

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE AGRO-ALIMENTARI

CAMPUS DI CESENA

CORSO DI LAUREA IN TECNOLOGIE ALIMENTARI

TITOLO DELLA TESI

“ACCORGIMENTI NUTRIZIONALI VOLTI ALL’OTTIMIZZAZIONE DEL METABOLISMO DEL  
TRIPTOFANO IN CONDIZIONI FISIOLOGICHE E PATOLOGICHE”

Tesi in

Scienza dell’alimentazione

Relatore:

Chiar.ma Prof.ssa **Alessandra Bordini**

Correlatore:

Dott.ssa **Simona Vita**

Candidato: **Mattia Parigiani**

Matricola N° 0000839490

Anno Accademico 2019/2020

Sessione unica

# *INDICE*

## Capitolo 1 IL TRIPTOFANO: CARATTERI GENERALI

1.1	Struttura chimica e funzioni nell'organismo umano .....	1
1.2	Contenuto negli alimenti e fabbisogno giornaliero .....	5
1.3	Assorbimento, trasporto e uptake.....	7

## Capitolo 2 IL METABOLISMO DEL TRIPTOFANO

2.1	Via della chinurenina .....	11
2.1.1	Enzima triptofano 2-3 deossigenasi .....	12
2.1.2	Enzima indoleamina 2-3 deossigenasi .....	13
2.1.3	Metabolismo post-chinurenina.....	14
2.2	Pathway della serotonina.....	17
2.3	Pathway della melatonina .....	21
2.4	Funzioni della serotonina .....	23
2.5	Funzioni della melatonina .....	25

## Capitolo 3 RUOLO DEL TRIPTOFANO E DEI SUOI METABOLITI NEL PROCESSO INFIAMMATORIO

3.1	Le cause alimentari dell'infiammazione sistemica .....	28
3.2	Variazioni del metabolismo del triptofano nell'obesità .....	30
3.3	Variazioni del metabolismo del triptofano nella sindrome metabolica.....	32
3.4	Variazioni del metabolismo del triptofano nelle malattie neurodegenerative.....	34

## Capitolo 4 BIODISPONIBILITÀ E METABOLISMO DEL TRIPTOFANO

4.1 Biodisponibilità del triptofano .....	35
4.2 Metabolismo del triptofano e attività fisica.....	37
4.3 Il ruolo della flora batterica intestinale .....	39

Capitolo 5 LA DIETA MEDITERRANEA COME FONTE DI TRIPTOFANO E MELATONINA.....	43
--	----

Capitolo 6 INTEGRATORI ED ALIMENTI ARRICCHITI CON TRIPTOFANO .....	47
---	----

Capitolo 7 CONCLUSIONI.....	50
-----------------------------	----

Capitolo 8 BIBLIOGRAFIA.....	52
------------------------------	----

# Capitolo 1

## Il Triptofano: caratteri generali

### 1.1 Struttura chimica e funzioni nell'organismo umano

La molecola di triptofano fu scoperta nel 1901 dai due chimici inglesi Hopkins e Cole, che furono in grado di isolarla a seguito dell'idrolisi della caseina: la proteina fu posta in una soluzione all'8% di carbonato di sodio e subì una digestione triptica (da qui il nome triptofano) al termine della quale si assistette alla precipitazione dell'aminoacido, poi recuperato a seguito di filtrazione (Hopkins F. et al., 1901).

Il triptofano è un amminoacido aromatico neutro a lunga catena (large neutral amino acid - LNAA) che appartiene alla famiglia dei 9 amminoacidi essenziali (insieme a valina, leucina, isoleucina, fenilalanina, treonina, metionina, lisina e istidina), quindi non potendo essere sintetizzato endogenamente dall'organismo umano, deve essere assunto con l'alimentazione.

Come per tutti gli amminoacidi proteinogenici, solamente l'isomero -L è utilizzato nella sintesi proteica ed è coinvolto in svariate vie metaboliche di importanza biochimica e fisiologica. Inoltre, solo in tale configurazione il triptofano può oltrepassare la barriera ematoencefalica (Palego L. et al., 2015).

Il triptofano (formula chimica bruta  $C_{11}H_{12}N_2O_2$ ) ha una massa molecolare di 204,22 g/mol (la più alta tra gli amminoacidi), si presenta come una polvere bianca o bianca giallastra, insapore, incolore e inodore (PubChem). A pH fisiologico si trova in forma zwitterionica, in cui il gruppo amminico è protonato e quello carbossilico è deprotonato (PubChem).

Il precursore per la sintesi di triptofano è l'acido corismico, a partire dal quale ha inizio una serie di passaggi che si concludono con la reazione tra l'indolo-3-glicerofosfato e il piridossalfosfato-serina; su questo complesso agisce l'enzima

triptofano sintetasi che catalizza la reazione produttrice del composto finale triptofano (Santos-Sánchez N. F. et al., 2019).

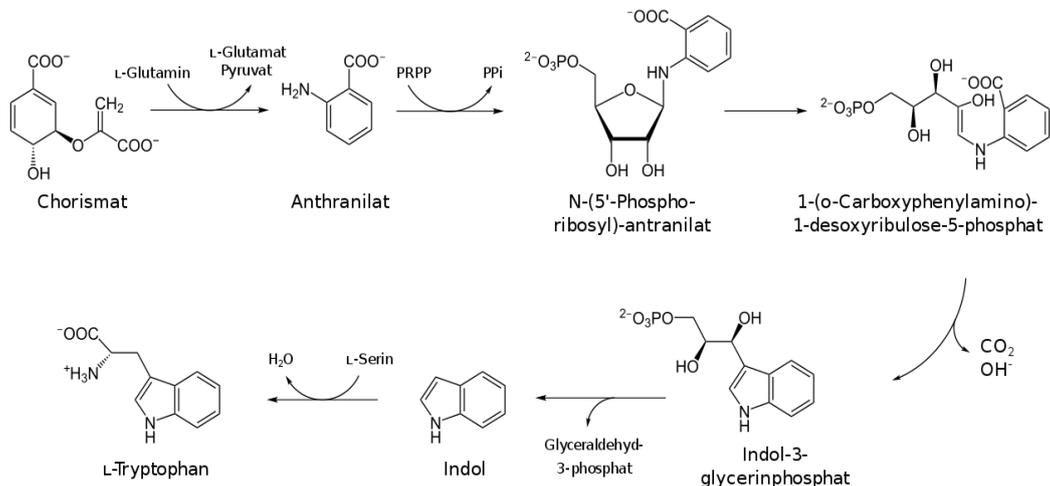


Figura 1.1 Sintesi del triptofano

Questo è l'unico amminoacido che deriva dall'indolo o 2-3 benzopirrolo (una struttura formata da un anello benzenico e un pirrolo), la cui presenza rende la molecola idrofobica (Schiffer M. et al., 1994).

La struttura dell'indolo svolge due ruoli fondamentali:

- È composto da 8 atomi di carbonio, che possono essere sfruttati come residui stabilizzanti le strutture peptidiche e proteiche in cui il triptofano è coinvolto come amminoacido strutturale, infatti il benzene è una molecola aromatica e permette interazioni  $\pi - \pi$  mentre l'azoto del pirrolo permette legami a idrogeno. Di conseguenza l'indolo in qualità di gruppo laterale caratterizzante peptidi e proteine permette di stabilizzare le strutture formate grazie a interazioni idrofobiche (Palego L. et al., 2015).
- Può fungere da scheletro per la formazione di nuove molecole con uno specifico significato biologico.

Le proteine fibrose integrali di membrana contengono generalmente concentrazioni più elevate di triptofano rispetto alle proteine globulari idrosolubili. All'interno delle sub-unità delle proteine, molti residui di triptofano formano legami a idrogeno con l'ossigeno carbonilico della catena principale, stabilizzandone la struttura. Sulla superficie delle molecole i residui sono posizionati in modo da formare legami a H con le teste idrofile dei fosfolipidi di membrana e in modo tale che gli anelli idrofobici siano immersi nella parte lipidica del doppio strato (Schiffer M. et al., 1994).

Una tra le funzioni principali del triptofano, sebbene non quella quantitativamente preponderante, è la sintesi proteica, a cui partecipa, come già detto, solamente l'isomero -L. Il triptofano è anche il precursore di diversi composti quali serotonina, melatonina, triptamina, niacina, NAD, NADP, acido chinolinico e chinurenico (Nongonierma A. et al., 2015). La serotonina (5-idrossitriptamina o 5-HT) è un neurotrasmettitore che agisce a livello del sistema nervoso centrale in risposta a stimoli ambientali. La melatonina (N-acetil-5-metossitriptamina) è un ormone prodotto dall'epifisi che agisce regolando i ritmi del sonno (Höglund E. et al., 2019).

Il triptofano svolge un ruolo molto importante anche a livello dell'apparato digerente, dove favorisce la rigenerazione della mucosa intestinale e protegge l'ambiente circostante da agenti potenzialmente pericolosi (Lamas B. et al., 2016); è inoltre a disposizione delle cellule enterocromaffini per la produzione di serotonina.

In uno studio condotto da ricercatori italiani si è osservato che la somministrazione di triptofano determina nei topi una maggiore protezione contro l'infiammazione e un'alterata capacità di resistere alle infezioni intestinali (Zelante T. et al., 2013). Questo effetto è apparso legato alla produzione di alcuni metaboliti dell'aminoacido da parte dei lattobacilli della flora microbica intestinale.

Proprio in virtù delle fondamentali funzioni che il triptofano svolge a livello dell'organismo umano, diversi studi epidemiologici si sono focalizzati

sull'effetto della sua carenza. È stato osservato come una dieta povera di triptofano ma ricca degli altri LNAA porti rapidamente alla diminuzione della concentrazione di triptofano ematico con conseguente bassa disponibilità dell'aminoacido per la sintesi proteica e riduzione del suo uptake da parte del cervello (pari al 70% in meno). A livello cerebrale la ridottissima disponibilità di triptofano porta alla diminuita sintesi di serotonina, con peggioramento del tono dell'umore. In soggetti che non hanno mai mostrato segni di depressione, il calo del tono dell'umore è lievissimo, ma negli individui a rischio di depressione per un fattore familiare, la privazione di triptofano porta a scompensi nel controllo dell'umore. Nelle persone che sono in recupero da una situazione di depressione, abbassare momentaneamente il livello di triptofano può portare a crisi depressive acute (Jenkins T. et al., 2016).

Per evitare di incorrere nelle problematiche generate dalla carenza di triptofano, il mercato degli integratori a base dello stesso aminoacido ha cominciato a registrare un forte impulso a partire dagli inizi degli anni '80 del secolo scorso. La diffusione di questi integratori è stata favorita dalla scoperta di nuove tecniche di sintesi del principio attivo, basate su un tipo di processo fermentativo che permette di produrne quantità industriali ad un prezzo molto competitivo. Proprio grazie all'integrazione della dieta con questa tipologia di prodotto si è potuto raggiungere l'obiettivo di incrementare il livello di triptofano ematico al punto tale da permettere un raddoppiamento del trasporto di triptofano al cervello, quindi una sintesi in loco di serotonina raddoppiata (Steenbergen L. et al., 2015).

Nel 1989, a causa di un lotto di triptofano sintetizzato in maniera errata da una singola compagnia (era stata utilizzata una variante geneticamente modificata di *Bacillus Amylolyquefaciens* per aumentare le rese e una quantità ridotta di carbone attivo nella purificazione del principio attivo per ridurre i costi), si diffuse negli USA una malattia autoimmune (sindrome eosinofilo-mialgica) (Belongia E. et al., 1990). Per questo motivo gli integratori a base di triptofano

furono ritirati dal mercato degli USA fino al 2005, anno in cui la Food and Drug Administration (FDA) permise nuovamente la loro vendita (Allen J. et al., 2011). Ciò fu conseguente alla dimostrazione che il triptofano non è una sostanza tossica, e la sua  $DL_{50}$  (dose assunta in una volta sola che uccide il 50% di una popolazione campione) corrisponde a 1.4 g/Kg di peso corporeo negli umani (Nongonierma A. et al., 2015).

## **1.2 Contenuto negli alimenti e fabbisogno giornaliero**

Il triptofano è contenuto in molti alimenti sia di origine animale che vegetale: latte, formaggi, albume d'uovo, carne, pesce, frutta oleosa a guscio (noci, anacardi, arachidi, mandorle), semi (soia, girasole, sesamo, zucca), patate, ceci e in quantità minor nei cereali (riso, grano, mais) (Strasser B. et al., 2016).

La prima valutazione da fare per misurare la sua quantità negli alimenti è considerare che la sintesi da parte di piante e batteri richiede molta energia, oltre alla presenza di enzimi e substrati specifici. Questa è una delle principali cause per cui il triptofano è poco presente nella catena alimentare e la sua presenza nei tessuti animali è strettamente controllata. Tra tutti gli amminoacidi è quello contenuto in misura minore all'interno degli alimenti (solo il 2% rispetto al 9% della leucina, il più rappresentato) (Palego L. et al., 2015).

L'assunzione raccomandata per gli adulti varia da 250-425 mg/giorno, che corrispondono a 3,5-6 mg/giorno \* Kg peso. I neonati e i bambini hanno, come per tutti gli altri amminoacidi essenziali, un fabbisogno giornaliero relativo molto più alto, circa 12 mg/giorno \* Kg peso corporeo.

Una dieta bilanciata e variabile assicura abbondantemente il soddisfacimento del fabbisogno medio (Palego L. et al., 2015).

<b>Alimento</b>	<b>Triptofano (mg/100g)</b>
Latte	42
Uova	165
Farina di frumento	110
Salsiccia	93
Patate	28
Formaggio	325
Carne di manzo	230
Banana	10
Soia	160
Pane integrale, tostato	140
Semi di chia, secchi	440
Petto di pollo	400
Cacao	290

*Tabella 1. Quantità di triptofano negli alimenti*

In America centrale, mais e fagioli contribuiscono al soddisfacimento delle necessità proteiche quotidiane per il 31 ed il 24% rispettivamente. Entrambe le matrici alimentari però sono povere di triptofano e lisina, e rendono quindi maggiormente frequenti sindromi carenziali quali la sindrome di kwashiorkor nei bambini, normalmente legata ad uno scarso apporto proteico. (Friedman M, 2018).

È stato osservato come l'assunzione di cereali arricchiti con triptofano aiuti a migliorare la qualità del sonno e a diminuire ansia e stress in soggetti dai 55 ai 75 anni. L'esperimento, durato 3 settimane, è consistito nell'assunzione da parte di 35 soggetti (26 donne e 9 uomini) di 30g di cereali al giorno, ripartiti tra il pranzo e la cena. Durante la prima settimana (di controllo) i soggetti hanno assunto cereali tradizionali non arricchiti (22,5mg di triptofano in 30g di

alimento), nella seconda (trattamento) hanno assunto cereali arricchiti con triptofano (60mg in 30g di alimento) e nella terza settimana hanno seguito la loro dieta normale senza l'obbligo di mangiare cereali o per lo meno senza che venissero fornite informazioni relative a specifiche quantità di cereali da ingerire. L'assunzione dei cereali arricchiti ha migliorato l'efficienza del sonno, in termini di maggior immobilità durante il sonno, di minor attività notturna (come ad esempio il sonnambulismo) e di minor tempo impiegato per addormentarsi (Bravo R. et al., 2012).

Il consumo di cereali arricchiti è stato testato anche su bambini di 8 - 16 mesi con disturbo del sonno, e si è dimostrato avere effetti positivi anche su questo gruppo di popolazione (Friedman M, 2018).

### **1.3 Assorbimento, trasporto e uptake**

Il triptofano segue, come tutti gli altri amminoacidi, un percorso ben definito per poter essere assorbito e utilizzato dai diversi tessuti.

