sovrantante è stato stratificato sopra un gradiente discontinuo di Percoll (2%, 6%, 10% e 20% v/v in saccarosio tamponato con Tris) e centrifugato a 33,500 gpm per 5 minuti.

Lo strato compreso tra il 10% e il 20% di Percoll, corrispondente alla frazione sinaptosomiale, è stata raccolta e lavata attraverso una terza centrifugazione. Il precipitato sinaptosomiale è stato risospeso in una soluzione fisiologica con la seguente composizione (mM): NaCl, 140; KCl, 3; MgSO<sub>4</sub>, 1.2; CaCl<sub>2</sub>, 1.2; NaHPO<sub>4</sub>, 1.2; NaHCO<sub>3</sub>, 5; HEPES, 10; glucosio, 10; pH 7.2-7.4.

### 7.3 Esperimento di rilascio di neurotrasmettitori da sinaptosomi in superfusione

L'apparato di superfusione consiste in 20 unità di superfusione, composte da una camera superiore (per riscaldare il mezzo di superfusione) e da una camera inferiore, dove i sinaptosomi sono stratificati su un filtro microporoso come un monostrato (**Figura1, A**). Il mezzo di superfusione viene raccolto continuamente per mezzo di una pompa peristaltica a una velocità di flusso costante (0,5 mL/L). Questa continua superfusione dall'alto verso il basso del monostrato sinaptosomiale (**Figura1, B**) assicura la rimozione di qualsiasi sostanza endogena presente (**Figura1, C**), anche quelle liberate dai terminali stessi, riducendo quindi al minimo gli effetti dovuti alla presenza di una biofase (**Figura1, D**). I recettori presinaptici nativi presenti sui sinaptosomi superfusi sono quindi posti in condizioni "prive di ligandi" e la loro capacità di regolare il rilascio di un definito trasmettitore può essere evidenziata solo grazie all'aggiunta di agonisti esogeni al mezzo di superfusione che saranno in grado di interagire con il rispettivo recettore e di causare una risposta (**D**).

È però importante sottolineare che, in questo paradigma sperimentale, gli antagonisti sono "*di per sé*" inattivi, ma diventano funzionalmente attivi quando vengono aggiunti contemporaneamente agli agonisti, in quanto in questa condizione sono in grado di competere con gli agonisti per il legame ai recettori presinaptici che modulano l'esocitosi del trasmettitore alterando l'efficienza di legame dell'agonista.

La marcatura selettiva con tracciante radioattivo (nel nostro caso, [<sup>3</sup>H]NA) permette di isolare una specifica sottopopolazione di terminali (quelli in grado di ricaptare e di liberare attivamente il tracciante radioattivo) e quindi di monitorare gli effetti determinati dall'attivazione dei recettori situati su quella sottopopolazione di terminali nervosi (nel nostro caso quelli noradrenergici) da agonisti, impedendo artefatti che

possono derivare dalla presenza di recettori appartenenti ad altre sottofamiglie recettoriali sullo stesso terminale.

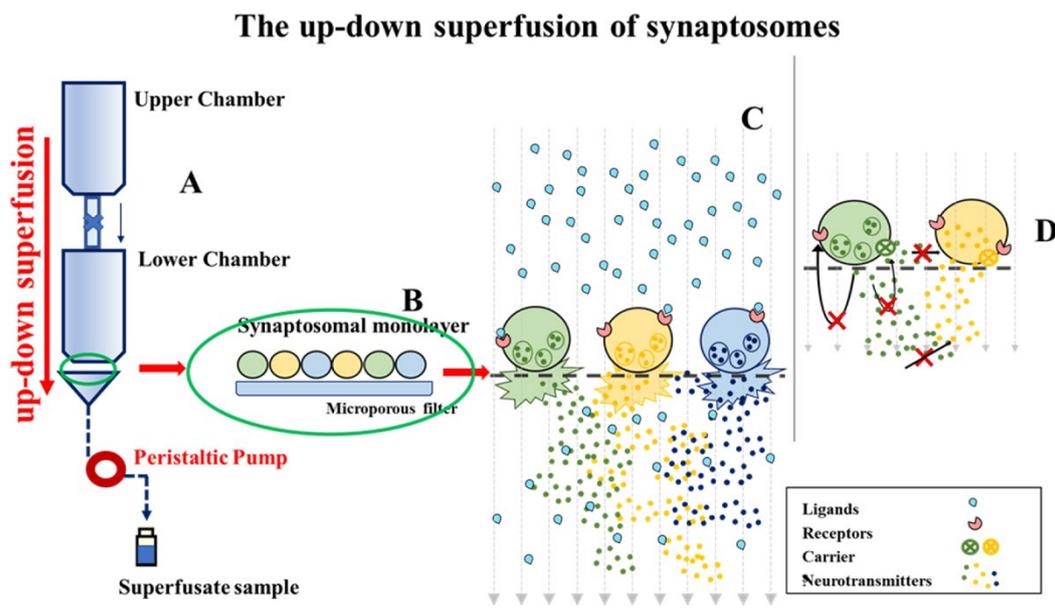
La quantificazione del tracciante radioattivo nei campioni raccolti permette di correlare le variazioni nell'esocitosi del trasmettitore alle concentrazioni dei ligandi nel mezzo di superfusione e, quindi, all'attivazione dei recettori presinaptici che controllano l'efficienza del rilascio del trasmettitore (causata nel nostro caso da uno stimolo depolarizzante, cioè il KCl C 12 mM).

I sinaptosomi sono stati continuamente superfusi dall'alto verso il basso con una soluzione ionica iso-osmotica ed isotonica a una velocità di flusso costante (0,5 mL/min) per 36 minuti per equilibrare il sistema. A  $t = 39$ , i sinaptosomi sono stati esposti transitoriamente (90 s) a un mezzo ad alto contenuto di KCl (12 mM, KCl, in sostituzione di una concentrazione equimolare di NaCl), in presenza di clonidina, di acido ellagico e delle Urolitine A, B o C. Quando indicato, i sinaptosomi sono stati esposti anche all'antagonista dei recettori  $\alpha_2$  yohimbina.

Le frazioni di superfusato sono state raccolte come segue: due frazioni di 3 minuti (rilascio basale), una prima ( $t = 35-39$  min, b1) e una dopo ( $t = 45-48$  min, b3) una frazione di 6 minuti ( $t = 39-45$  min, rilascio evocato, b2) che contiene la liberazione di trizio indotta dall'esposizione allo stimolo. L'eccesso di [ $^3\text{H}$ ]NA evocato da 12 mM KCl è stato calcolato sottraendo il contenuto del neurotrasmettitore nelle frazioni b1 e b3 da quello della frazione b2. La quantità di radioattività in ciascuna frazione del superfusato è stata espressa come percentuale della radioattività sinaptosomiale totale.

I dati sono riportati come media  $\pm$  SEM di determinazioni indipendenti ottenute in diversi esperimenti condotti in triplo (almeno tre camere di superfusione per ogni condizione sperimentale). Gli effetti di clonidina, acido ellagico, URO-A, URO-B,

URO-C, in assenza o in presenza di yohimbina sono stati espressi come percentuale dell'overflow indotto da 12 mM KCl da solo (Figura 3, 6, 7 e 8) o come percentuale di rilascio residua calcolata rispetto all'effetto rilasciante causato dallo stimolo iperpotassico (Figura 4 e 5).



