

UNIVERSITÀ DELLA CALABRIA



Dipartimento di Farmacia e Scienze della Salute e della Nutrizione

Dottorato di Ricerca in

**“Biochimica cellulare e attività dei farmaci in oncologia”**

XXVIII° ciclo

**Caratterizzazione del profilo comportamentale e  
neurochimico dell’olio essenziale di bergamotto nel ratto**

Settore BIO/14

**Coordinatore**

Ch.mo Prof. Diego Sisci

Firma

**Tutor**

Ch.mo Prof. L.A. Morrone

Firma

**Dottorando**

Dott.ssa Laura Tridico

Firma

# INDICE

<b>1 INTRODUZIONE</b> .....	1
1.1 Oli essenziali e aromaterapia .....	1
1.2 Oli essenziali e sistema olfattivo.....	3
1.3 Proprietà ansiolitico-sedative degli oli essenziali .....	5
1.4 Olio essenziale di bergamotto (BEO) .....	7
1.4.1 Proprietà neurobiologiche del BEO.....	10
<b>2. SCOPO DELLA TESI</b> .....	13
<b>3. MATERIALI E METODI</b> .....	14
3.1 Animali.....	14
3.2 Sostanze.....	14
3.3 Sonde microdialisi.....	14
3.4 Box inalazione.....	16
3.5 Protocollo sperimentale.....	16
3.5.1 <i>Impianto chirurgico della sonda</i> .....	18
3.5.2 <i>Microdialisi</i> .....	18
3.5.3 <i>Test comportamentali</i> .....	19
3.6 Analisi degli amminoacidi .....	23
3.7 Analisi statistica .....	24
<b>4. RISULTATI</b> .....	25
4.1 Somministrazione sistemica.....	25
4.1.1 <i>Open field test</i> .....	25
4.1.1.1 Analisi comportamentale.....	25
4.1.2 <i>Elevated Plus-maze</i> .....	28
4.1.3 <i>Porsolt test</i> .....	30
4.2 Somministrazione inalatoria.....	31
4.2.1 Open field test.....	31

<b>5. DISCUSSIONE .....</b>	<b>34</b>
<b>6. CONCLUSIONI.....</b>	<b>39</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>40</b>

# 1 INTRODUZIONE

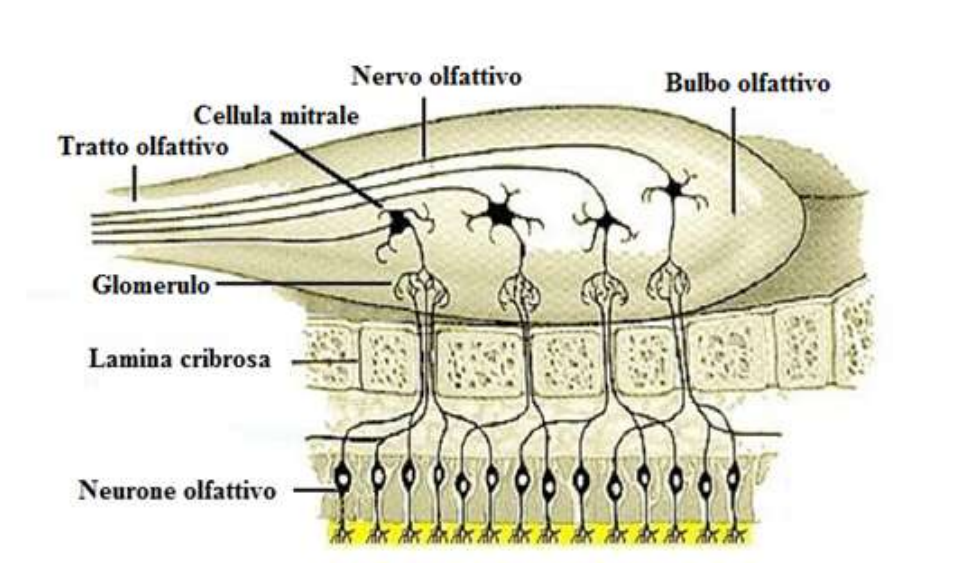
## 1.1 Oli essenziali e aromaterapia

I farmaci utilizzati nel trattamento di patologie croniche disabilitanti quali disturbi dell'umore, ansia, depressione e dolore neuropatico sono spesso caratterizzati da gravi effetti collaterali e necessitano di lunghi periodi di trattamento, fattori che incidono negativamente sulla *compliance* del paziente e sulla spesa sanitaria nazionale (Purohit et al., 2015). Per tale motivo è sempre più crescente l'utilizzo, accanto alla medicina convenzionale, della medicina alternativa complementare (*Complementary Alternative Medicine*, CAM) (Ballard et al., 2009; Ravindran and DaSilva 2015) considerata più naturale ed economica. Essa comprende una serie di pratiche quali terapie fisiche (ad esempio l'agopuntura), la nutraceutica (ovvero l'utilizzo di integratori alimentari e nutrizionali come le vitamine e i minerali) e l'aromaterapia che utilizza gli oli essenziali (Perry and Perry 2006; Edris 2007; Fung 2012). Gli oli essenziali sono liquidi idrofobici, aromatici e volatili prodotti dalle piante aromatiche come metaboliti secondari che, a differenza dei metaboliti primari (proteine, lipidi, polisaccaridi), non sono indispensabili per la sopravvivenza della pianta ma svolgono importanti funzioni di difesa e di protezione (Pierce et al., 2012). Gli oli essenziali possono essere prodotti nelle foglie, nei fiori, nei frutti, nella corteccia e conservati nelle cellule secretorie, in canali, nelle cellule epidermiche o nei tricomi ghiandolari. Sono costituiti da una complessa miscela di molecole, molti, presenti solo in traccia e solo alcuni costituiscono i componenti in maggiore percentuale che caratterizzano le proprietà biologiche dell'essenza (Bakkali et al., 2008). In base alla loro struttura chimica, i costituenti degli oli essenziali sono classificati in a) idrocarburi terpenici, distinti in monoterpeni (C10), sesquiterpeni (C15) e diterpeni (C20); b) terpeni contenenti ossigeno (terpenoidi), quali alcoli, chetoni, aldeidi, esteri, lattoni e cumarine (Masotti et al., 2003). Diversi fattori, quale metodo d'estrazione, droga utilizzata, età, stadio vegetativo della pianta, tempo di raccolta e composizione chimica del terreno possono influenzare il contenuto in principi attivi degli oli essenziali rendendo difficile la loro standardizzazione e quindi il loro utilizzo biologico (Angioni et al., 2003; Masotti et al., 2006). Si conoscono circa 3000 oli essenziali e tra questi circa trecento sono utilizzati nell'industria farmaceutica, agronomica, alimentare e cosmetica. Nella medicina tradizionale gli oli essenziali sono stati utilizzati per la loro attività antisettica (battericida, antivirale e antifungina) analgesica, sedativa, anti-infiammatoria, spasmolitica e anestetica locale (Bakkali et al., 2008). Sono utilizzati tramite massaggio e/o per via inalatoria nell'aromaterapia per

migliorare lo stato di salute e di benessere (vedi Edris 2007) come riportato in diversi studi clinici. Ad esempio, in uno studio multicentrico randomizzato su 288 pazienti malati di cancro, è stata osservata una riduzione dell'ansia e/o della depressione nei pazienti sottoposti a massaggio aromaterapico con diversi oli essenziali per un periodo di sei settimane, rispetto ai pazienti che ricevevano solo cure convenzionali (Wilkinson et al., 2007). Tuttavia, l'inalazione di olio di lavanda, di bergamotto o di cedro non modificava lo stato di ansia e agitazione presente in pazienti sottoposti a radioterapia (Graham et al., 2003). In una *review* pubblicata nel 2011, sono stati descritti i risultati ottenuti in sedici *trials* controllati randomizzati in cui pazienti affetti da ansia, sono stati sottoposti ad aromaterapia utilizzando diversi oli essenziali. Quattordici di tali studi hanno riportato risultati positivi soprattutto dopo trattamento con olio essenziale di lavanda, mentre in soli due studi non si osservava alcun effetto (Lee et al., 2011). Bradley e colleghi (2009) hanno evidenziato la difficoltà di standardizzare uno studio in doppio cieco misurando gli effetti indotti dall'inalazione dell'olio di lavanda ed hanno studiato gli effetti dell'essenza dopo somministrazione acuta per via orale. I risultati indicano che in una condizione di ansia blanda, indotta dalla visione di un videoclip e misurata tramite parametri cardiovascolari, elettrodermici e respiratori (Kreibig et al., 2007), si osservava una modulazione di tali parametri nei pazienti trattati con olio di lavanda; tuttavia, non si osservava alcun effetto in condizioni di ansia più profonda (Bradley et al., 2009). Risultati positivi sono stati ottenuti in soggetti affetti da disordini generalizzati d'ansia (*GAD*) dopo somministrazione orale dell'olio di lavanda per sei settimane (Woelk and Schläfke, 2010). Nello stesso studio gli autori hanno paragonato gli effetti indotti dall'olio essenziale con quelli ottenuti in un gruppo di pazienti trattati con lorazepam (Woelk and Schläfke, 2010) evidenziando effetti simili alla benzodiazepina. Alcuni studi sono stati anche condotti per valutare gli effetti del trattamento aromaterapico con olio di *Lavandula angustifolia* (Fu et al., 2013), *Melissa officinalis* (Ballard et al., 2002; 2009) e *Salvia officinalis* (Mirrodi et al., 2004) in pazienti affetti da demenza. In particolare i risultati più incoraggianti sono stati ottenuti in uno studio randomizzato condotto in 72 pazienti affetti da demenza severa e trattati con olio di *Melissa Officinalis* per via inalatoria e tramite massaggio (Ballard et al., 2002). Tuttavia, nonostante l'utilizzo dell'aromaterapia sia sempre più diffuso, la mancanza di studi clinici condotti con rigore metodologico rende ancora difficile stabilire la reale efficacia terapeutica degli oli essenziali in modo da validarne l'uso clinico (German et al., 2013).

## 1.2 Oli essenziali e sistema olfattivo

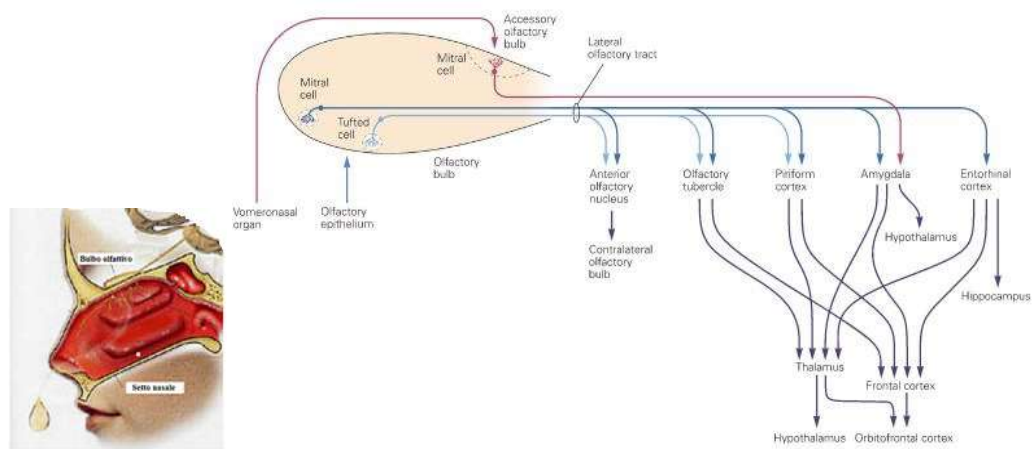
Le sostanze presenti nella componente volatile degli oli essenziali, applicati sulla cute o somministrati per via inalatoria, attivano il sistema olfattivo. Le molecole odorose legano specifici recettori metabotropici, presenti sulle ciglia dei neuroni sensoriali olfattivi, e trasducono il segnale chimico in segnale elettrico (Wachowiak, 2010). Gli assoni delle cellule olfattive costituiscono le fibre olfattive primarie, che attraversano la lamina basale e poi la volta ossea della cavità nasale in corrispondenza della lamina cribrosa dell'etmoide. Nel loro insieme costituiscono il nervo olfattivo, facente parte del primo paio di nervi cranici, e raggiungono i bulbi olfattivi disposti in corrispondenza della fossa cranica anteriore (Wachowiak, 2010). Il bulbo olfattivo costituisce il primo *relay* della *pathway* olfattiva in cui gli assoni dei neuroni sensoriali stabiliscono sinapsi eccitatorie glutammatergiche, con i dendriti dei neuroni di secondo ordine della via olfattiva: le cellule mitrali e le cellule a pennacchio (o *tufted cells*) (**Fig 1.1**). Le cellule mitrali presentano i corpi cellulari disposti a formare un unico strato mentre i corpi cellulari delle cellule *tufted* si trovano a diversi livelli nello strato plessiforme esterno del bulbo e costituiscono la via efferente. Il sistema olfattivo è l'unico esempio di connessione diretta con il sistema nervoso centrale in quanto le informazioni raggiungono direttamente la corteccia olfattiva bypassando il *relay* talamico (Wachowiak, 2010). La corteccia olfattiva comprende cinque aree distinte: il nucleo olfattivo anteriore, il tubercolo olfattorio (area perforata anteriore), il nucleo corticale dell'amigdala, la corteccia piriforme e la porzione laterale della corteccia entorinale.



**Fig 1.1:** bulbo olfattivo.

La corteccia entorinale occupa una posizione strategica che le consente di trasmettere le informazioni dalle aree olfattive corticali ai due maggiori centri telencefalici quali l'amigdala e l'ippocampo e ritrasmetterle alle aree olfattive (Minghong, 2010).

Gli stimoli olfattivi hanno quindi la capacità di attivare un *network* estremamente complesso che coinvolge strutture limbiche, corticali ed ipotalamiche (**Fig 1.2**) e fornisce le basi neuroanatomiche per comprendere gli aspetti emozionali e motivazionali dell'olfatto nonché la capacità degli odori di regolare funzioni endocrine e vegetative (Nagai et al., 2014).



**Fig 1.2:** aree cerebrali attivate da uno stimolo olfattivo.

Dopo massaggio aromaterapico o inalazione (Kovar et al., 1987; Jirovetz et al., 1992) i principi attivi presenti nella componente volatile degli oli essenziali attivano direttamente le diverse aree cerebrali o, attraverso la mucosa polmonare, raggiungono la circolazione sistemica ad una concentrazione certamente inferiore rispetto a quella raggiunta dopo una somministrazione per via sistemica. È quindi opportuno tenere in considerazione anche una componente “psicodinamica” nel valutare gli effetti indotti dagli oli essenziali (Johnson 2011). L'esperienza olfattiva è caratterizzata da un elevato grado di soggettività ed è influenzata sia da condizioni psico-emotive individuali sia da fattori esterni che inducono, ad esempio a memorizzare la percezione olfattiva di un aroma in un dato contesto che influenzerà lo stato emozionale del soggetto alla successiva esposizione a quell'odore (Jellinek 1997; Jonson 2011). Ad esempio, Sugawara e colleghi (1999) hanno dimostrato che l'inalazione di oli essenziali di arancio, ginepro, bergamotto, geranio o cipresso determina una differente percezione

odorosa che dipende dal contesto in cui avviene tale esposizione. I soggetti descrivevano, infatti, in maniera differente la percezione dell'aroma a seconda che avessero svolto prima un'attività fisica o mentale o fossero stati sottoposti all'ascolto di un suono naturale (Sugawara et al., 1999). Lo stesso gruppo di ricerca ha, inoltre, dimostrato come, nel caso di molecole chirali, la percezione olfattiva variava in funzione del singolo enantiomero. In particolare, i due enantiomeri del linalolo determinano una diversa risposta sensoriale ed anche una modifica stereospecifica del tracciato elettroencefalografico (Sugawara et al., 2000).