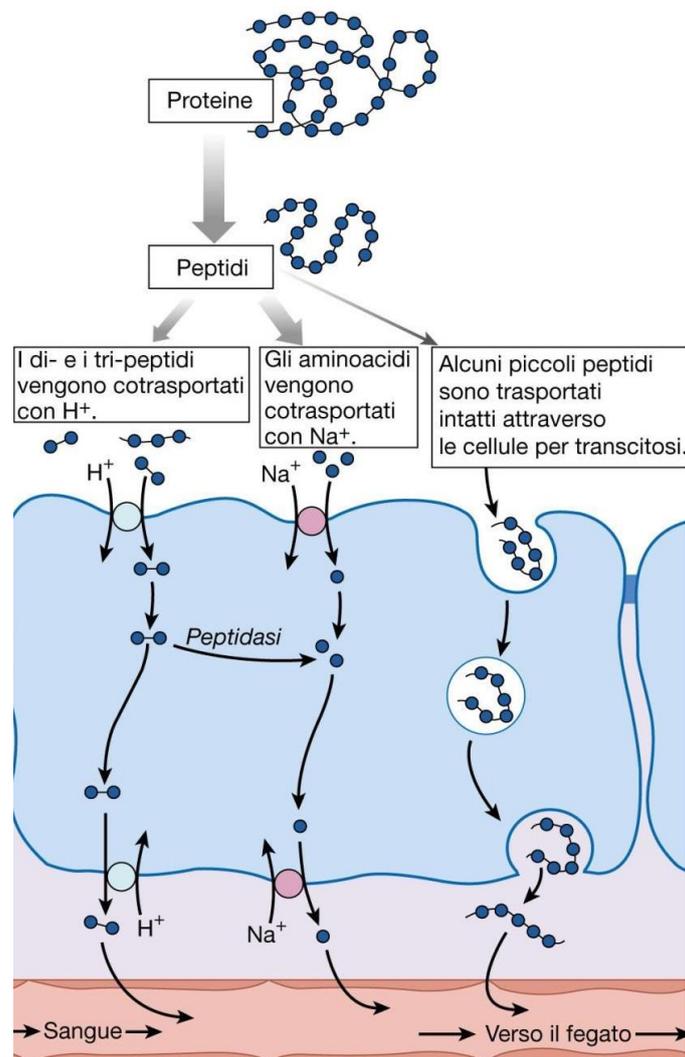
La digestione delle proteine comincia nello stomaco. Le cellule parietali delle ghiandole gastriche rilasciano l'enzima proteolitico pepsina nella forma inattiva di pepsinogeno, il quale viene attivato dal pH acido dello stomaco. Infatti, la presenza di ioni  $H^+$  causa un cambiamento conformazionale della molecola che si esplica con l'esposizione dei siti attivi. L'attivazione dello zimogeno a pepsina prevede che il pH ottimale d'azione dell'enzima sia intorno a 3 e in un ambiente a tal punto acido, viene effettuata la prima idrolisi parziale sulle proteine.

Successivamente quando il contenuto dello stomaco (chimo) entra nell'intestino tenue, le cellule endocrine del duodeno e del digiuno reagiscono al pH acido stimolando la secrezione dell'ormone secretina. Questa induce la secrezione di bicarbonato da parte del pancreas, che permette di neutralizzare rapidamente il pH gastrico acido. Anche la percezione della presenza di grassi e di polipeptidi,

da parte delle cellule enteroendocrine, induce la secrezione di colecistochinina che induce a sua volta la secrezione di enzimi digestivi (efficaci solo a pH neutro) da parte del pancreas.

Tra questi enzimi digestivi figurano tripsina, chimotripsina, elastasi e carbossipeptidasi, tutti secreti come proenzimi in forma di zimogeni.

Dopo la digestione da parte delle forme attive di questi enzimi si ha una predominanza di peptidi formati da 6-8 amminoacidi.



*Figura 1.3 Digestione e assorbimento AA*

I peptidi sono scissi ulteriormente dalle peptidasi collocate sull'orletto a spazzola degli enterociti; successivamente questi (composti ora da 2-3 amminoacidi) sono trasportati all'interno degli enterociti attraverso uno specifico sistema di trasporto (anch'esso collocato sull'orletto a spazzola) dove vengono finalmente scissi a singoli amminoacidi. A questo punto entrano in circolazione attraverso la membrana basolaterale della cellula intestinale e vengono trasportati ai principali distretti tissutali quali fegato e muscoli; infine entrano a far parte del pool amminoacidico per il turnover proteico (Bhuthia Y. et al., 2018).

A livello intestinale sono presenti diversi sistemi di trasporto, specifici e aspecifici, attivi e passivi. In particolare, il triptofano e altri aminoacidi a lunga catena sfruttano due trasportatori, entrambi deputati all'assorbimento di tali molecole. Questi due sistemi sono:

- Il trasportatore sodio dipendente per aminoacidi neutri ( $B^0AT1$ ), presente sulla membrana apicale dell'epitelio e codificato dal gene *SLC6A19*, la cui mutazione porta alla malattia di Hartnup.
- Il sistema T, selettivo per aminoacidi aromatici, presente nella membrana basolaterale. La proteina è nota come *TAT1*, e controlla unicamente il trasporto degli aminoacidi aromatici dall'enterocita al flusso sanguigno (Palego L. et al., 2015).

Praticamente la totalità degli aminoacidi viene assorbita nell'intestino tenue, con un diverso gradiente di assorbimento. I dipeptidi e i tripeptidi vengono assorbiti maggiormente nella prima porzione (duodeno e digiuno) mentre gli aminoacidi vengono assorbiti prevalentemente nella porzione distale (ileo).

Il triptofano, insieme alla glicina, è assorbito meno efficacemente di altri aminoacidi nel primo tratto, perciò rimane presente in quantità abbondante nel lume arrivando intatto fino all'ileo (Bhuthia Y. et al., 2018).

Tra gli aminoacidi neutri, il triptofano è quello che possiede la minor affinità per il trasportatore apicale  $B^0AT1$ , ciò significa che per fornire ai tessuti la

quantità di triptofano realmente necessaria al corretto svolgimento delle loro funzioni bisogna assicurare un apporto maggioritario. In questo contesto l'assorbimento a livello intestinale è un primo passaggio finemente regolato necessario alla successiva biotrasformazione dell'aminoacido (Palego L. et al., 2015).

Il triptofano è lipofilo e scarsamente solubile in soluzioni acquose a pH fisiologico, perciò viene trasportato nel flusso sanguigno legato all'albumina per oltre il 75%. Tuttavia, a livello plasmatico esiste un preciso equilibrio tra il triptofano legato all'albumina e quello libero, equilibrio fondamentale nel determinare l'entità del successivo trasporto verso la barriera-emato-encefalica (BEE).

Il triptofano è trasportato attraverso la barriera emato-encefalica dalla proteina LAT1, che appartiene alla superfamiglia dei trasportatori denominati carrier di tipo L, e da una proteina accessoria, l'antigene di superficie cellulare CD98 (heavy chain 4F2) (Palego L. et al., 2015).

La regolazione del rapporto triptofano legato/triptofano libero è modulata da alcuni fattori come ad esempio l'intensa attività sportiva che contribuisce all'aumento di lipolisi con conseguente incremento del livello di acidi grassi non esterificati (NEFA), I NEFA facilitano la rottura del legame tra triptofano e albumina legandosi essi stessi alla proteina ed aumentando la concentrazione di triptofano libero. Si ritiene che il triptofano abbia un'affinità più alta per la BEE che per l'albumina, quindi una piccola percentuale dell'aminoacido legato è comunque disponibile ad oltrepassare la barriera (Palego L. et al., 2015).

Un altro meccanismo di controllo riguarda la dissociazione del triptofano dall'albumina all'interno del microcircolo cerebrale attraverso interazioni con il glicocalice della membrana delle cellule endoteliali. Questo processo dipende dall'emodinamica, ovvero dalla quantità di sangue che circola nel cervello: la dissociazione di triptofano dall'albumina aumenta quando il flusso sanguigno è ridotto (Ruddik J. et al., 2006).

Quando il triptofano supera la BEE, esso può essere trasportato nel sistema nervoso centrale tramite proteine che si suppone appartengano alla classe delle ABC (ATP-binding cassette transporters).

Una volta giunto nel sistema nervoso centrale il triptofano è disponibile per le diverse cellule (microglia, macrofagi, cellule dendritiche, astrociti, mastociti, neuroni serotonergici), ognuna delle quali lo utilizza per specifici scopi (Palego L. et al., 2015).

## Capitolo 2

### Il metabolismo del triptofano

#### **2.1 Via della chinurenina**

Il triptofano acquisisce rilevante importanza in virtù dei prodotti che da esso originano. Oltre al ruolo rivestito nella sintesi proteica, il triptofano è da anni riconosciuto come precursore biosintetico di numerosi composti neurologicamente attivi, tra cui figurano le principali melatonina e serotonina. Una via del triptofano che solo recentemente ha suscitato l'interesse da parte del mondo della ricerca grazie alla sua influenza sul sistema immunitario, sullo stato infiammatorio e sulle condizioni neurologiche, è la via della chinurenina (Ian D. et al., 2015).

Inizialmente la via della chinurenina era considerata la principale via di produzione di NAD, ma al di là di questo prodotto, restava una via biologicamente inattiva. In seguito, si scoprì che la maggior parte della degradazione del triptofano (fino al 95%) avviene tramite questo pathway che ha luogo in diversi tessuti fegato, reni, cervello, astrociti, microglia, cellule endoteliali del microcircolo e macrofagi (Marazziti D. et al., 2013).

La prima reazione di questa via metabolica prevede la conversione del triptofano a N-formilchinurenina ad opera dell'enzima triptofano 2-3 deossigenasi (TDO) nel fegato, reni e cervello o dell'enzima indoleamina 2-3 deossigenasi (IDO) nelle cellule di astrociti, microglia, tessuto endoteliale cerebrale e macrofagi (Badawy A. 2016). Sia IDO che TDO catalizzano lo stesso tipo di reazione e la loro concentrazione è fattore limitante la reazione.

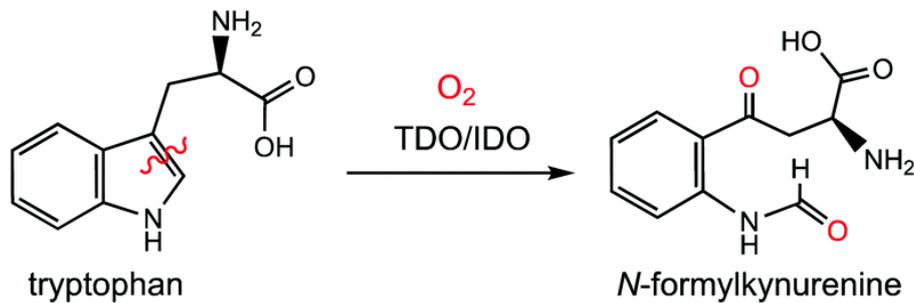
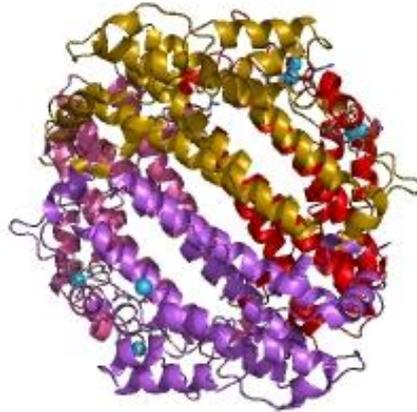


Figura 2.1 Prima tappa della via della chinurenina

### 2.1.1 Enzima triptofano 2-3 deossigenasi

La TDO è un enzima eme dipendente specifico per L-triptofano, che inserisce due atomi di ossigeno nel legame 2-3 dell'anello pirrolico (Nelson D. et al., 2002). TDO viene attivata dal suo stesso substrato triptofano quindi, paradossalmente, una presenza eccessiva di triptofano plasmatico riduce la quota di precursore che sarà destinata a formare serotonina. D'altra parte, basse concentrazioni di triptofano nel sangue possono anche essere determinate dall'aumento di cortisolo, che funge da attivatore ormonale della TDO, oltre che da un aumento dei livelli plasmatici di mediatori dell'infiammazione quali IL- $\beta$ , TNF  $\alpha$  e IFN  $\gamma$  (Marazziti D. et al., 2013).



*Figura 2.2 Struttura chimica TDO*

### 2.1.2 Enzima indoleamina 2-3 deossigenasi

IDO invece è un monomero con minor specificità per il substrato, tant'è che può ossidare anche D-triptofano, indolo e indoleamine. È attivato dalle citochine pro-infiammatorie: l'attivatore principale è IFN-  $\gamma$ . L'attività di IDO è determinata quindi dall'equilibrio tra citochine infiammatorie (IL-1 $\beta$ , IL-2, TNF- $\alpha$ ) e antinfiammatorie (interleuchina IL-4, IL-10, fattore di crescita trasformante  $\beta$ ). Ovviamente una preponderanza di citochine antinfiammatorie agisce inibendo IFN- $\gamma$  e non attivando IDO. Anche il monossido di azoto (NO) inibisce reversibilmente IDO, inattivando il complesso enzimatico Fe<sup>2+</sup>-NO-Triptofano (Badawy A. 2016).

.

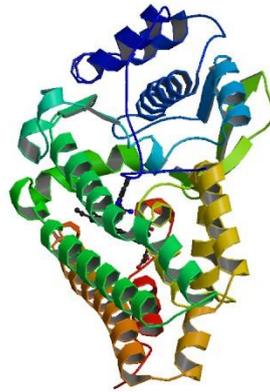


Figura 2.3 Struttura chimica IDO

L’N-Formilchinurenina è idrolizzata a chinurenina (K) dall’enzima N-formilchinurenina formammidasi. Questo enzima idrolizza il gruppo formilico (CHO) staccandolo dall’azoto.

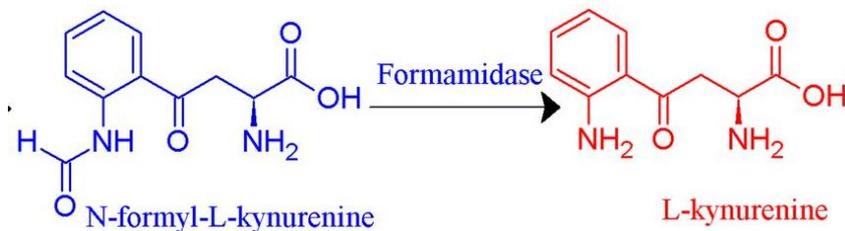


Figura 2.4 Seconda tappa della via della chinurenina

### 2.1.3 Metabolismo post-chinurenina

I prodotti della chinurenina vengono a formarsi nel corso del metabolismo post chinurenina, il quale è suddiviso a sua volta in due vie: la via **dell'acido chinurenico** e la via **del NAD**. Per quanto riguarda la prima via, la chinurenina viene trasformata in acido chinurenico (KA) ad opera dell’enzima chinurenina amino transferasi, il cui prodotto contribuisce all'alterazione cognitiva tipica degli stati depressivi, schizofrenici, demenziali e caratterizzanti obesità e ipertensione (Oxenkrug, Gregory F., 2010).

Invece, per quanto la via del NAD, la chinurenina può essere metabolizzata dalla chinureninasi ad acido antranilico, il quale subisce un'idrossilazione non specifica ad acido 3 idrossiantranilico; oppure viene metabolizzata ad opera dell'enzima chinurenina idrossilasi, formando 3-idrossichinurenina (3-HK), la quale a sua volta viene transaminata dall'enzima chinurenina amminotransferasi ad acido xanturenico (3-HK  $\rightarrow$  XA). Questo metabolita ha la capacità di reagire con l'insulina, creando un complesso che essendo non distinguibile dell'insulina, determina una diminuzione della sensibilità alla stessa tipica della sindrome metabolica.