**Figura 1:** schema semplificato dell'apparato di superfusione, lo strumento per lo studio della liberazione di trasmettitori da sinaptosomi.

### 7.3.1 Analisi statistica: esperimento di Rilascio

Per la gestione dei dati/statistica e il disegno dei grafici è stato utilizzato il pacchetto software SigmaPlot 10 per l'analisi dei dati e la creazione di grafici. L'analisi statistica dei risultati degli esperimenti è stata eseguita utilizzando il test ANOVA, seguito dal test di Tukey per le comparazioni multiple.

I risultati vengono considerati significativi per almeno  $p < 0,05$ .

## **7.4 Analisi Western Blot**

L'ippocampo è stato omogenato in tampone di lisi RIPA (10 mM Tris, pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,1% SDS, 1% Triton X-100, 1 mM sodio ortovanadato e inibitori delle proteasi). Le proteine sono state quantificate con un saggio BCA, separate mediante SDS-10% PAGE ( $\mu\text{g}/\text{lane}$  come indicato nelle figure) e separate su membrane PVDF. Le membrane sono state testate con l'anticorpo policlonale di coniglio per i recettori adrenergici  $\alpha_2A$  (1:500, PA1-048, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) e con l'anticorpo monoclonale di topo per i recettori adrenergici  $\alpha_2C$  (1:500, MA5-27724, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) overnight a 4 °C. Le membrane sono state poi incubate per 1 ora a temperatura ambiente con gli appropriati anticorpi secondari legati alla perossidasi di rafano (1:5000, A9044 e A9169, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Gli immunoblots sono stati visualizzati con un sistema di rilevamento ECL (enhanced chemiluminescence) per Western blotting. Le immagini sono state acquisite con il sistema di acquisizione immagini Alliance LD6 (Uvitec, Cambridge, UK) e analizzate con il software UVI-1D (Uvitec, Cambridge, UK)

### **.7.4.1 Analisi statistica: Western Blot**

Per la gestione dei dati/statistica e il disegno dei grafici è stato utilizzato il pacchetto software SigmaPlot 10 per l'analisi dei dati e la creazione di grafici. I confronti multipli sono stati eseguiti con l'analisi della varianza (ANOVA) seguita dal test di confronto multiplo di Tukey. I dati sono stati considerati significativi per  $p < 0,05$  almeno.

## **7.5 Prodotti chimici**

La noradrenalina, levo [7-<sup>3</sup>H] (attività specifica 12,1 Ci/mmol), è stata prodotta da Perkin Elmer (Boston, MA, USA).

La yohimbina, la clonidina, la 6-nitroquipazina, l'acido ellagico, l'urolitina A, l'urolitina B e l'urolitina C provengono da Sigma Aldrich (Milano).

Il sistema di rilevamento Western blotting Immobilon Forte Western HRP substrate è stato prodotto e venduto da Merck (Darmstad, Germania).

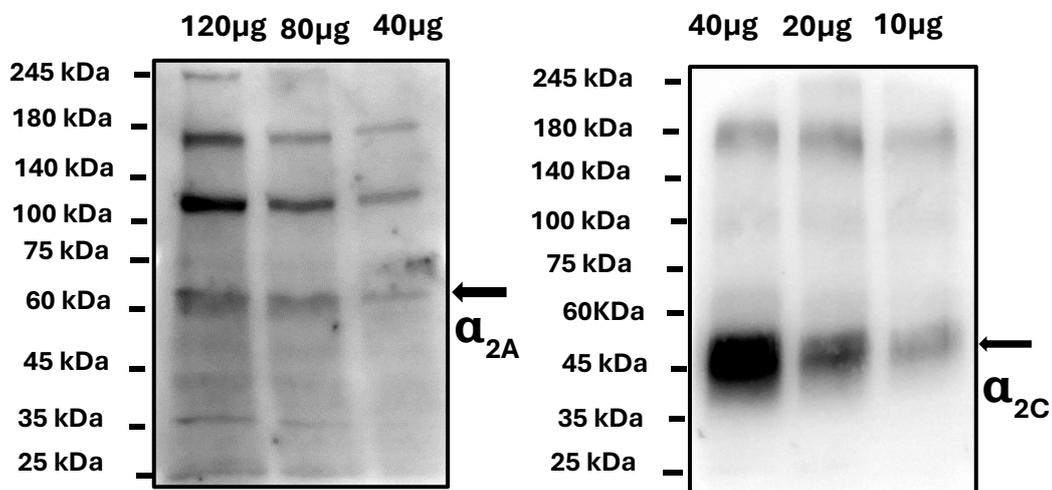
## 8. Risultati e Discussione

### 8.1 Esistenza di autorecettori $\alpha_2$ presinaptici in terminazioni nervose di ippocampo di topo adulto e loro ruolo nel controllo della esocitosi di noradrenalina: caratterizzazione con clonidina e yohimbina.

Come già introdotto, il lavoro di ricerca da me svolto nell'ambito della tesi sperimentale è stato dedicato a valutare se e in che misure acido ellagico e i suoi principali metaboliti, le urolitine, possano interagire e controllare la funzione di recettori  $\alpha_2$  noradrenergici in definite aree cerebrali. A questo scopo, considerato che nel SNC questi recettori hanno una preferenziale localizzazione presinaptica sulle terminazioni noradrenergiche dei processi assonali che dai corpi neuronali localizzati nel *Locus coeruleus* innervano le principali aree superiori (corteccia ed ippocampo) ed inferiori (midollo spinale), è stato deciso di utilizzare come modello sperimentale le terminazioni nervose noradrenergiche isolate da ippocampo di topo adulto e di valutare sia da un punto di vista strutturale che funzionale la presenza di questi recettori e quindi il loro profilo farmacodinamico utilizzando un agonista puro, la clonidina e un antagonista pro, la yohimbina.

Per prima cosa, ho svolto esperimenti con la tecnica di Western Blot per evidenziare la presenza della proteina recettoriale  $\alpha_2$ . Gli esperimenti sono stati effettuati per confermare da un punto di vista qualitativo che l'omogenato di ippocampo presenta un'immunopositività per queste proteine. Ippocampi di topi maschi adulti sono stati prelevati dopo il sacrificio dell'animale e l'omogenato preparato come indicato nella sezione dei metodi. Questo preparato è stato quindi sottoposto ad una separazione monodimensionale su membrana in funzione del peso molecolare delle proteine. Una volta separate, le diverse proteine sono state caratterizzate grazie all'utilizzo di

anticorpi specifici verso i recettori  $\alpha_2$ . In particolare, le membrane sono state incubate con anticorpi in grado di riconoscere selettivamente le proteine del recettore  $\alpha_2$ , sottotipo A e C, le due forme maggiormente espresse nell'ippocampo. L'analisi western blot ha evidenziato che i due anticorpi erano in grado di riconoscere una proteina avente un peso compatibile con quello dei recettori  $\alpha_2$  A (62x kDa) e C (50 kDa) (Figura 2), confermando quindi la presenza dei due recettori nel preparato. Questi esperimenti hanno evidenziato come le due proteine presenti adottino preferibilmente la forma monomerica.