### **1.3 Proprietà ansiolitico-sedative degli oli essenziali**

Al fine di standardizzare l'uso degli oli essenziali in aromaterapia, numerosi studi preclinici hanno investigato le proprietà ansiolitico-sedative, antidepressive, cognitive e analgesiche dei differenti fitocomplessi (de Sousa et al., 2015; Rombolà et al., *in press*). Ad esempio, Carvalho-Freitas and Costa 2002 hanno riportato che la somministrazione orale di olio essenziale o di estratti idroalcolici di *Citrus aurantium* L. induce nel topo un potenziamento dell'ipnosi da pentobarbital. Nello stesso lavoro utilizzando il *plus maze* test gli autori riportano un effetto ansiolitico dell'olio essenziale ma non degli estratti idroalcolici. L'attività ansiolitica non era falsata da una modifica del comportamento esplorativo dell'animale o da una compromissione dell'attività locomotoria. Lo stesso gruppo di ricerca ha in seguito confermato l'azione ansiolitica dell'olio di arancio soprattutto in uno stato ossessivo-compulsivo indotto nel *marble-burying* test (Pultrini et al., 2006). Proprietà ansiolitiche dell'arancio dolce sono state osservate nel ratto anche dopo somministrazione per via inalatoria (Faturi et al., 2010). Komiya e collaboratori (2006) hanno invece investigato gli effetti anti-stress dell'olio di lavanda, di rosa e di limone, valutando l'attività ansiolitica tramite *plus maze* e *open field test* e l'attività antidepressiva tramite *forced swimming test*. In particolare, l'inalazione dell'aroma per 90 minuti prima dei test comportamentali non induce alcun effetto negli animali trattati con l'olio di rosa e di lavanda. Al contrario l'olio di limone evidenzia un elevato effetto anti-stress (Komiya et al., 2006). È importante sottolineare che studi farmacologici con agonisti o antagonisti dei recettori per le benzodiazepine, per la serotonina e la dopamina hanno indicato che gli effetti indotti dall'essenza non erano mediati dal recettore per le benzodiazepine ma vi era una fine regolazione del



sistema dopaminergico a livello dell'ippocampo e del sistema serotoninergico a livello della corteccia prefrontale e dello striato (Komiya et al., 2006). Gli effetti ansiolitico-sedativi e antidepressivi dell'olio di limone sono stati osservati anche dopo somministrazione per via orale del fitocomplesso (Lopes et al., 2011). In contrasto a quanto riportato da Komiya e collaboratori (2006), De Almeida e collaboratori (2004) hanno dimostrato utilizzando il *plus maze test* che l'inalazione per 7 minuti di volumi crescenti di una miscela di acqua/olio di rosa determina nel ratto un effetto ansiolitico. Il diverso lotto di olio essenziale utilizzato, la differenza di tempo di esposizione dell'essenza e la diversa specie roditore utilizzata nei due studi potrebbero essere alla base dei diversi risultati ottenuti. Tra i diversi fitocomplessi, l'olio di *Lavandula angustifolia* ottenuto tramite distillazione delle sommità fiorite è stato ampiamente studiato per la sua azione sedativo-ansiolitica e antidepressiva. In particolare, la somministrazione di olio di lavanda per 24 h o per 2 settimane tramite un vaporizzatore ha indotto nel gerbillo un effetto ansiolitico misurato valutando il numero di entrate nelle braccia aperte ed il tempo speso in esse nel *plus maze test* (Bradley et al., 2007). Lo studio è stato effettuato su un gruppo di animali maschi e un gruppo di femmine e gli autori hanno osservato delle differenze tra i due gruppi in alcuni comportamenti etologici quali ad esempio l'*head dipping* (l'animale protende il corpo in modo che la testa sporga fuori dal braccio aperto guardando verso il basso) e lo *stretch-attend posture* (l'animale si protende in avanti sulle zampe anteriori, mantenendo quelle posteriori fisse nella posizione iniziale, pronto a ritrarsi in caso di pericolo) (Bradley et al., 2007). Shaw e collaboratori (2007) hanno invece investigato le proprietà ansiolitiche dell'olio di lavanda nel ratto. Il fitocomplesso era somministrato per via inalatoria, utilizzando diversi protocolli sperimentali e volumi di olio crescenti (0,1-1 ml) variando anche il tempo di esposizione dell'animale all'aroma (30 minuti-3 ore). L'attività ansiolitica è stata studiata mediante l'*open field test* e gli effetti dell'essenza sono stati paragonati a quelli ottenuti dopo somministrazione sistemica di clordiazepossido (Shaw et al., 2007). I risultati ottenuti indicano che un effetto ansiolitico si osserva solo dopo un periodo di esposizione di almeno 30 minuti e con volumi non inferiori a 0,5 ml. In particolare gli autori evidenziano che l'inalazione di olio di lavanda induce un effetto ansiolitico più blando rispetto al clordiazepossido e suggeriscono che i meccanismi molecolari coinvolti non sono completamente sovrapponibili. Ad esempio, mentre la benzodiazepina reverte l'aumento di *c-Fos* osservato in tutte le aree cerebrali coinvolte nello stato d'ansia nei ratti controllo durante l'*open-field test*, l'olio di lavanda

diminuisce i livelli di *c-Fos* solo a livello dell'ipotalamo e dell'amigdala (Shaw et al., 2011). Alcuni autori hanno inoltre evidenziato che l'effetto ansiolitico osservato dopo inalazione di olio di lavanda non è dovuto a un'interferenza con la trasmissione GABAergica. Infatti, il pre-trattamento per via sistemica con flumazenil, antagonista del recettore per le benzodiazepine, e con picrotossina, antagonista del recettore Gaba-A, non reverte l'effetto del fitocomplesso (Chioca et al., 2013). È di particolare interesse evidenziare che il pre-trattamento con il composto WAY100635, antagonista dei recettori 5-HT<sub>1A</sub>, reverte l'effetto ansiolitico osservato dopo inalazione del fitocomplesso suggerendo un coinvolgimento della trasmissione serotonergica in tale attività (Chioca et al., 2013). Nel loro complesso, tutti questi risultati ottenuti dalla ricerca di base, a volte preliminari e non sicuramente esaustivi sono, tuttavia, fondamentali per la comprensione dei meccanismi che sottendono gli effetti dei diversi fitocomplessi nonché enorme utilità al fine di poter procedere alla valutazione dell'efficacia terapeutica degli oli essenziali mediante trials clinici.

#### **1.4 Olio essenziale di bergamotto (BEO)**

Come riportato nella Farmacopea Ufficiale (X ed.), l'olio essenziale di bergamotto (BEO) si ottiene per spremitura a freddo dell'epicarpo e parte del mesocarpo del frutto fresco di *Citrus Bergamia Risso et Poiteau*. Il bergamotto è un frutto endemico calabrese che fruttifica con successo solo lungo la sottile striscia costiera che si estende tra Villa San Giovanni e Gioiosa Jonica, caratterizzata da un terreno di tipo argilloso-calcareo e da peculiari caratteristiche climatiche che forniscono l'habitat ideale per l'agrumo. Tuttavia, il bergamotto è coltivato anche in altri Paesi (Florida, California, Costa d'Avorio, Tunisia, Sud America) e la sua origine rimane ancora da chiarire, sebbene l'ipotesi più accreditata sembra essere quella di un ibrido tra due diverse varietà del genere *Citrus* (Rapisarda and Germanò 2013). Il *Citrus Bergamia* è un albero sempreverde, di 3-4 metri di altezza, con foglie lanceolate, verde scuro, appuntite, carnose e con piccioli provvisti di strette ali con fiori biancastri. Il frutto maturo ha una forma sferica o leggermente piriforme, con un peso medio intorno ai 100 gr. e una colorazione gialla. La buccia è mediamente sottile, con una superficie liscia e, a volte, moderatamente rugosa, mentre la polpa, di colore verde-giallo pallido, è caratterizzata da un sapore fortemente acido e amaro. Il periodo di raccolta dei frutti va da novembre a

marzo, mentre la fioritura avviene nel mese di aprile. Il bergamotto viene prodotto solo attraverso l'innesto. Anni fa si innestava su piante di limetta e di arancio amaro; oggi l'innesto è stato abbandonato a causa della mancanza di resistenza alle malattie. Esistono tre diverse varietà di bergamotto che si differenziano l'una dall'altra per caratteristiche botaniche e morfologiche, quali l'aspetto della pianta, la forma delle foglie e dei frutti, lo spessore della buccia e il periodo di raccolta dei frutti (Verzera et al., 2003):

- varietà *Femminello*, caratterizzata da un albero a rapido accrescimento ma ridotto sviluppo, con rami esili, foglie lanceolate, frutti sferici e lisci che raggiungono la maturazione a fine ottobre;
- varietà *Castagnaro*, con frutti meno sferici, un po' rugosi e periodo di raccolta coincidente con l'inizio del mese di novembre;
- varietà *Fantastico*, caratterizzata da foglie di maggiori dimensioni, fiori odorosissimi e maturazione dei frutti tra novembre e dicembre.

Quest'ultima varietà rappresenta circa il 90% delle piante produttive (Dugo and Bonaccorsi 2013). La tutela della coltivazione del *Citrus Bergamia* Risso et Poiteau è affidata al Consorzio del Bergamotto di Reggio Calabria che ha il compito di garantire la qualità del prodotto. In epoche precedenti alla prima opera d'industrializzazione l'olio essenziale di bergamotto era estratto per pressione manuale dalla scorza del frutto e veniva fatto assorbire da spugne naturali. Oggi, l'essenza è ricavata per abrasione della parte superficiale dei frutti mediante un sistema di grattugie di cui sono dotate le "macchine pelatrici". Tale processo permette di ottenere un impasto composto da una miscela di acqua e olio essenziale. In seguito, la fase acquosa è separata dalla fase oleosa che costituisce l'essenza. L'essenza di bergamotto ha una consistenza oleosa e si presenta liquida, talvolta con depositi solidi, volatile, con colorazione verde o giallo-verdastro, un caratteristico odore gradevole e un sapore aromatico amaro. L'olio essenziale di bergamotto è un fitocomplesso contenente oltre trecento componenti ed è formato da una frazione volatile, che rappresenta il 93-96%, e da una frazione non volatile che costituisce il 4-7%. La complessa composizione chimica dell'OE di bergamotto è stata resa nota mediante l'uso di tecniche analitiche quali la gascromatografia accoppiata alla spettrometria di massa (GC-MS) per la frazione volatile (Verzera et al., 1998), e la cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) per quella non volatile (Dugo et al., 1997). I componenti della frazione volatile possono essere classificati in terpeni (es. linalolo), sesquiterpeni ed idrocarburi, mentre la

frazione non volatile è costituita prevalentemente da composti eterociclici ossigenati, distinti in furanocumarine (psoraleni) e metossicumarine (Rapisarda and Germanò 2013). La frazione volatile dell'olio essenziale di bergamotto è caratterizzata da un contenuto elevato di composti ossigenati e soprattutto dalla presenza in quantità superiori a quelle di tutti gli altri olii essenziali agrumari, di un alcool, il linalolo (6-18%) e del suo corrispondente estere, l'acetato di linalile (19-28%) (Rapisarda and Germanò 2013). Queste due sostanze determinano le caratteristiche aromatiche dell'essenza e costituiscono dei *markers* di qualità del prodotto, mentre i residui idrocarburici non hanno un ruolo fondamentale nel determinare il carattere olfattivo dell'olio essenziale (Dugo et al., 1987). Il residuo non volatile è composto da cere e flavoni polimetossilati che influenzano le proprietà olfattive dell'olio. Esso contiene anche lo 0,2% di bergaptene che è responsabile della fototossicità del BEO (Ashwood-Smith et al., 1981). Inoltre, il limonene, un monoterpene monociclico che rappresenta il costituente principale delle essenze del genere *Citrus*, con percentuale generalmente non inferiore al 60% (Moufida and Marzouk, 2003), nell'olio essenziale di bergamotto non è mai superiore al 50% e talvolta la sua percentuale è pari a quella dell'acetato di linalile (Rapisarda and Germanò 2013). Tuttavia, la composizione dell'olio essenziale di bergamotto è soggetta a un'enorme variabilità per quanto riguarda la composizione percentuale di ciascun componente dell'essenza e subisce ampie oscillazioni in funzione della stagione di raccolta e dell'area di produzione dei frutti. Ad esempio la quantità di linalolo diminuisce dal 12% al 6% durante la stagione di raccolta mentre il contenuto di acetato di linalile aumenta, durante lo stesso periodo di raccolta, dal 23% al 31% (Dugo and Bonaccorsi 2013). Analogamente, anche la quantità dei componenti della frazione non volatile dell'essenza viene influenzata dal periodo di produzione: da gennaio a marzo, il contenuto di bergamottina aumenta significativamente, mentre quelli di bergaptene e ciproptene diminuiscono di circa due terzi rispetto al contenuto iniziale (Dugo et al., 1997). L'olio essenziale di bergamotto è ampiamente utilizzato in diversi settori industriali e in particolare, è indispensabile nell'industria profumiera, in quanto, ha la peculiare funzione non solo di fissare il bouquet aromatico dei profumi, ma anche di armonizzare le altre essenze contenute, esaltandone freschezza e fragranza. L'olio essenziale di bergamotto trova impiego anche nel settore alimentare come aromatizzante e in quello cosmetico per la preparazione di prodotti quali deodoranti, saponi, prodotti solari e dentifrici. Inoltre, è utilizzato come correttivo degli odori nelle preparazioni farmaceutiche (Navarra et al., 2015). Inoltre grazie al suo potere antisettico e

antibatterico, è utilizzato nella sepsi chirurgica, in odontoiatria, oftalmologia, ginecologia e dermatologia, tanto da essere inserito nelle farmacopee di diversi paesi (Verzera et al., 2003).

#### 1.4.1 Proprietà neurobiologiche del BEO

Nell'ultimo decennio, alcuni risultati ottenuti dalla ricerca di base, hanno evidenziato specifiche ed interessanti proprietà neurobiologiche dell'olio essenziale di bergamotto sia in condizioni normali che patologiche e possono fornire le basi razionali per la comprensione dell'utilizzo del BEO nell'aromaterapia. In particolare, la somministrazione di dosi crescenti di BEO, induce nel ratto effetti comportamentali quantificabili e riproducibili, correlabili a specifiche variazioni delle bande di frequenza dello spettro elettroencefalografico (EEG) (Rombolà et al., 2009). Utilizzando la tecnica della microdialisi cerebrale è stato, inoltre, evidenziato che la somministrazione di BEO, sia sistemica che focale, è grado di determinare nell'ippocampo di ratto un aumento statisticamente significativo dei livelli extracellulari di amminoacidi quali glutammato e acido  $\gamma$ -aminobutirrico (GABA) (Morrone et al., 2007) rispettivamente i più importanti neurotrasmettitori a carattere eccitatorio ed inibitorio nel sistema nervoso centrale (SNC) di mammifero. In un modello d'ischemia cerebrale focale permanente (MCAo), la somministrazione sistemica di BEO un'ora prima dell'occlusione dell'arteria cerebrale media, determina 24 h dopo l'insulto, una riduzione dell'area cerebrale ischemica, soprattutto a livello dello striato e della corteccia motoria (Amantea et al., 2009). In tali condizioni sperimentali i livelli di glutammato aumentano nella corteccia frontoparietale (penombra ischemica) subito dopo l'occlusione dell'arteria cerebrale ma tale aumento è significativamente ridotto dal trattamento sistemico con BEO (Amantea et al., 2009). È ipotizzabile che la capacità del fitocomplesso di ridurre i livelli del neurotrasmettitore nello spazio sinaptico sia dovuta ad una normalizzazione della funzione del trasportatore sebbene rimane da chiarire se l'effetto sia dovuto ad un blocco oppure ad una inversione di tale trasportatore. La riduzione dei livelli di glutammato osservata dopo pre-trattamento con il fitocomplesso si accompagna a un aumento dei livelli di fosforilazione di Akt e della chinasi GSK-3 $\beta$  (Amantea et al., 2009). L'attivazione di Akt promuove la sopravvivenza cellulare tramite fosforilazione e conseguente inattivazione di proteine quali Bad, caspasi-9 e GSK-3 $\beta$

coinvolte nei processi di morte cellulare mentre previene il rilascio mitocondriale del citocromo c e l'attivazione della caspasi-3 (Cardone et al., 1998; Brazil and Hemmings, 2001; Grimes and Jope, 2001). La capacità del fitocomplesso di attivare processi di sopravvivenza cellulare è stata dimostrata anche in una linea cellulare di neuroblastoma umano (Corasaniti et al., 2007). Il fitocomplesso, in maniera concentrazione-dipendente, riduce la morte neuronale indotta dall'eccessiva stimolazione del recettore N-metil-D-aspartato (NMDA) per il glutammato. In particolare, il BEO amplifica i segnali di sopravvivenza cellulare prevenendo la rapida deattivazione di Akt e l'attivazione a valle di varie chinasi coinvolte nei processi di morte cellulare. Inoltre, il BEO previene l'accumulo di specie reattive dell'ossigeno e l'attivazione della calpaina indotte dallo stimolo eccitotossico (Corasaniti et al. 2007). Recentemente, in diversi modelli di dolore infiammatorio e neuropatico nel topo sono stati studiati effetti antinocicettivi e antiallodinici del BEO. In particolare, la somministrazione locale di dosi crescenti di BEO nella zampa di topo induce un effetto anti-nocicettivo locale nel test della capsaicina (Sakurada et al., 2011), principio attivo presente nelle piante del genere *Capsicum*. In tale modello di dolore infiammatorio è stato evidenziato che il fitocomplesso interferisce con il sistema oppioide periferico. Infatti, studi farmacologici hanno evidenziato che il BEO non induce alcun effetto negli animali pretrattati con naloxone metil-ioduro, antagonista dei recettori oppioidi che non attraversa la barriera ematoencefalica (Sakurada et al., 2011). Nello stesso studio, Sakurada e collaboratori hanno inoltre evidenziato un effetto sinergico tra dosi inattive di olio essenziale e basse dosi di morfina. Gli effetti antinocicettivi del fitocomplesso e l'interazione con il sistema oppioide sono stati recentemente confermati utilizzando il test della formalina (Katsuyama et al., 2015). La somministrazione locale del BEO induce, inoltre, effetti antiallodinici in un modello di dolore neuropatico indotto dalla lesione parziale del nervo sciatico (Kuwahata et al., 2013). Tale studio ha evidenziato la capacità del fitocomplesso di ridurre gli effetti centrali della morfina in quanto è stata osservata una riduzione dell'allodinia nei topi neuropatici anche dopo trattamento con dosi inattive di BEO in associazione a basse dosi dell'oppioide (Kuwata et al., 2013). Gli effetti analgesici del BEO nel dolore neuropatico sono stati confermati da risultati analoghi ottenuti dopo somministrazione sub-cronica sistemica di BEO o di linalolo in un modello di dolore neuropatico indotto dalla legatura parziale del nervo L4-L5 nel topo (Berliocchi et al., 2009; Batista et al., 2010). In tale modello si induce una severa allodinia meccanica che inizia a svilupparsi sin dai primi giorni successivi alla chirurgia

e si mantiene stabile fino a trenta giorni. In tali condizioni sperimentali, la somministrazione di linalolo per via sottocutanea per sette giorni consecutivi dopo la legatura induce un effetto antiallodinico (Berliocchi et al., 2009). La capacità del BEO di indurre un'azione analgesica periferica è potenzialmente di grande utilità in quantopotrebbe permettere di ridurre eventuali effetti collaterali sistemici o interazioni con altri farmaci (Sakurada et al., 2011).

