

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO
FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA
DIPARTIMENTO DI
FARMACOLOGIA, CHEMIOTERAPIA E TOSSICOLOGIA MEDICA

DOTTORATO DI RICERCA IN
FARMACOLOGIA, CHEMIOTERAPIA E TOSSICOLOGIA MEDICA
CICLO XXIII°

**RUOLO PREDITTIVO DELL'ESPRESSIONE DEL RECETTORE
SCAVENGER CD36 NELLA MALATTIA DI ALZHEIMER**

Dott.ssa Marialuisa GIUNTA

Matr. Nr. R07823

TUTORE: Prof. Silvano Gabriele Cella

COORDINATORE DOTTORATO: Prof. Alberto Panerai

ANNO ACCADEMICO 2009-2010

INDICE

RIASSUNTO	6
1. RIASSUNTO	7
INTRODUZIONE	13
1. LA MALATTIA DI ALZHEIMER (AD)	14
1.1. CLINICA	17
1.2. QUADRO NEUROPATOLOGICO.....	20
1.3. PLACCHE SENILI O NEURITICHE.....	24
1.3.1. <i>β</i> -Amiloide.....	26
1.4. GOMITOLI NEUROFIBRILLARI	30
1.5. EZIOPATOGENESI.....	33
1.5.1. <i>Ipotesi ereditaria</i>	33
1.5.2. <i>Ipotesi tossica dell'alluminio</i>	38
1.5.3. <i>Ipotesi Immunitaria</i>	39
1.5.4. <i>Ipotesi della Barriera Ematoencefalica</i>	39
1.5.5. <i>Ipotesi Virale</i>	39
1.5.6. <i>Altri fattori causali</i>	39
1.6. DIAGNOSI	40
1.6.1. <i>Valutazione neuropsicologica e cognitiva</i>	46
1.7. TRATTAMENTO	48
2. NEUROINFIAMMAZIONE: UN PROCESSO PATOLOGICO PRECOCE	54
2.1 CRONICITÀ DELLA RISPOSTA INFIAMMATORIA IN AD.....	55
2.2. UNA RISPOSTA INFIAMMATORIA DI FASE ACUTA NEI PAZIENTI AD	57
2.3. NEUROINFIAMMAZIONE E SINTOMI CLINICI PRECOCI	58
2.4. METABOLISMO DEL GLUCOSIO	59
2.5. IL MITOCONDRIO: FONTE E TARGET DELLO STRESS OSSIDATIVO	61
3. MODELLI SPERIMENTALI DI MALATTIA DI ALZHEIMER: TOPI APP23	65
4. RECETTORE SCAVENGER CD 36	70
4.1. STRUTTURA DI CD36.....	70
4.2. MODIFICAZIONI POST-TRASCRIZIONALI	72
4.3. MODIFICAZIONI POST-TRADUZIONALI.....	72
4.4. REGOLAZIONE DELL'ESPRESSIONE DI CD36	73
4.5. LIGANDI DI CD36 ED ALTRI RECETTORI SCAVENGER	76
4.6. ESPRESSIONE DI CD36 NEI TESSUTI NEURONALI.....	79
4.7. FUNZIONI DI CD36	79
4.7.1. <i>Possibili Funzioni di CD36 nel Sistema Nervoso Centrale</i>	79
4.7.2. <i>Metabolismo lipidico e ruolo di CD36</i>	80
4.7.3. <i>Fagocitosi</i>	81
4.8. RUOLO DI CD36 NELLE MALATTIE	82
4.8.1. <i>Malattia di Alzheimer</i>	82
4.8.2. <i>Neuropatia periferica diabetica</i>	85
4.8.3. <i>Malattie da demielinizzazione</i>	85
4.8.4. <i>Malaria</i>	85
4.8.5. <i>Emoglobinopatie</i>	86
4.8.6. <i>Aterogenesi</i>	86
4.9 CD36 E L'ATTIVITÀ ANTI-ANGIOGENICA DI TSP-1	87
5. ESPRESSIONE, SIGNALING E MALFUNZIONAMENTO DI INSULINA ED IGF-1 NEL SISTEMA NERVOSO CENTRALE	89
5.1. INSULINE RECEPTOR SUBSTRATES (IRS).....	90
5.2. IGF-1 E IL SUO RECETTORE IGF-1R.....	91
5.3. POSSIBILE ASSOCIAZIONE TRA AD E DIABETE MELLITO DI TIPO 2	93
5.4. MALFUNZIONAMENTO DEL SIGNALING DI INSULINA E IGF-1: CONTRIBUTO ALL'INSORGENZA DI AD	94
5.5. POTENZIALE TERAPEUTICO DELL'INSULINA.....	96
6. ESTROGENI E DECADIMENTO COGNITIVO	98

6.1 ESTRADIOLO	103
7. RECETTORE DEGLI ESTROGENI (ER)	103
7.1 MECCANISMI D' AZIONE DEGLI ESTROGENI	106
7.1.1. <i>Meccanismo classico</i>	106
7.1.2. <i>Meccanismo ERE-indipendente</i>	107
7.1.3. <i>Meccanismo ligando-indipendente</i>	107
7.1.4. <i>Meccanismo non genomico</i>	107
7.2 FONTI E SINTESI DEGLI ESTROGENI	110
7.3 RUOLI FISIOLGICI DEGLI ESTROGENI.....	111
7.3.1. <i>Apparato riproduttivo maschile e femminile</i>	112
7.3.2. <i>Tessuto osseo</i>	112
7.3.3. <i>Sistema nervoso centrale</i>	112
8. LA MENOPAUSA.....	114
8.1. ASPETTI NEUROLOGICI DELLA MENOPAUSA.....	115
9. TERAPIA ORMONALE SOSTITUTIVA (HRT).....	116
9.1. I FITOESTROGENI	117
9.1.1. <i>Fitoestrogeni e tessuto osseo</i>	121
9.1.2. <i>Fitoestrogeni e sintomi postmenopausali</i>	122
9.1.3. <i>Fitoestrogeni ed Alzheimer's disease</i>	122
10. IL PROGESTERONE ED I SUOI MOLTEPLICI RECETTORI	123
SCOPO DELLA	ERRORE. IL SEGNA LIBRO NON È DEFINITO.
RICERCA	ERRORE. IL SEGNA LIBRO NON È DEFINITO.
1. OBIETTIVI.....	130
MATERIALI E METODI	140
1. STUDIO NELL'UOMO	141
1.1. RECLUTAMENTO DEI CAMPIONI	141
1.2. SEPARAZIONE DEI LEUCOCITI DA SANGUE INTERO	143
2. STUDIO NELL'ANIMALE	144
2.0.1. <i>I° esperimento</i>	144
2.0.2. <i>II° esperimento</i>	146
2.1. ESTROMINERAL	146
2.2. MINERALOMETRIA OSSEA COMPUTERIZZATA (MOC - RATTO)	146
2.3. ISOLAMENTO DI LEUCOCITI DA MILZA (RATTO E TOPO).....	147
2.3. ISTOCIMICA DI SEZIONI CEREBRALI (RATTO E TOPO).....	147
2.3.1. <i>I° esperimento</i>	147
2.3.2. <i>II° esperimento</i>	148
2.4. IMMUNOISTOCIMICA DI SEZIONI CEREBRALI (RATTO E TOPO)	149
2.4.1. <i>I° esperimento</i>	149
2.4.2. <i>II° esperimento</i>	149
3. COLTURE CELLULARI N9	150
3.1. TRATTAMENTI CELLULARI.....	150
4. ESTRAZIONE DELL'RNA TOTALE.....	151
5. RETROTRASCRIZIONE (RT).....	152
5.1. RT PER PCR SEMIQUANTITATIVA (CAMPIONI UMANI)	152
5.2. RT PER PCR QUANTITATIVA (CAMPIONI ANIMALI)	153
7. REAL-TIME PCR QUANTITATIVA.....	155
8. DOSAGGI PLASMATICI	156
8.1. 17-β-ESTRADIOLO.....	156
8.2. PROGESTERONE	157
8.3. IGF-1.....	157

8. ANALISI STATISTICA	157
RISULTATI	ERRORE. IL SEGNALIBRO NON È DEFINITO.
STUDIO NELL'UOMO	159
1. ESPRESSIONE LEUCOCITARIA DEI PARAMETRI BIOCHIMICI NEI PAZIENTI AD E SOGGETTI CONTROLLO	159
ESPRESSIONE GENICA DI CD36 IN LEUCOCITI	159
ESPRESSIONE GENICA DI ER- α ED ER- β IN LEUCOCITI	160
ESPRESSIONE GENICA DI IL-6 IN LEUCOCITI	164
ESPRESSIONE GENICA DI PR-A/B IN LEUCOCITI	166
ESPRESSIONE GENICA DI IGF-1R IN LEUCOCITI	168
2. LIVELLI PLASMATICI DI ESTRADIOLO, PROGESTERONE ED IGF-1	170
LIVELLI PLASMATICI DI 17- β -ESTRADIOLO	170
LIVELLI PLASMATICI DI PROGESTERONE	172
LIVELLI PLASMATICI DI IGF-1	174
3. ANALISI DELLE CORRELAZIONI	176
STUDIO NELL'ANIMALE	186
4. ANALISI DELLA VARIAZIONE DEL PESO CORPOREO IN RATTO IN TRATTAMENTO CON TERAPIA ORMONALE SOSTITUTIVA	186
5. ANALISI DELLA VARIAZIONE DEL PESO DELL'UTERO IN RATTO IN TRATTAMENTO CON TERAPIA ORMONALE SOSTITUTIVA	187
6. ANALISI DELLA STRUTTURA OSSEA FEMORALE IN RATTO IN TRATTAMENTO CON TERAPIA ORMONALE SOSTITUTIVA	188
7. ESPRESSIONE CEREBRALE E LEUCOCITARIA DI CD36 IN RATTO IN TRATTAMENTO CON TERAPIA ORMONALE SOSTITUTIVA	191
ESPRESSIONE GENICA DI CD36 A LIVELLO DELLA CORTECCIA FRONTOTEMPORALE E DELL'IPPOCAMPO DI RATTO	191
ESPRESSIONE DI MRNA DI CD36 IN LEUCOCITI ISOLATI DA MILZA DI RATTO	193
ESPRESSIONE PROTEICA CEREBRALE DI CD36, GFAP E FERRITINA	194
8. LIVELLI PLASMATICI DI ESTRADIOLO IN RATTO.....	196
9. ESPRESSIONE CEREBRALE E LEUCOCITARIA DI CD36 IN TOPO APP23	197
ESPRESSIONE GENICA DI CD36 A LIVELLO DELLA CORTECCIA FRONTOTEMPORALE E DELL'IPPOCAMPO DI TOPO APP23	197
ESPRESSIONE GENICA DI CD36 IN LEUCOCITI ISOLATI DA MILZA DI TOPO APP23	199
ESPRESSIONE PROTEICA CEREBRALE DI CD36 IN TOPO APP23.....	199
CORRELAZIONE TRA ESPRESSIONE PROTEICA CEREBRALE DI CD36 E DEPOSIZIONE DI PLACCHE DI B-AMILOIDE IN TOPO APP23.....	202
10. ESPRESSIONE GENICA DI CD36 IN CELLULE N9	203
DISCUSSIONE	ERRORE. IL SEGNALIBRO NON È DEFINITO.
1. DISCUSSIONE.....	205
BIBLIOGRAFIA	ERRORE. IL SEGNALIBRO NON È DEFINITO.
BIBLIOGRAFIA.....	219

RIASSUNTO

1. RIASSUNTO

Tra le patologie dell'anziano, le demenze rappresentano uno dei problemi sanitari principali. Circa il 70% dei casi di demenza è rappresentato dal morbo di Alzheimer (AD), una patologia cerebrale a carattere neurodegenerativo, la cui prevalenza è stimata essere in aumento nel corso dei decenni. La caratteristica neuropatologica più comune e distintiva della AD è rappresentata dalle placche di β A (β -amiloide), che, con la loro deposizione, costituiscono l'elemento chiave per l'innescamento di processi ossidativi e pro-infiammatori da parte della microglia attivata. L'interazione, infatti, tra microglia attivata e placche di β A induce il rilascio di citochine pro-infiammatorie, come l'interleuchina-6 (IL-6), o di fattori neurotossici, come il *tumor necrosis factor- α* (TNF- α), e stimola l'espressione, da parte della microglia stessa, di alcuni recettori *scavenger* deputati alla rimozione delle placche, tra cui la proteina multifunzionale di classe B tipo I (SRBI) CD36.

Attualmente una diagnosi certa di AD è possibile solo mediante analisi *post mortem* del tessuto cerebrale: per questo motivo negli ultimi anni sono stati ricercati ed individuati degli indicatori biologici ed ormonali di malattia, che potessero essere utili nella diagnosi precoce di AD. Tali indicatori sono espressi anche dai leucociti periferici, cellule di facile reperibilità che sintetizzano virtualmente tutti gli ormoni ed i corrispondenti recettori, che sono sottoposti agli stessi meccanismi regolatori cui soggiacciono quelli localizzati in aree cerebrali inaccessibili *in vivo*. Alla luce di ciò, i leucociti rappresenterebbero utili elementi spia periferici per studiare le modificazioni che si instaurano a livello cerebrale. In particolare, è stato recentemente dimostrato che l'espressione leucocitaria di CD36 è significativamente ridotta nei pazienti con AD; poiché tale riduzione si instaura molto precocemente, essendo già presente nei soggetti con decadimento cognitivo lieve (MCI), CD36 può rappresentare un indicatore precoce di aumentato rischio di neurodegenerazione.

Studi epidemiologici hanno evidenziato una maggiore incidenza della AD negli individui di sesso femminile. Una possibile causa di tale fenomeno è rappresentata dalle modificazioni delle funzioni endocrine, che insorgono durante la transizione menopausale e che configurano un assetto ormonale predisponente alla neurodegenerazione. È dimostrato in letteratura che gli estrogeni esercitano un'azione neuroprotettiva e neurotrofica legandosi a specifici recettori, presenti in due isoforme (ER- α ed ER- β), e che in corso di AD prevengano la formazione delle fibrille di β A, inibiscano la reazione infiammatoria, conseguente alla loro deposizione, e proteggano le cellule dalla loro azione citotossica. La diminuita secrezione di estrogeni in epoca post-menopausale, infatti, è correlata inversamente con la "salute cerebrale" e direttamente con l'entità del deterioramento cognitivo.

Un altro ormone sessuale femminile, il progesterone, sembra svolgere molteplici funzioni centrali non legate alla funzione riproduttiva: la regolazione dei processi cognitivi, la funzione mitocondriale della cellula neuronale, la neurogenesi e la riparazione del tessuto nervoso danneggiato. Le risposte neuronali regolate dal progesterone sono mediate dai recettori PR-A e PR-B, incluse alcune varianti derivate da *splicing* alternativo del gene di PR.

A livello del sistema nervoso centrale (SNC), quindi, gli estrogeni e il progesterone agiscono di concerto nel regolare diverse funzioni neuronali, come la neuroprotezione e diversi processi cognitivi. Il gene di PR contiene sequenze promotore capaci di legare ER; pertanto, l'espressione genica di PR presuppone l'esistenza di una (efficiente) stimolazione estrogenica. È stata, inoltre, dimostrata l'esistenza di punti di convergenza tra il *signaling* intracellulare degli estrogeni e quello del fattore di crescita insulino-simile di tipo 1 (IGF-1), un neuromodulatore che regola la plasticità sinaptica ed è coinvolto nella risposta riparativa del tessuto neuronale agli insulti citolesivi, garantendo protezione nei confronti dei processi neurodegenerativi.

In base a tali presupposti, nel presente lavoro di tesi si è deciso di valutare l'espressione leucocitaria di alcuni parametri biologici, per comprendere come vari il bilancio netto tra le influenze ormonali neuroprotettive e proneurotossiche nel corso della vita, focalizzando l'interesse sulla fase di transizione menopausale, periodo critico della vita femminile durante il quale possono verificarsi condizioni predisponenti alla neurodegenerazione.

Per lo studio sono stati reclutati, per entrambi i sessi, sia soggetti sani di controllo, di età compresa tra 20 e 91 anni, sia pazienti affetti da AD. Tutte le persone arruolate sono state sottoposte a prelievo di sangue, dal quale sono stati isolati i leucociti ed il plasma. Con tecnica RT-PCR è stata analizzata l'espressione di CD36, ER- α , ER- β , PR-A/B, IGF-R1 ed IL-6 sui leucociti e, mediante dosaggio RIA od ELISA, il livello di estradiolo, progesterone, IGF-1 ed IL-6 nel plasma, con i seguenti risultati:

- come atteso, l'espressione leucocitaria di CD36 era significativamente ridotta nei pazienti AD rispetto ai controlli sia giovani che anziani. Inoltre, mentre nei maschi sani l'espressione non si modificava con l'età, nelle donne essa subiva una notevole riduzione nel periodo corrispondente alla transizione menopausale (decade di età compresa tra 51 e 60 anni), per poi tornare a livelli normali nei soggetti più anziani; molto interessante era l'osservazione che nelle donne con AD i valori erano simili a quelli riscontrati nelle donne in peri-menopausa.
- l'espressione leucocitaria di ER- α ed ER- β nelle donne di età compresa tra 51 e 60 anni aumentava significativamente, mentre negli uomini rimaneva quasi costante nel corso

della vita e. nei pazienti AD di entrambi i sessi non variava rispetto ai soggetti sani di età paragonabile.

- l'espressione leucocitaria di PR-A/B negli uomini sani era inferiore rispetto alle donne di pari età e progressivamente aumentava fino a raggiungere un picco nella decade di età compresa tra 41 e 50 anni, dopo di che si riduceva nella successiva decade per poi rimanere stabile con l'aumentare dell'età. Nelle donne, invece, si osservava un andamento bifasico con un minimo nei soggetti appartenenti alla decade 41-50 e valori maggiori nei soggetti più giovani e più anziani. Di nuovo nei pazienti AD di entrambi i sessi non si osservavano differenze rispetto ai soggetti sani di età paragonabile.
- l'espressione leucocitaria di IGF-1R nei controlli di sesso maschile diminuiva con l'aumentare dell'età, mentre nelle donne questo andamento era meno evidente. Solo nei pazienti AD di sesso maschile l'espressione di IGF-1R era significativamente maggiore di quella dei soggetti sani dello stesso sesso.
- l'espressione leucocitaria di IL-6 nella popolazione controllo risultava costante per ogni fascia d'età per gli uomini e con un brusco aumento nella decade compresa tra 51 e 60 anni per le donne. Nei pazienti AD di entrambi i sessi l'espressione di IL-6 era inferiore rispetto ai controlli sani di età paragonabile.
- i livelli plasmatici di estradiolo e progesterone negli uomini sani non variavano in funzione dell'età. Al contrario, nelle donne sane si osservava una riduzione significativa di entrambi gli ormoni a partire dall'inizio della menopausa. Negli uomini AD i livelli di estradiolo erano ridotti rispetto ai controlli, mentre nelle donne AD erano simili a quelli dei controlli anziani di età paragonabile.
- i livelli plasmatici di IGF-1 progressivamente diminuivano nei soggetti sani di entrambi i sessi. Questa riduzione era non solo più evidente, ma anche più precoce nelle donne rispetto agli uomini. I livelli di IGF-1 erano significativamente più elevati nei pazienti AD di entrambi i sessi rispetto ai soggetti controllo di pari età.
- nessuno dei parametri biologici valutati era correlato all'età, tranne i livelli plasmatici di estradiolo e progesterone nelle donne e quelli di IGF-1 in entrambi i sessi.
- nella popolazione sana di entrambi i sessi si osservava una correlazione diretta tra le espressioni di ER- α o ER- β e IL-6 e tra le concentrazioni di IGF-1 e l'espressione di IGF-1R; quest'ultima nei pazienti AD non era statisticamente significativa.

Per valutare il ruolo di IGF-1 nella transizione menopausale, la popolazione femminile pre- e post-menopausale è stata suddivisa nei gruppi con livelli di IGF-1 normali o ridotti sulla base di un cut-off predefinito: nel gruppo delle donne in pre-menopausa con livelli normali di IGF-

1 le concentrazioni plasmatiche di estradiolo erano positivamente correlate con l'espressione leucocitaria di PR-A/B, ma questa associazione veniva meno quando era considerato il gruppo con livelli ridotti di IGF-1. Al contrario, nelle donne in post-menopausa con normali o ridotti livelli di IGF-1 non si osservava alcuna correlazione statisticamente significativa tra i due parametri.

Sulla base di questi dati si può affermare che la fase di transizione menopausale rappresenti una "finestra temporale critica" nella quale si sviluppa un assetto ormonale caratterizzato da un forte sbilanciamento di diversi fattori ormonali e dalla netta prevalenza delle influenze pro-neurotossiche (in particolare, la riduzione della protezione esercitata dagli estrogeni, che, anche in presenza di livelli normali di IGF-1, non sono in grado di stimolare l'espressione di PR-A/B e di ridurre la produzione di IL-6) rispetto a quelle neuroprotettive. Ciò potrebbe rappresentare un elemento favorente lo sviluppo di processi neurodegenerativi.

Alla luce di ciò nella seconda parte di questo lavoro di tesi si è deciso di indagare *in vitro* l'efficacia degli estrogeni nel modificare, in senso favorevole, il bilancio fra le influenze neuroprotettive vs. quelle pro-neurotossiche (per es., riduzione dell'espressione microgliale di CD36, indotta da stimolazione con citochine). Per questo studio sono state utilizzate cellule immortalizzate di microglia murina N9, che sono state trattate con 17- β -estradiolo e TNF- α , secondo tempistiche diverse: l'estradiolo veniva dato prima, dopo oppure insieme a TNF- α , per valutare l'effetto di una somministrazione precoce, tardiva o simultanea sull'espressione di CD36. Come precedentemente detto, la sua riduzione è un fenomeno predisponente alla malattia, tanto che TNF- α , una delle citochine maggiormente espresse in corso di AD, ne causava una riduzione significativa. Solo un trattamento precoce con 17- β -estradiolo era in grado di revertire l'effetto della citochina pro-infiammatoria, dimostrando l'effettiva esistenza di una finestra temporale in cui l'estrogeno svolge il suo ruolo protettivo. Inoltre, poiché si sta sempre più diffondendo la tendenza alla prescrizione di isoflavoni derivati dalla soia (fitoestrogeni) per contrastare i fenomeni vasomotori (*hot flushes*), che affliggono molte donne nelle fasi precoci della menopausa, si è ritenuto utile indagare l'eventuale capacità neuroprotettiva di questi composti, valutando gli effetti della terapia ormonale sostitutiva (HRT) o di una terapia con fitoestrogeni sull'espressione di CD36, inteso come indicatore biochimico precoce di aumentato rischio di demenza, sia mediante *Real-time* PCR, sia mediante tecnica immunostochimica. Per questo studio sono state utilizzate delle ratte, divise in 4 gruppi sperimentali: intatte + veicolo, ovariectomizzate + veicolo, ovariectomizzate + 17- β -estradiolo ed ovariectomizzate + fitoestrogeno e venivano valutati anche dei parametri di avvenuto rimpiazzo estrogenico, con i seguenti risultati:

- analisi del peso corporeo: esso era maggiore, come atteso negli animali ovariectomizzati, e lo stesso accadeva per gli animali che assumevano fitoestrogeni, mentre gli animali intatti e quelli in terapia con estrogeno si mantenevano più magri, sebbene i pesi dei due gruppi di animali non fossero esattamente sovrapponibili;
- analisi del peso dell'utero: come atteso l'ovariectomia aveva indotto l'utero ad atrofizzarsi, e lo stesso accadeva per quello delle ratte in terapia con fitoestrogeni, mentre gli animali intatti o in terapia con estrogeni mostravano uteri trofici, sebbene, di nuovo, vi fosse una certa discrepanza tra i due gruppi;
- analisi della densità minerale ossea femorale: come atteso l'ovariectomia riduceva la densità ossea a livello del femore, inteso sia *in toto* sia a livello della diafisi e della metafisi, e lo stesso avveniva per il fitoestrogeno, mentre nel gruppo delle ratte intatte o che assumevano estradiolo, l'osso non veniva inficiato ed i valori di densità dei due gruppi erano pressoché sovrapponibili, fatta eccezione per la diafisi;
- livelli plasmatici di 17- β -estradiolo: come atteso i livelli risultavano bassi nelle ratte ovariectomizzate o in terapia fitoestrogenica, mentre si mantenevano elevati, ma sempre non sovrapponibili, nelle ratte intatte od in terapia estrogenica;
- espressione genica cerebrale di CD36 (PCR): essa si riduceva significativamente sia nell'ippocampo che nella corteccia fronto-temporale delle ratte ovariectomizzate e la terapia con 17- β -estradiolo revertiva questo effetto, riportandola ai livelli delle ratte intatte;
- espressione genica periferica di CD36: essa non variava tra i 4 gruppi sperimentali;
- espressione proteica centrale di CD36 (immunoistochimica): essa non si modificava nei diversi gruppi sperimentali e tendeva a formare degli addensamenti (*clusters*) attorno ai vasi;
- espressione proteica cerebrale di GFAP (immunoistochimica): come atteso gli animali presentavano un evidente stato di gliosi età-correlato, ma non sussistevano differenze tra i vari gruppi;
- espressione proteica cerebrale di Ferritina (immunoistochimica): come atteso la marcatura per questa proteina risultava quasi sovrapponibile a quella per CD36, fatta eccezione per le cellule endoteliali.

Alla luce dei risultati sul peso corporeo, sull'utero, sull'osso e sulle concentrazioni plasmatiche di 17- β -estradiolo ottenuti in questi animali si può concludere che l'estrogeno somministrato esogenamente ha sortito un effetto uguale o simile, in alcuni casi, a quello dell'estrogeno endogeno, contrastando lo stato ipoestrogenico, indotto dall'ovariectomia, e le

conseguenze che ne derivano. Inoltre, in concomitanza con i dati ottenuti nell'uomo, si riconferma uno sbilanciamento in corso di menopausa verso fattori sfavorevoli, come la riduzione di CD36, anche se tale riduzione appare meno evidente in immunohistochimica, probabilmente per una differente sensibilità della metodica.

Infine, dato il ruolo ampiamente dimostrato in letteratura di CD36 nella patogenesi dell'AD ed al fine di testare la possibilità di un utilizzo futuro di questo recettore come marcatore biochimico precoce di malattia, è stata valutata l'espressione nel tempo di CD36 nei topi APP23, riconosciuti valido modello sperimentale di AD, sia mediante tecnica *Real-time* PCR sia mediante immunohistochimica. A tal fine sono stati utilizzati animali di 1,3,6,9 e 12 mesi di età, nei quali la deposizione di placche inizia attorno al sesto mese di età; proprio in concomitanza di questo evento CD36 raggiungeva il massimo della sua espressione, per poi tornare a livelli inferiori, seppure non basali, sia a livello di espressione genica sia a livello di quella proteica. Inoltre, una controcolorazione con tioflavina S, che marca le placche di A β , ha permesso di evidenziare una correlazione inversa tra queste e CD36, determinando per questo recettore un ruolo nella fase acuta di malattia: con il progredire della malattia, infatti, CD36 si down-regolava.

In conclusione, l'effetto protettivo, esercitato dagli estrogeni nel contrastare la riduzione di CD36, risulta essere dose e tempo-dipendente. Inoltre, alla luce delle modificazioni di CD36, che avvengono precocemente nella AD, esso sembrerebbe avere un ruolo predittivo proprio nella diagnosi di questa malattia.

INTRODUZIONE

1. LA MALATTIA DI ALZHEIMER (AD)

AD è una patologia a carattere degenerativo del sistema nervoso centrale (SNC). Si tratta di una forma di demenza corticale, che dagli studi prospettici clinico-patologici si configura come la più comune, una delle maggiori cause di disabilità e mortalità nei Paesi ad elevato tenore di vita (Aguero-Torres *et al.*, 1998; Fig. 1.1.).

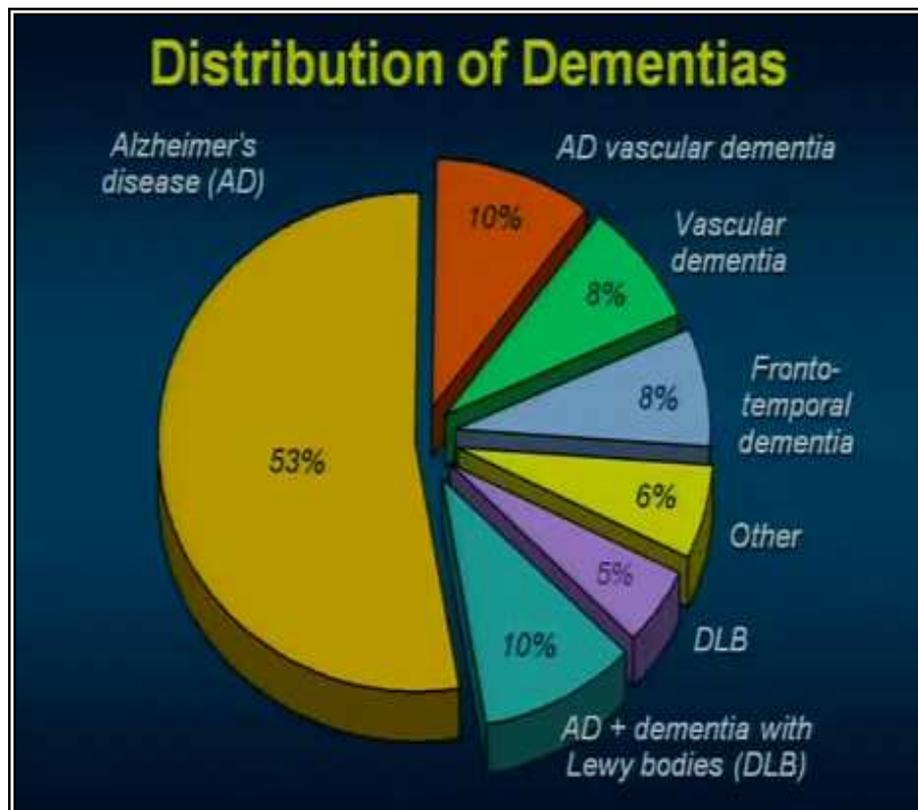


FIGURA 1.1. Prevalenza (%) delle diverse forme di demenze.

AD è stata descritta per la prima volta nel 1906 dal neuropatologo Alois Alzheimer (1863-1915) durante la *Convenzione Psichiatrica di Tübingen*, nella quale presentò il caso di una donna di 51 anni affetta da una forma sconosciuta di demenza. Ma solo nel 1910 la malattia venne nosologicamente definita da Emil Kraepelin, il più famoso psichiatra di lingua tedesca dell'epoca, che pubblicò un trattato di *Psichiatria*, nel quale veniva discussa una nuova forma di demenza, scoperta da Alzheimer, a cui venne attribuito il nome di *malattia di Alzheimer*.

È una malattia irreversibile, ingravescente, caratterizzata da una perdita progressiva delle facoltà intellettive, che conduce alla perdita della propria autonomia nelle più comuni attività della vita quotidiana. Il principale sintomo è rappresentato da un *deficit* di memoria.

Le persone affette da questa patologia manifestano afasia di tipo principalmente motorio, perdita della comprensione dell'uso degli oggetti usuali e graduale alterazione della capacità di comprensione.

L'esordio sintomatico è a carattere "insidioso": i primi sintomi sono lievi, difficili da riconoscere e da distinguere dalle disattenzioni di una persona anziana sana (*deficit* cognitivo dell'anemnesi). Anche nel momento in cui si riconosce il carattere patologico di alcuni componenti non è semplice pervenire ad una sicura diagnosi differenziale, in quanto alcuni sintomi sono comuni ad altre patologie, quali la depressione e la demenza multiinfartuale.

I vari sintomi sembrano avere una differente frequenza, anche in relazione alla fase della malattia (Harrel *et al.*, 1995). Secondo alcuni Autori, i sintomi psichiatrici rappresentano spesso la conseguenza di un peggioramento del declino cognitivo (Marin *et al.*, 1997). Secondo altri, il disturbo comportamentale non sembra essere in relazione con la gravità del deterioramento cognitivo, potendo insorgere in maniera grave anche in pazienti con modesto *deficit* intellettivo (Mega *et al.*, 1998).

La storia clinica della malattia si può separare in tre fasi. Nella fase iniziale le manifestazioni precoci comprendono la perdita di memoria con comparsa di disorientamento spazio-temporale, ma di primaria importanza è la dissoluzione progressiva del linguaggio, che dapprima si manifesta con una "anomia" di lieve entità. Nella fase intermedia il danno della memoria si accentua, e si accompagna a *deficit* di comprensione e utilizzo di parole "sbagliate" (parafasie). La memoria anterograda è molto alterata, con minore compromissione della retrograda. Inoltre, si possono osservare deficit attentivo-esecutivi, flessione dell'umore, ansia reattiva, ritiro sociale, apatia ed irascibilità. Con il tempo il paziente diviene sempre più incapace di sostenere una vita di relazione e si addentra nella fase finale; possono comparire sintomi di tipo psicotico, quali deliri, allucinazioni, nonché comportamenti afinalistici o inappropriati come vagabondaggio o aggressività (soprattutto verbale). Assai frequente è l'alterazione del ritmo sonno/veglia o dell'appetito con continua ricerca di cibo (forma iperfagica) o con rifiuto del cibo (forma anoressica) (Fig. 1.2).



FIGURA 1.2. Manifestazioni cliniche e stadi della malattia di Alzheimer.

Se nella prima e seconda fase della malattia l'attività motoria è buona (le funzioni di cervelletto e gangli della base non sono intaccati), nelle fasi più avanzate della malattia si verificano alterazioni motorie ed incontinenza, con conseguente perdita dell'autonomia. Nella fase ultima della malattia si possono osservare sfumature o disturbi comportamentali, disinibizione ed agitazione, sintomi da contenere con adeguata terapia farmacologica.

La gravità del quadro demenziale può aumentare la probabilità d'insorgenza di altre patologie organiche e riduce grandemente l'aspettativa di vita. Queste condizioni intervengono dopo 5/10 anni dai primi sintomi della malattia. Attualmente, in virtù dell'assistenza sanitaria, i pazienti sopravvivono dai 10 ai 12 anni dai primi sintomi della malattia; generalmente la

morte sopravviene per fattori internistici, per un'infezione respiratoria od urinaria intercorrente (Khachaturian, 1997).

1.1. Clinica

L'AD è una complessa sindrome al cui sviluppo concorrono fattori genetici ed ambientali diversamente combinati, che conducono ad un quadro clinico ed anatomopatologico comune (Whitehouse, 1997). Il *deficit* mnesico è globale, riguarda sia la memoria verbale che quella visuo-spaziale, limitando, in particolare, l'apprendimento di nuove informazioni; caratteristicamente, infatti, i ricordi più datati sono conservati più a lungo, e solo in un secondo tempo diviene deficitaria anche la rievocazione. Spesso è presente una discrepanza fra l'esecuzione di compiti automatizzati di ambito professionale ed attività quotidiane, anche banali, ma nuove e non previste. Caratteristicamente il malato demente tenta di coprire le proprie lacune mnesiche con evidenti confabulazioni. Quando il deficit mnesico si fa più pronunciato si rendono evidenti gli altri *deficit* cognitivi. Il linguaggio è difficoltoso per incapacità di richiamare i vocaboli, e il paziente tenta di ovviare a questa situazione ricorrendo a complesse circonlocuzioni. Il vocabolario si restringe, mentre la comprensione è inizialmente conservata, per essere poi compromessa nelle fasi successive. In fase avanzata compare spesso ecolalia, ed infine il disturbo può evolvere fino ad una vera afasia anomica. Con il tempo il paziente diventa incapace di riconoscere i volti familiari (prosopagnosia) e persino il proprio. La capacità di calcolo è parimenti compromessa (acalculia o discalculia), alterando inizialmente le capacità lavorative del paziente e rendendolo infine incapace di eseguire anche i calcoli aritmetici più semplici. Con l'aggravarsi della malattia il paziente presenta difficoltà di orientamento anche in luoghi a lui familiari, e perfino nella sua stessa casa (Fig. 1.1.1.)

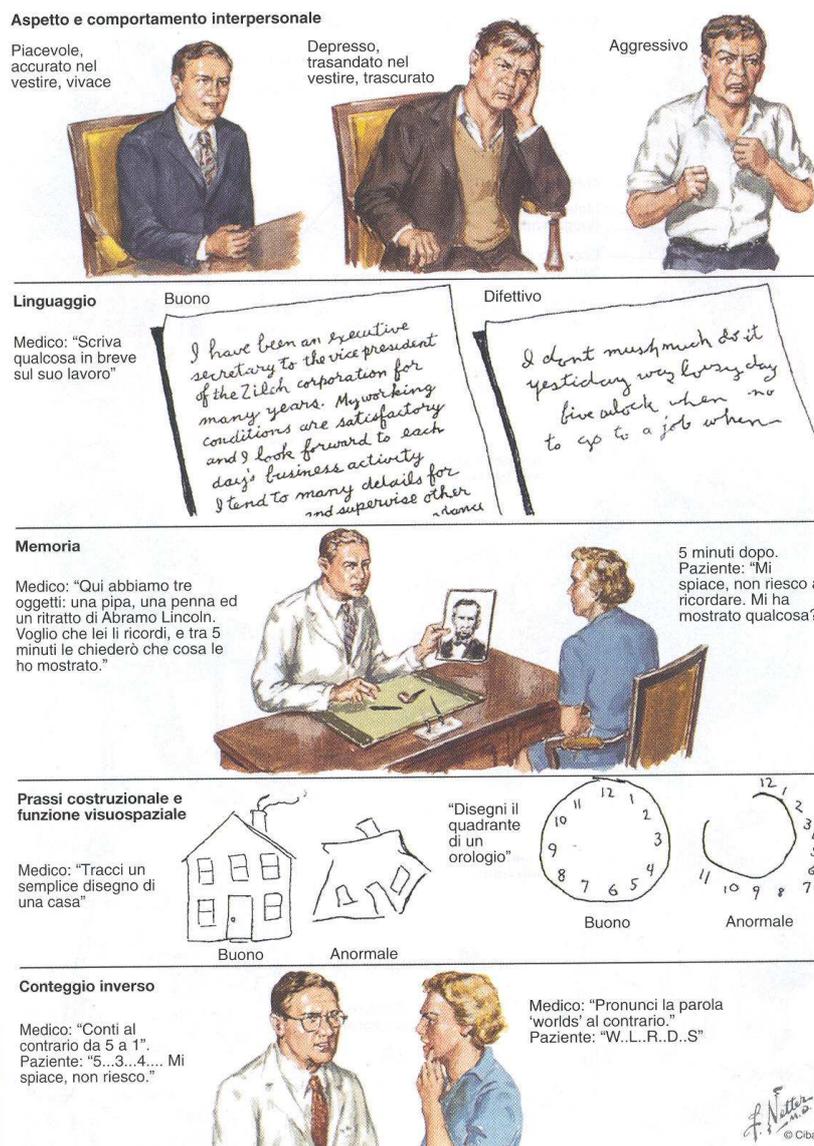


FIGURA 1.1.1. Valutazione clinica delle insufficienze delle funzioni corticali superiori.

L'inversione del ritmo sonno-veglia, soprattutto nelle fasi avanzate della malattia, è aggravata dal disorientamento temporale, che porta il paziente a non riconoscere le diverse fasi della giornata. Gradualmente il paziente sviluppa difficoltà nel comprendere la relazione esistente fra se stesso e gli oggetti come si osserva, ad esempio, nell'aprassia dell'abbigliamento, ove emergono difficoltà o incapacità nel posizionare i propri segmenti corporei in accordo con i capi di abbigliamento o nel rispettarne la corretta stratificazione. Simili difficoltà compaiono nell'utilizzo degli strumenti e degli oggetti della vita quotidiana, come le posate o gli elettrodomestici (aprassia di utilizzo). Frequentemente con il progredire della malattia interviene difficoltà nella locomozione con instabilità e passi accorciati, ma senza *deficit* di forza o rigidità; nelle fasi finali il paziente è incapace di mantenere la stazione eretta ed è costretto a giacere a letto, completamente dipendente da altri. La capacità di giudizio è progressivamente compromessa: il paziente non è più in grado di cogliere somiglianze o

differenze concettuali, di giudicare correttamente prezzi, dimensioni, quantità, diventando con il tempo incapace di badare ai propri affari prima, a se stesso poi. Il soggetto è inoltre facilmente distraibile da stimoli esterni e si stanca velocemente nell'affrontare anche semplici compiti.

Con il tempo la vita di relazione è sempre più compromessa dai *deficit* sopra descritti, aggravati da sintomi psichiatrici, spesso di tipo psicotico (deliri di furto, di gelosia, di riferimento, di persecuzione, allucinazioni visive), che divengono frequenti nelle ultime fasi della malattia; spesso sono inoltre presenti manifestazioni comportamentali inappropriate, vagabondaggio, aggressività verbale e fisica. La presenza di depressione, soprattutto in fase iniziale è frequente e spesso causa difficoltà nella diagnosi differenziale e nell'inquadramento della patologia, soprattutto perché tali manifestazioni possono essere di tipo reattivo alle difficoltà incontrate dal paziente. La concomitante comparsa di sintomi quali alterazioni comportamentali, irritabilità, agitazione, passività, apatia, possono allontanare il sospetto di demenza orientando verso una patologia psichiatrica e non verso i sintomi psichiatrici di una patologia degenerativa. Approfonditi test neuropsicologici sono in grado di evidenziare i *deficit* e favorire una corretta diagnosi anche nelle fasi precoci della malattia; per confermare l'iniziale sospetto è necessario seguire il paziente nel tempo. Talvolta la malattia si manifesta con un episodio "demenziale", cioè con un comportamento, circoscritto nel tempo, chiaramente incongruo alle circostanze (Spinnler, 1988). L'esame obiettivo inizialmente è normale, mentre nelle fasi successive possono essere evocati i riflessi di suzione, prensione ed altri segni di liberazione frontale; possono essere presenti segni di interessamento extrapiramidale e raramente crisi epilettiche; compare incontinenza sfinterica e acinesia, e il paziente diventa mutacico. Da alcuni studi neuropsicologici su soggetti anziani apparentemente sani si è osservato che, in coloro che col tempo sviluppano la malattia, essa resta asintomatica nella maggior parte dei casi per almeno 5 anni dalle prime anomalie emerse ai test più approfonditi, con lieve perdita della memoria e dell'attenzione. Alcuni autori ritengono che tale periodo possa essere anche più lungo. Non in tutti i pazienti la malattia esordisce ed evolve nello stesso modo: esiste, infatti, una grande variabilità nella comparsa dei sintomi e nella loro velocità di progressione; comune è, invece, il livello di decadimento finale con perdita completa dell'autosufficienza ed una vita sempre più di tipo vegetativo. La durata della malattia è piuttosto variabile e difficile da stabilire, essendo subdolo l'esordio e probabilmente lungo il processo patogenetico prima che i sintomi si rendano manifesti: il periodo sintomatico dura in media 7-8 anni, ma non sono rari i casi con decorso inferiore ad un anno o superiore a 20 anni (Larsson *et al.*, 1963).

1.2. Quadro Neuropatologico

Dal punto di vista neuropatologico l'aspetto più caratteristico dell'AD è un processo degenerativo costituito da perdita di neuroni in specifiche aree cerebrali (corteccia cerebrale, ippocampo e strutture sottocorticali quali il nucleo basale di Meynert), presenza di placche neuritiche o senili (nucleo centrale di A β , circondato da processi neuritici in degenerazione e da cellule gliali reattive), degenerazione neurofibrillare (accumulo intracitoplasmatico di ammassi di fibre argirofile) e angiopatia amiloide (Khachaturian, 1985; Mirra *et al.*, 1991; Braak e Braak, 1991; Mirra *et al.*, 1993; Fig. 1.2.1).

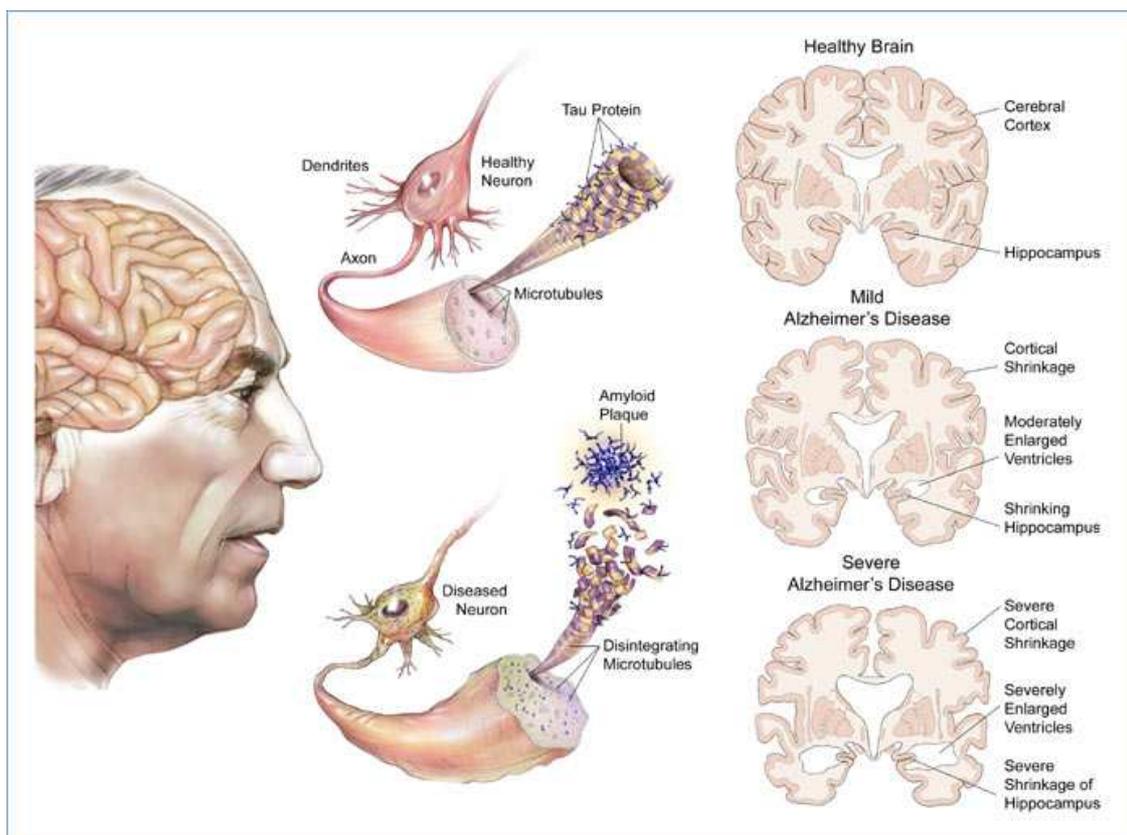


FIGURA 1.2.1. Aspetti patologici macroscopici (atrofia delle circonvoluzioni e dell'ippocampo; ampliamento dei solchi; assottigliamento dello strato corticale; ventricolomegalia) e microscopici (depositi di β -amiloide e formazione grovigli neurofibrillari) della malattia di Alzheimer.

La graduale riduzione di sostanza cerebrale che si osserva anche nel soggetto anziano normale si esaspera marcatamente in questa patologia. Il cervello presenta generalmente una grave atrofia generalizzata e simmetrica, anche se a volte i lobi parietali e, in misura minore, temporali e frontali possono essere più severamente colpiti rispetto alle altre regioni cerebrali con circonvoluzioni cerebrali ristrette, solchi e ventricoli ampliati (Fig.1.2.2.); il peso del cervello, soprattutto nelle fasi avanzate della malattia, può essere ridotto anche del 20%.

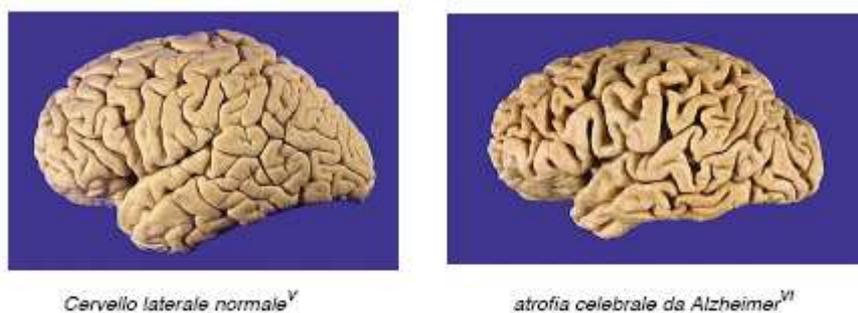


FIGURA 1.2.2. Atrofia generalizzata e simmetrica, con solchi e ventricoli ampliati, in cervello di paziente affetto da AD.

Questa atrofia si associa ad una perdita di neuroni corticali ad un rimpicciolimento dei neuroni superstiti, con una rarefazione dei dendriti e delle spine dendritiche, ed ad un aumento della componente astrocitaria (Fig. 1.2.3.).

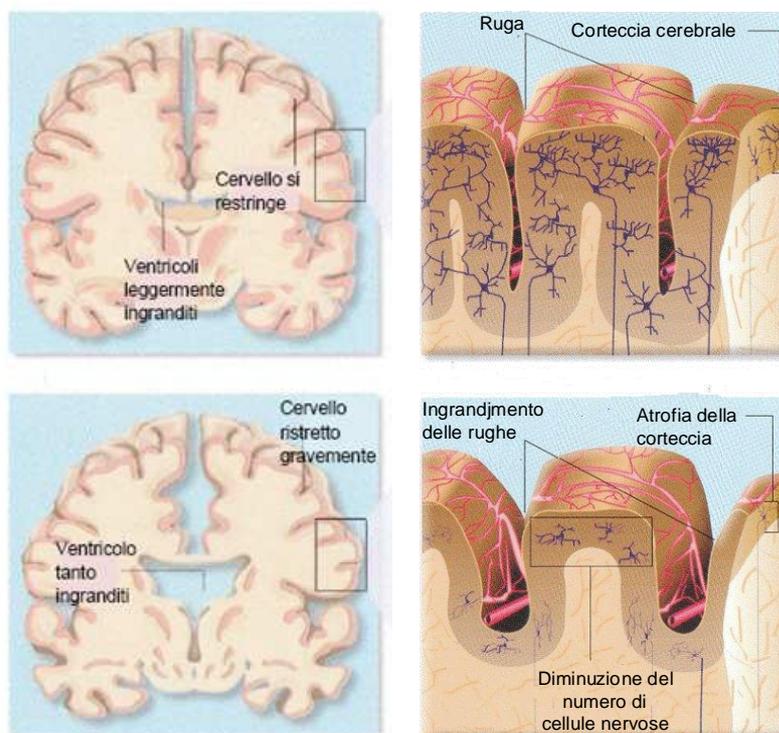


FIGURA 1.2.3. In alto: AD in fase iniziale con cervello che si restringe e ventricoli che si ingrandiscono leggermente; in basso: AD in fase avanzata con cervello ristretto, ventricoli ingranditi a causa della diminuzione del numero di cellule nervose.

Anche l'ippocampo risulta gravemente atrofico, tanto da esser considerato da alcuni autori come diagnostico. La perdita neuronale colpisce soprattutto il *subiculum*, la corteccia entorinale ed il giro paraippocampale da cui prende origine la via perforante, tramite la quale l'ippocampo è posto in connessione con la neocorteccia (Fig. 1.2.4.).

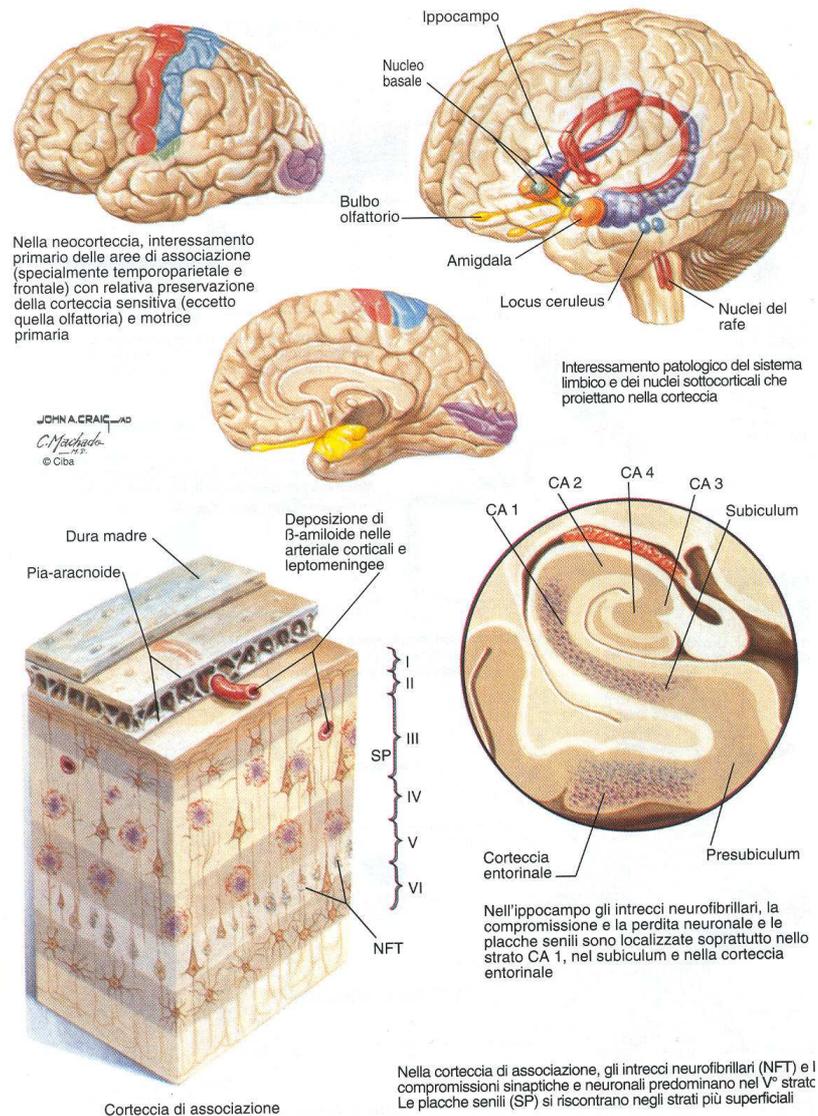


FIGURA 1.2.4. Distribuzione delle modificazioni patologiche nella malattia di Alzheimer.

È proprio l'isolamento dell'ippocampo, regione chiave dei processi mnescici, una delle cause primarie del *deficit* cognitivo, in particolare a carico della memoria episodica, presente nei soggetti con AD in fase precoce (Marilyn, 1996). Con il successivo coinvolgimento delle strutture corticali del lobo temporale, connesse con le aree temporo-limbiche, si aggiungerà l'amnesia semantica, che compare nella fase conclamata della malattia. Risultano depauperati anche il nucleo anteriore del talamo, i nuclei settali, la banda diagonale di Broca e l'amigdala.

Anche diversi nuclei troncoencefalici sono colpiti dalla perdita neuronale (tra questi il nucleo del *rafe* dorsale, il *locus coeruleus*, sedi rispettivamente di neuroni serotoninergici e noradrenergici, la *substantia nigra*), le aree limbiche (probabile causa dei disturbi dell'umore) ed il nucleo basale del Meynert, principale fonte delle fibre colinergiche alla neocorteccia.

È stato dimostrato che il numero di placche neuritiche e degenerative neurofibrillari si correla significativamente con le funzioni cognitive valutate *antemortem* (Terry *et al.*, 1999), mentre

sia l'estensione che il numero delle placche amiloidi non è in relazione proporzionale con la gravità dei sintomi psichici.

La perdita neuronale interessa sia le grosse cellule piramidali sia gli interneuroni. Molti dei neuroni superstiti sono di volume ridotto e con minore numero di dendriti, i quali, a loro volta, si presentano addossati l'uno all'altro, a causa della perdita di sinapsi e neuropilo; la perdita sinaptica, che accompagna la degenerazione neuronale, è correlata ai *deficit* mnesici cui si assiste nell'AD. Alle alterazioni neuronali si associa una proliferazione astrocitaria, di significato verosimilmente riparativo o compensatorio, soprattutto negli strati III e IV della corteccia. Sebbene l'atrofia cerebrale sia un reperto relativamente costante nell'AD, la considerevole variabilità che si può osservare tra i diversi casi ne impedisce l'utilizzo come marcatore diagnostico affidabile. Gli aspetti tipici all'esame neuropatologico sono rappresentati dalle placche senili, dagli ammassi neurofibrillari (NTF) e dall'angiopatia amiloide (congofila), il riscontro dei quali *post mortem* consente la diagnosi definitiva. (Fig. 1.2. 5.).

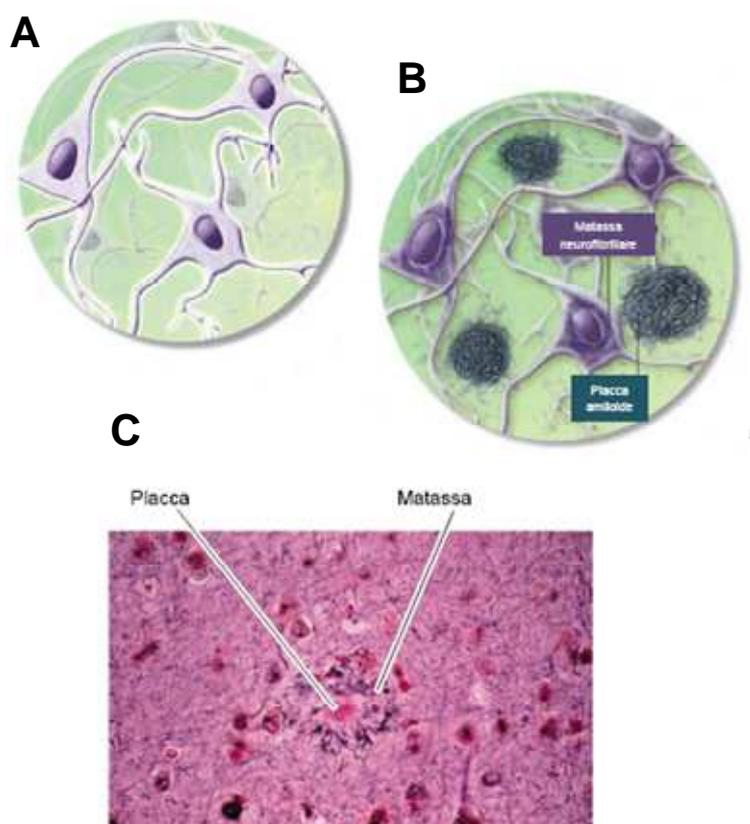


FIGURA 1.2.5. Sistema nervoso sano con cellule perfettamente comunicanti tra di loro (A); sistema nervoso affetto da AD con neuroni circondati da placche di A β e con neuriti destabilizzati dai grovigli di tau iperfosforilata, che impediscono uno scambio di informazioni corretto (B); *staining* per le due caratteristiche neuropatologiche dell'AD: placca neuritica e groviglio neurofibrillare (D).

Tali lesioni si possono riscontrare, sebbene in misura minore e confinate in determinate regioni cerebrali, anche in anziani normali, ed in altre patologie degenerative cerebrali, risultando quindi tipiche ma non patognomoniche di AD: è la valutazione quantitativa più che quella qualitativa a permettere la diagnosi.

1.3. Placche Senili o Neuritiche

Le placche senili sono costituite da foci microscopici di depositi extracellulari di amiloide associati a danno assonale e dendritico, generalmente rappresentati in grande numero nella corteccia limbica ed associativa (Dickson, 1997); queste formazioni contengono depositi insolubili di A β , principalmente in forma filamentosa, che nella parte centrale della placca si addensano a formare un *core* compatto, e neuriti distrofici, i quali si localizzano sia dentro, sia in prossimità dei depositi amiloidei. La sostanza amiloide è formata da fibrille con conformazione a foglietto β di 6-10 nm di diametro presenti nello spazio extracellulare, costituite da una proteina di 4 kDa, chiamata A β 1-42 che deriva da un precursore di maggiori dimensioni, l'APP. I neuriti danneggiati si presentano dilatati, con alterazioni ultrastrutturali, tra cui lisosomi rigonfi, aumentato numero di mitocondri e filamenti elicoidali accoppiati, generalmente indistinguibili da quelli che compongono gli ammassi neurofibrillari. I neuriti che partecipano alla formazione della placca senile possono provenire da neuroni di diverse classi neurotrasmettitoriali. La placca senile è, inoltre, associata ad elementi microgliali ed astrocitari attivati. La componente microgliale esprime antigeni di superficie tipici dello stato attivato come CD45 e HLA-DR ed è localizzata soprattutto dentro al *core* o nei suoi pressi. Gli elementi astrocitari circondano invece la placca e mostrano abbondanti processi che si estendono verso il *core*. Nella placca senile si trovano colocalizzate sia la proteina A β 1-42 più idrofobica e particolarmente incline all'aggregazione (Jarrett *et al.*, 1993; Pike *et al.*, 1995; Citron *et al.*, 1996), sia la forma A β 1-40, che è normalmente prodotta più in abbondanza della A β [1-42]. Le indagini immunoistochimiche mettono in evidenza la presenza di agglomerati di A β localizzati diffusamente nella corteccia, comprese quelle aree non chiaramente implicate nella tipica sintomatologia della AD (come talamo, caudato, putamen e cervelletto), caratterizzati da una leggera ed amorfa immunoreattività, senza un *core* compatto né chiaramente fibrillare (placche diffuse) (Yamaguchi *et al.*, 1988; Tagliavini *et al.*, 1988). Inoltre, nella maggior parte di questi agglomerati non è possibile dimostrare la presenza di neuriti distrofici o se ne può riconoscere solo una ridotta quantità.

Le placche diffuse sono costituite quasi esclusivamente da A β 1-42 (□Iwatsubo *et al.*, 1994; Roher *et al.*, 1994; Iwatsubo *et al.*, 1995; Lemere *et al.*, 1996) e sono le uniche forme

riconoscibili in quelle regioni nelle quali mancano o si ritrovano in quantità ridotta i neuriti distrofici, le modificazioni gliali e i grovigli neurofibrillari, seconda caratteristica patologica di AD. Esse possono essere anche messe in evidenza come uniche lesioni nella corteccia limbica ed associativa di soggetti della stessa età non affetti da malattie dementigene degenerative e sono presenti già durante l'età adolescenziale in soggetti con trisomia 21 (Sindrome di Down) (Lalowsky *et al.*, 1996). Queste evidenze hanno portato ad ipotizzare per queste lesioni un significato di precursori delle placche senili, ipotesi corroborata anche da esperimenti su topi transgenici esprimenti il gene mutante umano per l'APP, i quali sviluppano depositi diffusi prima della forma fibrillare associata alle modificazioni neuritiche e gliali.

Nelle placche senili si può dimostrare la presenza di numerose altre molecole, la maggior parte delle quali di significato infiammatorio. Vi sono evidenze che ApoE4, C1q ed altre molecole possano legarsi alla A β ed accelerare la formazione di fibrille (Strittmatter *et al.*, 1993; Webster *et al.*, 1994; Snow *et al.*, 1995); altre invece, come la *clusterina*, possono inibirla (Ghisso *et al.*, 1993). La fibrillogenesi potrebbe essere quindi determinata da uno squilibrio tra i fattori che la favoriscono e quelli che la inibiscono (Verbeek *et al.*, 1997). È interessante notare che la densità di placche senili e di NFT in alcune aree corticali è stata correlata con la gravità del decadimento cognitivo (Caramelli *et al.*, 1998).