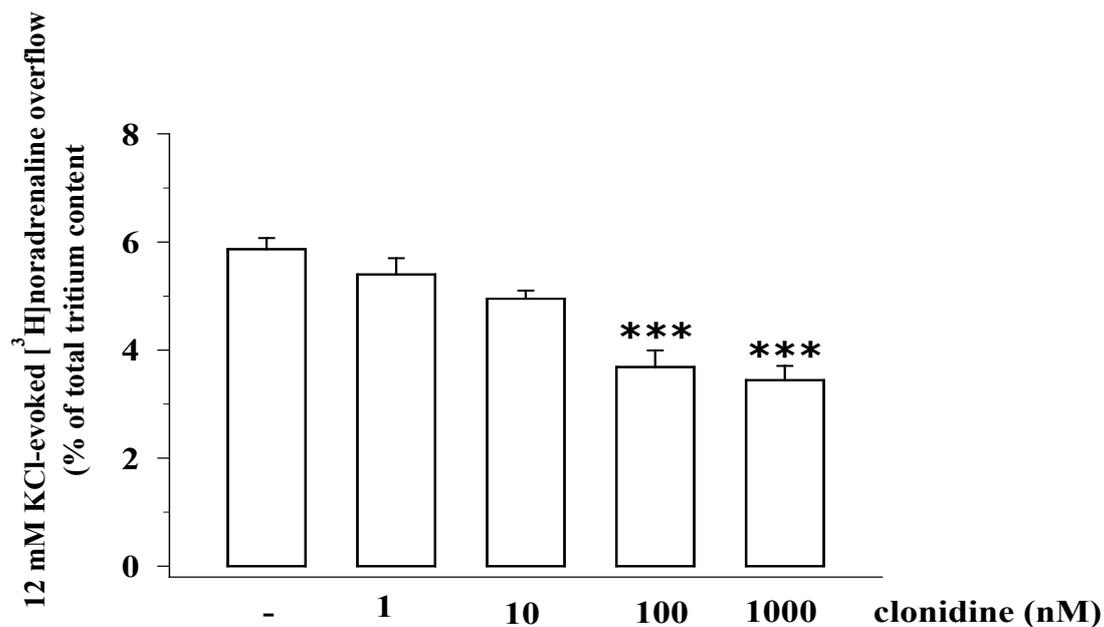
**Figura 2:** Analisi Western blot per evidenziare la presenza in omogenati di ippocampo di topo maschio adulto delle proteine  $\alpha_2$  A e C. Gli omogenati di ippocampo sono stati processati per separare le proteine in funzione del peso molecolare e la presenza delle proteine dei recettori  $\alpha_2$  è stata evidenziata incubando le membrane con anticorpi in grado di riconoscere selettivamente i due sottotipi recettoriali. Le membrane sono quindi state incubate con un anticorpo secondario in grado di legarsi all'anticorpo primario e la presenza dei complessi antigene-anticorpo è stata poi evidenziata come descritto nei materiali e metodi.

Lo studio è poi proseguito svolgendo studi funzionali che confermassero che i recettori  $\alpha_2$  fossero localizzati sulle terminazioni nervose noradrenergiche ippocampali. Come

già introdotto, è universalmente riconosciuto che questi recettori hanno preferibilmente una localizzazione presinaptica sulle terminazioni nervose noradrenergiche e che la loro principale funzione sia l'autoregolazione della liberazione di noradrenalina indotta da stimoli depolarizzanti. Per confermare la presenza di questi recettori ho quindi svolto degli esperimenti di quantificazione della liberazione di noradrenalina da terminazioni ippocampali noradrenergiche.

Sinaptosomi ippocampali sono stati marcati con [<sup>3</sup>H]noradrenalina e poi superfusi e stimolati con stimolo iperpotassico in accordo con la tecnica della “superfusione di un monostrato di sinaptosomi” descritta nella sezione dei metodi. Le terminazioni premarcate sono state esposte in superfusione ad una soluzione poli-ionica contenente 12 mM di cloruro di potassio (12 mM KCl) per 90 secondi. La liberazione determinata dalla depolarizzazione transiente della membrana sinaptica ha causato un picco nella liberazione del trizio che poi è ritornata ai valori della liberazione basale quando la soluzione di superfusione è stata rimpiazzata dalla soluzione normo-potassica (3 mM KCl).

In queste condizioni sperimentali, l'aggiunta di clonidina allo stimolo depolarizzante ha causato un riduzione della liberazione di [<sup>3</sup>H]noradrenalina indotta dallo stimolo depolarizzante. Clonidina ha inibito la liberazione esocitotica di [<sup>3</sup>H]noradrenalina in maniera concentrazione-dipendente, esercitando il massimo effetto inibitorio quando aggiunta alla concentrazione di 100-1000 nM (Figura 3). Considerata la specificità di clonidina nel legarsi ed attivare i recettori  $\alpha_2$  adrenergici, questi risultati confermano la presenza di tali recettori sulle terminazioni nervose ippocampali che ricaptano la amina triziata.



**Figura 3:** relazione concentrazione-effetto della inibizione mediata da clonidina sulla liberazione di [<sup>3</sup>H]noradrenalina indotta dall'esposizione transiente dei sinaptosomi in superfusione ad una soluzione iperpotassica contenente 12 mM KCl. La Clonidina alle concentrazioni indicate è stata aggiunta concomitaneamente allo stimolo depolarizzante. I dati sono espressi come liberazione di trizio causata dallo stimolo depolarizzante sopra la liberazione basale. I dati sono espressi come media ± SEM e rappresentano la liberazione indotta da 12 mM KCl sopra la liberazione basale. \*\*\* p<0.001 vs 12 mM KCl.

Per ulteriore conferma ho svolto esperimenti per verificare se yohimbina, un antagonista selettivo per i recettori  $\alpha_2$ , fosse in grado di competere e annullare la capacità di clonidina di inibire l'esocitosi del tracciante radioattivo. I dati riportati in **Tabella 1** mostrano come l'antagonista  $\alpha_2$ , di per incapace di modificare la liberazione di trizio indotta dallo stimolo iperpotassico, sia in grado di impedire in maniera significativa l'effetto inibitorio che clonidina esercita sul rilascio di [<sup>3</sup>H]noradrenalina causato dall'esposizione transiente ad una soluzione 12 mM KCl.

**Tabella 1:** effetto di clonidina sulla liberazione di [<sup>3</sup>H]noradrenalina indotta da soluzione iperpotassica da sinaptosomi ippocampali di topo: antagonismo da yohimbina.