## 2. SCOPO DELLA TESI

Gli effetti ansiolitico-sedativi di diversi oli essenziali e le evidenze sperimentali che dimostrano le proprietà biologiche del BEO a livello centrale e periferico, ha portato ad investigare gli effetti indotti dal fitocomplesso in test comportamentali, quali *l'open field*, *l'elevated plus-maze* ed il *Porsolt test*, ampiamente utilizzati in letteratura come modelli sperimentali di ansia e depressione. Inoltre, nell'animale sottoposto al test comportamentale sono stati valutati, tramite la tecnica della microdialisi cerebrale, i livelli di amminoacidi con funzione di neurotrasmettitori, sia a carattere eccitatorio (aspartato, glutammato) che inibitorio (GABA, taurina, glicina). L'analisi è stata estesa anche alla glutammina, amminoacido coinvolto nel metabolismo del glutammato e alla citrullina, co-prodotto della sintesi del nitrossido (Palmer et al., 1988). La tecnica della microdialisi ampiamente utilizzata nella ricerca di base, consente di recuperare nell'animale libero di muoversi (*freely moving*), sostanze a basso peso molecolare nell'interstizio di organi o tessuti senza modificarne il volume, monitorando l'ambiente extracellulare rivelando eventuali modificazioni come risposta a stimoli esterni (Benveniste 1989). Il protocollo sperimentale è stato disegnato in modo da effettuare i test comportamentali in un intervallo di tempo compreso tra trenta e quaranta minuti dopo la somministrazione. In tale intervallo, infatti, sono stati infatti evidenziati specifici effetti del BEO sui livelli dei neurotrasmettitori e sulla potenza del tracciato EEG (Morrone et al. 2007; Rombolà et al., 2009). Al fine di valutare eventuali differenze neurocomportamentali e neurochimiche dopo somministrazione sistemica o inalatoria, l'olio essenziale di bergamotto è stato somministrato sia per via intraperitoneale (i.p.) sia per via inalatoria dopo vaporizzazione dell'essenza. I risultati ottenuti con il fitocomplesso sono stati paragonati a quelli osservati in un gruppo di animali trattati per via sistemica con diazepam, benzodiazepina ampiamente utilizzata clinicamente per le sue proprietà ansiolitico-sedative.



## 3. MATERIALI E METODI

### 3.1 Animali

Sono stati utilizzati ratti Wistar (Charles River, Calco, Italia) del peso di 250-300 g. Gli animali sono stati tenuti a una temperatura costante ( $22 \pm 1$  °C) e umidità relativa (50%) sotto un regolare ciclo buio-luce (luce da 7 a.m. a 7 p.m.), con libero accesso a cibo e acqua. Tutti gli esperimenti sono stati condotti in accordo con quanto stabilito dal Consiglio Direttivo della Comunità Europea del 24 novembre 1986 (86/609/EEC) e in ottemperanza con il D.L. 4 marzo 2014 n°26 al fine di minimizzare la sofferenza degli animali e usarne solo il numero necessario a produrre risultati statisticamente significativi.

### 3.2 Sostanze

*Olio essenziale di bergamotto* (OEB). È stato fornito dall'azienda Capua 1880 S.r.l., Campo Calabro, Reggio Calabria (RC). L'analisi cromatografica del lotto utilizzato ha evidenziato la seguente composizione nei principali componenti della frazione volatile del fitocomplesso: limonene 39,60%, linalolo 9,55%, acetato di linalile 31,09% e bisabolene 0.45%; per quanto riguarda le furocumerine: bergaptene 2783,33 ppm, bergamottina 26931 ppm.

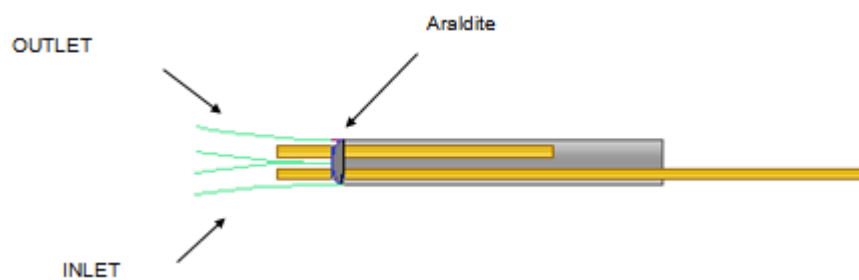
*Olio essenziale di jojoba*. È stato fornito dall'azienda Farmalabor, Canosa di Puglia.

*Diazepam* (DZP). È stato fornito dall'industria farmaceutica Roche S.p.A., Monza.

### 3.3 Sonde microdialisi

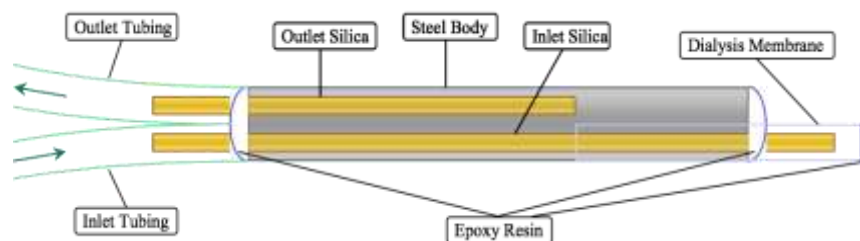
Le sonde da dialisi sono state realizzate in laboratorio, secondo la procedura descritta da Richards e collaboratori 1993. Un tubo di acciaio inossidabile (*stine still*, 25 G, 15 mm di lunghezza, Coopers' Needleworks, Birmingham, UK) costituisce il corpo della sonda (*steel body*), all'interno del quale sono inseriti due filamenti di silice fusa (*fused silica*, i.d. 0,074 mm, o.d. 0,15 mm, Chebios, Roma, Italia); quello più lungo attraversa interamente il corpo della sonda, sporgendo da entrambi i lati, quello più corto è inserito fino a metà del tubo d'acciaio, sporgendo da un solo lato (**Fig.3.1, fase1**). Un'estremità

della silice fusa più lunga, costituisce il supporto per la membrana da dialisi, l'altra invece è utilizzata per l'inserimento di un tubo in polietilene di 70 mm (*fine bore polythene tubing*, i.d. 0,28, o.d. 0,61 mm; Smiths Medical International Ltd, Kent, UK) che costituisce l' "INLET" della sonda. Alla sporgenza della silice fusa più corta è inserito un tubo in polietilene di 50 mm che costituisce l'"OUTLET" della sonda. I tubi di *inlet* ed *outlet* sono fissati al corpo del tubo d'acciaio mediante una resina (*epoxy resin*, Araldite® Bostik, Leicester, UK) costituita da una miscela in parti uguali di due componenti, indurente (*hardener*) e resina (*resin*) (**Fig.3.1, fase 2**).



**Fig 3.1:** costruzione sonda da microdialisi, fase 1 e 2.

Una membrana di cellulosa rigenerata con cut-off di 5000 Da è inserita delicatamente nella nella silice fusa e fatta scivolare dentro il corpo del tubo d'acciaio, fino a toccare la silice fusa di *out* contenuta all'interno. La membrana da dialisi è quindi tagliata di 0.5 mm e fissata al corpo della sonda applicando la resina sul tubo d'acciaio e sulla terminazione aperta della membrana da dialisi, formando così una camera (**Fig. 3.2, fase 3**).



**Fig 3.2:** sonda da microdialisi.

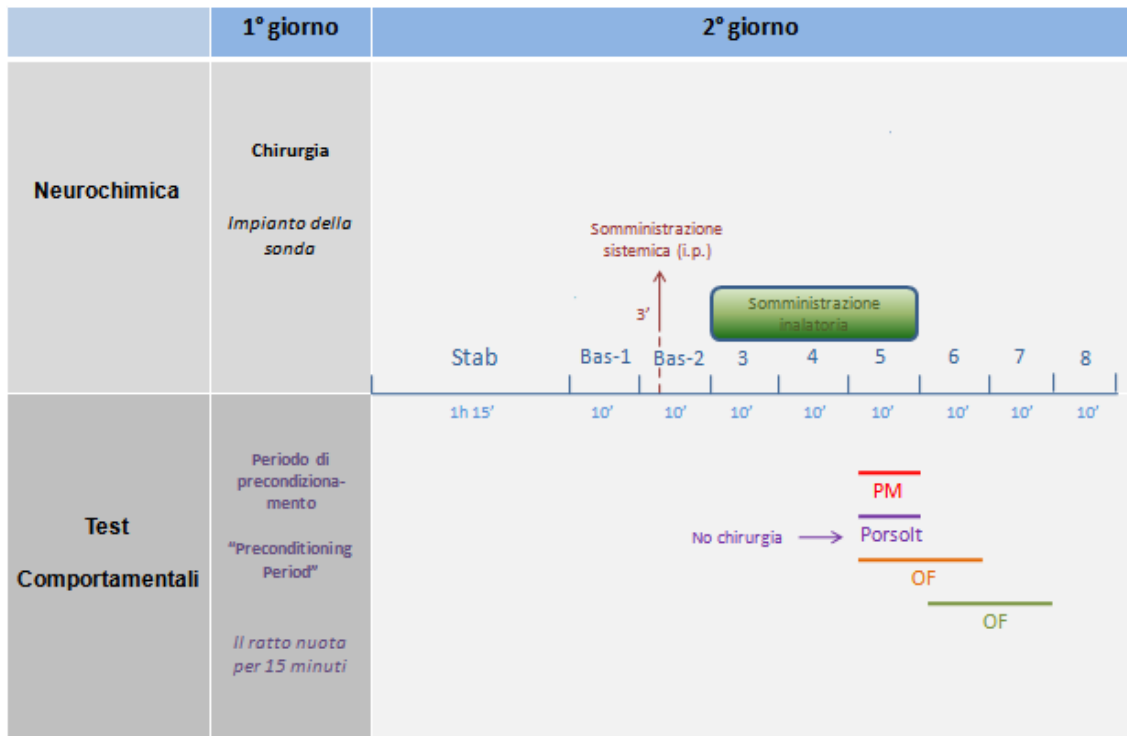
Prima di ogni impianto chirurgico è stato verificato il corretto funzionamento della sonda, mediante perfusione del tubo *inlet* con una soluzione salina NaCl 0.9%.

### **3.4 Box inalazione**

La somministrazione degli oli essenziali per via inalatoria, è stata realizzata mediante l'utilizzo di una camera rettangolare di plexiglass delle dimensioni di 60 cm in lunghezza, 30 cm di larghezza e 31 cm di altezza, costituita da due vani distinti. Il vano più piccolo, avente in alto una parete scorrevole, contiene un vaporizzatore sul quale è posto prima dell'introduzione dell'animale nella stanza, il volume di olio essenziale da vaporizzare. Il vano più grande invece, avente anch'esso in alto una parete scorrevole, è quello nel quale è posto l'animale durante la fase d'inalazione. Questo vano è costituito da fessure sia nella parte alta del coperchio che lateralmente, per consentire, una volta introdotto l'animale, la gestione dei tubi da microdialisi e la totale libertà nei movimenti (fessure in alto) e il normale riciclo d'aria (fessure laterali). I due compartimenti, inoltre, sono separati da due pareti verticali, di cui una fissa forata di colore bianco e una scorrevole trasparente che è rimossa nel momento in cui è posizionato l'animale, consentendo il passaggio dei vapori per diffusione da un ambiente all'altro.

### **3.5 Protocollo sperimentale**

Gli animali sono stati sottoposti a chirurgia per l'impianto della sonda da microdialisi (vedi 3.5.1). 24 h dopo la chirurgia essi sono stati trasferiti in una gabbia pulita e condotti dalla stanza di stabulazione a quella del comportamento per iniziare la fase di *habituation* della durata di 15 minuti, seguita dal periodo di stabilizzazione della sonda da microdialisi (1ora) e dalla successiva raccolta dei campioni di dializzato (ogni 10 minuti) (**Fig. 3.3**), (vedi 3.5.2).



**Fig 3.3:** *protocollo sperimentale.* Il 1°giorno gli animali sono sottoposti a impianto della sonda o, per quelli che eseguono il Porsolt test, al periodo di precondizionamento. Il 2°giorno, per gli animali impiantati, inizia la stabilizzazione della sonda e la raccolta dei campioni di dializzato ogni 10 minuti. Il numero di campioni raccolti varia a seconda del test comportamentale. Per gli animali sottoposti al plus-maze (PM, rosso) sono stati raccolti 6 campioni di dializzato; per quelli sottoposti all’open field (OF, arancione), somministrati per via sistemica, sono stati raccolti 7 campioni di dializzato; per quelli che hanno eseguito l’open field (OF, verde) somministrati per via inalatoria, sono stati raccolti 8 campioni di dializzato. . Gli animali che hanno eseguito il Porsolt test (viola), non sono stati impiantati con sonde da microdialisi. La somministrazione per via sistemica, intraperitoneale (i.p.), è indicata dalla freccia rossa, mentre la somministrazione per via inalatoria di 30 minuti, è indicata dal rettangolo di colore verde.

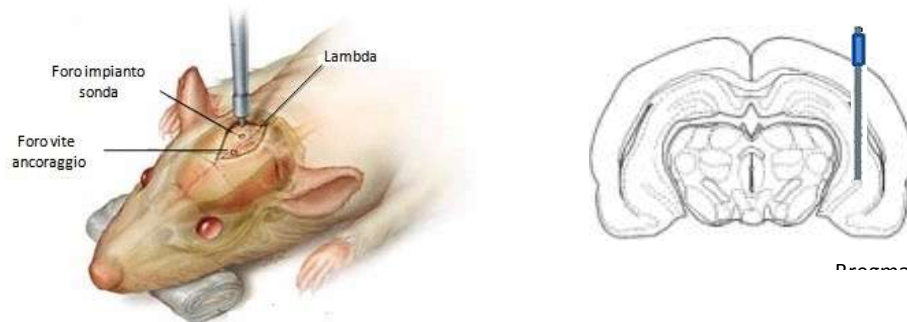
Gli animali che hanno eseguito l’open field o il plus-maze test, sono stati pretrattati per via sistemica (intraperitoneale, i.p.) con dosi crescenti di BEO: 100  $\mu$ l/kg (n=11), 250  $\mu$ l/kg (n=14), 500  $\mu$ l/kg (n=16), od olio di jojoba 500  $\mu$ l/kg (n=16), usato come controllo, oppure diazepam 1.2 mg/kg (n=12), o per via inalatoria con volumi crescenti di BEO: 5  $\mu$ l (n=6), 20  $\mu$ l (n=5), 50  $\mu$ l (n=7) o con olio di jojoba 50  $\mu$ l (n=9).

