



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE
Corso di Laurea
Scienze Biologiche

I polifenoli EVOO esercitano effetti antinfiammatori sulle Cellule della microglia attraverso la via di segnalazione TREM2

EVOO Polyphenols Exert Anti-Inflammatory Effects on the Microglia Cells through TREM2 Signaling Pathway

Tesi di Laurea di:
Giulia Bigelli

Sessione AUTUNNALE
Anno Accademico 2022/2023

Docente referente
Chiar.ma Prof.ssa
Maura Benedetti

ABSTRACT

La malattia di Alzheimer (AD), risulta essere caratterizzata dall'accumolo a livello del cervello di placche senili extracellulari e da grovigli fibrillari neuronali intracellulari.

Le cellule della microglia, «macrofagi» del sistema nervoso centrale, risultano essere coinvolte nella neuroinfiammazione.

Queste ultime vanno ad assumere nell'AD e in molte altre malattie neurodegenerative un fenotipo patologico cronicamente infiammatorio e neurotossico specifico (MGnD).

Importante per lo studio è il recettore TREM2, espresso principalmente dalla microglia supportandone la sopravvivenza e stimolandone la proliferazione.

Le rare varianti eterozigoti di questo recettore risultano essere collegate ad un aumento del rischio di sviluppare AD ad esordio tardivo (LOAD) e, in modo specifico, la via TREM2-APOE è coinvolta nel cambiamento del fenotipo della microglia nelle malattie neurodegenerative.

Si sono eseguiti una serie di test in vitro utilizzando modelli cellulari neuronali umani (SH-SY5Y) e microgliali (BV2 e C13N); le cellule sono state trattate in modo differenziale con polifenoli di olio extra vergine di oliva (EVOO), tra cui Oleuropeina aglicone (OleA) e idrossitirosolo (HT) prima di aggiungere LPS.

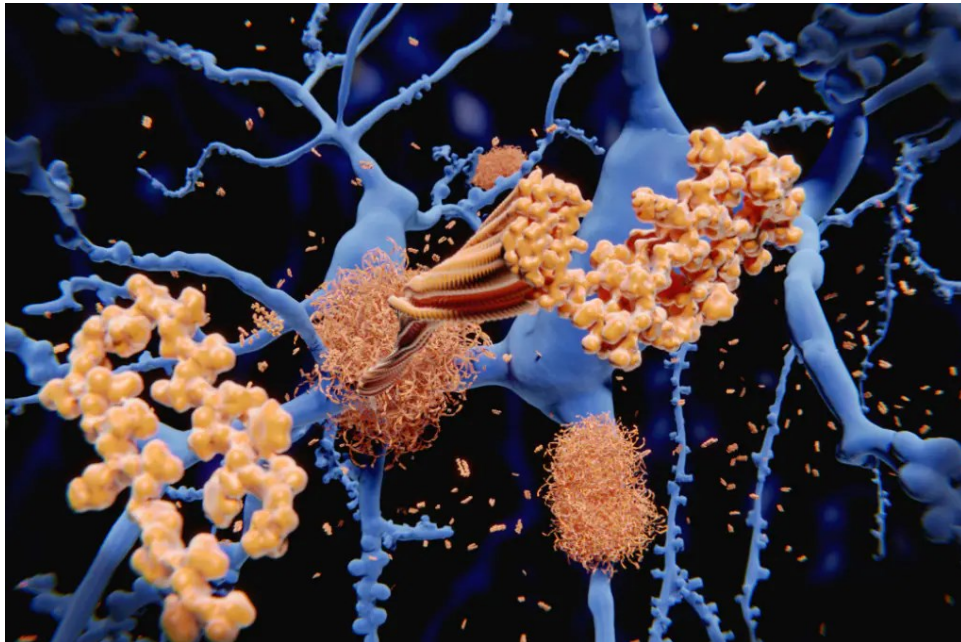
Successivamente, grazie ad una serie di test biochimici e di biologia cellulare come , ELISA, MTT, rilevamento ROS, Western blotting e immunofluorescenza sono state valutate le proprietà anti-neuroinfiammatorie di OleA e HT e il loro possibile utilizzo per ritardare o migliorare l'insorgenza e la progressione della neurodegenerazione cronica.

I risultati ottenuti dai vari test testimoniano che i due polifenoli agiscono in termini di :

- riduzione dello stress ossidativo e del danno mitocondriale;
- riduzione del rilascio di citochine proinfiammatorie (IL-6, IL-8, IP-10 e RANTES);
- diminuzione della traslocazione nucleare di Nf- κ B e miglioramento dello squilibrio della segnalazione TREM2;
- potenziamento dell'attività protettiva della microglia favorendo il fenotipo di polarizzazione 2.

Tali risultati forniscono nuove importanti intuizioni sui meccanismi attraverso i quali i polifenoli alimentari delle olive potrebbero essere utilizzati per migliorare l'attività protettiva della microglia e per apportare benefici contro la neuroinfiammazione e deterioramento neuronale.

INTRODUZIONE : ALZHEIMER E MICROGLIA



Alzheimer: forma più comune di demenza
degenerativa progressivamente
invalidante

Si osservano nel cervello:

- placche senili extracellulari contenenti il peptide amiloide- β polimerizzato
- grovigli fibrillari neuronali intracellulari (NTF) dati dalla polimerizzazione della proteina tau iperfosforilata (p-tau)

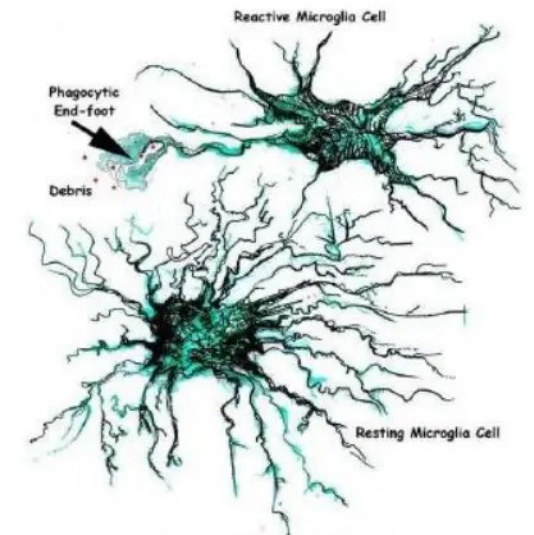
Sono coinvolte nel mantenimento
dell'omeostasi cerebrale:

Cellule della microglia

Astrociti

«Macrofagi» del
SNC

coinvolte nella
neuroinfiammazione



INTRODUZIONE MICROGLIA E RECETTORE TREM2

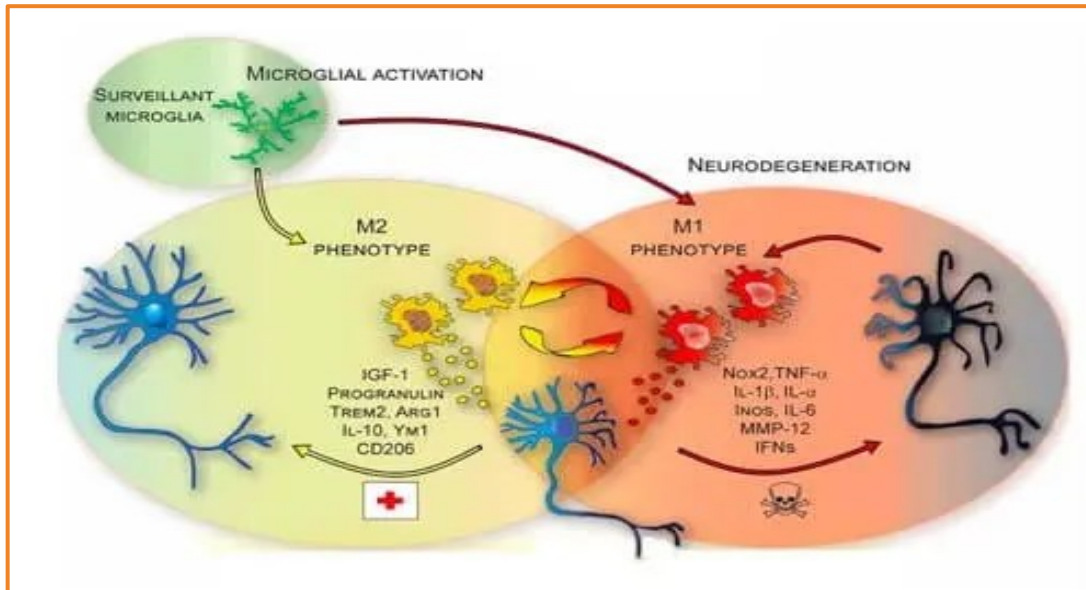
MICROGLIA

In base allo stato morfologico
e funzionale

Ramificata
(inattivata)

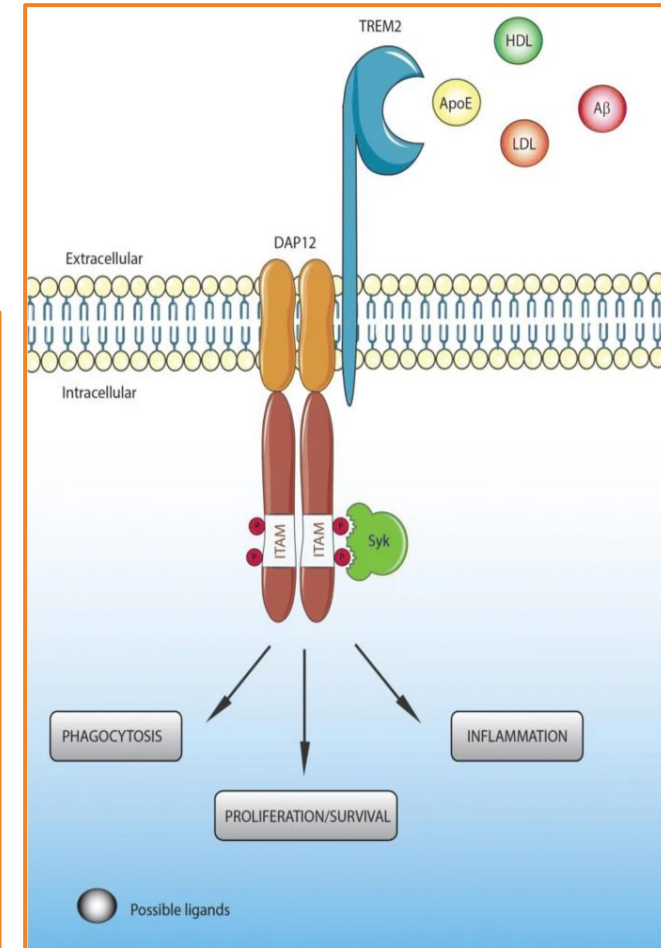
Ameboide/fagocitica (attivata)

- Fenotipo M1
- Fenotipo M2
- Fenotipo patologico (MGnD)



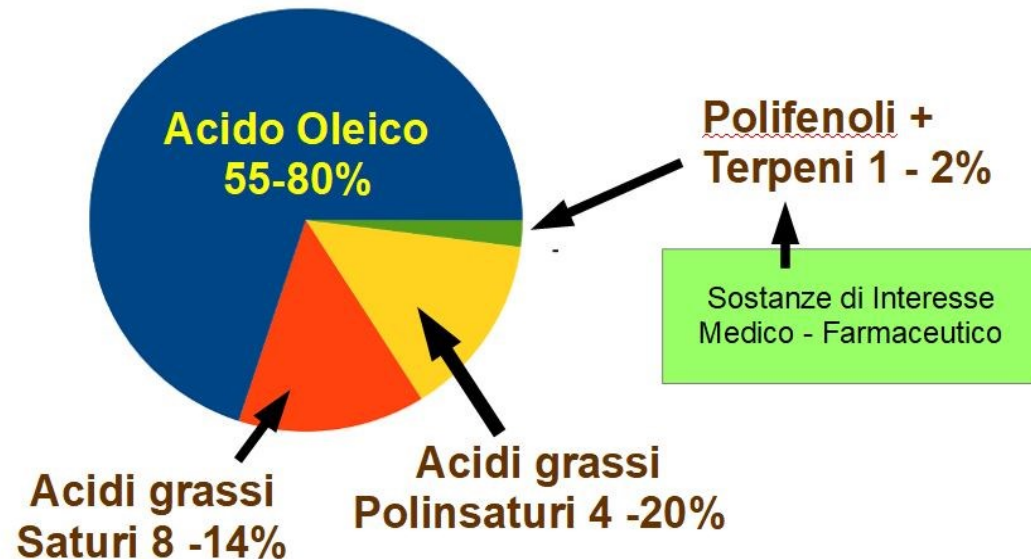
RECETTORE TREM2:

- Varianti eterozigoti di TREM2 sono collegate ad un aumento del rischio di sviluppare AD ad esordio tardivo (LOAD).
- La via TREM2-APOE è vista come un regolatore del cambiamento del fenotipo della microglia nelle malattie neurodegenerative



SCOPO DEL LAVORO I POLIFENOLI EVOO

Composizione dell'Olio Extra Vergine di Oliva



1) Valutare le proprietà anti-neuroinfiammatorie di:

- Oleuropeina aglicone (OleA)
- Idrossitirosolo (HT)

Polifenoli EVOO

2) Osservare gli effetti dei polifenoli naturali dell'EVOO in cellule microgliali BV-2 attivate a seguito di stress acuto, come la **stimolazione con LPS**

3) Verificare se queste molecole possono essere utilizzate per poter **ritardare o migliorare l'insorgenza e la progressione della neurodegenerazione cronica**

MATERIALI E METODI

Linee cellulari utilizzate :

- Cellule microgliali BV-2 murine
- Cellule microgliali C13NJ umane

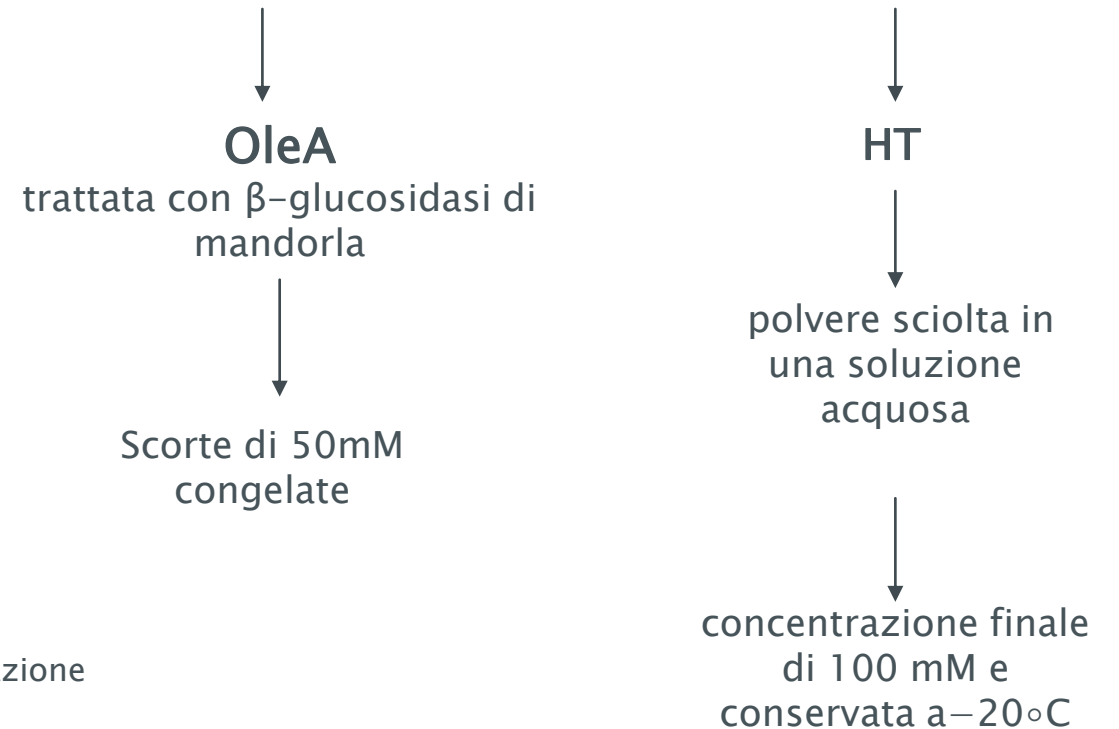


- **Saggio di riduzione dell'MTT**

Trattamento cellule nei pozzetti con Olea, HT, LPS, e altre sostanze.
Aggiunta di 100 μ L di soluzione MTT (0,5 mg/mL) e successivamente misurazione dell'assorbanza

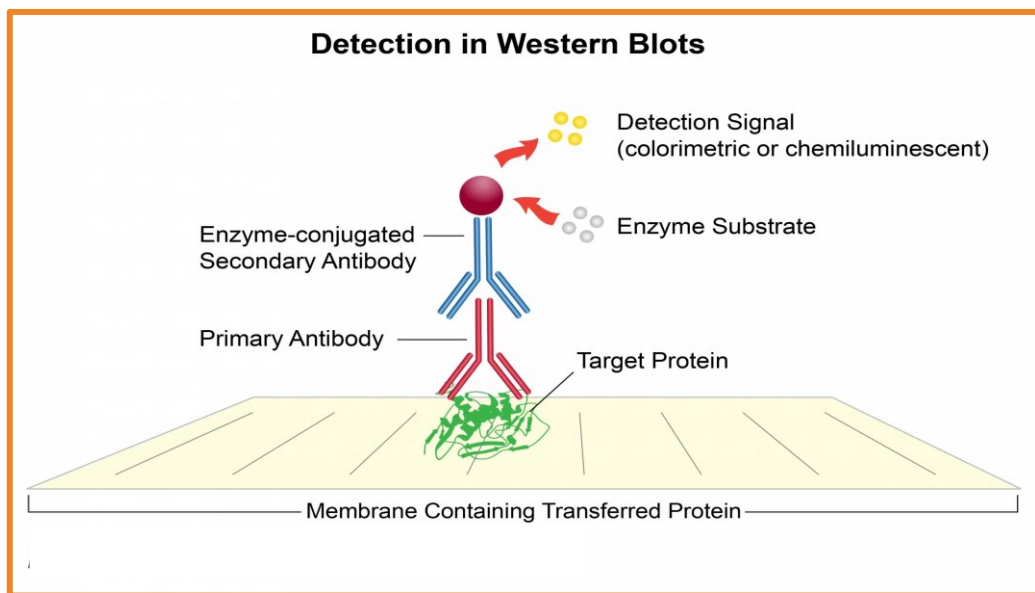
- **Rilevazione i livelli intracellulari di ROS** attraverso un lettore di micropiastre a fluorescenza