La 3-HK può anche subire un'idrolisi a seguito di cui viene distaccata l'alanina per azione dell'enzima chinureninasi, formando acido 3-idrossiantranilico (3-HAA). Sia 3-HK sia 3-HAA incrementano la perossidazione lipidica e innescano le reazioni a cascata dell'acido arachidonico che incrementano tragicamente la produzione di fattori pro-infiammatori come prostaglandine e leucotrieni. L'acido 3-idrossiantranilico è un forte agente neurotossico e viene immediatamente trasformato ad acido 2-amino-3-carbossimuconico-6-semialdeide che viene convertita ad acido picolinico dall'enzima 2-amino-3-carbossimuconato-semialdeide carbossilasi e attraverso una conversione non enzimatica ad acido chinolinico.

Infine, l'acido chinolinico viene convertito a NAD dall'enzima chinolinato fosforibosil transferasi (Badawy A. 2016).

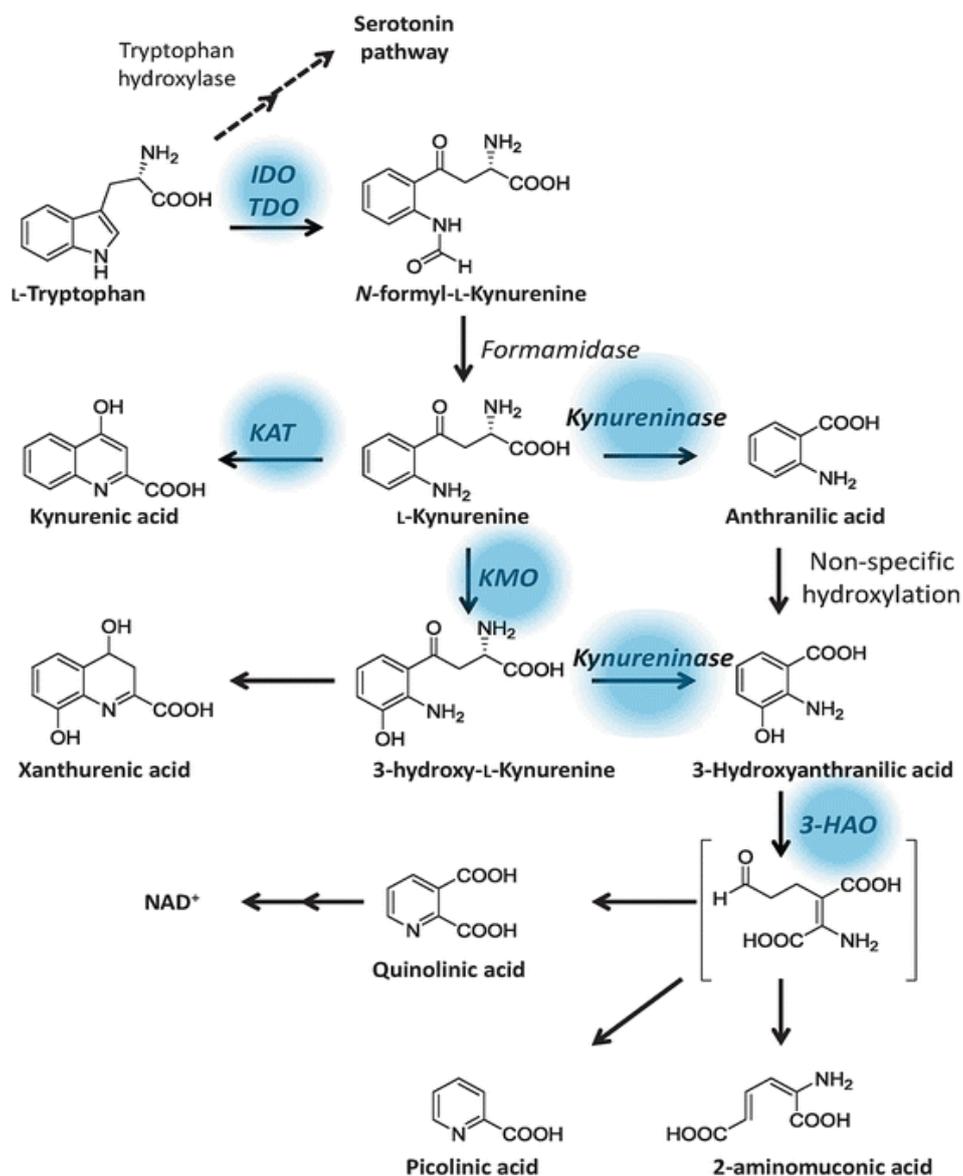


Figura 2.5 Metabolismo post-chinurenina

L'acido picolinico è una molecola neuroprotettiva che agisce come chelante di zinco e ferro e perciò può limitare gli effetti dell'acido chinolinico. È un composto antifungino, antivirale, antitumorale ed ha funzione di regolazione sulla crescita cellulare con evidente ruolo nel gestire le infiammazioni.

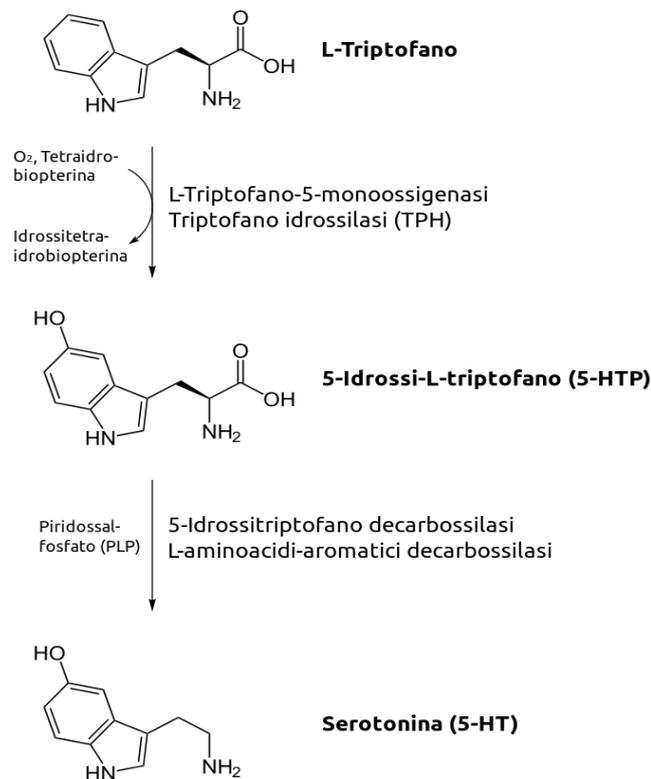
L'acido chinolinico (QUIN) può esercitare un'attività neurotossica attivando i recettori neuronali dell'N-metil-D-aspartato (NMDA), associati

all'apprendimento e alla memoria. A livello cerebrale QUIN eserciterebbe una funzione neuro protettiva solo a bassissime concentrazioni ma qualora a seguito di stati infiammatori la sua concentrazione plasmatica aumentasse, l'effetto esercitato è neurotossico (Dehghani M. et al., 2019).

Il *NAD* è un coenzima ossidoriduttivo e svolge un ruolo essenziale a livello cellulare in quanto nella sua forma ridotta (*NADH*) trasporta gli elettroni alla catena respiratoria permettendo la sintesi di *ATP*. Sebbene si sia indotti a pensare che una maggior quantità di precursore determini la sintesi di una maggior concentrazione di *NAD*, in realtà in caso la produzione di *QUIN* aumenti la sintesi di *NAD*. Peraltro la via della chinurenina non è la via principale tramite cui viene prodotto *NAD* (Badawy A., 2016).

## **2.2 Pathway della serotonina**

La serotonina o 5-idrossitriptamina (5-HT) è un'ammina biogena che ha funzione di ligando per la famiglia dei recettori serotoninergici (Ruddel R. et al., 2008). È sintetizzata a partire da L-triptofano: la prima reazione, limitante, è la conversione in 5-idrossi-L-triptofano (5-HTP) tramite l'azione dell'enzima triptofano idrossilasi, che aggiunge un gruppo -OH sull'atomo C5 dell'anello benzenico. Il 5-HTP viene successivamente decarbossilato dall'enzima 5-idrossitriptofano decarbossilasi formando serotonina (Boadle-Biber M., 1993).



*Figura 2.6 Sintesi di serotonina*

Esistono 2 geni diversi che codificano per l'enzima triptofano idrossilasi: TPH1 e TPH2. TPH1 è espresso nelle cellule enterocromaffini ed è responsabile della maggior parte della presenza di serotonina nel sangue mentre TPH2 è espresso solamente nei neuroni serotonergici del tronco encefalico e influenza la quantità di serotonina all'interno del cervello. La serotonina formata nel cervello agisce come neurotrasmettitore mentre quella formata nel tratto gastro-intestinale agisce come ormone (Yadav V., 2013).

Il triptofano assorbito nell'intestino tenue viene immesso in circolo e captato dalle cellule cerebrali grazie a un carrier condiviso con altri aminoacidi neutri a lunga catena. L'aminoacido essenziale viene trasformato in serotonina tramite le due reazioni appena riportate, e la serotonina viene immagazzinata nelle vescicole sinaptiche dei neuroni presinaptici serotonergici. Le vescicole

migrano verso la membrana sinaptica e, in seguito a stimolazione, rilasciano 5-HT per esocitosi. La serotonina rilasciata interagisce con specifici recettori dei neuroni postsinaptici.

L'azione della serotonina si esaurisce sia tramite la sua diffusione a livello della sinapsi sia tramite la ricaptazione all'interno del neurone presinaptico, in cui viene nuovamente immagazzinata o degradata ad opera dell'enzima monoammina ossidasi (MAO) (D'Auria M., 2011). Questo enzima catalizza la deaminazione ossidativa della 5-HT convertendola in 5-idrossi-3 indolealdeide (5-HIAL), la quale è ulteriormente trasformata in acido 5 idrossi-3-indoleacetico dall'aldeide deidrogenasi (5-HIAA). Piccolissime concentrazioni di 5-HIAL possono essere trasformate in 5 idrossitriptolo (5-HTOL) da un'aldeide reductasi NAD dipendente o da un'alcol deidrogenasi NADPH dipendente (Bortolato M. et al., 2010). 5-HIAA viene eliminata per diffusione: dopo essere entrato nel circolo sanguigno, viene escreto tramite i reni.

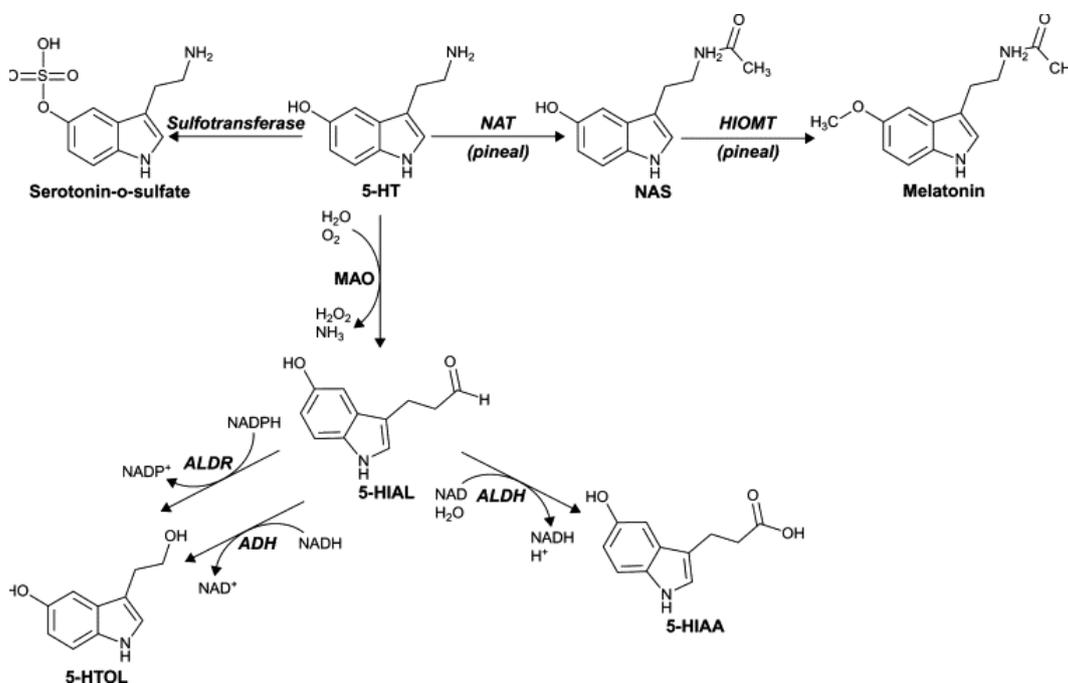


Figura 2.7 Catabolismo della serotonina

Oltre alla degradazione tramite MAO la serotonina può subire ulteriori bioconversioni, di entità minore che si verificano nel tratto gastro-intestinale, nella retina e nella tiroide:

- Coniugazione a gruppi solfati tramite una sulfotransferasi
- Glucuronilazione tramite la glucuronil transferasi

Per finire la 5-HT può anche essere convertita nella ghiandola pineale a melatonina (Bortolato M. et al., 2010).

Nel sistema nervoso centrale la 5-HT eccita alcuni neuroni e ne inibisce altri. Inoltre, a livello presinaptico determina inibizione del rilascio di neurotrasmettitori dalle terminazioni nervose.

Anche a livello delle piastrine l'azione della serotonina si esaurisce poiché essa viene ricaptata e depositata nei granuli secretori.

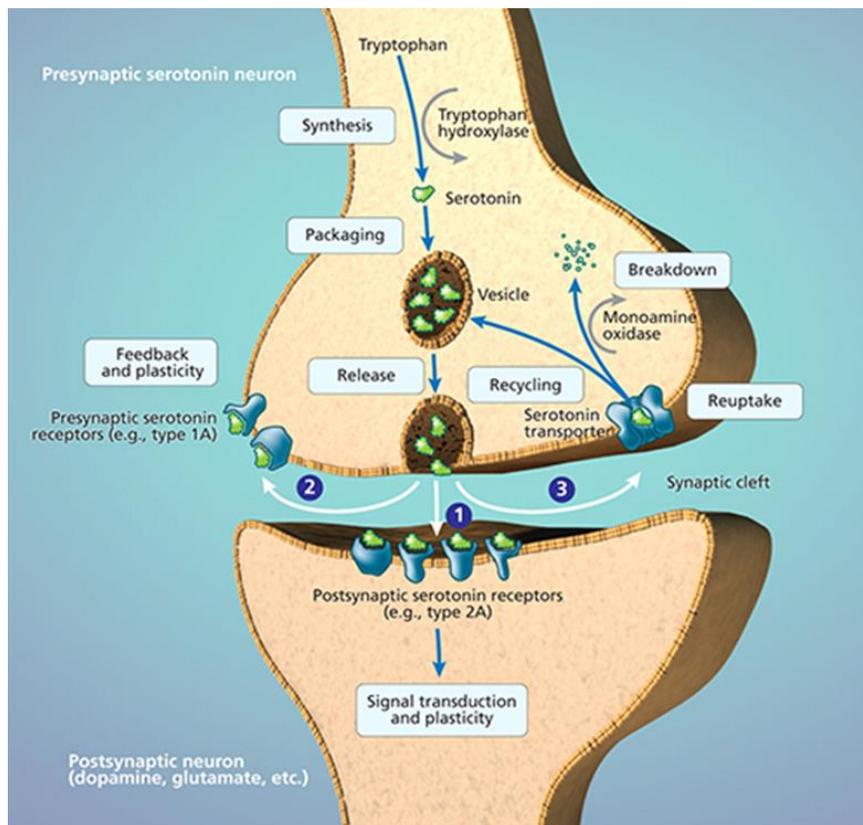


Figura 2.8 Reuptake della serotonina

## 2.3 Pathway della melatonina

La ghiandola pineale, estremamente vascolarizzata è situata al centro del cervello ed è composta da due tipi di cellule: i pinealociti che producono indoleamine (soprattutto melatonina) e le cellule gliali (che hanno una funzione nutritiva e di sostegno) (Brzezinskif A. et al.,1997).