Nelle arteriole e venule meningee e in quelle che attraversano la corteccia cerebrale sono presenti depositi di A β (Angiopatia Amiloide Congofila; Glenner *et al.*, 1984a; Glenner *et al.*, 1984b), localizzati nella membrana basale e che si estendono nel tessuto circostante (Verbeek *et al.*, 2000), costituiti principalmente da A β [1-40] (Suzuki *et al.*, 1994). Esperimenti sia *in vivo* che *in vitro* dimostrano che i depositi di A β provocano degenerazione delle cellule muscolari lisce e, come conseguenza, un difetto dell'integrità della barriera ematoencefalica. Questo, a sua volta, potrebbe contribuire all'alterazione della microcircolazione ed ai problemi energetici cerebrali dei pazienti AD (Kalaria *et al.*, 1992).

Associati ai depositi amiloidei sono riscontrabili cellule della serie monocitomacrofagica che in alcuni casi sembrano precedere la deposizione di A β , facendo ipotizzare per quest'ultima un significato di conseguenza più che di causa; queste considerazioni, cui si aggiunge l'evidenza di cellule microgliali associate alle placche senili, richiamano l'attenzione sul significato delle popolazioni di origine monocitomacrofagica (di cui anche gli elementi microgliali fanno parte) nella genesi ed evoluzione delle lesioni tipiche dell'AD. I depositi amiloidei si interrompono bruscamente quando il vaso passa nella sostanza bianca

sottocorticale, ove infatti solo rari vasi presentano i depositi di A β ; l'estensione dell'angiopatia amiloide varia considerevolmente anche tra individui con una quantità di A β parenchimale confrontabile.

1.3.1. β -Amiloide

La proteina A β deriva dal suo precursore APP a seguito di tagli sequenziali da parte di diversi enzimi. Il termine APP comprende un gruppo eterogeneo di polipeptidi espressi ubiquitariamente nell'organismo, eterogenei sia per la presenza di diverse isoforme (le tre maggiormente rappresentate di 695, 751 e 770 residui) sia per modificazioni post-traduzionali, tra cui glicosilazioni, solfatazioni e fosforilazioni (Oltersdorf *et al.*, 1990; Hung e Selkoe, 1994; Walter *et al.*, 1997; Weidemann *et al.*, 1997). Le isoforme contenenti 751 e 770 residui sono largamente espresse sia dalle cellule non neuronali che da quelle neuronali; invece l'isoforma contenente 695 residui è espressa in maggiore quantità dai neuroni (Haass *et al.*, 1991). La differenza tra le isoforme 770/751 e 695 consiste nella presenza nelle prime due di un esone codificante un enzima inibitore della serina proteasi (*Kunitz-type of serine.protease inhibitor* - KPI); nelle piastrine umane le isoforme contenenti il dominio KPI hanno la funzione di inibitori del fattore XIa, serina proteasi implicata nella cascata della coagulazione (Smith *et al.*, 1990).

La APP è una proteina a singolo dominio transmembrana traslocata in sede tradizionale nel reticolo endoplasmico; sia durante che dopo il transito nella via secretoria può andare incontro a tagli sequenziali, con la produzione di derivati secreti nel lume vescicolare o nello spazio extracellulare. Il taglio proteolitico operato dalla α -secretasi (Esch *et al.*, 1990; Sisodia *et al.*, 1990) porta al rilascio di un frammento solubile (α -APPs) di elevato peso molecolare nello spazio extracellulare (o nel lume) e lascia un frammento transmembranario di 83 residui aminoacidici (C83; Elser e Wolfe, 2001). L'attività α -secretasica nelle cellule di mammifero è stata assegnata ad una serie di proteine, definite adamolisine, appartenenti alla famiglia delle metalloproteasi disintegrine (Buwbaum *et al.*, 1998; Lopez-Perez *et al.*, 2001), la cui attività enzimatica è regolata da esteri del forbolo, protein chinasi C, ed influenzata da diversi fattori, come neurotrasmettitori, citochine ed ormoni. Di rilevanza è la scoperta che gli estrogeni possono attivare l'attività α -secretasica, con conseguente riduzione della formazione di A β (Xu *et al.*, 1998). Alternativamente la APP può essere scissa da una β -secretasi, che taglia un frammento solubile di dimensioni ridotte rispetto a quello generato dalla α -secretasi, lasciando un frammento transmembranario di 99 residui (C99; Seubert *et al.*, 1993). L'enzima che opera l'attività β -secretasica è stato identificato e denominato BACE (*β -site APP cleaving*

enzyme; Bennet *et al.*, 2000). L'attività del BACE, aspartil-proteasica, risulta essere ottimale a pH acido e l'enzima preferenzialmente è attivo all'interno degli endosomi. Per rispondere a questo requisito è necessario che la APP sia trasportata dalla superficie all'interno della cellula (Perez *et al.*, 1999). Il prodotto del BACE può essere in seguito trasferito sulla superficie cellulare dove diventa substrato per la γ -secretasi (Selkoe, 2001). L'azione della γ -secretasi sui frammenti transmembranari residuati dall'azione della α e β -secretasi porta al taglio e secrezione di due frammenti proteici: rispettivamente p3 (Haass *et al.*, 1992) ed A β (Fig.1.3.1.1.).

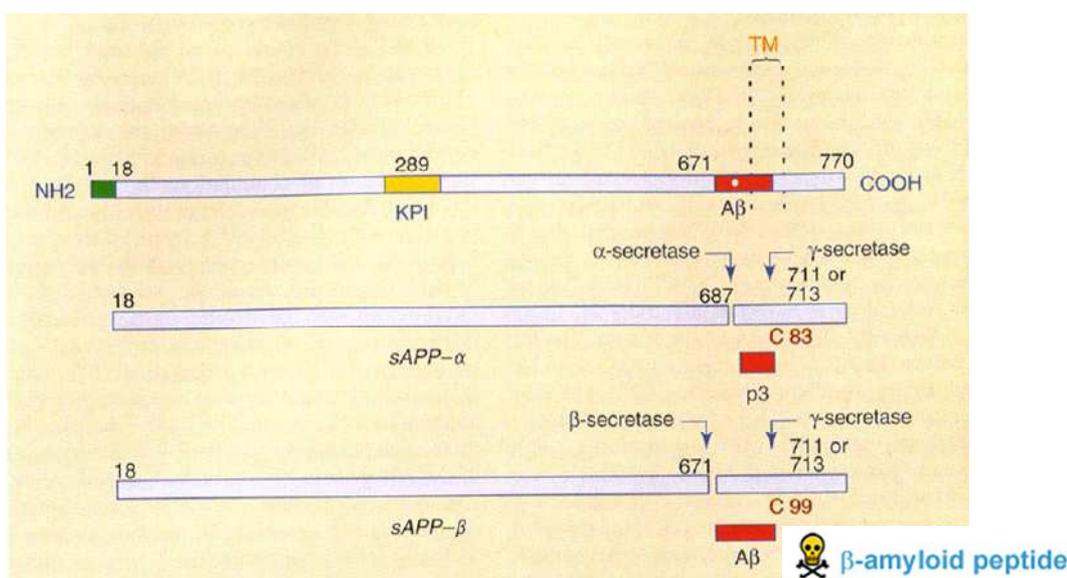


FIGURA 1.3.1.1. Pathway amiloidogenico e non della APP.

Il peptide A β è costitutivamente prodotto e rilasciato dalle cellule in condizioni di normalità (Haass *et al.*, 1992, Seubert *et al.*, 1992; Shoji *et al.*, 1992; Busciglio *et al.*, 1993), ed è misurabile nel *liquor* e nel plasma di soggetti normali durante tutta la vita. Il taglio proteolitico della γ -secretasi produce una varietà di peptidi A β diversi nella sequenza C-terminale. Il frammento più comune è A β 40, solubile nei solventi acquosi, seguito da A β 42, che rappresenta il 5-10% dei frammenti A β totali; nei cervelli AD sono stati trovati anche peptidi A β 43 ed A β 44, e frammenti A β 46 sono stati isolati da muscolo scheletrico (Kuo *et al.*, 2000). La lunghezza del peptide correla positivamente con la sua insolubilità e la capacità di formare aggregati tossici (Jarret *et al.*, 1993). Alcuni studi candidano l'aspartil proteasi simile alla catepsina-D come γ -secretasi (Evin *et al.*, 1995), in realtà la sua identità rimane ancora ignota. Non è ancora precisamente determinato in quale punto della catena sintetica dell'APP avvenga il taglio enzimatico operato dalla α , β o γ -secretasi; una consistente parte della α -APPs può essere generata dall'azione dell' α -secretasi sulla APP inserita nella

membrana plasmatica (Sisodia, 1992), ma può essere generata anche durante la catena sintetica intracellulare della APP (Sambamurti *et al.*, 1992; De Strooper *et al.*, 1993). L'azione della β -secretasi può avvenire, almeno in parte, durante le ultime fasi dei processi sintetici post-traduzionali (Haass *et al.*, 1995); i siti in cui è operato il taglio dei frammenti C99 e C83 da parte della γ -secretasi sono ancora oggetto di studio.

Sembra che i frammenti $A\beta$ 1-40 ed $A\beta$ 1-42 siano generati in percentuale considerevole durante la internalizzazione e la processazione endosomiale della APP (Koo e Squazzo, 1994; Perez *et al.*, 1999). Vi sono dati contraddittori sul principale sito di produzione della forma $A\beta$ [1-42], se durante le prime fasi della catena sintetica intracellulare (cioè il reticolo endoplasmatico, il compartimento intermedio e le prime fasi del Golgi) oppure dopo che la APP abbia raggiunto la superficie cellulare. Alcune evidenze suggeriscono che i peptidi di $A\beta$, generati precocemente durante le fasi intracellulari, non siano destinati alla secrezione e vengano catabolizzati all'interno della cellula (Cook *et al.*, 1997). Tuttavia è probabile che la maggior parte dei peptidi di $A\beta$ siano invece destinati alla via secretoria. I livelli di $A\beta$ nel CSF umano sono compresi nell'intervallo 3-8 nM (Motter *et al.*, 1995), mentre la quantità plasmatica è generalmente minore di 500 pM. Sia la forma $A\beta$ [1-40] che $A\beta$ [1-42] possono essere identificate nel CSF e nel plasma. È stato dimostrato che i frammenti C99 e C83 (substrati della γ -secretasi) originano da molecole di APP completamente glicosilate (Haass *et al.*, 1995; Weidemann *et al.*, 1997), suggerendo che l'attività α , β e γ -secretasica avvenga principalmente sulla superficie cellulare od in prossimità di essa, probabilmente in gran parte durante il ricircolo endosomiale (Perez *et al.*, 1999).

Nella cellula neuronale, che esprime livelli di APP tra i più elevati dell'intero organismo (soprattutto APP695), la molecola APP può essere trasportata lungo l'assone sia in senso anterogrado, nella componente veloce del trasporto assonale (Koo *et al.*, 1990), sia in senso retrogrado verso il corpo cellulare ed essere, quindi, traslocata sulla superficie somatodendritica (Ichiara *et al.*, 1995). La APP è presente in vescicole nei terminali assonali, anche se non specificamente nelle vescicole sinaptiche. Nonostante sia stato ipotizzato che il terminale assonale sia uno dei siti principali di produzione della $A\beta$, non esistono ancora prove definitive al riguardo, essendo tutt'altro che remota la possibilità che la produzione di $A\beta$ avvenga durante il ricircolo endosomiale in altri siti neuronali. Inoltre, nonostante il neurone esprima abbondantemente la APP e sia in grado di secernere $A\beta$ in notevole quantità (Haass *et al.*, 1992), anche altri stipiti cellulari nel tessuto cerebrale esprimono quantità variabili di APP (astrociti, microglia, cellule endoteliali e muscolari lisce) e potrebbero contribuire al processo di secrezione e deposizione della $A\beta$. Inoltre poiché in periferia

praticamente tutte le cellule esprimono APP e sono in grado di generare la A β , e poichè la A β è presente nel plasma, non è da escludere la possibilità che la A β sia in grado di superare la barriera ematoencefalica e depositarsi nel tessuto cerebrale. Vi sono evidenze della capacità della A β di superare in quantità ridotta la barriera ematoencefalica mediante un meccanismo di endocitosi mediato da recettori (Zlokovic, 1996; Poduslo *et al.*, 1997; Posuslo *et al.*, 1999). Della A β è stata provata una neurotossicità sia diretta che, soprattutto, indiretta, mediata da numerosi agenti infiammatori dopo attivazione della microglia.

Sono state proposte numerose funzioni per la famiglia di proteine della APP (*APP like proteins*: APPLPs) e dei suoi derivati principali (α -APPs): in particolare α -APPs sembra avere proprietà autocrine (Saitoh *et al.*, 1989) ed essere in grado di agire come fattore neuroprotettivo e probabilmente anche neurotrofico (Mattson *et al.*, 1992; Mattson *et al.*, 1993). Le isoforme di APP con 751 e 770 residui (contenenti il dominio KPI -inibitore della serina proteasi; Tanzi *et al.*, 1988) sono in grado, negli studi *in vitro*, di inibire enzimi con proprietà serina proteasiche come la tripsina e la chimotripsina (Sinha *et al.*, 1990); inoltre inibiscono il fattore IXa nella cascata coagulativa. Le isoforme secrete di APP possono conferire proprietà adesive cellula - cellula e cellula - substrato in coltura (Schubert *et al.*, 1989). È stato suggerito sulla base dei risultati di studi *in vitro* che la APP inserita nella membrana plasmatica possa avere un ruolo nelle interazioni cellulari. Funzioni putative di APP includono anche la mediazione dello sviluppo neuronale (Kibbey MC *et al.*, 1993; Milward *et al.*, 1992; Small *et al.*, 1994) ed effetti neuroprotettivi, mediati dalla capacità di legare e ridurre Cu²⁺ (Multhaup *et al.*, 1996; White *et al.*, 1999). Più recentemente, è stato identificato un coinvolgimento di APP nel traffico assonale vescicolare (Zheng P *et al.*, 1998); inoltre, Goldstein e collaboratori hanno scoperto un'interazione diretta di APP con la chinesina convenzionale (*kinesin I*), suggerendo per APP la funzione di carico del motore cellulare (Kamal *et al.*, 2000). Tale scoperta dimostra un legame diretto di APP con il sistema di trasporto associato ai microtubuli; pertanto un'anomala interazione APP-chinesina potrebbe giocare un ruolo nell'insorgenza di AD, probabilmente interferendo con il normale trasporto assonico. Infine non vi sono evidenze che nei soggetti affetti da AD vi sia una perdita di funzione della APP; viceversa sembra più probabile che mutazioni conferiscano alla APP proprietà tossiche, incrementando la produzione del frammento A β , potenzialmente citotossico.

Probabilmente l'accumulo di A β è solo il punto di confluenza cui giungono vie patogenetiche diverse. Molte ipotesi sono state formulate: alcune propendono per un'eccessiva produzione di A β , altre per un ridotto catabolismo del precursore, che provocherebbe la formazione e

l'accumulo di molecole con la spontanea tendenza ad aggregarsi (per ridotta attività degli enzimi del catabolismo o a causa di mutazioni della APP che ne ostacolano il metabolismo). Secondo alcuni Autori (Teller *et al.*, 1996) nei soggetti sani la forma A β 1-42 non si accumulerebbe grazie ad una più rapida *clearance*. La glicazione della molecola di A β può facilitarne l'aggregazione, rendendola più resistente alle proteasi e meno solubile (Tabaton *et al.*, 1997). Anche la genetica di AD sembra non deporre a favore di una disfunzione della APP, dal momento che, fatta eccezione per alcune mutazioni missenso nel gene di APP che segregano con AD in 0.1% dei casi di AD familiare (FAD), le altre mutazioni o polimorfismi associati ad AD riguardano proteine quali le preseniline 1 e 2 (PS1 e PS2), l'isoforma ϵ 4 dell'apolipoproteina E e l' α 2-macroglobulina (A2M).

1.4. Gomitoli Neurofibrillari

Sono costituiti da masse di filamenti anormali di forma globosa o a fiamma, situate a livello del citoplasma perinucleare, che spesso si estendono sino ai dendriti apicali e che al microscopio ottico presentano una struttura fibrillare (Fig. 1.4.1.).

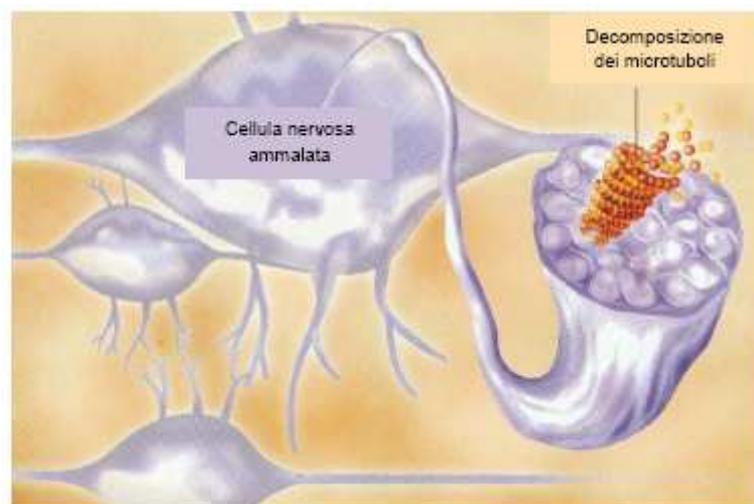


FIGURA 1.4.1. Formazione di matasse neurofibrillari con destabilizzazione dei microtubuli e trasporto del segnale indebolito.

Le matasse si formano in neuroni di grandi dimensioni come nell'ippocampo, corteccia olfattiva, amigdala, nuclei del proencefalo basale e parecchi nuclei del tronco (anche *locus coeruleus* e del *rafe*). Sono visibili come strutture basofile con l'ematossilina-eosina, ma si colorano fortemente con i metodi all'argento (Bielschowsky).

Ogni filamento consiste in due fibrille disposte ad elica ed è formato principalmente dalla proteina tau (Pollock *et al.*, 1986), proteina assonica capace di co-polimerizzare con la

tubulina, promuovendo l'assemblaggio dei microtubuli. Nei neuroni maturi essa è localizzata prevalentemente a livello somato-neurite: la tau del corpo cellulare risulta maggiormente fosforilata di quella assonale (Uberty *et al.*, 1997a; 1997 b; Fig. 1.4.2.).

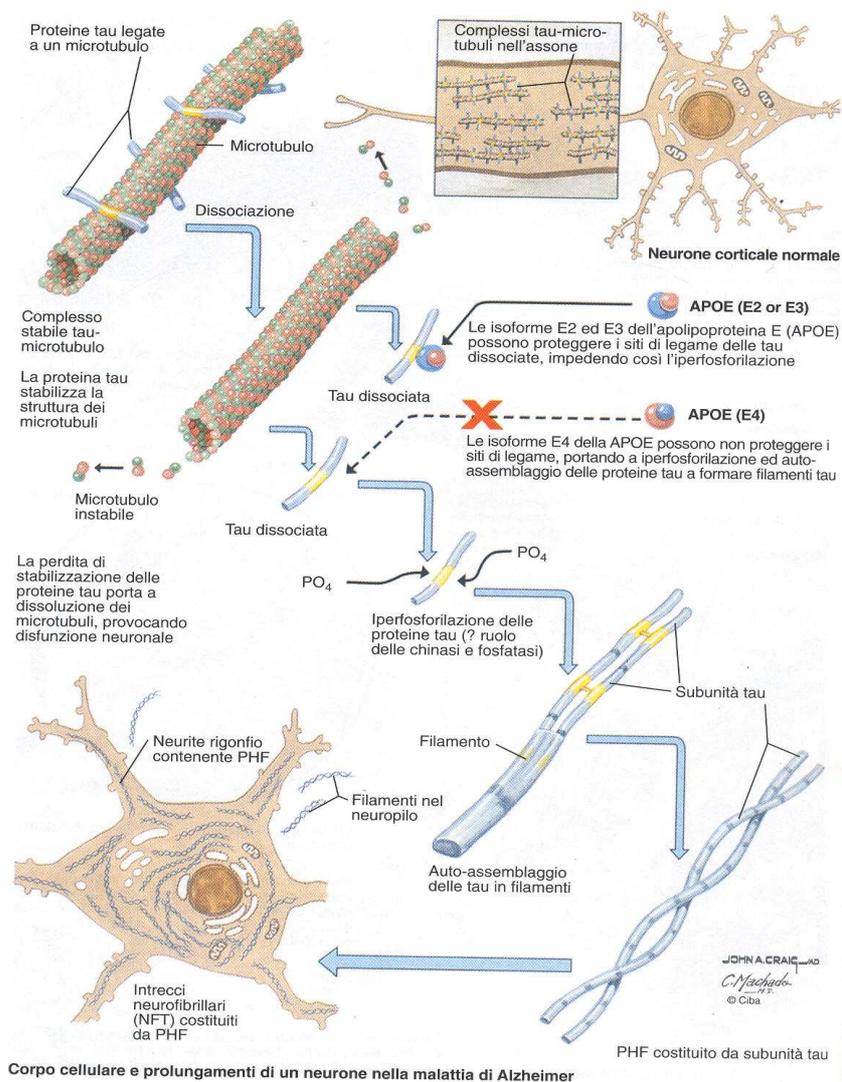


FIGURA 1.4.2. Filamenti appaiati ad elica (PHF) dei gomitoli neurofibrillari nella malattia di Alzheimer.

La maggior parte di queste fibre (di dimensione ~10 nm) consistono in coppie di filamenti elicoidali (paired helical filaments PHF) con un periodo pari a ~160 nm. *In vitro* numerose chinasi sono in grado di fosforilare la proteina tau in vari siti (Goedert *et al.*, 1986; Illenberger *et al.*, 1998), tuttavia non è ancora chiaro quante e quali chinasi siano responsabili *in vivo* nell'iniziare il processo di iperfosforilazione, che conduce alla dissociazione della proteina tau dai tubuli e alla sua aggregazione in filamenti elicoidali appaiati insolubili. Negli ammassi neurofibrillari, associate alla proteina tau iperfosforilata si localizzano altre proteine anomale, quali l'ubiquitina, la proteina associata ai microtubuli e una proteina dei neurofilamenti.

La proteina tau patologica è insolubile ed è presente in più isoforme; vengono, infatti, riespresse delle forme fetali normalmente assenti nell'adulto (Goedert *et al.*, 1992). Essa, inoltre, risulta glicosilata, glicata e abnormemente fosforilata (Grundke-Iqbal *et al.*, 1986; Lee *et al.*, 1991; Kanemaru *et al.*, 1992; Yan *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1996). La glicosilazione sarebbe importante nel mantenere la struttura a filamenti elicoidali appaiati; mentre la glicazione (si differenzia dalla precedente per l'assenza di reazione enzimatica) indurrebbe stress ossidativo. La modificazione più importante è, tuttavia, l'iperfosforilazione per azione di A β 42, che induce l'attivazione della Cdk5 (*Cyclin-dependent kinase 5*): in questo stato è compromesso sia il corretto assemblaggio dei microtubuli sia il trasporto assonale (Lee e Tsai, 2003) e viene sequestrata la tau normale, con formazione degli ammassi neurofibrillari. Contemporaneamente, i microtubuli si disgregano ed il blocco dei trasporti retrogrado ed anterogrado lungo gli assoni è prevedibilmente responsabile dell'accumulo di componenti neuronali e della conseguente morte cellulare. L'anomala iperfosforilazione di tau osservata in AD sembra coinvolgere anche un'altra proteina chinasi: GSK3 β (*glycogen synthase kinase*); alcuni ricercatori ipotizzano una sinergia tra Cdk5 (iniziale fosforilazione) e GSK3 (ulteriori modificazioni) nel prevenire la fisiologica incorporazione di tau nel sistema microtubulare (Sengupta A *et al.*, 1997). È stato inoltre dimostrato che l'utilizzo di inibitori di Cdk5 e GSK3 β su cellule ippocampali di ratto esercita protezione contro la morte neuronale (Alvarez A *et al.*, 2001).

Le due lesioni classiche dell'AD possono essere presenti indipendentemente l'una dall'altra; ammassi neurofibrillari molto simili o addirittura indistinguibili da quelli riscontrati nell'AD sono stati descritti in più di una dozzina di altre patologie neurodegenerative (es. panencefalite sclerosante subacuta, malattia di Kuf, paralisi sopranucleare progressiva), quasi in tutti i casi in assenza di depositi di A β o placche senili. Il fatto che gli NFT siano riscontrabili in un'ampia varietà di insulti neuronali, suggerisce che la loro formazione in AD rappresenti una risposta citologica dei neuroni al graduale accumulo di A β .

Inoltre, depositi di A β possono essere riscontrati nella corteccia cerebrale di anziani cognitivamente normali in assenza di ammassi neurofibrillari; si osservano anche rare forme di AD definite "tangle poor", caratterizzate da abbondanti placche neuritiche e ridotta densità di NFT nella neocorteccia (Terry RD *et al.*, 1987).

1.5. Eziopatogenesi

Non si conosce una causa della malattia; tuttavia, gli ultimi studi propendono per un'origine multifattoriale, vale a dire che viene riconosciuta una concomitanza di cause. Pertanto, sono state proposte varie ipotesi concernenti l'eziologia della AD (Tab.1.5.1).

Factor	RR/OR-Ratio (95% CI)	Reference
1. Family history of Dementia	OR 3.5 (2.6–4.6) OR 2.62 (1.53–4.51)	Van Duijn et al., 1991 Canadian Study
2. Family history of M. Parkinson	OR 2.4 (1.0–5.8) OR 0.86 (0.28–2.61)	Van Duijn et al., 1991 Canadian Study
3. Family history of Down Syndrome	RR 2.7 (1.2–5.7)	Van Duijn et al., 1991
4. Maternal age at birth > 40 ys 15–19 ys	RR 1.7 (1.0–2.9) RR 1.5 (0.8–3.0)	Rocca et al., 1991 Rocca et al., 1991
1. Head trauma	RR 1.82 (1.20–2.67)	Mortimer et al., 1991
2. Depression	RR 1.82 (1.16–2.86) OR 0.87 (0.46–1.67) RR 2.94 (1.76–4.91)	Jorm et al., 1991 Canadian Study Devanand et al., 1996
3. Education and occupation	RR 2.0–3.2 (1.3–4.1, 2.2–4.6) OR 4.00 (2.49–6.43) RR 1.18 (0.61–2.27)	Ott et al., 1995 Canadian Study Yoshitake et al., 1995
4. Vaskular risk factors		
Severe atherosclerosis	OR 3.0 (1.5–6.0)	Hofman et al., 1997
Diabetes	RR 2.18 (0.97–4.90)	Yoshitake et al., 1995
5. Hypothyreosis	RR 2.3 (1.0–5.4)	Breteler et al., 1991
6. Exposition to toxic substances		
Adhesives	OR 2.16 (1.25–3.70)	Canadian Study
Pesticides	OR 2.17 (1.18–3.99)	Canadian Study
Solvents	OR 2.3 (1.1–4.7)	Kukull et al., 1995
7. Alcohol abuse	no increase of RR	Graves et al., 1991

TABELLA 1.5.1. Elenco dei principali fattori di rischio della AD (Hock e Müller-Spahn, 1999).

1.5.1. Ipotesi ereditaria

Oltre all'età avanzata, una storia familiare positiva rappresenta il principale fattore di rischio per la malattia. Alcuni studi epidemiologici hanno evidenziato che il rischio di sviluppare la malattia aumenta da tre a quattro volte nei soggetti che hanno un familiare di primo grado affetto da tale patologia (Plassman & Breitner, 1996). Gli studi sui gemelli indicano che i monozigoti mostrano una concordanza del 40-50%, mentre per i dizigoti le percentuali variano entro un *range* compreso tra il 10% e il 50% (Small *et al.*, 1993). Quest'ultimo dato sottolinea l'importanza dell'associazione tra fattori genetici e cause ambientali (Raiha *et al.*, 1996).

Studi genetici di *linkage* hanno dimostrato che in alcuni casi di AD ad insorgenza precoce vi è una mutazione a carico del gene della APP (braccio lungo del cromosoma 21) o dei geni che

codificano per la presenilina 1 (PS1) e la presenilina 2 (PS2; rispettivamente cromosomi 14 e 1; Fratiglioni *et al.*, 1993; Hutton *et al.*, 1998). Queste mutazioni si trovano nella maggioranza delle linee familiari di malattia di AD ad insorgenza precoce (Tab.1.5.1.1 e Fig. 1.5.1.1). Circa il 5% delle forme di AD sono geneticamente determinate.

Locus	Defect	Chrom.	duration of disease (yrs)	%AD	%FAD	Gen. product
n.k.	Trisomie	Chr. 21	30-50			APP
AD1	Mutations	Chr. 21	45-65	< 1	< 5	APP
AD3	Mutations	Chr. 14	30-60	< 5	50-8	PS1
AD4	Mutations	Chr. 1	40-70	< 1	5-10?	PS2
AD2	Polymorph.	Chr. 19	> 60	?	?	ApoE4

TABELLA 1.5.1.1. Fattori genetici attualmente riconosciuti per la AD. Sono riportate le principali varianti genetiche delle forme sporadiche e familiari di AD.

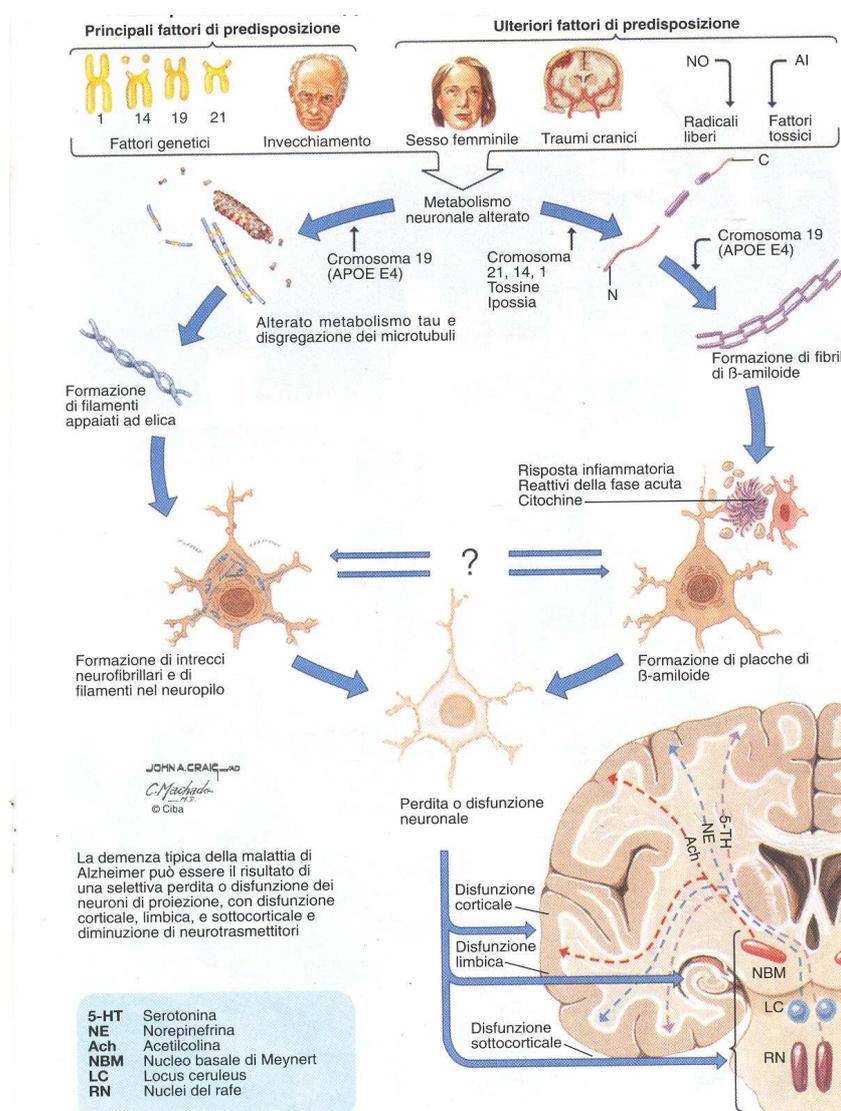


FIGURA 1.5.1.1. Fattori possibili nello sviluppo e nella progressione della malattia di Alzheimer.

• Forme familiari legate al cromosoma 21

Il primo gene associato ad AD ad essere identificato fu quello codificante per il precursore di $A\beta$, localizzato sul cromosoma 21; esso correla con la sindrome AD in due modi: sia per aumentato dosaggio genico nella trisomia del 21 (Sindrome di Down), sia per mutazioni missenso che incrementano i tagli “amiloidogenici” di APP (risultanti in eccessiva produzione di $A\beta_{40}$ ed $A\beta_{42}$) operati da β e γ -secretasi (Fig. 1.5.1.2)

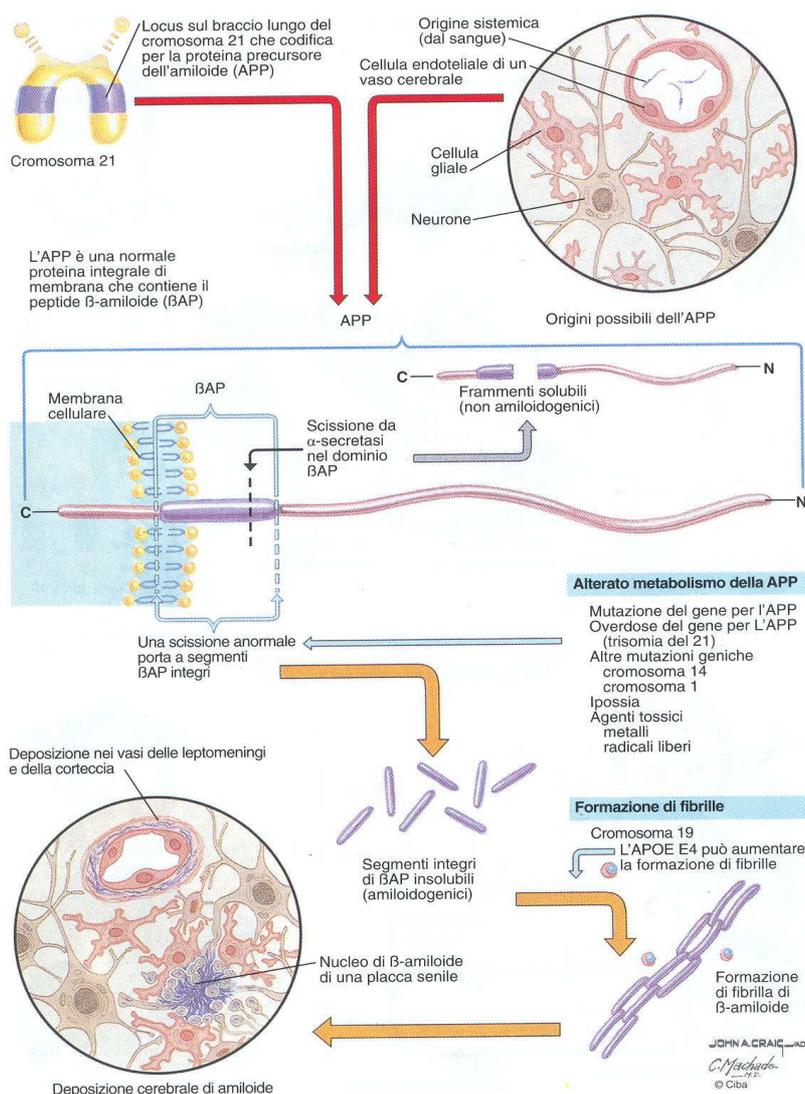


FIGURA 1.5.1.2. Amiloidogenesi nella malattia di Alzheimer.

Il coinvolgimento del cromosoma 21 è apparso subito interessante anche per un altro motivo: un eccesso di superossidodismutasi (SOD), enzima codificato dal cromosoma 21, provocherebbe accumulo di radicali tossici dell'ossigeno. L'overespressione cronica di APP e di SOD e la concomitante overproduzione dei peptidi $A\beta_{40}$ ed $A\beta_{42}$ è ritenuta responsabile della precoce comparsa nei soggetti Down delle placche diffuse (composte quasi esclusivamente da $A\beta_{42}$), che appaiono già all'età di 12 anni (Tokuda T *et al.*, 1997).

Attualmente sono conosciute nove mutazioni missenso di tipo dominante nel gene APP associate ad AD familiare (FAD); esse clusterizzano nel sito di taglio delle β -secretasi ("Swedish" APP mutation), ed in prossimità dei siti di taglio α e γ -secretasi. Recentemente il gruppo di Tagliavini ha identificato una nuova mutazione nel gene di APP di tipo recessivo, la quale agisce con un effetto dominante negativo sull'amiloidogenesi (Di Fede *et al.*, 2009).

- Forme familiari legate ai cromosomi 14 e 1

Più di 70 mutazioni missenso sono state identificate nei geni codificanti per due proteine altamente omologhe, presenilina 1 e 2 (PS1 e PS2), localizzate rispettivamente sul cromosoma 14 e 1. Tali mutazioni, a penetranza incompleta, risultano in una forma di AD aggressiva ed ad esordio precoce (età d'esordio: 40-60 anni) (Sherrington *et al.*, 1995; Levy-Lahad *et al.*, 1995). L'abilità delle mutazioni di PS1 e PS2 nell'istaurare un selettivo aumento di deposizione della forma $A\beta_{42}$ è stata dimostrata in pazienti AD con tali mutazioni (Mann *et al.*, 1996 ; Fig. 1.5.1.3).

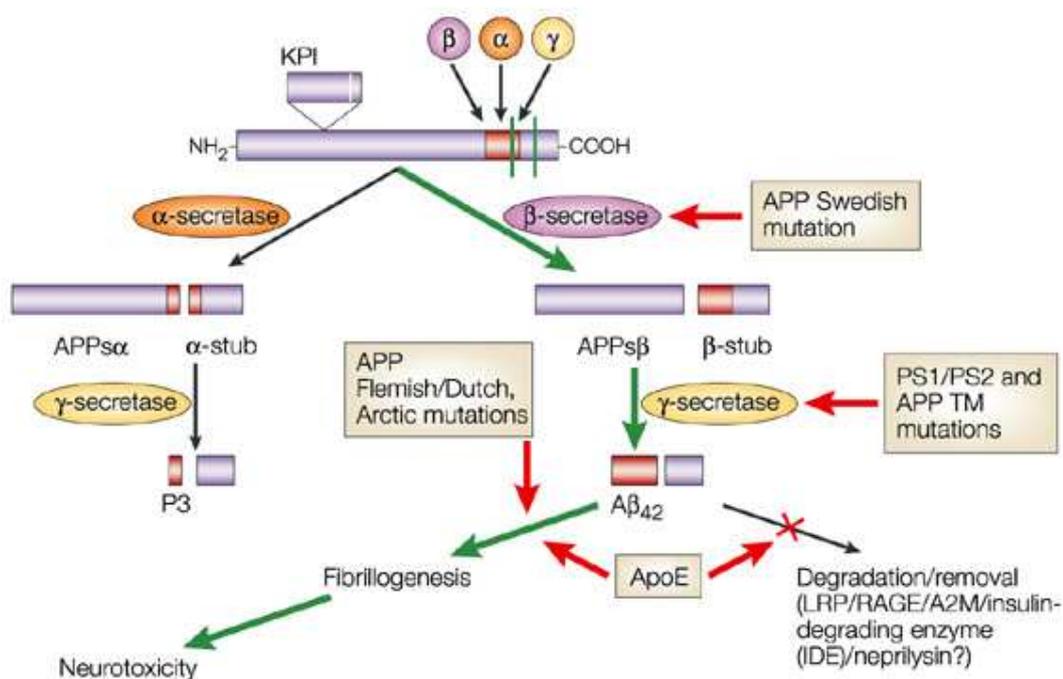


FIGURA 1.5.1.3. Processamento di APP ad opera degli enzimi α -, β - e γ -secretasi. Ruolo delle mutazioni nei geni di APP e di preseniline (PS) e del polimorfismo ApoE4 nella fibrillogenesi dei peptidi $A\beta$.

Le preseniline sono proteine di membrana politopiche a espressione ubiquitaria, localizzate principalmente a livello del reticolo endoplasmico e delle vescicole di Golgi, ma presenti in modesta percentuale anche sulla superficie cellulare; esse sono altamente conservate e si sono rivelate essenziali per il clivaggio fisiologico del recettore Notch, in seguito al legame con il suo ligando extracellulare (De Stropper *et al.*, 1999). Tale associazione assegna alle

preseniline un ruolo fisiologico d'interesse in numerosi processi cellulari, dal momento che il signaling di Notch ricopre una funzione importante negli eventi di specializzazione cellulare, sia dentro che fuori il SNC (Selkoe *et al.*, 2000). Di notevole riguardo è la scoperta che topi *knock-out* per PS1 mostrano una sostanziale riduzione di A β , dovuta al blocco dell'attività γ -secretasica su APP. La modalità con cui le preseniline regolino il clivaggio di APP, od altri substrati, rimane oggetto di dibattito. Una teoria suggerisce che le PS giochino un ruolo nel traffico cellulare di proteine, quali APP e/o γ -secretasi, garantendone una corretta distribuzione a livello delle membrane cellulari (Naruse *et al.*, 1998); un'ipotesi alternativa vede le PS direttamente coinvolte nel clivaggio di APP da parte delle γ -secretasi, ma ciò richiederebbe un'interazione fisica tra APP e PS non ancora verificata. In tale contesto è stato proposto che le PS possano svolgere un ruolo di cofattori delle γ -secretasi od essere addirittura essi stessi tali enzimi (Wolfe *et al.*, 1999).

- A β clearance e Polimorfismi in linkage con AD

La maggioranza degli studi si è focalizzata sull'identificazione dei meccanismi cellulari di formazione di A β e degli enzimi secretasi, mentre poca attenzione è stata rivolta alla comprensione del metabolismo e degradazione di A β .

Un altro gene sembra essere correlato con l'AD: vi è una variante genetica del gene 19 (denominata ApoE- ϵ 4) presente nel 15% della popolazione sana, ma nel 50% della popolazione affetta da AD.

L'apolipoproteina E (Apo E) è una lipoproteina polimorfica codificata da tre alleli (ϵ 2, ϵ 3, ϵ 4), che è espressa prevalentemente, a livello cerebrale, nella glia e che riveste un ruolo fondamentale nella mobilizzazione e nella redistribuzione del colesterolo nell'ambito dei processi di riparazione e crescita della mielina e delle membrane neuronali (Weisgraber e Mahley, 1996). L'allele ϵ 4 è considerato un fattore genetico di rischio della AD (Saunders *et al.*, 1993) e nel cervello l'Apo E si ritrova in corrispondenza della degenerazione neurofibrillare e delle placche senili, insieme con la A β , con la quale interagisce, aumentandone così la tossicità. Tutto ciò, insieme con l'esistenza di una correlazione fra l'estensione dei depositi amiloidei e la frequenza di questa forma allelica, ha suggerito che l'ApoE influenzi l'amiloidogenesi cerebrale e, quindi, possa mediare l'eliminazione di A β solubile nell'encefalo (Schmechel *et al.*, 1993). Fisiologicamente l'ApoE sequestra la A β solubile, favorendone la degradazione da parte di proteasi. Nell'AD, al contrario, il legame ApoE- A β diventa instabile e parte della A β si separa dal complesso, accumulandosi in forma libera fino al livello di polimerizzazione. A questo stadio, pertanto, il complesso ApoE-A β 42

passa dalla forma solubile a quella insolubile e partecipa al processo di formazione dell'amiloide. Una minor quantità fisiologica di ApoE è stata evidenziata nel plasma e nel *liquor* di soggetti omozigoti $\epsilon 4$ (Gregg *et al.*, 1986). È quindi possibile che questa minor espressione e produzione cerebrale dell'isoforma 4 giustifichi la sua minor efficienza nell'eliminare la A β dall'encefalo. L'allele $\epsilon 4$, in conclusione, sottende l'accumulo di A β da alterato smaltimento, dovuto alla minor efficienza dell'isoforma corrispondente di ApoE nell'eliminazione della A β solubile cerebrale.

Recentemente, è stato segnalato un nuovo polimorfismo associato ad AD localizzato nel gene codificante per $\alpha 2$ -macroglobulina, una proteina multi-funzionale con proprietà inibitorie verso alcune proteasi (Blacker *et al.*, 1998). Tale proteina risulta coinvolta nel metabolismo di A β dal momento che è in grado di legare LRP (low-density lipoprotein-related receptor), responsabile dell'uptake di A β mediato anche da ApoE.

La deposizione di A β evoca una risposta infiammatoria mediata dalla microglia, la quale, se da un lato contribuisce alla neurodegenerazione (attivazione microgliale esacerbata e cronica), dall'altro lato partecipa alla *clearance* dei depositi amiloidogenici; come suggerito da esperimenti su modelli animali in cui l'overespressione di TGF- $\beta 1$, attivatore microgliale, riduce le placche amiloidi (Wiss-Coray *et al.*, 2001).

Tutti gli studi sul catabolismo di A β convergono sul coinvolgimento delle metalloproteasi nella degradazione dei peptidi amiloidi. Tra questi enzimi i più studiati sono l'enzima di degradazione dell'insulina (IDE, *insulin-degrading enzyme*), il cui gene (situato sul cromosoma 10) si trova in linkage con AD (Ertekin-Taner *et al.*, 2000) e la neprilisina dimostratasi capace di degradare A $\beta 42$ esogena, somministrata in perfusione nel cervello di ratto (Iwata *et al.*, 2000).

1.5.2. Ipotesi tossica dell'alluminio

Sono stati riscontrati elevati livelli di alluminio nel cervello di persone affette da AD (Zapatero *et al.*, 1995; Deloncle *et al.*, 1995). Si discute sulla possibilità che l'alluminio possa essere implicato nella patologia della malattia (Shin *et al.*, 1994; 1995; Corrigan *et al.*, 1993). Tale ipotesi è stata suggerita dall'evidenza sperimentale che l'iniezione di alluminio nel coniglio induca la comparsa di degenerazione neurofibrillare, soprattutto in determinate aree cerebrali.

Tuttavia, non tutte le specie animali reagiscono allo stesso modo e inoltre, la degenerazione neurofibrillare indotta dall'alluminio è differente da quella presente in AD, in quanto è costituita da grovigli di neurofilamenti chimicamente e morfologicamente nonnali.

Infine, non vi sono prove dirette che la demenza sia causata da una forma di intossicazione da alluminio, anche se alcuni studi epidemiologici hanno documentato una debole associazione tra AD ed utilizzo di antiacidi contenenti sali di alluminio.

1.5.3. Ipotesi Immunitaria

Secondo questa ipotesi con AD si svilupperebbe una reazione autoimmunitaria contro specifiche strutture del SNC implicate anatomopatologicamente nella patogenesi della AD (neuroni colinergici del nucleo di Meynert, placca neuritica). Infatti, nei pazienti affetti da AD si riscontrano elevati titoli di anticorpi, che attaccano selettivamente i neuroni colinergici, contro cellule prolattina-secerenti ed anti-neurofilamenti.

Secondo alcuni Autori la produzione di autoanticorpi costituirebbe un epifenomeno nell'ambito degli eventi patogenetici della AD (smascheramento di epitopi nascosti al sistema immunitario).

1.5.4. Ipotesi della Barriera Ematoencefalica

Secondo alcuni Autori un'alterazione della permeabilità della barriera ematoencefalica permetterebbe a sostanze tossiche di penetrare nel SNC e di danneggiare i neuroni.

1.5.5. Ipotesi Virale

Come già proposto per altre malattie neurologiche (per es., la sclerosi multipla), non si può escludere che la AD abbia origine virale, anche se non vi sono prove sperimentali a favore di questa ipotesi.

1.5.6. Altri fattori causali

Esistono altri fattori di rischio per AD, considerati "probabili": sono il livello di scolarizzazione, patologie vascolari, alcune esposizioni occupazionali o ambientali (solventi organici, campi magnetici, lavori manuali), il fumo, la depressione, i traumi cranici, l'abuso di alcool (Zubenko *et al.*, 1990; Fratiglioni *et al.*, 1993; Mayeux *et al.*, 1995; Sobel *et al.*, 1995; Jacqmin-Gadda *et al.*, 1996; Skoog *et al.*, 1996; Kukull *et al.*, 1996; De Ronchi *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2004).

Vengono riconosciuti, invece, come fattori protettivi i farmaci antinfiammatori non steroidei (FANS; che determinano un'inibizione dei meccanismi infiammatori implicati nella patogenesi dell'AD), gli estrogeni (che inducono un aumento della sinaptogenesi nelle cellule piramidali ippocampali CA1 ed una riduzione della deposizione di β -amiloide) ed il moderato consumo di vino (McGeer *et al.*, 1996; Birge, 1997; Orgogozo *et al.*, 1997).

1.6. Diagnosi

La fase diagnostica nella valutazione di un soggetto con apparenti disturbi cognitivi inizia con l'indagine anamnestica, indagando le eventuali difficoltà relative alla memoria ed agli altri ambiti cognitivi e le loro ripercussioni sulla vita di tutti i giorni (indagine ecologica). Se i sospetti si cominciano a delineare chiaramente, il passo successivo è un'indagine neuropsicologica, che ha lo scopo di confermare o meno i sospetti, analizzarli nei diversi ambiti cognitivi e cercare di quantificarli, offrendo così un utile elemento diagnostico ed un parametro confrontabile nel tempo, per poter effettuare l'indispensabile *follow-up*. Appurata l'esistenza del disturbo cognitivo, il clinico deve escludere le forme secondarie con le idonee indagini strumentali e con un'accurata obiettività clinica. Se tutti i dati convergono verso una forma di decadimento cognitivo primitivo, l'analisi dell'andamento temporale e dei settori neuropsicologici più compromessi può indirizzare verso la corretta diagnosi clinica con l'identificazione del tipo di patologia specifica da cui si ritiene sia affetto il paziente.

L'unica diagnosi certa di AD è però quella istopatologica, anche se elevati livelli di sensibilità e specificità sono stati raggiunti mediante la messa a punto di criteri di diagnosi clinica universalmente accettati. Il sintomo iniziale ed essenziale per porre diagnosi di AD secondo i criteri NINCDS – ADRDA (*National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke – Alzheimer's Disease and Related Disorders Association Work Group*; Blacker D. *et al.*, 1994; Tab 1.6.1) e DSM IV (McKhann *et al.*, 1984), è il *deficit* di memoria, cui deve essere associata la compromissione almeno di un'altra area cognitiva (orientamento spazio-temporale, ragionamento astratto, capacità di giudizio, linguaggio, calcolo, prassia, gnosis, abilità visuo-spaziali e costruttive). L'utilizzo di tali criteri porta, quindi, a porre diagnosi di AD probabile o possibile (McKhann *et al.*, 1984).

Table 1 NINCDS-criteria of Alzheimer's disease

-
- dementia established by clinical examination and documented by the MMS, BDS, or some similar examination, and confirmed by neuropsychological tests
 - deficits in two or more areas of cognition
 - progressive worsening of memory and other cognitive function
 - no disturbance of consciousness
 - onset between age of 40 and 90, most often after the age 65; and
 - absence of systemic disorders or other brain diseases that in and of themselves could account for the progressive deficits memory and cognition
-

TABELLA 1.6.1. Criteri diagnostici secondo NINCDS per la malattia di Alzheimer.

La diagnosi di AD “probabile” si basa sul riscontro di: deterioramento mentale stabilito clinicamente e mediante tests neuropsicologici, *deficit* in due o più aree cognitive, tra cui la memoria, assenza di alterazione della coscienza, inizio dei sintomi dopo i 40 anni, esordio insidioso, decorso progressivo ed esclusione di altre patologie capaci di compromettere le funzioni cognitive.

La diagnosi di AD “possibile” è riservata alle forme con caratteristiche cliniche atipiche (insorgenza brusca, segni neurologici focali, incoordinazione motoria precoce, crisi epilettiche precoci) o con malattie sistemiche o cerebrali coesistenti, che tuttavia non si ritiene possano essere causa della demenza. Oggi si tende a formulare diagnosi di AD in tutti quei casi in cui, nonostante le sovrapposizioni, i criteri per la malattia di AD siano sufficienti a giustificare la clinica.

Mentre il ruolo dei test è abbastanza secondario rispetto agli esami neuroradiologici nel caso della diagnosi differenziale tra AD e demenze vascolari, o rispetto allo stesso esame clinico per la diagnosi differenziale tra AD e “demenze sottocorticali” (ad es., morbo di Parkinson, malattia di Huntington), un'area di notevole importanza è costituita dalla diagnosi differenziale tra AD e demenza fronto-temporale (FTD). In una serie di studi comparativi è stato possibile dimostrare un differente profilo di prestazioni in pazienti con diagnosi clinica di AD ed FTD (Binetti *et al.*, 1998; Cappa *et al.*, 1998) (Tab.1.6.2).

I. Cerebral neuronal degenerations	Alzheimer's disease Spectrum of frontotemporal lobe dementias Dementia and parkinsonism (dementia with Lewy Bodies, DLB) Other system degenerations
II. Acquired cerebral disorders	Vascular dementias Multiple sclerosis Intracranial neoplasms (meningioma) Head trauma (incl. subdural hematoma) Hydrocephalus Transmissible spongiform encephalopathies (e.g., CJD)
III. Other systemic disorders	Metabolic disorders malnutrition Vit. B12 deficiency Infections (HIV) Neurosyphilis Viral encephalitis
IV. Psychiatric disorders	Major depression Delirium Abuse of alcohol, drugs

TABELLA 1.6.2. Diagnosi differenziale delle varie forme di deterioramento cognitivo.

Una variante della AD recentemente descritta, è rappresentata dalla demenza associata ai corpi corticali di Lewy, che rappresenta circa il 20% di tutti i casi di demenza. Le caratteristiche cliniche di questa malattia comprendono esecuzioni cognitive fluttuanti con episodi di confusione; allucinazioni visive relativamente precoci e persistenti o psicosi paranoide (manifestazioni che nella AD possono comparire in un secondo tempo), disturbi precoci dell'andatura ed ogni combinazione di rigidità, bradicinesia, tremore e postura flessa. A differenza dell'AD, i deficit cognitivi, compresi i disordini della memoria, sono meno importanti nelle fasi precoci della malattia.

Le tecniche di *neuroimaging* assumono un ruolo importante nell'*iter* diagnostico delle demenze e dell'AD, da un lato escludendo patologie e condizioni in grado di generare un quadro sindromico simile, quali tumori cerebrali, ematomi sottodurali, idrocefalo e lesioni ischemiche, dall'altro evidenziando un quadro di atrofia che, sebbene non specifico, è di aiuto nel formulare la diagnosi. La tomografia computerizzata (TC) e la risonanza magnetica (RM), infatti, sono in grado di dimostrare nei pazienti in fase avanzata una dilatazione dei ventricoli laterali e del terzo ventricolo fino al doppio delle dimensioni normali, nonché un ampliamento dei solchi corticali; la RM in sezione sottile dimostra una sproporzionata atrofia degli ippocampi ed un allargamento dei corni temporali dei ventricoli laterali. (Fig. 1.6.1)

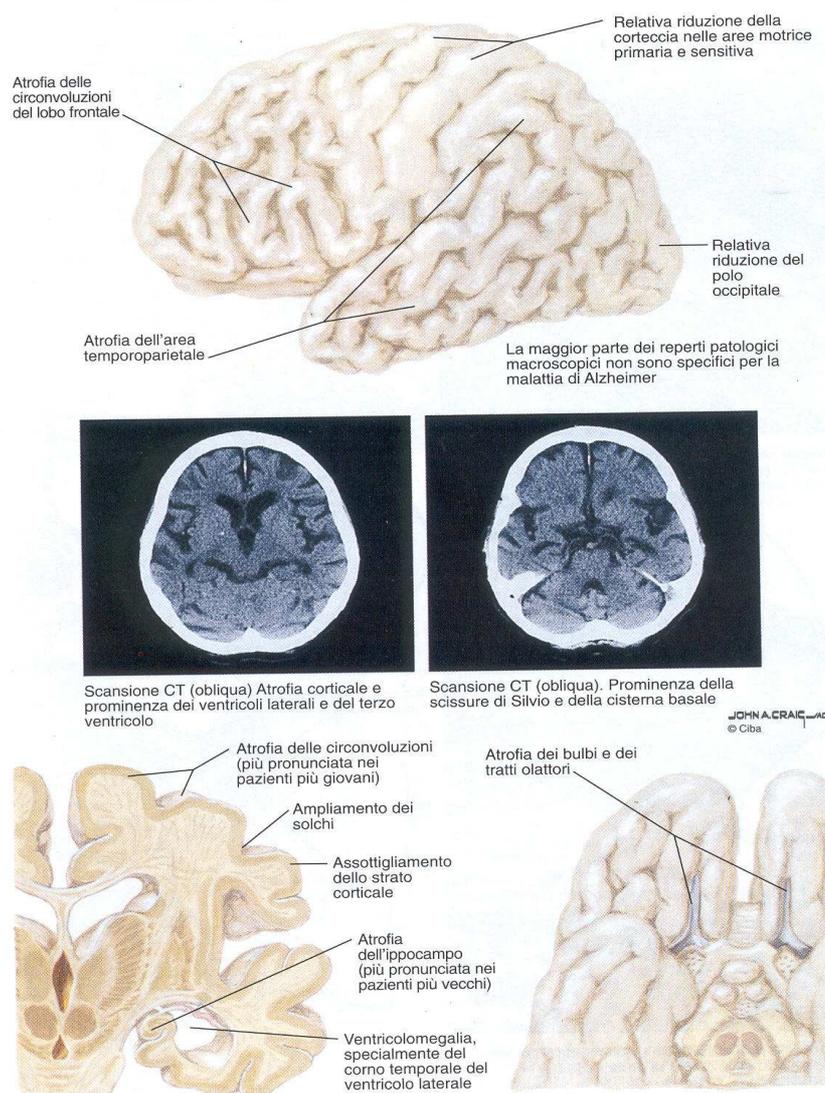


FIGURA 1.6.1. Aspetti patologici macroscopici nella malattia di Alzheimer.

Nelle fasi precoci della malattia, invece, le alterazioni spesso non sono distinguibili da quelle che si osservano in anziani con funzioni cognitive inalterate; infatti un certo grado di atrofia cerebrale è presente anche nell'invecchiamento normale e la differenza con i quadri di AD è di tipo puramente quantitativo.

Le indagini neuroradiologiche funzionali, come PET (tomografia ad emissione di positroni) e SPECT (tomografia ad emissione di fotone singolo), che possiedono una maggiore specificità, rilevano rispettivamente un ipometabolismo ed un ipoafflusso nelle regioni associative temporo-parietali già nelle fasi precoci della malattia, con risparmio delle regioni sensitive e motorie primarie, dei gangli della base, del talamo e del cervelletto (Friedland *et al.*, 1983; Kuhl *et al.*, 1985). Il deficit di perfusione e metabolismo cerebrale presenta buona correlazione con le caratteristiche del deterioramento cognitivo del paziente. La presenza di asimmetria funzionale emisferica è frequente e si correla con le asimmetrie delle varie

compromissioni, che si osservano nelle valutazioni neuropsicologiche: un'alterazione prevalente dell'emisfero sinistro si accompagna a maggiori difficoltà nelle prove linguistiche, mentre i pazienti con opposta asimmetria si dimostrano deficitari soprattutto nelle prove visuoperceptive. La riduzione del metabolismo cerebrale non è una semplice conseguenza dell'atrofia, come dimostra la capacità di SPECT e PET di evidenziare aree a ridotto metabolismo ben prima che le modificazioni morfo-strutturali siano evidenti (Fig. 1.6.2.).

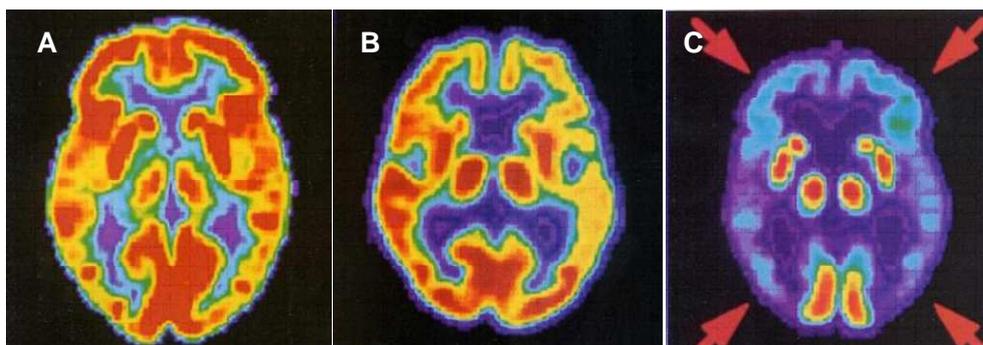


FIGURA 1.6.2. Immagine PET di un cervello alzheimeriano a vari stadi di malattia. A = demenza in fase iniziale; B = demenza moderata; C = demenza in stadio avanzato.

L'analisi convenzionale del *liquor* è normale, e solo occasionalmente si può evidenziare un lieve aumento delle proteine totali.

Durante le prime fasi diagnostiche è importante valutare attentamente la presenza di patologie internistiche capaci di rendere conto del quadro di deterioramento cognitivo, quali l'iper o ipotiroidismo, l'insufficienza epatica, renale o respiratoria, il diabete e l'ipertensione arteriosa con le loro complicanze, il *deficit* di acido folico o vitamina B12: tali quadri sistemici, come altre patologie neurologiche, tra cui l'idrocefalo normoteso, sono trattabili ed il decadimento cognitivo da essi determinato è, almeno parzialmente, reversibile. Sono inoltre da escludere l'abuso di alcolici o di altre sostanze (compresi i farmaci) e l'esposizione a tossici ambientali. Una corretta diagnosi è, inoltre, essenziale per determinare un trattamento mirato, una prognosi realistica ed i possibili rischi genetici (Geldmacher e Whitehouse, 1996).

Un altro possibile esame è l'elettroencefalogramma. Può servire per verificare eventuali alterazioni dell'attività elettroencefalica: nella AD si osserva generalmente un rallentamento del ritmo di fondo, con incremento dell'attività theta (θ) e delta (δ). Tuttavia, l'assenza di alterazioni elettroencefalografiche non esclude la diagnosi, in quanto vi è una notevole eterogeneità ed alcuni pazienti con AD possono non mostrare rallentamento del tracciato per diversi anni.

Anche un semplice esame del sangue, per verificare anemie o *deficit* biochimici, può essere utile.

Dal momento che i criteri clinici in uso non permettono né diagnosi precoce né differenziale di AD, e giacché l'efficacia terapeutica sarebbe maggiore se intervenisse prima dell'istaurarsi dei meccanismi neurodegenerativi, si fa sempre più urgente la necessità di disporre di *biomarkers*, capaci di fornire una diagnosi precoce e accurata di AD.

Ad oggi, secondo numerosi reports che affrontano la questione dei biomarkers in AD (Frank *et al.*, 2003; Shaw *et al.*, 2007), i livelli di tau totale (t-tau) ed A β misurati nel liquido cerebrospinale (CSF) sono identificati come i parametri biologici più promettenti ed informativi nella AD.

Aumentati livelli di tau nel *liquor* si ritiene siano associati al rilascio della proteina associata ai microtubuli tau (MAPT) da parte dei neuroni danneggiati, che circondano i grovigli neurofibrillari (*neurofibrillar tangles* o NFT) ed i neuriti distrofici, facenti parte della placca neuritica. Il valore predittivo degli elevati livelli di tau, riscontrati nella AD, risulta, però, avere poca importanza dal momento che questo referto si riscontra anche in altre forme dementigene (demenza a corpi di Lewy, FTD, morbo di Creutzfeld-Jacob, *stroke*; Arai *et al.*, 1995; Vigo-Pelfrey *et al.*, 1995).

Nel CSF di persone affette da AD sono rilevabili ridotti livelli di APP, anche se non è ancora stabilito sistematicamente se tale deficienza sia specifica per la AD (Lanfelt *et al.*, 1995; Almkvist *et al.*, 1997). La concentrazione di A β , infatti, sembra essere diminuita in pazienti con AD (Motter *et al.*, 1995), probabilmente come conseguenza di una diminuita eliminazione dal tessuto cerebrale, dovuta al deposito intraparenchimale del peptide.