La dose più bassa e quella intermedia di olio essenziale di bergamotto, utilizzate nel trattamento per via sistemica, sono state somministrate in un volume totale di 500  $\mu$ l/kg, aggiungendo olio essenziale di jojoba. Per gli animali trattati per via inalatoria, è stato utilizzato un volume di 50  $\mu$ l: i volumi di 5 e 20  $\mu$ l di BEO sono stati “portati” a 50  $\mu$ l con olio essenziale di jojoba. Un volume di 50  $\mu$ l impiega 45 min ad evaporare. Dopo 15 minuti dall’evaporazione il ratto è stato posto nel box inalazione (vedi 3.4). Alla fine di ogni sessione sperimentale, i campioni di dializzato sono stati conservati a -80 °C e

successivamente analizzati per la determinazione quantitativa e qualitativa dei componenti presenti nel campione (vedi 3.6).

### 3.5.1 Impianto chirurgico della sonda

Gli animali sono stati anestetizzati con isoflurano (2.5% in aria) sia nella fase preparatoria che durante la chirurgia. Per l'impianto delle sonde è stato seguito il protocollo utilizzato da Richards e collaboratori (2000). Dopo aver posizionato l'animale nell'apparecchio stereotassico (Kopf 900, Analytical Control, Milano, Italia) è stato praticato un foro sul cranio seguendo le coordinate riportate sull'atlante Paxinos-Watson (1998) (mm relativi al bregma: P=-5.20; L=4.8; V=8, dalla dura madre) per l'impianto della sonda da microdialisi nell'ippocampo ventrale (**Fig: 3.4**). Sono stati successivamente praticati due fori per posizionare due viti a cui ancorare la sonda mediante l'utilizzo di cemento dentale (*Duralay, Reliance Dental Mfg. Co. Worth, Illinois, USA*).



**Fig 3.4:** impianto sonda microdialisi nell'ippocampo ventrale di ratto.

Alla fine della chirurgia, gli animali sono stati trasferiti in una gabbia di osservazione per permettere loro un adeguato recupero, con libero accesso ad acqua e cibo.

### 3.5.2 Microdialisi

Il giorno dopo l'impianto della sonda da dialisi, gli animali sono stati sottoposti a test comportamentali e alla raccolta di campioni di dializzato, mediante la tecnica della

microdialisi cerebrale. L'*inlet* della sonda è stato connesso mediante un tubo di polietilene, a una siringa da 1 ml a sua volta collegata a una pompa peristaltica (CMA 100, Analytical Control, Milano, Italia), settata a un flusso di 1,7  $\mu\text{l}/\text{min}$ ; l'*outlet*, invece, terminava in un'epENDORF da 500  $\mu\text{l}$  (CMA, Analytical Control, Milano, Italia) per la raccolta del dializzato. La sonda è stata perfusa con fluido cerebro-spinale artificiale, CSF (*artificial cerebro spinal fluid*, con la seguente composizione in mM: NaCl, 125; KCl, 2,5; MgCl<sub>2</sub>, 1,18; CaCl<sub>2</sub>, 1,26; NaH<sub>2</sub>PO<sub>2</sub>, 0,2; a un pH di 7) mediante il tubo *inlet*. Il cut-off di 5000 Da della membrana ha consentito la dialisi solo di quei composti con un peso molecolare inferiore. Le sostanze presenti nel fluido extracellulare cerebrale sono diffuse secondo il loro gradiente di concentrazione verso la soluzione fisiologica artificiale, utilizzata per perfondere la sonda. Essa, è stata filtrata prima di ogni esperimento mediante un filtro di 0,22  $\mu\text{m}$  (Millipore UK, Ltd, Watford, England), per rimuovere qualsiasi particella in grado di bloccare il funzionamento della sonda.

### 3.5.3 Test comportamentali

Gli effetti indotti dalla somministrazione sistemica o inalatoria dell'olio essenziale di bergamotto, o jojoba oppure diazepam (iniettato per via i.p.) sono stati osservati mediante la realizzazione di test comportamentali. Per garantirne una corretta esecuzione, sono state rispettate alcune condizioni generali: ad esempio, è stata ridotta la presenza degli oggetti nella stanza del comportamento, lasciando solo quelli necessari alla realizzazione di ogni singola sessione sperimentale, affinché, l'animale potesse percepire meno "ingombro" possibile ed esserne in qualche modo influenzato. A tal proposito, il tavolo e gli altri oggetti sono stati coperti con della carta bianca, così come le pareti della stanza, in maniera tale da permettere all'animale di rivolgere l'attenzione solo alla realizzazione del test. Prima di trasferire l'animale nella stanza del comportamento, sono stati attivati tutti i dispositivi (computer, telecamera, pompa da microdialisi) per abituarlo ai rumori presenti per l'intera durata del protocollo sperimentale. Tutti i test sono stati video-ripresi e i parametri comportamentali, analizzati *offline*. Alla fine della sessione sperimentale, ogni apparato è stato pulito con una soluzione di etanolo/acqua al 30%. Ogni test è stato realizzato tra le 9.00 e le 12.00 a.m., ad eccezione del Porsolt test, realizzato tra le 14.00 e le 17.00 p.m.

### 3.5.3.1 *Open field*

L'*open field* è un test che permette sia di valutare lo stato emozionale dell'animale sia di misurare qualitativamente e quantitativamente l'attività locomotoria e la volontà dei roditori di esplorare (Prut and Belzung, 2003). Per la sua semplicità nella realizzazione e per il gran numero d'informazioni che vengono ottenute dai vari parametri studiati durante l'esecuzione, il test è ampiamente utilizzato in letteratura per la valutazione del comportamento di diverse specie animali (Clarke and Jones, 2000), non soltanto roditori; per tale motivo è caratterizzato da una grande variabilità nelle procedure e protocolli usati per la sua realizzazione. Il test è stato realizzato mediante l'utilizzo di un'arena circolare in plastica nera del diametro di 70cm il cui pavimento era suddiviso in otto quadranti e una sezione circolare centrale, per distinguere i movimenti eseguiti dall'animale rispettivamente alla periferia o al centro (Tucci et al., 2010). La sessione comportamentale, della durata di 20 minuti, è iniziata posizionando l'animale al centro dell'arena. Durante l'intera sessione sperimentale è stata mantenuta un'illuminazione pari a 20 lux. L'intensità di luce è stata fornita da una normale lampada a bulbo, collocata a terra e rivolta verso le pareti della stanza evitando la formazione di zone d'ombra all'interno dell'arena che avrebbero potuto "alterare" il comportamento dell'animale. Il test è stato video-ripreso, mediante l'utilizzo di una telecamera posta sopra l'arena. Per la valutazione dell'attività locomotoria, durante il test sono stati misurati i seguenti parametri, espressi come frequenza ogni 5 minuti (Choleris et al., 2001): *crossing* (attraversamento di ogni quadrato sull'arena con tutte e quattro le zampe), *rearing* (posizionamento verticale dell'animale, in piedi sulle zampe posteriori) e *wall-rearing* (posizionamento dell'animale in verticale con le zampe che toccano i muri dell'arena). Un comportamento "simile" all'ansia, è stato valutato attraverso altri parametri, misurati come tempo totale in secondi: *grooming* (toelettatura) che comprende il "lavaggio" della testa, del muso nonché del corpo da parte dell'animale; *center* (tempo speso dall'animale al centro dell'arena); *immobility* (tempo speso dall'animale senza muoversi). Il numero di *crossing* e *rearing*, rappresentano una misura dell'attività locomotoria ma anche dell'ansia, mentre il parametro "*wall-rearing*" è legato prevalentemente alla capacità esploratoria dell'animale; il "numero di entrate" e il "tempo speso al centro" dell'arena, sono, invece, indici di esplorazione e ansietà. Il *grooming* è un parametro che caratterizza la risposta dell'animale a un ambiente nuovo (Espejo, 1997), tanto che tende a ridursi quando l'animale è sottoposto

a esposizioni ripetute al test. Anche se non esistono grosse evidenze sperimentali della loro attendibilità, “*defecation*” e “*urination*”, sono altri parametri spesso usati come indice dello stato emozionale dell’animale e come misura di ansietà (Lister, 1990).

### 3.5.3.2 *Elevated plus-maze*

Questo test comportamentale è ampiamente utilizzato come modello sperimentale di ansia, per valutare quello che è chiamato “comportamento di esitamento condizionato” (Pawlak et al., 2012). Mediante questo tipo di test viene studiato quel comportamento esplorativo naturale dei ratti, soppresso in determinate condizioni (ad esempio altezza, spazi aperti) provocando un conflitto “approccio (braccia aperte) –evitamento (braccia chiuse)” (Pellow et al., 1985). Proprio quest’ultimo che caratterizza l’intera durata del test, è generato quando l’animale incontra una nuova situazione che crea ambiguità tra comportamento esplorativo motivato e quello simile all’ansia, verso la novità (Ohl, 2003). Carobrez e Bertoglio (2005) hanno dedotto che il passaggio dal comportamento esplorativo a quello ansioso, si ha entro il secondo minuto del test. Quando si osserva un’esplorazione quasi uguale in entrambi i bracci, il principale stimolo motivazionale durante questa fase diventa la novità, la curiosità. L’apparato usato per la realizzazione del test consiste in un labirinto di plexiglass costituito da due braccia aperte (50 x 10 cm) e due chiuse (50 x 10 x 40 cm) opposte l’una all’altra che si estendono da una piattaforma centrale (10 x 10 cm) e rialzate da terra 50 cm. Le braccia aperte, la piattaforma centrale e il pavimento delle braccia chiuse sono fatti di plexiglass nero (Lister, 1987), i muri che percorrono le braccia chiuse, sono fatti invece di plexiglass trasparente. L’animale è posizionato al centro del labirinto, con il muso rivolto verso le braccia aperte e video-ripreso per i 10 minuti del test, mediante una telecamera posizionata in maniera tale da avere una totale visione dell’apparato. Nella stanza comportamentale in cui è stato realizzato il test, è stata mantenuta un’illuminazione a luce piena, pari a 170 lux. Sono stati valutati i seguenti parametri comportamentali: numero di entrate nelle braccia chiuse ed aperte; percentuale di tempo speso nelle braccia aperte. La percentuale di tempo speso nelle braccia aperte – una misura inversa del comportamento simile all’ansia- è calcolata come:  $\frac{t \text{ braccia aperte}}{t \text{ tot}}$  (durata test: 600 sec) x 100. Il parametro “n° totale di entrate”- somma n° entrate braccia aperte e chiuse- è utilizzato per valutare l’attività spontanea motoria (SMA) dell’animale. È stata



considerata “entrata” nel braccio, la condizione in cui l’animale è entrato con tutte e quattro le zampe.

Gli animali alla fine di ogni test comportamentale, sono stati sacrificati con una dose letale di isoflurano ed i cervelli rimossi e congelati istantaneamente con pentano e conservati a -80 °C per essere utilizzati per l’analisi istologica del tessuto cerebrale, al fine di controllare l’esatto posizionamento della sonda.

### 3.5.3.3 Porsolt test

Il Porsolt test o *forced swimming test* (FST), conosciuto anche come “*behavioral despair test*” realizzato da Porsolt e collaboratori (1977, 1978), è comunemente utilizzato per la valutazione dello stato depressivo nei roditori. Versioni modificate del test sono ampiamente utilizzate per facilitare la differenziazione e classificazione di farmaci antidepressivi attivi sul sistema serotonergico o noradrenergico (Carlezon et al., 2002). L’animale è posto in un cilindro di plexiglass trasparente, avente un’altezza di 70 cm e un diametro di 23 cm, contenente 30 cm di acqua mantenuta a una temperatura di 24-30 °C (Cryan et al., 2005). La profondità dell’acqua deve essere tale non consentire all’animale di toccare il fondo del cilindro, né con le zampe né con la coda.

I parametri comportamentali valutati durante il test sono:

- *immobility*: tempo speso galleggiando nell’acqua, facendo solo i movimenti necessari per mantenere il capo fuori dall’acqua;
- *swimming*: tempo speso nuotando lungo il perimetro del cilindro;
- *struggling o climbing*: tempo speso a compiere movimenti verso l’alto o verso il basso con le zampe anteriori contro le pareti del cilindro.

Il giorno prima del test vero e proprio, l’animale è stato sottoposto a una sessione di nuoto (*preconditioning period o habituation session*), della durata di 15 minuti (**Fig. 3.3**), dopodiché, è stato prelevato e asciugato con della carta assorbente, vicino a fonti di calore, evitando di utilizzare materiale ruvido in grado di provocare lesioni oppure asciugamani in grado di indurre stress nell’animale. Il giorno dopo, l’animale è stato posto nuovamente nel cilindro per la realizzazione del test della durata di 5 minuti (**Fig. 3.3**). La telecamera è stata posizionata di fronte al cilindro, in maniera tale da

distinguere bene i movimenti dell'animale al momento dell'analisi del video. Il test è stato realizzato a luce piena pari a 170 lux.

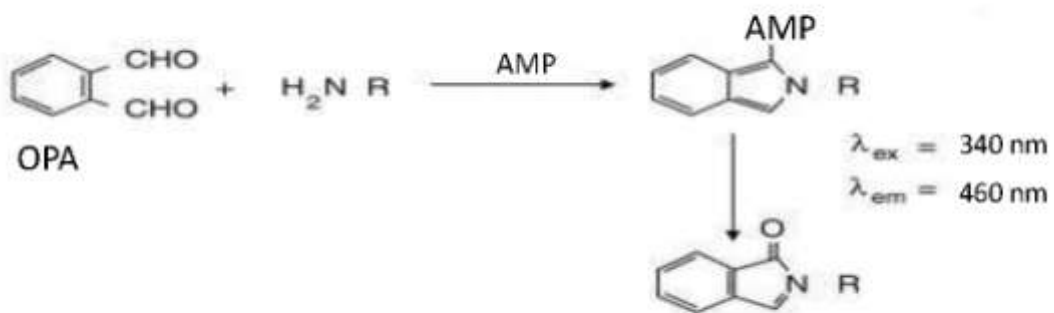
Gli animali che hanno eseguito il Porsolt test, non sono stati impiantati chirurgicamente ma è stato comunque rispettato lo stesso protocollo utilizzato per gli altri gruppi sperimentali (**Fig.3.3**).

### **3.6 Analisi degli amminoacidi**

I campioni di dializzato, prelevati durante ogni sessione sperimentale, sono stati analizzati mediante cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC). Questa tecnica strumentale permette attraverso un'alta efficienza e risoluzione, la determinazione quantitativa e qualitativa dei componenti di una miscela. Quest'ultima è caricata su una colonna contenente una *fase fissa o stazionaria*, sulla quale viene fatta fluire una miscela di liquidi, *fase mobile*. Nel nostro caso, la colonna analitica (*restek*, Pinnacle II C<sub>18</sub> 5 µm, 150 x 3,2 mm, Superchrom s.r.l. Milano) aveva come *fase stazionaria* gel di silice e su di essa è stata fatta fluire come *fase mobile* una miscela di liquidi costituita da 3 eluenti: acqua distillata filtrata (A); metanolo (Merck-Chemicals, Germania) + 5% di tampone acetato 100 mM (B); tampone acetato 100 mM (Prolabo, VWR, Belgio)+ 5% metanolo (C). La separazione è stata ottenuta utilizzando un gradiente di metanolo (3% per i primi minuti della corsa) in tampone acetato (pH 6,95), aumentando linearmente con metanolo da 3 al 30% (v/v) dopo 27 minuti; il tempo di ogni singola corsa è stato di 50 minuti. Al termine della separazione analitica, si registra un cromatogramma, costituito da picchi, grazie ad uno specifico programma di lettura; quello utilizzato nel nostro laboratorio è stato Borwin 1.5 (Jasco, Cremella, Italia). Per l'analisi cromatografica è stato utilizzato un sistema HPLC con rivelatore a fluorescenza, strumento impiegato prevalentemente per quelle analisi che richiedono elevata sensibilità ed alta selettività, soprattutto quando l'analita ha poco o nessun assorbimento UV. Il sistema cromatografico che è stato impiegato, era costituito da: una pompa (*pump*, PU-980, Jasco, Roma); una colonna analitica (*fase stazionaria*); un rivelatore a fluorescenza (*fluorimetro detector*, FP-920, Jasco, Roma). Il rivelatore a fluorescenza si basa sul principio che alcuni composti sono fluorescenti quando sono colpiti dalla luce UV. La luce viene assorbita, la molecola è eccitata ed emette poi la luce di una lunghezza d'onda diversa. Gli analiti presenti in tracce sono comunemente derivatizzati

in modo che possano essere rilevati mediante fluorescenza. Nel nostro caso per rendere rilevabili gli aminoacidi neurotrasmettitori contenuti nei campioni di dializzato, è stata eseguita una derivatizzazione con o-ftaldeide incompleta (OPA) (975  $\mu$ l)/ acido mercaptopropionico (AMP) 10% in metanolo (25  $\mu$ l) (Sigma- Aldrich, s.r.l. Milano, Italia) (Richards et al., 2000) (**Fig. 3.5**).