Preparazione campioni dei polifenoli:



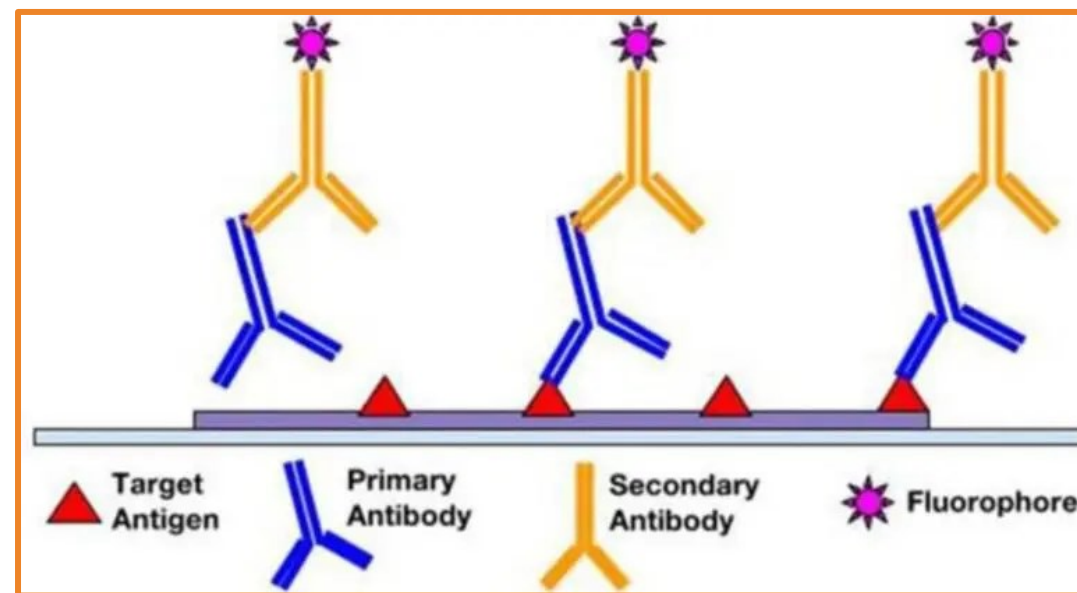
MATERIALI E METODI

Western Blot



- Analisi con anticorpi primari e secondari specifici per TREM2;
- Rilevazione bande proteiche e acquisizione dei segnali chemiluminescenti;
- Analisi densitometrica.

Immunofluorescenza



- Utilizzo di anticorpi primari e secondari specifici per TREM2;
- Raccolta delle immagini a colori utilizzando un microscopio a scansione;
- Generazione di fotomontaggi e la quantificazione dei segnali.

MATERIALI E METODI

Nitric Oxide Assay

- Determinazione della concentrazione di nitriti nei campioni .
- L'intensità di assorbimento è stata misurata alla lunghezza d'onda di 540 nm utilizzando un lettore di micropiastre.

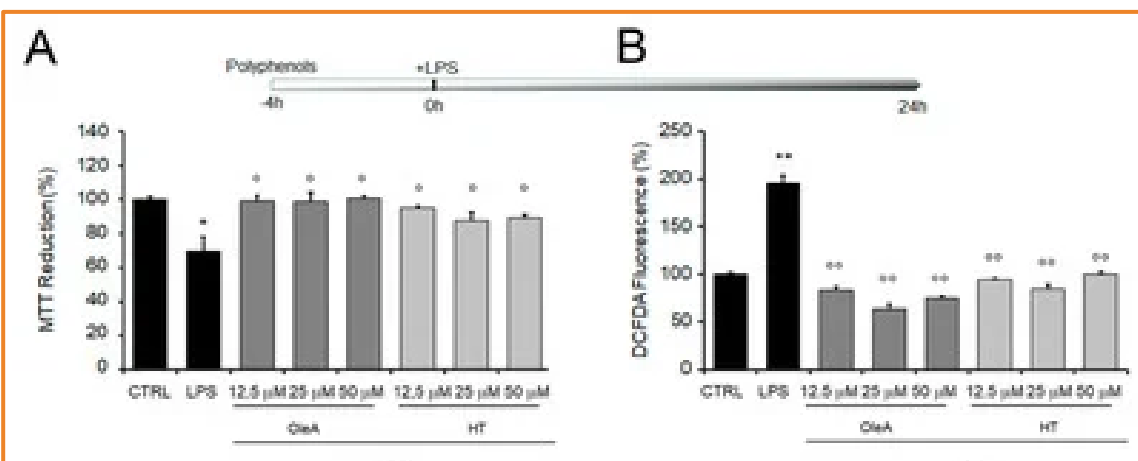
Determinazione rilascio citochine

- Il terreno di cultura in cui son state coltivate le cellule C13NJ precedentemente trattate, viene poi centrifugato e sottoposto a screening per la concentrazione di Interleuchine ,FGF,G-CSF e altri fattori.
- Test basato su sfere magnetiche.