La combinazione di aumentati livelli in CSF di t-tau e phosphotau (p-tau), forma fosforilata di tau, insieme a diminuita concentrazione di A β 42 è considerata un segno patologico distintivo, diagnostico per AD (Blennow *et al.*, 2003; Frank *et al.*, 2003; Sunderland *et al.*, 2003; deLeon *et al.*, 2006; Thal *et al.*, 2006; Shaw *et al.*, 2007; Vanderstichele *et al.*, 2008;). Recenti studi forniscono, inoltre, dati preliminari che suggeriscono che tale combinazione dei parametri appena descritti potrebbe essere un dato predittivo della conversione ad AD in soggetti con *mild cognitive impairment* (MCI; Hansonn *et al.*, 2006; Leslie *et al.*, 2009).

Allo stato dell'arte, la diagnosi clinica di AD probabile raggiunge il 90% dell'accuratezza usando moderni metodi clinici, neuropsicologici e di *imaging*; la sensibilità e specificità diagnostica negli stadi precoci della malattia migliorano grazie all'uso di *markers* nel CSF

(tau e peptidi A β) e markers plasmatici (es. rapporto A β -42/A β -40). Nonostante ciò, urge l'identificazione di test semplici, non invasivi per la diagnosi precoce di AD.

Recentemente, Jellinger e colleghi hanno identificato una nuova proteina: ALZAS (Alzheimer Associated Protein) di 79 ammino acidi (aa), contenente il frammento A β 42, il frammento transmembrana (TM) ed un frammento C-terminale di APP di 12 aa (non presenti in altri alleli noti di APP), il cui gene è localizzato sul cromosoma 21, all'interno della regione codificante per APP. ALZAS è espressa nelle regioni corticali ed ippocampali, così come nei linfociti dei pazienti AD. Test ELISA hanno evidenziato elevati titoli plasmatici della proteina antigenica in pazienti MCI, ma solo moderate concentrazioni in pazienti AD (confermati post-mortem); infine ridotti o addirittura assenti livelli del frammento C-terminale nei gruppi controllo giovani ed anziani (Jellinger *et al.*, 2008). Lo studio dimostra che ALZAS sia un affidabile *biomarker*, dotato della capacità di riflettere gli squilibri sia centrali che periferici in corso di AD. Si auspica una prossima applicazione come *marker* diagnostico periferico, non invasivo.

Anamnesi, *bioimaging* e valutazione neuropsicologica forniscono nel complesso delle indicazioni diagnostiche piuttosto precise, ma, come già detto in precedenza, l'unica diagnosi certa di AD è possibile solo *post-mortem*, attraverso l'autopsia. E' pertanto, importante, nella formulazione dell'ipotesi diagnostica, valutare la possibilità che il paziente sia affetto da forme patologiche diverse che presentano sintomi in parte simili.

1.6.1. Valutazione neuropsicologica e cognitiva

La valutazione neuropsicologica si avvale di una batteria di test per la misurazione del quadro cognitivo e dello *status* delle principali funzioni cognitive. Vengono prese in esame diverse funzioni: memoria a breve termine, memoria a lungo termine, funzioni attentive, funzioni verbali, funzioni percettive e prassiche, funzioni cognitive generali.

Il primo test che viene eseguito è, generalmente, il *Mini Mental State Examination* (MMSE) (Folstein *et al.*, 1985), una prova che in pochi minuti può fornire delle interessanti informazioni diagnostiche sullo stato cognitivo del paziente. Attraverso il MMSE è possibile valutare l'orientamento spaziale e temporale del paziente, il livello cognitivo, le funzioni prassiche, mnestiche e grafiche (Fig. 1.6.1.1.).

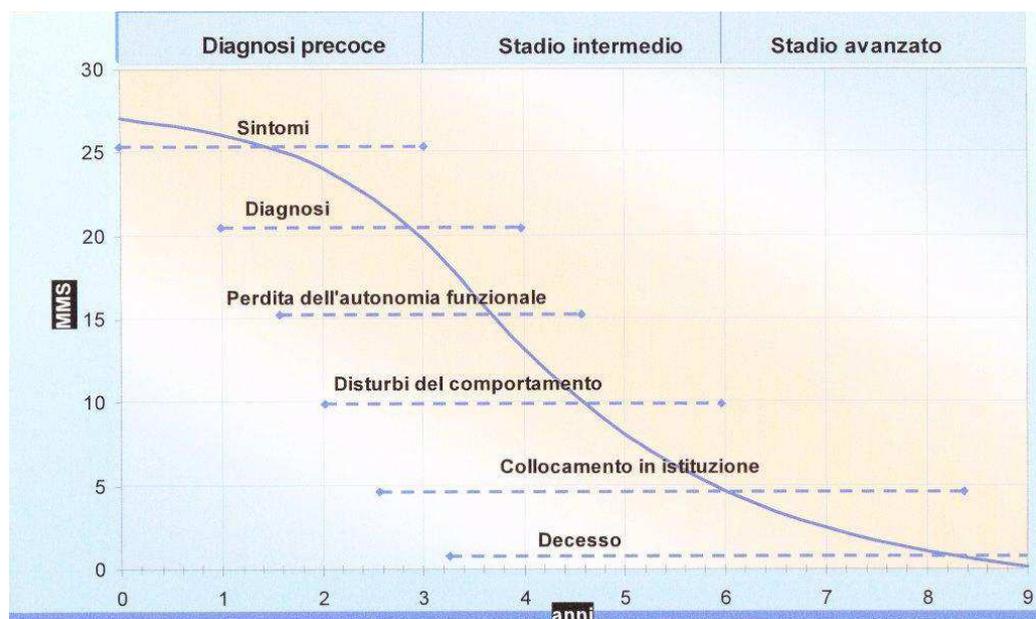


FIGURA 1.6.1.1. Evoluzione della malattia di Alzheimer (Feldman & Gracon, 1996)XVIII

Qui di seguito è riportato un esempio di valutazione neuropsicologica per fenomeni cognitivi:

1. Orientamento: si chiede al paziente che giorno è e dove si trova;
2. Memoria a breve termine: si fanno vedere al paziente tre oggetti; quindi gli si chiede di ripeterli,
3. Attenzione al calcolo: gli si chiede di sottrarre 7 ogni volta a partire da un dato numero,
4. Memoria di fissazione: si chiedono di nuovo gli oggetti prima mostrati,
5. Linguaggio: si chiede al paziente di dare un nome a dei nuovi oggetti; si invita il paziente a ripetere frasi, leggere e scrivere.
6. Il test dell'orologio (*clock-drawing test*) valuta le funzioni esecutive del lobo frontale e le abilità visuospatiali; il test dura 5-10 minuti ed è estremamente diffuso nella pratica clinica. Come il MMSE, il test dell'orologio manca di un'adeguata sensibilità per la diagnosi di demenza precoce o moderata (Powlishta KK *et al.*, 2002). Il test dell'orologio viene valutato secondo i criteri descritti da Freedman e colleghi (Freedman *et al.*, 1994); al paziente viene richiesto di disegnare un orologio e di inserirvi i numeri e le lancette, in modo da visualizzare un orario stabilito. La valutazione prende in considerazione alcune caratteristiche del disegno, a cui sono attribuiti dei punteggi; si osserva: la forma del cerchio, l'ordine corretto e la posizione dei numeri, posizionamento corretto delle lancette ecc..

Esistono molteplici test, alcuni utili a valutare l'efficacia di trattamento (ADAS: *Alzheimer Disease Association Scale*), altri usati per graduare i livelli di gravità dell'AD; in ogni caso il test neuropsicologico rappresenta un'estensione dell'esame obiettivo neurologico, partecipa alla diagnosi ed al processo nosologico, ed è infine un ottimo strumento informativo ai fini assistenziali e medico-legali.

1.7. Trattamento

AD è una patologia progressiva, tuttora incurabile. Non esistono ad oggi trattamenti capaci di arrestare la progressione della degenerazione cerebrale. Il trattamento risulta pertanto, finalizzato a rallentare il decorso inaggravante, a migliorare, almeno temporaneamente, i sintomi cognitivi e comportamentali e a garantire al paziente una qualità della vita buona o quantomeno dignitosa.

Le strategie terapeutiche comprendono: farmaci aventi quale bersaglio di azione i neurotrasmettitori, farmaci anti-infiammatori, estrogeni e farmaci anti-ossidanti.

Nell'AD sono stati riscontrati livelli ridotti di molti neurotrasmettitori, ma il sistema maggiormente compromesso è il sistema colinergico (Fig. 1.7.1.).

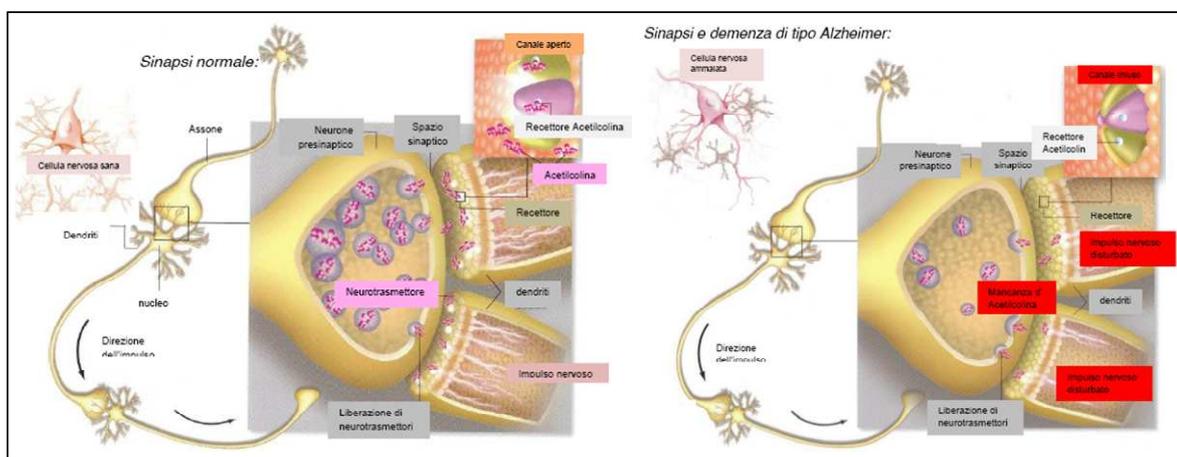


FIGURA 1.7.1. Meccanismo di trasmissione del segnale dell'acetilcolina tra due sinapsi sane (a sinistra) e tra due sinapsi di un paziente affetto da AD.

Il riscontro di un grave *deficit* colinergico nell'AD ha aperto la strada ad una serie di tentativi terapeutici volti a ripristinare livelli normali di acetilcolina a livello cerebrale, partendo dal principio che il potenziamento od il ripristino della funzione colinergica possa ridurre significativamente la gravità del deterioramento cognitivo (Mori *et al.*, 1995). Sono perciò stati intrapresi studi clinici volti a valutare diverse sostanze, note per essere in grado di potenziare la neurotrasmissione colinergica. I risultati migliori sono stati raggiunti con gli inibitori della acetilcolinoesterasi (AChE), un enzima che inattiva l'acetilcolina una volta che

essa viene liberata dalle terminazioni nervose. Con l'inibizione di questo enzima si permette al neurotrasmettitore di rimanere attivo più a lungo a livello delle terminazioni sinapsiche (Fig. 1.7.2.)

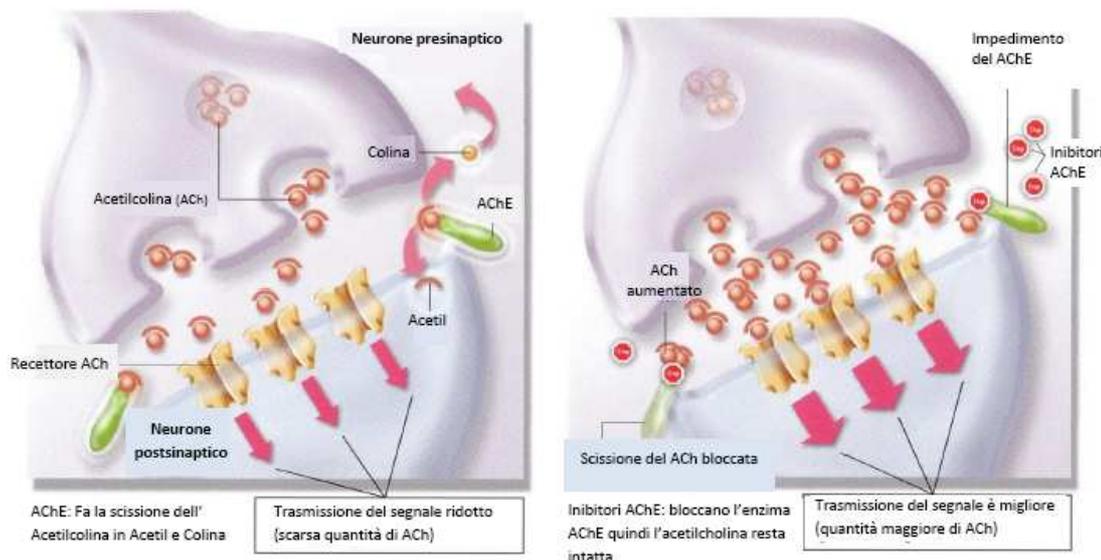


FIGURA 1.7.2. Meccanismo d'azione degli inibitori della acetilcolinoesterasi a livello sinaptico.

La somministrazione di precursori di Ach, quali colina e lecitina, si è dimostrata inefficace (Etienne *et al.* 1981; Patel 1995), mentre sono ancora allo studio agonisti muscarinici e nicotinici.

La classe degli inibitori di AchE può essere suddivisa in cinque gruppi:

1. aminoacridine: *tacrina*;
2. piperidine: *donezepil*;
3. carbamati: *fisostigmina* e *rivastigmina*;
4. organofosforici: *metrifonato*;
5. alcaloidi terziari: *galantamina*.

La *tacrina* è stato il primo farmaco ad essere sperimentato (Summer *et al.*, 1981). Si è dimostrato che i malati di AD trattati con *tacrina* presentavano un declino significativamente inferiore delle funzioni cognitive rispetto a pazienti trattati con placebo. Vi erano, tuttavia, degli effetti collaterali importanti: alterazione degli indici di funzionalità epatica e disturbi gastrointestinali, come nausea e vomito.

Per tutti questi effetti collaterali e le precauzioni che ne accompagnavano l'impiego, la *tacrina* è stata sostituita da un altro farmaco della stessa classe: il *donezepil*, che, a differenza della *tacrina*, non presenta una significativa epatotossicità e può essere somministrato una sola volta al giorno, data la sua lunga emivita. L'effetto collaterale più frequente è

rappresentato da modesta nausea o piroisi, frequenti soprattutto a dosaggi maggiori. I risultati ottenuti con il *donezepil* sono sovrapponibili a quelli della *tacrina*, ma con il vantaggio che gli effetti collaterali sono più modesti (Cameron *et al.* 2000).

Da un punto di vista biochimico, sembra che questi farmaci, grazie all'attivazione indiretta dei recettori muscarinici, portino ad un effetto protettivo nei confronti della neurodegenerazione ed ad una modificazione del metabolismo di APP.

Esiste una categoria completamente diversa di farmaci, il cui meccanismo d'azione è rivolto contro i processi infiammatori, che rivestirebbero un ruolo importante nella patogenesi dell'AD. Nel cervello dei pazienti con AD sono presenti alcune proteine infiammatorie ed elementi del sistema immunitario, che sembrano coinvolti nella genesi del danno neuronale e nella deposizione di amiloide.

È stato osservato che pazienti affetti da artrite reumatoide, che assumono per lunghi periodi *FANS* hanno una prevalenza ridotta di AD. L'utilizzo di antinfiammatori sembra, quindi, ridurre il rischio di sviluppare AD. È stato dimostrato che l'*indometacina* induce un miglioramento delle funzioni cognitive nei pazienti con AD contro un peggioramento in quelli che assumevano placebo. Tuttavia, la comparsa di gravi effetti gastrointestinali limita fortemente l'impiego dei *FANS*.

La ricerca è attualmente tesa alla scoperta di una nuova classe di farmaci antinfiammatori che non abbiano questo effetto collaterale, come per esempio gli inibitori selettivi della cicloossigenasi (COX-2); tra questi il candidato principale risulta essere al momento il Rofecoxib, la cui messa in commercio è stata autorizzata nel 2002, in base a dati tossicologici, farmacologici e clinici favorevoli, dal Comitato per le Specialità Medicinali dell'EMEA, il CPMP.

Gli estrogeni possono influenzare positivamente le funzioni cognitive: donne che hanno ricevuto una terapia ormonale sostitutiva hanno un minor rischio di sviluppare l'AD. Rimane il dubbio di un aumentato rischio di trombosi o di tumore alla mammella. Inoltre sia estrogeni che testosterone risultano capaci di promuovere *in vitro* il clivaggio "non amiloidogenico" di APP operato da α -secretasi e di ridurre la formazione di A β .

L'accumulo degli effetti dannosi provocati dai radicali liberi sulle membrane e sul materiale genetico delle cellule favorisce i processi di invecchiamento e di degenerazione. Questo accumulo sarebbe legato sia ad un'aumentata produzione di radicali liberi che ad un difetto nel loro smaltimento. La somministrazione di antiossidanti come la vitamina E (detta anche tocoferolo) o di selegilina [un inibitore selettivo delle monoamino ossidasi tipo B (MAO-B),

cioè di enzimi coinvolti nella degradazione delle catecolamine] potrebbe rallentare la progressione della malattia.

Nuove terapie anti-amiloidi sono attualmente in fase di studio. L'obiettivo di tali strategie è di prevenire la formazione della placca amiloide tramite: interferenza diretta con le secretasi (inibire le β e γ -secretasi o favorire il taglio di α -secretasi) o rimozione dei peptidi amiloidi tramite l'uso di agenti anti-aggreganti o tramite immunizzazione.

Gli inibitori delle β -secretasi sono polipeptidi che si sono dimostrati efficaci *in vitro*, la cui biodisponibilità e stabilità *in vivo* non sono state ancora valutate. Le γ -secretasi rappresentano un target terapeutico alternativo; sono stati sviluppati inibitori di tali enzimi, che effettivamente prevengono la formazione dei peptidi amiloidi, ma il loro uso è limitato dalla possibile interferenza con il signaling di Notch.

Una classe emergente di farmaci è rappresentata dagli agenti ipocolesterolemizzanti, le statine. Studi epidemiologici recenti dimostrano che pazienti anziani che hanno ricevuto trattamento con statine, hanno un minor rischio di sviluppo di demenza rispetto ad individui non trattati di età corrispondente (Jick *et al.*, 2000). Inoltre agenti ipocolesterolemizzanti riducono la secrezione di A β in colture cellulari, e la simvastatina riduce i livelli di A β nel liquor di cavie (Fassbender *et al.*, 2001). Uno studio randomizzato di 26 settimane, condotto da Simons e coll su 44 pazienti con AD, ha individuato una minore riduzione del punteggio dell'MMSE nei pazienti che assumevano simvastatina (80 mg/die) rispetto a quelli che assumevano placebo (Simons *et al.*, 2002). La superiorità delle statine lipofile (per es. simvastatina, lovastatina, che attraversano la barriera ematoencefalica più efficacemente) rispetto a quelle idrofile (per es. pravastatina, fluvastatina, rosuvastatina e atorvastatina) è ancora materia di dibattito.

Un altro approccio volto a ridurre l'accumulo di sostanza amiloide e la tossicità che ne deriva consiste nell'uso di agenti chimici che prevengono l'oligomerizzazione e formazione delle fibrille di A β ; sono stati proposti una varietà di composti, tra cui il rosso Congo, la rifampicina, la doxorubicina, la nicotina ed il benzofurano: a causa della loro tossicità nessuna di tali molecole trova applicazione *in vivo*.

Oligosaccaridi e chelanti metallici potrebbero costituire potenziali "plaque busters", in grado di dissolvere le placche amiloidi; una particolare attenzione è rivolta ai chelanti degli ioni rame, dal momento che tali ioni sono in grado di indurre l'aggregazione di A β . In uno studio clinico di fase II, condotto in un gruppo di pazienti AD trattati con clioquinolo, si sono osservati ridotti livelli di peptide amiloide, aumento dei livelli di zinco e un punteggio

superiore nel test cognitivo ADAS (*Alzheimer's Disease Assessment Scale*), rispetto al gruppo trattato con placebo (Ritchie *et al.*, 2003). Il clioquinolo è un *metal-protein-attenuating compound* (MPAC), che inibisce l'interazione tra gli ioni zinco e rame e la β -amiloide, favorendone quindi il dissolvimento e prevenendone l'accumulo. Il profilo di sicurezza e l'efficacia biochimica del clioquinolo, risultante da questi studi, incoraggiano a proseguire i lavori di ricerca.

Un altro dato interessante proviene da studi sui micro RNA (miRNA), presenti nel cervello umano, dove regolano l'espressione genica neuronale; si osserva nei pazienti AD una specifica alterazione dei livelli di taluni miRNA. In particolare, è stata dimostrata un aumento dell'espressione di miRNA-146a, il quale risulta sensibile a NF- κ B e la cui sequenza è altamente complementare a 3'-*untranslated region* (3'UTR) del fattore H del complemento H (CFH), un importante repressore della risposta infiammatoria neuronale. Presumibilmente, durante la cascata infiammatoria l'aumentata espressione di NF- κ B sensibilizza l'azione di miRNA-146a, il quale agisce sequestrando CFH inibendone l'azione anti-infiammatoria; l'*up-regulation* di miRNA-146a associata a *dow-regulation* di CFH è stata osservata nel cervello di pazienti AD (*post mortem*) ed in cellule neuronali umane in coltura primaria (HNC), in cui si induce stress neuronale (Lukiw *et al.*, 2008). Negli studi *in vitro* su tali cellule, l'utilizzo di resveratrolo (inibitore di NF- κ B) o di oligonucleotidi antisenso di miRNA-146a (anti-miRNA-146a) ripristinano i livelli di CFH; dimostrando così un ruolo potenziale degli anti-miRNA-146a come strategia terapeutica contro l'infiammazione patologica in AD.

L'uso di terapie vaccinali per la AD ha una storia piuttosto recente, inaugurata nel 1999 dagli studi di un'azienda farmaceutica californiana, la Elan, che ha cominciato a studiare una possibile terapia immunitaria su topi geneticamente modificati (PD-APP), affinché a sei settimane di vita sviluppassero la malattia. Questi topi sono stati immunizzati con il peptide β -amiloide, in particolare contro la sua porzione A β 42. I risultati (Schenk *et al.*, 1999) sono stati eclatanti. L'immunizzazione previene la formazione delle placche, mentre negli animali più vecchi riduce la progressione dei processi neurodegenerativi. Presumibilmente, gli elevati livelli periferici di anticorpi anti-amiloide indotti nei topi consentono ad una ridotta frazione di essi di passare la BEE ed agire a livello centrale. A fronte di tali dati, seguì la sperimentazione sull'uomo: furono avviati in USA degli studi di fase I. I primi risultati furono estremamente positivi.

Successivamente l'immunizzazione attiva, che aveva fatto tanto sperare per i risultati ottenuti sui modelli murini e per l'iniziale successo della sperimentazione umana, è stata quasi del tutto abbandonata dopo i numerosi casi di encefalite che imposero la sospensione dello studio clinico nel 2002. Secondo uno studio retrospettivo, l'imprevisto sviluppo della grave infiammazione dell'encefalo sarebbe stato innescato da una intensissima risposta dei linfociti T contro gli aggregati di A β . Alcuni studiosi, fra cui Cynthia Lemere, continuano a percorrere questa via, impiegando solo parti del peptide, che sembrano in grado di attivare una risposta delle cellule B senza evocare la pericolosa reazione dei linfociti T. Questi tentativi sono però considerati con prudenza e scetticismo dalla maggior parte dei ricercatori.

L'immunizzazione passiva è invece di grande attualità ed il trattamento in grado di conferirla, realizzato dalla Elan Corporation, è giunto alla II fase di sperimentazione clinica. Gli anticorpi sono prodotti da cellule di topo geneticamente *ingegnerizzate* per prevenire il rigetto da parte dell'organismo umano e sembra che non inneschino, da parte delle cellule-T, risposte nocive per l'encefalo. Tuttavia la reale efficacia terapeutica dell'immunizzazione passiva è ancora controversa. Si è osservato, ad esempio, che gli anticorpi passano difficilmente la BEE e gli effetti dell'immunizzazione passiva riscontrati in alcune ricerche potrebbero essere la conseguenza di un processo indiretto. L'azione degli anticorpi contro i peptidi A β presenti diffusamente nell'organismo ne causerebbe una forte riduzione periferica, che indurrebbe il cervello a mobilitare dalla placche i suoi peptidi in eccesso, che raggiungono così la periferia. Se tale è il meccanismo operante, l'immunizzazione passiva agirebbe, in qualche modo, alterando un equilibrio fisiologico.

Infine, non si può non menzionare il promettente tentativo di terapia cellulare che Mark Tuszynski dell'Università della California a San Diego ha sperimentato su alcuni volontari in una fase non avanzata della malattia (Tuszynski *et al.*, 2005). Dopo aver prelevato cellule da biopsie cutanee, vi ha inserito il gene codificante l'NGF (*nerve growth factor*); ha poi introdotto queste cellule geneticamente modificate nel proencefalo degli stessi pazienti, con il risultato di un marcato rallentamento del declino cognitivo. Anche se questo studio, per il ridotto numero dei soggetti trattati e la mancanza di adeguati controlli, non può ritenersi molto significativo, il suo buon esito ha incoraggiato l'avvio di nuovi progetti di terapia cellulare con protocolli più esigenti, che consentano di nutrire qualche speranza per il futuro.

2. NEUROINFIAMMAZIONE: UN PROCESSO PATOLOGICO PRECOCE

Le placche amiloidi in AD colocalizzano con un'ampia varietà di molecole pro-infiammatorie (fattori del complemento, proteine della fase acuta, citochine pro-infiammatorie) e sono strettamente associate con attivazione microgliale ed astrocitaria. Numerose evidenze sostengono una forte correlazione tra le placche amiloidi ed una caratteristica risposta infiammatoria indotta localmente, indipendente da risposta immunitaria (di tipo adattativo) e di natura cronica. Studi clinicopatologici mostrano come l'attivazione microgliale sia un evento patogenico precoce, che precede l'estesa perdita neuronale osservata in AD. Studi epidemiologici evidenziano l'esistenza di *linkage disequilibrium* tra AD ed alcuni geni codificanti proteine della fase acuta e citochine, proposti pertanto come fattori di rischio di AD. Ulteriori indagini epidemiologiche dimostrano come l'uso di farmaci anti-infiammatori non steroidei (NSAIDs) possa prevenire e/o ritardare il rischio di sviluppare AD; nonostante il loro utilizzo come trattamento terapeutico non si sia poi rivelato così positivo come atteso, il dato è servito a prendere in considerazione il ruolo dei meccanismi infiammatori in AD.

Le forme di AD ad insorgenza precoce (35-40 anni) rappresentano una piccola frazione dei casi di AD, che include le forme ad eredità autosomica dominante, causate da mutazioni in geni localizzati sui cromosomi 1, 14 e 21; in tali situazioni si considera come evento primario e scatenante il disordine l'aumentata produzione dei peptidi A β (soprattutto A β 42), con conseguente oligomerizzazione e deposito extracellulare della forma fibrillare neurotossica, inducente la risposta infiammatoria.

L'eziologia delle forme sporadiche (ad insorgenza tardiva), costituenti la maggioranza dei casi di AD, risulta ancora poco definita, anche se si delinea una patogenesi eterogenea e multifattoriale; ovvero esse si rivelano come la conseguenza di un'interazione tra geni di suscettibilità (es. apolipoproteina E4) e fattori di rischio ambientali, sempre più assimilabili a certi stili di vita (Hoyer, 2000).

Sebbene le forme familiari e sporadiche di AD non formino un'entità nosologica omogenea, esse condividono le medesime caratteristiche cliniche e neuropatologiche. Tale concetto (eterogeneità eziologica e uniformità clinica) non è nuovo nella scienza medica (es. diabete mellito di tipo I e II); concorde a questa linea di pensiero Hoyer distingue due forme di AD: di tipo I (forma familiare) e di tipo II (forma sporadica). La formulazione di tale idea nasce da una serie di evidenze, secondo le quali nel tessuto neuronale in corso di AD (soprattutto AD di tipo II) si assiste a svariate modificazioni dello stato fisiologico: ridotto metabolismo

energetico, consumo di glucosio, alterazioni del segnale insulinico e stress ossidativo. Lo stress ossidativo precede l'insorgenza dei sintomi clinici tipici di AD; l'origine del danno ossidativo è attribuibile alla disfunzione mitocondriale, che inevitabilmente disturba le funzioni normali della cellula, rendendola più sensibile agli insulti neurotossici e provocando l'innescamento della morte cellulare programmata, evento chiave delle patologie neurodegenerative. Infine, AD (tipo II) viene da alcuni considerato come "diabete di tipo III o neuronale", dal momento che in tale patologia si osserva un'alterazione del metabolismo dell'insulina a livello dei tessuti neuronali, dove si assiste al fenomeno di resistenza insulinica, che gioca un ruolo importante nelle fasi precoci della malattia (Moreira *et al.*, 2007).

2.1 Cronicità della risposta infiammatoria in AD

L'assenza di immunoglobuline e di infiltrati linfocitari (linfociti T) nelle placche senili suggerisce che né la risposta umorale né quella cellulo-mediata siano coinvolte nella formazione delle placche amiloidi cerebrali (Halliday *et al.*, 2000); inoltre non si osserva nell'endotelio capillare cerebrale dei pazienti AD alcun aumento nell'espressione di molecole di adesione (*intercellular adhesion molecule-1* - ICAM-1; *vascular cellular adhesion molecule-1* - VCAM-1, E-selectina), evento necessario per il reclutamento dei leucociti dalla periferia al focus infiammatorio intracerebrale. Tali dati sono pertanto in linea con l'ipotesi di una risposta infiammatoria locale, cronica e indipendente dal sistema immunitario (SI) adattativo in assenza di influsso di leucociti periferici (Eikelenboom *et al.*, 1996).

La deposizione dei peptidi A β è l'evento scatenante il processo infiammatorio. È stata dimostrata la capacità di A β di legare il fattore del complemento C1, con successiva attivazione della cascata del complemento (anticorpo-indipendente) (Rogers *et al.*, 1992); numerose proteine pro-infiammatorie definite "proteine A β -associate" (Aikama *et al.*, 2000) colocalizzano con la placca amiloide, in particolare α 1-antichimotripsina (ACT), ICAM-1, α 2-macroglobulina, clusterina, apolipoproteina E, componente P amiloidea sierica ed eparan solfato. La loro produzione sembra essere locale dal momento che ad oggi non esistono evidenze che supportino una disfunzione di BEE in AD; inoltre Kalaria e collaboratori (1993) hanno dimostrato che il tessuto neuronale esprime mRNA di tali proteine. Studi *in vivo* su topi hAPP (esprimenti *human-APP*) dimostrano che l'aumentata espressione di alcune proteine A β -associate (ApoE, ACT) conduce ad un aumentato deposito di peptidi amiloidi (Bales *et al.*, 1997; Nilsson *et al.*, 2001), mentre il risultato dell'inibizione del fattore del complemento è un diminuito accumulo di sostanza amiloide (Wiss Corray *et al.*, 2000). Tali dati

sottolineano l'importanza delle proteine A β -associate nell'equilibrio dinamico tra deposizione e rimozione di A β neuronale.

Un ruolo chiave nei processi infiammatori associati a neurodegenerazione è attribuito alla microglia, che rappresenta la prima linea di difesa del tessuto neuronale contro ogni tipo di insulto ambientale. Recenti studi, basati sulla tecnica PET, utilizzando un *marker* di attivazione microgliale (PK-11195, ligando del recettore benzodipenico periferico pBR), supportano l'ipotesi che tale attivazione rappresenti un evento patogenetico precoce, che anticipa il manifestarsi dell'atrofia cerebrale nei pazienti AD (Cagnin *et al.*, 2001).

La forma fibrillare di A β induce una risposta infiammatoria cronica mediata dalla microglia, la cui attivazione risulta particolarmente evidente a livello delle placche neuritiche; le cellule microgliali attivate sono immunoreattive per IL-1, IL-6 e TNF- α (Griffin *et al.*, 1989; Dickson *et al.*, 1993; Huell *et al.*, 1995) e si dimostrano capaci di produrre e rilasciare prodotti tossici, quali specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Meda *et al.*, 1995), citochine pro-infiammatorie. In particolare, IL-1 presenta la capacità di regolare *in vitro* la sintesi di APP e la produzione dei frammenti A β (Blasko *et al.*, 1999) eccitotossine (Giulian *et al.*, 1997) e proteasi, che danneggiano la vitalità dei neuroni vicini. La microglia rappresenta l'elemento essenziale attraverso cui si esercita la neurotossicità dei depositi di A β ; è importante ricordare che, in aggiunta a quanto detto, la microglia produce anche citochine anti-infiammatorie, come IL-10 (De Groot *et al.*, 2001). Inoltre, la cascata infiammatoria indotta da amiloide coinvolge le già citate proteine associate ad A β , in grado sia (alcune) di indurre che (altre) prevenire la oligomerizzazione delle fibrille A β e la successiva deposizione; uno squilibrio tra questi due tipi di proteine è stato riscontrato in AD (Zhan *et al.*, 1995). Pertanto, se da un lato l'attivazione infiammatoria da A β in AD contribuisce all'innesco del processo neurodegenerativo, dall'altro alcune proteine infiammatorie (soprattutto fattori del complemento) stimolano la *clearance* di A β ad opera della microglia (Rogers *et al.*, 2002). Tale concetto non è sorprendente dal momento che l'eliminazione dello stimolo patogenetico (depositi di A β) e di meccanismi di riparazione tissutale sono caratteristiche salienti.

Un altro tratto distintivo della risposta infiammatoria sistemica consiste in un aumento delle concentrazioni plasmatiche delle proteine di fase acuta, riscontrato anche nel siero dei pazienti AD; in particolare si riportano aumentati livelli sierici di ACT (Licastro *et al.*, 1995), IL-6 e TNF- α e diminuzione dei livelli di albumina (Maes *et al.*, 1999).

Un aspetto interessante recentemente emerso risulta essere il ruolo dei neuroni, da sempre descritti come vittime passive del danno indotto dalla risposta microgliale ai depositi di A β ; in

realità diversi studi riportano un ruolo attivo dei neuroni nella neuroinfiammazione in AD (Hoozemans *et al.*, 2002).

2.2. Una risposta infiammatoria di fase acuta nei pazienti AD

Considerando il ritrovamento nelle placche neuritiche dei pazienti AD dell'enzima $\alpha 1$ -antichimotripsina, Abraham e Potter suggeriscono che l'overespressione di ACT, in diversi tipi di patologie neuronali, potrebbe riflettere una risposta infiammatoria di fase acuta di tipo neuronale del tutto assimilabile al ben noto shock acuto che avviene in periferia in risposta al lipopolissaccaride (LPS), endotossina presente sulla parete esterna dei batteri Gram negativi (Abraham e Potter, 1990). La risposta di fase acuta rappresenta una difesa fisiologica dell'organismo ad eventi stressanti di origine eterogenea; essa consiste nell'attivazione del sistema adrenergico simpatico, che genera una risposta sistemica caratteristica, denominata "fight or flies" (aumento della frequenza cardiaca e degli atti respiratori, vasocostrizione, broncodilatazione), mediata dall'epinefrina/norepinefrina. All'interno di questo contesto un ruolo importante è giocato anche dall'attivazione dell'asse ipotalamico-ipofisario-surrenalico (HPA).

Nei pazienti AD si assiste ad una disregolazione dell'asse HPA: gli elevati livelli di cortisolo riscontrati nei soggetti AD rispetto ai controlli anziani sani, non sopprimibili con la somministrazione di desametasone, indice di alterazione del *feed-back* negativo dell'asse HPA, si correlano con un aumento del rischio di declino cognitivo. Esiste una stretta associazione tra i livelli di cortisolo, il danno ippocampale e/o la perdita neuronale.

Pertanto, il riscontro di ipercortisolemia ed iperattivazione dell'asse HPA, unitamente agli aumentati livelli sierici delle proteine di fase acuta indicano che, oltre ai fenomeni infiammatori cronici neuronali, altra caratteristica della patologia risulta la discussa risposta sistemica di fase acuta, a cui si assegna un ruolo nel processo patologico di AD.

Studi epidemiologici retrospettivi rivelano che aumentati livelli sierici di ACT, proteina C reattiva ed IL-6 e ridotti livelli del fattore di crescita insulino-simile (IGF-1) si associano ad un maggior rischio di insorgenza di AD (Engelhart, 2000; Schmidt *et al.*, 2002; Dick *et al.*, 2003; Yaffe *et al.*, 2003); tale profilo proteico nei livelli sierici in individui anziani potrebbe rivelarsi una misura del rischio di AD.

Considerando il ruolo esercitato dalle citochine nell'orchestrare la risposta infiammatoria locale e sistemica, numerosi studi genetici hanno indagato la presenza nella popolazione AD di eventuali polimorfismi in tali geni. Il gene di IL-1 risulta essere il candidato preferito, dal

momento che esistono numerosi polimorfismi di tale gene correlati in modo specifico con AD: il rischio di AD risulta più frequentemente associato con il gene di IL-1a (Du *et al.*, 2000) e tale rischio aumenta in concomitanza con la variante polimorfica di IL-1b (allele 2) (Nicoll *et al.*, 2000). Un altro studio dimostra l'esistenza di un legame, seppur debole, tra il gene di IL-1RA (IL-1 receptor agonist) e il rischio di insorgenza precoce (prima di 65 anni) di AD (Grimaldi *et al.*, 2000). Altro gene considerato è quello di TNF- α ; l'allele T di tale gene aumenta il rischio di sviluppare demenza vascolare ed, in presenza del polimorfismo in ApoE4, anche il rischio di AD (McCusker *et al.*, 2001). Infine si pone attenzione al gene di IL-6, per il quale esistono dati discordanti: alcuni studi dimostrano che l'allele C del gene di IL-6 è correlato ad un minor rischio di sviluppo di AD (Bagli *et al.*, 2000), mentre altri lavori non trovano alcuna relazione significativa tra il polimorfismo nel gene di IL-6 ed il rischio di AD (Bhojak *et al.*, 2000).

2.3. Neuroinfiammazione e sintomi clinici precoci

I sintomi cognitivi rappresentano i segni cardinali delle sindromi dementigene, e riflettono la distruzione dei *networks* neuronali delle regioni ippocampali e della neocorteccia; purtroppo tali manifestazioni insorgono nelle fasi tardive della malattia quando i danni neuronali sono ormai del tutto irreversibili. Studi epidemiologici indicano che i sintomi depressivi, quali la perdita di interesse e di energia e la ridotta velocità nell'ideazione ed elaborazione delle informazioni (bradifrenia soggettiva), si manifestano negli stadi preclinici di AD (Geerlings *et al.*, 2000); essi sembrano una manifestazione precoce di quel processo patologico che conduce al *deficit* cognitivo. In analogia, nel morbo di Creutzfeldt Jacob i sintomi psichiatrici (soprattutto depressione) rappresentano le manifestazioni cliniche precoci e preminenti, che anticipano in molti casi i sintomi neurologici (Zeidler *et al.*, 1997); nel modello animale della malattia da prioni le alterazioni comportamentali precoci precedono di gran lunga i sintomi clinici tipici utilizzati per definire il tempo di incubazione della patologia ceppo-specifico. La patologia associata a tali segni comportamentali è caratterizzata dalla presenza di microglia attivata (Betmouni *et al.*, 1996); inoltre studi clinici sia sull'animale che sull'uomo dimostrano la capacità delle citochine pro-infiammatorie, che regolano la risposta infiammatoria acuta, di indurre una patologia "depressive-like" e "sickness behaviour". Quest'ultimo termine sta ad indicare un insieme ben definito di cambiamenti comportamentali che si sviluppano in un individuo nel corso di una malattia infettiva; le citochine prodotte a livello centrale sono le medesime espresse dalle cellule del sistema immunitario innato e agiscono su recettori cerebrali identici a quelli caratterizzati delle cellule immuno-competenti.

L'espressione di tali citochine nel tessuto cerebrale in risposta alle citochine periferiche, rilasciate nel corso della normale infezione, viene regolata da intermediari molecolari, quali citochine anti-infiammatorie (IL-10, IL-1RA), fattori di crescita (IGF-1), ormoni (glucocorticoidi) e neuropeptidi (vasopressina, α -melanotropina) (Dantzer, 2004).

Dal momento che la produzione di citochine a livello neuronale è una conseguenza dell'attivazione microgliale, indotta dalle fibrille di A β nella patologia di AD, tale evento si colloca nelle fasi precoci del processo patologico.

Ricapitolando, le fasi iniziali di AD vedono un'aumentata produzione di citochine, che produce una sindrome pre-clinica caratteristica e documentata, comparabile alle alterazioni comportamentali osservate nei modelli animali o nei *trials* clinici sull'uomo, che fanno uso di citochine (Eikelenboom *et al.*, 2002; Perry *et al.*, 2003).

2.4. Metabolismo del glucosio

Il glucosio rappresenta il substrato energetico per eccellenza del tessuto nervoso, il cui metabolismo energetico è mantenuto dalla combinazione di una concentrazione ematica di glucosio elevata e costante e presenza di un efficiente sistema di trasporto del glucosio. Quest'ultimo viene garantito dalla presenza di trasportatori neuronali per il glucosio GLUT1-5,7 e 8 (Dienel GA, Hertz L, 2001; Erol A, 2008), responsabili della sua diffusione facilitata attraverso la barriera emato.encefalica (BEE) (, e la membrana plasmatica di neuroni e cellule gliali. Le isoforme di GLUT più abbondanti a livello cerebrale sono GLUT1, 3 e 4, mentre GLUT2, 5 e 8 risultano residue (Choeiri C *et al.*, 2002).

Il metabolismo e l'uptake cerebrale di glucosio risultano alterati in AD; tale fenomeno viene generalmente riferito come causa piuttosto che come conseguenza del processo neurodegenerativo (Hoyer S., 2004); numerose evidenze propongono il difettoso metabolismo energetico come una componente fondamentale nella patogenesi di AD (Blass JP, Gibson GE, 1999).

La riduzione nella velocità del metabolismo cerebrale risulta l'anormalità meglio documentata ed interviene nelle fase precoci di AD (Blass JP *et al.*, 2000); si evidenziano alterazioni sia nella velocità di metabolismo di glucosio che di ossigeno, entrambe precedono tanto i sintomi clinici che si osservano durante l'esecuzione dei test neuropsicologici quanto l'atrofia cerebrale rivelata da *neuroimaging* (Small GW *et al.*, 1996). Nei soggetti AD si osserva un'atrofia nella microcircolazione, che rappresenta in effetti la principale superficie di

scambio metabolico nel cervello (Cash AD *et al.*, 2003; Praprotnik D *et al.*, 1996), e anche una riduzione nei livelli di GLUT1 e 3, responsabili dell'uptake di glucosio nei neuroni (Liu Y *et al.*, 2008); tale fenomeno correla con una riduzione nella O-GlcNacilazione e iperfosforilazione di tau, e diminuzione di densità di NFT a livello cerebrale. Tali risultati suggeriscono un possibile meccanismo in cui il deficit di GLUT1 e 3 causa un inadeguato uptake/metabolismo del glucosio e contribuisce alla neurodegenerazione tramite un'abnorme modificazione post-traduzionale della proteina tau.

L'attività di una vasta gamma di enzimi coinvolti nel metabolismo energetico, risulta alterata nei pazienti AD e in colture cellulari esposte a A β , in particolare diminuisce l'attività di aconitasi, glutamina sintetasi, creatin chinasi, piruvato deidrogenasi (PDH) e α -chetoglutarato deidrogenasi (KGDH) (Sorbi S *et al.*, 1983). Recentemente, Reed e colleghi hanno osservato una diminuzione significativa di attività di PDH, lattato deidrogenasi e ATP-sintasi in pazienti MCI (Reed T *et al.*, 2008). Inoltre, si osserva che i cambiamenti nelle attività del ciclo degli acidi tricarbossilici (soprattutto il complesso PDH) correlano con gli stadi clinici della patologia, suggerendo una correlazione con le alterazioni mitocondriali (Bubber P *et al.*, 2005). La diminuita attività di PDH giustifica la riduzione dei livelli di acetilCoA (Melo JB *et al.*, 2002; Perry EK *et al.*, 1980), che a sua volta è causa di riduzione dei livelli di colesterolo e formazione di neurosteroidi; la diminuita disponibilità di acetilcolina che ne deriva si riflette in un ulteriore difetto enzimatico dell'acetiltransferasi (Sims NR *et al.*, 1983). I risultati esposti supportano l'"ipotesi colinergica", secondo cui la disfunzione del sistema di segnalazione colinergico in specifiche regioni cerebrali incide profondamente sui processi mnemonici, cognitivi e correla con la perdita di memoria e apprendimento, e con la neurodegenerazione riscontrabili nei pazienti AD (Bartus RT 2000; Bartus RT *et al.*, 1982). In accordo con tale ipotesi, si identifica in AD una diminuita attività enzimatica dell'acetilcolinesterasi (AChE), responsabile dell'idrolisi di acetilcolina nelle terminazioni sinaptiche colinergiche e non, e pertanto determinante nel garantire una corretta neurotrasmissione (Atack JR *et al.*, 1983). Dati contrastanti derivano però dalla scoperta di un'aumentata attività di AChE in prossimità delle placche amiloidi (Ulrich J *et al.*, 1990), dove l'enzima induce l'assemblaggio in fibrille dei peptidi A β e ne aumenta la citotossicità.

Infine, tra gli enzimi facenti parte della catena di trasporto degli elettroni, l'attività della citocromo ossidasi risulta essere quella maggiormente compromessa; numerosi lavori indicano una riduzione dell'attività delle citocromo ossidasi nelle piastrine dei pazienti AD (Cardoso SM *et al.*, 2004; Parker Jr WD *et al.*, 1994) e nel tessuto neuronale *post mortem* di tale soggetti (Kish SJ *et al.*, 1992; Mutisya EM *et al.*, 1994). Valla e colleghi (Valla J *et al.*,

2006) hanno osservato un significativo decremento mitocondriale del complesso III e IV nei linfociti dei pazienti AD; dal momento che il deficit del complesso IV si ripete nei pazienti MCI, gli Autori collocano il danno mitocondriale nelle fasi precoci di AD.

Per concludere, l'espressione di alcuni geni codificanti per subunità della catena mitocondriale risulta diminuita in numerose regioni cerebrali, quali corteccia cingolata posteriore, giro temporale mediano, regione CA1 dell'ippocampo, corteccia entorinale, corteccia visiva e giro frontale superiore (Liang WS *et al.*, 2008); questi ultimi dati suggeriscono una interazione tra l'alterato metabolismo del glucosio cerebrale e la ridotta espressione genica delle subunità costituenti la catena di trasporto degli elettroni, nell'ambito dell'insorgenza della patologia di AD.

2.5. Il mitocondrio: fonte e target dello stress ossidativo

Il cervello è un tessuto ad alto consumo energetico e, sebbene rappresenti solo il 2% del peso corporeo riceve il 15% della gittata cardiaca e risponde del 20% del consumo totale di ossigeno. L'alta richiesta energetica origina dalla necessità di mantenere i gradienti ionici a cavallo delle membrane plasmatiche, condizione necessaria per la generazione dei potenziali d'azione. L'afflusso di sangue al cervello deve essere costante, dal momento che l'assenza di ossigeno o glucosio per brevi periodi di tempo causano necrosi e perdita neuronale.

Il mitocondrio è riconosciuto come il generatore di energia cellulare essenziale per il mantenimento delle attività cellulari fisiologiche, inoltre l'organello monitora la vitalità della cellula e, se necessario, è in grado di indurre il programma di morte cellulare. Esistono tre principali che portano all'apoptosi, che si realizza con l'attivazione delle proteasi caspasiche, che catalizzano una cascata proteolitica diretta contro substrati cellulari specifici con conseguente variazioni morfologiche e biochimiche specifiche e identificative del fenotipo apoptotico; tutti hanno come target finale il mitocondrio e sono mediati dai membri della famiglia Bcl-2, tra cui Bid, Bax e Bad.

I mitocondri sono essenziali per il mantenimento delle funzioni neuronali, in quanto l'unica risorsa energetica di tali cellule è rappresentato dal metabolismo glicolitico di tipo aerobio; l'ultima tappa di tale processo è rappresentata dalla fosforilazione ossidativa, attraverso cui il gradiente protonico generato dalla catena di trasporto degli elettroni (situata a cavallo della membrana mitocondriale interna) viene sfruttato per la generazione di ATP, moneta ubiquitaria di scambio di energia. La fosforilazione ossidativa è la principale fonte di radicali liberi endogeni, che sono prodotti fisiologicamente dalla respirazione cellulare; in condizioni

normali la produzione delle specie radicaliche dell'ossigeno (ROS) è controbilanciata dalle difese antiossidanti della cellula; una perturbazione di tale equilibrio genera stress ossidativo con conseguente disfunzione mitocondriale e danno cellulare. I targets principali dei ROS comprendono le componenti stesse del mitocondrio (lipidi, proteine e DNA); la mancanza di proteine istoniche che proteggono il DNA mitocondriale (mtDNA) e la ridotta capacità di "DNA repair" rende tale organello estremamente suscettibile allo stress ossidativo.

Aumentato stress ossidativo e riduzione delle difese antiossidanti sono caratteristiche salienti che intervengono precocemente nel processo patologico di AD (Smith MA *et al.*, 1997; Straface E *et al.*, 2005); pertanto, nei neuroni dei pazienti AD si osserva un'abbondante ossidazione di acidi nucleici, proteine e lipidi, che si può dimostrare dagli aumentati livelli di 8-idrossi-8-deossiguanosina (8-OHdG) e 8-idrossiguanosina (8-OHG) (Nunomura A *et al.*, 1999; Nunomura *et al.*, 2001), da aumentati livelli di carbonili proteici e residui tirosinici nitrati (Smith MA *et al.*, 1996; Smith MA *et al.*, 1997), e da elevati livelli di sostanze reattive acide e alterata composizione lipidica (Sayre LM *et al.*, 1997). Infine, si rilevano glicazione e glicosilazione a livello dei carboidrati (Smith MA *et al.*, 1994; Smith MA *et al.*, 1995) responsabili della formazione di prodotti di glicazione avanzata (RAGE), tra cui pentsidina e pirralina.

Contemporaneamente, si assiste ad una significativa riduzione nell'attività di enzimi antiossidanti (superossido dismutasi e catalasi) nella corteccia frontale e temporale di pazienti AD (Marcus DL *et al.*, 1998); interessante è la scoperta che tale alterazione si incontra in modo specifico nei pazienti AD/MCI, mentre è assente nei pazienti con demenza vascolare (Straface E *et al.*, 2005).

Numerose evidenze sostengono che alla base della perdita neuronale causata dallo stress ossidativo ci sia declino nella funzione dell'enzima glutatione reduttasi (GSH), che è un importante agente riducente nelle cellule di mammifero. Nei pazienti AD si ritrovano ridotti livelli di GSH in specifiche regioni del SNC (Gu M *et al.*, 1998); è stato inoltre dimostrato che alterazioni a carico del sistema GSH sono coinvolte nella citotossicità mediata da A β (Cardoso SM *et al.*, 2003).

Numerosi studi *in vitro* e studi clinici indicano che AD è caratterizzata da disfunzione mitocondriale, aumentato stress ossidativo e morte neuronale.

Studi *in vitro* dimostrano che i peptidi A β in presenza dello ione calcio provocano un'apertura prolungata del PTP mitocondriale (permeability transition pore) (Moreira PI *et al.*, 2001; Moreira PI *et al.*, 2002); l'induzione di PTP è associato a un repentino aumento della permeabilità della membrana mitocondriale interna, e gioca un ruolo importante nell'apoptosi,

in quanto facilita il rilascio dei fattori apoptogenici. Inoltre, la combinazione di A β e calcio è associata a una riduzione del potenziale mitocondriale transmembranario e della capacità dei mitocondri neuronali di accumulare calcio, inducendo così un completo disaccoppiamento della respirazione cellulare e un'alterazione morfologica mitocondriale (distruzione delle creste mitocondriali e rigonfiamento) (Moreira PI *et al.*, 2001; Moreira PI *et al.*, 2002). Interessante è la scoperta che la disfunzione mitocondriale associata al diabete è esacerbata dalla presenza di A β e dall'invecchiamento fisiologico; tale dato suggerisce che il diabete e l'invecchiamento possono essere fattori di rischio nella neurodegenerazione indotta dal peptide A β (Moreira PI *et al.*, 2003; Moreira PI *et al.*, 2005).

Studi su fibroblasti di pazienti AD rivelano alterazioni nella morfologia e distribuzione dei mitocondri, che sembrano essere associate alla diminuita espressione della proteina 1 simile alla dinamina (DLP1), la quale regola la distribuzione mitocondriale (Wang X *et al.*, 2002). È stato dimostrato che la riduzione in DLP1 è la conseguenza di un elevato stress ossidativo e aumentata produzione di A β .

Studi di ibridazione *in situ* per mtDNA, unitamente a indagini immunohistochimiche per COX e analisi morfometriche, dimostrano che nei pazienti AD i neuroni colpiti da stress ossidativo contengono elevati livelli di mtDNA e COX (Castellani R *et al.*, 2002; Hirai K *et al.*, 2001). In particolare, mtDNA e COX si distribuiscono specificamente nel citoplasma neuronale, e nel caso di mtDNA nei vacuoli associati a lipofusina; le analisi morfometriche mostrano inoltre una significativa riduzione del numero di mitocondri in AD. Di notevole importanza è la scoperta che l'acido lipoico, usato come marker mitocondriale, risulta associato a strutture granulari, e all'analisi ultrastrutturale esso si colloca nel mitocondrio, citosol e in organelli identificati come vacuoli autofagici. Quest'ultimo dato dimostra che i mitocondri siano possibili target di una degradazione di tipo autofagico, osservata in AD (Moreira PI *et al.*, 2007).

Rimanendo nell'ambito di studi clinici, Raina e colleghi (2001) hanno osservato aumentati livelli delle caspasi 8 e 9 (quelle che iniziano il processo di apoptosi) in associazione alla patologia di AD, mentre nessun incremento si evidenzia nei livelli delle caspasi 3, 6 e 7 (quelle che entrano in gioco nelle fasi successive e terminali dell'apoptosi).

In un ulteriore studio, Wang e colleghi (2005) hanno quantificato le basi ossidate nel DNA nucleare e mitocondriale a livello di alcune aree cerebrali (lobo frontale, parietale e temporale e cervelletto) su autopsie *post mortem* di pazienti AD e controlli sani di età corrispondente. I risultati dimostrano un aumento dei fenomeni ossidativi a livello dei lobi frontali, parietali e temporali; il mtDNA presenta una quantità di basi ossidate 10 volte superiore a quella del

DNA nucleare. Inoltre, il massimo livello di ossidazione si rileva a livello del lobo temporale, mentre il cervelletto risulta poco interessato dal danno ossidativo; tali dati confermano che lo stress ossidativo a carico di mtDNA abbia un ruolo fondamentale nel processo degenerativo, osservato in AD.

3. MODELLI SPERIMENTALI DI MALATTIA DI ALZHEIMER: TOPI APP23

I modelli animali sono considerati essenziali nella ricerca nel tentativo di chiarire i processi alla base di alcune malattie umane e, di conseguenza, di testare potenziali strategie terapeutiche. Ciò vale specialmente nel caso delle malattie neurodegenerative, in cui i primi step della patogenesi sono spesso non accessibili nei pazienti.

Un valido modello animale dovrebbe mostrare le stesse alterazioni istopatologiche, biochimiche, cognitive e comportamentali osservate nei pazienti affetti da Alzheimer.

Esistono numerosi modelli di topi transgenici, che evidenziano mutazioni a carico della proteina precursore amiloide (*Amyloid Precursor Protein, APP*); tra questi vi è il topo transgenico APP23 sviluppato da Sturchler-Pierrat *et al.* (1997).

I topi transgenici APP23 contengono un APP751 cDNA umano e portano la doppia mutazione Swedish associata alla AD familiare KM670/671NL, che è sotto il controllo del gene promotore neurone-specifico Thy-1, che stimola un'espressione della APP umana 7 volte maggiore rispetto a quella endogena (Sturchler-Pierrat *et al.*, 1997). Questi topi riproducono alcuni dei cambiamenti neuropatologici associati all'AD, come le placche amiloidee con un *core* di amiloide, alterazioni neuritiche e perdita neuronale (Calhoun *et al.*, 1998; Fig. 3.1.).

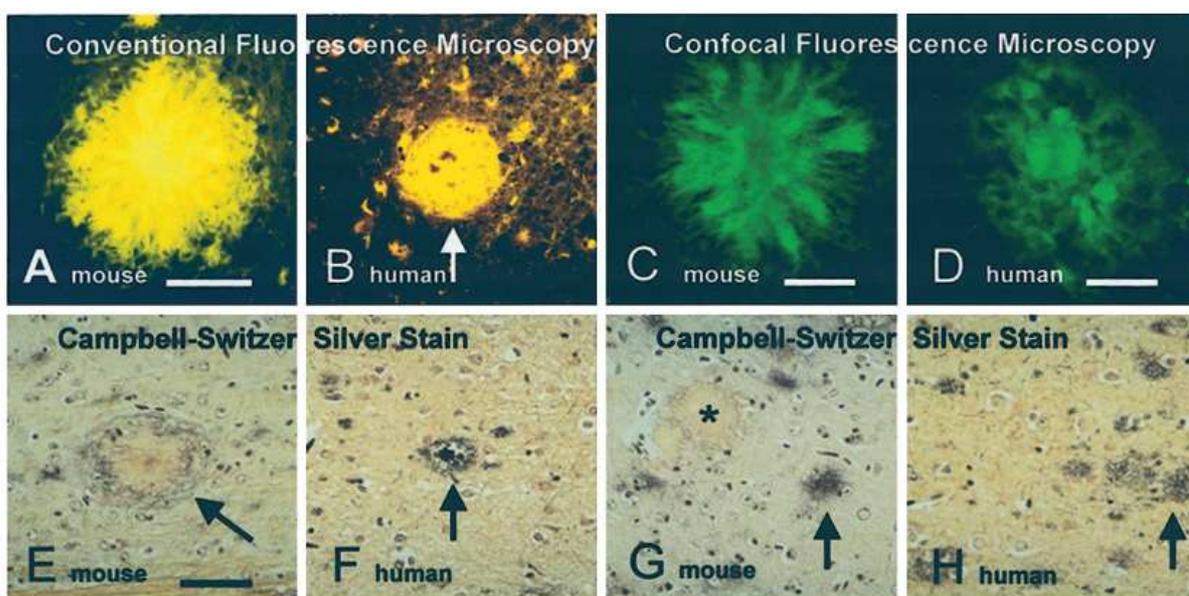


FIGURA 3.1. Fotomicrografie di placche alzheimeriane di topo transgenico (A and C) e di uomo (E and G) visualizzate con tioflavina S ed esaminate al microscopio a fluorescenza (A–D) o visualizzate con il metodo Campbell-Switzer silver ed esaminate con microscopia a campo chiaro con luce riflessa (E–H). In B la freccia indica la placca. Barre in A e B = 5 60 mm.; barra in C = 5 25 mm; barra in D = 5 15 mm. La freccia in E e l'asterisco in G mostrano come il *core* della placca sia poco colorato. La freccia in F mostra come il *core* sia intensamente colorato. Sia in G che in H le frecce indicano placche diffuse. Barra in E = 5 120 m m. Kuo YM *et al.*, *J Biol Chem.* 2001 Apr 20;276(16):12991-8. *Epub* 2001 Jan 10.

Come si evince dalla Fig. 3.1. la comparazione morfologica tra placca murina e placca umana, rivela alcune similarità ma anche alcune differenze: entrambi, sia il topo che l'uomo, possiedono placche diffuse e compatte, ma mentre quelle murine appaiono come strutture sferiche, composte da materiale filamentoso con un *core* più grande ma scarsamente colorato, poiché l'amiloide sembra più dispersa (Fig. 3.1. pannelli A, E e G), le placche umane mostrano una struttura più complessa ed un *core* intensamente colorato (Fig. 3.1. pannelli B ed F). Inoltre, i due tipi di placca differiscono anche a livello biochimico e biofisico, essendo quella umana resistente ad agenti detergenti e denaturanti e quella murina molto più solubile, a causa della mancanza di *crosslinking* covalenti (Kuo *et al.*, 2001)

In questi animali i depositi amiloidei cominciano ad apparire prevalentemente nella corteccia frontale e nel *subiculum* ad un'età di 6 mesi per le femmine e 7-8 mesi per i maschi; i depositi, in seguito, aumentano di numero e dimensione, raggiungendo il massimo tra i 12 e i 18 mesi e a 24 mesi occupano prevalentemente molte aree della corteccia (tra cui l'area somatosensoriale S1), ippocampo ed il talamo (Sturchler-Pierrat *et al.*, 1997); come nell'AD, però, nessun deposito è presente nel cervelletto.

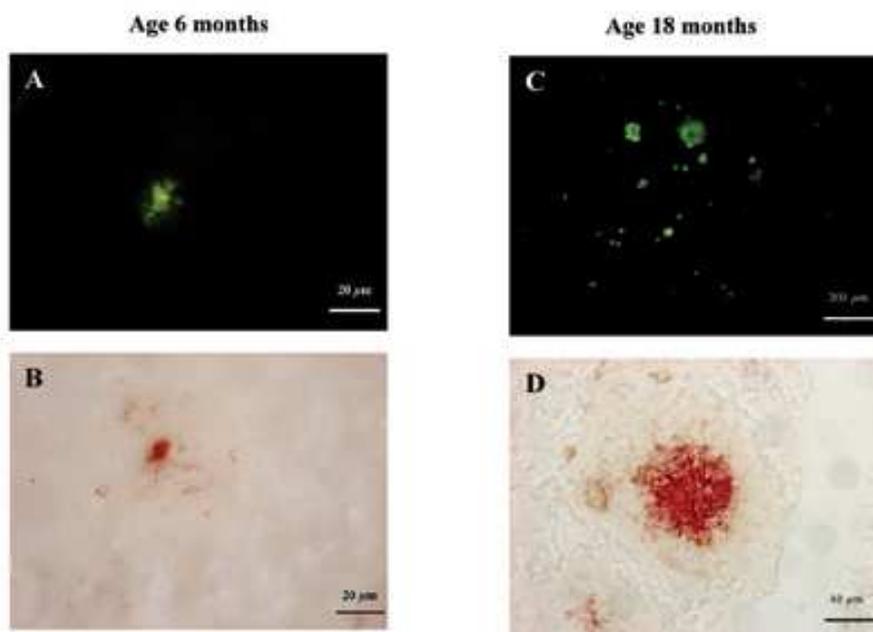


FIGURA 3.2. Evoluzione del *burden* delle placche nel cervello di APP23. Colorazione per tioflavina S (pannelli A e C) e colorazione immunohistochimica per Ab 1-40 (pannelli B e D) in neocorteccia di topo. Van Dam *et al.*, *CNS Spectr.* Vol 10, No 3.2005.

Le placche amiloidi, così come in AD, sono associate alle cellule della microglia con morfologia attivata ed ad astrociti reattivi (Sturchler-Pierrat *et al.*, 1997 ; Stalder *et al.*, 1999). I livelli di A β , coinvolta nella deposizione delle placche, aumentano, come atteso, più nella

corteccia cerebrale e nell'ippocampo: è stato stimato un aumento di oltre 500 volte tra i 4 e i 18 mesi di età (Johnson-Wood *et al.*, 1997).