I livelli aminoacidici presenti nel dializzato (espressi in  $\mu$ mol/l), sono stati calcolati dopo calibrazione con una soluzione standard di aminoacidi (0,25- 1- 2,5  $\mu$ M) (Sigma- Aldrich, s.r.l. Milano, Italia).



**Fig 3.5:** reazione di derivatizzazione degli aminoacidi.

### 3.7 Analisi statistica

I risultati comportamentali sono stati riportati come media  $\pm$  SEM e analizzati mediante analisi della varianza a una via (ANOVA), seguita dal Bonferroni's Multiple Comparison Test per ogni singola sessione di 5 minuti. I risultati neurochimici sono stati riportati come media  $\pm$  SEM e analizzati mediante analisi della varianza a due vie (ANOVA), seguita dal Bonferroni's Multiple Comparison Test. Le differenze sono state considerate statisticamente significative quando  $*p < 0,05$  rispetto al controllo o al valore basale. L'analisi dei dati è stata ottenuta utilizzando il software Graph Pad® per Windows.

## 4. RISULTATI

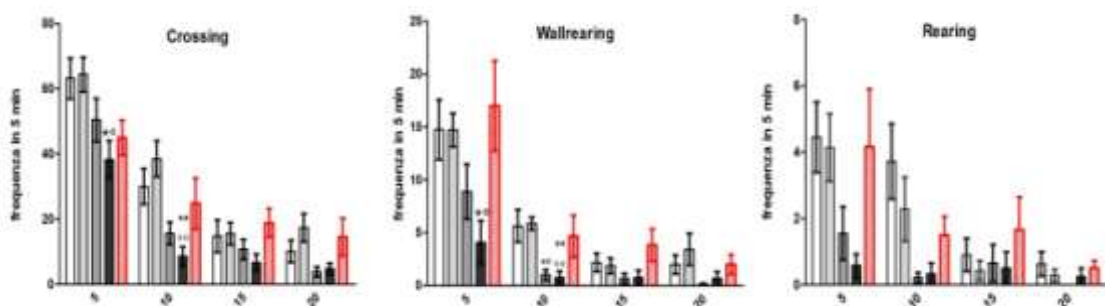
### 4.1 Somministrazione sistemica

#### 4.1.1 *Open field test*

##### 4.1.1.1 Analisi comportamentale

a) I parametri *crossing*, *wall-rearing* e *rearing*, sono stati misurati come media  $\pm$  SEM della frequenza ogni 5 minuti, rispetto ai 20 minuti totali del test.

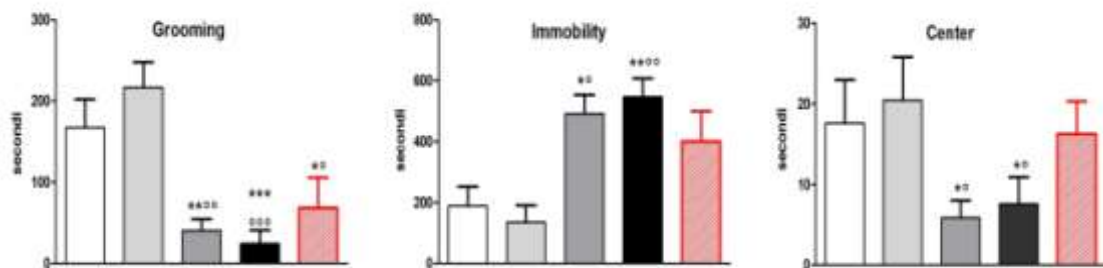
La somministrazione sistemica dell'olio essenziale di bergamotto alle dosi di 250 e 500  $\mu$ l/kg (i.p.) ha determinato una riduzione dei parametri *crossing*, *wall-rearing* e *rearing* (Fig. 4.1). In particolare la dose piú alta del fitocomplesso ha prodotto una riduzione statisticamente significativa nei primi due intervalli sperimentali (5-10 min), mentre per tutta la durata del test per la dose piú bassa di OEB (100  $\mu$ l/kg), non è stata osservata nessuna variazione statisticamente significativa rispetto al gruppo controllo (jojoba 500  $\mu$ l/kg). La diminuzione del *crossing* nei primi 5 minuti del test osservata per il gruppo di animali trattati con la dose piú alta di BEO è paragonabile a quella osservata per il gruppo trattato con DZP (1.2 mg/kg). Inoltre, è stata osservata per l'intera sessione sperimentale un aumento dell'attività esploratoria (*rearing*) da parte degli animali trattati con DZP rispetto ai gruppi trattati con olio di jojoba o con olio essenziale di bergamotto (250 e 500  $\mu$ l/kg) (Fig. 4.1.)



**Fig.4.1:** *crossing*; *wall-rearing*; *rearing* in 5 minuti dopo trattamento acuto per via sistemica(i.p.) con jojoba (controllo, 500  $\mu$ l/kg, n=11, barra bianca), BEO (100  $\mu$ l/kg, n=7, barra grigio chiaro; 250  $\mu$ l/kg, n=9, barra grigio scuro; 500  $\mu$ l/kg, n=12, barra nera), DZP (1.2 mg/kg, n=7, barra rossa), in ratti maschi Wistar, nell'open field test. \* $^{\circ}$ p<0.05 vs jojoba o BEO 100  $\mu$ l/kg, rispettivamente; \*\* $^{\circ}$ o $^{\circ}$ p<0.01 vs jojoba o BEO 100  $\mu$ l/kg, rispettivamente.

I parametri *grooming*, *immobility* e *center* sono stati calcolati come media  $\pm$  SEM del tempo totale in secondi, rispetto ai 20 minuti del test.

Una riduzione statisticamente significativa è stata osservata per il parametro *grooming*, per gli animali trattati con OEB 250 e 500  $\mu$ l/kg, rispetto al gruppo controllo (**Fig. 4.2**). La diminuzione del *grooming* che compare per la dose intermedia di BEO, è paragonabile a quella del gruppo di animali trattati con la benzodiazepina. Un aumento dell'*immobility*, è stato osservato per gli animali trattati con le dosi più alte di BEO sia rispetto al gruppo controllo  $p < 0.05$  sia rispetto al gruppo trattato con il diazepam. Inoltre, una riduzione statisticamente significativa del tempo speso dagli animali al centro dell'arena (*center*), è stata osservata per entrambe le dosi di BEO, 250 e 500  $\mu$ l/kg, rispetto agli altri gruppi sperimentali. Per tutta la durata del test, gli effetti prodotti dalla dose 100  $\mu$ l/kg di BEO sono risultati paragonabili a quelli prodotti dalla dose di jojoba 500  $\mu$ l/kg (gruppo controllo) (**Fig. 4.2**).



**Fig 4.2:** *grooming; immobility; center* in secondi dopo trattamento acuto per via sistemica (i.p.) con jojoba (controllo, 500  $\mu$ l/kg, n=11, barra bianca), BEO (100  $\mu$ l/kg, n=7, barra grigio chiaro; 250  $\mu$ l/kg, n=9, barra grigio scuro; 500  $\mu$ l/kg, n=12, barra nera), DZP (1.2 mg/kg, n=7, barra rossa), in ratti maschi Wistar, nell'open field test. \* $p < 0.05$  vs jojoba o BEO 100  $\mu$ l/kg rispettivamente; \*\* $p < 0.01$  vs jojoba o BEO 100  $\mu$ l/kg, rispettivamente; \*\*\* $p < 0.001$  vs jojoba o BEO 100  $\mu$ l/kg, rispettivamente.

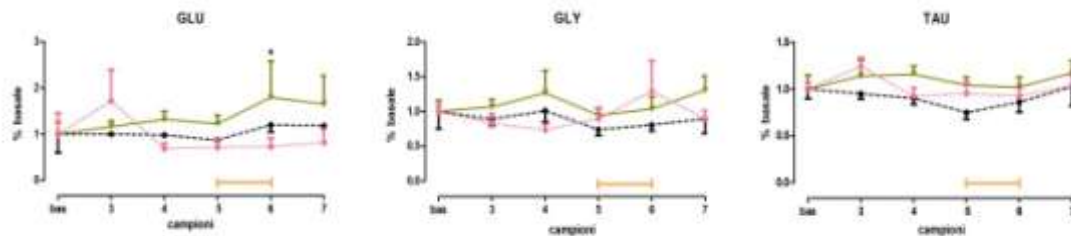
#### 4.1.1.2 Analisi neurochimica

I livelli extracellulari degli aminoacidi analizzati sono riportati in % rispetto al valore basale, indicato come media  $\pm$  SEM, normalizzato ad 1. (Tabella 1).

Mean $\pm$ SEM	Asp	Glu	Gln	Gly	Cit	Tau
<i>Via sistemica</i>						
Open Field n=22	0,35 $\pm$ 0,03	1,27 $\pm$ 0,20	15,17 $\pm$ 1,97	1,68 $\pm$ 0,38	0,42 $\pm$ 0,09	4,51 $\pm$ 0,63

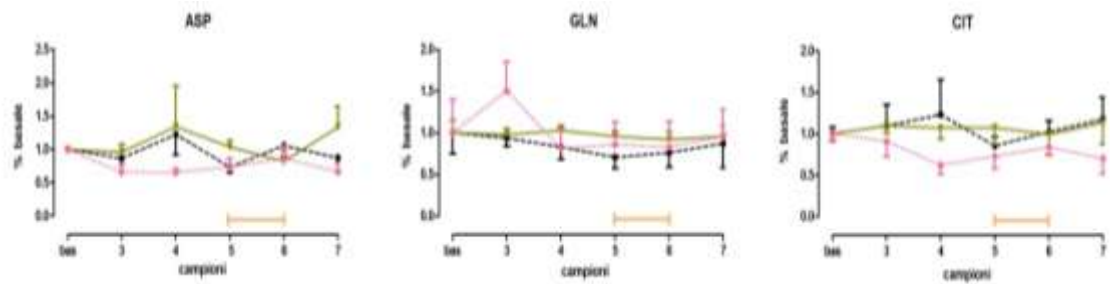
**Tabella 1-** Valori basali calcolati come media dei campioni bas-1 e bas-2 raccolti prima della somministrazione.

Nel gruppo di animali trattati con olio di jojoba, si osserva una tendenza all'aumento dei livelli di glutammato (GLU) nei campioni 6 e 7 di dializzato (raccolti rispettivamente durante e dopo il test) che non raggiunge tuttavia la significatività statistica rispetto al valore basale (**Fig. 4.3**). Negli animali trattati con BEO 500  $\mu\text{l}/\text{kg}$  (i.p.) si osserva un aumento dei livelli extracellulari di glutammato rispetto ai valori basali in tutti i campioni (3-7); tale aumento, risulta essere statisticamente significativo nel campione 6. Un aumento dei livelli di glicina (GLY) e taurina (TAU) si osserva nei campioni post-trattamento (3-7) per il gruppo trattato con BEO 500  $\mu\text{l}/\text{kg}$ . Le variazioni osservate dopo il trattamento con il fitocomplesso risultano maggiori rispetto a quelle osservate dopo il trattamento con olio di jojoba 500  $\mu\text{l}/\text{kg}$  (**Fig.4.3**) senza tuttavia raggiungere la significatività statistica.



**Fig 4.3:** livelli di glutammato (GLU); glicina (GLY); taurina (TAU), espressi in % rispetto al valore basale normalizzato ad 1, nell'ippocampo ventrale, dopo trattamento acuto per via sistemica (i.p.) con jojoba (500  $\mu\text{l}/\text{kg}$ ,  $n=4$ ●), BEO (500  $\mu\text{l}/\text{kg}$ ,  $n=6$ , ▼), DZP (1.2 mg/kg,  $n=6$ , ▲), in ratti maschi Wistar, nell'open field test, eseguito durante la raccolta dei campioni 5 e 6; \* $p < 0.05$  vs bas.

Non sono state osservate variazioni statisticamente significative dei livelli di di aspartato (ASP), glutammina (GLN) e citrullina (CIT) per il gruppo di animali trattati con BEO 500  $\mu\text{l}/\text{kg}$ , rispetto ai livelli basali e al gruppo controllo. Analogamente, la somministrazione sistemica di DZP 1.2 mg/kg non ha indotto alcuna variazione neurochimica rispetto al valore basale ed ai gruppi di animali trattati con jojoba, per tutti gli amminoacidi studiati. Non sono state osservate modificazioni dei livelli extracellulari degli aminoacidi negli animali trattati con le dosi di 100 e 250  $\mu\text{l}/\text{kg}$  di olio essenziale di bergamotto (**Fig. 4.4**).

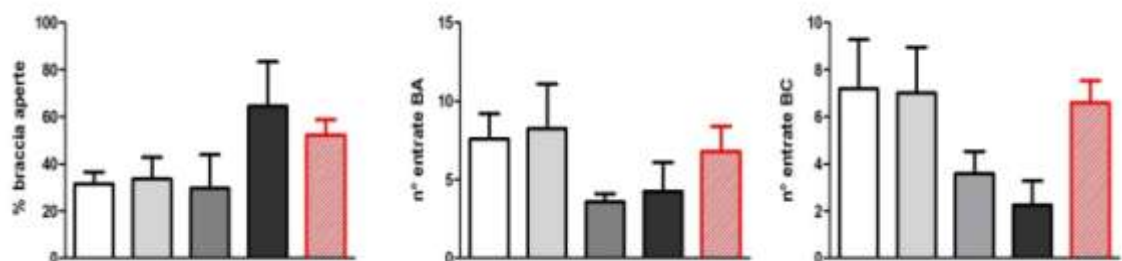


**Fig 4.4:** livelli di aspartato (ASP); glutamina (GLN); citrullina (CIT), espressi in % rispetto al valore basale normalizzato ad 1, nell'ippocampo ventrale, dopo trattamento acuto per via sistemica (i.p.) con jojoba (500 µl/kg, n=4●), BEO (500 µl/kg, n=6, ▼), DZP (1.2 mg/kg, n=6, ◆) in ratti maschi Wistar, nell'open field test, eseguito durante la raccolta dei campioni 5 e 6.

#### 4.1.2 *Elevated Plus-maze*

##### 4.1.2.1 Analisi comportamentale

I risultati sono stati riportati come media  $\pm$  SEM del tempo speso nelle braccia aperte e numero di entrate nelle braccia aperte e chiuse. Gli animali trattati con BEO alle dosi di 100 e 250 µl/kg e con diazepam (1.2 mg/kg), hanno trascorso una percentuale di tempo nelle braccia aperte pari al gruppo controllo (jojoba 500 µl/kg). La somministrazione della dose più alta del fitocomplesso ha, invece, determinato un marcato aumento del tempo speso nelle braccia aperte pur non raggiungendo la significatività statistica. Inoltre, la somministrazione di dosi di BEO pari a 250 e 500 µl/kg, ha indotto una diminuzione del numero di entrate nelle braccia aperte e chiuse, sia rispetto al controllo sia al gruppo diazepam. Per tutta la durata del test, in ogni parametro comportamentale, la dose di BEO 100 µl/kg è risultata paragonabile alla dose di jojoba 500 µl/kg (controllo) (**Fig. 4.5**).



**Fig 4.5:** % di tempo speso nelle braccia aperte, n° entrate braccia aperte (BA); n° entrate braccia chiuse (BC), dopo trattamento acuto per via sistemica (i.p.) con jojoba (controllo, 500 µl/kg, n=5, barra bianca), con BEO (100 µl/kg, n=4, barra grigio chiaro; 250 µl/kg, n=5, barra grigio scuro; 500 µl/kg, n=4, barra nera), DZP (1.2 mg/kg, n=5, barra rossa), in ratti maschi Wistar, nell'elevated plus-maze test.

**Tabella 2-** Percentuale di tempo speso nelle braccia aperte per gli animali trattati con BEO 500µl/kg i.p. nell'elevated plus-maze.

Animali (n=4)	% in open arms
2	89
1	69
1	10

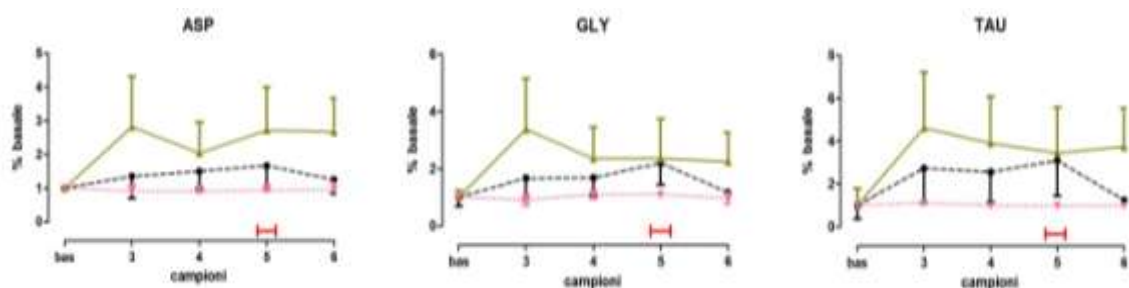
#### 4.1.2.2 Analisi neurochimica

I livelli extracellulari degli aminoacidi analizzati sono riportati in % rispetto al valore basale, indicato come media  $\pm$  SEM, normalizzato ad 1.(Tabella 3).