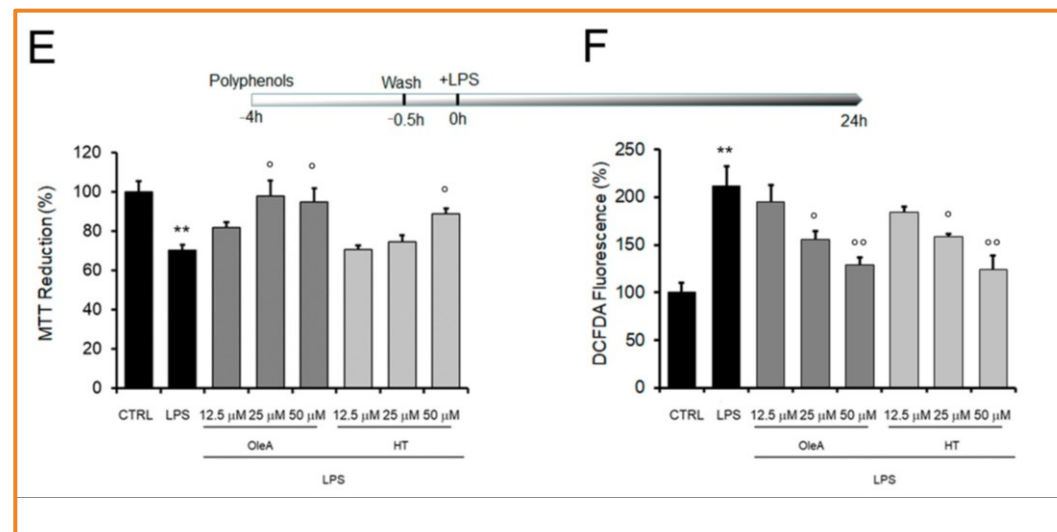
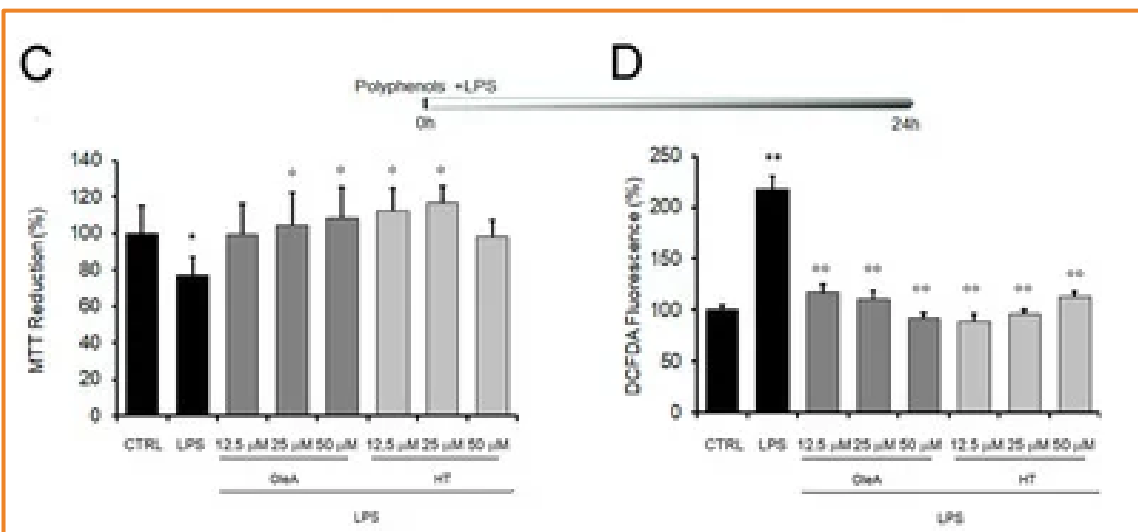
Saggio di citotossicità sulle cellule neuronali dei fattori rilasciati dalla microglia

- Le cellule di neuroblastoma umano SH-SY5Y dopo essere state seminate e coltivate, sono state trattate con il mezzo condizionato raccolto dalle cellule C13NJ trattate precedentemente con LPS .
- Esecuzione dei saggi MTT e ROS .