La via metabolica principale che porta alla sintesi di melatonina (N acetil 5 metossitriptamina) partendo dal triptofano prevede la formazione di serotonina, che subisce quindi un'acetilazione (catalizzata dall'enzima aralchilamina N- acetiltransferasi) e una metilazione (ad opera dell'enzima acilserotonina O-metil transferasi). La prima reazione è la tappa limitante (Hardeland R. et al., 2005).

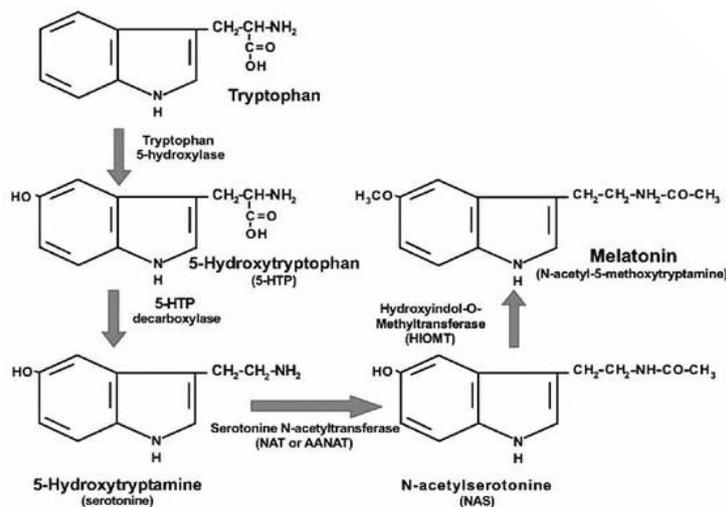


Figura 2.8 Sintesi della melatonina

La melatonina è un ormone particolarmente importante nella regolazione del ritmo circadiano dell'organismo.

L'orologio biologico naturale si trova nel nucleo soprachiasmatico collocato nell'ipotalamo ed è proprio questo nucleo soprachiasmatico che prende l'informazione della durata del giorno dalla retina e invia alla ghiandola pineale (o epifisi) il segnale di sintetizzare melatonina o di inibirne la produzione. La secrezione dell'indoleamina in questione infatti è regolata dal ciclo luce-buio, in particolare la sintesi di melatonina è inibita durante il giorno. Durante le ore di luce i fotorecettori della retina vengono iperpolarizzati (ossia viene aumentato il valore assoluto del potenziale trans-membrana), non rilasciano norepinefrina ai recettori per la norepinefrina ed inibiscono quindi la produzione di melatonina in una maniera dose dipendente (maggiore è il tempo di esposizione alla luce, maggiore è l'intensità della luce, maggiore sarà l'entità di inibizione della sintesi di melatonina). Contrariamente, il buio ne stimola il rilascio poiché i fotorecettori rilasciano norepinefrina, che attiva i recettori correlati con conseguente produzione di melatonina. Nel genere umano la secrezione di melatonina comincia poco dopo il tramonto ed ha un picco tra le 2 e le 4 di notte, calando gradualmente nelle successive ore. La quantità di melatonina prodotta varia con l'età. I neonati fino a 3 mesi producono pochissima melatonina, che inizia a venire prodotta in maniera circadiana nei mesi successivi. Il picco di produzione si ha tra gli 1 e i 3 anni, con valori di 320 pg/ml (durante la notte) per poi calare gradualmente. Gli adolescenti e gli adulti hanno normalmente valori di melatonina compresi tra 10 pg/ml (durante il giorno) e 60 pg/ml (durante il picco notturno) (Brzezinskif A. et al.,1997).

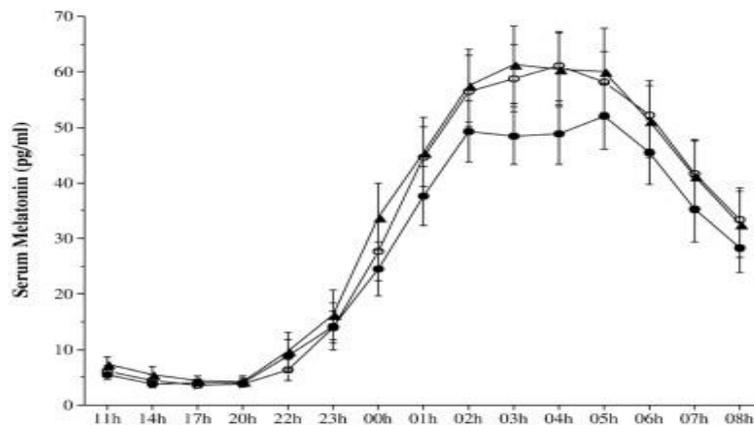


Figura 2.9 Andamento circadiano della melatonina negli adulti

È proprio durante la notte che la melatonina sintetizzata aumenta di concentrazione ed entra nel circolo sanguigno per diffusione passiva. Dopodiché la melatonina è rapidamente metabolizzata nel fegato tramite l'idrossilazione a 6-idrossimelatonina e dopo coniugazione ad acido solforico o glucuronico, la 6-solfatossimelatonina formata si viene escretata con le urine.

## 2.4 Funzioni della serotonina

La serotonina è un messaggero chimico i cui 14 recettori sono espressi quasi per la totalità nel cervello e in misura minore a livello del sistema nervoso centrale, nel tessuto vascolare cerebrale e non cerebrale, oltre che nel tratto gastro-intestinale. È molto difficile trovare un comportamento umano neuropsicologico che non sia modulato dalla serotonina, infatti questa domina l'umore, la rabbia, l'aggressività, l'appetito, la memoria, la sessualità e l'attenzione, ecc. Ogni comportamento è regolato da più recettori e ogni recettore (espresso in più regioni del cervello) regola più comportamenti. Per esempio, l'ansia è regolata dai recettori 5-HT<sub>1A</sub> e 5-HT<sub>2C</sub> ma il recettore 5-HT<sub>2C</sub> regola anche movimento, l'appetito e il bilancio energetico (Berger M. et al., 2019). Il 95% di serotonina periferica si trova a livello del tratto gastro-intestinale dato che le cellule enterocromaffini la sintetizzano e la riversano nell'intestino. La serotonina

agisce ancora prima della digestione, non appena si introduce il cibo in bocca, infatti il contatto tra cibo e papille gustative ne determina il rilascio consentendo ai nervi sensoriali afferenti di trasmettere l'informazione al sistema nervoso centrale (CNS). Successivamente il cibo seguirà il proprio percorso digestivo grazie alla peristalsi ed al rilascio di enzimi pancreatici, entrambi fenomeni regolati dalla secrezione di serotonina (Berger M. et al., 2019). La serotonina intestinale controlla lo stimolo dell'appetito attraverso un sistema di feed-back grazie all'attivazione di fibre afferenti che portano l'informazione nel sistema nervoso centrale (SNC) attivando i neuroni nelle aree dedicate al bilancio energetico (Lam D. et al., 2007). Inoltre, i recettori 5-HT<sub>2C</sub> e 5-HT<sub>1B</sub> presenti nell'ipotalamo agiscono sulle melanocortine, un gruppo di ormoni che regolano l'assunzione di cibo (Berger M. et al., 2019).

A livello del sistema circolatorio la serotonina può regolare la pressione sanguigna causando vasocostrizione o vasodilatazione a seconda del recettore che va a stimolare. La serotonina controlla anche il funzionamento delle piastrine, che in condizioni normali la inglobano nei granuli densi. Quando le piastrine si attivano durante il processo di coagulazione liberano serotonina, che stimola l'aggregazione piastrinica e la vasocostrizione.

La serotonina fa anche parte del sistema di controllo della respirazione grazie al suo effetto sul tronco encefalico e sulla vascolarizzazione polmonare. Nel caso di ipertensione polmonare arteriosa (PAH), l'ipossia aumenta i livelli di serotonina nel plasma, aumentando l'azione del recettore 5-HT<sub>2B</sub> sulle cellule endoteliali delle arterie polmonari e di conseguenza aumentando la resistenza vascolare, aggravando la PAH. Inibitori di questo recettore potrebbero quindi essere utili per trattare la malattia durante i primi stadi (Berger M. et al., 2019). La serotonina ha un ruolo anche nella regolazione della temperatura corporea (Lam D. et al., 2007). È stato osservato come topi non produttori di serotonina mostrino una rapida diminuzione della temperatura corporea (ipotermia) se posti in luoghi freddi; probabilmente il processo è mediato dai recettori 5-HT<sub>1A</sub> e 5-HT<sub>7</sub> (Berger M. et al., 2019).

La serotonina è implicata anche nella percezione del dolore sia a livello periferico che centrale; in caso di infiammazione, i bassi livelli di serotonina inducono un'aumentata sensibilità delle fibre nervose periferiche, che inviano un segnale di dolore al SNC (Berger M. et al., 2019).

## **2.5 Funzioni della melatonina**

La melatonina oltre ad essere prodotta dall'epifisi, viene sintetizzata anche nel tratto gastro-intestinale, nella pelle, nella retina, nelle ghiandole salivari, nelle piastrine e nei linfociti. Agisce come orologio biologico, quindi, modula principalmente il ritmo sonno-veglia. La scansione circadiana è coordinata dal naturale alternarsi del giorno e della notte ed è coordinato da eventi interni ed esterni al nostro corpo. Quando questi eventi non sono più in risonanza, l'intero sistema subisce una "rottura" o desincronizzazione ovvero uno stato in cui l'orologio biologico e quello astronomico sono sfasati. Ciò si manifesta attraverso sintomi come fatica persistente, disordini del sonno, mancanza di appetito e disturbi dell'umore che possono portare a depressione. L'alterazione di questo equilibrio può essere dovuta all'assenza di stimoli sincronizzatori, ad esempio la sottoposizione per diversi giorni ad un ambiente totalmente buio, patologie non trasmissibili, cecità, voli che coprono tre o più fusi orari (Touitou Y. et al., 2017). La quantità di melatonina rilasciata durante la notte varia per ogni individuo. In uno studio di sonno controllato, a luce soffusa, è stato dimostrato come soggetti sani che dormono abitualmente oltre 9 ore ("Long sleepers" LS) e soggetti sani che dormono abitualmente meno di 6 ore ("Short sleepers" SS) hanno una diversa durata della "notte biologica" (ovvero il periodo in cui la melatonina viene prodotta e rilasciata nel flusso sanguigno) (Blask D. et al., 2009).

La melatonina agisce attraverso l'attivazione di due recettori di membrana specifici, il sito ad alta affinità ML1 e il sito a bassa affinità ML2 (Tordjman S.

et al., 2017). I recettori ML1 appartengono alla famiglia delle guanosintrifostato binding protein (recettori accoppiati a proteine G) ed agiscono inibendo l'adenilato ciclasi nella cellula bersaglio. Questo porta alla riduzione della produzione dell'adenosina monofosfato ciclica (cAMP), guanosina monofosfato ciclica (cGMP) e dell'attività delle chinasi. L'effetto di questo meccanismo risiede nell'attivazione delle fosfolipasi, che regolano il flusso di ioni all'intero della cellula (Singh M. et al., 2014).

Gli effetti della melatonina dipendono dal tipo e dalla posizione dei suoi recettori, i quali sono stati rilevati in diversi organi del corpo umano, quali cervello, retina, fegato, sistema cardiovascolare, intestino, reni, adipociti, cellule immunitarie, prostata, cellule ovariche ed epidermide (Ekmekcioglu, C, 2006). In specifiche circostanze la melatonina regola l'umore, il comportamento sessuale, è coinvolta nella gestione di depressione, insonnia, epilessia, diabete, sindrome metabolica, alopecia, emicrania, cancro, disordini cardiaci, alterazioni del sistema immunitario e svolge l'attività antiossidante (Singh M. et al., 2014). La grande potenza antiossidante della melatonina risiede nel fatto che essa reagisce con i radicali liberi (in particolare radicali idrossilici e perossilici) e viene metabolizzata a 3 idrossi melatonina, ma dopo aver estrinsecato la sua azione di scavenger, il metabolita prodotto (melatonina radicalizzata) è ancora in grado di neutralizzare radicali liberi.

Inoltre, la melatonina è anche in grado di stimolare la sintesi del glutathione e l'attività dei tre sistemi antiossidanti enzimatici endogeni: glutathione perossidasi, superossido dismutasi e catalasi (Singh M. et al., 2014). L'effetto antiossidante della melatonina si esplica soprattutto nel cervello, in cui si ha una generazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) maggiore rispetto a quella di altri tessuti (Singh M. et al., 2014).

La melatonina ha inoltre un effetto protettivo nel tratto intestinale, dove previene la formazione di ulcere grazie alla riduzione della secrezione dell'acido cloridrico e aumentando quella di bicarbonato, migliora la microcircolazione locale e promuove la rigenerazione dei tessuti (Tordjman S. et al., 2017).

Uno studio eseguito su ratti obesi ha evidenziato che la melatonina riduce l'aumento di peso, l'adiposità viscerale, l'ipertrigliceridemia conseguenti ad una dieta ipercalorica (Sanchez-Mateos, S., et al, 2007).

La melatonina pare svolgere un ruolo anche nella regolazione del metabolismo del glucosio. In uno studio su ratti diabetici si è osservato che la somministrazione di melatonina riduce la concentrazione ematica di glucosio e colesterolo (Esmail Eman M. et al., 2019).

La melatonina aumenta la proliferazione delle cellule ossee e incrementa la produzione del collagene di tipo I. Aumenta l'espressione genica delle sialoproteine e di alcune proteine dell'osso come la fosfatasi alcalina e l'osteocalcina. Inibisce il riassorbimento dell'osso attraverso la sotto regolazione della formazione degli osteoclasti (Tordjman S. et al., 2017).

Agisce anche sulla riproduzione e la maturazione sessuale dei mammiferi, attraverso la sotto regolazione dell'espressione del gene che regola l'ormone di rilascio delle gonadotropine (GnRH) in maniera ciclica durante le 24h. Il rilascio di GnRH controlla l'ormone luteinizzante e l'ormone follicolo-stimolante. La melatonina influenza quindi il ritmo riproduttivo degli animali agendo sulla secrezione di ormone luteinizzante e regolandolo in base alla stagione (Tordjman S. et al., 2017).

Un aspetto innovativo caratterizzante la melatonina riguarda la sua capacità radioprotettiva nei confronti della pelle che è soggetta spesso ad eventi stressogeni come i raggi solari. Molti studi effettuati sia in vitro sia in vivo su espianti di pelle umana evidenziano in particolare che la melatonina protegge i cheratinociti e melanociti dell'epidermide dai danni indotti dai raggi UV-B e protegge i fibroblasti dermici contro gli effetti dei raggi UV-A. Perciò la melatonina favorisce la guarigione di ferite, favorisce la produzione di una barriera per la pelle e influenza la pigmentazione della pelle al punto da poter svolgere persino un ruolo nella patogenesi della vitiligine (Slominski, Andrzej T. et al., 2018).

Alcuni studi in vivo su volontari hanno dimostrato che la melatonina applicata localmente può inibire l'alopecia androgenica nelle donne dal momento che anche i follicoli piliferi del cuoio capelluto sintetizzano melatonina (Fischer Tobias W., et al., 2008).

## Capitolo 3

### Ruolo del triptofano e dei suoi metaboliti nel processo infiammatorio

#### **3.1 Le cause alimentari dell'infiammazione sistemica**

L'infiammazione è un processo che consiste nell'insieme delle risposte cellulari messe in atto dall'organismo con l'obiettivo di difendere il tessuto colpito da eventi lesivi e restaurarne l'originaria integrità funzionale e morfologica (Lumeng C. et al., 2011). La fase iniziale del processo infiammatorio è caratterizzata dal rilascio di numerose molecole immunomodulatorie, come le citochine proinfiammatorie che danno inizio alla lotta contro l'invasore, per poi lasciare spazio, nella fase di terminazione dell'infiammazione, a mediatori antiinfiammatori che contribuiscono ad ultimare la riparazione del danno tissutale (Minihane A. et al., 2015).