Le similari caratteristiche funzionali della microglia nei topi APP23 rispetto ai pazienti con AD, rendono questi topi un modello idoneo per indagare gli effetti dei processi infiammatori nella patologia di Alzheimer (Stalder *et al.*, 1999).

I topi APP23 presentano un declino età-correlato nelle funzioni cognitive e disturbi nell'attività di base (Van Dam *et al.*, 2003; Vloeberghs *et al.*, 2004). Dall'età di 3 mesi in poi, topi eterozigoti mostrano deficit significativi nella memoria visuo-spaziale, come osservato nel *Morris Water Maze* (MWM) o labirinto ad acqua di Morris. Questi deficit di memoria spaziale precedono la prima comparsa delle placche nella neocorteccia e nell'ippocampo all'età di 6 mesi, ma sono correlati ai livelli di A β solubile. Una disfunzione colinergica, avvalorata da ridotti livelli di attività della acetilcolinesterasi e della colina acetiltransferasi nei nuclei basali anteriori cerebrali, in aggiunta ad alterazioni in altri sistemi di neurotrasmissione, potrebbe essere alla base di questo declino cognitivo (Van Dam *et al.*, 2005b).

In questi topi non è stato osservato alcun groviglio neurofibrillare, ma tutte le placche contengono tau iperfosforilata, che ricorda una precoce *tau pathology*. E' interessante ricordare che i grovigli neurofibrillari, comunque, non rappresentano una caratteristica diagnostica inequivocabile di AD, dal momento che sono presenti in un ampio *range* di condizioni neurologiche come la sclerosi laterale amiotrofica, la demenza frontotemporale o il Parkinsonismo associato con il cromosoma 17.

Recenti scoperte hanno dimostrato l'esistenza di un legame tra la amiloidosi e la formazione dei gomitoli neurofibrillari: l'iniezione di A β -42 nell'ippocampo di topi esprimenti una tau mutata causava un'accelerazione nell'assemblaggio dei filamenti di tau iperfosforilata (Götz *et al.*, 2001) e topi esprimenti doppia mutazione, sia di APP che di tau, mostravano un'accelerata formazione di grovigli neurofibrillari rispetto ai topi esprimenti solo la tau mutata (Lewis *et al.*, 2000). Queste affermazioni non fanno altro che supportare in modo più evidente che è l'amiloide, in realtà, a rivestire un ruolo centrale nella patologia dell'Alzheimer.

Un buon modello animale dovrebbe rispondere ad eventuali interventi terapeutici in modo equivalente a quello dei pazienti con AD, mimando la condizione umana in eziologia, patofisiologia e sintomatologia (De Deyn *et al.*, 2000). Van Dam *et al.* nel 2005 hanno dimostrato che la somministrazione a topi APP23 dei 4 farmaci approvati a livello internazionale per il trattamento sintomatico dell'AD (donepezil, rivastigmina, galantamina e

memantina) riduceva selettivamente o antagonizzava i deficit di apprendimento nel MWM test, accreditando, così, al modello di APP23 maggiore validità come strumento di valutazione di futuri approcci terapeutici AD-correlati.

Una buona correlazione tra i dati umani e quelli negli APP23, avvalorata ulteriormente questo modello transgenico: i benefici di un esercizio fisico regolare nei pazienti con AD sono stati ben documentati (Rolland *et al.*, 2007) ed, allo stesso modo, l'esercizio nel topo APP23 è stato dimostrato diminuire la formazione delle placche (Adlard *et al.*, 2005).

Chapman *et al.* (1999) hanno dimostrato che, in questo modello di animale transgenico, già all'età di 4-5 mesi, e prima della comparsa di alterazioni neuropatologiche assimilabili all'AD, si osserva un'alterazione significativa della plasticità sinaptica e di altri parametri elettrofisiologici. Le modificazioni nella plasticità ippocampale in topi APP23 adolescenti potrebbe risultare nello sviluppo di *deficit* di memoria più avanti nel tempo, durante il progredire della malattia (Hartl *et al.*, 2008).

Un criterio adatto per valutare i cambiamenti fisiologici in questi animali transgenici è rappresentato da un approccio elettrofisiologico, poiché esso misura direttamente la funzione neuronale in termini di eccitabilità e la loro capacità di risposta ad *input* sinaptici.

Roder *et al.* (2003) hanno eseguito un'indagine elettrofisiologica *in vitro* ed *in vivo* dei topi transgenici APP23 e documentato l'esistenza di cambiamenti neurofisiologici nell'ippocampo in presenza di depositi di β -amiloide; infatti, effettuando esperimenti su preparazioni di fettine ippocampali di topi APP23, aventi 12 e 18 mesi, la trasmissione sinaptica di base risultava significativamente ridotta, in rapporto a topi Wild-type (WT) di pari età. Questo suggerisce che alla comparsa dei depositi di placche amiloidi sia associata una riduzione della funzionalità sinaptica; tuttavia la plasticità sinaptica in tale area non sembra essere influenzata in questo modello.

La deposizione di A β a livello della vascolatura cerebrale è rilevabile nel 90% dei casi di AD; sebbene la APP transgenica sia espressa solo a livello dei neuroni, dato la neurone-specificità di Thy-1, questo modello murino sviluppa anche considerevoli accumuli di A β cerebrovascolari, facilmente rilevabili all'età di 12 mesi (Calhoun *et al.*, 1999; Bornemann e Staufenbiel, 2000; Sturchler-Pierrat e Staufenbiel, 2000 e Winkler *et al.*, 2001). Questa angiopatia cerebrale amiloide (CAA) e le patologie ad essa associate, ad es. microemorragie, ricordano le alterazioni pato-morfologiche dei pazienti con AD (Probst *et al.*, 1991 e Staufenbiel *et al.*, 1997).

Il sito di espressione della APP può anche influenzare il fenotipo transgenico: infatti, il tipo di cellula, la distribuzione regionale e la localizzazione cellulare giocherebbero un ruolo

cruciale. Per esempio, topi transgenici che esprimono A β a livello intracellulare, senza secrezione in sede extracellulare, sono caratterizzati da morte prematura, crisi epilettiche e apoptosi neuronale (LaFerla *et al.*, 1995).

La struttura primaria della APP transgenica può influenzare la comparsa temporale dei segni neurologici degli stessi animali (Hsiao *et al.*, 1995). Il transgene umano della APP, contenente mutazioni associate alla AD familiare, produce morte e neofobia nei topi transgenici prima del Wt, che esprime livelli simili di APP murina, indicando l'importanza della specie e/o della mutazione di APP.

Alla luce di ciò, la linea murina APP23 risulta essere un modello appropriato per indagare i vari aspetti dei meccanismi patogenici attivi nell'AD (Tab.3.1.), tenendo, comunque, sempre in considerazione che eventuali discrepanze tra animale e uomo possono essere legate alla minor durata di vita dell'animale e, quindi, al minor tempo di esposizione all'amiloide stessa.

TABLE 2. COMPARISON OF HISTOPATHOLOGICAL, COGNITIVE, BEHAVIORAL, NEUROCHEMICAL, AND PHARMACOLOGIC OBSERVATIONS IN THE APP23 MODEL WITH THE HUMAN CONDITION	
Human Alzheimer's disease	APP23 model
Pathological Hallmarks	
Senile plaques	Dense core plaques
Neurofibrillary tangles	Hyperphosphorylated tau, no neurofibrillary tangles
Neurodegeneration and neuronal loss	Dystrophic neurites and neuronal loss
Inflammatory processes surrounding senile plaques	Plaque-associated activation of astrocytes and microglia
Amyloid microangiopathy	Cerebral amyloid angiopathy
Cognitive Performance and Behavior	
Progressive decline of learning and memory abilities	Age-dependent deterioration of MWM performance and impaired passive avoidance learning in later stage
Circadian rhythm and sleep-wake activity disturbances	Cage activity alterations and different activity pattern during active nocturnal phase, sundowning-like alterations
Other BPSD clusters (eg, aggression, depression, anxiety)	To be further evaluated in the APP23 model
Neurochemical Alterations	
Degeneration cholinergic nucleus basalis of Meynert and neocortical cholinergic deficits correlating with cognitive impairment	Distortion and reduction of cholinergic fiber network and reduction ChAT enzyme activity reduction of specific ChAT and AChE activity in basal forebrain
Other neurotransmitter and receptor density alterations	Alterations in noradrenergic, serotonergic, and glycinergic transmission, altered levels of non-neurotransmitter amino acids and changes in neuropeptide levels
Pharmacologic Treatment	
Symptomatic efficacy of treatment with donepezil, rivastigmine, galantamine, memantine	Treatment with donepezil, rivastigmine, galantamine, and memantine improves cognitive deficits in MWM
MWM=Morris water maze; BPSD=behavioral and psychological signs and symptoms of dementia; ChAT=choline acetyltransferase; AChE=acetylcholinesterase.	
Van Dam D, Vloeberghs E, Abramowski D, Staufenbiel M, De Deyn PP. <i>CNS Spectr</i> . Vol 10, No 3. 2005.	

TABELLA 3.1. Comparazione di osservazioni istopatologiche, cognitive, comportamentali, neurochimiche e farmacologiche tra topi APP23 e pazienti con AD. Van Dam *et al.*, *CNS Spectr*. Vol 10, No 3.2005.

4. RECETTORE SCAVENGER CD 36

I recettori *scavenger* sono proteine di superficie che mediano l'adesione cellulare e l'endocitosi di varie sostanze native e patologicamente modificate e partecipano al segnale intracellulare, al metabolismo lipidico e alla difesa contro batteri patogeni.

La microglia, le mastocellule, gli astrociti, le cellule cerebrali endoteliali microvascolari, le cellule cerebrali muscolari lisce delle arterie e le cellule epiteliali del pigmento retinico esprimono uno o più di questi recettori *scavenger*.

Il termine di *scavenger receptor* (SR) fu coniato circa venti anni fa per descrivere un sito di *binding* (legame) sui macrofagi ad elevata affinità per le lipoproteine a bassa densità acetilate (acLDL) (Goldstein *et al.*, 1979). Successivamente fu dimostrato che i macrofagi ed altre cellule in molte specie esprimono molteplici recettori strutturalmente distinti, che mediano il legame di acLDL e di altre lipoproteine modificate, come le LDL ossidate (oxLDL) (Podrez *et al.*, 2000; Platt e Gordon, 2001; Krieger, 2001), permettendo così di includere nella famiglia degli SR molte altre molecole, tra cui anche SR di classe A (SR-A) e SR di classe B tipo I (SR-BI).

È stato dimostrato che alcuni di questi recettori partecipano alla captazione e legame di una varietà di sostanze strutturalmente differenti tra loro, tra cui le fibrille di β -amiloide (fA β), la trombospondina 1 (TSP-1), i polisaccaridi anionici, i polinucleotidi, le cellule apoptotiche eucariotiche e molti batteri, tanto che fu dato loro il nome di recettori multiligandi (Krieger e Stern, 2001).

4.1. Struttura di CD36

CD36 è una glicoproteina di membrana, che appartiene alla classe B della famiglia dei recettori cellulari *scavenger* di superficie, del peso molecolare di 88 kDa, costituito da 471 residui aminoacidici. Esso ha due corti domini intracellulari e un largo dominio extracellulare. È N-glicosilata in numerosi siti e questo spiegherebbe la discrepanza tra il peso molecolare atteso (53kDa) e quello osservato (78-88 kDa).

La regione transmembrana è compresa tra i residui 439 e 465, mentre i residui 466-471 formano una corta coda citoplasmatica. Tra i residui 184 e 204 è compresa una regione idrofobica, che può venire in contatto con la membrana o formare una tasca idrofobica (Fig. 4.1.1).

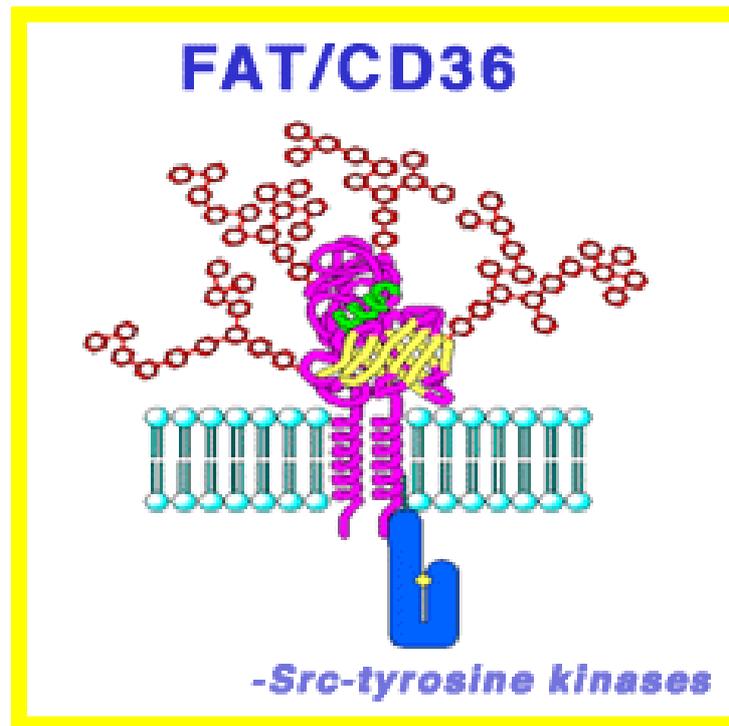


FIGURA 4.1.1. Rappresentazione schematica del recettore transmembranario CD36.

Gli aminoacidi 93-120 definiscono un sito di legame di minima alta affinità per TSP-1, che può essere modulato da una sequenza a valle (aminoacidi 139-155). Il sito di legame per le oxLDL è stato mappato a livello del dominio maggiore (aminoacidi 120-155); è stata identificata anche una regione con minor affinità a livello degli aminoacidi 28-93. Il sito di legame per le cellule apoptotiche e gli eritrociti infetti dal *Plasmodium Falciparum* giace tra gli aminoacidi 155 e 183, ma questa conclusione si basa solo su studi di inibizione con anticorpi monoclonali (mAb). Anticorpi per questo epitopo immunodominante bloccano tutte le funzioni di CD36, incluso il legame a TSP-1. Il sito per quest'ultimo legame è contenuto in una sequenza altamente conservata nei membri della famiglia del CD36, chiamata dominio CLESH (CD36 *LIMP II Emp sequence homology*; Crombie e Silverstein, 1998), che si ritrova anche in altre proteine (Fig. 4.1.2.)

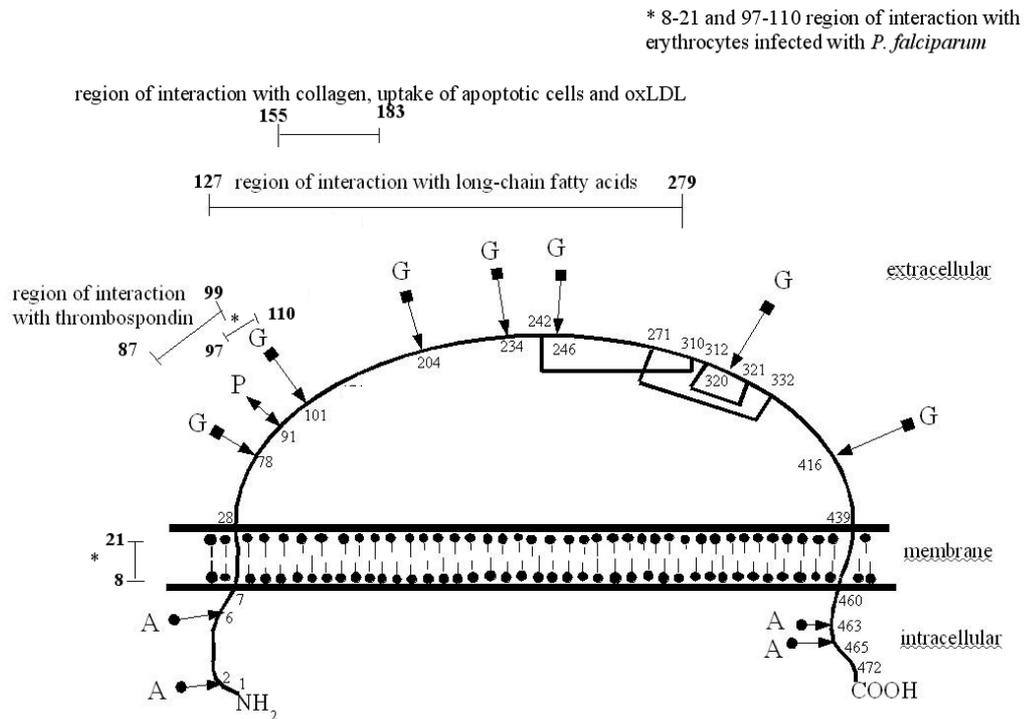


Figure legends: A – site of acylation (palmitoylation), G – site of glycosylation, P – site of phosphorylation
 disulfide bonds

Distinguished: two cytoplasmic, two transmembrane fragments and one extracellular fragment.

FIGURA 4.1.2. . Diagramma della struttura di CD36.

4.2. Modificazioni post-trascrizionali

Sono state identificate due forme alternative di mRNA per CD36: la prima è espressa nelle cellule HEL e manca dei residui aminoacidici 41-143; la seconda non è stata ancora sequenziata, ma in essa mancano gli ultimi 89 residui.

4.3. Modificazioni post-traduzionali

CD36 presenta 10 siti di glicosilazione N-terminali nella porzione extracellulare. Si ritiene che la glicosilazione conferisca al recettore la resistenza al clivaggio proteolitico come nei lisosomi o aree di infiammazione o danno tissutale.

La treonina in posizione 92 può essere fosforilata e lo stato di fosforilazione indurrebbe una variazione dell'affinità di legame di CD36 per TSP-1 ed il collagene (Asch *et al.*, 1993).

CD36 può essere palmitoilato a livello delle corte code citoplasmatiche C ed N-terminali (9-13 aminoacidi) (Gruarin *et al.*, 2000).

CD36 interagisce con la caveolina-1 in una speciale microinvaginazione della membrana plasmatica, conosciuta come *caveolae* (Lisanti *et al.*, 1994). Questa struttura, arricchita di colesterolo e sfingolipidi, è preposta a concentrare i recettori ed i prodotti dell'attivazione recettoriale (secondi messaggeri) e facilita l'integrazione della cascata dei secondi messaggeri. Per esempio nelle piastrine, in aggiunta a CD36, anche *src* e la kinasi *lyn src*-dipendente, si co-localizzano in queste strutture (Dorahy *et al.*, 1996).

Inoltre, le *caveolae* rivestono un ruolo nel traffico intracellulare del colesterolo. Le oxLDL depletano le *caveolae* cellulari endoteliali di colesterolo, causando uno spostamento della ossido nitrico sintasi endoteliale e un'alterata risposta all'acetilcolina (Uittenbogaard, 2000). Questi effetti negativi delle oxLDL sono mediati da CD36 e possono essere antagonizzati dall'interazione di SR-BI con le HDL, che prevengono la deplezione di colesterolo.

Recentemente è stato dimostrato che CD36 ed altre proteine acilate, che sono indirizzate a livello delle *caveolae*, possono inibire la fosforilazione di caveolina-1 (Lee *et al.*, 2001), suggerendo l'esistenza di un nuovo meccanismo di regolazione dipendente dai lipidi.

In conclusione, sono stati riconosciuti almeno tre potenziali ruoli per CD36 a livello delle *caveolae*: come recettore che indirizza specifici ligandi in sede caveolare, come sistema recettoriale capace di produrre secondi messaggeri ed, infine, come regolatore della funzione caveolare.

4.4. Regolazione dell'espressione di CD36

L'espressione di CD36 è ubiquitaria ed include l'endotelio microvascolare (ma non dei grandi vasi), gli adipociti, la muscolatura scheletrica striata, le cellule dendritiche, l'epitelio della retina, la ghiandola mammaria e la mucosa intestinale, le cellule muscolari lisce (Matsumoto *et al.*, 2000) e le cellule ematopoietiche, tra cui eritroblasti, piastrine, monociti/macrofagi (Ockenhouse *et al.*, 1989; Silverstein *et al.*, 1989; Alessio *et al.*, 1996; Huh *et al.*, 1996) e megacariociti (Febbraio *et al.*, 2001). I livelli di CD36 a livello del fegato umano, invece, sono ridotti.

L'espressione di CD36 è altamente regolata nei monociti e può subire *up-regulation* per opera di numerosi fattori che agiscono, indirettamente, a livello trascrizionale: molecole di adesione, M-CSF, GM-CSF, LDL native e modificate, colesterolo ed IL-4 (Yesner *et al.*, 1996) (Fig. 4.4.1).

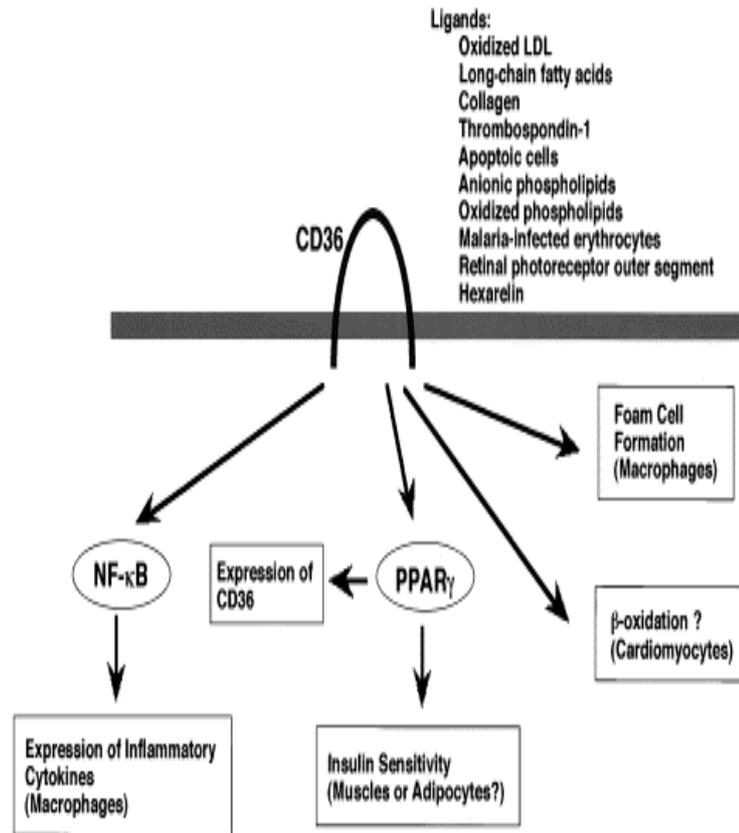


FIGURA 4.4.1. Cascata degli eventi intracellulari mediati da PPAR- γ dopo attivazione del recettore CD36 da specifici ligandi.

L'induzione di CD36 in risposta a questi diversi stimoli è anche dipendente dall'espressione ed attivazione del recettore attivato dal proliferatore dei perossisomi (PPAR- γ), un membro della superfamiglia dei recettori ormonali nucleari, che controllano l'omeostasi lipidica e il differenziamento cellulare.

L'espressione di PPAR- γ è indotta nei macrofagi in risposta a citochine o fattori di crescita rilasciati durante l'infiammazione (Huang *et al.*, 1999): per esempio IL-4, M-CSF ed GM-CSF aumentano l'espressione di PPAR- γ (Huang *et al.*, 1999).

L'espressione di CD36 è diminuita dai corticosteroidi, TGF- β 1, HDL e LPS (Huh *et al.*, 1996; Feng *et al.*, 2000)

L'espressione di CD36 si correla con la maturazione monocitaria e subisce un fenomeno di *down-regulation* durante l'infiammazione.

Come precedentemente detto, il recettore ormonale nucleare PPAR γ regola l'espressione di CD36 (Nagy *et al.*, 1998; Tontonoz *et al.*, 1998); in particolare, si formerebbe un

complesso eterodimerico tra PPAR γ e RXR, il recettore X dei retinoidi, che interagisce con una sequenza promotrice del gene del CD36, detta elemento PPAR- γ -responsivo (Tontonoz *et al.*, 1998).

Il complesso eterodimerico PPAR- γ -RXR è il regolatore trascrizionale di geni che codificano per proteine coinvolte nell'adipogenesi e nel metabolismo lipidico (Tontonoz *et al.*, 1995; Fig.4.4.2.)

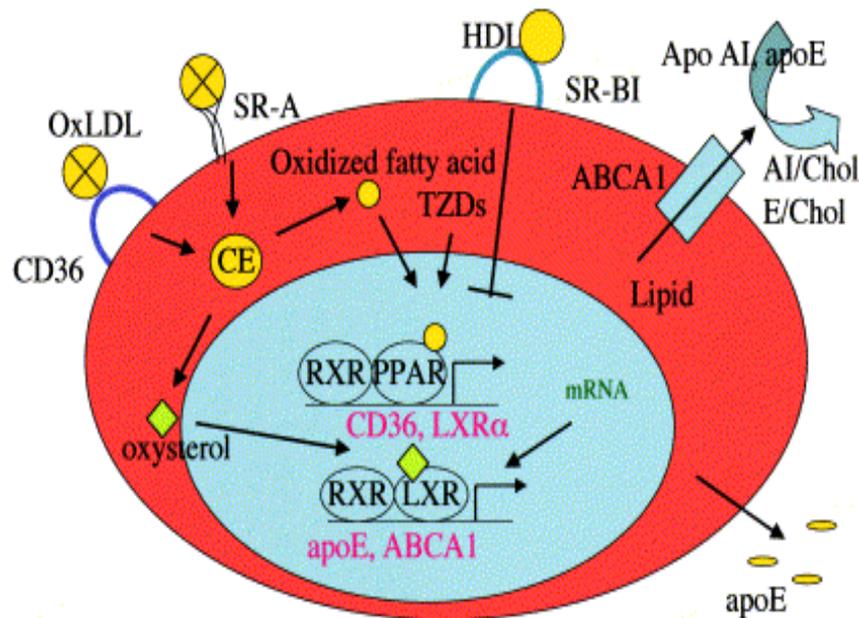


FIGURA 4.4.2. Formazione del complesso eterodimerico PPAR γ -RXR che modula la trascrizione di specifici geni dopo attivazione dei recettori *scavenger* di tipo A e B I per legame con lipoproteine.

I ligandi di PPAR- γ tra cui i lipidi derivati dalle oxLDL, l'acido 9- e 13-idrossiottodecadienoico (HODE), la prostaglandina J2 (PGJ2) ed i composti tiazolidinedionici con attività ipoglicemizzante aumentano l'espressione di CD36 (Nagy *et al.*, 1998; Tontonoz *et al.*, 1995).

L'induzione di CD36 da parte di IL-4 nei macrofagi consegue all'attivazione di alcune lipossigenasi intracellulari e alla produzione di PGJ2 (Huang *et al.*, 1999). La riduzione dell'espressione di CD36 da parte del TGF- β è, invece, conseguente alla fosforilazione ed all'attivazione di PPAR- γ .

La relazione tra l'espressione di CD36 e PPAR- γ ed il ruolo di CD36 nell'internalizzazione dei potenziali ligandi lipidici per PPAR- γ , a livello intracellulare, suggerirebbero l'esistenza di un sistema integrato di regolazione (Tontonoz *et al.*, 1998). Questo si rivelerebbe soprattutto a livello delle pareti dei vasi.

A riguardo è interessante ricordare che il CD36 è iper-espresso nelle cellule schiumose di lesioni aterosclerotiche umane aortiche e coronariche (Nakata *et al.*, 1999; Nakagawa-Toyama *et al.*, 2001).

4.5. Ligandi di CD36 ed altri Recettori Scavenger

Poiché per molti composti non è stato possibile identificare con precisione il sito di legame, si preferisce parlare genericamente di ligandi “putativi” degli SR (Krieger e Stern, 2001; Tab.4.5.1).

Putative ligands for scavenger receptors

Ligand	SR-A SR-B CD36		
LDL	-	+	-
acLDL	+	+	±
oxLDL	+	+	+
HDL	-	+	+
Long-chain fatty acids	-	-	+
BSA	-	-	-
mBSA	+	+	+
glyc CIV	+	?	?
TSP-1	?	?	+
fA β	+	+	+
AGE	+	?	+
CS	+	+	+
Fucoidan	+	+	-
poly I	+	?	-
PS	-	+	+
Apoptotic cells	+	+	+
Myelin	+	?	?
iRBC	?	?	+
Bacteria, LPS, LTA	+	?	?

TABELLA 4.5.1. Ipotetici ligandi dei recettori *scavengers* di tipo A e di tipo B e del recettore *scavenger* CD36.

Le funzioni che sono documentate per CD36 derivano dalle due maggiori proprietà: la sua abilità nel facilitare l'*uptake* di specifiche molecole lipidiche, come gli acidi grassi e le LDL ossidate, e la sua adesione a molte macromolecole cariche negativamente, con conseguente trasduzione del segnale intracellulare, con rilevanza per l'infiammazione, la fagocitosi e l'endocitosi (Husemann *et al.*, 2002)

Pertanto, queste sostanze sono state ritenute ligandi sulla base di una o più delle seguenti proprietà:

- esse sono legate od endocitate dalle cellule che esprimono gli SR o da cellule transfettate con cDNA codificante per uno degli SR;
- cellule che esprimono uno o più SR aderiscono in modo catione bivalente indipendente alla matrice, che contiene questi ligandi per gli SR;
- anticorpi specifici per gli SR bloccano la captazione dei ligandi da parte delle cellule che esprimono gli SR, e/o l'adesione di queste cellule alla matrice rivestita dal ligando degli SR; i putativi ligandi competono con altri ligandi degli SR per il legame e/o la captazione da parte delle cellule e/o bloccano l'adesione delle cellule, che esprimono gli SR alla matrice, che contiene ligandi degli SR.

Nonostante siano stati utilizzati molti di questi metodi per identificare i ligandi degli SR, con l'eccezione per gli anticorpi anti-recettore, non è stato possibile distinguere sostanze che mascherano ligandi di SR da sostanze che si legano direttamente agli SR (El Khoury *et al.*, 1996).

Come già detto in precedenza, CD36 lega un'eterogenia di ligandi: lipoproteine native e modificate (Endemann *et al.*, 1993, Nozaki *et al.*, 1995), gli acidi grassi a lunga catena (LCFA) (Abumrad *et al.*, 1993), fosfolipidi anionici ed ossidati (Rigotti *et al.*, 1995; Podrez *et al.*, 2002a, b), cellule apoptotiche (Ren *et al.*, 1995), eritrociti infetti dalla malaria (Oquendo *et al.*, 1989), collagene I e IV (Tandon *et al.*, 1989; Janabi *et al.*, 2001), segmenti esterni dei fotorecettori della retina (Ryeom *et al.*, 1996; Finnemann e Silverstein, 2001) e TSP-1 (Silverstein *et al.*, 1989). E' estremamente importante ricordare che CD36 lega anche i peptidi GH-liberatori (*GH-releasing peptides*, GHRP; Fig. 4.5.1), che, come discusso più dettagliatamente in seguito, sono composti sintetici dotati di azioni endocrine ed extraendocrine, tra cui la stimolazione della secrezione di ormone somatotropo e dell'assunzione di cibo.

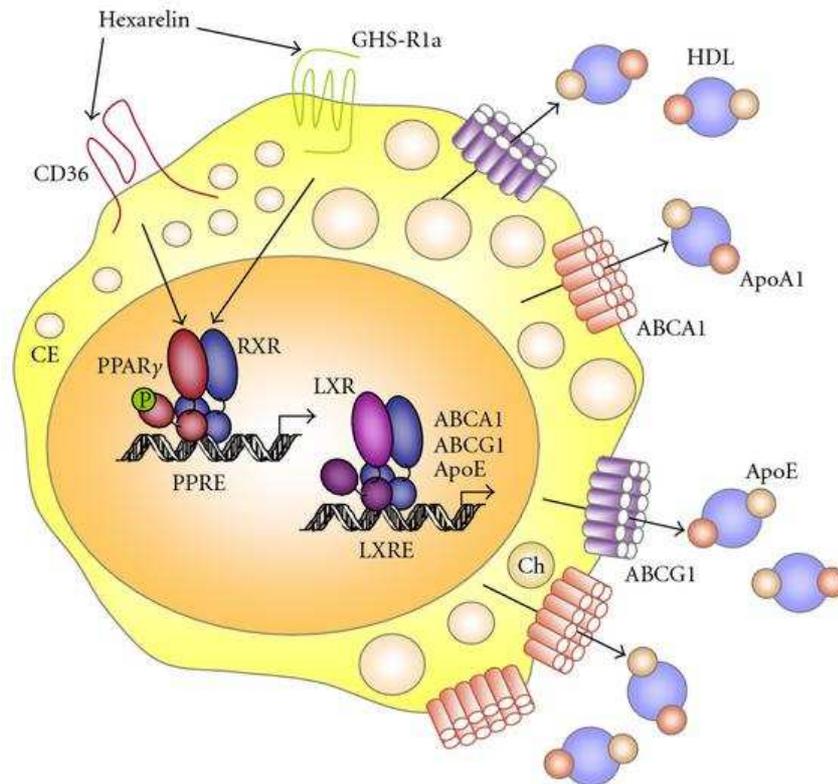


FIGURA 4.5.1. Attivazione del pathway di PPAR γ in macrofagi, come effetto dell'interazione di hexarelina con i recettori CD36 e GHS-R1a

Ghrelin, ligando endogeno dei GHRP, non lega CD36. Recentemente, è stata dimostrata la capacità di alcuni GHRP (desacil-grelina; hexarelina ed EP80317) di bloccare *in vitro* l'aumentata espressione di IL-1 β e IL-6, indotta da esposizione di cellule N9 (linea microgliale murina) ad A β ₂₅₋₃₅ (Bulgarelli I *et al.*, 2009). Dal momento che le cellule N9 non esprimono il recettore principale dei GHRP (GHS-R1a), si può facilmente postulare che l'effetto osservato sia mediato da un altro recettore, ovvero CD36. Da questi studi si dedurrebbe che CD36 sia il principale mediatore della cascata infiammatoria (espressione di citochine pro-infiammatorie), che si osserva in AD, a causa dell'accumulo dei peptidi A β neurotossici.

Infine, recentemente è stato dimostrato che CD36 lega con elevata affinità anche le fibrille della A β .

A un esame superficiale i ligandi degli SR appaiono eterogenei in composizione e struttura; tuttavia, la maggior parte dei composti presenta almeno due proprietà strutturali simili. Anzitutto, molti ligandi sono polianioni (ad esempio, l'acido polinosinico, il fucoidano, l'eparina solfato, l'acido lipoteinoico) o proteine in cui il gruppo amino ϵ dei residui lisinici è stato modificato (per esempio, acLDL, oxLDL, collagene glicato,

albumina maleilata). Quest'ultima modificazione chimica a carico della lisina conferisce carattere anionico alla proteina. Inoltre, alcuni ligandi hanno una struttura a β -foglietti, come la forma fibrillare di A β 1-42 o A β 25-35 (Lorenzo e Yankner, 1994).

4.6. Espressione di CD36 nei Tessuti Neuronal

Nel cervello umano di un adulto normale, l'endotelio capillare esprime elevati livelli di CD36, che sono facilmente individuati mediante metodi convenzionali di immunoistochimica (Barnwell *et al.*, 1989). Coraci *et al.* (2002) hanno dimostrato l'esistenza di CD36 sulla microglia primaria neonatale umana e sulle cellule N9 (Daviet *et al.*, 1995; Navazo *et al.*, 1996; Puente Navazo *et al.*, 1996).

Mancano studi che dimostrano una regolazione dell'espressione di CD36 a livello neuronale e/o microgliale (per esempio, durante lo sviluppo ontogenetico o dopo stimolazione con specifiche citochine). Poiché la microglia deriva ontogeneticamente dagli stessi precursori ematopoietici dei monociti/macrofagi, è possibile che la raffinata regolazione del CD36 analizzata in precedenza per i monociti/macrofagi valga anche per la microglia.

4.7. Funzioni di CD36

4.7.1. Possibili Funzioni di CD36 nel Sistema Nervoso Centrale

CD36 sembra essere coinvolto nell'omeostasi del SNC sia come mediatore del metabolismo lipidico a livello del SNC, della fagocitosi di cellule apoptotiche e dell'endocitosi di proteine e lipoproteine native, denaturate e chimicamente modificate, sia come attivatore della cascata del segnale di trasduzione in seguito al legame con un ligando.

Tuttavia, rimane poco chiaro quanto ciascun ruolo sia essenziale, dal momento che topi *knockout* per CD36 hanno un fenotipo normale (Suzuki *et al.*, 1997, Febbraio *et al.*, 1999; Trigatti *et al.*, 1999).

Inoltre, anche in campo umano soggetti con *deficit* di CD36 non mostrano alterazioni comportamentali di rilievo (Yamamoto *et al.*, 1994). Questi soggetti, definiti Naka-negativi, a causa di una mutazione per sostituzione di una prolina in posizione 90 con una serina, non esprimono CD36 contemporaneamente su piastrine e su monociti (variante di tipo I) oppure solo su piastrine (variante di tipo II).

Febbraio et al. nel 1999 hanno generato un topo geneticamente deficiente in CD36 ; questo animale non mostra ovvie anomalie di comportamento, suggerendo che il ruolo di CD36 nel fornire gli acidi grassi potrebbe essere marginale. Inoltre questi topi sono stati esaminati con il plus maze test, usato per misurare l'ansia e la capacità di esplorazione, ma non è stata trovata alcuna differenza rispetto ai WT. Infine il radial maze a 8 braccia, utilizzato per testare la capacità di apprendimento, ha dimostrato che i topi CD36-nulli hanno un deficit nella capacità di imparare, facendo sostanzialmente più errori rispetto ai controlli (Nada *et al.*, 2004).

4.7.2. Metabolismo lipidico e ruolo di CD36

Nel sangue i lipidi ed il colesterolo sono trasportati dalle lipoproteine. Le LDL contengono principalmente l'apolipoproteina B, mentre le HDL le apolipoproteine A-I, A-II, C ed E.

Le lipoproteine, che si ritrovano a livello del fluido cerebrospinale (CSF), sono HDL-simili e sono prodotte principalmente dagli astrociti (Ladu et al., 2000).

CD36 partecipa al legame e trasporto degli acidi grassi a lunga catena (LCFA) nelle cellule e nei tessuti quali adipociti, miocardio e muscolatura scheletrica (Abumrad *et al.*, 1993; Febbraio *et al.*, 2001) dove le LCFA sono importanti substrati per la produzione di energia.

Topi CD36^{-/-} hanno una diminuzione del trasporto delle LCFA da parte del tessuto adiposo e della muscolatura, un aumento dei livelli plasmatici di acidi grassi liberi, triacilglicerolo e colesterolo ed ipoglicemia a digiuno (Febbraio *et al.*, 1999); soggetti umani con *deficit* di CD36 presentano una diminuzione dei livelli circolanti di LCFA (Hwang *et al.*, 1998, Febbraio *et al.*, 1999).

CD36 lega le HDL con elevata affinità, ma ha una capacità estremamente ridotta di scambiare il colesterolo delle HDL rispetto ad altri SR, come ad esempio SR-A (Febbraio *et al.*, 1999). Ciò suggerisce un ruolo minore di CD36 nel metabolismo del colesterolo. Tuttavia, sia uomini che topi con *deficit* di CD36 hanno elevati livelli plasmatici di colesterolo (Febbraio *et al.*, 1999; Yanai *et al.*, 2000). Il legame, l'internalizzazione e la degradazione delle oxLDL da parte di CD36 sono più efficienti rispetto alle LDL e alle acLDL (Nicholson *et al.*, 1995).

Le lipoproteine, tra cui quelle presenti nel CSF, sono suscettibili all'ossidazione (Bassett *et al.* 1999). Lipoproteine modificate in senso ossidativo sono neurotossiche e stimolano i

macrofagi, la microglia e gli astrociti a secernere sostanze neurotossiche, quali le specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Kivatinitz *et al.*, 1997; Bassett *et al.*, 1999; Maxeiner *et al.*, 1998; Keller *et al.*, 1999; 2000).

Questo indicherebbe l'importanza di una rapida rimozione delle lipoproteine ossidate dal SNC. In periferia le lipoproteine ossidate sono rimosse efficacemente dalla circolazione per opera degli epatociti che esprimono gli SR (Van Oosten *et al.*, 1998; 2001). Allo stesso modo gli SR degli astrociti e della microglia potrebbero mediare questo processo nel SNC.

Tuttavia, non vi sono prove di un ruolo di CD36 nella rimozione di lipoproteine modificate da parte di cellule derivate dal SNC. Infatti, i meccanismi che mediano la rimozione di lipoproteine modificate dal SNC non sono stati studiati in dettaglio.

4.7.3. Fagocitosi

Un'altra funzione di importanza primaria degli SR è quella di rimuovere cellule apoptotiche, che si presentano durante lo sviluppo, la normale omeostasi e le infezioni (Bird *et al.*, 1999). CD36 è stato implicato nella rimozione di cellule apoptotiche, detriti cellulari, batteri, mielina e dei segmenti esterni dei bastoncelli; inoltre, esso svolge un ruolo nella rimozione di neutrofili apoptotici da parte dei macrofagi in cooperazione con l'integrina $\alpha_v\beta_5$ (Savill *et al.*, 1992). L'incubazione dei macrofagi con cellule apoptotiche indurrebbe un aumento nell'espressione di mediatori anti-infiammatori: questo effetto è mediato da CD36.

Nel SNC gli SR partecipano alla fagocitosi di cellule apoptotiche: le cellule coinvolte sono sia la microglia che gli astrociti.

La microglia nel cervello adulto umano esprime ridotti livelli di CD36 (Coraci *et al.*, 2002). Non è stato ancora dimostrato se CD36 abbia un ruolo nella fagocitosi delle cellule apoptotiche da parte della microglia nel SNC, come nella captazione di neutrofili, linfociti e fibroblasti in apoptosi da parte dei macrofagi/monociti periferici (Savill *et al.*, 1992; Ren e Savill, 1995; Puente Navazo *et al.*, 1996; Albert *et al.*, 1998).

Il riconoscimento e la internalizzazione da parte delle cellule dendritiche (DCs) di cellule apoptotiche, neoplastiche od infettate da virus, sono seguiti dalla presentazione degli antigeni tumorali o virali a cellule T CD8+ nel contesto del MHC-I. Le fasi di riconoscimento e captazione sono mediate da CD36 e dalla integrina $\alpha_v\beta_5$ (Albert *et al.*,

1998). Questo processo ricorda la funzione di CD36 nei macrofagi, ma nelle cellule dendritiche è finalizzato alla presentazione antigenica e non semplicemente alla degradazione delle cellule apoptotiche. Queste osservazioni, pertanto, sono a sostegno dell'ipotesi che gli SR siano originati dal sistema immunitario innato come molecole per il riconoscimento di antigeni esterni e, successivamente, specializzati nelle cellule dendritiche come recettori, per indirizzare gli antigeni esterni al processamento endosomico per la produzione di epitopi di presentazione nel contesto di MHC-I (Krieger, 1997).

4.8. Ruolo di CD36 nelle Malattie

4.8.1. Malattia di Alzheimer

I depositi intraparenchimali di $fA\beta$, come già citato nella parte introduttiva sull'AD, sono costituiti da peptidi di $A\beta$ di 40/42 aminoacidi, circondati da microglia attivata, astrociti e neuriti distrofici (Wisniewski *et al.* 1989; Selkoe, 2000): l'insieme costituisce la placca senile. L'infiammazione, che si sviluppa a livello della placca senile, riveste un ruolo importante nella patogenesi dell'AD (Akiyama, 1994; El Khoury *et al.*, 1998) e le cellule principalmente coinvolte in questo processo sono la microglia (Meda *et al.*, 1995; El Khoury *et al.*, 1998). Microglia ed astrociti, insieme ad altre cellule del SNC, che esprimono SR, interagiscono *in vitro* con $fA\beta$. Il legame è specifico ed induce attivazione di NF- κ B, importante attivatore trascrizionale, che, dopo essersi legato al DNA, induce un aumento della fosforilazione di proteine cellulari e produzione di sostanze proinfiammatorie, come i ROS, il TNF- α , l'ossido nitrico (NO) e le componenti del sistema del complemento (McDonald *et al.*, 1998; Combs *et al.*, 1999, 2001; Terry, 1999; Nakai *et al.*, 2001).

E' stato ipotizzato che CD36 abbia un ruolo nella patogenesi dell'AD (Coraci *et al.*, 2002), il suo legame con le $fA\beta$ attiva una sequenza di eventi che inducono neurotossicità. L'accumulo di $A\beta$ induce l'espressione di CD36 sulla microglia, che si attiva per eliminare l'amiloide accumulata. In questo modo CD36 funzionerebbe come parte di una risposta innata neuroprotettiva contro la neurotossicità. Tuttavia, è possibile che in condizioni in cui la *clearance* della $A\beta$ sia inadeguata, la continua induzione di CD36, con conseguente produzione di eccesso di ROS e chemochine da parte della microglia, potrebbe contribuire alla neurodegenerazione (Ricciarelli *et al.*, 2004) e, pertanto, il ruolo di CD36 potrebbe diventare dannoso.

In realtà, CD36 richiede l'intervento di altre proteine: solo la formazione del complesso eterotrimerico costituito da CD36, integrina $\alpha_6\beta_1$ e CD47 attiva, con un meccanismo tirosin-chinasi dipendente, il *burst* respiratorio con produzione di ROS e di IL-1 β . È interessante notare che questo recettore non è in grado di interagire con la forma non fibrillare di A β (Fig. 4.8.1.1).

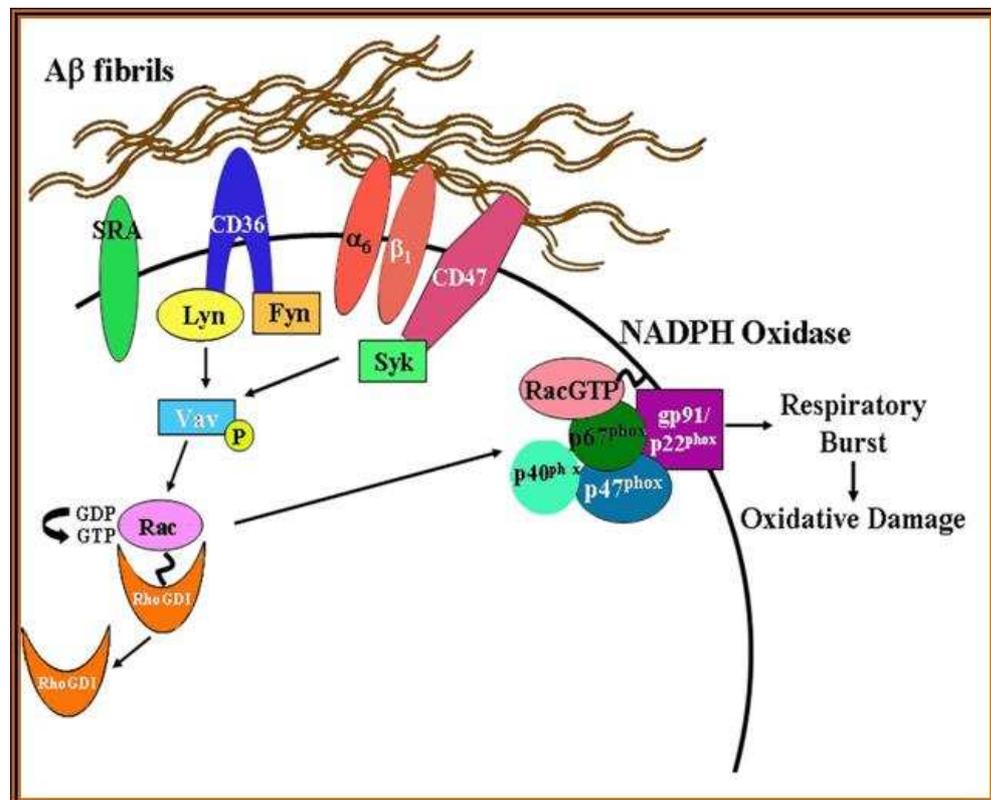


FIGURA 4.8.1.1. Modello di interazione delle fibrille di A β con il complesso recettoriale di superficie di una cellula microgliale con attivazione della cascata di traduzione del segnale intracellulare. *Wilkinson BL, Landreth GE J Neuroinflammation. 2006 Nov 9;3:30 modif.*

L'integrina $\alpha_6\beta_1$ è un elemento centrale del complesso recettoriale ed è essenziale per l'adesione e la risposta alle fA β . Il legame della subunità β_1 aumenta la fosforilazione tirosin-dipendente di molte proteine cellulari, con la successiva produzione di citochine pro-infiammatorie come IL-1 β (Lyn *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 2000).

E' stato ipotizzato che CD47 svolga un ruolo cruciale nel trasdurre la stimolazione recettoriale del complesso indotta da fA β e TSP-1 su monociti e microglia (Bamberger *et al.*, 2003). CD47 è una proteina integrale di membrana, che interagisce funzionalmente con l'integrina β_1 , modulando la funzione del complesso recettoriale CD36 dipendente. CD47 interagisce con altre proteine implicate con la generazione del segnale a livello intracellulare (Porter e Hogg, 1998).

Essa può anche agire indipendentemente, interagendo direttamente con proteine fibrillari come TSP-1 ed altre proteine di superficie (Jang *et al.*, 1999; Babic *et al.*, 2000, Brown e Frazier, 2001).

È stato dimostrato che CD47 è essenziale per il legame di fA β alla cellula e la conseguente attivazione della cascata intracellulare delle tirosin-chinasi (Bamberger *et al.*, 2003).

Non si conosce il contributo di ogni componente del complesso recettoriale CD36- $\alpha_6\beta_1$ -CD47 nell'attivare il segnale intracellulare; il contatto di fA β con la struttura recettoriale CD36- $\alpha_6\beta_1$ -CD47 favorirebbe l'adesione delle fibrille alla superficie cellulare, con la conseguente immobilizzazione ed aggregazione focale di più complessi recettoriali. È importante sottolineare l'azione cooperativa degli elementi del complesso recettoriale. Se con l'uso di specifici mAb si impedisce l'interazione di fA β anche solo con una componente del complesso CD36- $\alpha_6\beta_1$ -CD47 viene inibita, infatti, l'azione di stimolo della A β sulla cascata intracellulare; ne è una riprova, peptidi che interagiscono con il sito di legame dei singoli recettori non hanno alcuna attività agonistica.

Il legame di fA β alla microglia ed ai monociti induce l'associazione di CD36 alla fosfotirosinkinasi *Src* (PTK) *Lyn* e attiva una cascata di eventi intracellulari, che coinvolge *Fyn*, un altro membro della famiglia delle PTK, e la protein-kinasi mitogeno-attivata p44/42 (MAPK) (McDonald *et al.*, 1997; Combs *et al.*, 1999).

L'interazione di CD36 e *Lyn* nei macrofagi è essenziale per l'attivazione a valle di p44/42 e la successiva risposta pro-infiammatoria alla A β , diversamente da *Fyn*, che resta un importante componente di questa via intracellulare, che sembra interagire indirettamente con CD36 (Moore *et al.*, 2002).

L'interruzione della via intracellulare attivata da *Lyn* o *Fyn* inibisce *in vitro* la risposta infiammatoria dei macrofagi; questa attivazione estrapolata *in vivo*, significherebbe una riduzione del numero di macrofagi attivati nei siti di accumulo della A β nel cervello (Moore *et al.*, 2002).

Da modelli *in vivo* è stato osservato che CD36 attivato da fA β 1-42 induce la produzione dei ROS da parte di macrofagi umani monocito-derivati, microglia umana neonatale e cellule N9 (Daviet *et al.*, 1995; Navazo *et al.*, 1996; Puente Navazo *et al.*, 1996).

CD36, inoltre, sembrerebbe rivestire un ruolo anche nella angiopatia di AD: le cellule endoteliali del microcircolo cerebrale, sede di accumulo di fA β nell'angiopatia di AD (Esiri *et al.*, 1986; Yamaguchi *et al.*, 1992) sembrano esprimere CD36 (Barnmell *et al.*, 1989).

Eritrociti infetti dalla malaria interagiscono con CD36 sulle cellule endoteliali a livello del circolo cerebrale, alterando l'integrità della BEE (Pino *et al.*, 2005). Anche la fA β esercita lo stesso effetto (Claudio, 1996) e, quindi, ciò suggerisce che l'interazione di CD36 con fA β , depositata negli spazi subendoteliali, possa contribuire all'aumento della permeabilità della BEE, osservata nell'AD (Verdier *et al.*, 2004).

4.8.2. Neuropatia periferica diabetica

E' noto che nel paziente diabetico con neuropatia si accumulano proteine altamente glicosilate, chiamate prodotti terminali di glicosilazione avanzata (AGEs), a livello della mielina e della matrice extracellulare (Brownlee, 1992).

CD36 funge da recettore anche per AGEs (El Khoury *et al.*, 1994; Ohgami *et al.*, 2001 a; b). Da qui deriva l'ipotesi che CD36 possa svolgere un ruolo nella patogenesi della neuropatia periferica diabetica.

Nel paziente diabetico le proteine AGE-modificate alterano anche la funzione vascolare, interagendo con specifici recettori del tipo SR su macrofagi e su cellule endoteliali, inducendo iperproduzione di matrice, trombosi focale e vasocostrizione (Baynes, 2001). Questo potrebbe aggravare ulteriormente la neuropatia diabetica.

4.8.3. Malattie da demielinizzazione

Mentre la neuropatia diabetica periferica potrebbe riflettere una "eccessiva" interazione degli SR con la mielina glicata e le proteine di matrice, un *deficit* dell'attività degli SR potrebbe essere la causa dell'accumulo di detriti potenzialmente neurotossici nel sistema nervoso e indurre forme di alterata mielinizzazione (demyelinizzazione).

4.8.4. Malaria

CD36 appare come il maggior recettore per gli eritrociti infettati dal *Plasmodium Falciparum* (Oquendo *et al.*, 1989).

L'evento patofisiologico che caratterizza la malaria è l'adesione degli eritrociti parassitati al microcircolo di organi chiave, specialmente a livello del cervello: un processo conosciuto come citoaderenza.

Varie regioni della struttura proteica di CD36 sono implicate nella citoaderenza (Ockenhouse *et al.*, 1991): i residui 155-183 (Daviet *et al.*, 1995), 146-164 e 145-171

(Baruch *et al.*, 1999), tutti compresi in una regione extracellulare immunodominante ed idrofobica, ed i residui 8-21 e 97-110 (Asch *et al.*, 1993). Tuttavia, è importante precisare che alcune di queste osservazioni furono determinate usando metodi indiretti, come anticorpi bloccanti la citoaderenza, che potrebbero inibire aspecificamente la citoaderenza solo per ingombro sterico.

Anche le regioni nell'estremità C-terminale di CD36 sembrerebbero influenzare la citoaderenza (Serghides *et al.*, 1998).

Con la citoaderenza gli eritrociti parassitati vengono sequestrati e sfuggono alla sorveglianza del sistema immunitario. Pertanto, Aitman *et al.* (2000) hanno proposto l'ipotesi che un *deficit* di CD36 potesse essere correlato con una malattia meno severa. Questa ipotesi è stata smentita: infatti, i pazienti con *deficit* di CD36 sviluppano una malattia molto più grave, suggerendo, quindi, che l'espressione di CD36 da parte del macrofago è fondamentale ai fini della rimozione degli eritrociti infettati. Un'ulteriore conferma deriva dal lavoro di McGilvray *et al.* (2000) che hanno dimostrato che CD36 media la fagocitosi non opsonica degli eritrociti infetti da parte dei macrofagi, mediante riconoscimento di un ligando parassita-codificato simile alla TSP-1.

4.8.5. Emoglobinopatie

CD36 riconosce anche alterazioni nella membrana eritrocitaria, indotti dalla emoglobina S, mutazione prevalente nella popolazione africana.

Il marcato rallentamento del flusso ematico delle cellule falciformi favorisce una maggiore interazione tra CD36 dell'endotelio e TSP-1 dell'eritrocita, contribuendo alla patobiologia vascolare della malattia (Sugihara *et al.*, 1992).

Inoltre gli eritrociti falciformi sono caratterizzati da alterazioni strutturali della membrana; come per le cellule apoptotiche, questo potrebbe promuovere il riconoscimento, con successiva captazione, da parte di CD36 di origine macrofagica.

È interessante notare che l'eterozigosi per l'emoglobina S protegge contro la malaria causata dal *Plasmodium Falciparum*, poiché i parassiti non possono infettare i reticolociti.

4.8.6. Aterogenesi

Un'importante ruolo patologico svolto da CD36, relativo alla formazione di cellule schiumose da macrofagi ed alla patogenesi dell'aterosclerosi, è il riconoscimento e l'internalizzazione di oxLDL (Endemann *et al.*, 1993).

CD36 riconosce le LDL modificate per ossidazione da radicali liberi prodotti dal sistema mieloperossidasi (MPO-oxLDL; Podrez *et al.*, 1999). La formazione delle cellule schiumose MPO-oxLDL-dipendente può essere inibita utilizzando anticorpi anti-CD36 (Podrez *et al.*, 2000).

In risposta ad un danno endoteliale, i macrofagi e le LDL migrano nello spazio sub-endoteliale, in cui vengono intrappolate (Steinberg, 1997). Uno stimolo infiammatorio porta alla secrezione, da parte degli endotelioцитi e macrofagi, di prodotti ossidanti, tra cui NO e il perossido di idrogeno. Questi generano oxLDL, ligandi CD36-specifici o ligandi per altri SR.

L'internalizzazione delle oxLDL tramite CD36 genera dei sottoprodotti lipidici (9-HODE, 13-HODE e PGJ2), mediati dalla lipossigenasi o da altre vie metaboliche, che, a loro volta, forniscono ligandi per il fattore di trascrizione PPAR- γ . Il legame di queste strutture lipidiche porta PPAR- γ a dimerizzare con RXR e modifica il complesso in modo che esso possa traslocare nel nucleo e attivare la trascrizione di geni bersaglio (vedi sopra). Poiché questi geni bersaglio includono sia PPAR- γ che CD36, si attiva un circuito di amplificazione del segnale: l'incremento dell'espressione di CD36 promuove la captazione delle oxLDL, perpetuando il ciclo e causando l'accumulo di esteri del colesterolo da parte dei macrofagi e la successiva trasformazione in cellule schiumose (Steinberg, 1997).

4.9 CD36 e l'attività anti-angiogenica di TSP-1

La TSP-1 e i frammenti da essa derivati furono identificati come potenti inibitori endogeni dell'angiogenesi tumorale, efficaci contro tutti gli induttori angiogenici, tra cui bFGF e VEGF (Good *et al.*, 1990). Il segnale anti-angiogenico di TSP-1 viene mediato da CD36 (Dawson *et al.*, 1997; Jimenez *et al.* 2000), tramite un'interazione, che può essere modulata anche da un'altra proteina contenente il dominio CLESH, glicoproteina ricca in istidine.

Molti studi hanno dimostrato che CD36 si associa fisicamente, come precedentemente detto, con le protein-tirosin chinasi *Fyn*, *Lyn* e *Yes*. L'esposizione di cellule endoteliali alla TSP-1 favorisce il reclutamento di *Fyn* a livello del complesso di membrana CD36, con attivazione delle chinasi e successiva attivazione a valle della protein-kinasi mitogeno-attivata p38 (p38 MAPK).

L'attività anti-angiogenica della TSP-1 è legata alla capacità di indurre l'apoptosi delle cellule endoteliali tramite la via che utilizza come effettori le caspasi-3.

Il segnale di CD36 può portare alla morte cellulare programmata anche in altri tipi cellulari: l'incubazione di cellule ovariche di criceto CD36-transfettate con oxLDL induce apoptosi (Rusinol *et al.*, 2000).

5. ESPRESSIONE, SIGNALING E MALFUNZIONAMENTO DI INSULINA ED IGF-1 NEL SISTEMA NERVOSO CENTRALE

L'insulina e *insuline-like growth factor 1* (IGF-1) sono importanti modulatori dello sviluppo e del metabolismo nel SNC e, conseguentemente, l'espressione dei loro recettori risulta eterogenea nel tessuto neuronale. Insulina ed IGF-1 sono fattori neurotrofici, dal momento che stimolano la sopravvivenza e la differenziazione neuronale in assenza di altri fattori di crescita; essi promuovono la nascita e la migrazione neuritica, la sintesi proteica, l'espressione delle proteine citoscheletriche e la formazione sinaptica (Ye *et al.*, 1996; D'Ercole *et al.*, 2002; Popken *et al.*, 2004). In aggiunta, IGF-1 regola lo sviluppo e la sopravvivenza degli oligodendrociti e la mielinizzazione (D'Ercole *et al.*, 1996), mentre l'insulina è più coinvolta nella regolazione delle attività metaboliche e nel mantenimento dell'omeostasi del glucosio (Wozniak *et al.*, 1993); tale funzione è anche suggerita dalla sovrapposizione nella distribuzione dell'insulina e dei suoi recettori (IR) e dei trasportatori GLUT1 e 4 in regioni cerebrali specifiche (ippocampo e plesso corioide; Salkovic-Petrisic e Hoyer, 2007; Zhao *et al.*, 1999).

Studi di immunistochemica su biopsie umane localizzano l'insulina prevalentemente a livello di ippocampo, talamo, ipotalamo ed amigdala; l'insulina, presente a livello cerebrale, deriva *in primis* dalla sintesi pancreatica (cellule β delle isole di Langerhans), e viene trasportata nel *liquor* attraverso la BEE, ad opera di un meccanismo recettore-mediato (Erol, 2008; Salkovic-Petrisic ed Hoyer S, 2007; Banks, 2004; Burns *et al.*, 2007). In aggiunta, l'insulina può diffondere liberamente nel SNC attraverso l'area postrema, una regione circumventricolare caratterizzata da una BEE molto permeabile (Porte *et al.*, 1998; Sankar *et al.*, 2002). Alcuni autori propongono l'esistenza di una sintesi locale *de novo* dell'insulina; questa ipotesi è sostenuta dal ritrovamento di mRNA per la proinsulina I e II (proteine precursori inattive dell'insulina) nel tessuto cerebrale fetale di roditori e in colture neuronali, e da immunoreattività per l'insulina in reticolo endoplasmatico, apparato di Golgi, citosol, assoni e dendriti di cellule neuroali (Adamo *et al.*, 1989; Zhao *et al.*, 1999).

La principale risorsa di IGF-1 è rappresentata dal fegato, dove la sua produzione è stimolata dall'ormone della crescita; altri organi, quali il cervello ed il midollo spinale sono in grado di produrre tale peptide. L'IGF-1 circolante è in grado, come l'insulina, di attraversare la BEE; si dimostra che sia la frazione prodotta localmente che quella circolante sono capaci di modulare le funzioni cerebrali. L'espressione di IGF-1 presenta una distribuzione neuronale uniforme, ed è rilevata sia nelle fasi fetali che adulte dello sviluppo neuronale (D'Ercole *et*

al., 1996; D'Ercole *et al.*, 1993; Folli *et al.*, 1996) ; essa subisce una regolazione evolutiva con un picco massimo concidente con la proliferazione neuronale e lo sviluppo del neurite (Ye *et al.*, 1997). Durante lo sviluppo del SNC IGF-1 esercita azioni prevalentemente neurotrofiche, mentre nel cervello adulto si comporta come neuromodulatore e regola la plasticità sinaptica. Il fattore di crescita si dimostra protettivo contro una vasta gamma di insulti neurodegenerativi ed è coinvolto nei processi riparativi conseguenti a danno neuronale (Fernandez *et al.*, 1999; Saatman *et al.*, 1997); IGF-1 è protettivo nei confronti della tossicità indotta dal peptide A β (Dore *et al.*, 1997), dallo ione ferro (Zhang *et al.*, 1993) dall'acido kainico (Azcoitia *et al.*, 1999) ed anche nei fenomeni di ipossia-ischemia.