Mean $\pm$ SEM	Asp	Glu	Gln	Gly	Cit	Tau
<i>Via sistemica</i>						
<u>Elevated Plus Maze</u> n=18	0,32 $\pm$ 0,03	1,6 $\pm$ 0,24	16,7 $\pm$ 1,48	1,00 $\pm$ 0,15	0,39 $\pm$ 0,04	4,95 $\pm$ 0,40

**Tabella 3-** Valori basali calcolati come media dei campioni bas-1 e bas-2 raccolti prima della somministrazione.

I livelli di aspartato (ASP) misurati nei campioni (3-6) per gli animali trattati con BEO 500 µl/kg, risultano maggiori rispetto al valore basale e ai valori misurati sugli animali trattati con olio di jojoba 500 µl/kg. Tuttavia, tale aumento non risulta essere statisticamente significativo. Un andamento simile, si osserva anche per i livelli di glicina (GLY) e taurina (TAU). In particolare, nei ratti trattati con BEO, si osserva un lieve aumento nei campioni 3-4-6 ma non nel campione 5 (**Fig. 4.6**).

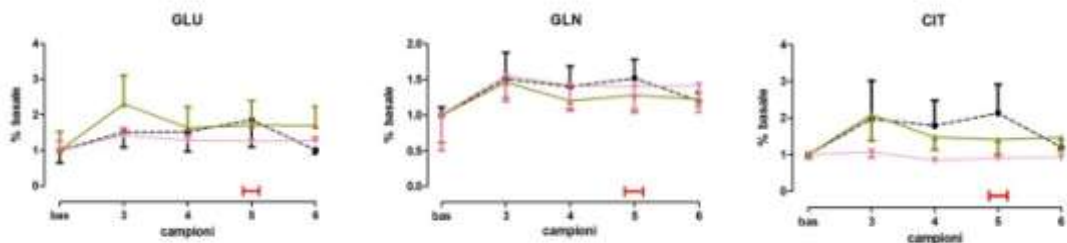


**Fig. 4.6:** livelli di aspartato (ASP); glicina (GLY); taurina (TAU), espressi in % rispetto al valore basale normalizzato ad 1, nell'ippocampo ventrale, dopo trattamento acuto per via sistemica (i.p.) jojoba (500 µl/kg, n=5.●.) con BEO (500 µl/kg, n=7▼), DZP (1.2 mg/kg, n=4, ◆) in ratti maschi Wistar, nell'elevated plus-maze test, eseguito durante la raccolta del campione 5.



Per gli animali trattati con olio essenziale di bergamotto, si osserva un aumento dei livelli extracellulari di glutammato dopo trattamento (campione 3) rispetto al basale e allo stesso campione del gruppo trattato con olio di jojoba. I livelli di glutammina e citrullina, nei campioni 3 e 6, risultano uguali sia per il gruppo controllo sia per gli animali trattati con BEO, mentre, risultano essere più bassi nei campioni 4 e 5 prelevati dagli animali trattati con il fitocomplesso (**Fig.4.7**).

La somministrazione sistemica di DZP 1.2 mg/kg non ha indotto alcuna variazione neurochimica rispetto al valore basale ed ai gruppi di animali trattati con olio di jojoba, per tutti gli amminoacidi studiati. Non sono state osservate, inoltre, modificazioni dei livelli degli amminoacidi negli animali trattati con le dosi di 100 e 250 µl/kg di olio essenziale di bergamotto (**Fig.4.7**).

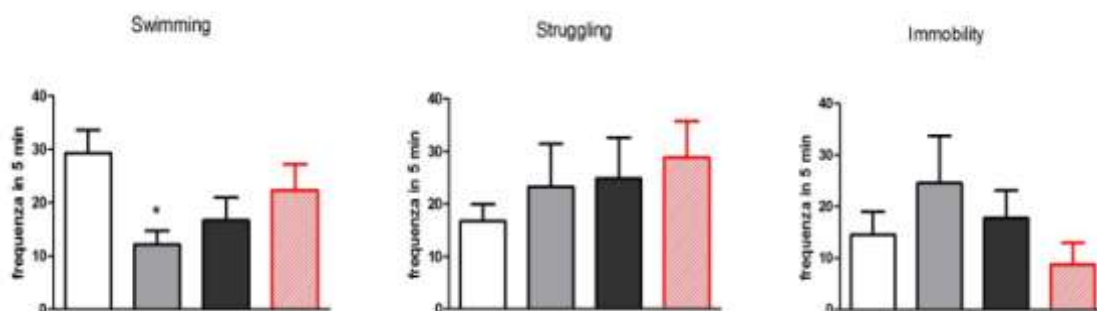


**Fig 4.7:** livelli di glutammato (GLU); glutammina (GLN); citrullina (CIT), espressi in % rispetto al valore basale normalizzato ad 1, nell'ippocampo ventrale, dopo trattamento acuto per via sistemica (i.p.) con jojoba (500 µl/kg, n=5●)BEO (500 µl/kg, n=7 ▼)DZP (1.2 mg/kg, n=4, ◆), in ratti maschi Wistar, nell'elevated plus-maze test, eseguito durante la raccolta del campione 5

#### 4.1.3 Porsolt test

##### 4.1.3.1 Analisi comportamentale

I risultati sono stati riportati come media  $\pm$  SEM dello *swimming*, *struggling*, *immobility*. La somministrazione di BEO ha determinato una riduzione della frequenza di *swimming*, raggiungendo la significatività statistica rispetto al gruppo controllo (jojoba 500 µl/kg) alla dose di 250 µl/kg. Al contrario, nessuna differenza statisticamente significativa è stata evidenziata dopo trattamento con diazepam (1.2 mg/kg). La stessa dose di BEO ha, inoltre, determinato un marcato aumento del parametro *immobility* rispetto al gruppo controllo, mentre, per tale parametro è stata osservata una riduzione per gli animali trattati con diazepam. In tutti e quattro i gruppi sperimentali, non sono state osservate variazioni del parametro *struggling* (**Fig.4.8**).



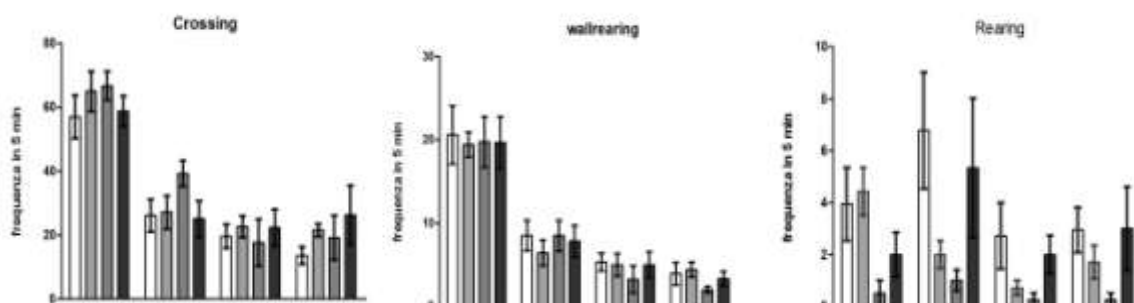
**Fig 4.8:** *swimming; struggling; immobility, dopo trattamento acuto per via sistemica(i.p.) con jojoba (controllo, 500 µl/kg, n=7, barra bianca), BEO ( 250 µl/kg, n=6, barra grigio scuro; 500 µl/kg, n=6, barra nera), DZP (1.2 mg/kg, n=6, barra rossa),in ratti maschi Wistar, nel Porsolt test, \*p<0.05 vs controllo.*

## 4.2 Somministrazione inalatoria

### 4.2.1 Open field test

#### 4.2.1.1 Analisi comportamentale

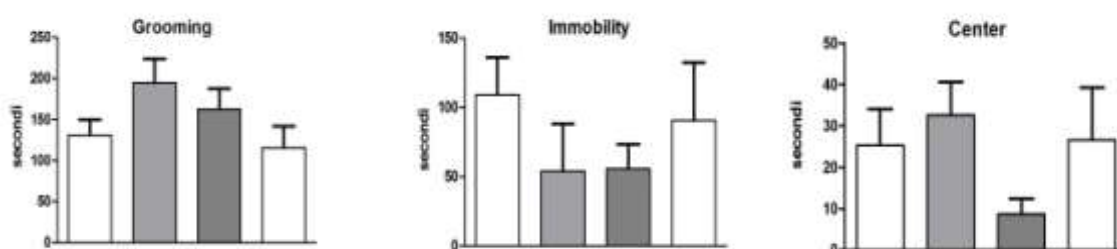
I parametri *crossing*, *wall-rearing* e *rearing*, sono stati misurati come media  $\pm$  SEM della frequenza ogni 5 minuti, rispetto ai 20 minuti totali del test. La somministrazione di 5, 20 o 50 µl di olio essenziale di bergamotto, non ha indotto variazioni statisticamente significative della frequenza di *crossing* e *wall-rearing* per tutta la durata del test. Per i volumi più bassi di EOB è stata osservata in tutti e quattro gli intervalli sperimentali (5-10-15-20 minuti) una riduzione del parametro *rearing* rispetto al gruppo controllo, tale riduzione è stata osservata solo negli ultimi 15 minuti del test dopo inalazione di un volume di 50 µl di BEO (**Fig.4.9**).



**Fig 4.9:** *crossing; wall-rearing; rearing, in 5 minuti dopo trattamento per via inalatoria con jojoba (controllo, 50 µl, n=9, barra bianca),BEO (5 µl, n=6, barra nera; 20 µl, n=5, barra grigio scuro; 50 µl, n=7, barra grigio chiaro), in ratti maschi Wistar, nell'open field test.*

I parametri *grooming*, *immobility* e *center* sono stati calcolati come media  $\pm$  SEM del tempo totale in secondi, rispetto ai 20 minuti del test.

L'inalazione di volumi di BEO pari a 50 e 20  $\mu$ l, ha indotto un aumento del parametro *grooming* rispetto al gruppo controllo (jojoba 50  $\mu$ l). Al contrario, la somministrazione di un volume di 5  $\mu$ l di BEO non ha indotto variazioni dello stesso parametro. Il trattamento con volumi differenti di olio essenziale di bergamotto (50, 20 e 5  $\mu$ l), ha invece indotto una riduzione del parametro *immobility* rispetto al controllo. Per gli animali trattati con un volume di 50  $\mu$ l di olio essenziale di bergamotto è stato inoltre osservato un aumento del tempo speso al centro dell'arena (*center*), rispetto agli altri gruppi sperimentali. Per il gruppo di animali trattati con BEO 20  $\mu$ l è stata osservata una riduzione dello stesso parametro sia rispetto al controllo sia agli altri due gruppi trattati con il fitocomplesso (**Fig. 4.10**).



**Fig. 4.10:** *grooming*; *immobility*; *center*, in secondi dopo trattamento per via inalatoria con jojoba (controllo, 50  $\mu$ l, n=9, barra bianca) BEO (5  $\mu$ l, n=6, barra nera; 20  $\mu$ l, n=5, barra grigio scuro; 50  $\mu$ l, n=7, barra grigio chiaro), in ratti maschi Wistar, nell'open field test.

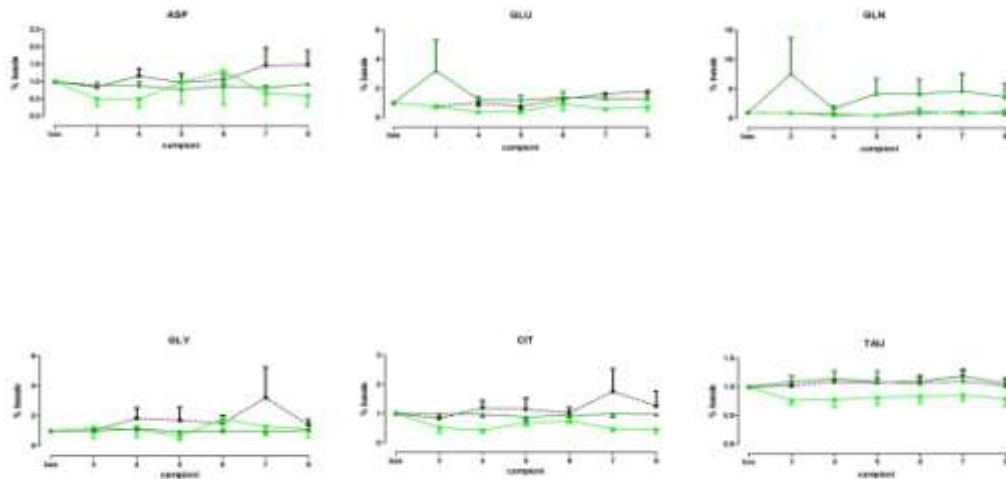
#### 4.2.1.2 Analisi neurochimica

I livelli extracellulari degli aminoacidi analizzati sono riportati in % rispetto al valore basale, indicato come media  $\pm$  SEM, normalizzato ad 1.(Tabella 4).

Mean $\pm$ SEM	Asp	Glu	Gln	Gly	Cit	Tau
<i>Via sistemica</i>						
<u>Elevated Plus Maze</u> n=18	0,32 $\pm$ 0,03	1,6 $\pm$ 0,24	16,7 $\pm$ 1,48	1,00 $\pm$ 0,15	0,39 $\pm$ 0,04	4,95 $\pm$ 0,40

**Tabella 4-** Valori basali calcolati come media dei campioni bas-1 e bas-2 raccolti prima della somministrazione.

Non è stata osservata alcuna variazione statisticamente significativa dei livelli degli amminoacidi in tutti i campioni raccolti dopo inalazione di olio di jojoba o BEO(Fig.4.11).



**Fig. 4.11:** livelli di aspartato (ASP); glutammato (GLU); glutamina (GLN), glicina (GLY), citrullina (CIT), taurina (TAU) espressi in % rispetto al valore basale normalizzato ad 1, nell'ippocampo ventrale, dopo trattamento acuto per via inalatoria con jojoba (50 µl, n=7●) BEO (20 µl, n=3 ■, 50 µl, n=4 ▼), in ratti maschi Wistar, nell'elevated plus-maze test, eseguito durante la raccolta del campione 5.