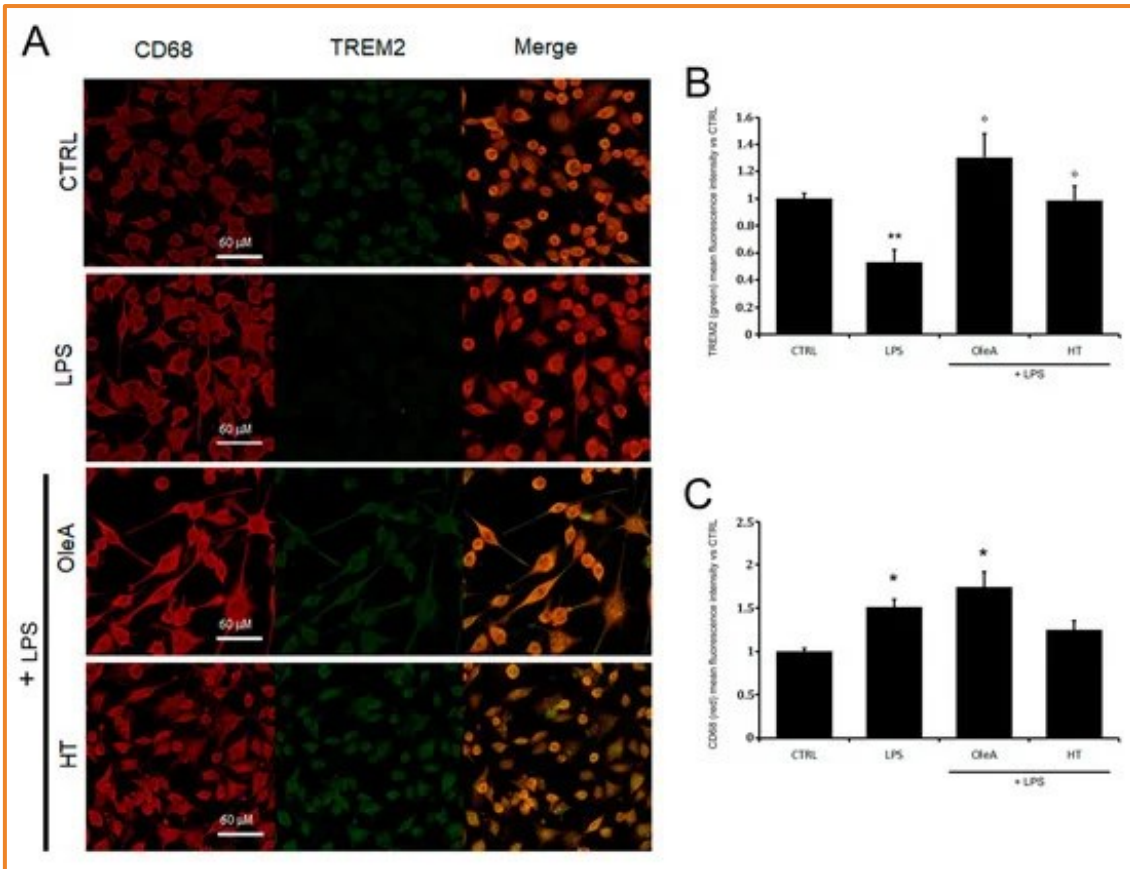
RISULTATI



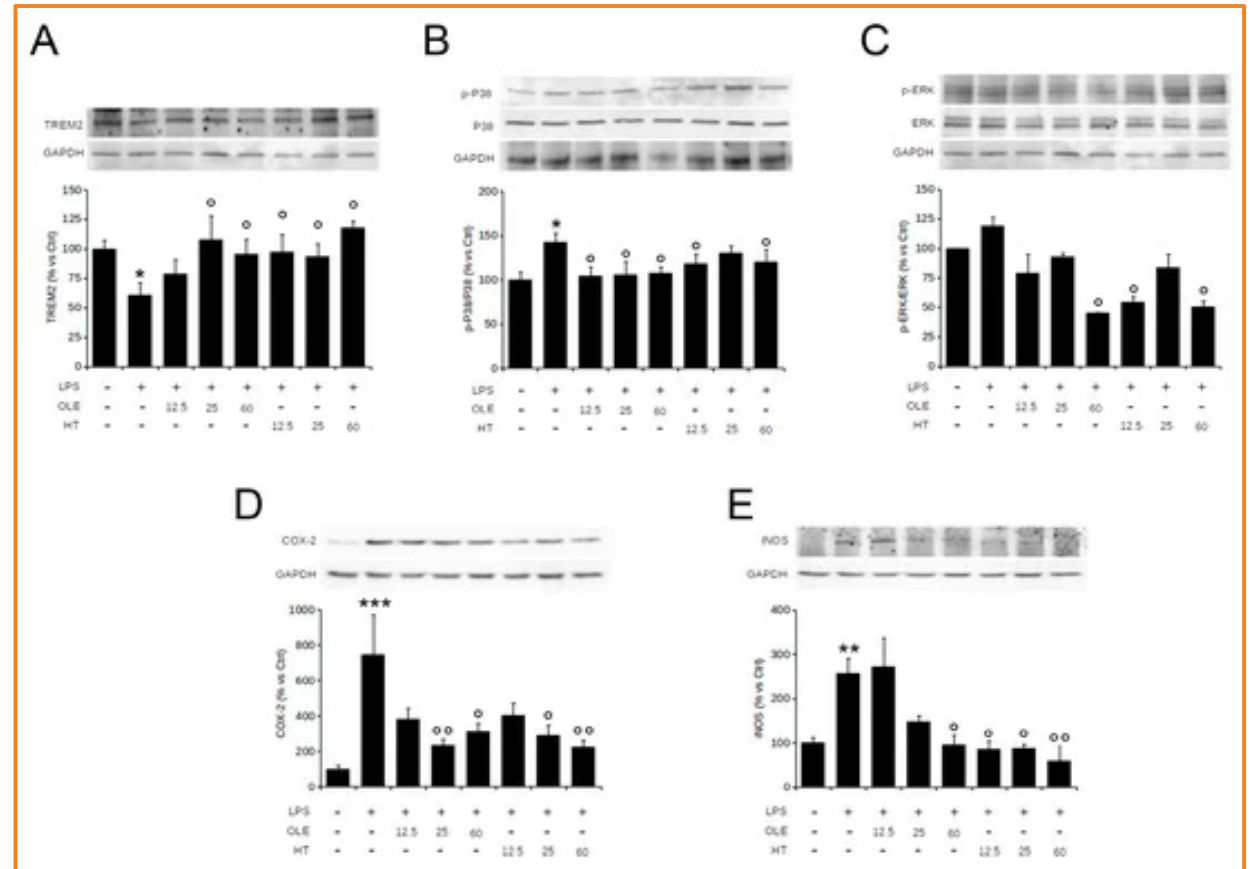
1) OleA e HT riducono lo stress ossidativo e il danno mitocondriale nelle cellule BV2 esposte a LPS



RISULTATI

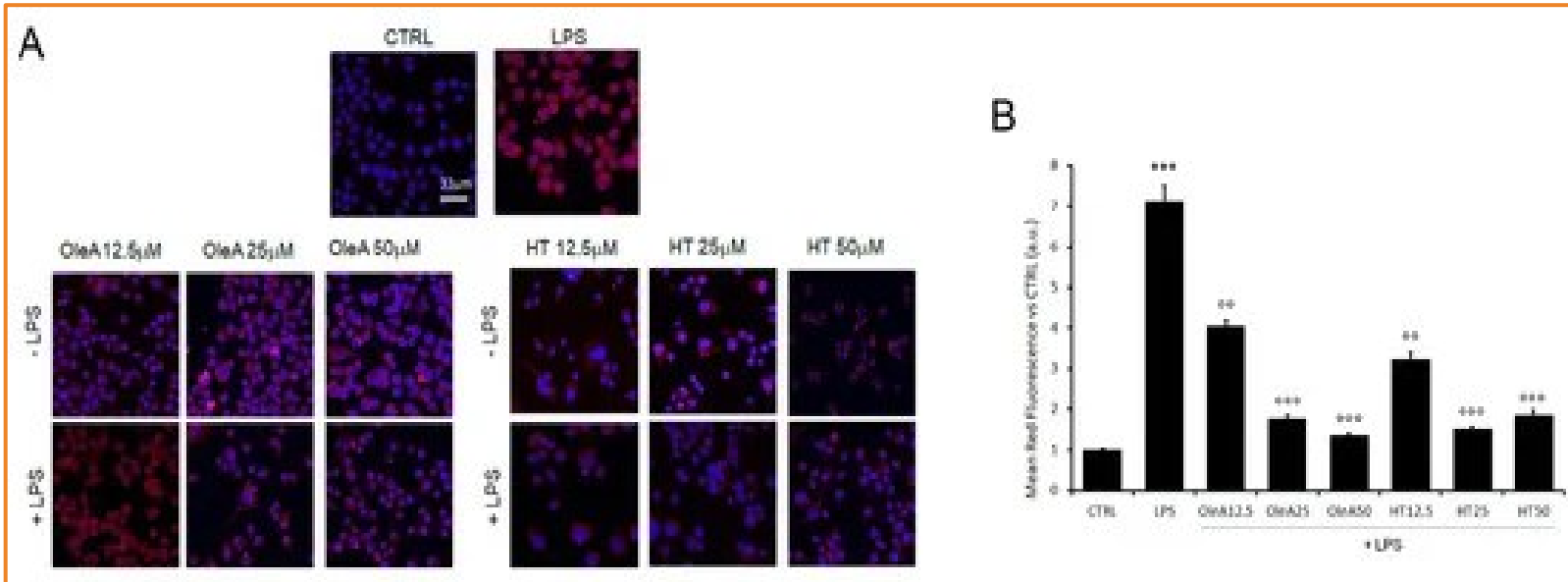


2) L'LPS induce una diminuzione dei livelli di TREM2 che viene prevenuta dall'esposizione cellulare a entrambi i polifenoli.