5.1. *Insuline receptor substrates (IRS)*

Insulina e IGF-1 esercitano le proprie funzioni sullo sviluppo cellulare e il metabolismo energetico tramite una via di trasduzione del segnale intracellulare, i cui protagonisti essenziali corrispondono a una molecole designate IRS *insuline receptor substrates*. I sottotipi 1-4 di IRS condividono una struttura molto simile, caratterizzata da un'estremità N-terminale altamente conservata e un'estremità C-terminale contenente siti multipli di fosforilazione ad attività tirosin-chinasica, essenziali per l'attivazione delle molecole effettrici situate a valle della via di trasduzione del segnale.

L'estremità N-terminale comprende tre domini funzionali, una regione PH (*pleckstrin homology*) e due regioni PDH (*phophotyrosine binding homology*). Il dominio PH media l'interazione di IRS con Tyk-2 (*Janus tyrosine kinase*) ed è importante nel coordinare IRS con i segnali mediati dai fosfolipidi e dalle proteine G (Giovannone *et al.*, 2000). Il dominio PTB interagisce con la subunità β del recettore dell'insulina e di IGF-1. L'estremità C-terminale è necessaria per l'interazione con le proteine (intermediare del segnale insulinico) contenenti il dominio SH (*src homology 2*).

La specificità del segnale trasmesso attraverso le molecole IRS risiede nella capacità del dominio PTB di interagire in modo differenziale con il recettore di insulina o IGF-1, e nella variabilità strutturale dell'estremità C-terminale, che permettono un'interazione selettiva di IRS con le proteine aventi dominio SH, le quali mediano specifiche risposte cellulari. Inoltre, l'espressione tessuto-specifica dei diversi sottotipi di IRS determina una risposta cellulare differenziale a insulina e IGF-1).

5.2. IGF-1 e il suo recettore IGF-1R

IGF-1 (definito anche somatomedina C) è un ormone di natura proteica (7649 kDa) che condivide analogie strutturali con l'insulina, consiste di 70 amminoacidi disposti a formare un'unica catena contenente tre ponti disolfuro; è prodotto principalmente dal fegato, come un ormone endocrino, sotto lo stimolo dell'ormone della crescita. Circa il 98% di IGF-1 si ritrova normalmente associato con un membro delle 6 IGF binding proteins (IGF-BP); la più abbondante risulta essere IGFBP-3 (80% di IGF-1 legato) e lega IGF in un rapporto molare 1:1.

Il recettore di IGF-1 (IGF-1R) rappresenta il recettore fisiologico di IGF-1 (in grado di legare anche il recettore dell'insulina IR). IGF-1R fa parte della famiglia dei recettori tirosin chinasi dei fattori di crescita (IR, IGF-1R e IGF-2R); è un recettore transmembrana in grado di interagire sia con IGF-1 che con IGF-2, una proteina strettamente associata a IGF-1. La sua struttura comprende due subunità alfa e beta, entrambe sintetizzate da un unico mRNA precursore, il quale subisce successivamente glicosilazione e taglio proteolitico; tali modificazioni consentono la formazione della catena transmembranaria $\alpha\beta$ funzionale, la cui struttura è mantenuta intatta dalla presenza di legami Cys-Cys (cisteina-cisteina). La catena α si colloca extracellularmente, mentre la catena β attraverso il doppio strato fosfolipidico ed è responsabile della trasduzione del segnale, in seguito all'interazione recettore-ligando; il recettore maturo ha un peso molecolare di circa 320kDa.

Sia IGF-1R che IR (presentano 60% di omologia) possiedono un sito di legame per l'ATP, che viene utilizzato per conferire gruppi fosfato sui residui di tirosina nel corso dell'autofosforilazione, evento scatenante la cascata di segnalazione intracellulare.

L'interazione ligando-recettore determina variazione conformazionale e dimerizzazione delle catene recettoriali α e β , in seguito alla quale le catene α inducono l'autofosforilazione sui residui di tirosina delle catene β ; ne consegue l'attivazione delle tirosin chinasi recettoriali intrinseche, che fosforilano a loro volta un certo numero di molecole citosoliche tra cui le IRS, già menzionate. L'attivazione delle IRS richiede la fosforilazione, da parte delle tirosin chinasi recettoriali, di residui tirosinici presenti in specifici domini dell'estremità C-terminale di tali molecole. Le proteine IRS fosforilate (PT-IRS) interagiscono con le molecole a valle della cascata di trasduzione del segnale, ovvero le proteine contenenti domini SH2, tra cui Grb2 (*growth factor receptor-bound protein 2*), la tirosin fosfatasi SHPTP-2 e la sub unità regolatoria p85 della fosfatidil-inositolo-3 chinasi (PI3K). L'interazione di PT-IRS con Grb2 determina la sequenziale attivazione di p21 ras, delle MAPKK (chinasi di MAPK), e di Erk

MAPK. L'attivazione di Erk MAPK determina stimolazione mitotica, crescita neuritica ed espressione genica.

L'interazione di TP-IRS con p85 stimola il trasporto di glucosio e inibisce l'apoptosi attraverso l'attivazione di Akt/protein chinasi B e l'inibizione di GSK-3b (glicogeno sintasi chinasi-3b). Akt inibisce l'apoptosi fosforilando e perciò inibendo l'azione di GSK-3b e BAD; elevati livelli di GSK-3b e BAD unitamente a bassi livelli di Akt sono associati ad un incremento della morte neuronale (Dudek et al.,1997; Hetman et al., 2000; Eves et al.,1998). L'azione di BAD è mediata dall'inibizione di fattori anti-apoptotici, tra cui alcuni membri della famiglia Bcl. Questo processo coinvolge il mitocondrio: infatti le molecole pro-apoptotiche promuovono la permeabilità mitocondriale, il rilascio del citocromo c e l'attivazione caspatica (Fig. 5.2.1).

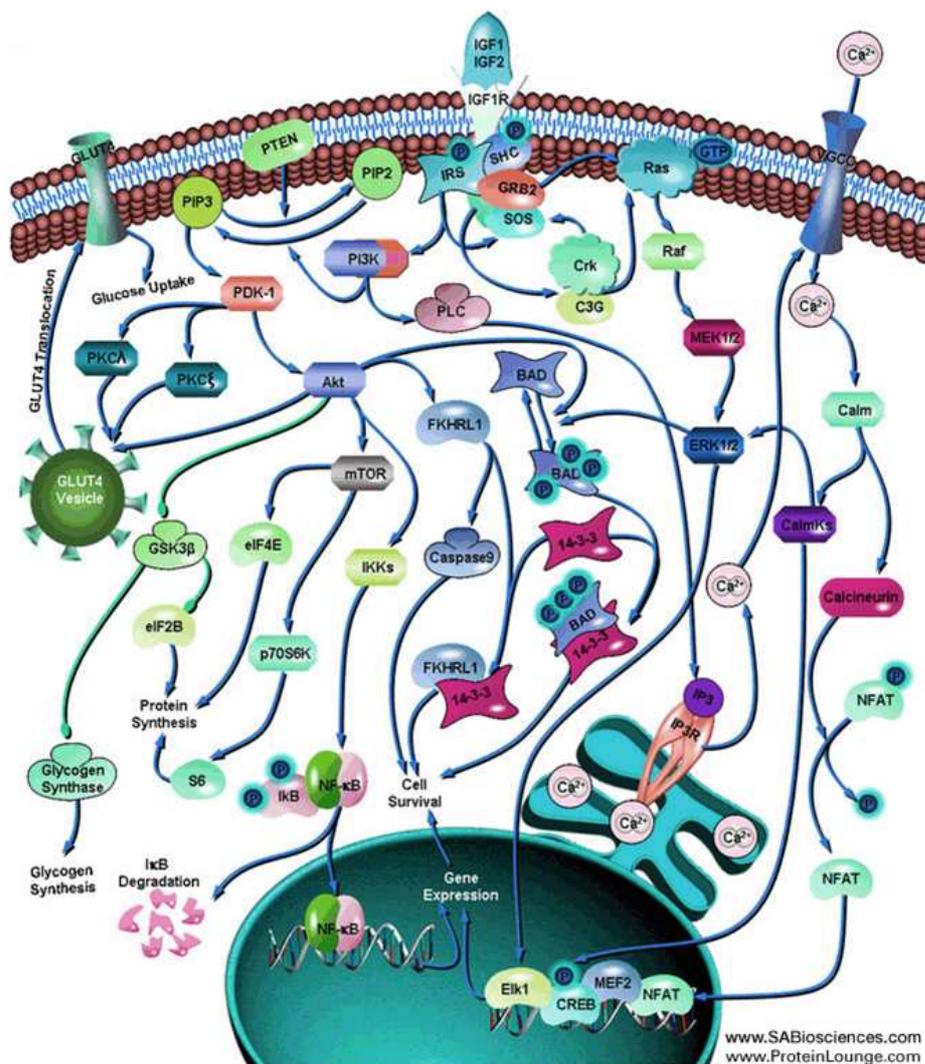


FIGURA 5.2.1. Cascata di trasduzione mediata da IGF-1.

5.3. Possibile associazione tra AD e Diabete mellito di tipo 2

Il diabete mellito è un disordine metabolico definito da una disfunzione del segnale insulinico e caratterizzato da un aumento progressivo dell'incidenza con l'età; è stato associato anche con un lento e progressivo danno neuronale (Li e Holscher, 2007; Biessels e Kappelle, 2005). Infatti, un moderato peggioramento delle funzioni cognitive è stato riportato nei pazienti con diabete di tipo 1 (autoimmune) e di tipo 2 (insulino-resistente), rispettivamente T1D e T2D, probabilmente come conseguenza di una complessa interazione tra il diabete e il normale processo di invecchiamento (Biessels *et al.*, 2005).

Numerose evidenze sostengono una stretta relazione tra T2D e AD. Studi epidemiologici riportano un rischio maggiore di AD nei pazienti T2D (Zhu *et al.*, 2005; Watson e Craft, 2004); entrambe le patologie sono accomunate da alcune caratteristiche salienti: processi età-correlati; degenerazione, elevati livelli di colesterolo, insulino-resistenza periferica e cerebrale, disfunzione nel signaling insulinico, diminuito trasporto e metabolismo del glucosio, presenza di elevati livelli di glucosio non-metabolizzato nel circolo ematico cerebrale (Hoyer, 1998; Salkovic-Petrisic e Hoyer, 2007; Sculingkamp *et al.*, 2000; Hoyer, 2003; Peila *et al.*, 2002; Watson e Craft, 2004). Una spiegazione data all'associazione T2D-AD consiste nell'assunzione che l'iperinsulinemia e iperglicemia tipici di T2D, che affliggono il paziente in maniera cronica, sono fattori causanti una serie di processi patologici: danno persistente alla microcircolo cerebrale, con conseguente neurodegenerazione e deficit cognitivi; sono tutti fattori favorevoli all'insorgenza di AD (Craft e Watson, 2004; Rasgon e Jarvik, 2004; Peila *et al.*, 2002; Hoyer, 2002). Studi epidemiologici mostrano che la coesistenza della variante polimorfica ApoE4 e di T2D raddoppia il rischio di AD, rispetto alla condizione del polimorfismo di ApoE preso singolarmente; in modo corrispondente nelle autopsie *post mortem* degli individui con T2D e genotipo ApoE4 si ritrova un significativo aumento dei depositi amiloidei e di NFT rispetto ai pazienti diabetici senza polimorfismo in ApoE (65). Tali risultati suggeriscono che la condizione diabetica (T2D), in sinergia con la variante polimorfica ApoE4, può essere ritenuta un fattore di rischio per l'insorgenza di AD.

Alcuni studiosi recentemente hanno definito AD come “diabete di tipo 3”, in quanto si verifica in AD una condizione di insulino resistenza che interessa le aree cerebrali (Rivera *et al.*, 2005; Craft *et al.*, 1998). Tale idea è supportata dal fatto che alcune indagini evidenziano in AD una riduzione dell'espressione di insulina (Lester-Coll *et al.*, 2006; Steen *et al.*, 2005), dell'espressione di IR e IGF1-R (Frolich *et al.*, 1998; Moloney *et al.*, 2008), dei livelli di IRS-

1, IRS-2 e PI3K e diminuzione dell'attività di ERK1/2 (*extracellular regulated kinase*) (Watson e Craft, 2004); in aggiunta si evidenzia una riduzione nell'interazione tra Grb2 e la proteina adattatrice Shc.

Ulteriori lavori hanno dimostrato la presenza di una correlazione tra AD e un'alterazione del signaling insulinico e di IGF-1; studi su autopsie *post mortem* di pazienti AD mostrano una diminuzione dell'attività tirosin chinasi rispetto ai controlli sani (Frolich *et al.*, 1998; Frolich *et al.*, 1999). Inoltre, altre modificazioni correlate a alterazioni del pathway insulinico in AD includono ridotto uptake di glucosio, aumentata attivazione di GSK-3b, produzione energetica deficitaria, aumentato stress ossidativo, presenza di prodotti di glicazione proteica avanzata e ridotta sopravvivenza neuronale (Hoyer *et al.*, 1998).

5.4. Malfunzionamento del signaling di insulina e IGF-1: contributo all'insorgenza di AD

Esperimenti *in vitro* dimostrano che la fosforilazione di tau è normalmente regolata da insulina e IGF-1 (Hong *et al.*, 1997). Le protein chinasi maggiormente coinvolte nella fosforilazione di tau includono: Erk MAPK e Cdk-5 (chinasi ciclina dipendente-5), entrambe attivate da insulina e IGF-1 (Lovestone *et al.*, 1994; Garver *et al.*, 1995).

La disregolazione del segnale insulinico e di IGF-1 provocano un'iperfosforilazione della proteina tau, dovuta alla ridotta attivazione di Akt e PI3K e conseguente attivazione di GSK-3b. L'attività di questa chinasi è regolata a livello cellulare dalle proteine Akt e PI3K e dal segnale di Wnt; l'inibizione del segnale di insulina/IGF-1 concorre all'attivazione di GSK-3b, lo stesso vale per il segnale di Wnt, conosciuto per il ruolo essenziale svolto nell'embriogenesi e il cui malfunzionamento sembra associato ad alcune alterazioni molecolari associate ad AD (Nishimura *et al.*, 1999; Grilli *et al.*, 2003).

GSK-3b è una chinasi serina/treonina multifunzionale che regola molteplici pathways di trasduzione del segnale intracellulare associate all'attività di recettori serin chinasi, accoppiati alle proteine G, ed è coinvolta nella risposta alle molecole della famiglia Wnt. La perturbazione del segnale di insulina e IGF-1 nel SNC ha come effetto principale l'aumentata attività di GSK-3b, che causa iperfosforilazione della proteina tau; l'abnorme modificazione di tau annulla le sue funzioni fisiologiche e ne determina l'aggregazione e l'accumulo a livello del pericario, promuovendo stress ossidativo, disfunzione mitocondriale e apoptosi (Mandelkow *et al.*, 2003). E' importante ricordare che un ulteriore meccanismo, indipendente dal segnale di insulina e IGF-1, che concorre all'attivazione di GSK-3b è rappresentato dalle

lesioni ipossiche e ischemiche tipiche dello stress ossidativo; tale meccanismo pertanto instaura un circolo vizioso, in cui si instaura un feed-back positivo tra l'attivazione di GSK-3b e l'iperfosforilazione di tau.

Lo stress ossidativo svolge un ruolo centrale nell'attivare altre *chinasi* coinvolte, che partecipano all'iperfosforilazione di tau; i livelli di Erk MAPK (Zhu *et al.*, 2002), Akt (Pei *et al.*, 2003; Rickle *et al.*, 2004) e Cdk-5 (Patrick *et al.*, 1999) risultano aumentati in corso di AD in risposta allo stress ossidativo e in maniera indipendente da insulina/IGF-1.

Il signaling di IGF-1 e insulina incide anche sul metabolismo della β -amiloide, tramite la mediazione di MAPK (Gasparini *et al.*, 2001; Gasparini *et al.*, 2002), in due modi: accelerando il trasporto di $A\beta/\beta$ APP dall'apparato di Golgi verso la membrana plasmatica; e promuovendo la secrezione di $A\beta$ e inibendone la degradazione operata dall'enzima degradante l'insulina (IDE). I peptidi $A\beta$ 40 e $A\beta$ 42 si dimostrano capaci di interferire con il segnale insulinico tramite una competizione e inibizione dell'interazione recettore/fattore di crescita o riducendo l'affinità dell'insulina/IGF-1 per il rispettivo recettore (Xie *et al.*, 2002; Ling *et al.*, 2002). Ciò suggerisce che l'accumulo di $A\beta$ promuove l'iperfosforilazione di tau e la successiva formazione di NFT, attraverso l'interferenza con il segnale insulinico che promuove l'attivazione di GSK-3b.

Esperimenti *in vitro* su colture neuronali ippocampali dimostrano che il pretrattamento con IGF-1 previene la neurotossicità indotta da Ab (Dore *et al.*, 1997; Dore *et al.*, 1999); l'azione neuro protettiva di IGF-1 è attribuibile alla stimolazione del segnale insulinico, che conduce alla soppressione dell'attività di GSK-3b mediata da IP3K e Akt (Zheng *et al.*, 2000). Purtroppo l'effetto di IGF-1 non è specifico per $A\beta$, dal momento che simili effetti sono riscontrabili nelle tossicità indotta da etanolo (de la Monte *et al.*, 2001; de la Monte e Wands, 2002).

IDE catalizza la degradazione dell'ormone insulina ed esercita un'azione inibitoria sul *signaling* di tale fattore di crescita, dal momento che la sua attivazione avviene quando vengono superati i livelli fisiologici di insulina. Recenti studi dimostrano che IDE può degradare i peptidi $A\beta$ solubili (McDermott *et al.*, 1997), e acquisisce pertanto la funzione di regolatore dei livelli extracellulari dei peptidi Ab (Qui *et al.*, 1998; Balasubramanian *et al.*, 2001). Modelli transgenici che overesprimono la forma mutata (inattivante) di IDE presentano iperinsulinemia, intolleranza al glucosio e aumentati livelli di $A\beta$ nel cervello. La ridotta attività di IDE nell'animale transgenico correla intuitivamente con gli aumentati livelli di

insulina e di A β riscontrati; in aggiunta l'accumulo di A β interferisce negativamente sul signaling del fattore di crescita determinando una condizione di insulino-resistenza.

Un ulteriore contributo all'ipotesi di una relazione tra disfunzione del segnale insulinico e insorgenza di AD, deriva da studi su modelli animali normalmente utilizzati per mimare la patologia diabetica nell'animale di laboratorio. La streptozotocina (STZ) è un analogo del glucosio metabolizzato dall'organismo in un composto citotossico; STZ si è rilevato particolarmente aggressivo nei confronti delle cellule β pancreatiche, e pertanto viene utilizzato per generare modelli sperimentali di diabete mellito. Iniezioni intracerebroventricolari di STZ riducono in modo cronico il metabolismo di glucosio nella corteccia cerebrale e nell'ippocampo; l'effetto generato consiste in un decremento dell'utilizzo cerebrale di glucosio e del metabolismo ossidativo (Duelli *et al.*, 1994), alterata funzionalità del recettore insulinico (Hoyer *et al.*, 2000), e deficit di apprendimento (Hoyer *et al.*, 1999). Gli animali che subiscono l'iniezione di STZ mostrano deficit progressivi e irreversibili nelle capacità di apprendimento, attività mnesiche e disturbi comportamentali (Lannert H, Hoyer S 1998).

Il principale fattore di rischio del diabete mellito di tipo 2 nei soggetti obesi consiste nell'accumulo di lipidi in tessuti non adiposi, tra cui il muscolo scheletrico. Peroxisome proliferator-activated receptors PPARs sono fattori di trascrizione nucleari coinvolti nella regolazione del metabolismo lipidico; la loro attivazione stimola il signaling insulinico risultando in una ridotta assunzione tissutale di lipidi. PPAR- α è un membro della superfamiglia dei recettori degli ormoni steroidei, che agiscono come fattori di trascrizione ligando-inducibili, coinvolti nel metabolismo del glucosio e dei lipidi. Un possibile meccanismo alla base del ridotto metabolismo energetico osservato in AD è l'insulino resistenza secondaria ad un alterata espressione di PPARs; un'evidenza a sostegno di tale deriva dall'associazione tra AD e un polimorfismo nell'esone 5 del gene di PPAR- α (noto come allele V). Successive indagini epidemiologiche hanno dimostrato un aumentato rischio di AD nei portatori dell'allele V rispetto ai controlli sani.

5.5. Potenziale terapeutico dell'insulina

Un inadeguato apporto di fattori trofici dovuto all'assenza o alla diminuzione dei livelli di insulina o del suo segnale determina una desensitizzazione dell'attività del recettore glutammatergico NMDA (N metil D aspartato), la cui funzionalità è essenziale nell'instaurare il meccanismo di

long term potentiation (LTP) ritenuto responsabile dei processi di apprendimento e di acquisizione delle facoltà mnesiche. Inoltre, la disregolazione del segnale insulinico è coinvolta nell'iperfosforilazione di tau mediata da GSK-3 β , la cui inibizione risulta inadeguata.

Secondo tali presupposti, ripristinando i livelli di insulina si potrebbe indurre la scomparsa delle alterazioni comportamentali.

La somministrazione combinata di insulina e glucosio appare necessaria per mantenere una glicemia normale (euglicemia), evitando così i dannosi effetti dell'ipoglicemia sulle funzioni cognitive e mnesiche dei pazienti AD (Watson e Craft, 2004; de la Monte e Wands, 2005). L'iniezione intracerebroventricolare di insulina migliora le *performance* cognitive, senza alterare le concentrazioni ematiche di insulina e glucosio; tale approccio pone però seri dubbi sulla sua applicabilità nei pazienti AD (Watson e Craft, 2004).

Una via alternativa di somministrazione per l'insulina è quella intranasale, la quale mostra il vantaggio di penetrare il SNC in pochi minuti attraverso il canale perivascolare trigeminale e olfattorio, oppure attraverso il pathway tradizionale di trasporto assonale. Un'idea interessante è stata l'utilizzo di cellule staminali per trasferire l'espressione di insulina e IGF-1 nel tessuto neuronale; i benefici derivanti da tale esperimento comprendono una migliore sopravvivenza dei neuroni e una riduzione dello stress ossidativo nel SNC, ma essi devono far fronte ai requisiti di sicurezza ed efficacia non ancora testati su tale tecnica.

Alternativamente, l'utilizzo di agenti sensibilizzanti l'azione insulinica (tiazolidinedioni, ligandi di PPARs), usati comunemente nel trattamento dell'iperinsulinemia nel diabete di tipo 2, si dimostra efficace nel ridurre la disponibilità di insulina a livello cerebrale, senza alterare la glicemia (van der Heide *et al.*, 2006). Sfortunatamente, recenti trials clinici con il risiglitazone, un tiazolidinedione, causano peggioramenti nella *performance* cognitiva nei pazienti AD (Risner *et al.*, 2006; Watson *et al.*, 2005). Altri approcci in via sperimentale consistono nella somministrazione di analoghi mimetici dell'insulina (demetilsterichinone B1, DAQB1), che interagisce con IR senza interferire con IDE (Salituro *et al.*, 2001); sebbene poco praticabile, incrementare l'attività di IDE (tramite terapia genica o infusione) potrebbe rivelarsi un metodo terapeutico interessante. Infine, anche l'uso di inibitori di GSK-3 β risulta essere un'attrattiva stimolante; bisogna però considerare che interferire con l'attività endogena di GSK-3 β potrebbe causare la perdita di attività dei target fisiologici di tale chinasi (de la Monte e Wands, 2005; Plum *et al.*, 2005).

6. ESTROGENI E DECADIMENTO COGNITIVO

Gli ormoni steroidei esercitano profondi effetti sulle funzioni del SNC, in particolare sull'umore, la memoria e le capacità cognitive. Questi effetti sono esercitati sia dai glucocorticoidi (Landfield *et al.*, 1981) che da altri ormoni steroidei, come gli androgeni e gli estrogeni. (Woolley 1998).

Gli estrogeni sono ormoni sessuali di tipo steroideo, vengono prodotti dalle gonadi sotto stretto controllo dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi (HPG; Fig. 6.1).

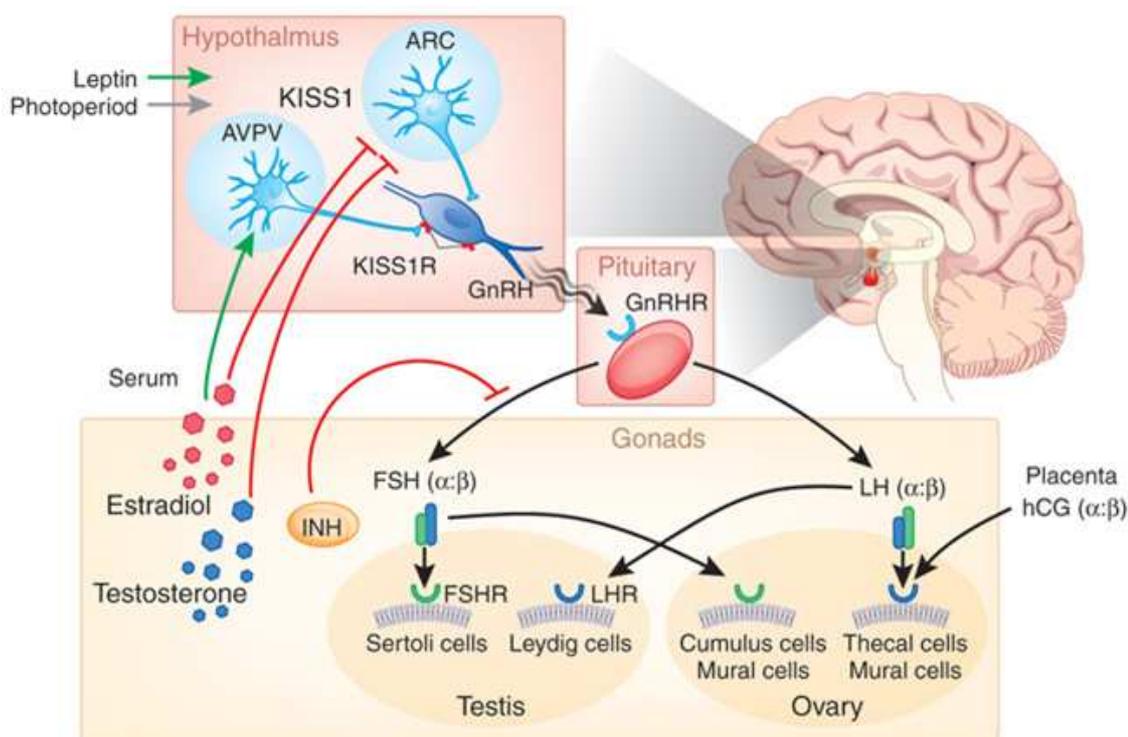


FIGURA 6.1. L'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi (HPG).

Tutti gli ormoni sessuali vengono prodotti a partire dal colesterolo (Klein e Berlin, 1996), che viene convertito in progesterone prima ed in 17-β estradiolo poi *via* aromatasi o 5-α-diidrotestosterone *via* 5-α-reduttasi (Ito Y *et al.*, 1993). Durante l'invecchiamento si osserva un declino dell'asse gonadotropo.

Una delle funzioni ipotalamiche è quella di sintetizzare neuroormoni della classe dei *Releasing Factor*, tra cui il fattore di rilascio delle gonadotropine (*Gonadotropin Releasing Hormone* o **GnRH**), che esercita la sua azione a livello adenoipofisario per la regolazione del rilascio delle gonadotropine ipofisarie, quali l'ormone luteinizzante (**LH**) e l'ormone follicolo stimolante (**FSH**) che, attraverso il circolo sistemico, arrivano a livello delle gonadi, per regolare la

steroidogenesi gonadica maschile e femminile. Il GnRH ha una breve emivita, per cui sono stati sintetizzati suoi analoghi maggiormente resistenti al metabolismo enzimatico con emivita superiore a 2 ore. Gli analoghi del GnRH presentano una selettività recettoriale elevata, ma la loro persistenza sul recettore, a causa della lunga emivita, determina una *down regulation* recettoriale, con un profilo stimolatorio che determina inizialmente un picco di rilascio di LH e FSH, seguito da una spiccata inibizione.

Gli analoghi del GnRH vengono somministrati per diverse patologie caratterizzate da livelli di estradiolo e testosterone alterati.

L'estradiolo, l'estrone e l'estriolo sono gli estrogeni principali: l'estradiolo rappresenta il maggiore estrogeno prodotto dalle ovaie, mentre estrone ed estriolo vengono per lo più prodotti in diversi tessuti periferici, come il fegato e il tessuto adiposo, come metaboliti dell'estrogeno o a partire da androgeni come il testosterone. L'estrone rappresenta la maggior fonte di estrogeni in caso di mancata attività ovarica, quindi in menopausa.

Gli estrogeni sono caratterizzati da una struttura steroidea a 18 atomi di carbonio, contenente un anello fenolico, fondamentale per il legame ad alta affinità con i recettori estrogenici, un gruppo idrossilico sul carbonio 3 dell'anello fenolico ed un gruppo idrossilico sul carbonio 17 del quarto anello. Essi sono implicati nei processi di proliferazione cellulare, nell'apoptosi (Wang, 2006), nel processo infiammatorio (Calkin *et al.*, 2002), nel metabolismo tissutale e sono stati classicamente associati con la funzione regolatoria dei processi riproduttivi; in età prepuberale, infatti, inducono la crescita di tutti gli organi dell'apparato genitale femminile e determinano la comparsa delle caratteristiche secondarie femminili (Drummond, 2006), mentre in età fertile sono responsabili delle modificazioni endometriche (Drummond, 2006), della regolazione del muco cervicale, della motilità tubarica e della ritenzione idrosalina (Thorn *et al.*, 1938; Korach, 1981). Inoltre, gli estrogeni determinano la chiusura delle epifisi osse in età puberale, determinando la fine della crescita ossea (Juul, 2001).

Questi ormoni risultano importanti durante tutto il corso della vita, poiché esercitano un effetto positivo sul mantenimento della massa ossea, inibendone il riassorbimento (Weitzmann e Pacifici, 2006), influiscono sul metabolismo proteico e sul metabolismo lipidico, diminuendo i livelli di colesterolo LDL ed aumentando quello di HDL, e stimolando la sintesi proteica (Smith *et al.*, 2004).

E' stata da tempo riconosciuta un'attività degli estrogeni a livello cerebrale, sia ipotalamica che extraipotalamica; a quest'ultima vengono attribuite importanti funzioni regolatorie sul sistema cognitivo e comportamentale (Fig. 6.2).

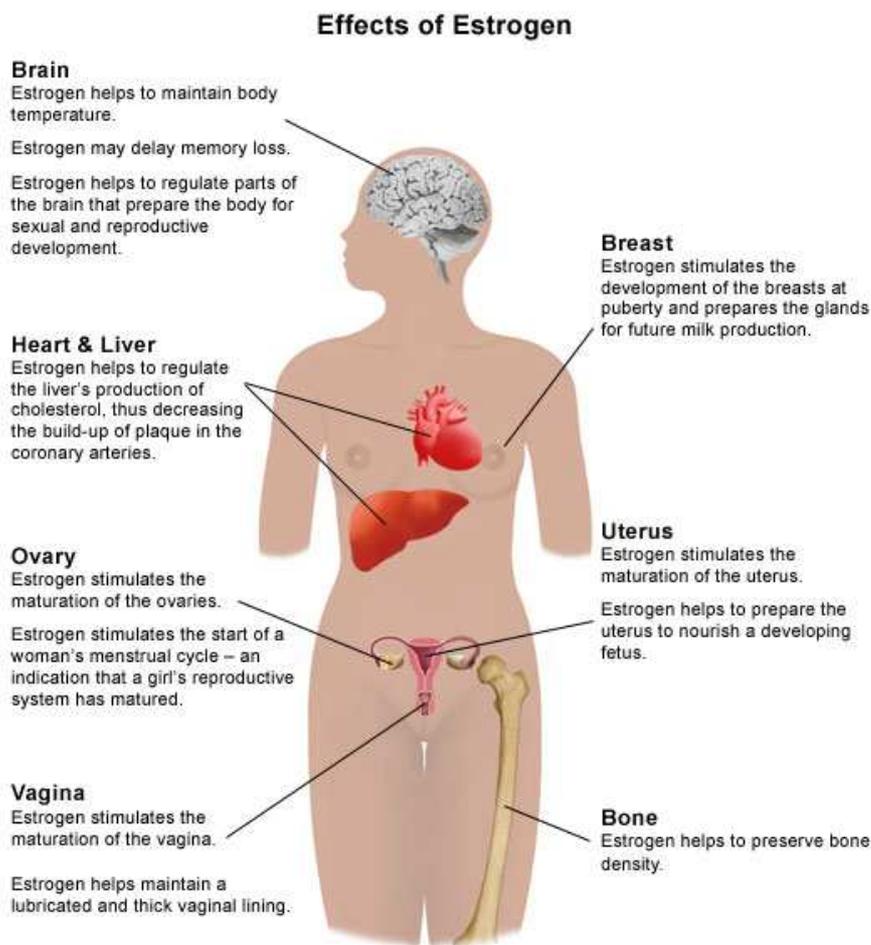


FIGURA 6.2. Effetti esercitati dagli estrogeni sull'organismo umano.

Gli estrogeni a livello cerebrale esercitano azioni di tipo neurotrofico: nei neuroni responsivi promuovono l'estensione assonale (Brinton *et al.*, 1997), il processo di *sprouting* neuronale (neoformazione di sinapsi) e promuovono la plasticità sinaptica (Foy *et al.*, 2000).

Diversi studi hanno dimostrato che gli estrogeni hanno un ruolo rilevante nella neuroprotezione riducendo la morte neuronale mediata da meccanismi apoptotici (Garcia-Segura *et al.*, 1998). Questi ormoni proteggono le cellule da stimoli stressogeni quali l'eccitotossicità prodotta dal glutammato (Goodman *et al.*, 1996; Zaulyanov *et al.*, 1999), la tossicità indotta da radicali liberi e specie reattive dell'ossigeno (Goodman *et al.*, 1996; Green *et al.*, 2000) e molti altri. Nell'AD proteggono dalla tossicità indotta dalla A β (Bhel *et al.*, 1995; Green *et al.*, 2000) e sono in grado di ridurre la formazione (Petanceska *et al.*, 2000; Fig. 6.3).

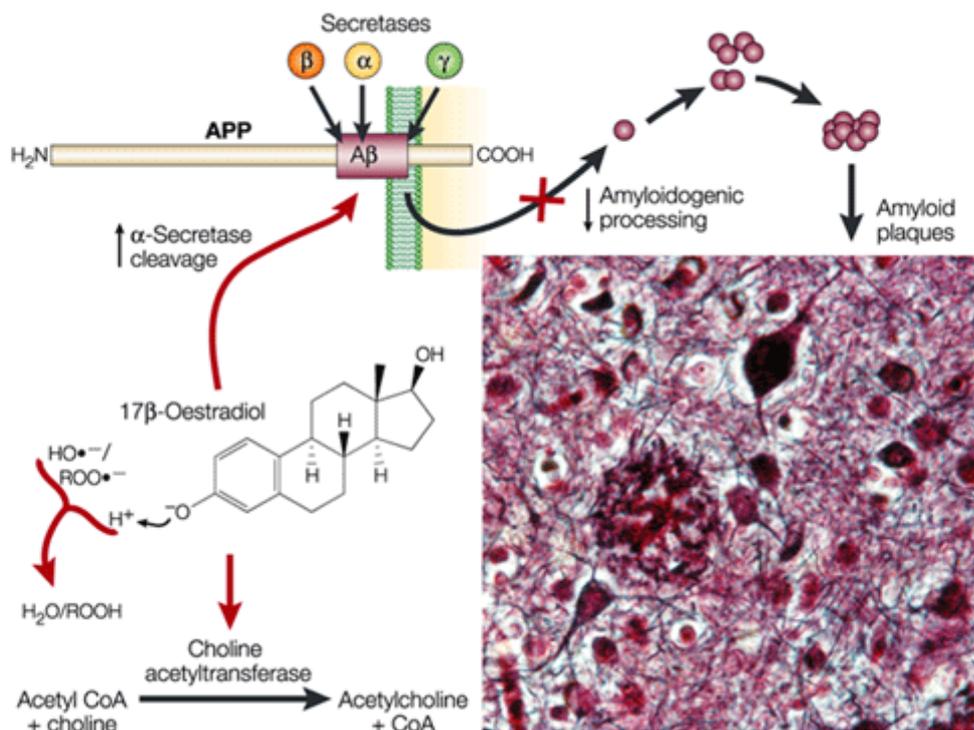


FIGURA 6.3. Gli estrogeni interferiscono con il processo di amiloidogenesi nella malattia di Alzheimer. *Christian Behl. Nature Reviews Neuroscience 2002; 3, 433-442*

Inoltre, hanno un effetto neuroprotettivo in caso di ischemia cerebrale acuta, dato riscontrato in molti modelli animali sperimentali (Alkayed *et al.*, 1998; Fukuda *et al.*, 2000; He *et al.*, 2002) per diverse specie (Goodman *et al.*, 1996; Fig. 6.4).

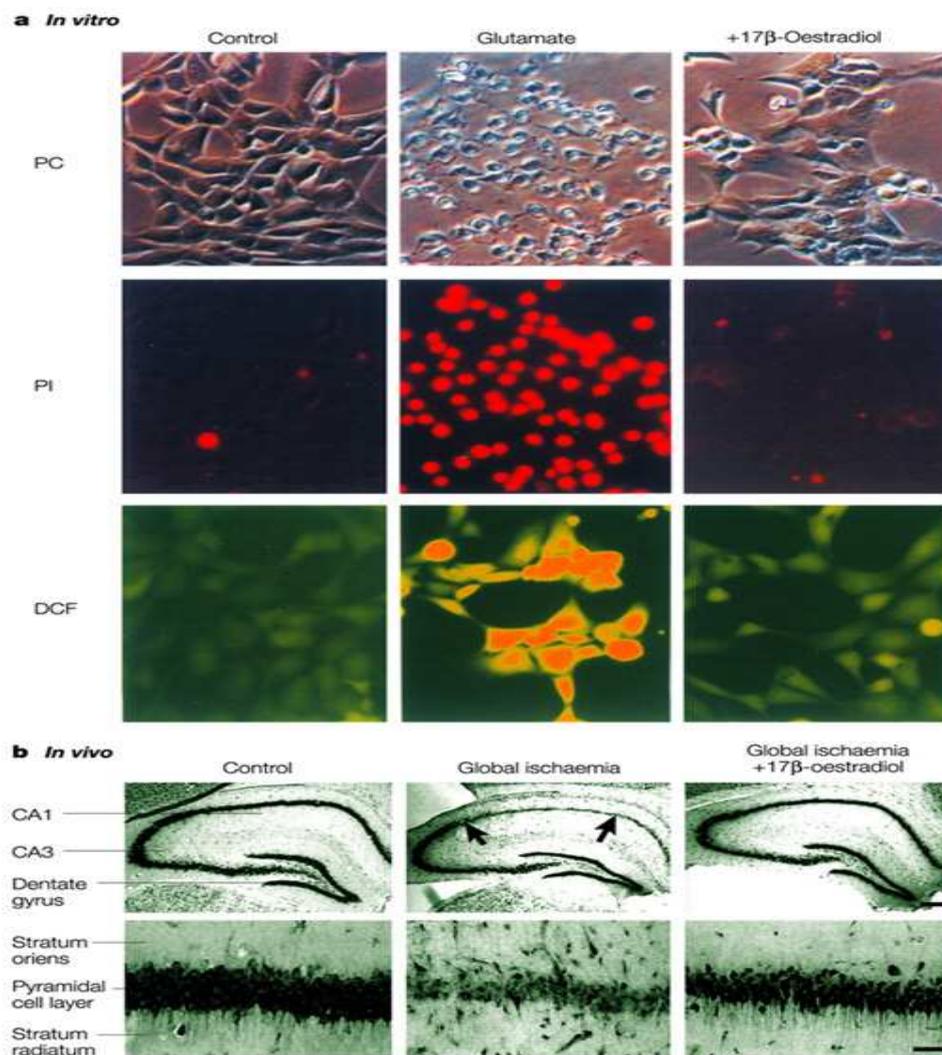


FIGURA 6.4. (a) *In vitro*, il glutammato induce apoptosi in cellule ippocampali HT22. Microscopia a contrasto di fase (PC) e colorazione del DNA con ioduro di propidio (PI) evidenziano le cellule morte dopo esposizione a glutammato. L'accumulo intracellulare di perossidi dopo lisi cellulare viene rilevato tramite colorazione con diclorofluoresceina (DCF); (b) *In vivo*, il pretrattamento con estadiolo previene la perdita neuronale indotta da ischemia globale in gerbilli maschi.

L'azione neuroprotettiva degli estrogeni è stata riconosciuta non solo nella donna, ma anche nell'uomo (Hawk *et al.*, 1998; Toung *et al.*, 1998)

È noto che la riduzione dei livelli di estrogeni ed androgeni può essere considerata un fattore di rischio per la compromissione cognitiva e lo sviluppo di AD. Gli estrogeni, infatti, esercitano un effetto protettivo, modulando la sintesi ed il rilascio di neurotrasmettitori e neuropeptidi, stimolando la crescita dendritica, le connessioni sinaptiche e la plasticità neuronale (Grabowska 2003; Norbury *et al.*, 2004). Le conseguenze della carenza estrogenica a livello del SNC si evidenziano in epoca postmenopausale, poiché lo stato di ipogonadismo ipergonadotropo provoca un'alterazione dell'equilibrio esistente tra i sistemi neuroendocrini posti a controllo di numerosi centri dell'ipotalamo e del sistema limbico.

6.1 Estradiolo

Il 17- β -estradiolo è il principale estrogeno prodotto dalle ovaie durante il ciclo ovarico, in particolare, dalle cellule della teca della granulosa dell'ovaio, per demetilazione ed aromatizzazione del testosterone. L'estradiolo ovarico è prodotto anche dall'estrone; in ridotte quantità esso è prodotto anche dalla placenta, dalla corteccia surrenale e dalla conversione periferica del testosterone. Questo spiega perchè anche nella donna in menopausa sono rilevabili quantità di estrogeni circolanti; inoltre, nell'uomo è prodotto anche in ridotte quantità dal testicolo e dalla conversione periferica di androgeni.

L'estradiolo è uno steroide a 18 atomi di carbonio (C₁₈) sintetizzato, principalmente, durante il periodo riproduttivo a partire dal colesterolo, mentre a livello epatico viene convertito in estrone. Nelle donne in post menopausa e nell'uomo adulto la sua sintesi è minima.

Per la maggior parte l'estradiolo circolante è legato alla proteina vettrice *sex hormone binding globulin* SHBG (Gershagen *et al.*, 1989), i cui livelli sierici sono inversamente correlati con le concentrazioni di β amiloide 40 (Gillet *et al.*, 2003), mentre solo una ridotta quota è libera. L'estradiolo viene metabolizzato per mezzo della coniugazione prima e della glucoronazione poi, e viene eliminato attraverso la bile e le urine.

La valutazione dei livelli plasmatici di estradiolo attraverso un semplice dosaggio rappresenta un indice di funzionalità dell'ovaio e dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi: ridotti livelli possono presentarsi in caso di ipogonadismo o ermafroditismo, mentre elevati livelli possono dipendere da stadi di gravidanza o da di tumori ovarici estradiolo-secerenti.

È possibile rilevare a livello cerebrale estradiolo, grazie alla conversione del testosterone in estradiolo catalizzata dalla aromatasi (Garcia-Segura *et al.*, 2003).

Esso, dunque, ricopre il ruolo di modulatore di importanti processi fisiologici non solo a livello dell'apparato riproduttivo, ma anche in tessuti non riproduttivi, quali l'osso, il sistema nervoso centrale ed il sistema cardiovascolare. Le azioni biologiche degli estrogeni sono per la maggior parte mediate dall'attivazione di specifici recettori intracellulari (Mendelsohn e Karas, 1999).

7. RECETTORE DEGLI ESTROGENI (ER)

I recettori degli estrogeni (ER) appartengono alla superfamiglia dei recettori nucleari, che agiscono da fattori di trascrizione attivati da ligandi. Il recettore per gli estrogeni (ER) è di

tipo intracellulare con localizzazione citoplasmatica e, quando attivo, promuove la trascrizione genica, legandosi al DNA a livello di elementi responsivi del filamento. Sono state identificate due isoforme di ER, prodotte per *splicing* alternativo: ER- α ed ER- β .

Analogamente ad altri recettori nucleari, i geni che codificano per ER α ed ER β sono organizzati in regioni funzionali indipendenti, ma capaci di interagire tra di loro.

I geni che codificano per le due isoforme si trovano su cromosomi diversi. ER α , è stato clonato nel 1986 da un gene presente sul cromosoma 6 umano (Green et al., 1986); nel 1996 è stato poi identificato ER β sul cromosoma 14 (Kuiper et al., 1996). Di entrambi i recettori esistono diverse varianti di *splicing*. Le due isoforme presentano elevata omologia di sequenza (96%) nella zona che lega il DNA e nel sito di interazione con i ligandi (53%); in particolare, i LBD di ER α ed ER β hanno una struttura terziaria molto simile. Nella regione ammino-terminale i due recettori presentano maggiori differenze di sequenza (Mendelsohn e Karas, 1999; Fig.7.1.).

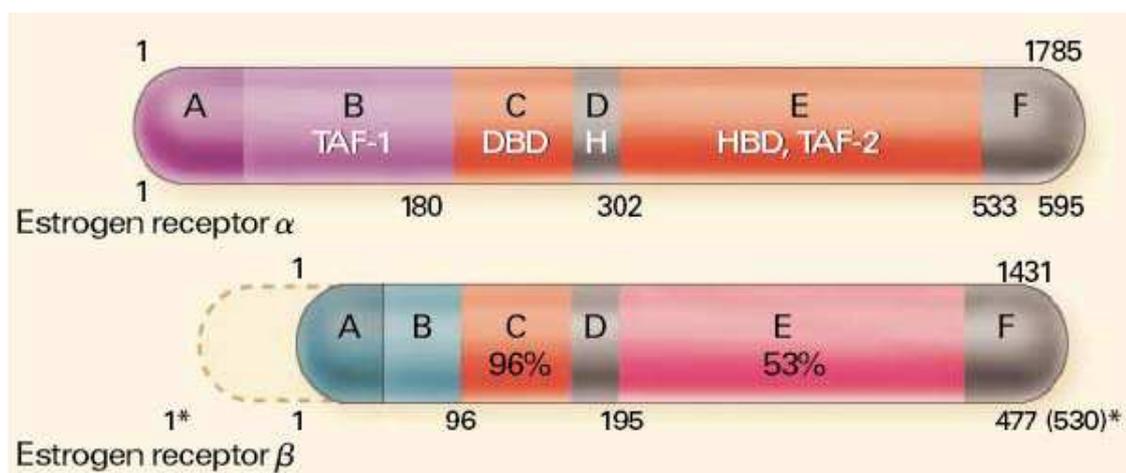


FIGURA 7.1. Struttura dei recettori α e β degli estrogeni nell'uomo TAF-1 = *transcriptional-activation Function-1*; DBD = *DNA binding domain*; H = *hinge region*; HBD = *hormone binding domain*; TAF-2 = *transcriptional-activation function-2*. I numeri sopra e sotto ogni recettore si riferiscono al numero di nucleotidi e di amminoacidi, rispettivamente (da Mendelsohn e Karas, 1999).

Il dominio ammino-terminale comprende una zona responsabile della trans-attivazione ligando-indipendente (TAF-1, *transcriptional-activation function-1*), coinvolta nelle interazioni proteina-proteina e nell'attivazione della trascrizione dei geni bersaglio.

Il dominio centrale o *DNA binding domain* (DBD) contiene il sito responsabile del legame con sequenze specifiche del DNA, gli *estrogen responsive elements* (ERE); inoltre, in questa regione sono presenti due strutture *zinc-finger*, che hanno un ruolo importante nella

dimerizzazione del recettore e nel legame con il DNA, e il sito che consente il passaggio dalla conformazione inattiva a quella attiva (*hinge region*).

Il dominio carbossi-terminale forma il sito di legame per il 17 β -estradiolo ed altri composti ad azione estrogenica (*ligand binding domain*, LBD); questa regione contiene anche una zona di transattivazione ligando-dipendente (TAF-2, *transcriptional-activation function-2*). Questo dominio è coinvolto nei processi di dimerizzazione, interazione con le *heat shock proteins*, traslocazione nucleare e modulazione della trascrizione di geni bersaglio, mediante il reclutamento di coattivatori e corepressori. Inoltre, in questo dominio è presente una regione responsabile della diverse risposte dei recettori degli estrogeni al 17- β -estradiolo ed ai modulatori selettivi dei recettori degli estrogeni (SERM); questa regione assume conformazioni distinte a seconda del ligando e permette la distinzione tra composti agonisti ed antagonisti (Nilsson et al., 2001). I SERM come il tamoxifene e il raloxifene, vengono utilizzati come terapia antitumorale; la loro efficacia è dovuta all'attività antiestrogenica. Diversi tipi cellulari e diversi promotori mostrano differenti risposte a questi modulatori specifici (Shang e Brown, 2002).

L'interazione con un ligando induce cambiamenti conformazionali nel recettore e porta, dopo un serie di eventi, a variazioni della velocità di trascrizione dei geni regolati dagli estrogeni. Questi eventi comprendono la dimerizzazione del recettore, l'interazione con il DNA, il reclutamento di cofattori, fino alla formazione del complesso di inizio della trascrizione (Nilsson et al., 2001).

Con metodica RT-PCR ER- α è stato localizzato nel tessuto polmonare, nel fegato, nel tessuto osseo, nei vasi del sistema cardiovascolare, nel tratto urogenitale e a livello del sistema nervoso centrale, mentre ER- β è stato localizzato nel tessuto polmonare, nel tessuto osseo, nei vasi del sistema cardiovascolare, nel tratto gastrointestinale, nel tratto urog e enitale e nei tessuti del sistema nervoso centrale.

Entrambe le isoforme giocano un ruolo importante nella genesi dei tumori e nella loro risposta al trattamento con estrogeni. Sono stati analizzati per l'espressione delle due isoforme di ER con metodica RT-PCR 70 adenomi ipofisari, che mostravano diversi fenotipi. I tumori mostravano un'espressione di ER- β molto più frequente rispetto all'espressione di ER- α (Shupnik *et al.*, 1998). Inoltre, ER- β è stato trovato in tumori che esprimono anche ormone della crescita (GH), mentre non si è trovato il recettore di tipo α . Nella maggior parte dei casi l'espressione delle due isoforme del recettore si sovrappone nei tumori, anch' se in alcune circostanze è espressa solo una delle due isoforme (Shupnik *et al.*, 1998).

ER- α ed ER- β sono stati localizzati con studi di immunocitochimica a livello dei tessuti riproduttivi. A livello delle ovaie ER- β si trova nei nuclei delle cellule della granulosa dei follicoli in via di accrescimento, nelle cellule interstiziali e nelle cellule dell'epitelio germinale. La marcatura nucleare di ER- α si osserva a livello testicolare, nelle cellule interstiziali e nelle cellule dell'epitelio germinale. Nell'utero è stata riscontrata un'abbondante localizzazione di ER- α nei nuclei delle cellule epiteliali, stromali e muscolari. Una simile localizzazione è stata osservata per ER- β , sebbene la marcatura mostrava una più debole intensità. Entrambi i sottotipi recettoriali sono stati trovati nelle cellule stromali ed epiteliali delle ghiandole mammarie; nei testicoli ER- β è presente nei nuclei delle cellule del Sertoli e di Leydig, mentre ER- α solo nelle cellule di Leydig; nella prostata è presente solo ER- β nelle cellule basali e secretorie, negli alveoli e nelle cellule basali e stromali (Pelletier e El-Alfy, 2000). C'è una specifica localizzazione dei sottotipi di ER nella maggior parte degli organi riproduttivi studiati.

7.1 Meccanismi d'azione degli estrogeni

7.1.1. Meccanismo classico

Nello stato di riposo, il recettore, in equilibrio tra citoplasma e nucleo, è legato a proteine che lo mantengono in uno stato inattivo e ne mascherano il sito di legame con il DNA (*heat shock proteins* o hsp). L'interazione del *ligand binding domain* con un agonista induce un cambiamento conformazionale del recettore che porta alla dissociazione dalle proteine inibitorie hsp e all'esposizione dei siti di dimerizzazione e di legame con il DNA. Gli omodimeri e gli eterodimeri traslocano nel nucleo attraverso un meccanismo non ancora completamente chiarito, ma che coinvolge l'interazione diretta con la caveolina-1. Una volta nel nucleo, i dimeri si legano agli ERE localizzati nella regione dei promotori di geni bersaglio e modulano la trascrizione con il contributo di coattivatori e corepressori, che vengono reclutati in modo diverso dalle due isoforme recettoriali. Questa regolazione dell'espressione genica è caratteristica dei recettori nucleari e rappresenta il meccanismo d'azione classico degli estrogeni (Gruber et al., 2002; Bolego et al., 2006).

In aggiunta a questa, sono note anche altre modalità di attivazione dei recettori degli estrogeni (Gruber et al., 2002; Bolego et al., 2006).

7.1.2. Meccanismo ERE-indipendente

La modulazione dell'espressione genica può avvenire anche in modo ERE-indipendente, attraverso l'interazione con altri fattori di trascrizione che regolano geni privi di ERE nella zona dei propri promotori. Per esempio, sia ER α che ER β possono legare il fattore di trascrizione nucleare AP-1 (*activating protein-1*), attivando la trascrizione dei suoi geni bersaglio (Peach et al., 1997). Inoltre, ER α è in grado di bloccare l'espressione di interleuchina-6 (IL-6), legando il fattore di trascrizione NF-kB ed impedendone l'interazione con i *responsive elements* sul gene di IL-6 (Galien e Garcia, 1997).

7.1.3. Meccanismo ligando-indipendente

La regolazione della trascrizione mediata dai recettori degli estrogeni non è limitata alla sola interazione con ligandi specifici. Per esempio, questi recettori possono venire attivati in seguito alla fosforilazione da parte di protein-chinasi, in risposta all'attivazione dei recettori di fattori di crescita. L'esistenza di tale *cross-talk* è stata dimostrata nel caso dell'attivazione ligando¹³ indipendente dei recettori degli estrogeni da parte dell'insulina, dell'EGF (*epidermal growth factor*) e del TGF- α (*transforming growth factor- α*) (Ignar-Trowbridge et al., 1993).

7.1.4. Meccanismo non genomico

Gli estrogeni hanno anche effetti che non possono essere attribuiti alla modulazione della trascrizione genica a causa della loro rapida insorgenza. Infatti, questi effetti non genomici si verificano nel giro di secondi o minuti dall'esposizione all'estradiolo e sono mediati dall'attivazione di diversi sistemi di trasduzione del segnale, quali la via delle protein chinasi PKA, PKB, PKC, delle MAPK (*miogeno-activated protein kinase*) e della PI3K (*phosphatidylinositol 3-OH kinase*); inoltre, in seguito all'attivazione di ER vengono prodotti secondi messaggeri, quali Ca²⁺, cAMP e cGMP (Losel et al., 2003). ER- α si lega in modo ligando dipendente alla subunità regolatoria del fosfatidilinositolo-3-idrossi chinasi (PI3K). La stimolazione con estrogeni aumenta l'attività di PI3K ER- α associata con successiva attivazione di una proteina chinasi (B/AKT) e dell'ossido nitrico sintasi endoteliale (eNOS) (Simoncini *et al.*, 2000). Topi trattati con estrogeni mostrano un aumento dell'attività di eNOS e una diminuzione dell'accumulo vascolare di leucociti dopo danno da ischemia e riperfusione. Questo effetto vascolo-protettivo degli estrogeni viene abolito in presenza di inibitori di PI3K e dell'eNOS. Queste

affermazioni definiscono un'importante via di segnalazione fisiologica non nucleare di ER- α che si attua attraverso la diretta interazione di ER- α con PI3K (Simoncini *et al.*, 2000, Fig. 7.1.4.1.).

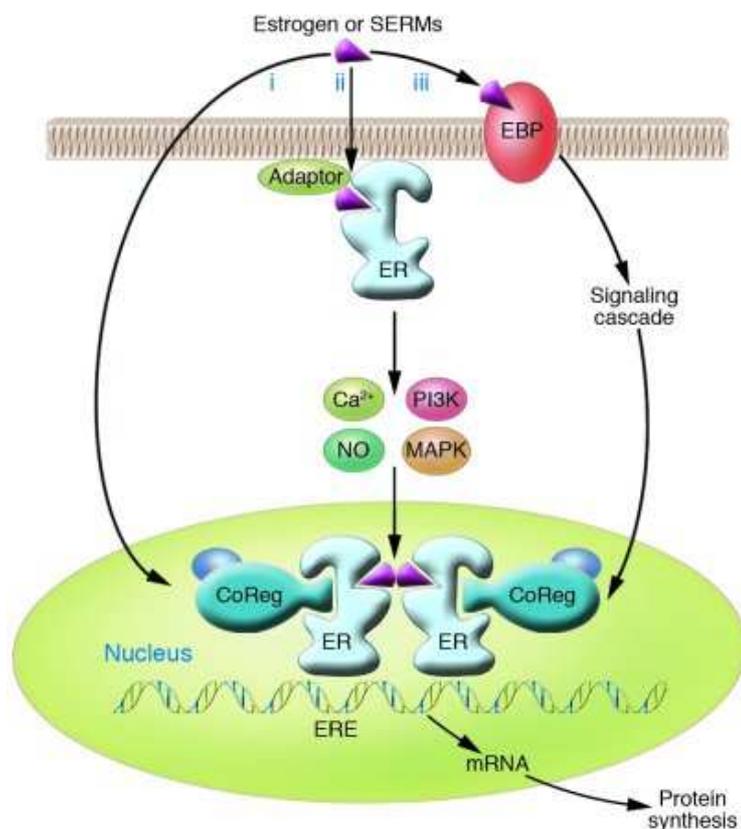


FIGURA 7.1.4.1. Meccanismi d'azione degli estrogeni. Nel pathway classico (i), gli estrogeni o modulatori selettivi del recettore degli estrogeni (SERMs) legano ER, che migra nel nucleo, dove attiva la trascrizione di geni specifici legando EREs (estrogen responsive elements) e reclutando proteine coregolatricie (CoRegs); effetti rapidi o non genomici degli estrogeni (ii) sono mediati da ER posizionato in prossimità della membrana plasmatica grazie a proteine adattatrici (Adaptor), che attivano cascate di trasduzione del segnale mediate da protein chinasi; anche proteine di membrana che legano gli estrogeni (EBPs) possono attivare questa cascata di trasduzione del segnale (iii).

L'attivazione di meccanismi non genomici può influenzare anche l'espressione genica; ciò implica che le azioni nucleari e quelle non nucleari degli estrogeni siano integrate (Pedram *et al.*, 2002). Gli effetti non genomici degli estrogeni sono molteplici, ma hanno alcune caratteristiche comuni: sono troppo rapidi per essere compatibili con la sintesi di mRNA e proteine, non vengono bloccati da inibitori della trascrizione o della sintesi proteica e sono indotti anche da molecole che non attraversano la membrana cellulare, quali l'estradiolo complessato con albumina (Simoncini *et al.*, 2002). Questi effetti sembrano essere mediati da recettori degli estrogeni localizzati sulla membrana cellulare. Sebbene non siano ancora stati clonati, i recettori in grado di mediare gli effetti rapidi degli estrogeni potrebbero essere: (a)

gli stessi recettori nucleari che traslocano sulla membrana (Razandi et al., 2004); (b) forme troncate del recettore ER α che localizzano di preferenza sulla membrana (Li et al., 2003); (c) recettori per neurotrasmettitori o ormoni peptidici modulati allostericamente dagli estrogeni (Grattan et al., 1996); (d) nuovi componenti della famiglia dei recettori degli estrogeni (Edwards, 2005). In particolare, è stato recentemente descritto un recettore accoppiato a proteina G, GPCR30, in grado non solo di legare gli estrogeni ma anche di attivare rapidamente la via della PI3K (Revankar et al., 2005). Gli estrogeni hanno una funzione neuroprotettiva che è dovuta ad una via di trasduzione del segnale che coinvolge l'attivazione delle MAP chinasi, della fosfoinositolo-3-fosfato chinasi e della proteina chinasi C. Gli effetti degli estrogeni sono mediati dal loro legame con il recettore ER (Goodenough *et al.*, 2005); questo legame induce la trascrizione genica ed è implicato nella promozione della sopravvivenza neuronale (Wise *et al.*, 2001). Inoltre, gli estrogeni possono fungere da *scavengers* dei radicali liberi e in questo modo prevengono la morte neuronale proteggendo i neuroni da vari insulti ossidativi. Il ligando di ER, il 17- β -estradiolo, in concentrazioni fisiologiche esercita un effetto protettivo nelle patologie neurodegenerative come l'AD (Dhandapani e Brann, 2002). I soggetti AD presentano livelli di ER- α e ER- β minori rispetto a pazienti non AD di età comparabile. La ridotta densità di ER nei pazienti AD indicherebbe un potenziale ruolo degli estrogeni nella regolazione della secrezione della proteina A β nel fluido cerebrospinale e potrebbe influenzare l'accumulo di A β nel parenchima cerebrale (Hong-Goka *et al.*, 2004).

Topi maschi *knock out* per ER- α/β sono animali sterili, ma possiedono una struttura normale di tutto l'apparato riproduttivo, hanno degli spermatozoi epididimali con motilità e numerosità significativamente ridotte. Le femmine *knock out* mostrano delle differenze strutturali a livello della cervice dell'utero e della parte superiore della vagina e queste strutture sono severamente ipoplastiche negli animali adulti. Le femmine doppie *knock out* sia per ER- α che β hanno a livello delle ovaie delle strutture che ricordano i tubuli seminiferi dei testicoli; all'interno del lume di questi simil-tubuli si trovano delle cellule della granulosa degenerate che ricordano le cellule di Sertoli dei testicoli (Couse *et al.*, 1999). Maschi e femmine *knock out* mostrano iperplasia e ipertrofia degli adipociti, resistenza insulinica e intolleranza al glucosio. La trasduzione del segnale mediato dagli estrogeni ha un ruolo importante nel tessuto adiposo in entrambi i sessi; l'obesità degli animali *knock out* è dovuta ad una riduzione del dispendio energetico piuttosto che a un aumento dell'introito energetico (Heine *et al.*, 2000).

Un trattamento con gonadotropina corionica (CG) riduce significativamente i livelli di mRNA di ER- α (45%) e di ER- β (40%), così come un trattamento con ormone rilasciante le gonadotropine (GnRH). CG e GnRH, quindi, inducono *down*-regolazione di ER- α e di ER- β attraverso l'attivazione della via di trasduzione della PKA e della PKC, rispettivamente (Chiang *et al.*, 2000).

Il cadmio è un potente stimolatore di ER indipendente dall'estradiolo (Garcia-Morales *et al.*, 1994), il cadmio a dosi ridotte blocca il legame dell'estradiolo all'ER in modo non competitivo; questa affermazione suggerisce che i metalli pesanti interferiscono con il dominio di legame all'ormone del recettore (Stoica *et al.*, 2000). Il gene umano che codifica per ER è più lungo di 140 kb, contiene 8 esoni e la posizione dei suoi introni risulta essere molto conservata (Ponglikitmongkol *et al.*, 1988).