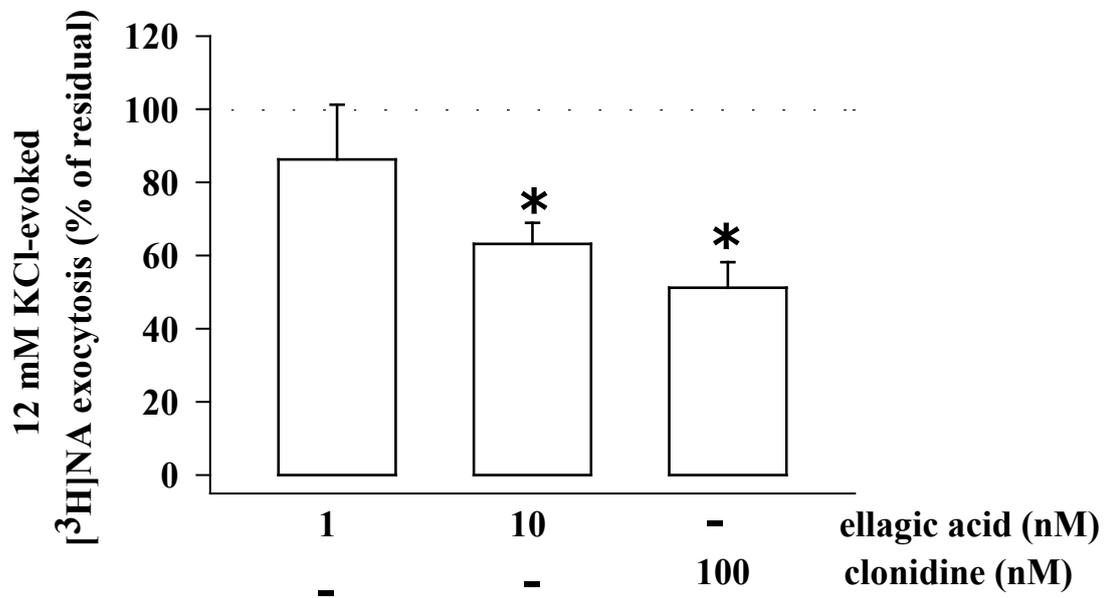
	[ <sup>3</sup> H]NA overflow (% del contenuto totale di trizio)
12 mM KCl	5.31 ± 0.28
12 mM KCl / 100 nM clonidina	2.89 ± 0.10***
12 mM KCl / 1 μM yohimbina	5.62 ± 0.36
12 mM KCl / 100 nM clonidina / 1 μM yohimbina	5.15 ± 0.33^^^

Nel loro insieme questi dati hanno confermato la presenza dei recettori presinaptici inibitori appartenenti al sottotipo α<sub>2</sub> su terminazioni ippocampali noradrenergiche.

## **8.2 L'acido ellagico mima clonidina e inibisce la liberazione di noradrenalina indotta da stimolo depolarizzante in terminazioni nervose di ippocampo di topo adulto: effetto di yohimbina.**

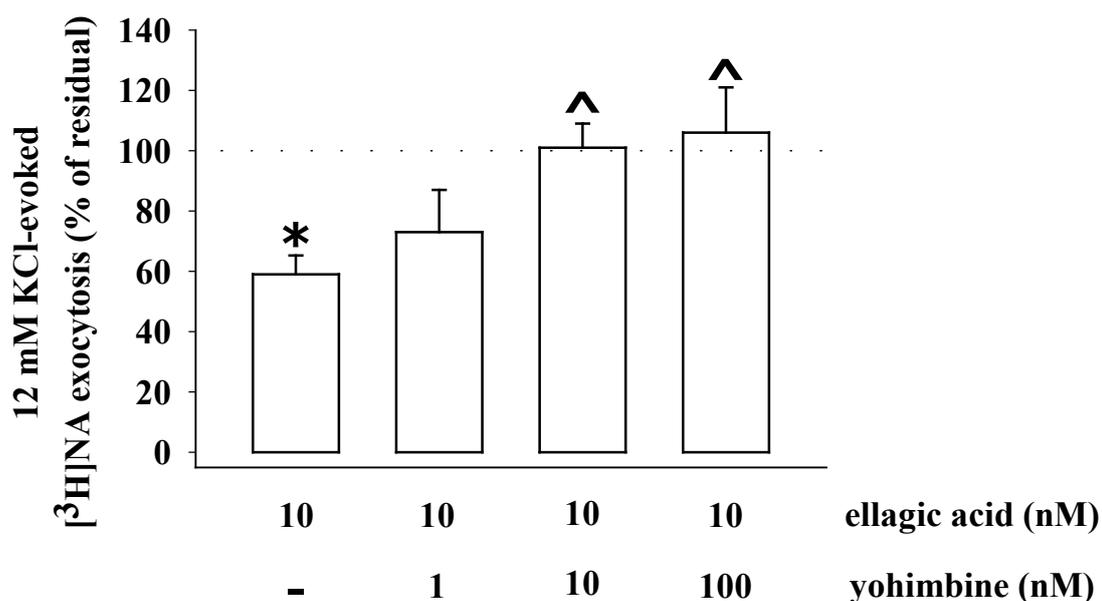
Applicando lo stesso paradigma sperimentale ho quindi valutato l'effetto di acido ellagico sulla liberazione di [<sup>3</sup>H]noradrenalina indotta da stimolo iperpotassico in sinaptosomi ippocampali di topo.

La Figura 4 mostra come acido ellagico (1000 nM) sia in grado di inibire la liberazione dell'amina. La Figura inoltre mostra come, in questo set di esperimenti, l'effetto sia quantitativamente comparabile a quello indotto da clonidina (100 nM)



**Figura 4:** relazione concentrazione-effetto della inibizione mediata da acido ellagico sulla liberazione di [<sup>3</sup>H]noradrenalina indotta dall'esposizione transiente dei sinaptosomi in superfusione ad una soluzione iperpotassica contenente 12 mM KCl: confronto con Clonidina (100 nM). I dati sono espressi come percentuale di liberazione di trizio residua rispetto alla liberazione di trizio indotta da solo stimolo depolarizzante. I dati sono espressi come media  $\pm$  SEM e rappresentano la liberazione indotta da 12 mM KCl sopra la liberazione basale. \*  $p < 0.05$  vs 12 mM KCl.

Sempre in questo set di esperimenti, abbiamo anche valutato l'effetto di yohimbina. I dati sono riportati in Figura 5 e mostrano come l'antagonista  $\alpha_2$  sia in grado di revertire in maniera concentrazione dipendente l'inibizione causata da acido ellagico (100 nM).



**Figura 5:** Antagonismo concentrazione-effetto indotto da yohimbina della inibizione mediata da acido ellagico sulla liberazione di [<sup>3</sup>H]noradrenalina causata dall'esposizione transiente dei sinaptosomi in superfusione ad una soluzione iperpotassica contenente 12 mM KCl. I dati sono espressi come percentuale di liberazione di trizio residua rispetto alla liberazione di trizio indotta da solo stimolo depolarizzante. I dati sono espressi come media ± SEM e rappresentano la liberazione indotta da 12 mM KCl sopra la liberazione basale. \* p<0.05 vs 12 mM KCl.; ^ p<0.05 vs 12 mM KCl / 10 nM acido ellagico