## 5. DISCUSSIONE

I principi attivi di origine naturale e nello specifico gli estratti da droghe vegetali sono stati tra i primi farmaci primi agenti utilizzati per il trattamento di malattie del SNC, come disturbi dell'umore, stati d'ansia e depressione (Gomes et al., 2009). In particolare, l'impiego degli oli essenziali in queste problematiche trova oggi espressione nell'aromaterapia, una forma di medicina complementare ampiamente utilizzata nel mondo occidentale. La possibilità di utilizzare fitocomplessi nelle patologie del SNC potrebbe, d'altra parte, limitare i molteplici effetti collaterali che accompagnano l'uso dei farmaci di sintesi attualmente utilizzati (Gomes et al., 2009). Sperimentalmente, la valutazione di una potenziale attività ansiolitica, ansiolitico-sedativa o antidepressiva è affidata alla realizzazione di test comportamentali che hanno l'intento di indurre una condizione di stress e uno stato ansioso dovuto alla situazione nella quale è proiettato l'animale; esso, infatti, esprime sia una sorta di paura e preoccupazione che curiosità per il "nuovo". Il fattore comune a tutti i test è rappresentato dal fatto che l'animale è posizionato in un ambiente "non familiare" che tende ad esplorare, specialmente durante i primi minuti, muovendosi in un "campo aperto" quale è l'arena dell'*open field* o lungo le braccia di un labirinto quali sono quelle del *plus-maze*. Lo stato emozionale dell'animale relativo a questa nuova condizione viene valutato mediante lo studio di specifici parametri che descrivono i differenti aspetti del comportamento e della sua "motivazione di fondo". Esposizioni ripetute al test, influenzano notevolmente il comportamento, tanto che gli animali si abituanano rapidamente e la loro locomozione tende a ridursi durante le varie sessioni, fino a quando l'attività raggiunge un livello stabile che è spesso usato per valutare gli effetti che diversi farmaci possono avere sulla locomozione (Walsh and Cummins, 1976). L'*open field*, ad esempio, è un test sfruttato per studiare prevalentemente farmaci con un'ipotetica azione ansiolitica, valutandone gli effetti "non specifici" o "effetti collaterali", cioè quei comportamenti "non legati all'ansia", così come la locomozione e il sonno (Walsh and Cummins, 1976). In questo tipo di test, dopo la fase di esplorazione, caratterizzata da un aumento della frequenza del parametro *wall-rearing*, l'animale tende ad evitare attivamente il centro dell'arena (*center*), che induce ansia, muovendosi lungo la periferia, comportamento caratterizzato da un aumento dei parametri *crossing* e *wall-rearing*. In un secondo momento, quando subentra la fase di "*habituation*" l'animale riduce i suoi movimenti (*immobility*), rimanendo più tempo immobile perché "il nuovo" è ormai diventato "familiare". I

farmaci ansiolitici, come ad esempio le benzodiazepine, diminuiscono la permanenza dell'animale nella periferia, dell'arena aumentando il tempo di esplorazione (Choleris et al., 2001), portando alla riduzione di parametri come il *crossing* e il *grooming*, quest'ultimo utilizzato come indice di risposta dell'animale a un nuovo ambiente (Espejo, 1997). In particolare, questo parametro, aumenta in due condizioni opposte: minore e maggiore stress (Kalueff and Tuohimaa, 2004a). La mancanza di stress, induce l'animale a effettuare una sorta di "grooming" spontaneo, come passaggio da un'attività ad un'altra. Generalmente, avviene in modo rilassato e senza interruzioni, passando dal lavaggio della zampa e della coda, alla pulizia dei genitali. Allo stesso modo, condizioni di stress inducono negli animali la comparsa di *grooming* caratterizzato da interruzioni frequenti e incomplete (Kalueff and Tuohima 2005). L'esecuzione di un test come *l'open field*, permette la descrizione di un parametro molto influenzato dalla nuova condizione che si presenta per l'animale: l'ansia indotta dalle dimensioni e dalla forma dell'arena, nonché la curiosità per qualcosa che non si conosce. Nel nostro caso, gli effetti comportamentali osservati per le dosi di 250 e 500 µl/kg di olio essenziale di bergamotto somministrato per via sistemica, evidenziano delle strette analogie con gli effetti comportamentali prodotti da farmaci ansiolitici come il diazepam. In particolare, le frequenze di *crossing* (statisticamente significativa) e *wall-rearing*, risultano addirittura inferiori anche a quelle osservate negli animali trattati con la dose ansiolitica della benzodiazepina (1.2 mg/kg i.p.) (Siemiakowski et al., 2000). Inoltre, la riduzione del *grooming* osservata negli animali trattati con il fitocomplesso (statisticamente significativa rispetto al controllo) sembrerebbe avvalorare l'ipotesi di un'azione ansiolitica esercitata dall'olio essenziale di bergamotto. Tuttavia, la riduzione dell'attività locomotoria osservata durante la realizzazione del test, è strettamente correlata all'aumento di un altro parametro, l'*immobility* e ciò lascerebbe pensare alla possibilità che il fitocomplesso possa verosimilmente produrre piuttosto un effetto ansiolitico-sedativo di tipo dose-dipendente. Ciò sembra essere confermato ulteriormente dalla riduzione del parametro *wall-rearing* che è specifico dell'attività esplorativa dell'animale. Per meglio caratterizzare tale ipotesi o riuscire a prescindere l'uno o l'altro effetto, sono stati realizzati esperimenti utilizzando l'*elevated plus-maze* test nel quale, generalmente, la preferenza per le braccia chiuse del labirinto (evitando attivamente quelle aperte) riflettono la manifestazione di una risposta simile alla paura (Pawlak et al., 2012). L'aumentata tendenza a evitare le braccia aperte durante i primi 3-5 minuti del test, può essere prevenuta da farmaci ansiolitici come le benzodiazepine.

Invece, la predominanza dell'approccio, durante i due minuti iniziali, può essere bloccata da farmaci ansiogeni causando un incrementato evitamento delle braccia aperte. Un comportamento impulsivo dell'animale è indice di una più alta percentuale d'entrata e di tempo trascorso nelle braccia aperte, riguardo al tempo d'entrata nelle braccia del labirinto (Ueno et al., 2002). In particolare, nel caso degli animali trattati con la dose di 250 µl/kg di olio essenziale di bergamotto, non si osserva un aumento della percentuale del tempo speso nelle braccia aperte (parametro utilizzato per indicare l'effetto ansiolitico dei farmaci) ma la riduzione del numero totale di entrate nelle braccia aperte e chiuse, che avvalorava l'ipotesi di un effetto ansiolitico-sedativo del fitocomplesso e che non si osserva con la benzodiazepina. Quest'effetto è ancora di più evidente per il gruppo di animali trattati con la dose più alta di BEO. In particolare, i test degli animali di quest'ultimo gruppo sono caratterizzati da un aumento del tempo speso nelle braccia aperte a supporto dell'ipotesi non di un effetto ansiolitico del fitocomplesso ma di un comportamento dell'animale in cui esso effettivamente "non sceglie" di stare nell'uno o nell'altro braccio del labirinto perché manca la fase di esplorazione iniziale, ma rimane più tempo nelle braccia aperte per il subentrare di una riduzione nei movimenti (Tabella 1). In particolare, in questo gruppo sperimentale, si è osservato per tre degli animali trattati, un'eccessiva permanenza nelle braccia aperte, e per uno solo, una notevole riduzione della percentuale di tempo speso nelle stesse. Anche se il numero totale di entrate nelle braccia aperte e chiuse risulta essere inferiore per i gruppi di animali trattati con BEO 250 e 500 µl/kg i.p., sia rispetto al controllo che al gruppo trattato con diazepam, ciò non è da considerare come una vera e propria compromissione dell'attività locomotoria ma piuttosto come la comparsa di una ridotta capacità nei movimenti, dovuta verosimilmente alla componente "sedativa" dell'olio essenziale che risulta predominante rispetto a quella di tipo ansiolitico. Per capire se questo effetto potesse caratterizzare una semplice alterazione dei movimenti o uno stato di totale compromissione, si è voluto sottoporre l'animale a una situazione di stress e ansia "estrema", che compaiono in condizioni sperimentali come il Porsolt test. L'animale messo a nuotare in un cilindro contenente acqua, si muove, infatti, in un ambiente ristretto e dal quale non esiste possibilità di fuga. Di conseguenza, a un periodo d'iperattività durante il quale esso prova a scappare, segue uno stato d'immobilità che riflette una situazione di disperazione o di tono dell'umore depresso, come se l'animale avesse "perso la speranza" (Porsolt et al., 1977, 1978). Questo test è ampiamente utilizzato per la valutazione dell'attività antidepressiva di farmaci ma dalla

letteratura, evidenze sperimentali, ne indicano l'impiego anche per fornire importanti informazioni sull'attività locomotoria degli animali e per la valutazione delle proprietà sedative di composti come gli oli essenziali (Lim et al., 2005). L'utilizzo anche in questo test del diazepam come farmaco ad attività ansiolitica è stato utile per meglio evidenziare le proprietà ansiolitiche e/o sedative dell'olio essenziale. L'analisi dei parametri comportamentali mostra, infatti, delle marcate differenze tra gli animali trattati con il diazepam e quelli trattati con BEO. Per questi ultimi ed in particolare per quelli trattati con la dose di 250 µl/kg, si osserva una riduzione statisticamente significativa dell'attività locomotoria (*swimming*). Tal effetto è di natura dose-dipendente, riducendosi con l'aumentare della dose del fitocomplesso. È importante evidenziare che con la benzodiazepina si osserva solo una minima riduzione del tempo speso a nuotare. Altre differenze con il farmaco ansiolitico, si osservano per il parametro *immobility* che aumenta considerevolmente dopo somministrazione del BEO. In particolare l'animale rimane a galla, senza perdere la "percezione della realtà". Questo stato di sedazione apparente indotto dall'olio essenziale di bergamotto, è evidenziato dal parametro *struggling* (che descrive lo stato di ansia e di paura dell'animale) che rimane più elevato rispetto al gruppo controllo, per tutta la durata del test, caratterizzato da un alto margine di errore standard. I risultati ottenuti nel gruppo trattato con il diazepam, avvalorano l'ipotesi di un effetto sedativo legato al fitocomplesso. Infatti, la benzodiazepina a dosi ansiolitiche evidenzia un comportamento non sovrapponibile a quello del BEO, non modificando i parametri *immobility* e *swimming* rispetto al gruppo controllo. Verosimilmente l'impiego di una dose più alta elevata di diazepam avrebbe evidenziato una simile risposta sedativa (Santos et al., 2012). Mentre è ben noto il meccanismo d'azione del diazepam e i suoi effetti sulla trasmissione GABAergica (Goodman and Gilman 2012) che sono alla base di ciò che si osserva nei test, non è chiaro, invece, come il BEO possa "influenzare" il comportamento. Verosimilmente, ciò potrebbe essere dovuto alla capacità di specifici componenti contenuti nell'olio di interferire con la trasmissione sinaptica (Morrone et al., 2007) ed in grado, pertanto di modulare attività fisiologiche di base come l'attività elettroencefalografica (Rombolà et al., 2009). In accordo con tale ipotesi, durante il test dell'*open field* è stato evidenziato un aumento statisticamente significativo dei livelli ipocampali di glutammato negli animali trattati sistemicamente con la dose di 500 µl/kg di BEO. È ben dimostrato che molte funzioni proprie del cervello (dalla percezione ordinata delle sensazioni e del dolore, all'apprendimento, alla memoria, al



controllo della funzione motoria), avvengono grazie alla liberazione di glutammato a livello sinaptico (Goodman and Gilman 2012). La difficoltà nel determinare un coerente meccanismo d'azione che possa spiegare gli effetti indotti dal BEO e il coinvolgimento di una specifica trasmissione nervosa, è sicuramente dettata dal fatto che per via sistemica, è somministrato interamente il fitocomplesso e non un singolo componente della miscela. Considerando tali evidenze sperimentali e soprattutto, l'impiego clinico del BEO in aromaterapia, sono stati studiati gli effetti dell'olio essenziale nell'*open field* test, dopo somministrazione per via inalatoria. La curva dose-risposta costruita con i volumi utilizzati di BEO per via inalatoria (5, 20 e 50  $\mu$ l) non ha, tuttavia, evidenziato variazioni statisticamente significative dei parametri comportamentali studiati rispetto al gruppo controllo. Ciò potrebbe in parte derivare dal fatto che per poter osservare gli effetti del fitocomplesso per via inalatoria, è necessario vaporizzare volumi più alti dello stesso, visto che i soli costituenti della frazione volatile arrivano a livello del SNC. Le differenze osservate nei risultati del test comportamentale sembrerebbero supportate anche da un differente profilo neurochimico dopo inalazione rispetto alla somministrazione sistemica.

## 6. CONCLUSIONI

I risultati ottenuti nel presente lavoro evidenziano un'attività sedativa dell'olio essenziale di bergamotto di tipo dose-dipendente. Tale effetto si osserva anche per la benzodiazepina, a dosi non ansiolitiche ma per quest'ultima appare evidente la comparsa di uno stato di sedazione "profonda" che si traduce nell'animale come totale immobilità e perdita dei movimenti più che in una riduzione dell'attività locomotoria, osservata invece per il BEO. La caratterizzazione di questi effetti biologici dell'olio essenziale di bergamotto assume particolare rilevanza in considerazione delle potenziali applicazioni cliniche del suo impiego nell'uomo. I risultati finora ottenuti avvalorano l'ipotesi relativa all'utilizzo di estratti naturali come rimedi terapeutici, da sostituire o affiancare ai farmaci ansiolitici convenzionali, come le benzodiazepine. Tali estratti sono caratterizzati dalla comparsa di un numero ridotto di effetti collaterali rispetto a quelli osservati in seguito all'assunzione di farmaci ansiolitici, come ad esempio dipendenza psicologica e/o effetti amnesici. Inoltre, dato che è sempre più elevato il numero di persone che ricorre all'aromaterapia e ai massaggi aromaterapici, come "terapia complementare", diventa di estrema importanza studiare e caratterizzare i meccanismi molecolari non ancora noti, alla base degli effetti centrali del BEO. Tali osservazioni rappresentano i presupposti per dar luogo ad ulteriori esperimenti, al fine di caratterizzare meglio il profilo neurofarmacologico dell'essenza di bergamotto e consentirne, quindi, un uso razionale in terapia.

## BIBLIOGRAFIA

- **Amantea, D.; Fratto, V.; Maida, S.; Rotiroti, D.; Rausa, S.; Nappi, G.; Bagetta, G.; Corasaniti, M.T.** (2009). Prevention of Glutamate Accumulation and Upregulation of Phospho-Akt may account for Neuroprotection Afforded by Bergamot Essential Oil Against Brain Injury induced by Focal Cerebral Ischemia in Rat. *Int. Rev. Neurobiol.*, 85: 389-405;
- **Angioini, A.; Barra, A.; Coroneo, V.; Dessi, S.; Cabras, P.** (2006). Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* essential oils from stem/leaves and flowers. *J Agric Food Chem.*, 54: 4364-4370;
- **Ashwood-Smith, M.J.; Poulton, G.A.** (1981). Inappropriate regulations governing the use of oil bergamot in suntan preparations. *Mutat Res.*, 85(5): 389-90;
- **Bakkali, F.; Averbeck, S.; Averbeck, D.; Idaomar, M.** (2008). Biological effects of essential oils--a review. *Food Chem Toxicol* , 46: 446-475;.
- **Ballard, C.G.; O' Brien, J.T.; Reichelt, K.; Perry, E.K.** (2002). Aromatherapy as a safe and effective treatment for the management of agitation in severe dementia: the results of a double-blind, placebo-controlled trial with melissa. *J. Clin. Psychiatry*, 63, 553–558;
- **Ballard, C.G.; Gauthier, S.; Cummings, J.L.; Brodaty, H.; Grosberg, G.T.; Robert, P.; Lyketsos, C.G.** (2009). Management of agitation and aggression associated with Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol*. May;5(5):245-55. doi: 10.1038/nrneurol.2009.39. Review;
- **Batista, P. A., Werner, M.F.P., Oliveira, E.C. et al.** (2010). The antinociceptive effect of (-)-linalool in models of chronic inflammatory and neuropathic hypersensitivity in mice. *J. Pain*. 11: 1222-29;
- **Benveniste, H.** (1989). Brain microdialysis. *J. Neurochem.*, 52(6): 1667-1679;
- **Berliocchi, L.; Russo, R.; Levato, A. et al.** (2009). (-)-Linalool attenuates allodynia in neuropathic pain induced by spinal nerve ligation in c57/b16 mice. *Int. Rev. Neurobiol.* 85: 221-35;
- **Bradley, B.F.; Brown, S.L.; Chu, S.; Lea, R.W.** (2009). Effects of orally administered lavender essential oil on responses to anxiety-provoking film clips. *Hum Psychopharmacol.*, 24(4):319-30. doi: 10.1002/hup.1016;

- **Bradley, B.F.; Starkey, N.J.; Brown, S.L.; Lea, R.W.** (2007). Anxiolytic effects of *Lavandula angustifolia* odour on the Mongolian gerbil elevated plus maze. *J Ethnopharmacol.*, 111(3):517-25. Epub 2006 Dec 27;
- **Brazil, D.P. and Hemmings, B.A.** Ten years of protein kinase B signaling: a hard Akt to follow (2001). *Trends Biochem. Sci.*, 26: 657-664;
- **Cardone, M.H.; Roy, N.; Stennicke, H.R.; Salvesen, G.S.; Franke, T.F.; Stanbridge, E. et al.** (1998). Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science*, 282: 1318-1321;
- **Carlezon, W.A.; Pliakas, A.M.; Parow, A.M.; Detke, M.J.; Cohen, B.M.; Renshaw, P.F.**(2002). Antidepressant-like effects of cytidine in the forced swim test in rats. *Biol Psychiatry*, 51(11): 882-9;
- **Carobrez, A.P. and Bertoglio, L.J.** (2005). Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: The elevated plus-maze model 20 years on. *Neuroscience & Behavioural Reviews*, 29, 1193-1205;
- **Carvalho-Freitas, M.I. and Costa, M.** (2002). Anxiolytic and sedative effects of extracts and essential oil from *Citrus aurantium* L. *Biol Pharm Bull.* 25(12):1629-33;
- **Chioca, L.R.; Ferro, M.M; Barretta, I.P; Oliveira, S.M.; Silva, C.R; Ferreira, J.; Losso, E.M; Andreatini, L.** (2013). Anxiolytic-like effect of lavender essential oil inhalation in mice: Participation of serotonergic but not GABAA/benzodiazepine neurotransmission. *Journal of Ethnopharmacology*, 147: 412–418;
- **Choleris, E.; Thomas, A.W.; Kavaliers, M.; Prato, F.S.** (2001). A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 25, 235-60;
- **Clarke, C.H. and Jones, R.B.** (2000). Effects of prior video stimulation on open-field behavior in domestic chicks. *Appl. Anim. Behav. Sci.*, 66: 107-17;
- **Corasaniti, M.T; Maiuolo, J.; Maida, S.; Fratto, V.; Navarra, M.; Russo, R.** (2007). Cell signaling pathways in the mechanisms of neuroprotection afforded by bergamot essential oil against NMDA-induced cell death in vitro. *Br. J. Pharmacol.*, 151: 518-529;