7.2 Fonti e sintesi degli estrogeni

I composti estrogenici a cui le donne possono essere esposte sono svariati e derivano da fonti sia endogene che esogene. Prima della menopausa, la fonte principale di estrogeni endogeni è rappresentata dal 17- β -estradiolo prodotto dall'ovaio. La sintesi di estradiolo avviene grazie alle cellule della teca, che producono e secernono androgeni a partire dal colesterolo; il testosterone così formato diffonde poi nelle cellule della granulosa, dove viene convertito in 17- β -estradiolo tramite l'enzima aromatasi (Hillier *et al.*, 1994). L'aromatasi è presente anche in altri tessuti, quali la muscolatura, il tessuto adiposo, i testicoli, la placenta, il tessuto nervoso e l'endotelio vascolare; ciascuno di questi tessuti è quindi in grado di sintetizzare estrogeni a livello locale. Una volta sintetizzato, l'estradiolo viene secreto dalle cellule della granulosa nella circolazione sistemica, dove lega in modo reversibile una *sex hormone binding globulin* (SHBG; Gershagen *et al.*, 1989), i cui livelli sierici sono inversamente correlati con le concentrazioni di A-40 (Gillet *et al.*, 2003) o l'albumina, che hanno la funzione di veicolare questo ormone lipofilo nel sangue; solo una minima parte è libera, a causa della sua elevata lipofilia. L'estrogeno libero diffonde nei tessuti bersaglio, dove esercita i suoi effetti genomici e non genomici. L'estradiolo viene poi ulteriormente trasformato nei composti meno attivi estrone e estriolo, prodotti principalmente a livello epatico. Il catabolismo enzimatico porta alla formazione di coniugati solfatati o glucuronidati, idrossiestrogeni e metossiestrogeni, escreti con la bile o le urine (Gruber *et al.*, 2002). Il controllo della sintesi degli estrogeni durante l'età fertile è esercitato dall'asse ipotalamo-ipofisi attraverso la secrezione ciclica di gonadotropine; in particolare, l'ormone follicolo-

stimolante regola l'espressione degli enzimi coinvolti nella steroidogenesi insieme ad altri fattori paracrini.

La valutazione dei livelli plasmatici di estradiolo attraverso un semplice dosaggio rappresenta un indice di funzionalità dell'ovaio e dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi. Ridotti livelli possono presentarsi in caso di ipogonadismo o ermafroditismo, mentre elevati livelli possono dipendere da stadi di gravidanza o in caso di tumori ovarici estradiolo-secerenti. Durante il ciclo mestruale, le concentrazioni plasmatiche di estradiolo variano nella donna da 0.36 a 2.8 nM; i livelli di ormone raggiungono un picco durante la fase preovulatoria, mentre sono più bassi nella fase premestruale. Durante la gravidanza, i livelli ematici di estradiolo arrivano a 70 nM, a causa della produzione placentare, e crescono ulteriormente in prossimità del parto. Nelle donne in post-menopausa, venendo a mancare la funzionalità ovarica, l'estradiolo viene principalmente prodotto dalla conversione di androgeni nel tessuto adiposo; la concentrazione plasmatica di estradiolo scende fino a 0.21 nM, livelli equivalenti a quelli dei maschi (Chambliss et al., 2002).

Oltre a quelle endogene, esistono importanti fonti esogene di molecole ad attività estrogenica, quali i contraccettivi, la terapia ormonale sostitutiva nelle donne in postmenopausa e i fitoestrogeni presenti nei cibi e nelle bevande. Quindi l'organismo può essere esposto a diversi tipi e diverse concentrazioni di estrogeni a seconda del sesso, dell'età, della dieta e delle terapie in corso.

7.3 Ruoli fisiologici degli estrogeni

In generale, gli estrogeni sono sempre stati considerati ormoni riproduttivi esclusivamente femminili; in realtà possono esercitare un ampio spettro di azioni biologiche in diversi tipi di tessuti anche negli uomini. Infatti, oltre agli effetti sulla crescita e sullo sviluppo dell'apparato riproduttivo femminile, gli estrogeni sono in grado di influenzare il tessuto osseo, il sistema immunitario, il sistema nervoso centrale e il sistema cardiovascolare (Barkhem et al., 2004).

La diversa distribuzione tissutale delle due isoforme recettoriali suggerisce che ER α e ER β mediano funzioni biologiche distinte. Per esempio, ER α è l'isoforma più abbondante nell'ovaio, nella prostata, nella vescica, nel polmone, nel colon, nello stomaco, nel sistema nervoso centrale e nell'apparato cardiovascolare. Inoltre, all'interno di uno stesso tessuto, l'espressione di un sottotipo recettoriale può essere limitata ad uno specifico tipo cellulare; per esempio, l'ovaio esprime entrambe le isoforme, ma ER α è presente nelle cellule della teca, mentre ER β è localizzato sulle cellule della granulosa (Barkhem et al., 2004).

7.3.1. Apparato riproduttivo maschile e femminile

Gli estrogeni sono di fondamentale importanza per la crescita, la differenziazione, lo sviluppo e la funzione dell'apparato riproduttivo femminile; infatti, i principali bersagli dell'azione degli estrogeni sono il tessuto mammario e l'apparato riproduttivo femminile.

ER α ed ER β sono entrambi espressi nelle ghiandole mammarie, ma solo ER α sembra essere essenziale per lo sviluppo delle ghiandole stesse; inoltre, la sovraespressione di ER α è implicata nel 70% dei casi di cancro della mammella (Gustafsson, 2003). ER α ed ER β sono espressi anche nell'utero, nell'ovaio, nei testicoli e nella prostata. La delezione del gene che codifica per ER α nei topi porta all'infertilità sia maschile che femminile, mentre la mancanza di ER β causa difetti riproduttivi solo nelle femmine. Nei topi maschi privi di ER β si osservano, invece, iperplasia della prostata e della vescica, tessuti che esprimono principalmente questo recettore (Gustafsson, 2003).

7.3.2. Tessuto osseo

A livello dello scheletro, gli estrogeni riducono il riassorbimento osseo, inibendo l'attività degli osteoclasti. La carenza di estrogeni che si instaura dopo la menopausa o la mancanza di ER α causano osteoporosi; la terapia estrogenica sostitutiva è però in grado di ridurre il riassorbimento del tessuto osseo nelle donne in post-menopausa (Gruber et al., 2002).

7.3.3. Sistema nervoso centrale

Gli estrogeni influenzano molteplici funzioni del sistema nervoso centrale (SNC), tra cui le funzioni di apprendimento, la memoria, la termoregolazione e le funzioni riproduttive, attraverso il controllo dell'asse ipotalamo-ipofisario, che a sua volta è responsabile della regolazione della produzione e secrezione di estrogeni da parte delle gonadi. L'instaurarsi della menopausa, con il conseguente calo degli estrogeni circolanti, è collegato ad un aumentato rischio di patologie neurodegenerative, come l'Alzheimer; rimane dubbia l'efficacia della terapia estrogenica sostitutiva nel proteggere da queste patologie.

Sicuramente ER β , espresso nelle aree del cervello coinvolte nei processi di apprendimento e di memoria, ha un ruolo importante nella modulazione di tali funzioni (Shughrue et al., 1997). È noto anche che l'estradiolo, mediante l'attivazione di ER α , esercita attività anti-infiammatoria e neuroprotettiva (Vegeto et al., 2004; Suzuki et al., 2007). È possibile rilevare a livello cerebrale estradiolo, grazie alla conversione del testosterone in estradiolo catalizzata dalla aromatasi (Garcia-Segura et al., 2003).

Gli estrogeni a livello del lobo temporomediale della corteccia esercitano un'azione nei processi coinvolti nella memoria episodica in particolare nella regione CA1 dell'ippocampo, area preferenzialmente coinvolta nei processi neurodegenerativi della AD (Hyman *et al.*, 1984); l'estradiolo induce insieme al progesterone l'incremento del numero delle spine dendritiche dei neuroni piramidali (Woolley e McEwen, 1993). Nella regione CA1 l'estradiolo promuove il fenomeno di LTP (*long term potentiation*) (Foy *et al.*, 2000), mentre è stato dimostrato come in modelli animali di età avanzata sopprimono il processo di LTD (*long term depression*).

8. LA MENOPAUSA

Secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) la menopausa è un evento fisiologico attraverso il quale passano tutte le donne e che prevede il cessare dell'attività ovarica con una conseguente perdita della fertilità. E' un processo dinamico che compare attorno ai 50 anni con un intervallo di normalità tra i 45 e i 58 anni. Non prevede un brusco passaggio, ma coinvolge un ampio lasso di tempo attraverso il quale si ha una sempre maggiore irregolarità del ciclo mestruale, dei fenomeni di improvviso e violento calore corporeo (flushing o vampate di calore), insonnia e molti altri sintomi. Nei casi in cui si manifesti tra i 40 e i 45 anni si parla di menopausa prematura, mentre l'insorgenza dopo i 53 anni caratterizza invece la menopausa tardiva. E' un evento discreto che si conclude con la permanente cessazione del ciclo mestruale per la perdita di funzione dei follicoli ovarici (North American Menopause Society, 2002).

La menopausa può verificarsi come evento fisiologico e naturale, ma ci sono cause che ne determinano la sua comparsa improvvisa, detta menopausa indotta, come interventi di rimozione di entrambe le ovaie (con o senza isterectomia) o la soppressione iatrogena della funzione ovarica (terapia chemioterapica o radiazioni). E' stato riconosciuto che il fumo può far anticipare l'evento anche di tre anni. L'unico elemento per determinare approssimativamente quando si presenterà la menopausa è l'età alla quale si è presentata per la madre, in quanto si tratta di un "traguardo" determinato geneticamente.

Nel termine menopausa occorre includere tre fasi, quali la transizione menopausale, che comincia con la comparsa dei primi disordini mestruali come il tempo che intercorre tra una ovulazione e l'altra (Soules *et al.*, 2001), la perimenopausa, che comprende il periodo immediatamente prima della menopausa fino ai primi dodici mesi dalla scomparsa del ciclo mestruale (Soules *et al.*, 2001) e, infine, la postmenopausa, che si riferisce a tutto il periodo che segue l'ultima mestruazione, indipendentemente dal tipo di menopausa spontanea o indotta (Henderson 2000). Il termine premenopausa è usato in modo improprio quando riferito al periodo di 1 o 2 anni che precede l'ultima mestruazione mentre dovrebbe essere utilizzato riferendosi a tutto il periodo della vita riproduttiva che precede la menopausa (OMS).

Con la menopausa i livelli di estradiolo e di progesterone risultano alterati in quanto vengono prodotti sempre meno dalle ovaie. Non esistono dei *markers* specifici di menopausa; sicuramente i livelli di FH risultano aumentati (Soules *et al.*, 2001). L'ingresso nella

menopausa viene identificato da un'analisi retrospettiva: dopo 12 mesi consecutivi di amenorrea la produzione di estrogeni vede il suo declino (Trevoux *et al.*, 1986).

Con la menopausa si ha una tendenza ad aumentare di peso (avviene nel 69% dei casi); questo è un meccanismo fisiologico considerabile, in parte, come una protezione naturale in quanto il grasso corporeo consente all'organismo di trattenere più a lungo gli estrogeni.

Nel periodo menopausale è possibile trovare delle quote ridotte di estrogeni circolanti, in maggioranza estrone, per la conversione dei precursori androgenici prodotti dallo stroma ovarico o dalla corteccia surrenale o da altri tessuti periferici.

Nel periodo perimenopausale, in alcuni casi, la donna riporta episodi di diminuzione delle capacità cognitive e in uno studio in donne in perimenopausa oltre il 60% riportava *deficit* nelle capacità mnemoniche (Mitchell *et al.*, 2001).

8.1. Aspetti neurologici della menopausa

Lo sbilanciamento ormonale che si verifica nella donna in menopausa risulta altamente associato con la comparsa e l'aumento di incidenza di malattie di tipo neurologico. La donna passa approssimativamente il 40% della sua vita in una fase postmenopausale, periodo nel quale lo stato di ipogonadismo e ipergonadiotropismo provoca un'alterazione dell'equilibrio esistente tra i sistemi neuroendocrini posti a controllo di numerosi centri dell'ipotalamo e del sistema limbico, ma l'aumento di incidenza di patologie associate con la menopausa si verifica durante quel periodo critico di transizione menopausale (Henderson 2006).

Il progressivo cessare della produzione di estrogeni da parte delle gonadi durante la transizione menopausale fino all'atrofia in perimenopausa (Burger *et al.*, 1999) si riflette a livello centrale con una serie di possibili disordini che caratterizzano la donna nella seconda metà della vita e nell'anzianità come la progressiva perdita di memoria ed il declino di grado lieve delle capacità cognitive (Mitchell *et al.*, 2001). La *performance* di memoria tende a diminuire con l'età, una diminuzione età correlata è considerata normale, tuttavia un'eccessiva perdita viene considerata nell'anziano un'indicazione preclinica di AD (Schonknecht *et al.*, 2005).

Uno studio ha riportato come vi siano alterazioni nel 60% dei casi nelle capacità di memoria nella seconda metà della vita della donna (Woods *et al.*, 2001); in particolare nella donna in perimenopausa (Xu *et al.*, 2005). Una serie di sintomi possono essere aggiunti alla perdita di memoria, come bassa capacità di concentrazione, difficoltà nel ricordare dei nomi noti,

dimenticanze di appuntamenti o eventi (Woods 2001); la dimenticanza di appuntamenti ed impegni appare essere correlata con alcune regioni ippocampali e temporomediali.

9. TERAPIA ORMONALE SOSTITUTIVA (HRT)

Le azioni svolte dagli estrogeni su tutto l'organismo femminile rendono ragione dell'orientamento terapeutico assunto nei confronti della prevenzione e cura dei disturbi della menopausa con l'uso degli estrogeni esogeni.

Con il termine *Hormone Replacement Therapy* (HRT) viene identificata genericamente la somministrazione di estrogeni soli o in associazione ai progestinici in donne in postmenopausa al fine di compensare la carenza estrogenica conseguente alla cessata produzione ovarica. L'associazione del progestinico è giustificata solo nelle pazienti con utero per la protezione endometriale; le pazienti che assumono solo estrogeni sono quelle che non presentano l'utero e si parla di Estrogen Replacement Therapy (ERT). Recentemente negli U.S.A. la North American Menopause Society (NAMS) ha proposto di non parlare di HRT ma di HT (Hormone Therapy) considerandolo un termine più appropriato. Nel 2005 il Women's Health Initiative (WHI) ha proposto il termine Menopausal Hormone Therapy (MHT).

Nella donna in menopausa si presenta una forte riduzione dei livelli di estrogeni sierici; le donne che si trovano nel periodo peri e post menopausale sono esposte ad un aumento del rischio ad una serie di patologie associate con i livelli di estrogeni come il cancro, lo *stroke* ed altre patologie cardiache (Wenger 1998), osteoporosi (Grady *et al.*, 1992) e forme dementigene (Wise *et al.*, 2001). Elevati livelli di estrogeni aumentano l'incidenza di alcune forme di cancro, come quello ovarico (Weiss 1982) o mammario (*Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer* 1997), mentre nelle demenze sono neuroprotettivi e sono associati con una diminuzione della loro incidenza (Kawas *et al.*, 1998).

Comunque, per essere il più preventivo possibile, il trattamento sostitutivo dovrebbe essere intrapreso il più precocemente possibile, sin dal periodo della perimenopausa. Infatti, se la HRT comincia dopo i 65 anni il rischio di demenza nelle donne sane aumenta (Shumaker *et al.*, 2003; Shumaker *et al.*, 2004)

Lo sviluppo di sintomi psicologici nella donna in menopausa è associato con il marcato declino di estrogeni (Hogervorst *et al.*, 2000), e nelle donne non dementi la HRT ha

dimostrato di convertire i *deficit* cognitivi associati con i ridotti livelli di estrogeni (Sherwin 1999; Brinton *et al.*, 2000).

I dati riguardanti la HRT risultano però ancora in piena discussione soprattutto per quanto riguarda il possibile miglioramento delle condizioni cognitive.

La terapia ormonale sostitutiva nelle donne in menopausa è in grado di ridurre il rischio di AD dal momento che uno degli effetti degli estrogeni è quello di eliminare la β A dal fluido cerebrospinale (Hong Goka *et al.*, 2004).

Il primo *trial* clinico è stato condotto dal WHI (*Women's Health Initiative*) e dal NHI (*National Institutes of Health*). Si tratta di uno studio in larga scala iniziato nel 1997 per testare la validità della somministrazione di ERT (estrogeni coniugato) o HRT (progestini sintetici) (*Design of the Women's Health Initiative Clinical Trial and Observational Study* 1998). Nel corso degli anni osservazioni da parte del WHI hanno riportato diversi dati discordanti (Rossouw 1999; Rossouw *et al.*, 2002); per esempio, nel 1999 veniva riportato che la HRT non era in grado di ridurre il rischio di ischemia cardiaca; nel 2002 il trattamento era stato interrotto per l'aumento di incidenza di *stroke*, embolie periferiche, ed eventi di embolie coronariche. In termini di benefici per lo stato cognitivo si era verificato un lieve aumento di incidenza nelle forme di demenza in confronto con il gruppo placebo.

Erano stati confermati i dati di miglioramento nell'osteoporosi (Grady *et al.*, 1992) ed una modesta riduzione di cancro all'endometrio e al colon retto (Calle *et al.*, 1995, Herbert-Croteau 1998, Grodstein *et al.* 1999), ma un aumento nel cancro alla mammella.

I benefici risultavano minori. Per questo motivo lo studio NHI fu interrotto nel 2002, dopo oltre 5 anni.

Per giustificare i risultati discordanti sul ruolo neuro protettivo o tossico degli estrogeni è stata ipotizzata la possibilità di un periodo critico (periodo finestra), in cui la somministrazione di estrogeni può offrire una protezione contro la neurodegenerazione (Resnick e Maki 2001); oltre questo periodo gli estrogeni possono essere elemento di stress e quindi di impatto negativo sull'assetto neuroendocrino nella donna.

9.1. I fitoestrogeni

Negli ultimi anni si è sviluppata l'idea che l'uso dei fitoestrogeni nella terapia menopausale possa essere di beneficio alla salute della donna, in particolare nei confronti del climaterio, e che possa compensare la carenza estrogenica, che si verifica durante la menopausa.

Inoltre, dati epidemiologici indicano che le donne dei Paesi Asiatici, grandi consumatori di soia, presentano una minor frequenza di fratture secondarie all'osteoporosi, di malattie cardiovascolari, di sintomi postmenopausali e di certi tipi di tumore (Adlercreutz e MAzur, 1997).

I fitoestrogeni sono composti biologicamente attivi derivati dalle piante, che mimano strutturalmente e funzionalmente gli estrogeni (Dixon, 2004). Sono, infatti, in grado di legarsi ai recettori degli estrogeni e di stimolarli, producendo effetti diversi, vista la diversa distribuzione tissutale di ER- α ed ER- β , ad esempio su osso, sistema cardiovascolare, metabolismo lipidico e tumore al seno. Il loro effetto estrogeno-simile ha fatto sì che alcuni di essi venissero definiti modulatori selettivi dei recettori degli estrogeni (*Selective Estrogen Receptor Modulators-SERMs*).

Essi sono presenti in frutta e vegetali e sono categorizzati in 3 classi: isoflavoni, lignani e cumestani.

Gli isoflavoni (I.s.) sono principalmente presenti nei semi di soia e possiedono una struttura non-steroidale ma con un anello fenolico, mediante il quale avviene il legame con il recettore degli estrogeni, agendo sia come agonisti che antagonisti degli estrogeni (Makela *et al.*, 1994, 1995). I due principali I.s., genisteina e daidzeina, sono in grado di legare sia ER- α che ER- β (Kuiper *et al.*, 1997,1998) ma stimolano soprattutto ER- β con, quindi, scarsi effetti sull'endometrio e sulla mammella, mentre hanno diversi altri effetti favorevoli sui vari sintomi della menopausa (Tab.9.1.1.)

	Compound	Relative binding affinity		Relative transactivation	
		ER α	ER β	ER α	ER β
Isoflavones	17 β -estradiol	100	100	100	100
	Diethylstilbestrol (DES)	236	221	117	69
	Tamoxifen	4	3	6	2
	Coumestrol	20	140	102	98
	Genistein	4	87	198	182
	Daidzein	0.1	0.5	97	80
	Formononetin	<0.01	<0.01	6	2
	Biochanin A	<0.01	<0.01	36	53
	Ipriflavone	<0.01	<0.01	11	3
	Endocrine disruptors	Bisphenol A	0.01	0.01	50
o,p'-DDT		0.01	0.02	54	10
Nonylphenol		0.05	0.09	62	34
Methoxychlor		<0.01	<0.01	9	2

TABELLA 9.1.1. Affinità di legame relativa e relativa attività di transattivazione di vari composti estrogenici, isoflavoni ed endocrino-tossine, in confronto al 17- β -estradiolo. C.R. Cederroth, S. Nef. *Molecular and Cellular Endocrinology* 304 (2009) 30–42.

Deve essere ricordato che l'affinità degli Is. per gli ER è 500-10000 volte inferiore a quella degli ormoni estrogeni, a seconda del modello molecolare o cellulare usato per confrontare la loro potenza. La loro azione è perciò sempre più blanda di quella degli estrogeni e, quindi, più rispettosa dei delicati equilibri ormonali che si instaurano dopo la menopausa.

Molti I.s., come la genisteina, interferiscono con l'espressione e l'attività dell'aromatasi, essendo inibitori competitivi (Adlercreutz *et al.*, 1993; Brooks e Thompson, 2005) e possono inibire la produzione endogena di 17- β -estradiolo, inducendo, perciò, effetti opposti rispetto a quelli necessari. Gli effetti estrogenici od anti-estrogenici dipendono dal tessuto, dall'isoflavone e dai livelli di estradiolo endogeno. Ad esempio in varie linee cellulari, in presenza di livelli fisiologici di estradiolo (1 nM), la genisteina agisce come anti-estrogeno, mentre a livelli di estradiolo simili a quelli trovati nelle donne in menopausa (0.01 nM), la genisteina mostra un effetto agonistico additivo (Hwang *et al.*, 2006). Inoltre, in un contesto fisiologico l'esistenza di questa doppia componente anti- od estrogenica potrebbe spiegare perché i fitoestrogeni siano poco attivi *in vivo* rispetto al loro effetto *in vitro*.

Un'altra via per esercitare gli effetti antiestrogenici gli I.s. è rappresentato dal loro effetto stimolatorio sulla sintesi della globulina ematica che lega gli ormoni sessuali (*sex hormone-binding globulin* – SHBG). È stato ipotizzato che l'aumento della SHBG sottragga dell'estradiolo dal circolo, svolgendo un effetto antiestrogeno e neutralizzando certi effetti indesiderati dell'estradiolo sull'endometrio e sulla mammella (Carusi, 2000).

Inoltre gli I.s. sono dotati, come gli estrogeni endogeni, di proprietà antiossidanti (Vedavanam *et al.*, 1999) o tirosin-chinasi inibitorie, prevenendo la stimolazione della proliferazione mediata da alcuni fattori di crescita (Akiyama *et al.*, 1987), e di attività anti-androgeniche (Saito *et al.*, 2000). Inoltre alcuni di essi hanno un effetto anti-tiroideo, poiché sono in grado di sopprimere la secrezione ipofisaria di TSH. In aggiunta inibiscono l'attività della perossidasi nella tiroide, bloccando, quindi, la sintesi della tiroxina (Chang *et al.*, 2000).

Infine gli I.s. possono anche modulare i geni recettoriali e l'espressione proteica di altri ormoni, inclusi gli steroidi (Ren *et al.*, 2001), interferendo, perciò, con altri sistemi endocrini. Tuttavia i potenziali benefici di questi composti sono soggetti a controversie, dal momento che i loro effetti appaiono spesso poco significativi e dipendenti dagli individui (This *et al.*, 2001; Bringer *et al.*, 2003; Wuttke *et al.*, 2003; Kurzer, 2003; Ziegler, 2004; Sirtori *et al.*, 2005; Boccardo *et al.*, 2006; Wuttke *et al.*, 2007; Velentzis *et al.*, 2008); infatti le incertezze riguardanti l'efficacia dei fitoestrogeni potrebbero essere dovute a variazioni di metabolismo da donna a donna. Inoltre è importante tenere in considerazione che la distribuzione di ER- α nei tessuti dipende dall'età e dal contesto patofisiologico del soggetto.

Polimorfismi enzimatici o il tipo di microflora intestinale possono avere ripercussioni cruciali sul rilascio di isoflavoni attivi (Clavel *et al.*, 2005; Rowland *et al.*, 2003; Possemiers *et al.*, 2007). Genisteina e daidzeina, infatti, sono presenti nella soia come β -D-glicosidi (genisteina e daizina). Questi glicosidi sono biologicamente inattivi (Setchell, 1998) e vengono idrolizzati

dalle β -glucosidasi batteriche e convertiti nelle corrispondenti forme bioattive. La daidzeina può poi essere metabolizzata ad equolo, il maggior metabolita circolante nei roditori (Fig. 9.1.1).

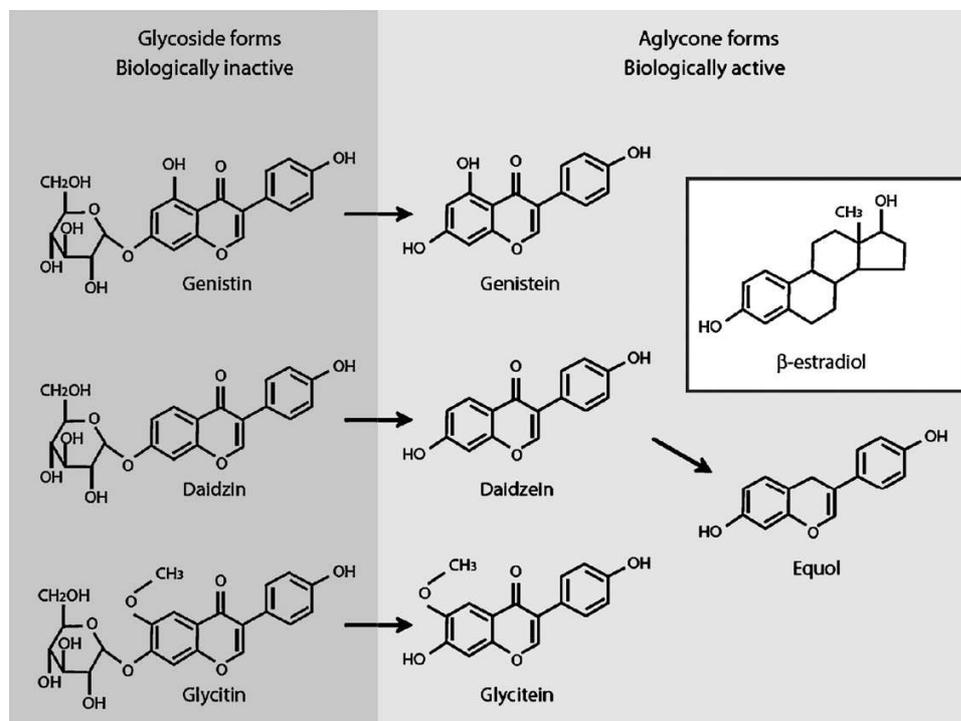


FIGURA 9.1.1. La struttura molecolare degli isoflavoni ricorda quella del 17- β -estradiolo. In seguito ad ingestione le β -glucosidasi intestinali tagliano il residuoglicosilico e genera gli agliconi biologicamente attivi (genisteina, daidzeina e gliciteina). La daidzeina può essere poi metabolizzata ad equolo. *C.R. Cederroth, S. Nef / Molecular and Cellular Endocrinology 304 (2009) 30–42.*

Gli I.s. interagiscono poi con le proteine plasmatiche come l'albumina ed debolmente anche con le lipoproteine (Boulton *et al.*, 1998); questo suggerisce che essi potrebbero interferire, in un contesto di poli-terapie, con l'assunzione e l'escrezione dei farmaci. Ciò potrebbe spiegare in parte la poca biodisponibilità e la debole attività dei fitoestrogeni. Inoltre, dal momento che il tessuto adiposo rappresenta il maggior sito di accumulo dei fitoestrogeni, è possibile un rilascio da quest'ultimo. L'eccesso di peso (e perciò di lipidi) a cui va incontro il 40% delle donne in menopausa potrebbe, perciò, correlare con un aumento di fitoestrogeni nel tessuto adiposo e, perciò, con loro concentrazioni plasmatiche variabili, dovute ad un rilascio imprevedibile nel sangue.

Alcuni studi hanno dimostrato che gli I.s. migliorano alcuni parametri metabolici; per esempio riducono le concentrazioni plasmatiche di LDL e colesterolo totale (Gardner *et al.*, 2001) o la massa grassa in donne in post-menopausa (Wu *et al.*, 2006), o che pazienti obesi trattati con proteine della soia andassero incontro a perdita di peso (Allison *et al.*, 2003). Inoltre un *trial* clinico condotto in donne post-menopausali rivelava una riduzione di glucosio

ed insulina a digiuno da parte degli I.s. (Cheng *et al.*, 2004). In contrasto, un numero significativo di studi riporta un'assenza di effetti benefici della soia sui classici parametri metabolici come il peso corporeo, il profilo sierico dei lipidi, la massa grassa, il glucosio e l'insulina (Yamashita *et al.*, 1998; Anderson and Hoie, 2005; Li *et al.*, 2005; Hall *et al.*, 2006; Ikeda *et al.*, 2006; Anderson *et al.*, 2007).

Dati discordanti si trovano anche negli studi sui roditori. I motivi di questi risultati discordanti possono essere molteplici, fra cui la variabilità del disegno sperimentale, la capacità degli individui di produrre equolo e la suscettibilità genetica.

Sembrirebbe poi che gli I.s. prevengano il cancro alla mammella; in realtà anche in questo caso i dati sono discordanti, essendo presenti alcuni studi su animali con una incidenza tumorale invariata (Allred *et al.*, 2001), un solo studio con una riduzione significativa della massa tumorale (Lamartiniere, 2000) ed addirittura uno studio in cui la somministrazione di genisteina causava lo sviluppo di un tumore solido (Allred *et al.*, 2001). Anche negli studi clinici la somministrazione di soia a donne in premenopausa sembrerebbe avere effetti controversi, da un canto riducendo l'incidenza di tumore al seno (Atkinson and Bingham, 2002), dall'altro incrementandola (Petraakis *et al.*, 1996). Lo stesso vale per il tumore dell'endometrio (Newbold *et al.*, 2001; Johnson *et al.*, 2001).

9.1.1. Fitoestrogeni e tessuto osseo

Molti studi sull'animale hanno dimostrato un significativo miglioramento della massa ossea dopo assunzione di estratti della soia (Arjmandi e Smith, 2002; Anderson e Garner, 1998; Picherit *et al.*, 2000). Altri studi osservazionali epidemiologici hanno dimostrato che i fitoestrogeni mantengono o migliorano leggermente la massa ossea in donne in post-menopausa (Horiuchi *et al.*, 2000; Mei e Kung, 2001). Gli I.s. sembrerebbero avere un effetto modesto nel ritardare la perdita ossea nelle donne in perimenopausa (Alekel *et al.*, 2000) e post-menopausa (Potter *et al.*, 1998; Clifton-Bligh *et al.*, 2001), ma questi effetti non sono stati riconfermati in altri studi (Hsu *et al.*, 2001), nei quali sono stati riportati inconsistenti effetti degli isoflavoni su marcatori ossei in donne in post menopausa (Arjmandi e Smith, 2002). Arjmandi *et al.* hanno dimostrato che le donne post-menopausali che assumevano gli isoflavoni avevano una escrezione urinaria significativamente ridotta di deossipiridinolina, uno specifico *biomarker* di riassorbimento osseo. Inoltre gli I.s. sembrano aumentare la sintesi di IGF-1, la cui concentrazione nelle donne è positivamente correlata alla massa ossea.

In scimmie in post-menopausa, tuttavia, gli I.s. risultavano sostituti inefficienti degli estrogeni nel proteggere contro la perdita ossea estrogeno-dipendente (Register *et al.*, 2003).

Pertanto l'ipotesi di un effetto benefico della soia sulla massa ossea è ancora fonte di dibattito ed il dosaggio ottimale e la componente responsabile degli effetti benefici sull'osso sono ancora poco chiari.

9.1.2. Fitoestrogeni e sintomi postmenopausali

In Asia solo il 10-20% delle donne in postmenopausa soffre di *hot flashes* rispetto al 70-80% delle donne delle donne occidentali (Lock, 1991; Tang, 1994). Una possibile spiegazione risiede nel consumo di soia, alimento base nella dieta asiatica, che influenzerebbe le risposte corporee ai cambiamenti nei livelli ormonali caratteristici della menopausa (Adlercreutz, 1990). Gli hot flashes sono dovuti ad overattivazione dell'ormone liberante gonadotropine (*Gonadotropin Releasing Hormone-GnRH*, Tataryn *et al.*, 1979) a causa del venir meno del feedback negativo dell'estradiolo.

Gli studi clinici sull'effetto degli I.s. nella sindrome postmenopausale sono contrastanti, con modesti o nulli benefici rispetto al placebo (Dalai set *al.*, 1998; St Germani net *al.*, 2001; Tice *et al.*, 2003).

Pertanto ulteriori analisi di ricerca sono necessarie in questa area.

9.1.3. Fitoestrogeni ed Alzheimer's disease

La terapia estrogenica sembra essere una delle strategie per la prevenzione delle demenze, in particolare dell'AD. Forti evidenze biologiche supportano gli effetti benefici degli estrogeni sul cervello. Inoltre i recettori estrogenici sono presenti nel cervello, in particolare in aree coinvolte nell'apprendimento e nella memoria, come l'ippocampo e l'amigdala (Shughrue *et al.*, 1997). Gli enzimi necessari per la biosintesi degli steroidi sessuali sono stati identificati nelle stesse regioni, suggerendo un ruolo importante degli estrogeni nel cervello. Visti i dati discordanti sugli effetti della HRT e l'AD, i fitoestrogeni sembrerebbero essere i nuovi candidati per l'AD. Sebbene in letteratura siano presenti pochi *papers* riguardo ai benefici effetti degli I.s. sulla memoria o sul sistema nervoso centrale (File *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2001), gli effetti dei fitoestrogeni sul SNC nell'uomo sono poco chiari e controversi.

10. IL PROGESTERONE ED I SUOI MOLTEPLICI RECETTORI

Dati emergenti assegnano al progesterone molteplici funzioni non-riproduttive nel SNC, tra cui regolazione dei processi cognitivi, variazioni nell'umore, processi infiammatori, funzione mitocondriale, neurogenesi e rigenerazione, mielinizzazione e recupero post traumatico. Le risposte neuronali evocate dal progesterone sono mediate da un'ampia gamma di recettori (PRs), che comprendono i classici recettori nucleari PRA e PRB e loro isoforme derivanti da splicing alternativo, e il recettore a sette domini transmembrana (7TMMPRb) e un altro recettore membranario noto come 25-Dx (PGRMC1). La via classica di trasduzione del segnale mediata da PRA e PRB, che prevede la traslocazione nucleare del recettore e la conseguente attivazione dell'espressione di geni *target* non è l'unica modalità di trasduzione del segnale intracellulare utilizzata dal progesterone. I recettori membranari del progesterone, infatti, si trovano a monte di cascate del segnale, che hanno come protagonisti diversi secondi messaggeri intracellulari. La distribuzione omogenea dei PRs a livello neuronale è la prova diretta che il progesterone svolge importanti funzioni nel regolare le attività neuronali.

10.1 Recettori del progesterone

I classici recettori nucleari del progesterone (cPR) si localizzano in molteplici regioni del SNC, tra cui ippocampo, corteccia, ipotalamo e cervelletto; in analogia ad altri ormoni steroidei, il progesterone (P4) estrinseca la sue funzioni legandosi e attivando specifici recettori a localizzazione cellulare, noti come fattori di trascrizione ligando-sensibili. In condizioni normali cPR sono sequestrati da numerose proteine chaperone, tra cui le *heat shock protein* hsp 90, 70 e 40; l'interazione del progesterone con tali molecole è un prerequisito per l'interazione recettore-ligando. In seguito all'interazione con P4, PR va incontro a modificazioni conformazionali, si dissocia dalle hsp e dimerizza, quindi trasloca a livello nucleare dove interagisce con specifiche sequenze del DNA, note come PREs (*progesteron responsive elements*), contenute nei promotori dei geni target. Il recettore attivo agisce in sinergia con proteine nucleari specifiche, note come co-attivatori, che possiedono sequenze altamente conservate (eliche antipatiche LXXLL) attraverso cui interagiscono con la regione AF-2 (activation function) del dominio ligand-binding di PR.

P4 si dimostra in grado di aumentare l'espressione di geni privi di PREs (Groshong *et al.*, 1997; Owen *et al.*, 1998; Richer *et al.*, 1998), suggerendo vie alternative di trasduzione del segnale. Queste risposte non classiche (PREs-indipendenti) dipendono sia da meccanismi genomici alternativi, in cui PR lega e attiva altri fattori trascrizionali come SP1 (Owen *et al.*,

1998); sia da meccanismi non genomici, come l'attivazione di secondi messaggeri (Nilsen *et al.*, 2002; Nilsen *et al.*, 2003; Lange *et al.*, 1998; Fig. 10.1.1).

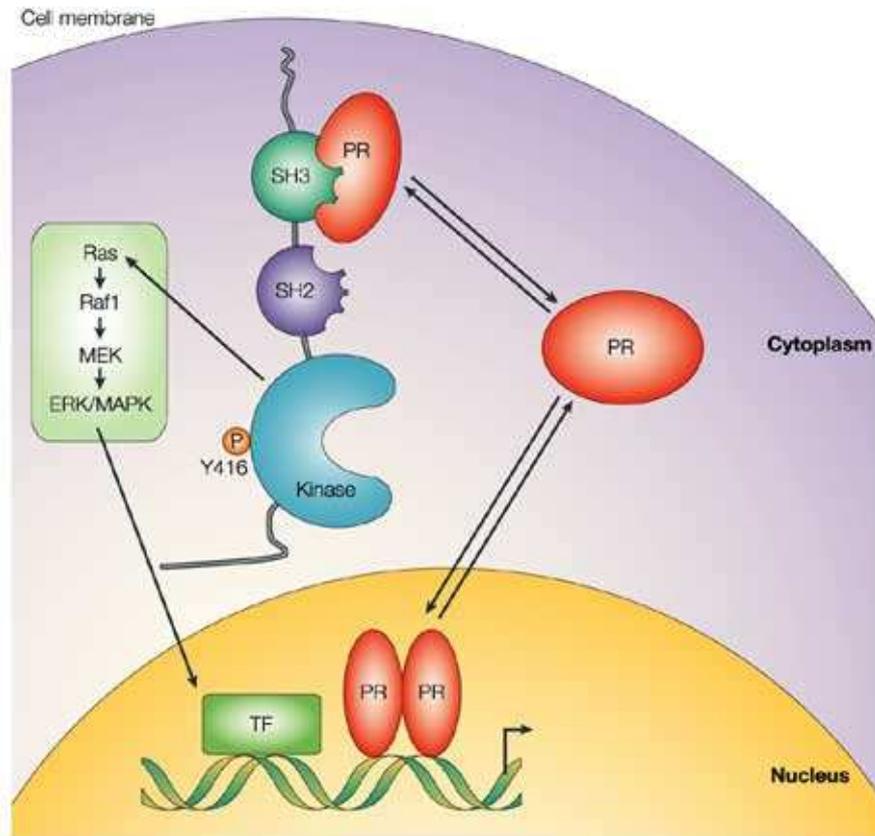


FIGURA 10.1.1. Meccanismi d'azione del recettore del progesterone (PR). A sinistra: interazione con il dominio SH3 di Src e attivazione della cascata di trasduzione del segnale delle MAPK, che influenzano l'attività di fattori di trascrizione nucleari (TF); a destra: azione genomica di PR, che dimerizza, trasloca nel nucleo e attiva geni specifici responsabili al progesterone.

10.2 Isoforme dei recettori del progesterone

Le isoforme più abbondanti dei cPR sono due: l'isoforma B "full-length" (PRB) e l'isoforma A (PRA), mancante dell'estremità N-terminale; entrambe le isoforme sono codificate dallo stesso gene (contenente 8 esoni) e si differenziano per un diverso inizio di trasduzione (start codon). In analogia con gli altri recettori nucleari, cPR sono composti da una regione N-terminale (codificata dall'esone 1), da un dominio di legame al DNA conservato (esoni 2 e 3), da una regione cerniera variabile (parte dell'esone 4), e da un dominio di legame al progesterone conservato (esoni 4-8). Il dominio N-terminale di PRB, conosciuto come BUS (B-upstream segment) assente in PRA, conferisce un'ulteriore funzione di attivazione (AF-3), ed è formato da due motivi LXXLL e da un residuo di triptofano altamente conservato.

Oltre a PRA e PRB, esistono ulteriori varianti di cPR generate dal fenomeno di splicing alternativo (Hirata *et al.*, 2002; Hirata *et al.*, 2003); esse si generano in seguito a inserzioni o delezioni di esoni (“intronic exon” o “exon-skipped” variants). Gli esoni intronici T e S possono essere inseriti tra gli esoni 3 e 4, mentre gli esoni i45a e i45b possono essere inseriti tra gli esoni 4 e 5; le varianti “exon-skipped” includono PR-c, PR-s, e PR-t. Queste sono generate da omissione dell’esone 1 (PR-c), oppure degli esoni 1-3 (PR-s e PR-t); esistono ulteriori varianti ottenute sempre da tale meccanismo, alcune delle quali presentano un difettivo dominio di legame al DNA e mancano del segnale di localizzazione nucleare (NLS). Le varianti mancanti di NLS hanno una localizzazione citosolica e contengono un dominio ricco in prolina (PXXP); tali varianti mostrano elevata affinità per i domini SH3 delle proteine Src; tale caratteristica conferisce alle varianti di PR di interagire e attivare le proteine Src e le MAPK nel citosol. I PRs mancanti sia del dominio di legame al DNA che del dominio NLS; potrebbero pertanto funzionare come recettori di membrana.

Le azioni di P4 a livello del SNC sono mediate oltre, che dai recettori classici, anche da meccanismi cPR-indipendenti, dal momento che è stato osservato che in topi *knock out* per PR il tessuto neuronale mantiene responsività all’azione di P4 (Krebs CJ *et al.*, 2000). Per la precisione, sono state identificate due proteine in grado di legare P4: 7TMPR e 25-Dx.

7TMTPR è una proteina di membrana che attraversa il doppio strato fosfolipidico 7 volte, come suggerito dalla sigla che la contrassegna, essa possiede caratteristiche comuni ai recettori associati alle proteine G; l’interazione di tale recettore con i progestinici risulta in un blocco dell’attività dell’adenil-ciclastasi, l’enzima che catalizza la produzione del secondo messaggero cAMP (Zhu *et al.*, 2003). Sono state identificate tre isoforme di 7TMTPR (7TMTPR α , β e γ), le quali sembrano essere altamente conservate durante l’evoluzione.

Un altro recettore di P4 a localizzazione membranaria è stato recentemente clonato in differenti specie. L’iniziale isolamento della proteina da roditori rivelava la presenza di un unico dominio transmembrana; nell’uomo sono stati identificati due geni ortologhi codificanti per la stessa proteina purificata nell’animale: il gene hpr 6.6 (cromosoma 10) codificante per una proteina di 195 amminoacidi, e il gene Dg6 (cromosoma 4) codificante per una proteina di 223 amminoacidi. La molecola proteica omologa nel ratto è di 223 amminoacidi e pesa 25 kDa; possiede un dominio idrofobico di 14 residui e una regione N-terminale ricca di prolina. L’overespressione di 25-Dx nelle cellule CHO (*Chinese Hamster Ovary cell*) conferisce al sistema cellulare un’augmentata capacità di legare P4 (Falkenstein *et al.*, 1999); la frazione microsomiale di tali cellule ingegnerizzate mostra al contempo ridotta affinità per altri ormoni steroidei, come testosterone, cortisolo e corticosterone, e nessuna affinità né per estradiolo che

per aldosterone. Tali evidenze indicano l'esistenza di un'interazione specifica tra 25-Dx e progesterone.

10.3 Meccanismo d'azione del progesterone

Il progesterone esercita molteplici effetti nel SNC attraverso tre principale meccanismi: regolazione dell'espressione genica, modulazione dei sistemi neurotrasmettitoriali e attivazione di vie di trasduzione del segnale intracellulare.

Storicamente, gli effetti di P4 sull'espressione genica sono stati considerati mediati da PRA e PRB; le due isoforme recettoriali agiscono in modo diverso sull'espressione genica e generalmente PRA si dimostra un transattivatore più potente di PRB, su cui esercita inoltre un'attività repressiva (Aupperlee *et al.*, 2007; Brayman *et al.*, 2006). L'espressione genica indotta da P4 è estremamente variabile, e tale complessità è generata dalla presenza delle varianti recettoriali (sopra descritte), le quali possiedono differenti affinità per ligandi diversi e si influenzano vicendevolmente grazie alla capacità di agire come transattiviatori (Marshbern *et al.*, 2005).

I meccanismi d'azione cPR indipendente sono mediati dai due recettori di membrana 25-Dx e 7TMPR.

Recentemente, sono stati identificati dei siti di legame per P4 sulla membrana di neuroni ipotalamici e del midollo spinale che coincidono con la proteina 25-Dx, per la quale è stata dimostrata la capacità di mediare l'azione antiapoptotica di P4 nelle cellule del corpo luteo e della granulosa ovariche (Peluso *et al.*, 2006; Peluso *et al.*, 2007). In tali cellule 25-Dx interagisce con la proteina che inibisce l'attivatore del plasminogeno (SERBP1), con cui media l'attivazione della protein chinasi cGMP-dipendente; la presenza in 25-Dx di domini omologhi a Src (domini SH) suggerisce un'ulteriore modalità d'azione di 25-Dx attraverso l'attivazione delle proteine Src.

Il meccanismo d'azione di 7TMPB sembra essere associato alla capacità della proteina di inibire l'attività dell'adenil-ciclastasi, che risulta in una attivazione del pathway delle MAPK.

La famiglia delle Mitogen-activated protein kinases (MAPKs) è coinvolta in numerose funzioni cellulari, tra cui la differenziazione cellulare, la proliferazione, sopravvivenza e morte cellulare. L'attivazione di MAPK, e di ERK (extracellular signal regulated kinase) è il meccanismo principale attraverso cui gli estrogeni (E2) esercitano il loro ruolo protettivo sulla popolazione neuronale (Singer *et al.*, 1999). Numerosi lavori dimostrano che E2 e P4 attivano il signaling di ERK (Nilsen *et al.*, 2002; Nilsen *et al.*, 2003; Singh *et al.*, 2001; Singer *et al.*,

1999), mentre MPA (medrossiprogesterone acetato), un progestinico mancante di qualità neuroprotettive, non è capace di indurre l'attivazione nucleare di ERK.

CREB (proteina di legame all'elemento responsivo di cAMP) rappresenta il substrato di MAPK, e la sua attivazione è associata a un aumento nella resistenza al danno ischemico (Finkbeiner 2000; Freeland *et al.*, 2001); si è dimostrato che CREB è attivato in risposta all'esposizione agli ormoni ovarici (Gu *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 2004; Wade *et al.*, 2003; Zhou *et al.*, 1996). L'effetto neuroprotettivo assegnato a P4 è associato alla sua capacità di attivare il segnale di MAPK, che risulta in una fosforilazione di CREB, il quale a sua volta determina un aumento dell'espressione del fattore anti-apoptotico bcl-2 (Freeland *et al.*, 2001); in accordo con quanto detto, E2 e P4 inducono *up-regulation* di bcl-2 in colture di neuroni ippocampali, mentre il trattamento con MPA, incapace di agire su ERK, non aumenta l'espressione di bcl-2 (Nilsen *et al.*, 2002). Accanto alla via MAPK/ERK, un altro pathway attraverso cui E2 e P4 esercitano effetti neuroprotettivi è rappresentato dal pathway di Akt (Singh *et al.*, 2001); si è dimostrato infatti che l'attivazione di Akt in colture di neuroni corticali promuove la sopravvivenza neuronale.

P4 si dimostra capace di indurre neuroprotezione attraverso molteplici meccanismi; recenti lavori suggeriscono che, in modelli di lesione spinale, P4 esercita un ruolo neuroprotettivo tramite l'*up-regulation* di BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*; Wang *et al.*, 2001; Borrás *et al.*, 2003; Simpkins *et al.*, 2007), incrementati livelli e attività dell'enzima colina acetiltransferasi, e miglioramento della disfunzione mitocondriale (Robertson *et al.*, 2006). In relazione a quest'ultimo punto, Nilsen e colleghi hanno osservato un aumento della respirazione mitocondriale in seguito a trattamento di 24 h con P4; dato ancora più interessante è che P4 riduce la generazione di radicali liberi e la perossidazione lipidica, migliorando significativamente l'efficienza della catena di trasporto di elettroni.

In modelli di ischemia cerebrale, gli effetti protettivi di P4 sono attribuiti, in parte, alla soppressione della risposta infiammatoria e dell'espressione di ossido-nitrico sintasi 2 (Gibson *et al.*, 2005); accanto all'azione diretta sulle cellule danneggiate, P4 esercita azione neuroprotettiva indirettamente agendo su popolazioni non-neuronali. Per esempio, P4 riduce la perdita di permeabilità della BEE (Roof *et al.*, 1997), diminuisce l'attivazione gliale (Grossman *et al.*, 2004), e stimola la mielinizzazione (Azcoitia *et al.*, 2003; Koenig *et al.*, 1995).

Diversi stimoli, tra cui kainato (Ben-Ari, 1985), pilocarpina (Turski *et al.*, 1989) e pentilentetrazolo (Jung *et al.*, 2002), producono alterazioni comportamentali stereotipate e significativa perdita neuronale in specifiche regioni cerebrali, tra cui l'ippocampo; il

trattamento con P4 si dimostra efficace nell'alleviare gli effetti generati da queste sostanze tossiche. Il principale meccanismo neuroprotettivo in questo modello sperimentale sembra coinvolgere un metabolita di P4, l'allopregnanolone (AP α 3 α ,5 α -tetraidroprogesterone); A α è un potente modulatore allosterico del recettore di tipo A dell'acido γ -amminobutirrico (GABA_A), amplificando la conduttanza dello ione cloro evocata da GABA (Baulieu *et al.*, 1996; Lephart *et al.*, 1993). Il risultato è un incremento della trasmissione gabaergica inibitoria, che contrasta l'eccitotossità evocata dall'ipereccitabilità glutammatergica; la conseguenza di queste azioni consiste in un recupero del danno neuronale e un miglioramento dei sintomi comportamentali, associati alla somministrazione delle sostanze tossiche.

Infine, P4 eserciterebbe un'azione di regolazione del metabolismo di A β e, pertanto, potrebbe avere un ruolo nella AD. Gli studi sulla regolazione di A β ad opera degli ormoni sessuali si basano sull'uso di modelli di animali ovariectomizzati, in cui si assiste ad una deplezione degli estrogeni e progesterone endogeni; tali animali ricevono generalmente una terapia sostitutiva a base di soli estrogeni.

Mentre la terapia estrogenica si dimostra efficace nello stimolare il catabolismo della A β , il trattamento con progesterone non è in grado né di ridurre il progressivo accumulo di A β né di contrastare la perdita di memoria, osservati nel modello animale. In aggiunta, negli animali che ricevono la terapia combinata con entrambi gli ormoni, P4 blocca gli effetti benefici di E2 sull'accumulo di A β (Carroll *et al.*, 2007).

***SCOPO DELLA
RICERCA***

1. OBIETTIVI

E' dato confermato che la donna in post-menopausa sia esposta ad un rischio superiore di insorgenza di AD rispetto agli uomini di pari età (Ripich *et al.*, 1995). Poiché la cessazione dell'attività endocrina ovarica, che si instaura nella donna in menopausa, configura un assetto ormonale particolare (Atwood *et al.*, 2005), si è deciso di indagare le eventuali correlazioni tra i cambiamenti ormonali nella donna e la patologia di AD, la cui natura multifattoriale suggerisce la concomitanza di un ampio *range* di fattori concausali di diversa origine.

Il presente lavoro di tesi si basa sulla caratterizzazione delle modificazioni fisiologiche che intervengono nell'organismo femminile durante il periodo di transizione menopausale: ci si è soffermati sulla ricerca di differenze tra uomo e donna nell'espressione di numerosi fattori, che potessero giustificare l'aumentato rischio di AD nel genere femminile e, quindi, avvalorare l'ipotesi della menopausa come fattore di rischio di neurodegenerazione.

E' stato, pertanto, reclutato un vasto numero di soggetti sani suddivisi per sesso e stratificati per età e di pazienti AD, suddivisi solo per sesso, ma non per età, non essendoci differenze correlate all'età all'interno di questo gruppo, nei quali si è valutata l'espressione di un pannello di *biomarkers* sia con riconosciuto effetto neuroprotettivo sia considerati favorevoli la neurodegenerazione, al fine di evidenziare in che modo i cambiamenti nel profilo di espressione di tali fattori fossero correlati con l'invecchiamento fisiologico, la differenza di genere e la patogenesi e progressione di AD. La stratificazione per età, infatti, all'interno della popolazione femminile permette di evidenziare variazioni significative nella fascia di transizione menopausale rispetto alle fasce pre- e post-menopausali, mentre il confronto con i pazienti AD permette di evidenziare la presenza di variazioni che si discostano dal normale invecchiamento fisiologico.

L'espressione di tali parametri biologici è stata analizzata nei leucociti periferici. Queste cellule di facile reperibilità, tramite prelievo venoso ematico, oltre a sintetizzare numerosi peptidi, ormoni e rispettivi recettori coinvolti nei differenti assi ormonali, rispondono agli stessi meccanismi di regolazione genica cui sono sottoposte le cellule microgliali, ovvero le cellule immunocompetenti del SNC. I leucociti (Miller *et al.*, 1981), infatti, insieme ad altri tessuti extra-neuronali come fibroblasti (Sims *et al.*, 1985) e piastrine (Di Luca *et al.*, 1988), sono ormai da tempo utilizzati in clinica diagnostica come utili strumenti nell'indagine delle modificazioni che si verificano nelle aree ipofisiotrope cerebrali, il cui accesso è precluso nell'uomo *in vivo*.

Di seguito si riportano le motivazioni che hanno condotto alla selezione dei *biomarkers*, oggetto di questo studio clinico.

1. AD è un disordine neurodegenerativo caratterizzato da una selettiva perdita neuronale e dalla presenza di due tipi di aggregati proteici: la placca amiloide, composta dalle fibrille del peptide A β insolubile e neurotossico, ed i grovigli neurofibrillari (NFTs), composti, essenzialmente, dalla forma fosforilata della proteina tau.

La placca amiloide rappresenta il segno patologico distintivo di AD ed è accompagnata da neuriti distrofici, astrociti reattivi e microglia attivata. Il *core* della placca risulta altamente immunogeno e scatena una risposta infiammatoria mediata dalle cellule microgliali cerebrali, che assumono il fenotipo dei cosiddetti macrofagi cerebrali (Kalaria, 1999). Queste cellule microgliali attivate migrano e circondano i depositi di A β , promuovendone l'*uptake*, che risulta essere tempo- e dose-dipendente in esperimenti *in vitro* con microglia corticale umana (Li R *et al.*, 2000).

Il riconoscimento e legame con la forma fibrillare e non del peptide A β avviene tramite l'espressione da parte delle cellule microgliali di un'ampia gamma di recettori sia in condizioni fisiologiche che patologiche (Rodrigo A *et al.*, 2005). Tali recettori includono i recettori *scavenger* di tipo A (SR-A) e di tipo B (SR-B), tra cui CD36, che mediano, rispettivamente, l'adesione e l'endocitosi delle fibrille di A β da parte della microglia e degli astrociti (El Koury *et al.*, 1996; Coraci *et al.*, 2002). In particolare, CD36, in seguito al legame con le fibrille di A β , stimola la secrezione di numerose molecole proinfiammatorie, quali le specie reattive dell'ossigeno, le citochine e l'ossido nitrico (Coraci *et al.*, 2002). Pertanto, in corso di AD, l'esposizione persistente della microglia al peptide A β evoca una risposta infiammatoria che cronicizza e gioca un ruolo fondamentale nella degenerazione neuronale; per questo Coraci e colleghi (2002) ipotizzano un coinvolgimento di CD36 nella patogenesi e progressione di AD. Uno di questi composti, hexarelina, è in grado di ridurre l'espressione di citochine proinfiammatorie (IL-1 e IL-6) su cellule microgliali (linea cellulare murina N9) esposte ad A β : in queste condizioni l'effetto anti-infiammatorio di hexarelina è mediato dal recettore *scavenger* CD36 e non dal più comune recettore GHS-R1a, la cui espressione è assente sulle cellule N9 (Bulgarelli I *et al.*, 2009).

Ad oggi non è stato ancora delineato un ruolo preciso per i recettori *scavenger* nella patobiologia di AD; anche se CD36, come precedentemente spiegato, è con alta probabilità associato alla reazione infiammatoria scatenata dai depositi di A β ; rimane da chiarire, quindi,

quale sia il suo contributo nel processo di flogosi, principale responsabile della neurodegenerazione in AD.

Alla luce di tali considerazioni nel presente lavoro si è voluto indagare, mediante tecnica RT-PCR, come variasse l'espressione di CD36 nel corso della vita all'interno della popolazione sana, in particolare nella fase di transizione menopausale, ed in corso di AD

In questo modo si mettono a confronto le modificazioni subite dal parametro biologico sia all'interno del processo fisiologico dell'invecchiamento, che si accompagna a normali fenomeni di declino cognitivo di entità più o meno lieve, sia tra la condizione controllo del soggetto sano (giovane od adulto) e quella patologica del paziente AD. Inoltre, all'interno della casistica di controllo, sulla base del riscontro di un aumentato rischio di AD nella donna, ci si può soffermare sul contributo della menopausa nell'instaurare un profilo di espressione del *biomarker* più o meno simile a quello riscontrabile nel soggetto AD.

2. L'interazione tra il SNC e il sistema immunitario in stati patologici come depressione e sclerosi multipla è ormai da tempo oggetto di numerosi studi scientifici; in particolare, si delinea un coinvolgimento di molteplici citochine nella modulazione di complesse funzioni cerebrali tra cui l'apprendimento e la memoria (Wilson *et al.*, 2002). L'overespressione di alcune citochine (soprattutto IL-1 β , IL-6 e TNF- α) è stata associata a numerosi *status* patologici, sia del sistema nervoso centrale che periferico, che comprendono malattie autoimmuni e disordini neurodegenerativi, tra cui AD (Viviani *et al.*, 2004). Come per altre citochine, il ruolo biologico di IL-6 risulta ancora poco chiaro, dal momento che diversi studi assegnano alla citochina sia funzioni neuroprotettive che neurolesive; da una parte, l'iperespressione di IL-6 in modelli animali transgenici provoca una riduzione del 63% della neurogenesi ippocampale (Vallieres *et al.*, 2002), dall'altra parte, si dimostra che la deplezione di IL-6 distrugge la capacità mnemonica a breve termine in topi *knock out* per IL-6 (Hryniewicz *et al.*, 2007). Tali studi suggeriscono il coinvolgimento della citochina nella regolazione della neurogenesi ippocampale adulta, che gioca un ruolo importante nell'apprendimento e nella memoria. Altri lavori assegnano ad IL-6 la capacità di interferire con i processi di plasticità sinaptica (Braidà *et al.*, 2004), aggiungendo così un altro elemento a favore dell'importanza di tale molecola nel modulare le funzioni cognitive.

Dato ancora più interessante deriva da lavori che dimostrano che nella corteccia e nel *liquor* di pazienti AD risultano incrementati i livelli di una serie di molecole proinfiammatorie, tra cui proteine del complemento, citochine (soprattutto IL-1, IL-6 e TNF- α) e chemochine e loro

recettori (Galimberti D., 2006); inoltre, polimorfismi nei geni di molecole proinfiammatorie si dimostrano associati ad AD (Candore G *et al.*, 2007).

Nonostante il ruolo fisiologico di IL-6 nel SNC sia ancora da chiarire, sempre più numerose sono le evidenze che assegnano al processo infiammatorio un ruolo centrale nella neurogenerazione di AD; pertanto, l'analisi della molecola proinfiammatoria IL-6 sembra ragionevolmente valutabile all'interno di questo studio clinico, che si occupa di screenare una serie di parametri capaci di influenzare, anche solo parzialmente, il bilancio netto tra le influenze neuroprotettive e quelle pro-neurotossiche nel contesto del processo neurodegenerativo di AD.

Anche in questo caso, è stata valutata l'espressione di IL-6 tramite tecnica RT-PCR nella popolazione controllo ed AD. Giacché si riporta che la produzione di IL-6 subisce modificazioni in condizioni di stress ed in stati depressivo-traumatici (Dentino *et al.*, 1999), tra cui si può includere la menopausa, una particolare attenzione è stata rivolta all'analisi del profilo d'espressione di questo parametro nella vita della donna, per evidenziare eventuali differenze con il sesso maschile o analogie con lo stato patologico di AD.

3. La donna in post-menopausa presenta un rischio d'insorgenza di AD fino a 2-3 volte superiore rispetto all'uomo di pari età; tale dato fa presupporre che le modificazioni ormonali caratterizzanti la menopausa, in particolare la brusca caduta dei livelli di estrogeni, siano i diretti responsabili dell'aumentato rischio di AD nella donna. È stato, in effetti, dimostrato che gli estrogeni esercitano un ruolo neuroprotettivo e, pertanto, la perdita di tale protezione provoca uno sbilanciamento tra le forze neuroprotettive e quelle neurolesive.

In effetti, si è dimostrato che la terapia estrogenica è associata con numerosi effetti benefici, che includono una diminuita incidenza di osteoporosi (Unnikrishnan AG *et al.*, 2000) ed un miglioramento dello stato cognitivo nelle donne in post-menopausa, le quali non mostrano segni di demenza (Phillips e Sherwin, 1994; Manly *et al.*, 2000; Maki *et al.*, 2001). Nonostante le proprietà neuroprotettive degli estrogeni nell'uomo risultino ancora controverse, esiste una ricca letteratura su modelli animali che suggerisce per questi ormoni un ruolo positivo in tal senso. Si osserva, infatti, che l'estradiolo protegge contro un ampio range di insulti tossici, tra cui radicali liberi (Behl C *et al.*, 1999), eccitotossicità (Singer CA *et al.*, 1999), tossicità indotta da A β (Brinton RD *et al.*, 2000); Li R e colleghi (2000) hanno dimostrato che, in esperimenti su microglia corticale umana attivata con il peptide A β , il pretrattamento con estrogeni incrementa l'internalizzazione di A β da parte di queste cellule.

Inoltre, gli estrogeni esercitano un'azione neurotrofica su popolazioni neuronali delle quali aumentano la plasticità sinaptica (Chang *et al.*, 1997; Granholm *et al.*, 2003).

I meccanismi attraverso cui gli estrogeni esercitano gli effetti neuroprotettivi sono molteplici e risultano attualmente oggetto di numerosi studi; sicuramente essi sono in parte mediati dall'attivazione dei recettori classici degli estrogeni (ERs), la cui espressione a livello del tessuto cerebrale risulta omogenea.

Per tale motivo un altro obiettivo di questo lavoro di tesi è stato quello di monitorare, tramite dosaggio radioimmunologico, i livelli di estradiolo nelle diverse decadi di età all'interno della popolazione sia femminile che maschile (controllo ed AD), e valutare tramite tecnica RT-PCR l'espressione leucocitaria delle due isoforme recettoriali ER- α ed ER- β .

4. Studi recenti assegnano ad un altro ormone sessuale di natura steroidea, il progesterone, molteplici funzioni non-riproduttive nel SNC; oltre alle regioni ipotalamiche, anche l'ippocampo e la corteccia cerebrale risultano tessuti sensibili alle azioni del progesterone. In tali regioni extra-ipotalamiche si evidenzia un sinergismo tra progesterone ed estrogeni nel regolare funzioni cognitive e nell'esercitare azioni neuroprotettive e di neuro-rigenerazione (Carroll *et al.*, 2007). Tale evidenza assume un significato clinico importante, dal momento che i progestinici vengono somministrati insieme agli estrogeni nella terapia ormonale sostitutiva, con il fine di contrastare gli effetti negativi degli estrogeni sulle proliferazione dell'epitelio uterino. Se da una parte, ormai da tempo, si riconosce agli estrogeni la capacità di proteggere la popolazione neuronale contro una serie di insulti tossici di diversa natura, dall'altra parte, il ruolo neuroprotettivo del progesterone risulta ancora poco studiato e necessita di ulteriori conferme. Si ipotizzano per il progesterone diversi meccanismi d'azione, tra cui l'attivazione dei classici recettori (cPR) e meccanismi alternativi non-genomici.