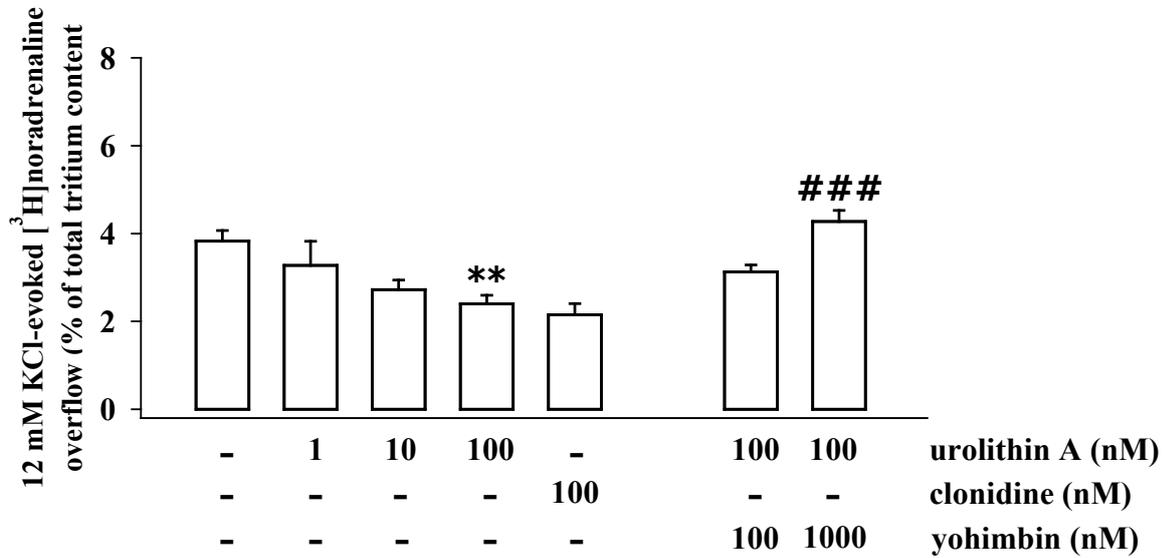
I dati funzionali descritti nelle figure 4 e 5 ci permettono di proporre che l'acido ellagico si comporti da agonista nei confronti dei recettori  $\alpha_2$  localizzati presinapticamente sulle terminazioni noradrenergiche ippocampali e inibisca quindi la liberazione di noradrenalina. Sulla base dei dati ad oggi disponibili in letteratura questo è il primo risultato sperimentale che dimostri in studi "in vitro" la capacità di acido ellagico di attivare in maniera specifica e con grande affinità questo tipo di recettori. Questi dati permettono di individuare un bersaglio cellulare per questo composto naturale, permettendo anche di ipotizzare azioni centrali che l'acido ellagico potrebbe svolgere interagendo selettivamente con questo recettore.

### **8.3 Effetto delle Urolitine A, B e C sulla liberazione di noradrenalina indotta da stimolo depolarizzante in terminazioni nervose di ippocampo di topo adulto: confronto con clonidina ed effetto di yohimbina.**

Come già discusso nell'introduzione di questa tesi, per quanto i risultati ottenuti con l'acido ellagico provino la sua capacità di modulare selettivamente uno specifico sottotipo recettoriale, è peraltro vero che da punto di vista funzionale la biodisponibilità limitata di questo composto renda abbastanza improbabile la possibilità che possa raggiungere ed interagire con questo recettore a livello ippocampale. Questo fatto limita ovviamente l'interesse di questa osservazione, ma al tempo stesso suggerisce di valutare se e in che misura i principali metaboliti dell'acido ellagico, le Urolitine A, B e C, note per avere un profilo farmacocinetico migliore che permette la loro distribuzione nell'organismo e anche il loro ingresso nel SNC, possano interagire con i recettori  $\alpha_2$ .

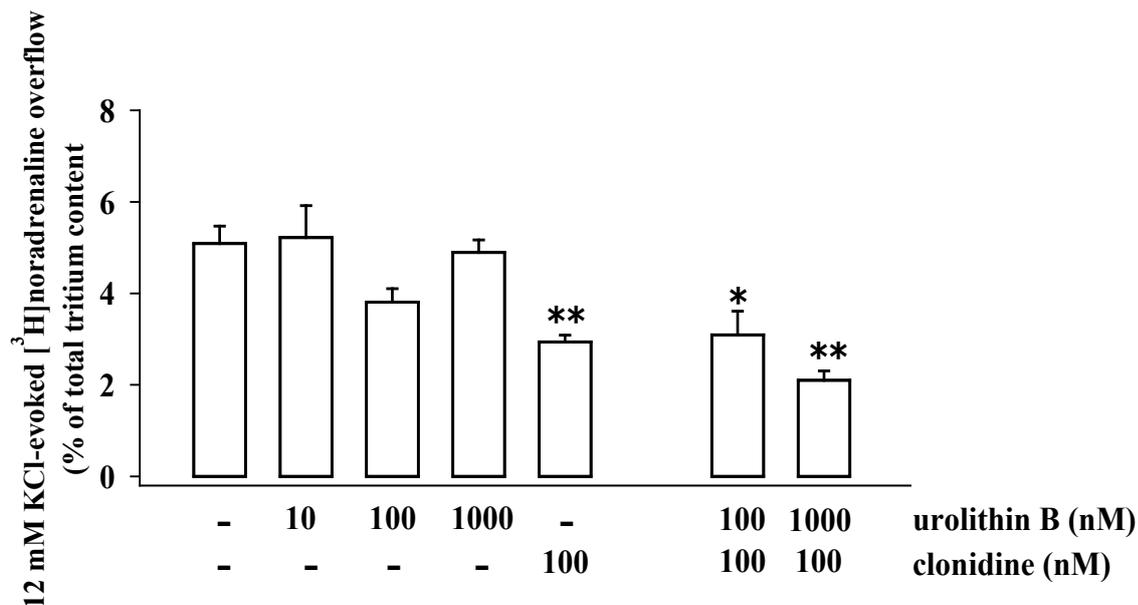
Per rispondere a questa domanda, ho svolto esperimenti in cui ho valutato l'impatto delle tre urolitine sulla liberazione di [ $^3\text{H}$ ]noradrenalina indotta da stimolo depolarizzante (12 mM KCl) da sinaptosomi ippocampali di topo maschio adulto. Per primo abbiamo studiato l'effetto di Urolitina A. I dati di questi esperimenti sono riportati nella Figure 6-e mostrano come Urolitina A sia in grado di mimare clonidina e quindi di inibire in maniera efficace la liberazione di [ $^3\text{H}$ ]noradrenalina da queste terminazioni. Urolitina A inibisce in maniera concentrazione dipendente la liberazione di trizio, esercitando un effetto massimo quando aggiunta alla concentrazione di 100 nM e il suo effetto è completamente annullato dalla presenza concomitante di yohimbina (1000 nM). È importante sottolineare come l'effetto indotto da Urolitina A

(100 nM) sia perfettamente sovrapponibile a quello causato da clonidina (100 nM).



**Figura 6:** relazione concentrazione-effetto della inibizione mediata da urolitina A sulla liberazione di [<sup>3</sup>H]noradrenalina indotto dall'esposizione transiente dei sinaptosomi in superfusione ad una soluzione iperpotassica contenente 12 mM KCl: confronto con Clonidina (100 nM) e antagonismo di yohimbina. I dati sono espressi come liberazione di trizio indotta dalla stimolazione iperpotassica in assenza o in presenza di Urolitina A e/o di clonidina. I dati sono espressi come media ± SEM e rappresentano la liberazione indotta da 12 mM KCl sopra la liberazione basale. \*\* p<0.01 vs 12 mM KCl.; ### p<0.001 vs 12 mM KCl / 100 nM Urolitina A.