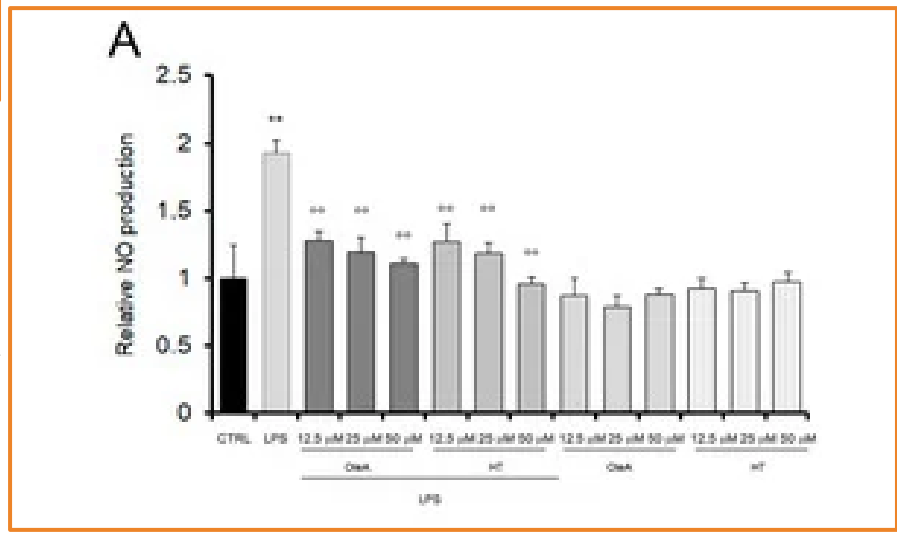
3) OleA e HT inibiscono la segnalazione della via proinfiammatoria TREM2-ERK-p38 e riducono l'espressione di iNOS e COX-2 indotta da LPS

RISULTATI

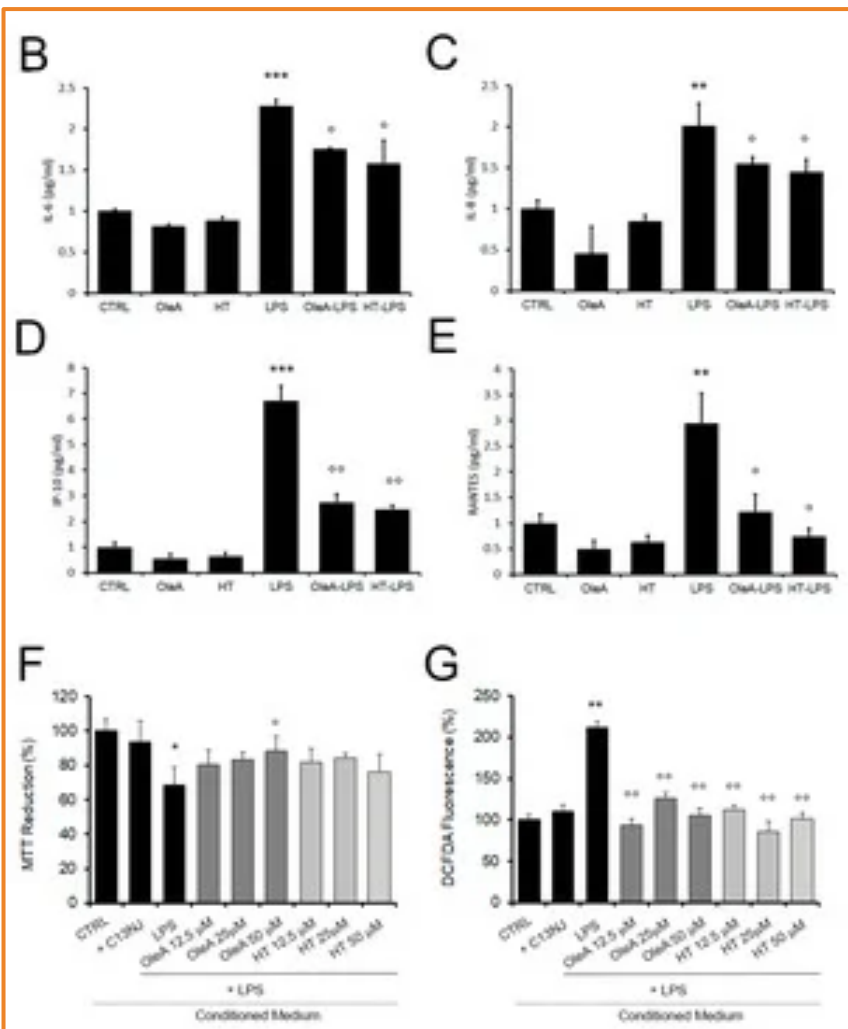


4) OleA e HT sopprimono la fosforilazione indotta da LPS e la traslocazione nucleare di NF- κ B

5.1) Relazione tra i due polifenoli e la produzione di ossido nitrico (NO), altro principale regolatore della risposta infiammatoria.