Nel caso in cui si assista ad un processo infiammatorio caratterizzato solo da un modesto aumento di fattori proinfiammatori, da un'assenza di segni clinici tipici dell'infiammazione acuta (rossore, dolore, calore e gonfiore), e da un protrarsi nel tempo senza una risoluzione ci si trova davanti ad una *infiammazione cronica di basso grado*, tipica di condizioni croniche come la sindrome metabolica o alcune patologie cardiovascolari (Mraz M. 2014).

In ambito nutrizionale, molte ricerche hanno valutato la relazione tra l'intake di alimenti e i mediatori dell'infiammazione per comprendere come i nutrienti e

non nutrienti caratterizzanti specifici pattern dietetici modulino la risposta infiammatoria (Galland L., 2010).

A seguito della rivoluzione industriale, la modernizzazione delle tecnologie alimentari e la scoperta di innovativi processi di conservazione hanno contribuito drammaticamente all'alterazione delle abitudini alimentari della popolazione di molte parti del mondo, soprattutto nei Paesi occidentali più sviluppati. In particolare, sono aumentati il rapporto tra acidi grassi  $\omega 6/\omega 3$  introdotti, l'assunzione di acidi grassi saturi, insaturi trans e di zuccheri raffinati mentre è diminuita l'assunzione di fibre e di micronutrienti con effetto antiossidante ed antinfiammatorio (Bosma-den Boer M. et al., 2012).

Per quanto riguarda il consumo di grassi, è scientificamente provato che non solo la quantità di grassi ingeriti con la dieta abbia un effetto sulla salute umana, ma è fondamentale discriminare la tipologia di grassi: diversi studi epidemiologici hanno evidenziato che gli acidi grassi saturi (Clarke L. et al., 2009), acidi grassi trans (Galland L., 2010) e un alto rapporto  $\omega 6/\omega 3$  (Ruiz-Núñez B. et al., 2013) sono positivamente associati all'infiammazione sistemica. Evidenze scientifiche supportano l'ipotesi che l'infiammazione subclinica svolga un ruolo rilevante nel contribuire all'insorgenza di patologie cronico degenerative. Diverse tipologie di studi (studi in vitro, esperimenti su animali e studi epidemiologici) si sono soffermate sul tentativo di dimostrare che gli acidi grassi  $\omega 3$ , in particolare EPA e DHA, siano coinvolti nella diminuzione del rischio di insorgenza di patologie croniche proprio grazie alle loro proprietà antinfiammatorie. Un alto consumo di pesce ricco in EPA e DHA è di primaria importanza nella prevenzione di malattie croniche tipiche della Dieta Occidentale, in cui è una costante la simultanea presenza di infiammazione sistemica (Ruiz-Núñez B. et al., 2013).

I risultati di sperimentazioni recenti hanno messo in luce che un'assunzione massiva di cibi ad alto indice/carico glicemico sia positivamente correlata ad un'infiammazione cronica di basso grado (Minihane A. et al., 2015). Ad esempio, in uno studio clinico osservazionale è stato riscontrato che per ogni

aumento di 10 unità dell'indice glicemico del pasto, si assiste ad un aumento del 29% del marker d'inflammation proteina c reattiva ad alta sensibilità (HS-CRP) (Galland L., 2010).

È risaputo che l'assunzione di alimenti amidacei raffinati causa una rapida oscillazione della glicemia ed insulinemia postprandiale, ed è ipotizzato che l'iperglicemia postprandiale acuta possa determinare un incremento di produzione di radicali liberi e di citochine proinfiammatorie IL-6, IL-18 e TNF- $\alpha$  (Esposito K. et al., 2002). Tutto questo conferma la stretta relazione tra iperinsulinemia/iperglicemia/insulino resistenza e infiammazione cronica, soprattutto negli individui obesi (Bosma-den Boer M. et al., 2012).

Anche il contenuto di fibra può influenzare la relazione tra la qualità dei carboidrati e l'infiammazione sistemica. Ad esempio, lo studio osservazionale "The Women's Health Initiative" ha riscontrato una relazione inversa tra l'elevato consumo (24 g/giorno) di fibra e la secrezione di citochine proinfiammatorie IL-6 e TNF- $\alpha$  (Galland L., 2010).

Per concludere, studi osservazionali hanno evidenziato un'associazione inversa tra il consumo di frutta e verdura e i markers dell'infiammazione, in virtù del loro alto contenuto di vitamine e minerali (in particolar modo vitamina A, vitamina C e magnesio) ma anche grazie all'abbondanza di componenti bioattivi (Lee H. et al., 2013).

### **3.2 Variazioni del metabolismo del triptofano nell'obesità**

Nel 2015 si è stimato che a livello mondiale 1,9 miliardi di persone fossero sovrappeso e 609 milioni obese. È stato stimato anche che, continuando con questo trend, nel 2030 il 57,8% della popolazione mondiale sarà sovrappeso o obesa (Chooi Y. et al., 2018).

L'organizzazione mondiale della sanità ha definito il sovrappeso e l'obesità come conseguenza dell'accumulo anormale o eccessivo di grasso, che nel lungo periodo determina rischi per la salute (WHO).

Il tessuto adiposo non è solo un organo di riserva dell'energia introdotta in eccesso rispetto al fabbisogno ma è un vero e proprio tessuto attivo nella regolazione di processi fisiologici e patologici come l'immunità e l'infiammazione.

Dal punto di vista istologico il tessuto appare molto eterogeneo perché è costituito da cellule di diverso tipo: cellule endoteliali, fibroblasti, macrofagi, linfociti, granulociti, adipociti, pre-adipociti, e cellule immunitarie. Alla luce delle cellule che lo compongono, il tessuto adiposo risulta un vero e proprio organo endocrino, responsabile della produzione di citochine sia antinfiammatorie sia proinfiammatorie. Quando gli adipociti aumentano di numero (iperplasia) e dimensione (ipertrofia), aumenta la secrezione di citochine proinfiammatorie, che contribuiscono all'instaurarsi di una infiammazione cronica di basso grado. Inoltre, a seguito dell'obesità nel tessuto adiposo si verifica l'alterazione quantitativa delle cellule immunitarie e tale squilibrio è alla base dei processi infiammatori (Mraz M. 2014).

Un'altra ipotesi a supporto della relazione obesità-infiammazione suggerisce che quando il tessuto adiposo si espande, esso diventi ipossico e l'ipossia tissutale stessa attivi l'infiammazione.

Nell'obesità è stata osservata una sovra espressione dell'enzima indoloammina 2,3-diossigenasi (IDO) nel fegato. IDO e triptofano 2,3-diossigenasi (TDO) catalizzano la trasformazione del triptofano in chinurenina (figura 3.1), e negli obesi i livelli di chinurenina e il rapporto chinurenina/triptofano nel sangue sono più alti del normale (Liu J. et al., 2018).

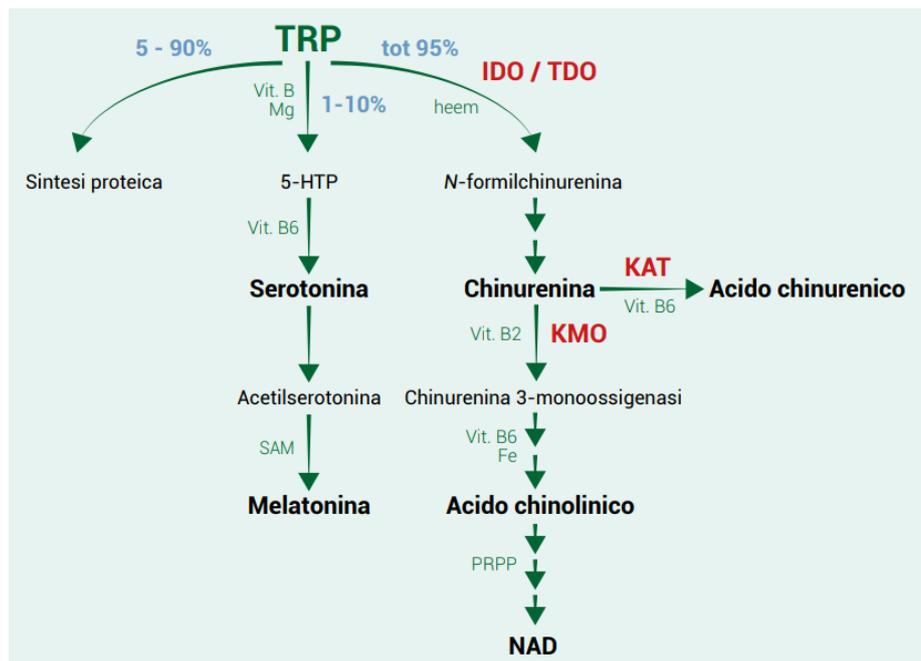


Figura 3.1: metabolismo del triptofano

La maggiore trasformazione del triptofano in chinurenina ridurrebbe la produzione di serotonina, e questa minore disponibilità a livello centrale potrebbe incrementare il desiderio ingiustificato di carboidrati, poiché una dieta ricca di carboidrati attiva l'insulina e di conseguenza aumenta la biodisponibilità del triptofano nel SNC (Strasser B. et al., 2015).

### 3.3 Variazioni del metabolismo del triptofano nella sindrome metabolica

La sindrome metabolica è definita dall'organizzazione mondiale della sanità come una condizione patologica multifattoriale caratterizzata da obesità centrale, insulino resistenza, ipertensione, dislipidemia e disfunzione endoteliale.

La sindrome metabolica è un fattore di rischio per malattie cardiovascolari aterosclerotiche e per il diabete di tipo 2.

La maggior parte dei soggetti con sindrome metabolica è obesa, e nelle cellule  $\beta$  del pancreas l'espressione degli enzimi IDO e chinurenina monoossigenasi (KMO) è fortemente aumentata dalla presenza di citochine pro-infiammatorie (IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ ) e da uno stato di glucolipotossicità. Il sintomo principale di ipossia e infiammazione indotta nelle isole di Langerhans è proprio l'incremento della produzione di chinurenina e di acido chinurenico.

Nel tessuto adiposo, IDO può essere espressa nei fibroblasti, macrofagi e cellule dendritiche. In caso di infiammazione però, il luogo principale in cui viene espressa sono le cellule endoteliali. L'esaurimento del triptofano nel microambiente cellulare causa stress nelle cellule del sistema immunitario, riducendone la funzionalità.

La diminuzione dei livelli di triptofano in circolazione, consumato per produrre i suoi metaboliti, porta alla diminuzione e alle disfunzioni di linfociti T e  $\beta$  attivati (Liu J. et al., 2018). Effetti citotossici della chinurenina sono stati evidenziati sui linfociti (Pedersen E. et al., 2013).

La chinurenina è stata recentemente identificata come potente vasodilatatore: la disfunzione endoteliale (alterazione del tessuto che riveste la superficie interna dei vasi sanguigni e linfatici) è una componente dell'aterosclerosi e si caratterizza per un'alterazione della vasodilatazione delle arterie mediata normalmente dall'ossido nitrico (NO). La conversione del triptofano a chinurenina mediata dall'IDO può rappresentare un modo per sopperire all'NO quando NO si trova in condizioni di ridotta attività (Pedersen E. et al., 2013).

Una eccessiva attivazione della via metabolica della chinurenina contribuisce anche ad aumentare il rischio di diabete sia di tipo 1 che 2. L'incremento di acido chinurenico, acido chinolinico, acido xanturenico e del rapporto chinurenina/triptofano aumenta la possibilità di insulino resistenza e diabete di tipo 2 (Liu J. et al., 2018).

### **3.4 Variazioni del metabolismo del triptofano nelle malattie neurodegenerative**

L'incremento dello stress ossidativo e nitrosativo (indotto dalle specie reattive dell'azoto) e i cambiamenti causati dai processi infiammatori hanno effetti sull'apprendimento e sulla progressione di malattie neuro degenerative attraverso la regolazione del catabolismo del triptofano (Anderson G. et al., 2013).

Alterazioni dell'equilibrio ossidativo in concomitanza ad un'inflammatione cronica sono fattori chiave della depressione, che è a sua volta associata ad una diminuzione di serotonina dipendente principalmente dalla ridotta disponibilità di triptofano. In particolare, in caso di depressione e schizofrenia, si ha un aumento del rapporto chinurenina/triptofano. Inoltre, stress ossidativo ed espressione di IDO e TDO sono state trovate alterate in bambini con autismo (Anderson G. et al., 2012).

Un aumento dell'acido chinurenico a livello centrale inibisce il recettore  $\alpha 7$  nicotinico dell'acetilcolina ( $\alpha 7nAChr$ ), determinando una riduzione del rilascio di GABA che causa l'alterazione di glutammato, dopamina e acetilcolina. Questo processo contribuisce al deficit cognitivo che si evidenzia in pazienti con schizofrenia, in cui è stato trovato un aumento di acido chinurenico nella corteccia cerebrale (Anderson G. et al., 2012).

# Capitolo 4

## Biodisponibilità e metabolismo del triptofano

### 4.1 Biodisponibilità del triptofano

Gran parte degli alimenti che consumiamo quotidianamente, prima di essere consumata, subisce diverse manipolazioni sia a livello industriale, sia a livello casalingo (Nielsen H. et al., 1985). Durante queste fasi, i macronutrienti possono reagire tra loro o con altre molecole naturalmente presenti, con additivi volontariamente aggiunti o con residui di acque di lavaggio e coadiuvanti tecnologici, causando la potenziale formazione di off-flavour, colori anomali rispetto a quelli originari, composti tossici o perdita del valore nutrizionale (Nielsen H. et al., 1985).

Tra le matrici proteiche comunemente consumate, il latte è una tra le maggiori fonti di triptofano e per questo molto spesso oggetto di studi che indagano il comportamento di questo aminoacido durante manipolazione industriale o casalinga e della digestione. Ad esempio, durante test di ossidazione forzata eseguiti per simulare il comportamento della frazione proteica nel corso della conservazione si è osservata una forte riduzione della biodisponibilità del triptofano delle proteine del siero di latte (Nielsen H. et al., 1985).

Lo studio di Traore S. et al (2011) ha evidenziato che, nella carne di pollo, tempi di cottura e aumento della temperatura sono correlati positivamente alla degradazione di triptofano, alla formazione di carbonili proteici e ponti disolfuro (Traore S. et al., 2011). Risultati analoghi sono stati ottenuti nel muscolo di pesce (Silva F. et al., 2016). L'aumentare della temperatura favorisce la rottura delle pareti cellulari con successiva liberazione di molecole pro-ossidanti che venendo a contatto con gli aminoacidi aromatici, e in particolare con il triptofano, ne determina l'ossidazione quindi la sua ridotta biodisponibilità (Silva F. et al., 2016).

Perciò i trattamenti termici devono essere gestiti nel modo più adeguato possibile in modo da preservare l'essenza originaria di composti estremamente sensibili ma essenziali per la salute umana.

Prima che il triptofano possa giungere agli organi target, quindi al fegato e al cervello, l'aminoacido deve essere preventivamente liberato dalla proteina che lo include, assorbito dall'intestino e deve poi entrare nel circolo sanguigno.

Un altro tipo di trasformazione chimica subita dagli aminoacidi in specifiche condizioni ambientali è la racemizzazione; parte dei residui degli L-amminoacidi contenuti nelle proteine degli alimenti possono trasformarsi negli isomeri -D a seguito di trattamenti ad alte temperature o a seguito di variazioni di pH con un tasso variabile in base al tipo di proteina, di aminoacidi e in base alle condizioni ambientali. Qualora ci sia interazione tra questi residui amminoacidici, la formazione di legami D-peptidici e di legami intermolecolari può danneggiare la digeribilità degli alimenti e la loro qualità dal punto di vista nutrizionale. In uno studio su topi si è osservato che sostituendo l'L-triptofano con D-triptofano e fornendo una dieta basata su amminoacidi liberi, si raggiungeva lo stesso livello di crescita utilizzando 2,5 volte più D-triptofano rispetto all'isomero -L (Friedman M., 2018).