Partendo da tale presupposti, è apparso interessante valutare l'attività del progesterone nella donna e nell'uomo nell'arco della vita ed analizzare il parametro anche nella condizione patologica di AD. Pertanto, sono stati determinati i livelli plasmatici di progesterone, tramite dosaggio radioimmunologico, ed i livelli leucocitari del recettore del progesterone PR-A/B tramite tecnica RT-PCR nella popolazione controllo ed AD, maschile e femminile.

5. La presenza di alterazioni del metabolismo cerebrale viene documentata in numerosi studi su pazienti con demenza senile, che hanno ricevuto diagnosi di AD o di demenza vascolare o di una combinazione di entrambe le patologie; tali anomalie metaboliche consistono in una inadeguata utilizzazione del glucosio ed un abnorme metabolismo energetico con

caratteristiche molto simili a quelle del diabete mellito di tipo 2 (Hoyer S, 2000). Inoltre, tali alterazioni metaboliche intervengono prima dei sintomi clinici, specchio del deterioramento delle funzioni cognitive, suggerendo, pertanto, che gli squilibri metabolici rappresentino una tappa precoce del processo degenerativo in AD.

L'osservazione di un parallelismo tra diabete ed AD ha prodotto l'ipotesi di una possibile alterazione del *pathway* insulinico in AD; la ridotta attivazione delle chinasi PI3-K ed Akt, molecole intermediarie del segnale di insulina ed IGF-1, e la conseguente aumentata attività di GSK-3 β hanno come risultato l'iperfosforilazione della proteina tau, che rappresenta il *core* dei NFTs descritti nella patologia di AD (Schubert *et al.*, 2003; Schubert *et al.*, 2004).

Si è dimostrato che nel SNC adulto IGF-1 agisce come un neuromodulatore e regola la plasticità sinaptica (Torres-Aleman, 1999); inoltre, in esperimenti *in vitro* su neuroni ippocampali IGF-1 protegge il tessuto contro insulti neurotossici, tra cui il peptide A β (Dore *et al.*, 1997). Gli effetti neuro protettivi di IGF-1 sono mediati dal suo recettore IGF-1R che, una volta attivato, origina una cascata di secondi messaggeri, che ha come principali protagonisti PI3K ed il sistema delle MAPK (LeRoith *et al.*, 1993).

Nel presente lavoro di tesi si è voluto, pertanto, studiare un possibile coinvolgimento del segnale di IGF-1 nella patobiologia di AD; a tale scopo sono stati determinati i livelli circolanti di IGF-1 negli individui di entrambi i sessi in condizioni controllo od in presenza di AD, e, parallelamente, sono stati valutati i profili di espressione leucocitaria del recettore IGF-1R.

6. Esistono numerosi punti di convergenza tra il segnale degli estrogeni e quello di IGF-1, che rivelano un sinergismo importante dei due fattori neurotrofici nel proteggere il tessuto neuronale contro insulti tossici, causa di neurodegenerazione.

Si è dimostrato che in colture ippocampali il trattamento con estrogeni determina la fosforilazione di Akt, suggerendo, pertanto, che gli effetti neuroprotettivi esercitati dagli estrogeni derivino in parte dall'attivazione di questo componente della via di trasduzione del segnale mediata da IGF-1R (Akama *et al.*, 2000). In aggiunta, si è dimostrato che in colture neuronali, sottoposte a condizioni di stress (deprivazione di fattori di crescita, sostanze nutritive ed ormoni), esiste un'interdipendenza tra il segnale di ERs e quello di IGF-1R nel promuovere la sopravvivenza neuronale (Dueñas *et al.*, 1994; Garcia-Segura *et al.*, 2000). Infine, altri studi su modelli animali suggeriscono un *cross-talk* tra ERs ed IGF-1R in alcune aree cerebrali (Cardona-Gomez *et al.*, 2000).

Tali osservazioni suggeriscono un'importante cooperazione tra estrogeni ed IGF-1 nell'instaurare una difesa del tessuto neuronale contro insulti neurotossici e, pertanto, nel prevenire il processo di neurodegenerazione; sembra, perciò, interessante studiare in che modo possibili alterazioni di tali meccanismi cooperativi determinino la rottura dei sistemi di riparazione, che consentono all'organismo di mantenere il fine equilibrio tra fattori neurotossici e neuroprotettivi.

Nel presente studio si è voluta valutare l'interazione tra IGF-1 ed estrogeni, suddividendo la casistica delle donne in sottogruppi secondo un *cut-off* predeterminato dei livelli circolanti di IGF-1:

1. donna in pre-menopausa con livelli normali di IGF-1 (condizione controllo);
2. donna in pre-menopausa con livelli ridotti di IGF-1;
3. donna in post-menopausa con livelli normali di IGF-1;
4. donna in post-menopausa con livelli ridotti di IGF-1.

In tutti i sottogruppi precedentemente elencati è stata valutata l'espressione di PR-A/B, come indice di un'adeguata stimolazione del segnale di estrogeni o di IGF-1; in particolare l'espressione leucocitaria del gene PR-A/B è stata correlata con i livelli circolanti di estradiolo nei gruppi pre- e post-menopausali con livelli normali o ridotti di IGF-1.

La scelta di valutare l'espressione di PR-A/B deriva dal fatto che il gene che codifica per PR-A/B contiene nel promotore un elemento responsivo per gli estrogeni; questa caratteristica designa il parametro PR-A/B come un efficace strumento per valutare, in modo indiretto, l'attività estrogenica.

Infine, lo stesso parametro (espressione leucocitaria di PR-A/B) può considerarsi, di buon grado un utile mezzo per studiare l'azione neuroprotettiva di IGF-1 ER-dipendente; studi su modelli sperimentali di neurodegenerazione indotta da acido kainico dimostrano, infatti, che l'attivazione di ER risulta necessaria per esplicitare l'azione neuroprotettiva di IGF-1, che risulta abolita nel trattamento con antagonisti di ER (Azcoitia *et al.*, 1999).

Allo stato attuale delle conoscenze è ancora insoluto il problema relativo all'efficacia protettiva degli estrogeni nei confronti del decadimento cognitivo senile. Infatti, in contrasto con quanto detto precedentemente sui loro effetti protettivi, studi successivi hanno negato l'effetto positivo degli estrogeni, lasciando insoluto il problema (den Heijer *et al.*, 2003; Shumaker *et al.*, 2003; Buckwalter *et al.*, 2004; Shumaker *et al.*, 2004; Espeland *et al.*, 2004). In particolare, il gruppo di studio Women's Health Initiative Memory Study (WHIMS) ha condotto un *trial* clinico della durata di circa 6 anni (randomizzato, eseguito in doppio cieco,

controllato con placebo) che ha coinvolto diverse migliaia di donne in post-menopausa (di età compresa tra 65 e 79 anni) per verificare gli effetti della terapia sostitutiva con estrogeni (da soli od associati a progestinici) sull'incidenza del decadimento cognitivo. Secondo gli autori i tassi di incidenza erano simili nei gruppi trattati con soli estrogeni o con estrogeni e progestinici ed il rischio di demenza risultava circa raddoppiato rispetto al gruppo trattato con placebo. L'effetto appariva più pronunciato nelle pazienti con funzionalità cognitiva di base maggiormente compromessa. Alla luce di questi risultati, gli autori decidevano di interrompere la sperimentazione e concludevano che la terapia estrogenica sostitutiva non è raccomandata per prevenire l'insorgenza di AD nelle donne in post-menopausa. Diversi autori hanno sottolineato la necessità di accertare se esista una finestra critica entro la quale si manifesti l'effetto protettivo degli estrogeni, legata in particolare al periodo della transizione menopausale, caratterizzato da una rapida riduzione dei livelli degli steroidi sessuali (Kesslak, 2002; Zandi *et al.*, 2002; Smith e Levin-Allerhand, 2003). Alla luce di ciò, nel presente lavoro si è voluto indagare in un modello *in vitro* di microglia murina immortalizzata (cellule N9) se gli estrogeni, in presenza di un danno come quello indotto dal TNF- α , riconosciuto come uno dei fattori neurotossici rilasciati in seguito a reazione della microglia attivata con la A β e che contribuisce alla neuro degenerazione stessa (Akiyama *et al.*, 2000), avessero un effetto tempo-dipendente; in particolare, si è indagato se la somministrazione precoce, simultanea o tardiva di estradiolo avesse qualche efficacia nel modulare l'espressione di CD36, inteso come indicatore biochimico di demenza. Come precedentemente detto, questo recettore sembra avere un ruolo nella patogenesi dell'AD. Infatti la produzione di specie reattive dell'ossigeno da parte di cellule microgliali preincubate con β -amiloide viene abolita in cellule pre-incubate con anticorpi anti-CD36 (Coraci *et al.*, 2002; Bamberger *et al.*, 2003). Inoltre, cellule microgliali e macrofagiche isolate da topi *knock-out* per CD36 presentano una spiccata riduzione nella secrezione di citochine in risposta alla β -amiloide (El Khoury *et al.*, 2003). Studi recenti hanno poi evidenziato una diminuzione dell'espressione genica leucocitaria di CD36 nei pazienti affetti da AD. Tale riduzione non è correlata all'età, essendo simile nei soggetti giovani ed in soggetti anziani sani usati come controllo. È interessante, inoltre, osservare che tali variazioni dell'espressione di CD36 rappresentano un fenomeno che si manifesta precocemente, essendo già presente in molti soggetti affetti da compromissione cognitiva lieve (*minimal cognitive impairment*, MCI), una condizione che in una elevata percentuale di casi prelude alla comparsa di demenza di Alzheimer (Ritchie e Touchon, 2000; Petersen *et al.*, 2001; Giunta *et al.*, 2007). I meccanismi responsabili di queste variazioni non sono ancora noti. Tuttavia, indipendentemente dal loro significato fisiopatologico, le

variazioni dell'espressione leucocitaria di CD36 potrebbero essere usate come indicatori biochimici precoci per individuare i soggetti affetti da MCI ad elevato rischio di progressione verso la AD conclamata.

Dal momento che lo studio effettuato nell'uomo è di tipo trasversale e vista l'impossibilità di indagare *in vivo* le modificazioni cerebrali umane, obiettivo di questo lavoro di tesi è stato anche indagare in un buon modello di menopausa, come il ratto ovariectomizzato, la variazione nel tempo del marcatore biologico precoce CD36,

Poiché si sta sempre più diffondendo la tendenza alla prescrizione di isoflavoni derivati dalla soia (fitoestrogeni) per contrastare i fenomeni vasomotori (*hot flushes*), che affliggono molte donne nelle fasi precoci della menopausa, si ritiene utile indagare l'eventuale capacità neuroprotettiva di questi composti, non ancora studiati da questo punto di vista, e sui quali i dati presenti in letteratura sono molto controversi (Usui, 2006). In particolare, l'idea che si sta sempre più diffondendo è quella di utilizzare questi composti naturali come SERMs, ovvero, con gli stessi effetti positivi degli estrogeni, ma senza gli effetti collaterali di questi ultimi. In realtà le evidenze di ciò risultano essere ancora piuttosto scarse. Per questo motivo, ratte adulte di circa 4 mesi di età sono state suddivise in 4 gruppi, 3 dei quali sono stati indotti in menopausa chirurgica mediante asportazione delle ovaie, e trattati con veicolo (gruppo controllo) o 17- β -estradiolo o fitoestrogeni. Pertanto, obiettivo ulteriore di questo lavoro di tesi è stato valutare, mediante PCR *Real-time* e colorazione immunoistochimica, gli effetti della HRT o di una terapia con fitoestrogeni sull'espressione sia centrale che periferica di CD36, come indicatore biochimico precoce di demenza; esso, infatti, potrebbe rappresentare un buon correlato della risposta infiammatoria, che viene innescata durante la formazione della placca senile, con l'ipotesi che una modificazione della sua espressione in pazienti con decadimento cognitivo in fase iniziale possa essere un evento precoce che precede la manifestazione conclamata della demenza. Sono stati analizzati anche il peso degli uteri, il peso degli animali, gli effetti sull'osso ed i livelli di estradiolo nel plasma a conferma dell'utilizzo di una corretta dose di estrogeni, essendo già noti dalla letteratura gli effetti dell'estradiolo su questi parametri.

Infine, alla luce di quanto detto sul ruolo di CD36 nella patogenesi della AD e sul suo possibile utilizzo come indicatore biochimico precoce di malattia, obiettivo ultimo di questo lavoro di tesi è stato indagare l'espressione centrale e periferica di CD36 in topi APP23, un valido modello sperimentale di AD, sia mediante tecnica di PCR *Real-time*, sia mediante colorazione immunoistochimica. Questi topi, infatti, riproducono alcuni dei cambiamenti neuropatologici associati all'AD, come le placche amiloidee con un *core* di amiloide,

alterazioni neuritiche e perdita neuronale (Calhoun *et al.*, 1998), a causa di una mutazione *Swedish* con APP umana, che li porta ad esprimere la APP umana 7 volte di più di quella endogena (Sturchler-Pierrat *et al.*, 1997). In questi animali, dunque, è possibile seguire la patogenesi della malattia fin dai primi step, cosa ovviamente preclusa nei pazienti con AD. Negli APP23 i depositi amiloidei cominciano ad apparire prevalentemente nella corteccia frontale e nel *subiculum* ad un'età di 6 mesi per le femmine e 7-8 mesi per i maschi, aumentando di numero e dimensione, con un massimo tra i 12 ed i 18 mesi, ed a 24 mesi occupano prevalentemente molte aree della corteccia, dell'ippocampo e del talamo (Sturchler-Pierrat *et al.*, 1997). Il confronto, poi, tra espressione cerebrale ed espressione leucocitaria di CD36, aiuterebbe a comprendere meglio la comunicazione esistente tra SNC e sistema immunitario in AD. Infine l'indagine su una possibile colocalizzazione tra CD36 e placche di A β , in questi stessi animali, e, quindi, mediante un confronto nel tempo tra questi due fattori, potrebbe, forse, permetterci di assegnare un ruolo più definito a CD36 nella patogenesi della malattia di AD.

***MATERIALI
E METODI***

1. STUDIO NELL'UOMO

1.1. Reclutamento dei campioni

Il presente lavoro di tesi è stato svolto in collaborazione con l'Ospedale San Carlo Borromeo (Milano), l'Istituto Geriatrico Camillo Golgi (Abbiategrasso, Milano) e il Dipartimento di Scienze Neurologiche, Centro "Dino Ferrari", Università di Milano.

Il presente studio è stato visionato e approvato dal comitato etico degli ospedali coinvolti nel reclutamento dei controlli e dei pazienti.

Nel corso degli anni 2005-2006 venivano reclutati soggetti controllo donatori di sangue presso il reparto di immuno-ematologia e medicina trasfusionale dell'Ospedale San Carlo Borromeo di Milano, per un totale di 288 soggetti (178 uomini e 110 donne). Si costituiva così una casistica di medie dimensioni stratificati per sesso e per età compresa fra 20 e 91 anni (media±D.S.: 57±19,98 anni). Il numero dei soggetti era: 25 tra i 21-30 anni di cui 8 donne e 17 uomini; 51 tra i 31-40 anni di cui 18 donne e 33 uomini; 39 tra i 41-50 anni di cui 15 donne e 24 uomini; 38 tra i 51-60 anni di cui 11 donne e 27 uomini; 52 tra i 61-70 anni di cui 14 donne e 38 uomini; 32 tra i 71-80 anni di cui 16 donne e 16 uomini; 51 tra i 81e 91 anni di cui 28 donne e 23 uomini.

Per tutti i soggetti compresi nello studio i criteri di esclusione erano rappresentati dalla presenza di gravi malattie sistemiche o malattie infiammatorie acute o croniche, disordini endocrini metabolici clinicamente rilevanti (compreso ogni tipo di diabete), indice di massa corporea (*body mass index* (BMI)) < 18.5 o > 29.9, alcolismo o altre tossicodipendenze, altri disordini di tipo cognitivo, neoplasie, associazione di preparati estroprogestinici sia a scopo anticontraccettivo che come terapia ormonale sostitutiva (*Hormone Replacement Therapy*, HRT), terapia a base di altri ormoni o con farmaci antinfiammatori sia steroidei che non steroidei, tutte condizioni che potrebbero alterare l'espressione dei parametri oggetto di studio. Inoltre si escludevano soggetti che rifiutavano il consenso informato e le donne che presentavano sanguinamenti vaginali, anomalie o presenza di malattie alla mammella o dell'endometrio.

Veniva reclutato anche un gruppo di 70 pazienti (24 uomini e 46 donne) con AD, di età compresa tra i 52 e i 92 anni (media ± D.S. : 78±8,48 anni) stratificati per sesso ma non per età, in quanto all'interno del gruppo studiato non abbiamo rilevato delle variazioni età correlate dei parametri studiati. I pazienti AD provenivano 33 dall' Istituto Geriatrico Camillo Golgi" (Abbiategrasso Milano) e 37 dal Dipartimento di Scienze Neurologiche, Centro "Dino

Ferrari”, Università di Milano. La diagnosi di demenza era basata sui criteri del DMS-IV (American Psychiatric Association, 1994); gli AD probabili venivano selezionati secondo i criteri NINCS-ADRDA (McKhann *et al.*, 1984) (Tab.2.2.1). La valutazione del paziente includeva l’anamnesi, l’esame obiettivo e neurologico e la diagnostica per immagine (TAC e/o RMN cerebrale).

Solo i soggetti che mostravano valori normali per ciascun parametro considerato venivano inseriti nel protocollo di questo studio. Per ogni soggetto reclutato venivano eseguiti esami ematochimici per escludere cause metaboliche di demenza (FT3, FT4, TSH, vitamina B-12 e acido folico); venivano anche valutati alcuni indici di flogosi (coefficiente di eritrosedimentazione e proteina C-reattiva).

Tutti i pazienti venivano sottoposti ad una serie di test neuropsicologici, tra cui l’MMSE. Sulla base del punteggio MMSE, i pazienti venivano classificati come affetti da demenza lieve (punteggio di MMSE ≥ 21 ; media \pm D.S.: 23.5 \pm 1.8), moderata (punteggio di MMSE: 11-20; media \pm D.S.: 16.4 \pm 2.2) o grave (punteggio di MMSE ≤ 10 ; media \pm D.S.: 2.3 \pm 3.0).

Venivano esclusi dal reclutamento pazienti con AD con concomitanti patologie di natura neoplastica o ematologica, recenti infezioni, o sottoposti ad intervento chirurgico, grave insufficienza epatica o renale, infarto miocardico o trauma cranico nei 6 mesi precedenti. Venivano anche esclusi i pazienti che erano stati sottoposti nelle 2 settimane precedenti ad un trattamento farmacologico anti-coagulante, anti-infiammatorio, corticosteroido o immunosoppressivo.

Segni di malnutrizione erano esclusi sulla base dell’esame obiettivo e dei parametri biochimici (in particolare albumina serica, vitamina B-12 e acido folico).

Dopo aver illustrato gli aspetti e le finalità del protocollo, ottenuto il consenso, i soggetti venivano sottoposti tra le 8.00 e le 12:00 a un prelievo di sangue dalla vena antecubitale del braccio in condizioni di riposo. Il sangue veniva raccolto sia per i controlli che per i pazienti AD in due provette da 8 ml ciascuna per un volume totale di 16 ml di sangue intero. Le provette erano VACUTAINER® CPT™ contenenti sodio citrato (*Becton Dickinson VACUTAINER System, Franklin lakes, New Jersey*). I campioni venivano poi trasportati in contenitori termici al Dipartimento di Farmacologia, Chemioterapia e Tossicologia Medica ed immediatamente separati i leucociti dal sangue intero e recuperato il plasma.

1.2. Separazione dei leucociti da sangue intero

La provetta VACUTAINER[®] CPT[™] è stata disegnata per la raccolta di sangue intero e la separazione delle cellule mononucleate. Si presenta come un tubo di vetro sotto vuoto contenente una prima fase liquida di 0.45 ml di sodio citrato 0.1M che funge da anticoagulante, una seconda fase intermedia sottoforma di gel in poliestere contenente un gradiente di densità e la terza fase acquosa di 2 ml di polisaccaride e sodio diatrizzato in soluzione (Ficoll 400[®] dense solution): queste tre fasi rappresentano il medium di separazione. Tale configurazione permette la separazione cellulare attraverso un singolo passaggio di centrifugazione.

Ogni campione di sangue in VACUTAINER[®] CPT[™] veniva capovolto 8-10 volte con attenzione per miscelare in modo omogeneo tutti i componenti al di sopra gel in poliestere e centrifugato a temperatura ambiente (RT 20-25°C) per 30 minuti a 2500 *rotation per minute* (rpm) secondo il principio per cui la separazione degli elementi nel sangue dipende dal loro movimento attraverso il medium di separazione.

Si formavano così le seguenti 7 fasi partendo dall'alto: il plasma, una nebulosa bianca costituita dalle cellule mononucleate e dalle piastrine, la soluzione densa di Ficoll 400[®], il gel in poliestere, un altro strato di soluzione densa di Ficoll 400[®], uno strato di granulociti e le cellule rosse del sangue coagulate. Da questo momento si procedeva sotto cappa sterile a flusso laminare fino alla conclusione della procedura sperimentale. Venivano prelevati i mononucleati della nebulosa attraverso diretta immersione del puntale di una pipetta a volume variabile P1000 e veniva recuperato il plasma conservato a -80 °C fino al momento dei dosaggi plasmatici. Il volume di nebulosa prelevato da entrambe le VACUTAINER[®] CPT[™] veniva trasferito in un tubo da 50 ml sterile e diluito con PBS sterile PH 7.0 (8 gr NaCl, 0,2 gr KCl, 1,44 gr Na₂ HPO₄, 1 L H₂O, PH 7.4) fino ad un volume finale di 20 ml.

Si procedeva così ad un primo lavaggio agitando per inversione 5 volte e centrifugando a RT e 1500 rpm per 10 minuti. Scartato il surnatante, il *pellet* di mononucleati, ottenuto dalla centrifugazione, veniva risospeso in 14 ml di PBS trasferiti, per un secondo lavaggio, in un nuovo tubo da 15 ml sterile. Si centrifugava nuovamente con le stesse condizioni del primo lavaggio. Veniva di nuovo scartato il surnatante per capovolgimento e il *pellet* veniva risospeso in un volume di Trizol, costituito da fenolo (denaturante delle proteine, che permette la precipitazione del guanidio nella fase fenolica in modo da eliminarlo), guanidio, (anch'esso forte denaturante delle proteine ma in particolare dell'enzima RNAsi, che degrada l'RNA),

ammonio tiocianato e glicerolo, proporzionale alle sue dimensioni. I campioni venivano conservati a -80°C fino all'estrazione dell' RNA totale.

2. STUDIO NELL'ANIMALE

Gli animali venivano stabulati in condizioni standard ad una temperatura costante di 22/23 °C, con umidità del 65% e venivano sottoposti ad un regime di 12 ore di luce e 12 ore di buio, con luce accesa a partire dalle 6.00. Venivano nutriti con una dieta standard in *pellet* (Diete Standard, Charles River, Calco, Italia) e con acqua *ad libitum*.

I trattamenti venivano condotti in animali coscienti e veniva prestata particolare attenzione per evitare di esporre gli animali a fattori di stress, quali rumori e variazioni di temperatura.

Tutti gli esperimenti venivano condotti in accordo con i protocolli precedentemente autorizzati dal Comitato per la Cura e l'Uso dell'animale dell'Università di Milano.

Per questo studio venivano eseguiti due diversi esperimenti, utilizzando i seguenti animali:

I° esperimento: 47 ratti femmina Sprague-Dawley (Charles River Calco, Como, Italia).

II° esperimento: 25 topi APP23 di entrambi i sessi (Novartis Pharma Basilea, Svizzera e per gentile concessione della Dr.ssa Morbin e del Dr. Giaccone, Fondazione I.R.C.C.S. Istituto Neurologico C. Besta, Milano, Italia)

2.0.1. I° esperimento

Le ratte, suddivise in 4 gruppi sperimentali di 10-12 unità ciascuno, venivano sottoposte ad ovariectomia, fatta eccezione per il gruppo controllo (ratte intatte).

Gli animali venivano anestetizzati con chetamina (Inoketam 500 - Virbac 40 mg/Kg i.p.) e xilazina (Rompum® - Bayer, 20 mg/Kg i.p.) e sottoposti ad ovariectomia bilaterale. Venivano praticate due incisioni dorsali, il tessuto adiposo sottocutaneo veniva staccato dalla cute ed aperto; quindi il tessuto muscolare sottostante veniva perforato con una pinzetta ed entrambe le ovaie venivano isolate ed asportate, dopo aver accuratamente legato la tuba corrispondente, per evitare emorragie. La muscolatura e la cute venivano poi richiuse con filo da sutura sterile non riassorbibile (n° 3.5, SMI Belgio).

Dopo una settimana di convalescenza, a tutti gli animali venivano somministrate le diverse sostanze secondo il seguente schema di trattamento:

1. gruppo ratte intatte: 200 µl di olio di semi contenente 1% di etanolo sc + 1ml di acqua os;

2. gruppo ratte ovariectomizzate + veicolo: 200 μ l di olio di semi contenente 1% di etanolo sc + 1ml di acqua os
3. gruppo ratte ovariectomizzate + 17- β -estradiolo: 200 μ l di 17- β -estradiolo (10 μ g/Kg/sc, Sigma-Aldrich, Milano; Italia) disciolto in olio di semi + 1ml di acqua os
4. gruppo ratte ovariectomizzate + fitoestrogeno: 200 μ l di olio di semi contenente il 1% di etanolo sc + 1ml di fitoestrogeno (10 mg/Kg/os, Estromineral, Rottapharm, Monza, Italia) disciolto in acqua.

Dal momento che l'estradiolo in polvere veniva solubilizzato in etanolo, quest'ultimo veniva aggiunto al veicolo (olio di sesamo) nei gruppi in cui non veniva somministrato il 17- β -estradiolo; inoltre, considerato che le due sostanze, estrogeno e fitoestrogeno, dovevano essere somministrate per due vie diverse, per dare uno stress simile a tutti gli animali, veniva fatto il doppio trattamento per via orale (os) e per via sottocutaneo (sc), anche in caso di somministrazione di solo veicolo.

Ogni 2 giorni veniva monitorato il peso corporeo degli animali. Inoltre, prima del sacrificio, le ratte appartenenti a tutti e 4 i gruppi sperimentali venivano sottoposte a striscio vaginale (*smear test*), per determinare la progressione dello stato estrale: le secrezioni vaginali venivano raccolte mediante l'inserimento di una pasteur sterile, riempita con 10 μ l di salina (0.9% NaCl), nella vagina delle ratte. La salina veniva rilasciata ed immediatamente recuperata e le cellule in essa contenute, venivano poste su un vetrino ed analizzate al microscopio.

Inoltre prima del sacrificio 6 animali per gruppo venivano sottoposti ad analisi mineralometrica computerizzata, per analizzare la densità ossea a livello femorale.

La durata del trattamento era di 4 mesi, al termine dei quali gli animali venivano sacrificati per decapitazione, dopo anestesia mediante etere.

In tutti i gruppi sperimentali venivano prelevati e pesati gli uteri, per valutarne il trofismo, come controllo preliminare dell'avvenuto rimpiazzo estrogenico. Venivano anche prelevati l'ippocampo e la corteccia frontotemporale, conservati singolarmente in eppendorf contenenti 300 μ l di *RNA-later* (Ambion-Invitrogen, S. Giuliano Milanese, Italia) e, quindi, congelati a -20°C fino al momento dell'estrazione dell'RNA.

2.0.2. II° esperimento

I topi venivano suddivisi in 5 gruppi, sacrificati nel corso del tempo, in modo da ottenere animali di età diverse: 1, 3, 6, 9 e 12 mesi. Il sacrificio avveniva mediante iniezione intraperitoneale (ip) di tiletamina-zolazepam (0,5 mg/10g), seguito da infusione intracardiaca di Embutramide (0,2 ml).

Anche in questo caso da ciascun animale venivano prelevati corteccia fronto-temporale e ippocampo, che venivano conservati come precedentemente spiegato.

2.1. Estromineral

Estromineral è formulato in compresse contenenti quantità bilanciate di Isoflavoni di Soia, Fermenti lattici probiotici (*Lactobacillus sporogenes*), Calcio, Vitamina D3 ed estratto di Equiseto. I fitoestrogeni contenuti in Estromineral sono isoflavoni di soia (I.s.) ottenuti da estratti purificati e titolati di semi di soia (*Glycine max L.*), geneticamente non modificata (*GMO free*). È usato uno speciale processo di estrazione, specifico per la frazione flavonica dei semi di soia, che consente di mantenere la “naturalità” degli I.s., ossia di mantenere le stesse proporzioni in cui gli I.s. sono presenti nei semi di soia, per sfruttare il sinergismo naturale dei principi attivi. Gli estratti sono stati depurati dai componenti inerti per ottenere una concentrazione di I.s. del 40%. Non è stato effettuato nessun processo che potesse alterare la struttura chimica e il rapporto naturale degli I.s.

Ogni compressa di Estromineral contiene 150 mg di estratto di semi di soia, pari a 60 mg di I.s., e, in particolare, pari a 30 mg di genistina (il β -glucoside della genisteina) e 30 mg di daidzina (il β -glucoside della daidzeina). Il *Lactobacillus sporogenes* scinde il legame glicosidico dei fitoestrogeni di soia, liberando gli agliconi attivi, ossia la genisteina e la daidzeina; questo processo è indispensabile per il loro assorbimento e per potenziarne l'efficacia. Inoltre, favorisce la biotrasformazione della daidzeina in equolo. Quest'ultimo, per la sua analogia strutturale con l'estradiolo, è la componente più attiva degli I.s. e dei loro metaboliti.

2.2. Mineralometria ossea computerizzata (MOC - ratto)

Una settimana prima del sacrificio, 6 animali per gruppo del I° esperimento venivano anestetizzati con Tiopentale Sodico (Pentotal Sodium – Abbott, 70 mg/Kg i.p.), posizionati

supini con completa abduzione dei 4 arti e scansionati con . Hologic QDR-1000 instrument (Hologic Inc., Waltham, MA, USA), dotato di un *software* apposito per piccoli animali da ricerca. Al fine di rivelare eventuali stati degenerativi, si misurava il contenuto osseo minerale (BMC) e la densità minerale ossea (BMD) a livello femorale, in particolare del femore sinistro, scegliendo 3 regioni di interesse, dette ROI: l'intero femore, la metafisi femorale distale e la diafisi femorale centrale. I risultati venivano forniti come area totale, espressa in cm^2 , della planimetria di specifici segmenti selezionati, BMC, espressa in mg, e BMD, espressa in mg/cm^2 delle ROI. I coefficienti di variazione erano del 3% per la BMC femorale e dello 1% per la BMD femorale.

2.3. Isolamento di leucociti da milza (ratto e topo)

Sotto cappa sterile a flusso laminare le milze prelevate dagli animali venivano ripulite da eventuali residui di adipe e poste in Petri contenenti 5-10 ml di PBS sterile PH 7.0 (8 gr NaCl, 0,2 gr KCl, 1,44 gr $\text{Na}_2 \text{HPO}_4$, 1 L H_2O , PH 7.4). L'involucro esterno veniva rotto delicatamente mediante un ago sterile, per permettere la fuoriuscita dei leucociti. La capsula esterna, ormai passata da un rosso-marrone ad un bianco trasparente, veniva scartata e le cellule risospese nel PBS al fine di ottenere una sospensione cellulare omogenea. Tale sospensione veniva poi raccolta in un pellet tramite centrifugazione a 1200 rpm e 4°C per 5 minuti. Scartato il surnatante, il *pellet* veniva lasciato asciugare capovolto, risospeso in 500 μl di Trizol e conservato in -80°C ricoperto da stagnola, data la sensibilità alla luce del Trizol.

2.3. Istochimica di sezioni cerebrali (ratto e topo)

2.3.1. I° esperimento

I cervelli di 3 animali per gruppo venivano rimossi, immediatamente immersi in fissativo non aldeidico (Alcolin ®, Diapath S.p.A, Martinengo, Bergamo, Italia) e conservati a 4°C per almeno 7 giorni. In questo modo venivano inibite le attività litiche post-mortali della cellula, rendendo insolubili i componenti strutturali, stabilizzando le proteine ed inattivando gli enzimi idrolitici. Successivamente i cervelli venivano trasferiti in biocassette (Bio Optica S.p.A., Milano, Italia) e disidratati in alcool a gradazioni crescenti (alcool 70% 2 ore, alcool 80% 2 ore, alcool 90% 2 ore, alcool 95% *overnight* ed alcool 100% 2 ore; Fluka - Sigma-Aldrich).

I campioni venivano, quindi, diafanizzati in xilolo per 5 ore e poi *overnight*, per rendere il cervello, già privato dell'acqua, diafano, ovvero trasparente, e penetrabile da parte della paraffina.

I cervelli venivano incubati a caldo in paraffina liquida (Bio Optica) in stufa a 60°C, per permetterle di sostituirsi al solvente all'interno del pezzo istologico, e divisi in 4 parti mediante sezione coronale (A = corteccia, B = ippocampo, C = talamo e D = cervelletto); venivano poi incluse in paraffina all'aria e montate su supporto solido.

Tutte le inclusioni venivano tagliate in sezioni di 5 µm di spessore utilizzando un microtomo manuale (Leica Microsystems S.r.l., Milano, Italia), raccolte su vetrini cromalinati (5g di gelatina tipo 1 – Sigma Aldrich – 1 g di $\text{KCr}(\text{SO}_4)_2$ – Carlo Erba reagenti – 1 o 2 cristalli di timolo – BDH) e lasciati aderire al vetrino in stufa a 60°C *overnight*.

Seguiva colorazione con Ematossilina-Eosina secondo la procedura standard: i vetrini venivano deparaffinati in xilolo per 10 minuti, reidratati usando una scala discendente di alcoli (100%, 95%, 90%, 80%, 70% per 5 minuti ciascuno) e, quindi, lavati in acqua distillata (2 x 5 minuti). I vetrini venivano immersi in ematossilina per 10 minuti (Bio Optica), per evidenziare i nuclei, lavati in acqua e, quindi, immersi per 5 minuti in soluzione di Eosina (Bio Optica), per evidenziare le strutture citoplasmatiche. Le sezioni venivano poi disidratate (passaggi rapidi in scala di alcool ascendente) e chiarificate in xilolo. Infine, sui preparati veniva applicato un vetrino copri-oggetto fissato con Eukitt (Bio Optica), una resina sintetica con lo stesso indice di rifrazione del vetro.

In nessuna delle sezioni esaminate erano presenti alterazioni significative rilevabili alla colorazione istologica di routine, perciò si sceglieva di eseguire l'indagine immunostochimica solo sulle sezioni relative alla corteccia temporale e all'ippocampo, che sono le aree maggiormente affette nella malattia di Alzheimer.

2.3.2. II° esperimento

I cervelli venivano rimossi, immediatamente fissati in formalina e conservati a 4°C. Successivamente i cervelli venivano tagliati in sezioni coronali, passanti per A = corteccia frontale, B = ippocampo, C = talamo e D = cervelletto, e trasferiti in biocassette (Bio Optica S.p.A., Milano, Italia). I campioni venivano disidratati in alcool a gradazioni crescenti, diafanizzati in xilolo ed inclusi in paraffina secondo le procedure precedentemente descritte. Le sezioni cerebrali venivano poi colorate con Ematossilina-Eosina secondo la procedura standard.

2.4. Immunoistochimica di sezioni cerebrali (ratto e topo)

2.4.1. I° esperimento

Le sezioni venivano deparaffinate, reidratate e lavate come precedentemente descritto. La perossidasi endogena veniva inibita mediante incubazione di 15 minuti in H₂O₂ al 3% (Merck S.p.A., Milano, Italia), diluita in acqua distillata.

I vetrini venivano immersi in acqua distillata (2 x 5 minuti) e, quindi, in tampone fosfato all'1% (10x PBS, GIBCO, Milano, Italia) diluito in acqua distillata. Per saturare i siti aspecifici i vetrini venivano incubati per 20 minuti con siero di pecora (normal *goat* serum, Dako Italia S.p.A., Milano), diluito 1:20 in PBS. Si procedeva poi con incubazione *overnight* ad RT con i seguenti anticorpi primari:

1. CD36, (policlonale Abcam, Cambridge, UK diluito 1:40 in PBS) per evidenziare le cellule che esprimono questo marcatore;
2. *Glial Fibrillary Acidic Protein*, (GFAP policlonale Dako Italia S.p.A diluita 1:500 in PBS) marcatore di gliosi astrocitaria
3. Anti-Ferritina (policlonale. Dako diluito 1:500 in PBS), utilizzato come marcatore dei monociti-macrofagi.

Il giorno successivo l'eccesso di anticorpo veniva eliminato mediante 3 lavaggi da 5 minuti ciascuno con PBS ed i vetrini venivano incubati per 1 ora con il sistema EnVision policlonale (Dako Italia S.p.A.), diluito 1:2.

Dopo 3 lavaggi in PBS, come metodo di rivelazione veniva utilizzata la 3-3¹-diaminobenzidina (DAB, Dako Italia S.p.A.). Le perossidasi legate al complesso anticorpo secondario/terziario, in presenza di perossido di idrogeno, catalizzano l'ossidazione della DAB, determinando la comparsa di un precipitato marrone ben visibile. La reazione, dopo 3-5 minuti veniva bloccata con acqua distillata. Successivamente i vetrini venivano blandamente controcolorati per immersione in ematossilina (30 secondi), disidratati mediante passaggi rapidi in scala ascendente di alcool e chiarificati in xilolo. Infine si procedeva al montaggio con Eukitt ed all'osservazione al microscopio (Eclipse E800, Nikon, Japan).

2.4.2. II° esperimento

Veniva eseguita l'analisi immunoistochimica utilizzando l'anticorpo anti-CD36 secondo le metodiche precedentemente descritte. L'utilizzo di formalina come fissativo, però, rendeva necessario uno smascheramento dei siti antigenici prima dell'icubazione con il perossido di

idrogeno, lasciando i campioni in forno a microonde con tampone citrato pH 6.0 10 mM per 6 minuti.

I vetrini marcati con il CD36 venivano colorati anche con la metodica istochimica della tioflavina S, che consente di evidenziare in fluorescenza la presenza di proteine con struttura secondaria in β -sheets, conformazione tipica dell'amiloide.

I campioni venivano incubati per 10 minuti al buio con tioflavina S; seguivano dei lavaggi in alcool 80° (2x2 minuti) ed in acqua distillata (4x2 minuti). Infine, si procedeva al montaggio con glicerina ed Eukitt.

3. COLTURE CELLULARI N9

La linea immortalizzata di microglia murina N9, gentilmente donata dalla Dr.ssa Ricciardi, veniva coltivata in IMDM (*Iscove's Modified Dulbecco's Media*, Euroclone, Pero, Italia) addizionato con il 5% di siero bovino fetale (FBS, Euroclone), lo 1% di penicillina 10000 U/ml - streptomicina 10000 μ g/ml (Euroclone), e lo 1% di L-glutammina 200 mM (Euroclone) e mantenuta a 37 C con il 5% di CO₂.

3.1. Trattamenti cellulari

Le cellule venivano contate e piastrate il giorno prima dei trattamenti ad una densità di 5×10^6 /ml in piastre da 12 pozzetti.

Nei due giorni successivi le cellule venivano trattate secondo il seguente schema, mediante l'aggiunta al medium di coltura di 17- β -estradiolo o *Tumor Necrosis Factor- α* (TNF- α) 17- β -estradiolo 8 ore prima di TNF- α ;

- 17- β -estradiolo insieme a TNF- α ;
- 17- β -estradiolo 8 ore dopo TNF- α ;
- solo 17- β -estradiolo;
- solo TNF- α ;

Il TNF- α od il 17- β -estradiolo (quando da solo) venivano aggiunti la sera per permettere un'incubazione *overnight*.

Le cellule non trattate venivano utilizzate come controllo.

Allo scadere dei tempi di incubazione le cellule venivano raccolte mediante distacco con tripsina (MMedical, Cornaredo, Italia) e concentrate in un *pellet* mediante centrifugazione a

1000 rpm e 4 °C per 10 min. Il *pellet* veniva poi lasciato asciugare sotto cappa, risospeso in 500 µl di Trizol e conservato al buio in -80 °C fino al processamento per le successive analisi.

4. ESTRAZIONE DELL'RNA TOTALE

Veniva estratto l'RNA totale dai vari tessuti animali conservati in RNA-later, dai leucociti, sia umani che animali, separati e risospesi in Trizol, e dalla linea immortalizzata N9.

Nel caso delle cellule leucocitarie o N9, i campioni dal -80°C venivano scongelati e omogeneizzati direttamente con un ultraturrax a lamine verticali; nel caso dei tessuti, invece, ne veniva prelevata una parte e veniva omogeneizzata mediante l'ultraturrax in 500 µl di Trizol. Le fasi che seguivano erano comuni.

L'omogeneizzato veniva trasferito in una provetta da 1,5 ml e lasciato riposare per 5min in ghiaccio. Venivano aggiunti 200 µl di cloroformio (Sigma-Aldrich) e si agitava per 15 secondi leggermente. Il composto veniva incubato per 3 minuti in ghiaccio e poi centrifugato per 15 minuti a 12000 x g a 4 °C (temperatura ottimale per l'inattivazione della funzionalità dell'enzima RNAsi). Dopo la centrifugazione si separavano due fasi: acquosa, contenente l'RNA (surnatante), e fenolica, contenente le componenti lipidiche (sottonatante), mentre all'interfaccia tra le due vi era un anello costituito dalle proteine denaturate ed il DNA. Il surnatante veniva trasferito in una nuova provetta e venivano aggiunti 500 µl di isopropanolo (Sigma-Aldrich), che precipita selettivamente l'RNA, insolubile in esso. Il tutto veniva vortexato e incubato per 10 minuti a RT. Dopo l'incubazione si procedeva ad una seconda centrifugazione per 10 minuti a 12000 x g a 4 °C. Il surnatante veniva eliminato ed al *pellet* venivano aggiunti 200 µl di etanolo 70% per un lavaggio. Il tutto veniva centrifugato per 5 minuti a 7500 x g a 4 °C, il surnatante veniva eliminato ed il *pellet* asciugato sotto vuoto per circa 2 minuti. Il *pellet* veniva quindi risospeso in una quantità di formamide minima di 20 µl circa, che poteva essere aumentata proporzionalmente alle dimensioni del *pellet*. Se si verificava qualche problema nella risospensione del *pellet*, per non aggiungere altra formamide, che avrebbe diluito eccessivamente l'RNA, la provetta veniva lasciata per qualche minuto in ghiaccio. L'RNA estratto con tale procedura risultava così costituito: al 90% circa da rRNA; al 7% circa da mRNA e all'1% circa da tRNA.

La concentrazione dell'RNA estratto, espressa in ng/ml, veniva letta allo spettrofotometro (Amersham Pharmacia, Milano, Italia), impostato alla lunghezza d'onda di 320 nm, al fattore di diluizione 10 (18 µl di acqua + 2 µl di RNA estratto) ed alla concentrazione di 0,1 M. Lo strumento veniva tarato usando un bianco costituito da 18 µl di acqua + 2 µl di formamide.

Allo spettrofotometro veniva letta anche la *ratio*, indice del grado di purezza dell'estratto, data dal rapporto tra l'assorbanza a 260 e quella a 280, che deve variare tra 1.9 e 2.0. Il residuo dei 20 µl di RNA, diluito 1:10, preparati per la lettura allo spettrofotometro, veniva sottoposto ad un'elettroforesi su gel di agarosio 1% con 2.5 µl di etidio bromuro, un intercalante delle basi azotate che emette luce nel visibile se colpito da raggi UVA, e che migra in senso opposto rispetto agli acidi nucleici. La vaschetta di supporto del gel veniva immersa in TAE (TAE = Tris-base 2 M, acido acetico glaciale, EDTA 0.5 M), e l'RNA, al termine di una corsa elettroforetica di 40 minuti a 80 V, migrava in base al peso molecolare, alla forma ed alla carica elettrica e, infine, veniva visualizzato tramite una fluorescenza indotta dai raggi di una lampada ultravioletta (UVA) per valutare l'integrità degli RNA estratti: risultavano così visibili due bande di altezza e spessore diverso, una banda da 5.1 Kb chiamata 28 S (laddove S indica il coefficiente di sedimentazione espresso in unità Swedberg) ed un'altra banda da 2 Kb, chiamata 18 S. I campioni di RNA estratto venivano poi conservati a -80 °C fino al momento della retrotrascrizione.

5. RETROTRASCRIZIONE (RT)

La retrotrascrizione veniva eseguita usando una concentrazione di RNA pari a 250 ng/µl; per ottenere tale concentrazione l'RNA dei campioni estratti veniva opportunamente diluito; di questo RNA diluito ne venivano prelevati 4 µl (in totale 1000 ng di RNA; Hattori *et al.*, 1999).

A seconda del tipo di *Polymerase Chain Reaction* (PCR) che sarebbe seguita (semiquantitativa o quantitativa), venivano seguiti due protocolli diversi di RT.

5.1. RT per PCR semiquantitativa (campioni umani)

Veniva preparato un *mix* per retrotrascrivere l'RNA così composto: 1 µl di primer la cui sequenza era costituita da 18 T (oligo dT; Life Technologies, S. Giuliano Milanese, Italia), 1 µl di enzima trascrittasi inversa proveniente dal virus della leucemia murina di Molony (M-MLV, GIBCO), 0.4 µl di deossiribonucleotidi, dNTP (Euroclone), 2 µl di DTT (GIBCO), 4 µl di Buffer (Buffer: TRIS-HCl 250 mM a pH 8.3; HCl 375 mM; MgCl₂ 15 mM; GIBCO), 1 µl di RNasi inibitore (Promega, Milano, Italia) ed una quantità di acqua filtrata ed autoclavata tale da arrivare ad un volume finale di 16 µl. Ai 4 µl di RNA estratto, ed opportunamente diluito, venivano aggiunti i 16 µl di *mix*-RT per un volume totale pari a 20 µl. I tubi così preparati venivano messi in un termociclatore (THERMOHYBAID, PX2 New, Ashford-

Middlesex, Inghilterra) con impostato un programma diviso in 2 *stages*: 37 °C per 50 minuti e 70 °C per 15 minuti (fase della retrotrascrizione).

5.2. RT per PCR quantitativa (campioni animali)

Per ripulire i campioni da eventuale contaminazione da DNA, che inficerebbe l'esito della PCR, ai 4 µl di diluizione venivano aggiunti 6 µl di *mix*, contenente *RNase Free* DNasi (Promega), e i campioni venivano fatti termociclare a 37°C per 30 minuti. Per bloccare l'attività dell'enzima veniva aggiunto 1 µl di Soluzione di Stop (Promega), seguito da uno step a 65°C per 10 minuti. Si procedeva poi con la retrotrascrizione del µg di RNA mediante il *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit*, con RNasi inibitore incluso (Applied Biosystems, Monza, Italia), in accordo con le istruzioni della ditta produttrice. I campioni venivano poi fatti termociclare per 10 minuti a 25°C, per 120 minuti a 37°C e per 5 minuti a 85°C.

6. PCR SEMIQUANTITATIVA

Veniva amplificato un tratto di cDNA prodotto per RT corrispondente ai geni per CD 36, ER- α , ER- β , PR-A/B, IGF-1R e IL-6 a seconda dei *primer* specifici utilizzati. Venivano usati *primer* specifici sintetici per i geni del CD36 *primer sense* di uomo, 5'-GAGAACTGTTATGGGGCTAT-3'; *primer antisense* di uomo, 5'-TTCAACTGGAGAGGCAAAGG-3'; dimensioni dell' amplificato 389 bp; ER- α *primer sense* di uomo 5'-GATGGTCAGTGCCTTGTTGATGC-3'; *primer antisense* uomo 5'-GCAGATTCATCATGCGGAACCGAG-3'; dimensione dell'amplicato 380 bp; ER- β *primer sense* di uomo 5'-GTCCATCGCCAGTTATCACATC-3'; *primer antisense* di uomo 5'-GCCTTACATCCTTCACACGA-3'; dimensione dell'amplicato 250 bp; PR-A/B *primer sense* di uomo, 5'-CCTCGGACACCTYGCCTGAA-3'; *primer antisense* di uomo, 5'-CGCCAACAGAGTGTCCAAGAC-3'; dimensione dell'amplicato 239 bp; IGF-1R *primer sense* di uomo 5'-ACGCCAATAAGTTCGTCCAC-3'; *primer antisense* di uomo 5'-TCCATCCTTGAGGGACTCAG-3'; dimensione dell'amplicato 180 bp; IL-6 *primer sense* di uomo 5'-AAAGAGGCACTGGCAGAA-3'; *primer antisense* di uomo 5'-AGCTCTGGCTTGTTCCCTCAC-3'; dimensione dell'amplicato 183 bp.

Tutti i *primer* venivano acquistati dalla Invitrogen-Life Technologies-Milano, Firenze, Italia; la ditta forniva anche le relative concentrazioni dei *primer* da cui veniva calcolata la quantità ottimale da usare per la PCR. Veniva preparato un mix-PCR così composto: 0.5 μ l di una speciale DNA polimerasi resistente alle alte temperature chiamata TAQ – polimerasi (Euro – Taq, Euroclone S.p.A., Pero, Milano, Italia), 3 μ l di Buffer (Buffer: (NH₄)₂SO₄ 160 mM; 670 Mm TRIS-HCl a pH 8.3, 0.1% Tween-20) e 0.9 μ l di Mg (Euroclone), 0.3 μ l di dNTP (Euroclone) e acqua in quantità tale da arrivare ad un volume finale di 10 μ l. I 10 μ l di mix-PCR venivano aggiunti a 18 μ l di acqua + 2 μ l di RT per un volume totale di PCR pari a 30 μ l. L'amplificazione del template veniva eseguita incubando le provette in un termociclatore (THERMOHYBAID, PX2 New) impostato con un programma per la PCR diviso in 3 *stage*, ognuno con diversi *step*: PCR 1-95 °C per 30 secondi (denaturazione); PCR 2- I° *step*, 94 °C per 30 secondi; II° *step*, temperatura di *annealing* (specifica per ogni *primer*, la temperatura teorica veniva comunicata dalla ditta di sintesi dei *primer* e, a partire da questa, mediante una serie di prove, veniva stabilita quella ottimale) per 30 secondi; III° *step*, 72 °C per 30 secondi (allungamento). PCR 3- I° *step*, 72 °C per 5 minuti; II° *step* 4 °C per 20 ore (*holding temperature*). Parallelamente veniva amplificata la gliceraldeide-3-fosfato-deidrogenasi (GAPDH) (*primer sense*, 5' – GCCATCAACGACCCCTTCATTG – 3'; *primer antisense*, 5'

– TGCCAGTGAGCTTCCCGTTC – 3’; dimensione dell’ amplificato 500-600 bp) (Invitrogen-Life Technologies) degli stessi campioni, ad una temperatura di *annealing* di 65.3 °C e per 30 cicli. Per visualizzare l’amplificato veniva utilizzato il metodo dell’etidio bromuro. I prodotti della PCR venivano separati mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio al 2% con 2.5 µl di etidio bromuro, in TAE e visualizzati tramite una fluorescenza indotta dai raggi di una lampada ultravioletta (UVA). L’intensità di ogni banda di amplificazione veniva quantificata utilizzando un sistema computerizzato di acquisizione e analisi dell’immagine (VersaDOC, Bio-Rad, Milano, Italia) dotato di un software di quantificazione delle bande (Quantity ONE-Bio-Rad). Le densità risultanti di tutti i geni di interesse venivano espresse relativamente alle corrispondenti densità delle bande del GAPDH (*housekeeping gene*) dello stesso campione (Hattori *et al.*, 1997; Kobayashi *et al.*, 1999). In questo modo, calcolando il rapporto tra i valori densitometrici delle bande dei diversi geni e del GAPDH, si ottiene un valore numerico che è funzione della sola quantità di mRNA dei geni presenti nel campione, con la garanzia di aver eliminato eventuali errori dovuti all’utilizzo di quantità di RNA totale non perfettamente identiche tra i diversi campioni.

7. Real-Time PCR QUANTITATIVA

Venivano disegnati *primers* gene-specifici (Life Technologies) per CD36 e GAPDH, in modo che il *primer sense* e quello *antisense* cadessero su due esoni diversi separati da un introne, per evitare l’amplificazione di DNA genomico. Le sequenze dei *primers* erano: CD36 *primer sense* di ratto, 5’ – ATTCTCATGCCGGTTGGAGACCTA – 3’; *primer antisense* di ratto, 5’ – AACTGTCTGTACACAGTGGTGCC – 3’; GAPDH *primer sense* di ratto, 5’ – TCTAGAGACAGCCGCATCTTCTTGTG – 3’; *primer antisense* di ratto, 5’ – ACAAGAGAAGGCAGCCCTGGTAA – 3’; CD36 *primer sense* di topo, 5’ – ATGACGTGGCAAAGAACAGCAG – 3’; *primer antisense* di topo, 5’ – AAGATGGCTCCATTGGGCTGTA – 3’; GAPDH *primer sense* di topo, 5’ – AACTTTGGCATTGTGGAAGG – 3’; *primer antisense* di topo, 5’ – ACACATTGGGGGTAGGAACA – 3’. I primers venivano utilizzati ad una concentrazione finale di 400 nM su un volume finale di reazione di 25 µl. Tutti i campioni, performati in duplicato, venivano diluiti 1:2 ed amplificati mediante una reazione con il *MaximaTM SYBR Green/ROX qPCR Master Mix 2X* (Fermentas-MMedical). I geni venivano amplificati mediante il sistema di rilevazione sequenziale ABI PrismTM 7000 (Applied Biosystems) ed il *software* SDS versione 1.2.3. Per il termociclatore veniva usato un protocollo standard a 2 *step* (95°C per 15 secondi, 60°C per 1 min, ripetuto 40 volte), seguito da uno *step* di

dissociazione a 95°C per 15 secondi, a 60°C per 20 secondi ed a 95°C per 15 secondi, per individuare l'eventuale formazione di dimeri di *primers*. La quantificazione relativa dell'espressione genica veniva calcolata mediante comparazione del CT (ciclo soglia) e normalizzata all'espressione del gene *housekeeping* GAPDH.

8. DOSAGGI PLASMATICI

Venivano eseguiti dosaggi plasmatici per estradiolo e progesterone con tecnica radioimmunologica (RIA) e per IGF-1 con tecnica immunoradiometrica (IRMA) nei campioni umani; nei campioni di ratto veniva, invece, eseguito un dosaggio di tipo immunoenzimatico colorimetrico (ELISA).

La procedura RIA comporta la competizione tra un antigene radioattivo e uno non radioattivo per un numero fisso di siti leganti l'anticorpo. La quantità di ormone marcato con [I-125] legato all'anticorpo è inversamente proporzionale alla concentrazione di ormone presente non marcato. La separazione dell'antigene libero e legato si ottiene usando un sistema con doppio anticorpo.

La metodica IRMA è un saggio non-competitivo in cui l'analita da dosare viene "intrappolato" tra due anticorpi. L'anticorpo primario si trova immobilizzato sulle pareti delle provette fornite; l'anticorpo secondario, invece, è marcato con [I-125], e serve pertanto per la rilevazione dell'antigene in studio. L'analita presente nei campioni plasmatici, gli standards e i controlli forniti si legano ad entrambi gli anticorpi e formano un complesso definito "sandwich".

Il saggio ELISA ha lo scopo di accertare la presenza di un antigene nel campione biologico mediante una metodica competitiva: l'antigene presente nel campione compete con un antigene marcato con perossidasi nei confronti dell'anticorpo diretto contro l'antigene ed adsorbito su micro-piastra. L'aggiunta di un substrato per la perossidasi, come la tetrametilbenzidina (TMB), determina una reazione colorimetrica. L'intensità del colore sviluppato è proporzionale alla concentrazione di antigene marcato e, quindi, inversamente proporzionale alla concentrazione dell'antigene presente nel campione.

8.1. 17- β -estradiolo

Nell'uomo la quantità plasmatica di 17- β -estradiolo veniva valutata con un kit commerciale DSL-39100 3rd (Diagnostic System Laboratories, Webster, Texas).

La sensibilità del metodo era 0,6 pg/mL, i coefficienti di variazione (CV) intra ed inter-dosaggio erano 3,5 % e 4,1 % rispettivamente.

Nel ratto i valori plasmatici di 17- β -estradiolo venivano valutati con un kit commerciale 17- β -estradiol (DiaMetra S.r.l.-Alifax, S.p.A., Polverara, Padova, Italia).

La sensibilità del metodo era 8,68 pg/mL, i coefficienti di variazione (CV) intra ed inter-dosaggio erano 2.3 % e 1.7 % rispettivamente.

8.2. Progesterone

I livelli plasmatici di progesterone venivano valutati con un kit commerciale DSL-3900 ACTIVE[®] (Diagnostic System Laboratories, Webster, Texas).

La sensibilità del metodo era di 2,06 ng/mL, i coefficienti di variazione (CV) intra ed inter-dosaggio erano 3,9 % e 3,8 % rispettivamente.

8.3. IGF-1

La quantità di IGF-1 nel plasma veniva valutata con un kit commerciale DSL-2800 ACTIVE[®] Non-Extraction (Diagnostic System Laboratories, Webster, Texas).

La sensibilità del metodo era 0,3 μ g/dL, i coefficienti di variazione (CV) intra ed inter-dosaggio erano 5,3 % e 8,9 % rispettivamente.

8. ANALISI STATISTICA

I valori sperimentali ottenuti venivano espressi come media \pm errore standard medio (SEM). I confronti multipli venivano eseguiti con il test di Bonferroni, preceduto da ANOVA. Le correlazioni venivano calcolate con il test di Pearson. L'analisi statistica veniva effettuata utilizzando il pacchetto *software* Jandel SigmaStat versione 3.0 (Jandel Scientific GmbH, Erktrath, Germania). Venivano considerate significative le differenze con un valore di $P < 0.05$.

RISULTATI

STUDIO NELL'UOMO

1. ESPRESSIONE LEUCOCITARIA DEI PARAMETRI BIOCHIMICI NEI PAZIENTI AD E SOGGETTI CONTROLLO

Espressione genica di CD36 in leucociti

Si osservava una riduzione statisticamente significativa di CD36 nei pazienti AD rispetto ai soggetti controllo indipendentemente dall'età sia nell'uomo [(AD): $0,48 \pm 0,06$ vs (21-30): $1,14 \pm 0,22$; (31-40): $1,21 \pm 0,17$; (41-50): $1,32 \pm 0,24$; (51-60): $1,20 \pm 0,24$; (61-70): $1,20 \pm 0,24$; (71-80): $1,19 \pm 0,34$; 81-91: $1,26 \pm 0,18$; $P < 0,05$] (Fig. 1.1.) che nella donna [(AD): $0,58 \pm 0,03$ vs (21-30): $1,91 \pm 0,39$; (31-40): $1,91 \pm 0,48$; (41-50): $1,86 \pm 0,49$; (81-91): $1,24 \pm 0,16$; $P < 0,05$] (Fig. 1.2.).

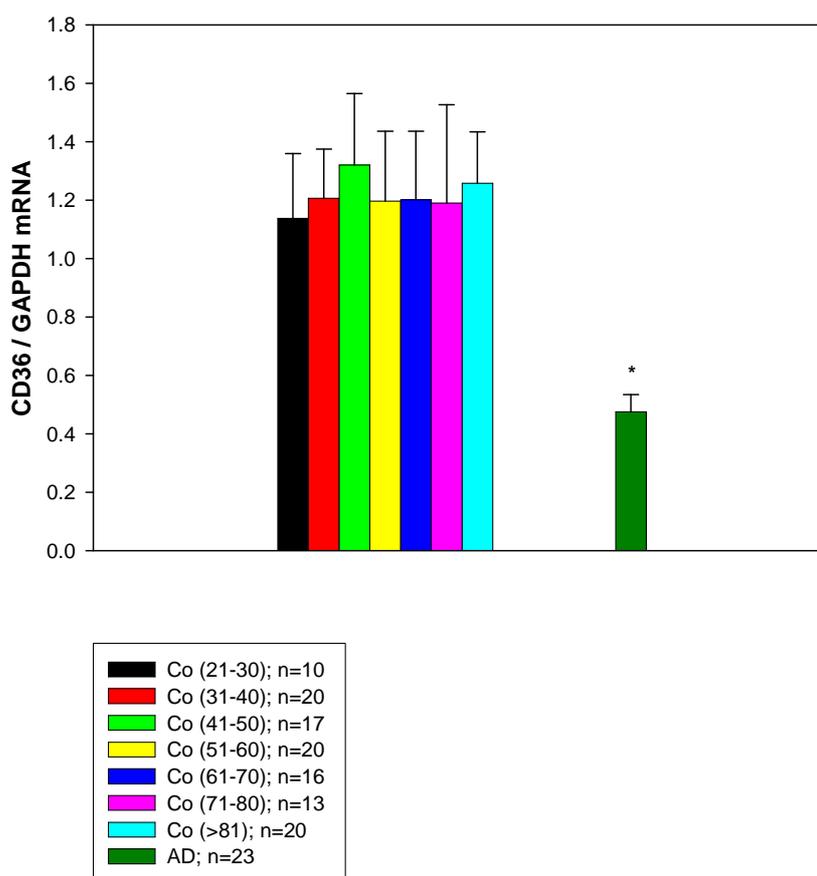


FIGURA1.1. Espressione leucocitaria di CD36 in soggetti controllo e pazienti AD maschi. I valori sono espressi come MEDIA ± SEM. * $P < 0,05$ vs gruppi controllo.

Nella fascia d'età 51-60 anni nella donna, periodo in cui si verifica la transizione menopausale, si osservava una diminuzione di CD36 paragonabile a quella delle pazienti AD [(51-60): $1,01 \pm 0,11$ vs (AD): $0,58 \pm 0,03$; $P = NS$] e tale riduzione persisteva con l'aumentare dell'età [(61-70): $0,64 \pm 0,07$; (71-80): $0,74 \pm 0,06$] (Fig 1.2.).