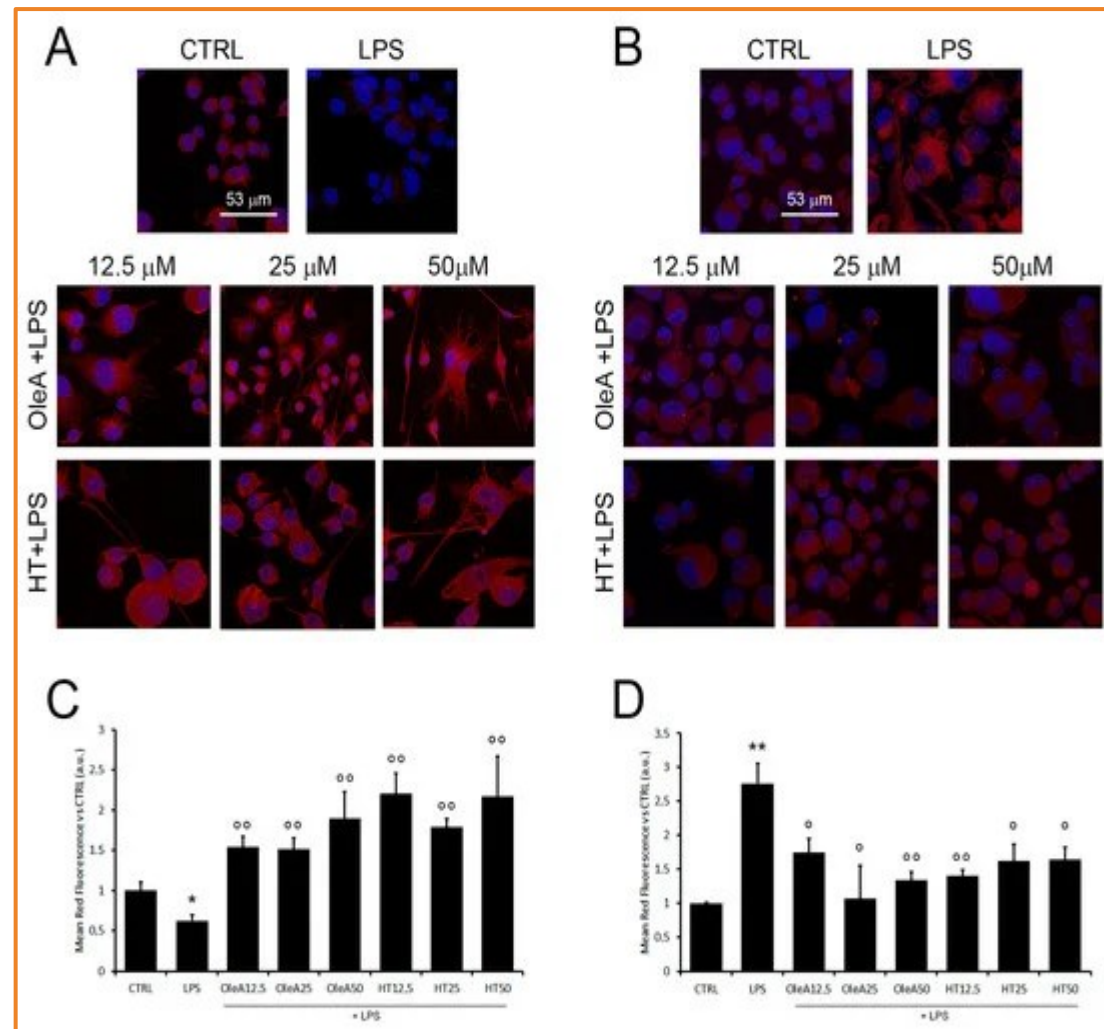


RISULTATI



5.2) OleA e HT riducono il rilascio di citochine e chemochine proinfiammatorie nelle cellule esposte a LPS

6) OleA e HT promuovono la polarizzazione della microglia verso il fenotipo M2



CONCLUSIONI

- ❖ L'utilizzo di Olea e HT, come di altri composti naturali, comporta bassi livelli di effetti collaterali, buona tollerabilità nei pazienti e relativo rapporto costo-efficacia . Questi possono inoltre essere facilmente somministrati attraverso il cibo e non presentano reazioni avverse nell'uomo.
- ❖ I due polifenoli studiati esercitano i loro effetti neuroprotettivi attraverso la loro capacità di attraversare la barriera emato-encefalica.
Questa peculiarità rende i polifenoli dell'olio EVO potenziali strumenti nutraceutici e promette l'uso realistico di questi principi attivi nel trattamento della neuroinfiammazione.
- ❖ Attraverso questo studio si è potuto osservare il ruolo svolto dai principali polifenoli dell'EVOO nel modulare la differenziazione microgliale e nel modificarne la polarizzazione.
- ❖ Si può quindi dedurre che l'utilizzo di questi ultimi può migliorare l'attività protettiva della microglia e possono essere adottati come approccio terapeutico (o preventivo) o in aggiunta alla terapia convenzionale per consentire alla microglia residente di innescare una risposta precoce contro i disturbi neurodegenerativi.

BIBLIOGRAFIA

- Leri, Manuela, et al. "EVOO Polyphenols Exert Anti-Inflammatory Effects on the Microglia Cell through TREM2 Signaling Pathway." *Pharmaceuticals* 16.7 (2023): 933. <https://doi.org/10.3390/ph16070933>
- Knapskog, Anne-Brita, et al. "Alzheimer's disease-diagnosis and treatment." *Tidsskrift for den Norske laegeforening: tidsskrift for praktisk medicin, ny raekke* 141.7 (2021). <https://doi.org/10.4045/tidsskr.20.0919>
- «Morbo di Alzheimer : le cause della malattia» [Morbo di Alzheimer: le cause della malattia | MEDICINA ONLINE](#)
- Immagine 1: «Alzheimer: perché quelle placche nel cervello non sono sempre collegate a demenza» https://www.focus.it/site_stored/imgs/0005/044/alzheimer-placche.1020x680.jpg
- Immagine 2-3: «La microglia : un focus sulle cellule immunitarie del nostro cervello» <https://www.microbiologiaitalia.it/wp-content/uploads/2020/02/microglia-cell.jpg>
- <https://www.microbiologiaitalia.it/wp-content/uploads/2020/02/phenotype-microglia.jpg>
- Immagine 4: Gratuze, Maud, Cheryl EG Leyns, and David M. Holtzman. "New insights into the role of TREM2 in Alzheimer's disease." *Molecular neurodegeneration* 13 (2018): 1-16. doi: <https://doi.org/10.1186/s13024-018-0298-9>
- Immagine 5: «I polifenoli delle olive» <https://liborioquinto.altervista.org/wp-content/uploads/2019/04/Olio-di-Oliva.jpg>
- Immagine 6: <https://www.resnovaweb.com/wp-content/uploads/2021/03/NGE-FG-180250.jpg>
- Immagine 7: https://img.directindustry.it/images_di/photo-g/39898-11023630.jpg
- Immagine 8: <https://www.leinco.com/wp-content/uploads/2020/04/WesternBlotFinal-02-scaled.jpg>
- Immagine 9: <https://www.microbiologiaitalia.it/wp-content/uploads/2020/11/indiretto-768x415.jpg>