L'uptake di triptofano da parte della barriera emato-encefalica è influenzato principalmente dal rapporto tra l'L-triptofano e gli altri aminoacidi neutri a lunga catena (LNAAs: Large Neutral Amino Acids) dal momento che tutti i LNAA (triptofano, valina, isoleucina, leucina, fenilalanina e tirosina) competono per lo stesso trasportatore. Un pasto ricco di proteine, che apporta una quantità di triptofano nettamente inferiore rispetto a quella cumulativa di tutti gli altri LNAA, determina un aumento della concentrazione ematica di triptofano nel flusso sanguigno maggiore rispetto all'incremento all'interno del sistema nervoso centrale a causa della condivisione dell'unico trasportatore a disposizione (Nongonierma A. et al., 2015).

I carboidrati migliorano sia l'assorbimento intestinale di triptofano sia l'aumento della sua concentrazione a livello cerebrale grazie all'incremento

dell'insulina secreta. Il più alto livello di questo ormone infatti favorisce l'uptake di tutti gli LNAA tranne il triptofano nel muscolo scheletrico, aumentando di conseguenza il rapporto ematico L-triptofano/LNAA e quindi la disponibilità dell'aminoacido per l'ingresso nel cervello (Höglund E. et al., 2019).

Un aumento dell'uptake encefalico di triptofano può essere ottenuto anche grazie all'introduzione di proteine con un profilo amminoacidico favorevole a questo AA rispetto agli altri LNAA, quali le  $\alpha$ -lattoalbumine (Sterndale S. et al., 2020; Fernstrom J. et al., 2013).

Uno studio clinico di intervento su 18 volontari sani ha evidenziato che il consumo di  $\alpha$ -lattoalbumina idrolizzata del siero di latte aumenta il rapporto triptofano/LNAA in modo più efficiente rispetto all' $\alpha$ -lattoalbumina non idrolizzata, e questo si accompagna ad un netto miglioramento del tono dell'umore (Markus C. et al., 2008).

Un'altra proteina contenente un alto rapporto triptofano/LNAA è il lisozima dell'albume d'uovo, il cui consumo è stato riportato non solo in grado di aumentare la concentrazione di triptofano ematico (Mitchell et al., 2011) ma anche di migliorare il tono dell'umore (Markus C. et al., 2008). Un altro studio di intervento ha evidenziato che il consumo di proteine dell'uovo idrolizzate migliora l'uptake di triptofano nel cervello, migliorando l'umore e le performance sotto stress (Markus C. et al., 2010).

## **4.2 Metabolismo del triptofano e attività fisica**

Alcuni studi riportano che l'attività fisica prevalentemente aerobica è in grado di aumentare l'espressione di un enzima presente nel muscolo scheletrico che catalizza la trasformazione di chinurenina in di acido chinurenico. Questo riduce il passaggio della chinurenina attraverso la BEE, e ne riduce la concentrazione a livello del SNC, migliorando i sintomi depressivi legati allo stress (Pedersen B. 2019).

È stato quindi ipotizzato che lo svolgimento di una regolare attività fisica potrebbe contribuire alla riduzione di sintomi depressivi grazie alla modulazione del pathway della chinurenina (Aguledo L. Z. et al., 2014). Il pathway della chinurenina a livello muscolare può essere influenzato anche dalla presenza di altri aminoacidi. Ad esempio, durante l'esercizio fisico intenso il triptofano e gli aminoacidi ramificati (BCAA) valina, leucina ed isoleucina possono essere ossidati per produrre energia. Questo diminuirebbe il triptofano disponibile per il passaggio della BEE della barriera emato-encefalica, diminuendone la quota disponibile per la produzione di serotonina e quindi causando alterazioni nell'umore legate all'attività fisica, soprattutto se prolungata (Cervenka I. et al., 2017). In realtà, durante l'esecuzione di esercizio fisico prolungato si verifica una diminuzione del livello plasmatico di BCAA perché questi vengono ossidati a scopo energetico dalle fibre muscolari, mentre si assiste ad un progressivo aumento plasmatico di triptofano libero. La spiegazione risiede nel fatto che, durante l'esercizio fisico prolungato, le riserve di tessuto adiposo vengono mobilitate per soddisfare le richieste energetiche, quindi la concentrazione plasmatica di acidi grassi non esterificati (NEFA) legati all'albumina aumenta. I NEFA hanno un'affinità di legame per l'albumina molto più alta rispetto al triptofano e ciò determina l'aumento della concentrazione plasmatica di triptofano libero. A riposo, il triptofano circola per il 90% legato all'albumina, mentre durante l'allenamento è raramente superiore al 10%, e l'aumento del triptofano libero agevola il passaggio dell'aminoacido essenziale per la sintesi di serotonina a livello cerebrale (Martin K. S. et al., 2020).

Peraltro, dallo studio di Sharifi e collaboratori (2016), eseguito su 32 soggetti con età compresa tra i 19 ed i 25 anni, emerge che tra le diverse attività sportive proposte (esercizi aerobici, anaerobici e di resistenza a sfinimento) solo l'attività aerobica è in grado di incrementare i livelli plasmatici di serotonina. Questo però solo se non viene protratta fino ad esaurimento, poiché al di sopra di una certa soglia si assiste ad un peggioramento del metabolismo della monoammina:

l'aumentato catabolismo del triptofano inverte la spirale innalzando il rapporto chinurenina/triptofano (Strasser B. et al., 2016).

Lo sport di resistenza protratto nel lungo periodo è apparso in grado di aumentare l'espressione dell'enzima KAT a livello muscolare, di aumentare la concentrazione di acido chinurenico entro la prima ora di allenamento, mentre lo svolgimento di esercizi eccentrici ad alta intensità non sono in grado di determinare lo stesso output (Schlitter M. et al., 2016).

Anche in età più avanzata (> 60 anni) il regolare svolgimento di attività aerobica aumenta la disponibilità di triptofano per il cervello a riposo (Melancon M. et al., 2014). Lo studio di Valdiglesias e collaboratori (2017) sottolinea l'importanza dello svolgimento di attività fisica in età avanzata, in quanto la sua assenza è positivamente correlata ad un elevato rapporto chinurenina/triptofano, oltre che ad un miglioramento della sarcopenia, delle funzioni immunitarie e dei disordini neuropsichiatrici (Valdiglesias V. et al., 2017).

È quindi possibile affermare che l'attività fisica comporti una serie di benefici essenziali, sia dal punto di vista fisico che mentale. Infatti, l'esercizio fisico moderato è in grado di aumentare la produzione di alcuni neurotrasmettitori, come serotonina, adrenalina, dopamina, contribuendo al miglioramento dell'umore. È altrettanto vero che questo effetto si raggiunge con attività fisica moderata, con almeno 2-3 giorni di riposo e con uno scopo ricreativo, mentre un allenamento troppo intenso potrebbe influenzare negativamente l'umore (Strasser B. et al., 2016).

### **4.3 Il ruolo della flora batterica intestinale**

Negli umani adulti circa il 90% della flora batterica intestinale appartiene ai phyla *Bacteroidetes* e *Firmicutes*, mentre una piccola percentuale fa parte di *Protobacteria*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria* e *Verrucomicrobia*. Cambiamenti massivi all'interno della comunità microbica (potenzialmente determinati da diete scorrette, antibiotici o infezioni) possono causare uno squilibrio o uno stato

infiammatorio, con importanti ricadute sulla salute. È stato osservato come una dieta ricca di acidi grassi saturi, zuccheri e poca fibra abbia un effetto negativo sulla composizione della flora batterica (Dalton A. et al., 2019), mentre una dieta ricca di proteine e completa del pool di amino acidi essenziali migliora lo stato del microbioma intestinale ed il sistema immunitario intestinale (Ma N. et al., 2019).

Nel tratto gastro intestinale il triptofano segue 3 vie metaboliche:

- 1) Via della chinurenina, sia nelle cellule immunitarie che epiteliali, regolata principalmente dall'enzima IDO 1
- 2) Metabolizzazione diretta operata dal microbiota intestinale a diverse molecole come l'indolo e derivati (Agus A. et al., 2018).
- 3) Produzione di serotonina da parte delle cellule enterocromaffini ad opera dell'enzima triptofano idrolasi

Il metabolismo del triptofano tramite la via della chinurenina, è mediata dall'enzima IDO 1 (Cervenka I. et al., 2017, Kennedy P. et al., 2017). Nonostante sia ancora poco descritta l'espressione di IDO 1 nelle cellule epiteliali intestinali e siano ancora pochi gli studi relativamente all'influenza che il microbioma ha sull'espressione dell'enzima stesso (Martin-Gallausiaux C. et al., 2018) è ben noto che IDO 1 sia in grado di regolare il rapporto ospite-microbiota agendo in modo duplice sul metabolismo del triptofano: da una parte depriva i microrganismi patogeni di quest'ultimo, complicando la colonizzazione dell'habitat da parte dei patogeni stessi, dall'altra parte utilizza il triptofano come substrato per sintetizzare intermedi con attività potenzialmente antimicrobica, come la chinurenina (Borghi M. et al., 2020). Oltre a quest'ultima sostanza, anche gli altri prodotti terminali della via della chinurenina, quali acido chinolinico, niacina, NAD ed acido chinurenico, sono implicati nella regolazione di molti processi biologici nell'ospite come ad esempio la neurotrasmissione, l'infiammazione e la risposta immunitaria (Gao et al., 2018).

La capacità da parte dei microorganismi di utilizzare in diversi modi il triptofano è un fattore da considerare nel bilancio della quota di triptofano che resta a disposizione dell'ospite per svolgere funzioni sia a livello locale sia a livello centrale. Sebbene a seguito della metabolizzazione dell'aminoacido da parte della microflora si assista ad una riduzione quantitativa dell'aminoacido stesso, in realtà bisogna considerare che i microorganismi componenti la flora batterica lo usano non senza ripercussione sul nostro corpo. I principali effetti sulla salute umana sono ascrivibili sia all'influenza sul metabolismo della serotonina, sia all'effetto di tutti i metaboliti derivanti dal catabolismo del triptofano.

Sebbene quasi la totalità della serotonina prodotta venga sintetizzata dalle cellule enterocromaffini, la flora batterica intestinale è in grado di modulare la secrezione di serotonina stessa (Dehhangi M. et al., 2019).

Il neurotrasmettitore secreto a livello intestinale è principalmente responsabile della motilità gastro-intestinale; ogni variazione quantitativa legata all'alterazione della sua sintesi può causare disordini all'apparato digerente ma può determinare anche disfunzioni a livello cerebrale.

Per quanto riguarda la produzione di serotonina, sebbene sia emerso che diversi batteri sono in grado di produrre direttamente e rilasciare serotonina in vitro, sono rari gli studi in cui la stessa capacità venga identificata in vivo nel tratto gastro intestinale. Effettivamente nello studio di Strandwitz (2018), l'aumento dei livelli di serotonina non sembrerebbe dipendere dalla sintesi diretta da parte delle specie microbiche, bensì essere determinata dalla secrezione batterica di piccole molecole (come SCFA) che segnalano alle cellule enterocromaffini di produrre più serotonina attraverso l'espressione del gene TPH1 (Strandwitz P., 2018). Gli animali "germ free", privi di flora intestinale, possiedono quantità maggiori di serotonina nel cervello ma livelli inferiori nel sangue e nel colon rispetto ad animali con un normale microbiota intestinale. I normali livelli di serotonina possono essere ristabiliti a seguito della colonizzazione del tratto gastro intestinale con un consorzio di specie sporigene i cui metaboliti fecali incrementino la produzione di serotonina da parte delle cellule enterocromaffini

(Wickoff W. et al., 2009). Studi successivi hanno confermato che la biotrasformazione, da parte della microflora batterica, del colato ad acido biliare secondario deossicolato, stimola la biosintesi di serotonina (Yano et al., 2015). O ancora, la deconiugazione della serotonina glucuronide coniugata, da parte di enzimi della microflora batterica, contribuisce ad incrementare i livelli di serotonina nel lume intestinale (Hata T. et al., 2017).

Per quanto riguarda invece l'utilizzo del triptofano, oltre ad essere questo un nutriente fondamentale per supportare la crescita di molte specie microbiche, circa il 4-6% di triptofano è metabolizzato a derivati di indicano, indolo, acido indolico o scatolo (Dehhangi M. et al., 2019).

Molti derivati dell'indolo sono ligandi per il fattore di trascrizione AhR; il segnale derivante dal legame con questi substrati è considerato un componente fondamentale della risposta immunitaria ed è cruciale per il mantenimento dell'omeostasi intestinale, dato che agisce sul rinnovamento epiteliale e sull'integrità della barriera intestinale (Agus A. et al., 2018).

In uno studio è stato osservato come una dieta a base di proteine animali ed elevata in grassi possa modificare il metabolismo del triptofano nei topi. Sono stati rilevati livelli di triptofano maggiori nei topi alimentati con una dieta ricca in grassi e proteine animali rispetto ai topi alimentati con un quantitativo ridotto di proteine. Una quantità maggiore di proteine determina una maggiore concentrazione di L-triptofano e ciò si riflette sulla produzione di metaboliti microbici, come scatolo e indolo. Ciò è causato da una quantità superiore di proteine che non vengono assorbite ma sono utilizzate dal microbiota presente nel colon e nel cieco. Inoltre, anche il tipo di proteine determina effetti sul microbiota, probabilmente a causa della differenza di digeribilità. È stato osservato però come un'eccessiva assunzione di grassi e proteine induca uno stato infiammatorio nel colon, che potrebbe alterare la composizione del microbiota intestinale e, di conseguenza, i metaboliti. Livelli troppo elevati di scatolo e indicano nelle urine sono indice di disbiosi intestinale (Shi J. et al., 2020).

## Capitolo 5

# La dieta mediterranea come fonte di triptofano e melatonina

La dieta mediterranea, riconosciuta dall'UNESCO (Organizzazione delle Nazioni Unite per l'Educazione, la Scienza e la Cultura) come patrimonio immateriale dell'umanità, si basa su un pattern alimentare che comprende l'olio di oliva (principale fonte di grassi), derivati vegetali (cereali, frutta, verdura, legumi, semi e vino), pesce, frutti di mare, prodotti caseari (consumati in quantità moderate), e bevande alcoliche (quasi esclusivamente vino rosso). Inoltre, è previsto un consumo limitato di proteine animali come carne rossa, altri prodotti trasformati a base di carne e dolci (Lăcătușu C. et al., 2019).

Il numero delle porzioni per i vari gruppi di alimenti viene rappresentato graficamente sotto forma di piramide alimentare. Nel caso della dieta mediterranea, si sono susseguiti 3 modelli a partire dal 1993, ma il modello definitivo usato attualmente come riferimento è quello rilasciato nel 2010 da parte della Mediterranean Diet Foundation (MDF) (Davis C. et al., 2015) (Fig. 5.1).