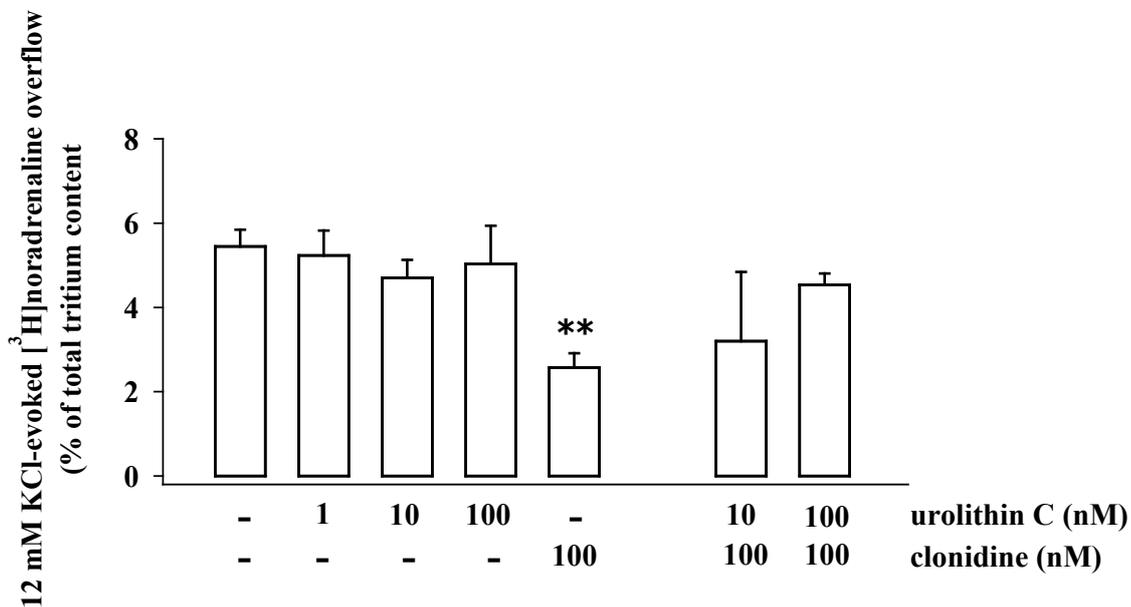
Ho quindi svolto un set di esperimenti simili utilizzando Urolitina B. In questo caso (Figura 7) i dati indicano chiaramente che Urolitina B non mima clonidina e quindi non modifica di per se la liberazione di [<sup>3</sup>H]noradrenalina indotta da stimolo depolarizzante. Inoltre, Urolitina B non è in grado di modificare l'effetto inibitorio esercitato da clonidina su questo parametro funzionale a suggerire che questa urolitina non interagisce con i recettori α<sub>2</sub>, né come un agonista che come un antagonista.



**Figura 7:** Urolitina B non modifica la liberazione di [<sup>3</sup>H]noradrenalina indotta dall'esposizione transiente dei sinaptosomi in superfusione ad una soluzione iperpotassica contenente 12 mM KCl né interferisce con l'inibizione causata da Clonidina (100 nM) sullo stesso parametro funzionale. I dati sono espressi come liberazione di trizio indotta dalla stimolazione iperpotassica in assenza o in presenza di Urolitina B e/o di clonidina. I dati sono espressi come media ± SEM e rappresentano la liberazione indotta da 12 mM KCl sopra la liberazione basale. \*\* p<0.01 vs 12 mM KCl.

Infine, ho analizzato nello stesso paradigma sperimentale gli effetti della Urolitina C. I dati ottenuti da questi esperimenti hanno descritto un quadro completamente diverso da quello osservato con Urolitina A e B. In particolare è emerso che Urolitina C (1-100 nM) non è in grado di per se di modificare la liberazione di [<sup>3</sup>H]noradrenalina indotta da 12 mM KCl, ma, quando aggiunta concomitantemente a clonidina, riduce l'effetto inibitorio causato dall'agonista  $\alpha_2$ . Infatti, in presenza di Urolitina C, clonidina (100 nM) non è più in grado di ridurre in maniera significativa il rilascio di trizio. In generale, questi dati sperimentali suggeriscono che Urolitina C si comporti come un antagonista nei confronti del recettore  $\alpha_2$ , impedendone l'attivazione da parte

di agonisti puri come clonidina e probabilmente noradrenalina, l'agonista naturale (Figura 8).



**Figura 8:** Urolitina C non modifica la liberazione di [<sup>3</sup>H]noradrenalina indotta dall'esposizione transiente dei sinaptosomi in superfusione ad una soluzione iperpotassica contenente 12 mM KCl ma previene l'inibizione causata da Clonidina (100 nM) nello stesso paradigma sperimentale. I dati sono espressi come liberazione di trizio indotta dalla stimolazione iperpotassica in assenza o in presenza di Urolitina C e/o di clonidina. I dati sono espressi come media  $\pm$  SEM e rappresentano la liberazione indotta da 12 mM KCl sopra la liberazione basale. \*\* p<0.01 vs 12 mM KCl.

## 9. Conclusioni e ipotesi future

I risultati dell'attività sperimentale da me svolte nell'ambito della tesi sperimentale hanno incrementato la conoscenza del meccanismo d'azione e degli effetti svolti da acido ellagico e dalle Urolitine nel SNC. I risultati indicano l'autorecettore presinaptico inibitorio di tipo  $\alpha_2$  come un bersaglio preferenziale di queste molecole, suggerendo quindi l'innervazione simpatica noradrenergica come uno dei sistemi controllati da questi prodotti naturali. Vista l'implicazione del sistema simpatico a livello periferico nel controllo della funzionalità degli organi e considerato il suo ruolo primario nell'attività cerebrale centrale (il sistema noradrenergico è deputato al controllo degli stadi emotivi e relazionali dell'individuo con le altre persone e con l'ambiente esterno, nei meccanismi di apprendimento e negli stati di ansia e depressione), la supplementazione con fonti di acido ellagico potrebbe permettere un controllo sull'efficienza di questi sistemi, come in effetti già ipotizzato in letteratura.

L'ipotesi è molto interessante, ma va affrontata e discussa in maniera corretta. I dati descritti in questa tesi infatti dimostrano una eterogeneità di risposte indotte dai metaboliti primari dell'acido ellagico, ed in particolare delle Urolitine A e C, variabilità che devono essere assolutamente prese in considerazione prima di ipotizzare interventi mirati al controllo e ripristino fisiologico dell'innervazione noradrenergica. I dati descritti in questa tesi infatti suggeriscono che Urolitina A e Urolitina C svolgono ruoli opposti sullo stesso recettore, la prima mimando la clonidina e quindi agendo come un agonista sui recettori  $\alpha_2$ , la seconda impedendo l'effetto di clonidina e quindi comportandosi come un antagonista.

Come discusso nell'introduzione a questa tesi, è logico immaginare che gli effetti centrali determinati dalla supplementazione dietetica con fonti di acido ellagico sia

dipendente dal metabotipo dell'individuo e quindi, dalla specializzazione / composizione della sua flora batterica intestinale. Questo parametro sarà in grado di determinare la produzione metabolica di urolitine da acido ellagico ed in particolare definirà il rapporto tra la produzione di urolitina A e urolitina C. Nel caso il metabotipo porti ad una maggiore produzione di urolitina A, avremo un prevalere di questo metabolita che potrà attivare in maniera continua ( e non fasica come la noradrenalina) i recettori  $\alpha_2$ , determinando nelle prime fasi della supplementazione alimentare un maggior autocontrollo della liberazione di noradrenalina e quindi in definitiva ad un effetto inibitorio del tono noradrenergico centrale. Questa attivazione probabilmente verrà modificata in seguito a somministrazione prolungata, in quanto in questo caso è possibile ipotizzare che i recettori continuamente attivati dall'agonista esogeno vengano disattivati, a causa di una desensibilizzazione dei meccanismi di autocontrollo, favorendo l'innervazione noradrenergica, con una sequenza di eventi cellulari e molecolari reminescenti degli adattamenti causati dalla terapia cronica-continuativa con antidepressivi inibitori della ricaptazione di noradrenalina. Nei pazienti caratterizzati da un metabotipo che porti prevalentemente alla produzione di Urolitina C si dovrebbe invece osservare sin dall'inizio della supplementazione una diminuzione dei meccanismi di autocontrollo presinaptici noradrenergici, a causa della elevata biodisponibilità di urolitina C che blocca gli autorecettori  $\alpha_2$ , e quindi osservare acutamente quegli effetti che nel metabotipo che produce preferibilmente urolitina A si dovrebbero osservare in seguito a trattamento cronico.