- **Cryan, J.F.; Valentino, R.J., Lucki, I.** (2005). Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressant using the modified rat forced swimming test. *Neurosci Biobehav Rev.*, 29(4-5): 547-69;
- **De Almeida, R.N.; Motta, S.C.; Faturi, C.D.; Catallani, B.;Leite, J.R.** (2004). Anxiolytic-like effects of rose oil inhalation on the elevated plus-maze test in rats. *Pharma-col. Biochem. Behav.* 77 (2): 361–364;
- **De Sousa, D.P.; Hocayen, Pde A., Andrade, L.N.; Andreatini, R.** (2015). A systematic Review of the Anxiolytic-Like Effects of Essential Oils in Animal Models. *Molecules*, 14:20(10): 18620-60;
- **Dugo, G.; Lamonica, G.; Cotroneo, A.; Trozzi, A.; Crispo, F.; Licandro, G. et al.** (1987). Introduzione. In “*La composizione della frazione volatile dell’essenza di bergamotto*”, pp7. *Essenze Derivati Agrumari*, Reggio Calabria;
- **Dugo, P.; Mondello, L.; Stagno D’Alcontres, I.; Cavazza, A., Dugo, G.** (1997). Oxygen heterocyclic compounds of Citrus Essential Oils. *Perfumer & Flavorist*, 22, 25-30;
- **Dugo, G. and Bonaccorsi, I.** (2013). *Citrus Bergamia: Bergamot and its derivatives*. Boca Raton, FL: CCR Press;
- **Edris, A.E.** (2007). Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. *Phytother Res.*, 21(4):308-23;
- **Espejo, E.F.** (1997). Effects of weekly or daily exposure to the elevated plus-maze in male mice. *Behavioural Brain Research.*, 87(2): 233-8;
- **Faturi, C.B.; Leite, J.R.; Alves, P.B.; Canton, A.C.; Teixeira-Silva, F.** (2010). Anxiolytic-like effect of sweet orange aroma in Wistar rats. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 34(4): 605-9;
- **Fu, C.Y.; Moyle, W.; Cooke, M.** (2013). A randomised controlled trial of the use of aromatherapy and hand massage to reduce disruptive behaviour in people with dementia. *BMC Complement Altern Med.* 13:165. doi: 10.1186/1472-6882-13-165;
- **Fung, J.K.; Tsang, H.W.; Chung, R.C.** (2012). A systematic review of the use of aromatherapy in treatment of behavioral problems in dementia. *Geriatr Gerontol Int.*, (3):372-82. doi: 10.1111/j.1447-0594.2012.00849.x. Epub 2012 Mar 21;

- **German, P.G.; Schuhmacher, A. Harrison, J.; Law, R.; Haug, K.** (2013). How to create innovation by building the translation bridge from basic research into medicinal drugs: an industrial perspective. *Hum Genomics*, 5: 7-5. doi: 10.1186/1479-7364-7-5;
- **Gomes, N.G.M.; Campos, M.G.; Orfao, J.M.C.; Ribiero, C.A F.** (2009). Plants with neurobiological activity as potential targets for drugs discovery. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, 33: 1372-89;
- **Goodma & Gilman** (2012). Le basi farmacologiche della terapia. *Mc Graw Hill*, 17, 403-05;
- **Graham, P.H.; Browne, L.; Cox, H.; Graham, J.J.** (2003). Inhalation aromatherapy during radiotherapy: results of a placebo-controlled double-blind randomized trial. *J Clin Oncol.*, 21(12):2372-6;
- **Grimes, C.A. and Jope, R.S.** (2001). The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3beta in cellular signaling. *Prog. Neurobiol.*, 65: 391-426;
- **Jirovetz, L.; Buchbauer, G.; Jager, W.; Woiiich, A.; Nikiforov, A.** (1992). Analysis of fragrance compounds in blood samples of mice by gas'chromatograohy, mass spectrometry . GC/FTIR and GC/ AES after inhalation of sandalwood oil. *Biomed Chromatogr*, 6(3):133-134;
- **Johnson, A.J.** (2011). Cognitive facilitation following intentional odor exposure. *Sensors*, 11, 5469-5488; doi: 10.3390/s110505469;
- **Kalueff, A.V. and Tuohimaa, P.** (2004a). Grooming analysis algorithm for neurobehavioural stress research. *Brain Res. Protoc.*, 13, 151-58;
- **Kalueff, A.V. and Tuohimaa, P.** (2005). Mouse grooming microstructure is a realible anxiety marker bidirectionally sensitive to GABAergic drugs. *Eur. J. Pharmacol.*, 508 (1-3), 147-53.
- **Katsuyama, S.; Otowa, A.; Kamio, S. et al.** (2015). Effect of plantar subcutaneous administration of bergamot essential oil and linalool on formalin-induced nociceptive behavior in mice. *Biomed. Res.* 36: 47-54. doi: 10.2220/biomedres.36.47;
- **Komiya M.; Takeuchi T.; Harada E.,** (2006). Lemon oil vapor causes an anti-stress effectvia modulating the 5-HT and DA activities in mice. *Behav Brain Res*, 172: 240-249;
- **Kovar , K.A.; Gropper, D.; Friess, D.; Ammon, H.P.** (1987). Blood levels of 1,8-cineole and locomotor activity of mice after inhalation and oral administration of rosemary oil, *Planta Med.*, 53 315-319 ;

- **Kreibig, S.D.; Wilhelm, F.H.; Roth, W.T.; Gross, J.J.** (2007). Cardiovascular, electrodermal, and respiratory response patterns to fear- and sadness-inducing films. *Psychophysiology*, 44: 787–806;
- **Kuwahata, H.; Komatsu, T.; Katsuyama, S. et al.** (2013). Peripherally injected linalool and bergamot essential oil attenuate mechanical allodynia via inhibiting spinal ERK phosphorylation. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 103(4): 735-41;
- **Lee, Y.L.; Wu, Y.; Tsang, H.W.; Leung, A.Y.; Cheung, W.M.** (2011) A systematic review on the anxiolytic effects of aromatherapy in people with anxiety symptoms. *J Altern Complement Med*, 17(2):101e8;
- **Lim, W.C.; Seo, J.M.; Lee, C II, P. H.P.; Lee, B.C.** (2005). Stimulative and sedative effects of essential oils upon inhalation in mice. *Arch. Pharm. Res* Vol 28, 7, 770-74;
- **Lister RG.,** (1990). Ethologically based animal models of anxiety disorders. *Pharmacol Ther*; 46: 321-40;
- **Lister, R.G.** (1987). The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharm.*, 92(2): 180-5;
- **Lopes, L.M.C.; Gonçalves e Sá, C.; de Almeida, A.A.; da Costa, J.P.; Marques, T.H.; Feitosa, C.M. et al.** (2011). Sedative, anxiolytic and antidepressant activities of *Citrus limon* (Burn) essential oil in mice. *Pharmazie*. 66(8):623-7;
- **Masotti, V.; Juteau, F.; Bessiere, J.M.; Viano, J.** (2003). Seasonal and phenological variations of the essential oil from the narrow endemic species *Artemisia molinieri* and its biological activities. *J Agric Food Chem.*, 51: 7115-7121;
- **Minghong, M.** (2010). Multiple Olfactory Subsystems Convey Various Sensory Signals. In *The neurobiology of olfaction*, Ed. Menini A., CRC Press, 225-241;
- **Mirrodi, M.; Navarra, M.; Quattropani, M.C.; Calapai, F.; Gangemi, S.; Calapai, G.**(2014). Systematic review of clinical trials assessing pharmacological properties of *Salvia* species on memory, cognitive impairment and Alzheimer disease, *CNS Neurosci Ther.*, 20(6): 485-95.
- **Morrone, L.A.; Rombolà, L.; Corasaniti, M.T. et al.** (2007) The essential oil of bergamot enhanced the levels of amino acids neurotransmitters in the hippocampus of rat: implication of monoterpene hydrocarbons. *Pharmacol.* 55: 255-62;

- **Moufida, S. and Marzouk, B.** (2003). Biochemical characterization of blood orange, sweet orange, lemon, bergamot and bitter orange. *Phytochemistry*, 62(8): 1283-9;
- **Nagai ,K.; Nijima, A.; Horii, Y.; Shen, J.; Tanida, M.** (2014). Olfactory stimulatory with grapefruit and lavender oils change autonomic nerve activity and physiological function. *Auton Neurosci*. 185:29-35. doi: 10.1016/j.autneu.2014.06.005. Epub 2014 Jun 25;
- **Navarra, M.; Mannucci, C.; Delbò, M.; Calapai, G.** (2015). *Citrus bergamia* essential oil: from basic research to clinical application. *Mini Review Article*;
- **Ohl, F.** (2003). Testing for anxiety. *Clinical Neuroscience Research*, 3, 233-238;
- **Palmer, R.M.J.; Ashton, D.S.; Moncada, S.** (1998). Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*, 333, 664-66;
- **Pawlak, C.R.; Karrenbauer, B.D.; Schneider, P.; Ho, Y.J.** (2012). The elevated plus-maze test: Differential Psychopharmacology of Anxiety-Related Behavior. *Emotion Review*. 4:98;
- **Paxinos and Watson.** The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, Academic Press Inc., 1998, USA;
- **Pellow, S.; Chopin, P.; File S.E.; Briley, M.** (1985). Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, 14(3), 149-67;
- **Perry, N.; Perry, E.** (2006). Aromatherapy in the management of psychiatric disorders: Clinical and neuropharmacological perspectives. *CNS Drugs*. 20: 257-280;
- **Pierce, S.; Luzzaro, A.; Cerabolini, B.** (2012). Taxonomy, Morphology and Ecology of Medicinal Plant. Chapter 2 in Herbal Medicine. Development and Validation of Plant-Derived Medicines for Human Health. *Ed CRC press*;
- **Porsolt, R.D.; Anton, G.; Blavet, N.; Jalfre, M.** (1978). Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur J Pharmacol.*, 47(4): 379-91;
- **Porsolt, R.D.; Le Pichon, M.; Jalfre, M.** (1977). Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*, 266(5604): 730-2;
- **Prut, L. and Belzung, C.** (2003). The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviours: a review. *Eur J Pharmacol.*, 463(1-3): 3-33;



- **Pultrini Ade, M.; Galindo, L.A.; Costa, M.** (2006). Effects of the essential oil from *Citrus aurantium* L. in experimental anxiety models in mice. *Life Sci.* 78(15):1720-5. Epub 2005 Oct 25;
- **Purohit, M.P.; Zafonte, R.D.; Sherman, L.M.; Davis, R.B.; Giwerc, M.Y.; Shenton, M.E.; Yeh, G.Y.**(2015). Neuropsychiatric symptoms and expenditure on complementary and alternative medicine. *J Clin Psychiatry*, Jul;76(7):e870-6. doi: 10.4088/JCP.13m08682;
- **Rapisarda, A. and Germanò, M. P.** (2013). *Citrus Bergamia* risso and poiteau botanical classification, morfology and anatomy, in *Citrus Bergamia: Bergamot and its Derivatives*, eds G.Dugo and I.Bonaccorsi (Boka Raton, FL: CCR Press), 9-11;
- **Ravindran, A.V.; da Silva, T.L.** Complementary and alternatie terapie as add-on to pharmacotherapy for mood and anxiety disorders: a systematic review (2013). *J Affect Disord.*, 150(3):707-19. doi: 10.1016/j.jad.2013.05.042. Review;
- **Richards, D.A.; Morrone, L.A.; Bowery, N.G.** (2000) Hippocampal extracellular aminoacids and EEG spectral analysis in a genetic rat model of absence epilepsy. *Neuropharm.*, 39(12): 2433-41;
- **Richards, D.A.; Obrenovic, T.P.; Johanson-Mora, A.; Islekel, S.; Symon, L.; Curzon, G.** (1993). Effects of global ischemia, under simulated penumbra conditions, on brain monoamine neurochemistry and subsequent neurological and histological deficits. *J. Neurochem.*, 61(5): 1801-7;
- **Rombolà, L.; Amantea, D.; Russo, R.; Adornetto, A.; Berliocchi, L.; Tridico, L. et al.** Rational Basis for the Use of Bergamot Essential Oil in Complementary Medicine to Treat Chronic Pain. Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, *in press*;
- **Rombolà, L.; Corasaniti, M.T.; Rotiroti, D. et al.** (2009). Effects of sistemyc administration of the essential oil of bergamot (BEO) on gross behaviour and EEG power spectra recorded from the rat hyppocampus and cerebral cortex. *Funct Neurol.* 24: 107-12;
- **Sakurada, T.; Mizoguchi, H.; Kuwahata, H. et al.** (2011) Intraplantar injection of bergamot essential oil induces peripheral antinociception mediated by opioid mechanism. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 97(3): 436-43;
- **Santos, F.J.; Lima, S.G.; Cerqueira, G.S., Citò, A.M.; Cavalcante, A.A.C.; Marques, T.H.C. et al.** (2012). Chemical composition and anxiolytic-like effects of the *Bauhinia platyptala*. *Rev. Bras. Farmacogn.*, 22, 507-16;

- **Shaw, D.; Annett, J.M.; Doherty ,B.; Leslie, J.C.** (2007). Anxiolytic effects of lavender oil inhalation on open-field behavior in rats. *Phytomedicine*, 14: 613-620;
- **Shaw, D.; Norwood, K.; Leslie, J.C.** (2011). Chlordiazepoxide and lavender oil alter unconditioned anxiety-induced c-fos expression in the rat brain. *Behav Brain Res.* 224(1):1-7. doi: 10.1016/j.bbr.2011.05.014;
- **Siemiatkowski, M.; Sienkiewicz-Jarosz, H.; Czlonkowska, Al.; Bidzinski, A.; Plaznik, A.** (2000). Effects of buspirone, diazepam and zolpidem on open field behavior, and brain [3H] muscimol binding after buspirone pretreatment. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 66, 645-51;
- **Sugawara, Y.; Hara, C.; Aoki, T.; Sugimoto, N.; Masujima, T.** (2000). Odor distinctiveness between enantiomers of linalool: difference in perception and responses elicited by sensory test and forehead surface potential wave measurement. *Chem. Senses*, 25: 77-84;
- **Sugawara, Y.; Hino, Y.; Kawasaki, M.; Hara, C.; Tamura, K.; Sugimoto, N. et al.** (1999). Alteration of perceived fragrance of essential oils in relation to type of work: a simple screening test for efficacy of aroma. *Chem Senses.*,24(4):415-21;
- **Tucci ,P.; Colaianna, M; Zotti, M.; Morgese, M.G.; Schiavone, S.; Govoni, V. ;Trabace L.** (2010). Soluble  $\beta$ amyloid<sub>1-42</sub>: a critical player in producing behavioural and biochemical changes evoking depressive-related state? *British journal of pharmacology*, 159:1704-1715;
- **Ueno, K.I.; Togashi, H.; Mori, K.; Matsumoto, M.; Ohashi, S.; Hoshino, A.; Yoshioka, M.** (2002).Behavioural and pharmacological relevance of stroke-prone spontaneously hypertensive rats as an animal model of a developmental disorder. *Behavioural Pharmacology*, 13, 1-13;
- **Verzera, A.; Trozzi, A.; Gazea, F.; Ciccirello, G.; Cotroneo, A.** (2003). Effects of rootstock on the composition of Bergamot (Citrus Bergamia Risso et Poiteau) Essential oil. *J. Agric. Food Chem.* 51, 206-10;
- **Verzera, A.; Trozzi, A.; Stagno D'Alcontres, I.; Mondello, L.; Dugo, G., Sebastiani, E.** (1998). The composition of the volatile fraction of Calabria bergamot essential oil. *Riv. Ital. EPPOS*, 25, 17-38;
- **Wachowiak, M.** (2010). Active sensing in olfaction. In *The neurobiology of olfaction*, Ed. Menini A, CRC Press. Chapter 12;

- **Walsh, R.N. and Cummins, R.A.** (1976). The open-field test: A critical review. *Psychological Bulletin*, 83: 482-504;
- **Wilkinson, S.M.; Love, S.B.; Westcombe, A.M.; Gambles, M.A. Burgess, C.C.; Cargill, A.et al.** (2007). Effectiveness of aromatherapy massage in the management of anxiety and depression in patients with cancer: a multicenter randomized controlled trial. *J Clin Oncol.* 25(5):532-9;
- **Woelk, H. and Schläfke S.** (2010). A multi-center, double-blind, randomised study of the Lavender oil preparation Silexan in comparison to Lorazepam for generalized anxiety disorder. *Phytomedicine*, 17(2):94-9. doi: 10.1016/j.phymed.2009.10.006. Epub 2009 Dec 3;