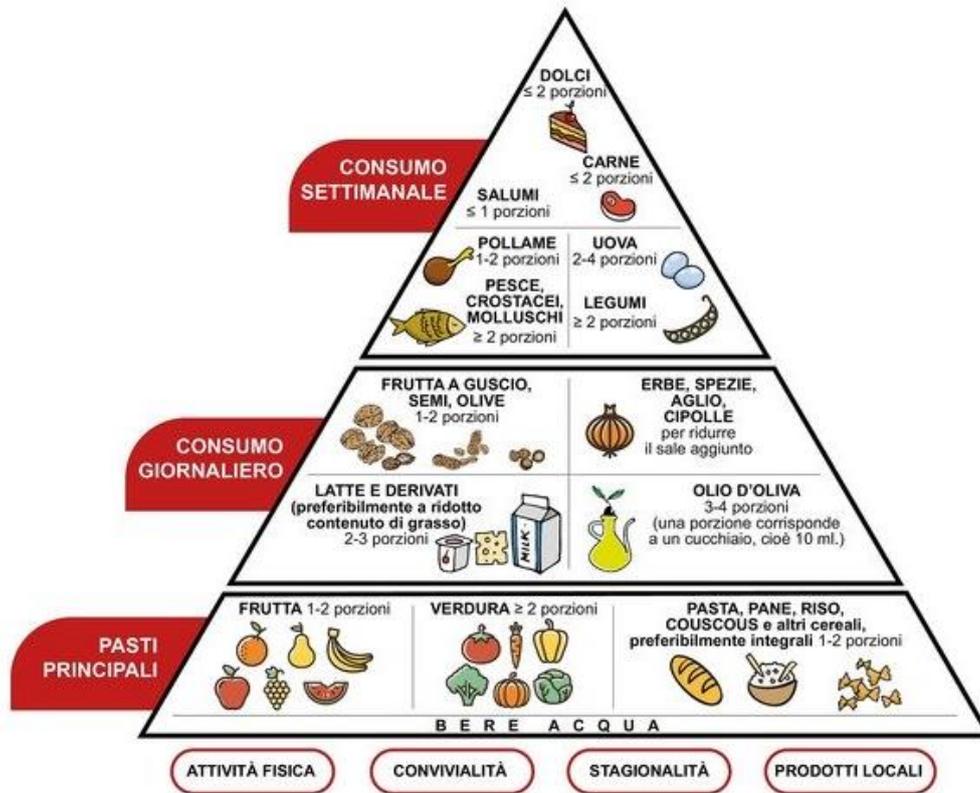


Figura 5.1 Piramide alimentare MDF

Tra le principali fonti di triptofano contemplate dalla dieta mediterranea, ritroviamo alcune matrici proteiche sia di origine vegetale che animale. Tra le prime, i legumi sono quelli che ne contengono in maggior quantità, invece tra le matrici proteiche di origine animale, yogurt e formaggi risaltano per l'elevato contenuto di questo aminoacido, la cui concentrazione aumenta durante la fermentazione grazie all'azione proteolitica di microrganismi come *Lactobacillus*, *Lactococcus* e *Saccharomyces* (Paroni R. et al., 2019).

Le patate contengono fino a 64,47  $\mu\text{g/g}$  di triptofano, mentre ortaggi e frutta sono carenti di questo aminoacido ma sono piuttosto ricchi di serotonina e melatonina.

Il pomodoro ha il maggiore contenuto di serotonina (8,81  $\mu\text{g/g}$ ), la cui concentrazione generalmente aumenta nel corso della maturazione ma cala a seguito dei processi di trasformazione (Islam J. et al., 2015).

Altri frutti come kiwi, ananas, fragola e mela contengono una quantità di melatonina, o meglio fitomelatonina, compresa tra 12 pg/g e 36 pg/g. Anche erbe medicinali (Iriti M. et al., 2010) e piante ipogee, come carote e cipolle, contengono concentrazioni discrete di melatonina (Garcia-Parrilla M. et al., 2008). Lo stadio di maturazione, le condizioni ambientali post-raccolta (temperatura, umidità e radiazioni solari) e i processi di trasformazione industriale sono fattori importanti nel determinare la quantità di fitomelatonina (Arnao M. et al., 2018; Feng X. et al., 2014).

Negli oli extra vergine di oliva, che non subiscono trattamenti termici e/o chimici, sono state osservate quantità di melatonina pari a 71 e 119 pg/mL, cioè concentrazioni quasi doppie rispetto a quelle tipiche di oli di oliva raffinati e oli di girasole (de la Puerta C. et al., 2006).

La fitomelatonina è contenuta anche in mandorle, pistacchi, noci e nocciole.

La fitomelatonina è prodotta nelle piante tramite vie metaboliche simili a quelle dell'uomo (Fig 5.2)

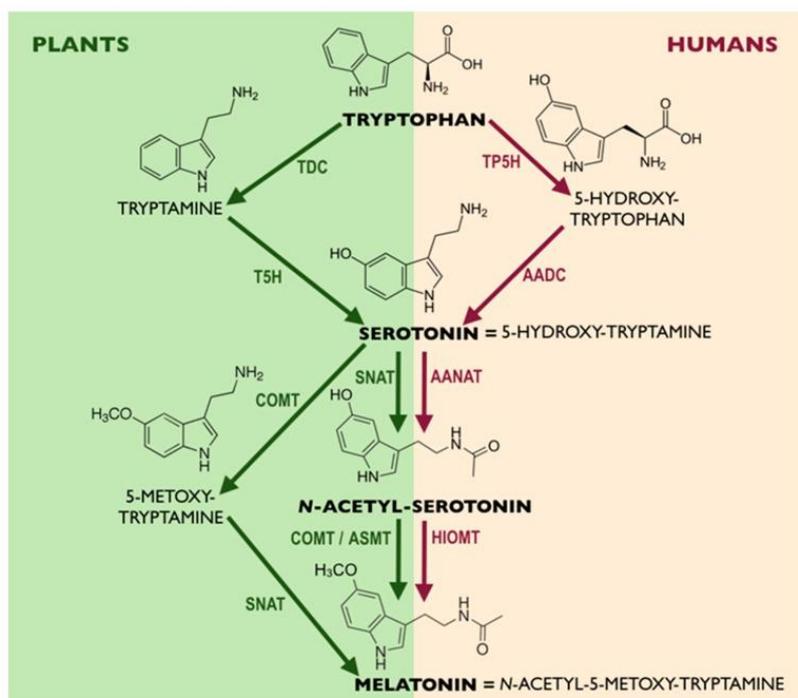


Fig. 5.2 Comparazione tra le vie biosintetiche della melatonina nell'uomo e nei vegetali

Tra i prodotti della fermentazione dell'uva, il vino rosso è quello che mostra la più alta concentrazione di fitomelatonina, che è contenuta nella buccia dell'uva in quantità compresa tra 5 e 96 pg/g (Iriti M. et al., 2010). Indipendentemente dalla quantità di melatonina caratterizzante le diverse cultivar, il processo fermentativo stesso contribuisce ad un lieve incremento della concentrazione del composto, indicando un possibile ruolo dei lieviti nella formazione di melatonina (Hernandez J. et al., 2018). Questo è valido per il processo fermentativo attuato per ottenere birra, infatti la fitomelatonina si ritrova nella birra deriva sia dall'orzo che dal metabolismo di *Saccharomyces cerevisiae*, in grado di sintetizzarla a partire dal triptofano (Iriti M. et al., 2010).

Oltre all'orzo, anche altri cereali quali avena, mais, riso, di cui il regime mediterraneo raccomanda il consumo in forma integrale, contengono fitomelatonina in quantità che varia notevolmente da una specie all'altra, ma anche da una cultivar all'altra, con concentrazioni variabili da 132 ng/g per il riso a 1017 ng/g per il mais (Meng X. et al., 2017).

Nel pane la concentrazione di melatonina varia tra 0,19-0,63 ng/g nella mollica e tra 0,14-0,82 ng/g nella crosta. Durante la lievitazione è stato osservato un aumento poco significativo di melatonina dato dai lieviti, mentre durante la cottura si ha una degradazione di circa il 95% della melatonina nella crosta (Yilmaz C. et al., 2014).

Infine, anche il caffè contiene una dose significativa di melatonina, circa 40 µg/tazza, corrispondenti alla produzione notturna endogena ma il cui effetto viene contrastato dalla caffeina, che può ridurre la normale produzione notturna (Peuhkuri K. et al., 2012).

Tra gli alimenti di origine animale, pesce (3,7 ng/g) e uova (1,54 ng/g) sono le principali fonti di melatonina (Meng X. et al., 2017). In particolare questa molecola all'interno delle uova fresche intere svolge una fondamentale funzione antiossidante, quindi protettiva verso i lipidi del tuorlo dalla perossidazione (Tan D. et al., 2014).

Riguardo la biodisponibilità della melatonina, molti studi hanno evidenziato una grossa variabilità individuale. Comunque, in media la biodisponibilità è molto bassa, circa il 3%, mentre l'eliminazione è molto rapida, con una emivita di circa 54 min.

Sebbene alcuni studi abbiano evidenziato un aumento di melatonina sierica dopo l'assunzione di alimenti ricchi di fitomelatonina, si ipotizza che ciò non sia dovuto all'assorbimento di fitomelatonina ma ad altri fitochimici che innescano un aumento di produzione endogena della melatonina (Saheli B. et al., 2019).

## Capitolo 6

### Integratori ed alimenti arricchiti con triptofano

Dato il crescente numero di evidenze scientifiche sull'importanza del triptofano e dei suoi metaboliti per la salute umana, sono stati effettuati diversi tentativi di arricchimento o fortificazione di alimenti di uso comune per incrementare l'assunzione quotidiana di questo amminoacido essenziale. Il triptofano è anche disponibile come integratore, sotto forma di compresse o polveri (Ghorani B. et al., 2018).

L'integrazione con triptofano è apparsa efficace nel combattere i disturbi del sonno. In uno studio eseguito su 45 bambini di età compresa tra i 3 e i 10 anni è stata osservata una diminuzione del 50% degli incubi nel 93% dei partecipanti allo studio, a seguito di un'integrazione a base di 5-idrossitriptofano (2mg/kg assunti prima di andare a dormire, per 20 giorni consecutivi) (Kałużna-Czaplińska J. et al., 2019).

La Norwegian Food Safety Authority (NFSA) ha però richiesto una valutazione del rischio per quanto riguarda l'L-triptofano contenuto negli integratori alimentari. Sulla base di studi pubblicati nel periodo compreso tra il 2012 ed il

2015, si è posta l'attenzione sui 3 effetti negativi riscontrati con maggior frequenza a seguito dell'assunzione:

- Riduzione dell'appetito, nausea, vomito, debolezza, affaticamento, tremori e mal di testa
- Potenziale incremento di rischio di cataratta (non confermato)
- Rischio di reazioni avverse causate da un'eccessiva azione serotoninergica se assunti in concomitanza con antidepressivi.

Solo dosi superiori a 1 g sono state associate ad effetti negativi, quindi è stato suggerito un intake massimo di 220 mg/giorno per gli adulti, valore che non è stato cambiato neppure successivamente da altri Comitati a causa della mancanza di sufficienti dati scientifici riportati in letteratura. Vi è pure una carenza di studi necessari alla determinazione degli effetti avversi su bambini ed adolescenti (Holvik K. et al., 2020).

Le concentrazioni consentite di L-triptofano in integratori alimentari fornite ad EFSA dagli Stati Membri e su cui la stessa Agenzia ha espresso opinione, sono più alte rispetto alla controparte norvegese: la dose giornaliera consigliata ammonta a 250 – 500 mg mentre l'UL proposto corrisponde a 750 mg/die. In base a queste specifiche condizioni d'uso proposte, EFSA si è espressa riguardo gli effetti dell'L-triptofano sul mantenimento del sonno, sul miglioramento dell'umore, sul mantenimento del peso corporeo e sulla normale funzione cognitiva, concludendo che, date le scarse evidenze scientifiche attualmente presenti in letteratura, non è possibile associare al triptofano nessuna indicazione salutistica (EFSA, 2011).

Alcuni studi hanno valutato gli effetti di una maggiore assunzione di triptofano tramite alimenti arricchiti.

L'effetto dell'assunzione giornaliera per 3 settimane di 15 g di cioccolato arricchito con pasta di arachidi (contenente l'1,03% di triptofano) e farina d'uva (fonte di resveratrolo) su alcuni parametri ematochimici è stato valutato in un gruppo di 10 consumatori abituali di cioccolato. Al termine dello studio è stata osservata una riduzione significativa dell'insulina, dovuta ad un probabile

miglioramento della sensibilità insulinica, e ad un calo della concentrazione ematica di 8-isoprostano, segno di minore stress ossidativo (Flórez-Méndez J. et al., 2019).

Nello studio di Galàn e collaboratori (2017) sono stati somministrati per 5 settimane a 22 bambini e ragazzi con problemi di sonno 30 g di cereali da prima colazione arricchiti con triptofano (60 mg di triptofano per porzione) o “tradizionali” (22.5 mg di triptofano per porzione). L’arricchimento si è rivelato efficace nel determinare una riduzione significativa della latenza di addormentamento e nel comportare una maggiore efficienza del sonno dopo aver consumato i cereali arricchiti durante la cena (Galán C. et al., 2017).

Una bevanda ottenuta dalle proteine dell’uovo, con un rapporto triptofano/LNAA superiore a quello dell’ $\alpha$ -albumina è stata testata su un campione di volontari con alto (17 volontari) e basso (18 volontari) livello di stress cronico. Gli studenti hanno svolto dei test di calcolo matematico, di coordinazione, di concentrazione e vigilanza dopo aver assunto la bevanda placebo o quella a base di idrolizzato d’uovo, la cui assunzione ha determinato un miglioramento dei risultati ottenuti nei test, una diminuzione del livello di cortisolo salivare ed un incremento del rapporto triptofano/LNAA nel plasma del 210% rispetto ai livelli basali (Markus C. et al., 2009).

Infine, in un altro studio è stata somministrata una bevanda contenente 2 o 4 g di un idrolizzato proteico di albume d’uovo ricco di triptofano a 60 donne sane con età compresa tra i 45 e i 65 anni. Il consumo dell’idrolizzato a più bassa concentrazione (2 g) è stato in grado di migliorare le funzioni emozionali (Gibson E. L. et al., 2014).

## Capitolo 7

### Conclusioni

Il triptofano è un amminoacido essenziale che, oltre a partecipare alla sintesi proteica, è precursore di composti di elevata importanza biologica quali serotonina, melatonina, niacina, NAD, NADP, acido chinolinico e chinurenico. Sebbene al triptofano siano stati attribuiti numerosi effetti funzionali, quali la modulazione dell'attività dei sistemi endocrino e nervoso e della rigenerazione della mucosa intestinale, a tutt'oggi EFSA non ha approvato nessuna indicazione salutistica per mancanza di evidenze scientifiche certe.

Rimane, comunque, che è importante soddisfare il fabbisogno di questo amminoacido essenziale. Ovviamente, per fare questo il primo ed essenziale passo è seguire una dieta qualitativamente e quantitativamente corretta composta da alimenti che forniscano la giusta quantità di triptofano. Anche la presenza di una buona concentrazione di molecole antiossidanti nella dieta, però, può contribuire a mantenere elevati i livelli ematici di triptofano. Infatti, tramite una diminuzione della produzione di citochine pro-infiammatorie, gli antiossidanti riducono l'attivazione dell'enzima IDO e quindi il coinvolgimento del triptofano nella via della chinurenina. Inoltre, gli antiossidanti proteggono il cofattore BH<sub>4</sub> dell'enzima triptofano 5-idrossilasi, supportando la sintesi di serotonina.

Una corretta introduzione dietetica di triptofano appare particolarmente importante nei soggetti obesi. Nell'obesità, caratterizzata da un'inflammatione cronica di basso grado dovuta al rilascio di citochine pro-infiammatorie da parte degli adipociti, si osserva una sovra-espressione dell'enzima IDO ed una riduzione della concentrazione intracellulare di triptofano. Questo può determinare effetti negativi sull'umore per ridotta sintesi di serotonina e melatonina, e riduzione della funzionalità delle cellule del sistema immunitario. Il triptofano è importante anche per il microbiota intestinale, che lo utilizza per supportare la propria crescita, e lo metabolizza producendo molecole importanti

come l'indolo, essenziale per il mantenimento dell'omeostasi intestinale. Inoltre il microbiota è in grado di stimolare la sintesi di serotonina nel lume intestinale tramite la produzione di molecole segnale. Nei soggetti obesi, la popolazione microbica è alterata rispetto a quella dei soggetti normopeso e questo contribuisce a scompensi sia a livello locale, sia a livello centrale.