Risulta quindi evidente che nel caso si voglia ipotizzare una supplementazione dietetica con cibi fonti naturali di ellagitannini e acido ellagico è fondamentale prima definire il metabotipo del paziente, per prevedere quale sia il metabolismo principale di questi composti e quindi il loro impatto sull'individuo. Queste osservazioni

sottolineano come il concetto di supplementazione dietetica abbia delle caratteristiche personali / individuali che devono essere discusse prima di procedere con consigli dietetici per il raggiungimento di effetti salutari negli individui.

## Bibliografia

1. Gupta A, Singh AK, Kumar R, Jamieson S, Pandey AK, Bishayee A. Neuroprotective Potential of Ellagic Acid: A Critical Review. *Advances in Nutrition*. luglio 2021;12(4):1211–38.
2. Cosa sono i nutraceutici, a cosa servono, cosa possono fare e cosa non devono fare | SIF Magazine [Internet]. [citato 1 maggio 2024]. Disponibile su: <https://www.sifweb.org/sif-magazine/articolo/cosa-sono-i-nutraceutici-a-cosa-servono-cosa-possono-fare-e-cosa-non-devono-fare-2021-01-30>
3. Nutraceutica, aree grigie e limiti legislativi [Internet]. [citato 1 maggio 2024]. Disponibile su: <http://www.nutrientiesupplementi.it/norme-sicurezza/item/1732-nutraceutica-aree-grigie-e-limiti-legislativi>
4. Cosa c'è da sapere se si parla di nutraceutici, integratori alimentari e botanicals | SIF Magazine [Internet]. [citato 1 maggio 2024]. Disponibile su: <https://www.sifweb.org/sif-magazine/articolo/cosa-c-e-da-sapere-se-si-parla-di-nutraceutici-integratori-alimentari-e-botanicals-2021-01-26>
5. Chopra AS, Lordan R, Horbańczuk OK, Atanasov AG, Chopra I, Horbańczuk JO, et al. The current use and evolving landscape of nutraceuticals. *Pharmacological Research*. gennaio 2022;175:106001.
6. User S. ISSalute. 2021 [citato 1 maggio 2024]. Acidi grassi Omega-3. Disponibile su: <https://www.issalute.it/index.php/la-salute-dalla-a-alla-z-menu/a/acidi-grassi-omega-3>
7. [www.sifweb.org/sif-magazine](https://www.sifweb.org/sif-magazine) [Internet]. [citato 1 maggio 2024]. I flavonoidi nei disturbi della circolazione delle gambe | SIF Magazine. Disponibile su: <https://www.sifweb.org/sif->

magazine/articolo/sifweb.org//sif-magazine/articolo/i-flavonoidi-per-la-salute-delle-nostre-gambe-funzionano-davvero-2024-04-04

8. Dama A, Shpati K, Daliu P, Dumur S, Gorica E, Santini A. Targeting Metabolic Diseases: The Role of Nutraceuticals in Modulating Oxidative Stress and Inflammation. *Nutrients*. 10 febbraio 2024;16(4):507.
9. User S. ISSalute. 2022 [citato 1 maggio 2024]. Coenzima Q. Disponibile su: <https://www.issalute.it/index.php/la-salute-dalla-a-alla-z-menu/c/coenzima-q>
10. [www.sifweb.org/sif-magazine](http://www.sifweb.org/sif-magazine) [Internet]. [citato 1 maggio 2024]. Isoflavoni | SIF Magazine. Disponibile su: <https://www.sifweb.org/sif-magazine/voci-di-supporto/sifweb.org//sif-magazine/voci-di-supporto/isoflavoni>
11. Prebiotici e probiotici: cosa sono e a cosa servono | Humanitas Salute [Internet]. [citato 1 maggio 2024]. Disponibile su: <https://www.humanitasalute.it/in-salute/99208-prebiotici-e-probiotici-cosa-sono-e-a-cosa-servono/>
12. User S. ISSalute. 2020 [citato 1 maggio 2024]. Selenio. Disponibile su: <https://www.issalute.it/index.php/la-salute-dalla-a-alla-z-menu/s/selenio>
13. Alfei S, Turrini F, Catena S, Zunin P, Grilli M, Pittaluga AM, et al. Ellagic acid a multi-target bioactive compound for drug discovery in CNS? A narrative review. *Eur J Med Chem*. 1 dicembre 2019;183:111724.
14. Romeo I, Vallarino G, Turrini F, Roggeri A, Olivero G, Boggia R, et al. Presynaptic Release-Regulating Alpha2 Autoreceptors: Potential Molecular Target for Ellagic Acid Nutraceutical Properties. *Antioxidants*. 4 novembre 2021;10(11):1759.

15. Turrini F, Malaspina P, Giordani P, Catena S, Zunin P, Boggia R. Traditional Decoction and PUAE Aqueous Extracts of Pomegranate Peels as Potential Low-Cost Anti-Tyrosinase Ingredients. *Applied Sciences*. 17 aprile 2020;10(8):2795.
16. Ifeanyichukwu UL, Fayemi OE, Ateba CN. Green Synthesis of Zinc Oxide Nanoparticles from Pomegranate (*Punica granatum*) Extracts and Characterization of Their Antibacterial Activity. *Molecules*. 2 ottobre 2020;25(19):4521.
17. Turrini F, Boggia R, Donno D, Parodi B, Beccaro G, Baldassari S, et al. From pomegranate marcs to a potential bioactive ingredient: a recycling proposal for pomegranate-squeezed marcs. *Eur Food Res Technol*. febbraio 2020;246(2):273–85.
18. Tzulker R, Glazer I, Bar-Ilan I, Holland D, Aviram M, Amir R. Antioxidant Activity, Polyphenol Content, and Related Compounds in Different Fruit Juices and Homogenates Prepared from 29 Different Pomegranate Accessions. *J Agric Food Chem*. 1 novembre 2007;55(23):9559–70.
19. García-Niño WR, Zazueta C. Ellagic acid: Pharmacological activities and molecular mechanisms involved in liver protection. *Pharmacological Research*. luglio 2015;97:84–103.
20. Turrini F, Zunin P, Catena S, Villa C, Alfei S, Boggia R. Traditional or hydro-diffusion and gravity microwave coupled with ultrasound as green technologies for the valorization of pomegranate external peels. *Food and Bioproducts Processing*. settembre 2019;117:30–7.
21. Gasperotti M, Passamonti S, Tramer F, Masuero D, Guella G, Mattivi F, et al. Fate of Microbial Metabolites of Dietary Polyphenols in Rats: Is the Brain Their Target Destination? *ACS Chem Neurosci*. 19 agosto 2015;6(8):1341–52.