Diversi studi hanno evidenziato un ruolo del triptofano e dei suoi metaboliti nel mantenere lo stato di salute psicofisica, ed è ad oggi necessario svolgerne ulteriori anche per chiarire completamente i diversi meccanismi d'azione.

A questo si accompagna lo sviluppo di strategie nutrizionali e tecnologiche in grado di aumentare l'assunzione di questo aminoacido. Oltre alla produzione di alimenti funzionali o specifici integratori, anche la biofortificazione potrebbe portare notevoli benefici, essendo una tecnica economica, sostenibile e conveniente, rafforzando le colture alimentari tipiche già presenti (Jamil S. et al., 2019).

In conclusione, il triptofano rappresenta un nutriente con svariate potenzialità per l'ottimizzazione dell'alimentazione, e sicuramente la produzione di alimenti più ricchi di questo aminoacido rappresenta una sfida per le tecnologie agro-alimentari. Rimane però la necessità di promuovere uno stile di vita più sano ed un'alimentazione corretta, che rimangano i pilastri portanti della salute.

## Capitolo 8

### Bibliografia

Allen, Jeffrey A., et al. "Post-epidemic eosinophilia–myalgia syndrome associated with L-tryptophan." *Arthritis & Rheumatism* 63.11 (2011): 3633-3639.

Anderson, George, and Michael Maes. "Metabolic syndrome, alzheimer disease, schizophrenia, and depression: Role for leptin, melatonin, kynurenine pathways, and neuropeptides." *Metabolic Syndrome and neurological disorders*.: Wiley (2013): 235-248.

Anderson, George, Michael Maes, and Michael Berk. "Schizophrenia is primed for an increased expression of depression through activation of immunoinflammatory, oxidative and nitrosative stress, and tryptophan catabolite pathways." *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 42 (2013): 101-114.

B Arnao, Marino, and Josefa Hernández-Ruiz. "The potential of phyto-melatonin as a nutraceutical." *Molecules* 23.1 (2018): 238.

Badawy, Abdulla A-B. "Kynurenine Pathway of Tryptophan Metabolism: Regulatory and Functional Aspects." *International journal of tryptophan research : IJTR* vol. 10 1178646917691938. 15 Mar. 2017, doi:10.1177/1178646917691938

Belongia, Edward A., et al. "An investigation of the cause of the eosinophilia–myalgia syndrome associated with tryptophan use." *New England Journal of Medicine* 323.6 (1990): 357-365.

Berger, Miles, John A. Gray, and Bryan L. Roth. "The expanded biology of serotonin." *Annual review of medicine* 60 (2009): 355-366.

Bhutia, Yangzom D., and Vadivel Ganapathy. "Protein digestion and absorption." *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. Academic Press, 2018. 1063-1086.

Blask, David E. "Melatonin, sleep disturbance and cancer risk." *Sleep medicine reviews* 13.4 (2009): 257-264.

Boadle-Biber, Margaret C. "Regulation of serotonin synthesis." *Progress in biophysics and molecular biology* 60.1 (1993): 1-15.

Bortolato, Marco, Kevin Chen, and Jean C. Shih. "The degradation of serotonin: role of MAO." *Handbook of Behavioral Neuroscience*. Vol. 21. Elsevier, 2010. 203-218.

Bosma-den Boer, Margarethe M., Marie-Louise van Wetten, and Leo Pruijboom. "Chronic inflammatory diseases are stimulated by current lifestyle: how diet, stress levels and medication prevent our body from recovering." *Nutrition & metabolism* 9.1 (2012): 32.

Bravo, R et al. "Tryptophan-enriched cereal intake improves nocturnal sleep, melatonin, serotonin, and total antioxidant capacity levels and mood in elderly humans." *Age (Dordrecht, Netherlands)* vol. 35,4 (2013): 1277-85. doi:10.1007/s11357-012-9419-5

Brzezinski, Amnon. "Melatonin in humans." *New England journal of medicine* 336.3 (1997): 186-195.

Chooi, Yu Chung, Cherlyn Ding, and Faidon Magkos. "The epidemiology of obesity." *Metabolism* 92 (2019): 6-10.

D'Auria, Maria Valeria. "SINTESI DI NUOVI LIGANDI DEI RECETTORI SEROTONINERGICI E VALUTAZIONE DELL'ATTIVITÀ ANTITUMORALE, 2011

Davis, Courtney, et al. "Definition of the Mediterranean diet; a literature review." *Nutrients* 7.11 (2015): 9139-9153.

Davis, Ian, and Aimin Liu. "What is the tryptophan kynurenine pathway and why is it important to neurotherapeutics?." (2015): 719-721.

de la Puerta, Cristina, et al. "Melatonin is a phytochemical in olive oil." *Food Chemistry* 104.2 (2007): 609-612.

Dehghani, Mona et al. "Microorganisms, Tryptophan Metabolism, and Kynurenine Pathway: A Complex Interconnected Loop Influencing Human Health Status." *International journal of tryptophan research : IJTR* vol. 12 1178646919852996. 19 Jun. 2019, doi:10.1177/1178646919852996

EFSA Journal 2011;9(4):2073

Ekmekcioglu, C. "Melatonin receptors in humans: biological role and clinical relevance." *Biomedicine & Pharmacotherapy* 60.3 (2006): 97-108.

Esmaiel, Eman Mohamad, Amira M. Abo-youssef, and Mohamed AbdAllah Tohamy. "Antidiabetic and antioxidant effects of tannic acid and melatonin on streptozotocin induced diabetes in rats." *Pakistan journal of pharmaceutical sciences* 32.4 (2019).

Esposito, Katherine, et al. "Inflammatory cytokine concentrations are acutely increased by hyperglycemia in humans: role of oxidative stress." *Circulation* 106.16 (2002): 2067-2072.

Feng, Xiaoyuan, et al. "Melatonin from different fruit sources, functional roles, and analytical methods." *Trends in food science & technology* 37.1 (2014): 21-31.

Fischer, Tobias W., et al. "Melatonin and the hair follicle." *Journal of pineal research* 44.1 (2008): 1-15.

FLOREZ-MENDEZ, Jennyfer, et al. "Effect of the consumption of chocolate enriched with tryptophan and resveratrol on biochemical markers and oxidative stress in a healthy population." *Vitae* 26.1 (2019): 8-16.

Friedman, Mendel. "Analysis, Nutrition, and Health Benefits of Tryptophan." *International journal of tryptophan research : IJTR* vol. 11 1178646918802282. 26 Sep. 2018, doi:10.1177/1178646918802282

Galán, Carmen, et al. "Tryptophan-enriched antioxidant cereals improve sleep in children with autistic spectrum and attention deficit hyperactivity disorders." *Journal of Cellular Neuroscience & Oxidative Stress* 9.1 (2017).

Galland, Leo. "Diet and inflammation." *Nutrition in Clinical Practice* 25.6 (2010): 634-640.

Garcia-Parrilla, M. Carmen, Emma Cantos, and Ana M. Troncoso. "Analysis of melatonin in foods." *Journal of Food Composition and Analysis* 22.3 (2009): 177-183.

Ghorani, Behrouz, et al. "Enrichment of cellulose acetate nanofibre assemblies for therapeutic delivery of L-tryptophan." *International journal of biological macromolecules* 108 (2018): 1-8.

Gibson, E. L., et al. "Effects of acute treatment with a tryptophan-rich protein hydrolysate on plasma amino acids, mood and emotional functioning in older women." *Psychopharmacology* 231.24 (2014): 4595-4610.

Gomes Domingos, A. L., Hermsdorff, H. H. M., & Bressan, J. (2019). Melatonin intake and potential chronobiological effects on human health. *Critical reviews in food science and nutrition*, 59(1), 133-140.

Hardeland, Rüdiger, S. R. Pandi-Perumal, and Daniel P. Cardinali. "Melatonin." *The international journal of biochemistry & cell biology* 38.3 (2006): 313-316.

Hernández, Javier Marhuenda, and María Pilar Zafrilla Rentero. "Bioactive Compounds Contained in Mediterranean Diet and Their Effects on Neurodegenerative Diseases." *Current Topics on Superfoods* (2018): 13

Höglund, Erik, Øyvind Øverli, and Svante Winberg. "Tryptophan metabolic pathways and brain serotonergic activity: a comparative review." *Frontiers in endocrinology* 10 (2019): 158.

Holvik, Kristin, et al. "Risk Assessment of" Other Substances"—L-tryptophan." *European Journal of Nutrition & Food Safety* (2020): 75-77.

Hopkins, F. Gowland, and Sydney W. Cole. "A contribution to the chemistry of proteids: Part I. A preliminary study of a hitherto undescribed product of tryptic digestion." *The Journal of physiology* 27.4-5 (1901): 418.

Iriti, Marcello, Elena M. Varoni, and Sara Vitalini. "Melatonin in traditional Mediterranean diets." *Journal of pineal research* 49.2 (2010): 101-105.

Islam, Jahidul, et al. "Simultaneous analysis of serotonin, tryptophan and tryptamine levels in common fresh fruits and vegetables in Japan using fluorescence HPLC." *Food bioscience* 13 (2016): 56-59.

Jamil, Shakra, et al. "Biofortified staple food crops as a need of new era."

Jenkins, Trisha A et al. "Influence of Tryptophan and Serotonin on Mood and Cognition with a Possible Role of the Gut-Brain Axis." *Nutrients* vol. 8,1 56. 20 Jan. 2016, doi:10.3390/nu8010056

Kałużna-Czaplińska, Joanna, et al. "How important is tryptophan in human health?." *Critical reviews in food science and nutrition* 59.1 (2019): 72-88.

Lăcătușu, Cristina-Mihaela, et al. "The Mediterranean Diet: from an environment-driven food culture to an emerging medical prescription." *International journal of environmental research and public health* 16.6 (2019): 942.

Lam, Daniel D., and Lora K. Heisler. "Serotonin and energy balance: molecular mechanisms and implications for type 2 diabetes." *Expert reviews in molecular medicine* 9.5 (2007): 1-24.

Lamas, B. "CARD9 impacts colitis by altering gut microbiota metabolism of tryptophan into aryl hydrocarbon receptor ligands." *Nature Medicine*, 22(6), 598–605 (2016).

Lee, Hansongyi, In Seok Lee, and Ryowon Choue. "Obesity, inflammation and diet." *Pediatric gastroenterology, hepatology & nutrition* 16.3 (2013): 143-152.

Liu, Jun-Jun, Jamileh Movassat, and Bernard Portha. "Emerging role for kynurenines in metabolic pathologies." *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care* 22.1 (2019): 82-90.

Lumeng, Carey N., and Alan R. Saltiel. "Inflammatory links between obesity and metabolic disease." *The Journal of clinical investigation* 121.6 (2011): 2111-2117.

Marazziti, Donatella, et al. "New developments on the serotonin hypothesis of depression: shunt of tryptophan." *Rivista di psichiatria* 48.1 (2013): 23-34.

Markus, C. Rob, et al. "Effect of tryptophan-rich egg protein hydrolysate on brain tryptophan availability, stress and performance." *Clinical Nutrition* 29.5 (2010): 610-616.

Meng, Xiao, et al. "Dietary sources and bioactivities of melatonin." *Nutrients* 9.4 (2017): 367.

Minihane, Anne M., et al. "Low-grade inflammation, diet composition and health: current research evidence and its translation." *British Journal of Nutrition* 114.7 (2015): 999-1012.

Mraz, Milos, and Martin Haluzik. "The role of adipose tissue immune cells in obesity and low-grade inflammation." *Journal of Endocrinology* 222.3 (2014): R113-R127

National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Tryptophan, CID=6305, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tryptophan>

Nongonierma, Alice B., and Richard J. FitzGerald. "Milk proteins as a source of tryptophan-containing bioactive peptides." *Food & function* 6.7 (2015): 2115-2127.

Oxenkrug, Gregory F. "Tryptophan–kynurenine metabolism as a common mediator of genetic and environmental impacts in major depressive disorder: the serotonin hypothesis revisited 40 years later." *The Israel journal of psychiatry and related sciences* 47.1 (2010): 56.

Palego, Lionella, et al. "Tryptophan biochemistry: structural, nutritional, metabolic, and medical aspects in humans." *Journal of Amino Acids* 2016 (2016).

Paroni, Rita, et al. "Bioactive phytochemicals of tree nuts. Determination of the melatonin and sphingolipid content in almonds and pistachios." *Journal of Food Composition and Analysis* 82 (2019): 103227.

Pedersen, Eva Ringdal, et al. "Urinary excretion of kynurenine and tryptophan, cardiovascular events, and mortality after elective coronary angiography." *European heart journal* 34.34 (2013): 2689-2696.

Peuhkuri, Katri, Nora Sihvola, and Riitta Korpela. "Dietary factors and fluctuating levels of melatonin." *Food & nutrition research* 56.1 (2012): 17252.

Ruddell, Richard G., Derek A. Mann, and Grant A. Ramm. "The function of serotonin within the liver." *Journal of hepatology* 48.4 (2008): 666-675.

Ruddick, Jon P et al. "Tryptophan metabolism in the central nervous system: medical implications." *Expert reviews in molecular medicine* vol. 8,20 1-27. 31 Aug. 2006, doi:10.1017/S1462399406000068

Ruiz-Núñez, Begoña, et al. "Lifestyle and nutritional imbalances associated with Western diseases: causes and consequences of chronic systemic low-grade inflammation in an evolutionary context." *The Journal of nutritional biochemistry* 24.7 (2013): 1183-1201.

Salehi, Bahare, et al. "Melatonin in medicinal and food plants: Occurrence, bioavailability, and health potential for humans." *Cells* 8.7 (2019): 681

Sanchez-Mateos, S., et al. "Melatonin and estradiol effects on food intake, body weight, and leptin in ovariectomized rats." *Maturitas* 58.1 (2007): 91-101.

Schiffer, M., Chang, C.H., and Stevens, F.J. *The functions of tryptophan residues in membrane proteins*. United States: N. p., 1994. Web. doi:10.2172/10172497.

Singh, Mahaveer, and Hemant R. Jadhav. "Melatonin: functions and ligands." *Drug discovery today* 19.9 (2014): 1410-1418.

Slominski, Andrzej T., et al. "Melatonin: A cutaneous perspective on its production, metabolism, and functions." *Journal of Investigative Dermatology* 138.3 (2018): 490-499.

Steenbergen, Laura, et al. "Tryptophan supplementation modulates social behavior: a review." *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 64 (2016): 346-358.

Strasser, Barbara, Johanna M. Gostner, and Dietmar Fuchs. "Mood, food, and cognition: role of tryptophan and serotonin." *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care* 19.1 (2016): 55-61.

Tan, Dun-Xian, et al. "Melatonin identified in meats and other food stuffs: potentially nutritional impact." *Journal of pineal research* 57.2 (2014): 213-218.

Tordjman, Sylvie, et al. "Melatonin: pharmacology, functions and therapeutic benefits." *Current neuropharmacology* 15.3 (2017): 434-443.

Touitou, Yvan, Alain Reinberg, and David Touitou. "Association between light at night, melatonin secretion, sleep deprivation, and the internal clock: Health impacts and mechanisms of circadian disruption." *Life sciences* 173 (2017): 94-106.

Yadav, Vijay K. "Serotonin: The central link between bone mass and energy metabolism." *Translational Endocrinology of Bone: Reproduction, Metabolism, and the Central Nervous System* 51 (2012).

Yılmaz, Cemile, Tolgahan Kocadağlı, and Vural Gokmen. "Formation of melatonin and its isomer during bread dough fermentation and effect of baking." *Journal of agricultural and food chemistry* 62.13 (2014): 2900-2905.

Zelante, Teresa, et al. "Tryptophan catabolites from microbiota engage aryl hydrocarbon receptor and balance mucosal reactivity via interleukin-22." *Immunity* 39.2 (2013): 372-385.