22. Bialonska D, Kasimsetty SG, Khan SI, Ferreira D. Urolithins, Intestinal Microbial Metabolites of Pomegranate Ellagitannins, Exhibit Potent Antioxidant Activity in a Cell-Based Assay. *J Agric Food Chem.* 11 novembre 2009;57(21):10181–6.
23. Iglesias-Aguirre CE, González-Sarrías A, Cortés-Martín A, Romo-Vaquero M, Osuna-Galisteo L, Cerón JJ, et al. *In vivo* administration of gut bacterial consortia replicates urolithin metabotypes A and B in a non-urolithin-producing rat model. *Food Funct.* 2023;14(6):2657–67.
24. García-Villalba R, Giménez-Bastida JA, Cortés-Martín A, Ávila-Gálvez MÁ, Tomás-Barberán FA, Selma MV, et al. Urolithins: a Comprehensive Update on their Metabolism, Bioactivity, and Associated Gut Microbiota. *Molecular Nutrition Food Res.* novembre 2022;66(21):2101019.
25. Tomás-Barberán FA, García-Villalba R, González-Sarrías A, Selma MV, Espín JC. Ellagic Acid Metabolism by Human Gut Microbiota: Consistent Observation of Three Urolithin Phenotypes in Intervention Trials, Independent of Food Source, Age, and Health Status. *J Agric Food Chem.* 16 luglio 2014;62(28):6535–8.
26. Iglesias-Aguirre CE, García-Villalba R, Beltrán D, Frutos-Lisón MD, Espín JC, Tomás-Barberán FA, et al. Gut Bacteria Involved in Ellagic Acid Metabolism To Yield Human Urolithin Metabotypes Revealed. *J Agric Food Chem.* 8 marzo 2023;71(9):4029–35.
27. Alfei S, Marengo B, Zuccari G. Oxidative Stress, Antioxidant Capabilities, and Bioavailability: Ellagic Acid or Urolithins? *Antioxidants.* 4 agosto 2020;9(8):707.

28. Aleksandrova S, Alexova R, Dragomanova S, Kalfin R, Nicoletti F, Fagone P, et al. Preventive and Therapeutic Effects of Punica granatum L. Polyphenols in Neurological Conditions. *IJMS*. 17 gennaio 2023;24(3):1856.
29. Zhu H, Yan Y, Jiang Y, Meng X. Ellagic Acid and Its Anti-Aging Effects on Central Nervous System. *IJMS*. 19 settembre 2022;23(18):10937.
30. Ríos JL, Giner R, Marín M, Recio M. A Pharmacological Update of Ellagic Acid. *Planta Med*. ottobre 2018;84(15):1068–93.
31. Il rebus della malattia di Alzheimer e delle terapie presenti e future | SIF Magazine [Internet]. [citato 1 maggio 2024]. Disponibile su: <https://www.sifweb.org/sif-magazine/articolo/il-rebus-della-malattia-di-alzheimer-e-delle-terapie-presenti-e-future-2021-08-05>
32. [www.sifweb.org/sif-magazine](https://www.sifweb.org/sif-magazine) [Internet]. [citato 1 maggio 2024]. Parkinson e Alzheimer, due malattie croniche con gravi disabilità | SIF Magazine. Disponibile su: <https://www.sifweb.org/sif-magazine/articolo/sifweb.org//sif-magazine/articolo/parkinson-e-alzheimer-due-malattie-croniche-con-gravi-disabilita-2021-02-24>
33. Espín JC, Larrosa M, García-Conesa MT, Tomás-Barberán F. Biological Significance of Urolithins, the Gut Microbial Ellagic Acid-Derived Metabolites: The Evidence So Far. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2013;2013:1–15.
34. Vermeiren Y, De Deyn PP. Targeting the norepinephrinergic system in Parkinson's disease and related disorders: The locus coeruleus story. *Neurochemistry International*. gennaio 2017;102:22–32.
35. Schwarz LA, Luo L. Organization of the Locus Coeruleus-Norepinephrine System. *Current Biology*. novembre 2015;25(21):R1051–6.

36. Alpha- and beta-adrenergic receptors: Ahlquist's landmark hypothesis of a single mediator with two receptors | American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism [Internet]. [citato 1 maggio 2024]. Disponibile su: <https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/ajpendo.00664.2007>
37. Brunton LL, Chabner BA, Knollmann BC. Le basi farmacologiche della terapia. 12<sup>a</sup> ed. Vol. unico. zanichelli; 2012. 1768 p.
38. MacDonald E, Kobilka BK, Scheinin M. Gene targeting — homing in on  $\alpha$ 2-adrenoceptor-subtype function. Trends in Pharmacological Sciences. giugno 1997;18(6):211–9.
39. MacKinnon AC, Spedding M, Brown CM.  $\alpha$ 2-Adrenoceptors: more subtypes but fewer functional differences. Trends in Pharmacological Sciences. aprile 1994;15(4):119–23.
40. Marjamäki A, Ala-Uotila S, Luomala K, Perälä M, Jansson C, Jalkanen M, et al. Stable expression of recombinant human  $\alpha$ 2-adrenoceptor subtypes in two mammalian cell lines: characterization with [3H]rauwolscine binding, inhibition of adenylate cyclase and RNase protection assay. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research. marzo 1992;1134(2):169–77.
41. Rump LC, Bohmann C, Schaible U, Schöllhorn J, Limberger N.  $\alpha$ 2c-Adrenoceptor-modulated release of noradrenaline in human right atrium. British J Pharmacology. novembre 1995;116(6):2617–24.
42. Alberts P. Subtype classification of presynaptic  $\alpha$ 2-adrenoceptors. General Pharmacology: The Vascular System. gennaio 1993;24(1):1–8.

43. Winzer-Serhan UH, Raymon HK, Broide RS, Chen Y, Leslie FM. Expression of  $\alpha 2$  adrenoceptors during rat brain development—I.  $\alpha 2A$  messenger RNA expression. *Neuroscience*. dicembre 1996;76(1):241–60.
44. MacDonald E, Scheinin M. Distribution and pharmacology of alpha 2-adrenoceptors in the central nervous system. *J Physiol Pharmacol*. settembre 1995;46(3):241–58.
45. Hunter JC, Fontana DJ, Hedley LR, Jasper JR, Lewis R, Link RE, et al. Assessment of the role of  $\alpha 2$  -adrenoceptor subtypes in the antinociceptive, sedative and hypothermic action of dexmedetomidine in transgenic mice. *British J Pharmacology*. dicembre 1997;122(7):1339–44.
46. User S. ISSalute. 2018 [citato 4 maggio 2024]. Glaucoma. Disponibile su: <https://www.issalute.it/index.php/la-salute-dalla-a-alla-z-menu/g/glaucoma>
47. User S. ISSalute. 2019 [citato 4 maggio 2024]. Sindrome o fenomeno di Raynaud. Disponibile su: <https://www.issalute.it/index.php/la-salute-dalla-a-alla-z-menu/s/sindrome-o-fenomeno-di-raynaud>
48. Temiz-Resitoglu M, Kucukkavruk SP, Guden DS, Cecen P, Sari AN, Tunctan B, et al. Activation of mTOR/I $\kappa$ B- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B pathway contributes to LPS-induced hypotension and inflammation in rats. *Eur J Pharmacol*. 5 maggio 2017;802:7–19.
49. Boggia R, Turrini F, Roggeri A, Olivero G, Cisani F, Bonfiglio T, et al. Neuroinflammation in Aged Brain: Impact of the Oral Administration of Ellagic Acid Microdispersion. *IJMS*. 21 maggio 2020;21(10):3631.