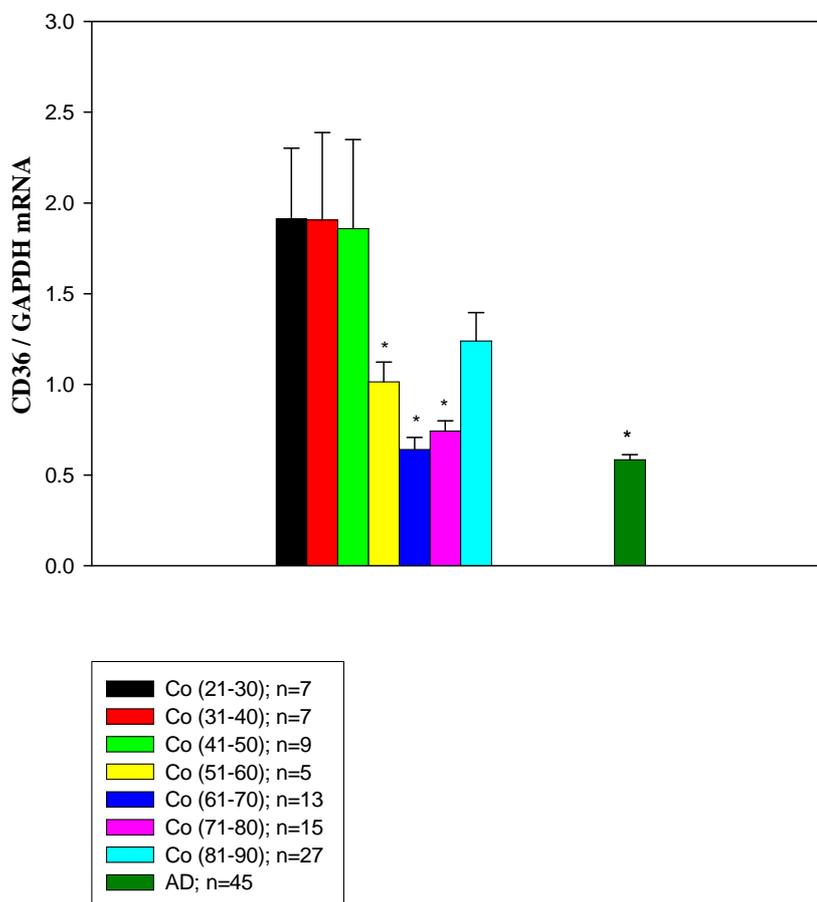


FIGURA 1.2. Espressione leucocitaria di CD36 in soggetti controllo e pazienti AD femmine. I valori sono espressi come MEDIA \pm SEM. * $P < 0,05$ vs gruppi controllo (21-30); (31-40); (41-50); (81-90).

Espressione genica di ER- α ed ER- β in leucociti

Negli uomini, non si riscontravano differenze tra le due isoforme recettoriali, α e β . Nelle diverse fasce d'età, i livelli di mRNA non presentavano variazioni statisticamente significative, sia per ER- α ($P = NS$) (Fig. 1.3.), che per ER- β ($P = NS$) (Fig. 1.4.).

Nei pazienti AD di sesso maschile non vi erano variazioni statisticamente significative rispetto ai soggetti sani di pari età, ($P = NS$) (Figg. 1.3. e 1.4.).

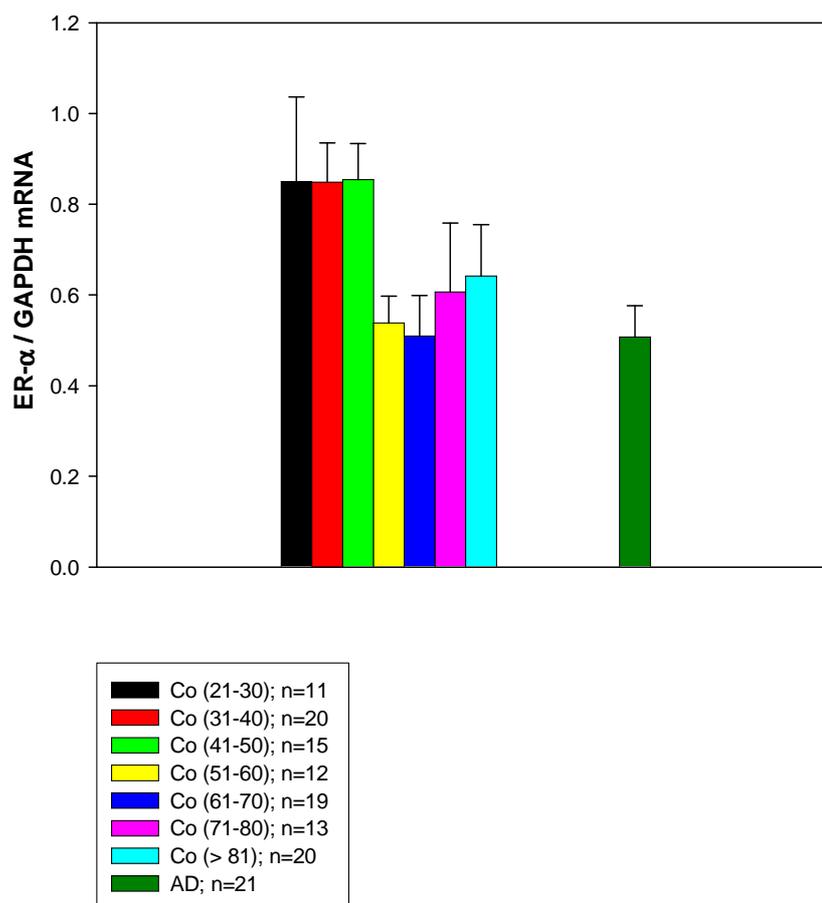


FIGURA 1.3. Espressione leucocitaria di ER- α in soggetti controllo e pazienti AD maschi. I valori sono espressi come MEDIA \pm SEM. P = NS.

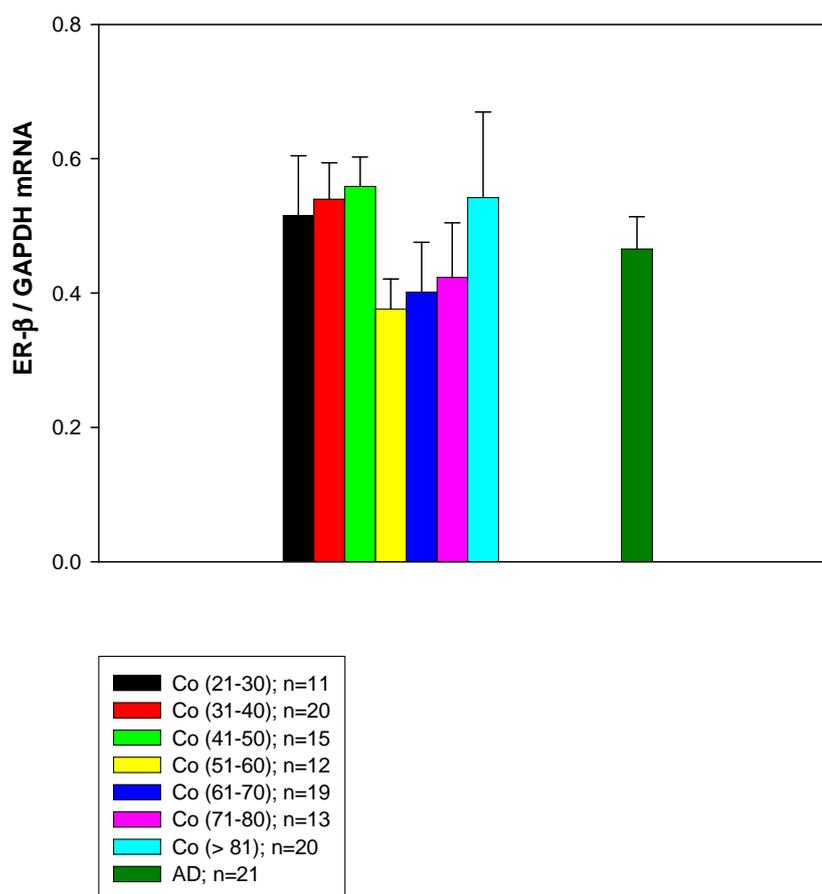


FIGURA 1.4. Espressione leucocitaria di ER- α in soggetti controllo e pazienti AD maschi. I valori sono espressi come MEDIA \pm SEM. P = NS.

Nelle donne si osservava che, nella fase di transizione menopausale vi era un aumento statisticamente significativo di entrambe le isoforme recettoriali rispetto ai soggetti controllo più giovani e più anziani: ER- α [(51- 60): $1,82 \pm 0,44$ vs (21-30): $0,63 \pm 0,16$; (31-40): $0,42 \pm 0,17$; (41-50): $0,64 \pm 0,14$; (61-70): $0,53 \pm 0,18$; (71-80): $0,59 \pm 0,09$; (81-91): $0,62 \pm 0,07$; $P < 0,05$] (Fig. 1.5.) e ER- β [(51- 60): $1,18 \pm 0,39$ vs (21-30): $0,53 \pm 0,13$; (31-40): $0,48 \pm 0,15$; (41-50): $0,44 \pm 0,08$; (61-70): $0,41 \pm 0,18$; (71-80): $0,54 \pm 0,12$; (81-91): $0,48 \pm 0,08$; $P < 0,05$] (Fig. 1.6.). Inoltre, nelle donne della fascia d'età 51-60 si osservava un aumento statisticamente significativo rispetto ai pazienti AD sia di ER- α [(51- 60): $1,82 \pm 0,44$ vs (AD): $0,55 \pm 0,04$; $P < 0,05$] (Fig. 1.5.). che di ER- β [(51- 60): $1,18 \pm 0,39$ vs (AD): $0,43 \pm 0,04$; $P < 0,05$] (Fig. 1.6.)

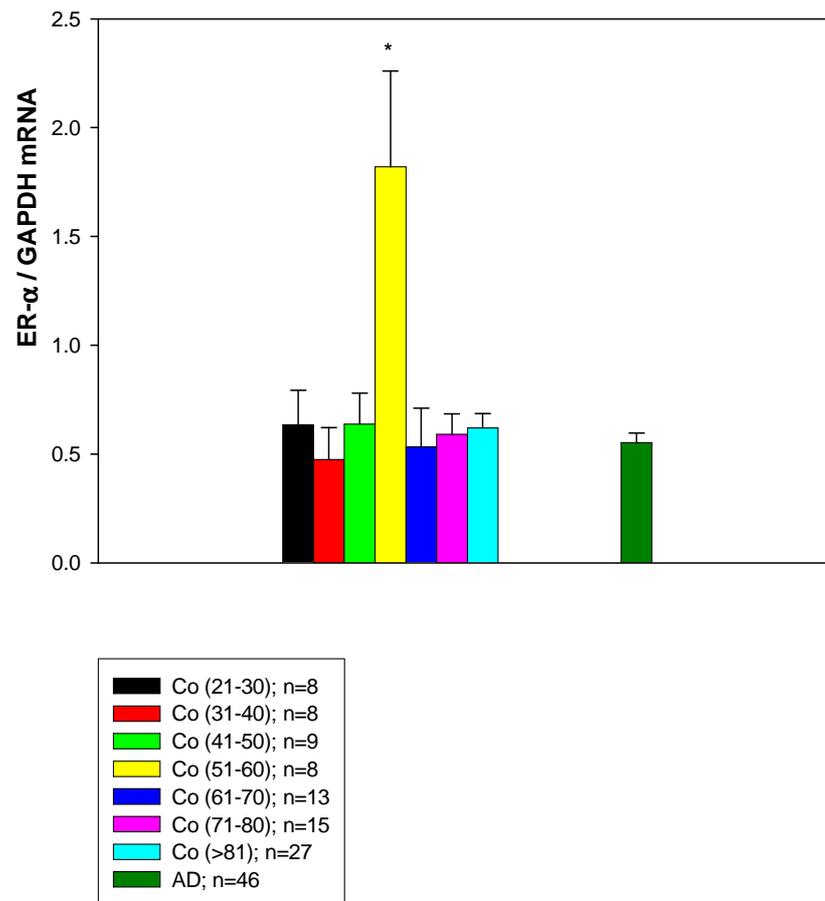


FIGURA 1.5. Espressione leucocitaria di ER- α in soggetti controllo e pazienti AD femmine. I valori sono espressi come MEDIA \pm SEM. * P < 0,05 vs gruppi controllo e AD.

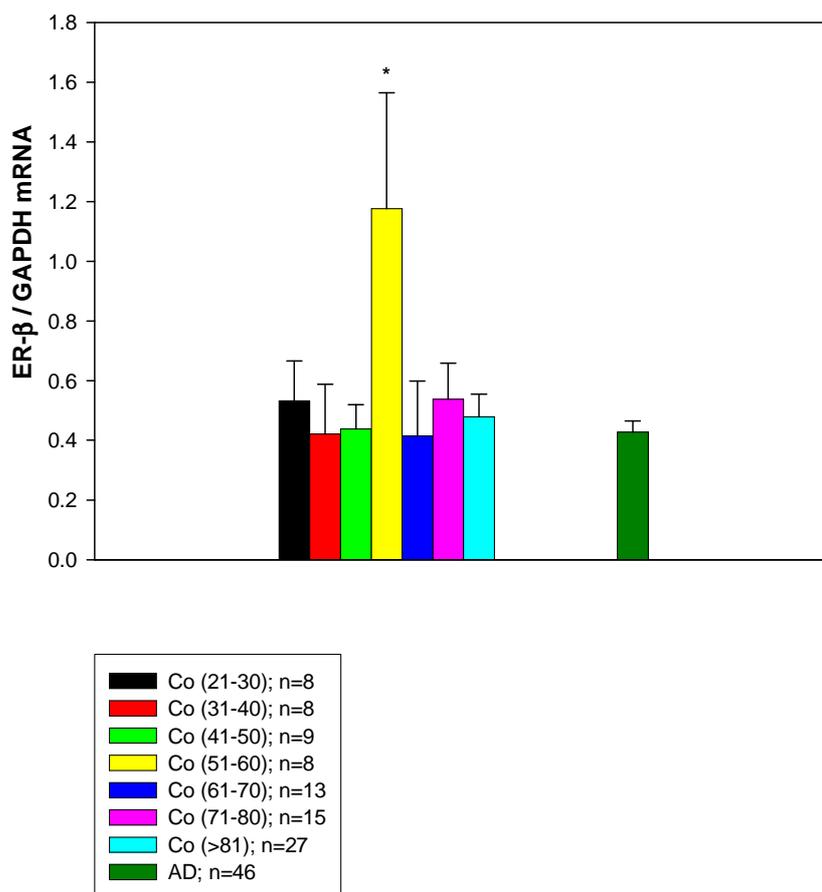


FIGURA. 1.6. Espressione leucocitaria di ER- β in soggetti controllo e pazienti AD femmine. I valori sono espressi come MEDIA \pm SEM. * P < 0,05 vs gruppi controllo e AD.

Espressione genica di IL-6 in leucociti

Nei soggetti maschi, non vi era alcuna variazione statisticamente significativa di IL-6 sia nelle diverse decadi di età (P = NS) (Fig. 1.7.) che rispetto ai pazienti AD (P = NS) (Fig. 1.7.).

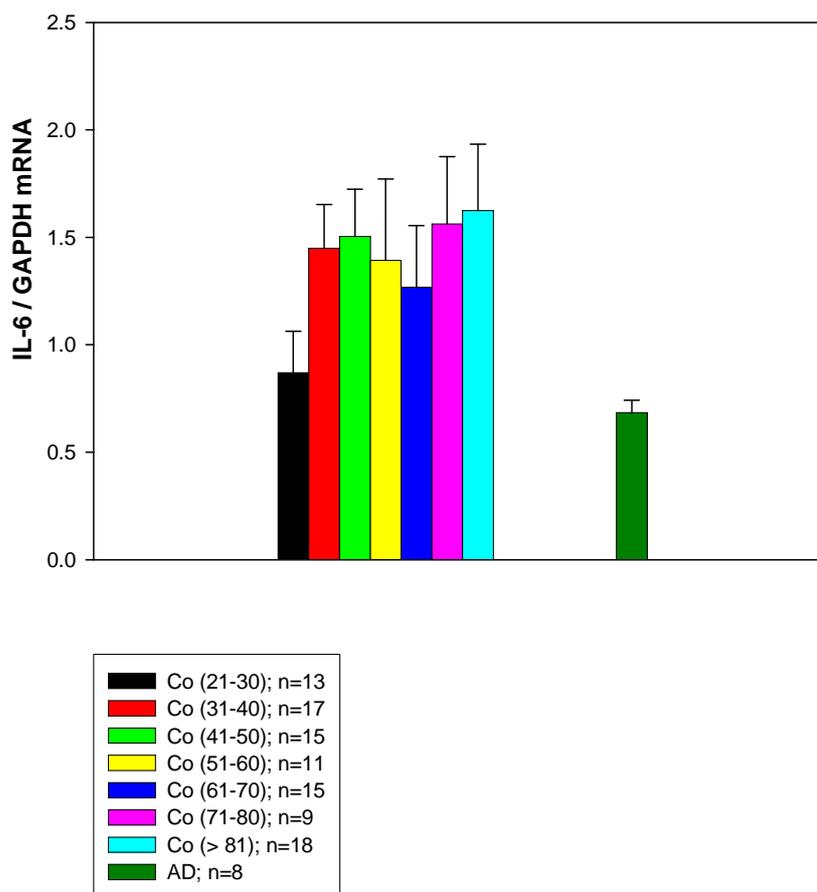


FIGURA. 1.7. Espressione leucocitaria di IL-6 in soggetti controllo e pazienti maschi. I valori sono espressi come MEDIA ± SEM. P = NS.

Nella donna, in fase di transizione menopausale, si osservava un picco di espressione di IL-6 statisticamente significativo sia rispetto alle donne sane di diverse età [(51-60): $3,00 \pm 0,75$ vs (21-30): $1,36 \pm 0,50$; (31-40): $1,02 \pm 0,40$; (41-50): $1,07 \pm 0,30$; (61-70): $0,96 \pm 0,50$; (71-80): $1,11 \pm 0,31$; (81-91): $1,78 \pm 0,35$; $P < 0,05$] (Fig. 1.8), che rispetto ai pazienti AD [(51-60): $3,00 \pm 0,75$ vs AD: $0,68 \pm 0,06$; $P < 0,05$] (Fig. 1.8.)

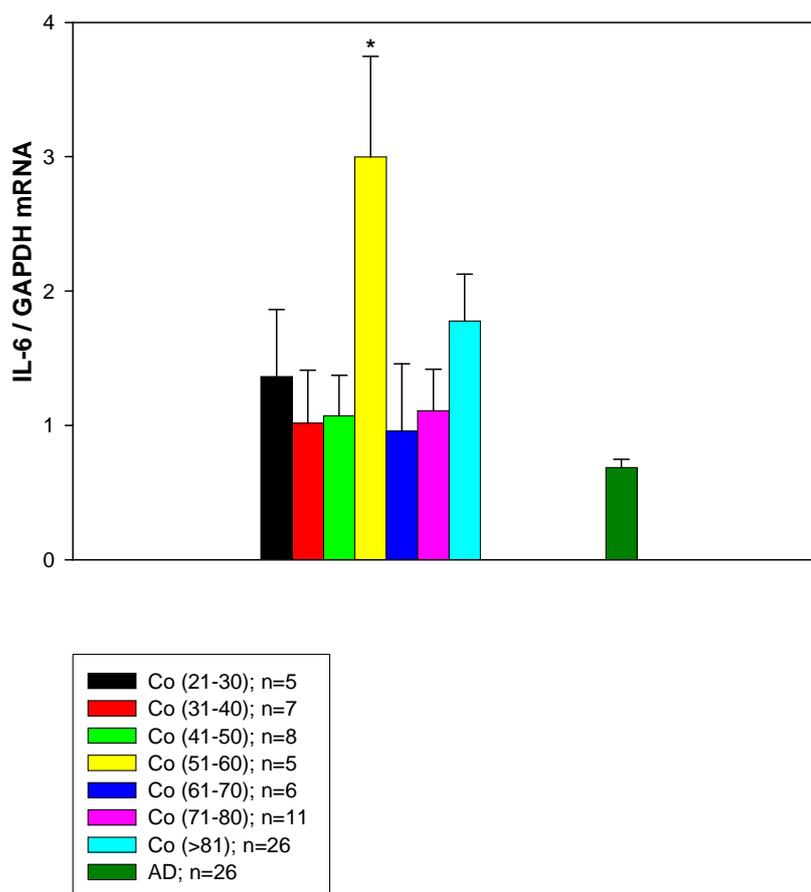


FIGURA 1.8. Espressione leucocitaria di IL-6 in soggetti controllo e pazienti AD femmine. I valori sono espressi come MEDIA \pm SEM. * $P < 0,05$ vs gruppi controllo e AD.

Espressione genica di PR-A/B in leucociti

Negli uomini non-dementi PR-A/B aumentava progressivamente con l'età fino a raggiungere un picco nella decade di età compresa tra i 41 e i 50 anni, per poi diminuire nella decade successiva e stabilizzarsi con l'aumentare dell'età [(21-30): $0,38 \pm 0,04$; (31-40): $0,47 \pm 0,06$; (41-50): $0,53 \pm 0,07$; (51-60): $0,36 \pm 0,04$; (61-70): $0,41 \pm 0,03$; (71-80): $0,34 \pm 0,04$; (81-90): $0,27 \pm 0,02$] (Fig. 1.9.); in particolare, si evidenziava un aumento statisticamente significativo tra la classe d'età di 41-50 anni rispetto a quella di 81-90 ($P < 0,05$).

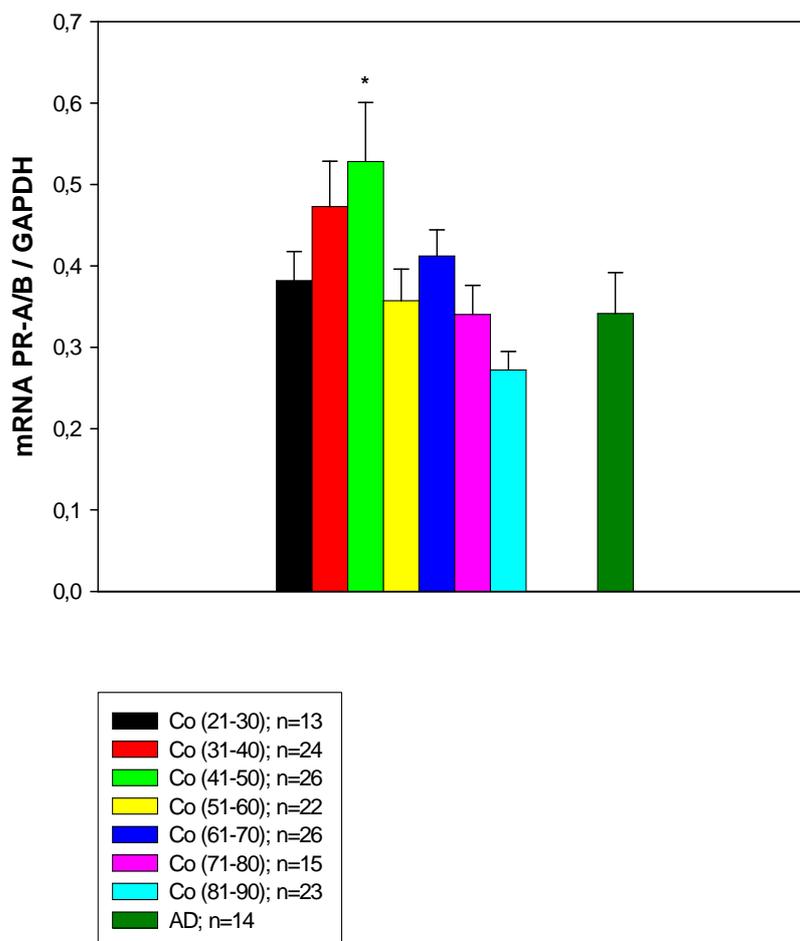


FIGURA 1.9. Espressione leucocitaria di PR-A/B in soggetti controllo e pazienti AD maschi. I valori sono espressi come MEDIA ± SEM. * P < 0,05 vs gruppo controllo (81-90).

Nelle donne PR-A/B mostrava un andamento bifasico, con un minimo nei soggetti appartenenti alla decade di età compresa tra i 41 e i 50 anni (fase di transizione menopausale) e valori maggiori nelle fasce d'età superiore e inferiore [(41-50): $0,29 \pm 0,05$ vs (21-30): $0,42 \pm 0,09$; (31-40): $0,36 \pm 0,03$; e vs (51-60): $0,32 \pm 0,04$; (61-70): $0,34 \pm 0,05$; (71-80): $0,44 \pm 0,10$; (81-90): $0,34 \pm 0,04$; (> 91): $0,54 \pm 0,36$; P<0,05] (Fig. 1.10.).

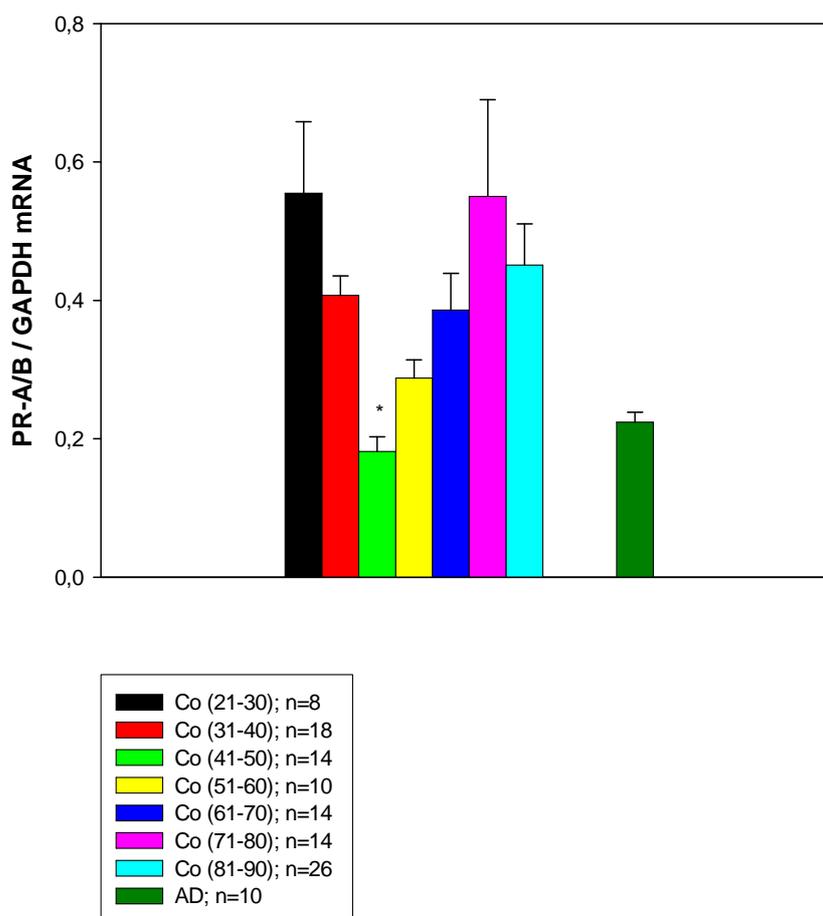


FIGURA 1.10. Espressione leucocitaria di PR-A/B in soggetti controllo e pazienti AD femmine. I valori sono espressi come MEDIA \pm SEM. * P < 0,05 vs gruppi controllo.

Nei pazienti AD di entrambi i sessi non si evidenziano differenze nell'espressione di PR-A/B rispetto ai soggetti controllo di pari età (ovvero nella fascia d'età che va dai 51 ai 90 anni) (P = NS) (Figg. 1.9. e 1.10.).

Espressione genica di IGF-1R in leucociti

Nei soggetti maschi sani l'espressione IGF-1R diminuiva progressivamente con l'età a partire dalla decade di età compresa tra i 31-40 anni [(21-30): $0,37 \pm 0,04$; (31-40): $0,46 \pm 0,04$; (41-50): $0,40 \pm 0,04$; (51-60): $0,33 \pm 0,03$; (61-70): $0,35 \pm 0,02$; (71-80): $0,30 \pm 0,03$; (81-90): $0,30 \pm 0,02$] (Fig. 1.11.); in particolare, si evidenziava un aumento statisticamente significativo tra la classe d'età di 41-50 anni rispetto a quella di 81-90 (P<0,05).

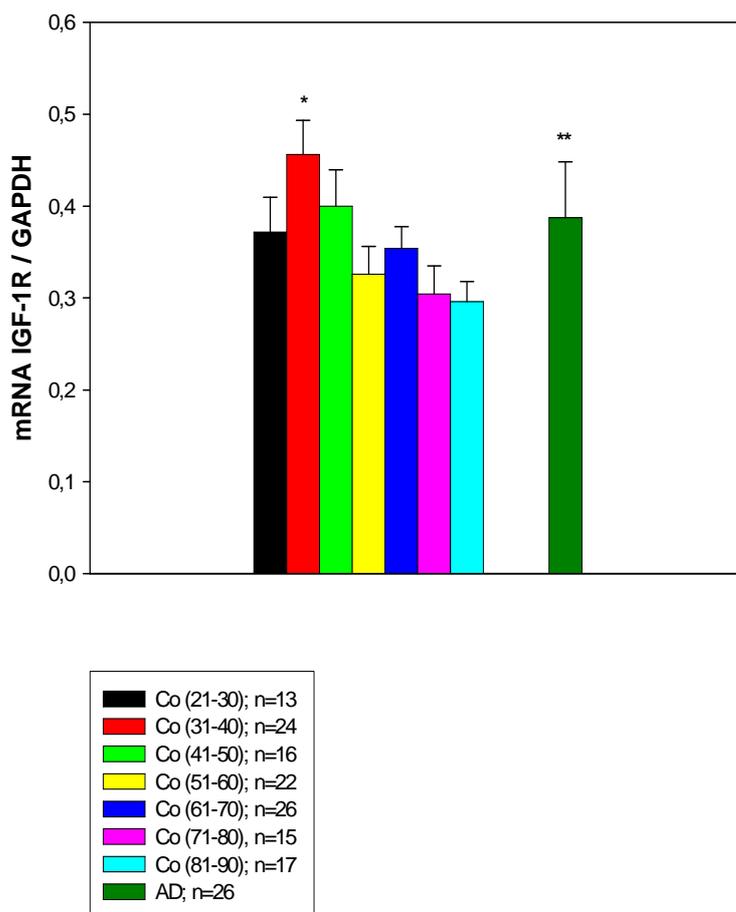


FIGURA 1.11. Espressione leucocitaria di PR-A/B in soggetti controllo e pazienti AD femmine. I valori sono espressi come MEDIA \pm SEM. * $P < 0,05$ vs gruppo controllo (81-90). ** $P < 0,05$ vs gruppo controllo (81-90).

Al contrario, nelle donne l'espressione di IGF-1R non subiva variazioni significative tra i diversi gruppi di età ($P = NS$) (Fig. 1.12.).

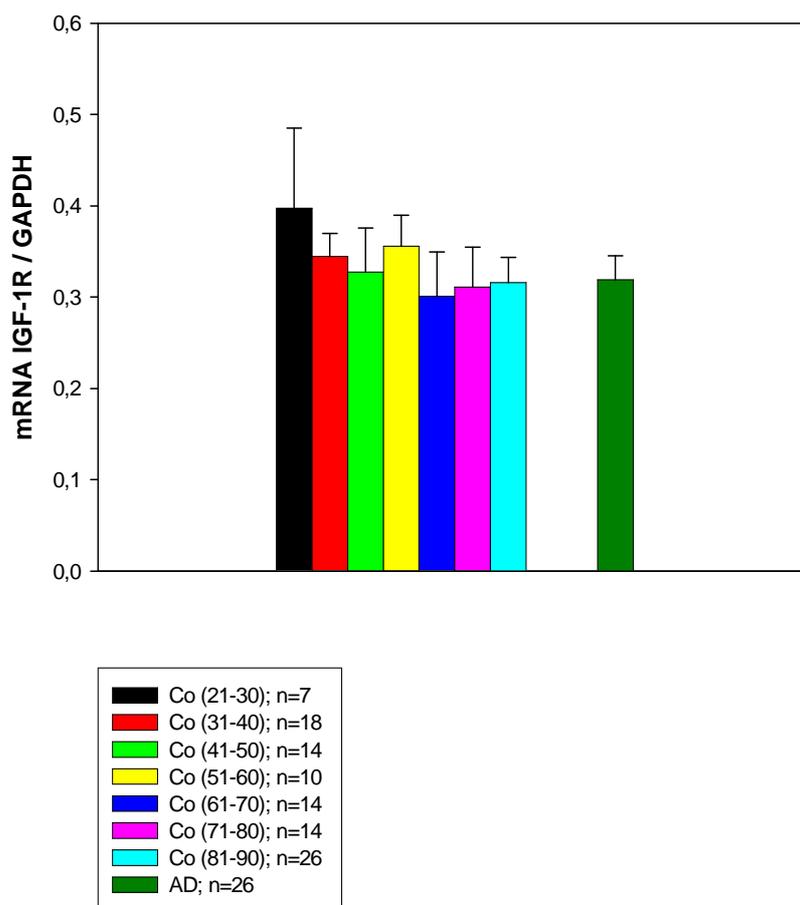


FIGURA 1.12. Espressione leucocitaria di IGF-1R in soggetti controllo e pazienti AD femmine. I valori sono espressi come MEDIA \pm SEM. P = NS.

Solo nei pazienti AD di sesso maschile l'espressione di IGF-1R risultava significativamente maggiore rispetto ai soggetti maschi non-dementi della fascia d'età 81-90 [(AD): $0,39 \pm 0,06$ vs (81-90): $0,30 \pm 0,02$; $P < 0,05$] (Fig. 1.11.).

2. LIVELLI PLASMATICI DI ESTRADIOLO, PROGESTERONE ED IGF-1

Livelli plasmatici di 17- β -estradiolo

I livelli plasmatici di estradiolo presentavano un andamento completamente differente negli uomini e nelle donne.

Nell'uomo le concentrazioni di questo ormone non presentavano alcuna variazione significativa sia all'interno del gruppo controllo per le diverse decadi di età ($P = NS$) (Graf. 2.1.), che nei pazienti AD, per i quali tali livelli erano sovrapponibili ai soggetti controllo di pari età ($P = NS$) (Fig. 2.1.).

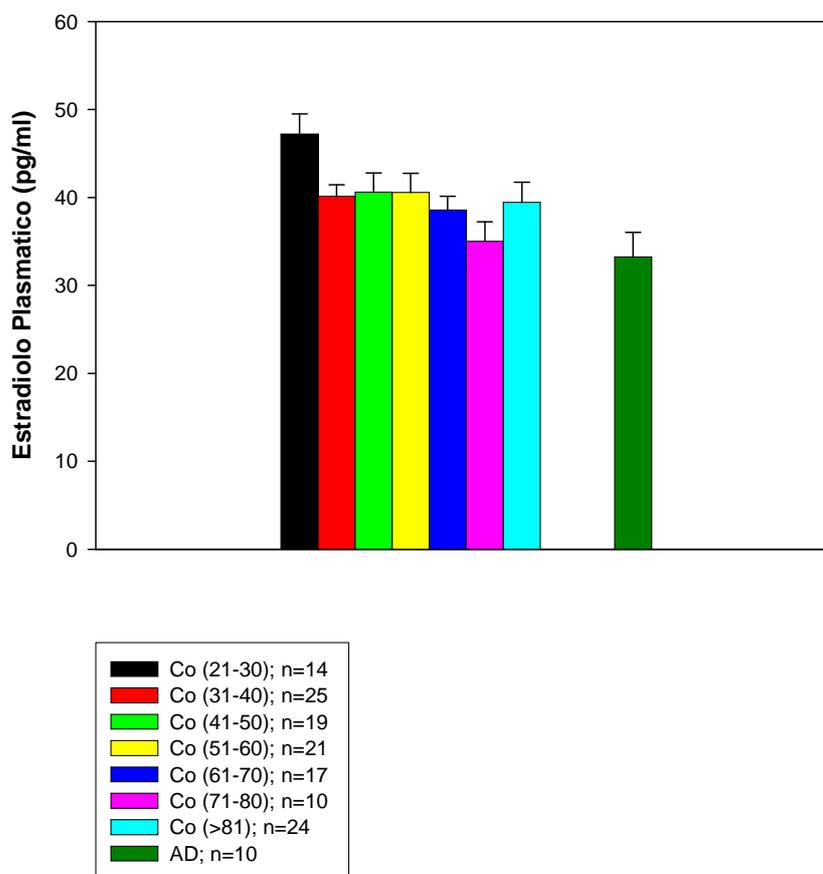


FIGURA 2.1. Livelli plasmatici di estradiolo in soggetti controllo e pazienti AD maschi. I valori sono espressi come MEDIA \pm SEM. P = NS.

Nella donna si osservava una drastica, ma fisiologica, riduzione statisticamente significativa dei livelli circolanti di estradiolo con l'ingresso in menopausa, che si manteneva tale con il progredire dell'età [(51-60): $23,95 \pm 1,98$; (61-70): $27,88 \pm 2,17$; (71-80): $29,15 \pm 2,48$; (81-91): $23,83 \pm 1,21$ vs (21-30): $77,56 \pm 11,47$; (31-40): $103,04 \pm 11,36$; (41-50): $79,80 \pm 19,95$; $P < 0,05$] (Fig. 2.2.); tale riduzione si osservava anche nei pazienti AD ed era sovrapponibile ai soggetti controllo di pari età [(AD): $22,03 \pm 1,23$ vs (51-60): $23,95 \pm 1,98$; (61-70): $27,88 \pm 2,17$; (71-80): $29,15 \pm 2,48$; (81-91): $23,83 \pm 1,21$; $P = NS$] (Fig. 2.2).

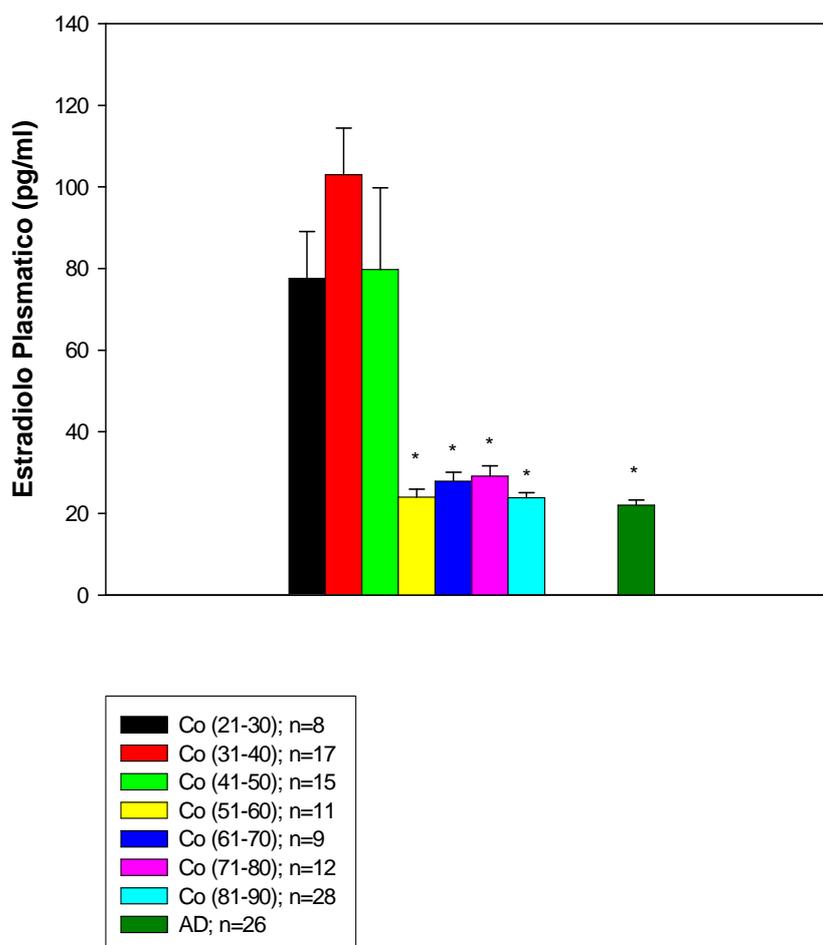


FIGURA 2.2. Livelli plasmatici di estradiolo in soggetti controllo e pazienti AD femmine. I valori sono espressi come MEDIA ± SEM. * P < 0,05 vs gruppi controllo (21-30); (31-40); (41-50).

Inoltre, la diminuzione osservata nei livelli di estradiolo nell'AD era statisticamente significativa rispetto a quelli giovani [(AD): 22,03 ± 1,23 vs (21-30): 77,56 ± 11,47; (31-40): 103,04 ± 11,36; (41-50): 79,80 ± 19,95; P<0,05]. (Fig. 2.2.).

Livelli plasmatici di progesterone

Come previsto, l'andamento dei livelli di progesterone nell'uomo e nella donna si sovrapponeva a quello precedentemente descritto per l'estradiolo.

Nell'uomo i livelli di progesterone non mostravano alcuna variazione significativa sia all'interno del gruppo controllo per le diverse decadi di età (P = NS) (Fig. 2.3.), che nei pazienti AD, per i quali tali livelli erano sovrapponibili ai soggetti controllo di pari età (P = NS) (Fig. 2.3.).

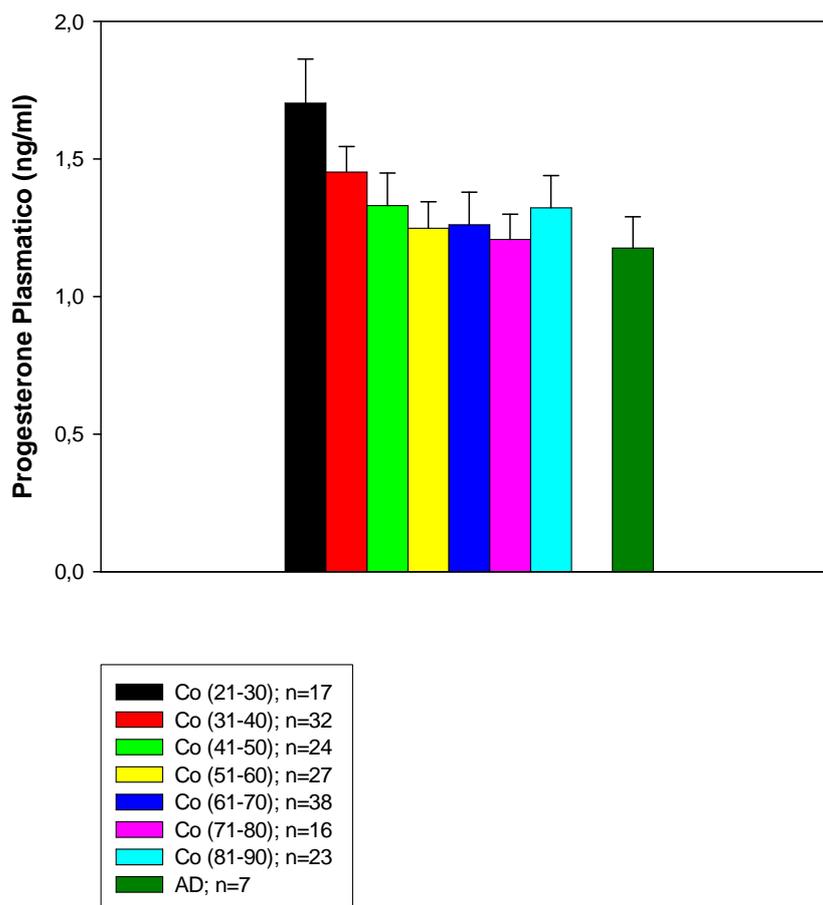


FIGURA 2.3. Livelli plasmatici di progesterone in soggetti controllo e pazienti AD maschi. I valori sono espressi come MEDIA \pm SEM. P = NS.

Nella donna si assisteva ad una notevole riduzione dei livelli di progesterone con un valore minimo nella fase di transizione menopausale (decade 51-60 anni), che si manteneva costante con il progredire dell'età [(51-60): $0,83 \pm 0,08$; (61-70): $1,05 \pm 0,14$; (71-80): $1,26 \pm 0,11$; (81-90): $1,63 \pm 0,32$; (> 91): $1,06 \pm 0,07$ vs (21-30): $4,64 \pm 2,28$; (31-40): $11,56 \pm 3,36$; (41-50): $5,41 \pm 1,76$; $P < 0,05$] (Fig. 2.4).

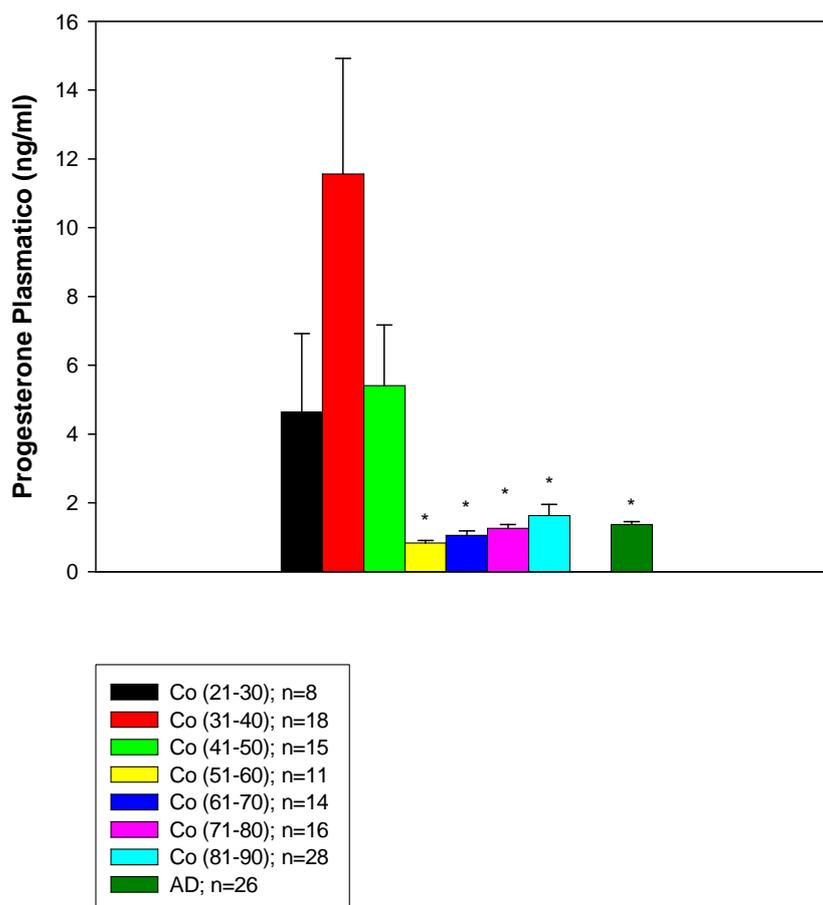


FIGURA 2.4. Livelli plasmatici di progesterone in soggetti controllo e pazienti AD femmine. I valori sono espressi come MEDIA \pm SEM. * $P < 0,05$ vs gruppi controllo (21-30); (31-40); (41-50).

I livelli di progesterone nelle pazienti AD si dimostravano corrispondenti a quelli dei soggetti controllo di pari età ($P = NS$); inoltre, nelle pazienti AD si evidenziava una diminuzione significativa dei livelli di progesterone rispetto ai controlli giovani [(AD): $1,36 \pm 0,09$ vs (21-30): $4,64 \pm 2,28$; (31-40): $11,56 \pm 3,36$; (41-50): $5,41 \pm 1,76$; $P < 0,05$]. (Fig. 2.4.).

Livelli plasmatici di IGF-1

Per quanto riguarda i livelli plasmatici di IGF-1, si osservava, nei soggetti controllo di entrambi i sessi, una caratteristica diminuzione con l'avanzare dell'età.

Nei maschi sani si assisteva a una riduzione progressiva dei livelli di IGF-1 nel corso della vita [(51-60): $130,26 \pm 10,76$; (61-70): $128,44 \pm 11,01$; (71-80): $83,03 \pm 15,02$; (81-90): $91,58 \pm 13,02$ vs (21-30): $258,12 \pm 28,06$; (31-40): $203,54 \pm 13,06$; (41-50): $208,61 \pm 16,41$; $P < 0,05$] (Fig. 2.5.).

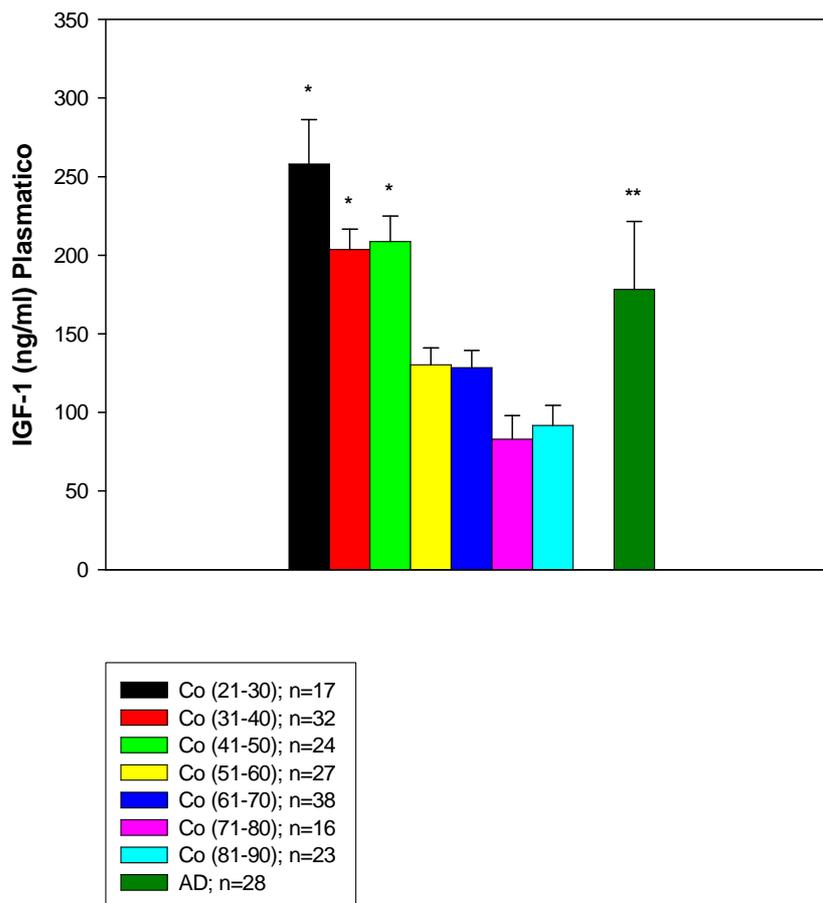


FIGURA 2.5. Livelli plasmatici di IGF-1 in soggetti controllo e pazienti AD maschi. I valori sono espressi come MEDIA ± SEM. * P < 0,05 vs gruppi controllo (51-60); (61-70); (71-80); (81-90). ** P < 0,05 vs gruppi controllo (71-80); (81-90).

Nelle donne, invece, la riduzione dei livelli di IGF-1 non solo risultava più marcata, ma si ristaurava più precocemente rispetto agli uomini [(31-40): 234,02 ± 19,87; (41-50): 184,63 ± 17,30; (51-60): 169,33 ± 19,88; (61-70): 97,05 ± 14,56; (71-80): 113,46 ± 20,34; (81-90): 83,87 ± 11,81; (>91): 66,74 ± 30,08 vs (21-30): 352,64 ± 64,47; P<0,05] (Fig. 2.6.).

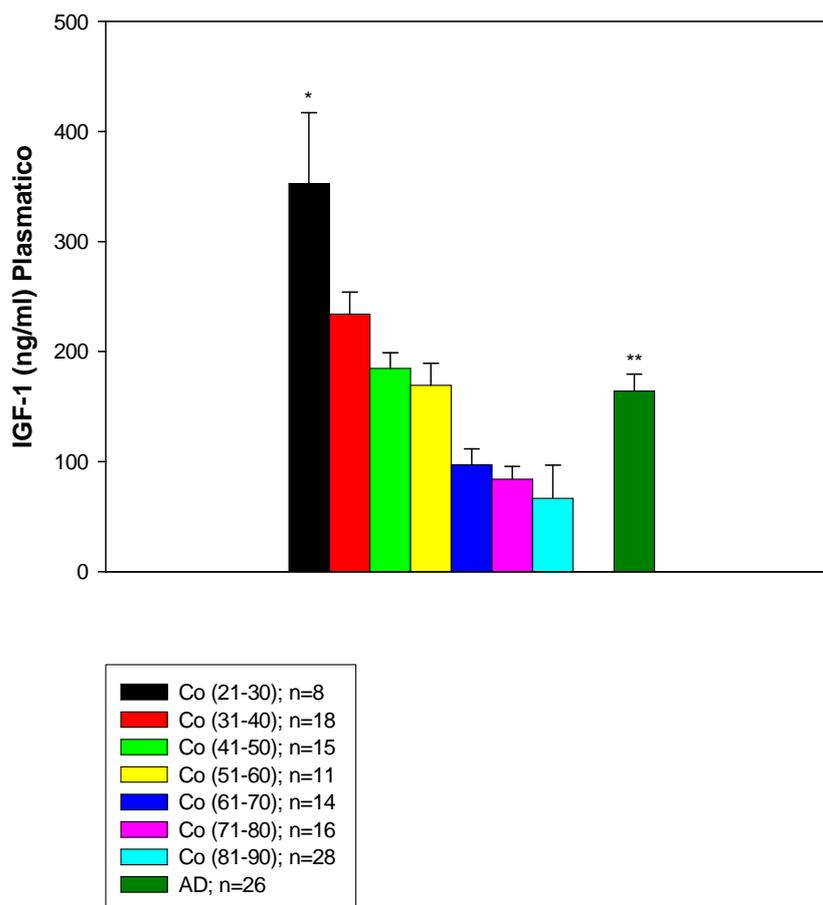


FIGURA 2.6. Livelli plasmatici di IGF-1 in soggetti controllo e pazienti AD femmine. I valori sono espressi come MEDIA ± SEM. * $P < 0,05$ vs gruppi controllo (31-40); (41-50); (51-60); (61-70); (71-80); (81-90). ** $P < 0,05$ vs gruppi controllo (71-80); (81-90).

Nei pazienti AD di entrambi i sessi si evidenziava un aumento significativo dei livelli plasmatici di IGF-1 rispetto ai controlli di età corrispondente (fasce d'età 71-80 e 81-90) ($P < 0,05$) (Figg. 2.5. e 2.6.).

3. ANALISI DELLE CORRELAZIONI

Dall'analisi delle correlazioni tra i diversi parametri biologici valutati emerge che:

- l'età era inversamente correlata con i livelli plasmatici di IGF-1 in entrambi i sessi (Fig. 3.1. e 3.2.) ($P < 0,05$) e con i livelli plasmatici degli ormoni steroidei estradiolo (Fig. 3.3.) ($P < 0,05$; $R = 0,5661$) e progesterone solo nel sesso femminile (Fig. 3.4.) ($P < 0,05$; $R = 0,4042$);

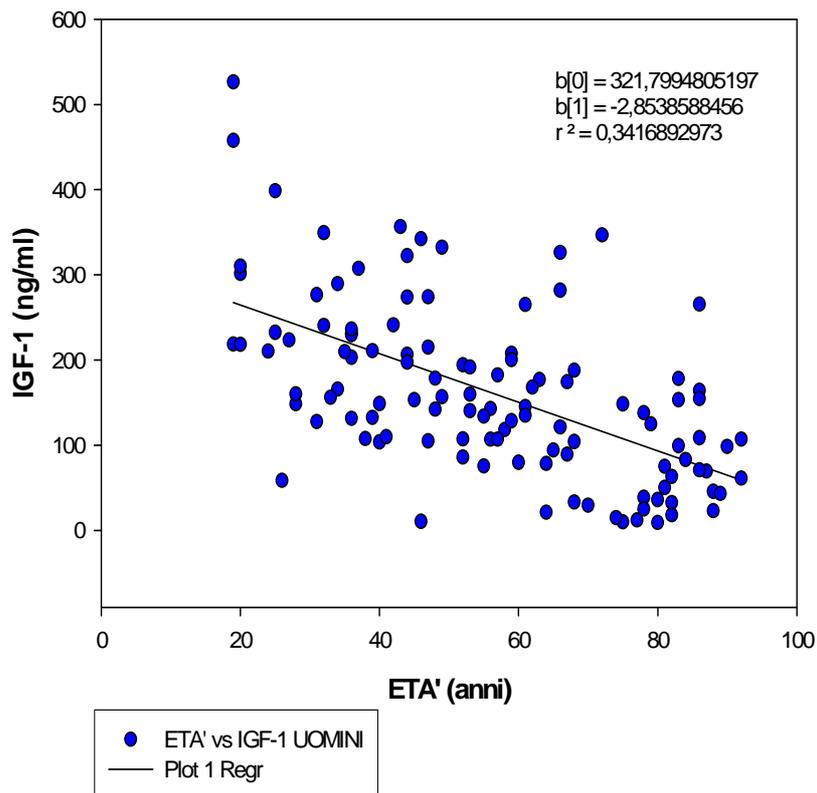


FIGURA 3.1. Correlazione lineare tra i livelli plasmatici di IGF-1 e l'età di tutti gli individui reclutati nello studio (soggetti controllo e pazienti AD) uomini. I valori sono espressi come MEDIA \pm SEM. $R^2 = 0,3417$; $P < 0,05$

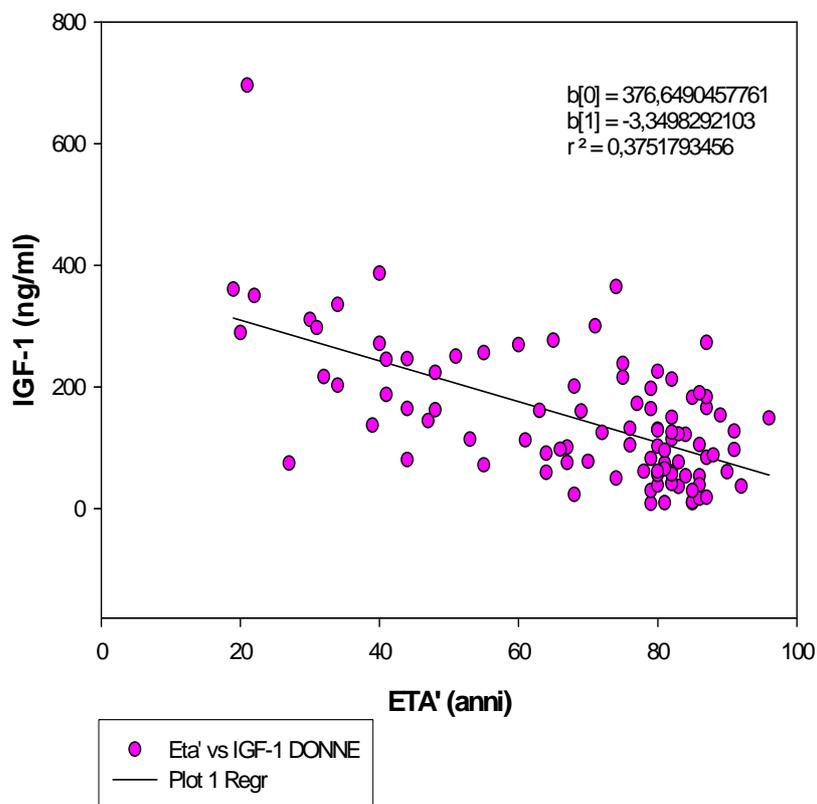


FIGURA 3.2. Correlazione lineare tra i livelli plasmatici di IGF-1 e l'età di tutti gli individui reclutati nello studio (soggetti controllo e pazienti AD) donne. I valori sono espressi come MEDIA \pm SEM. $R^2 = 0,3752$; $P < 0,05$

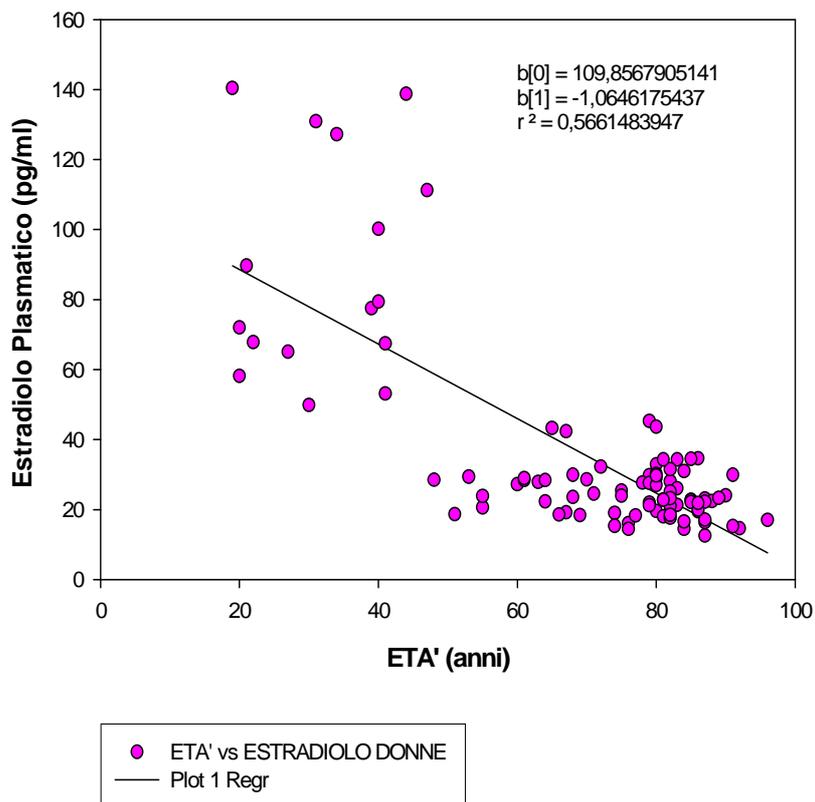


FIGURA 3.3. Correlazione lineare tra i livelli plasmatici di estradiolo e l'età di tutti gli individui reclutati nello studio (soggetti controllo e pazienti AD) donne. I valori sono espressi come MEDIA \pm SEM. $R^2 = 0,5661$; $P < 0,05$

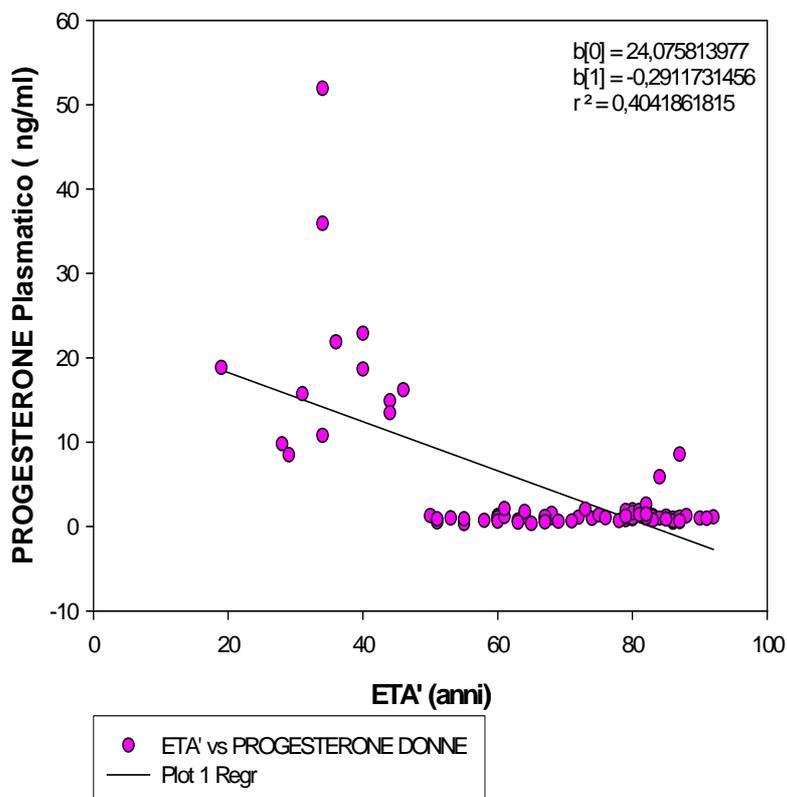


FIGURA 3.4. Correlazione lineare tra i livelli plasmatici di progesterone e l'età di tutti gli individui reclutati nello studio (soggetti controllo e pazienti AD) donne. I valori sono espressi come MEDIA \pm SEM. $R^2 = 0,4042$; $P < 0,05$

- nella popolazione controllo sia maschile (Fig. 3.5. e 3.6.) che femminile (Fig. 3.7. e 3.8.) si osservava una correlazione diretta tra l'espressione delle due isoforme recettoriali ER- α o ER- β e l'espressione di mRNA di IL-6 ($P < 0,05$) e tra i livelli plasmatici di IGF-1 e l'espressione leucocitaria di IGF-1R (Fig. 3.9. e 3.10.) ($P < 0,05$). Nei pazienti AD quest'ultima correlazione non risultava statisticamente significativa (Fig. 3.11.) ($P = NS$).

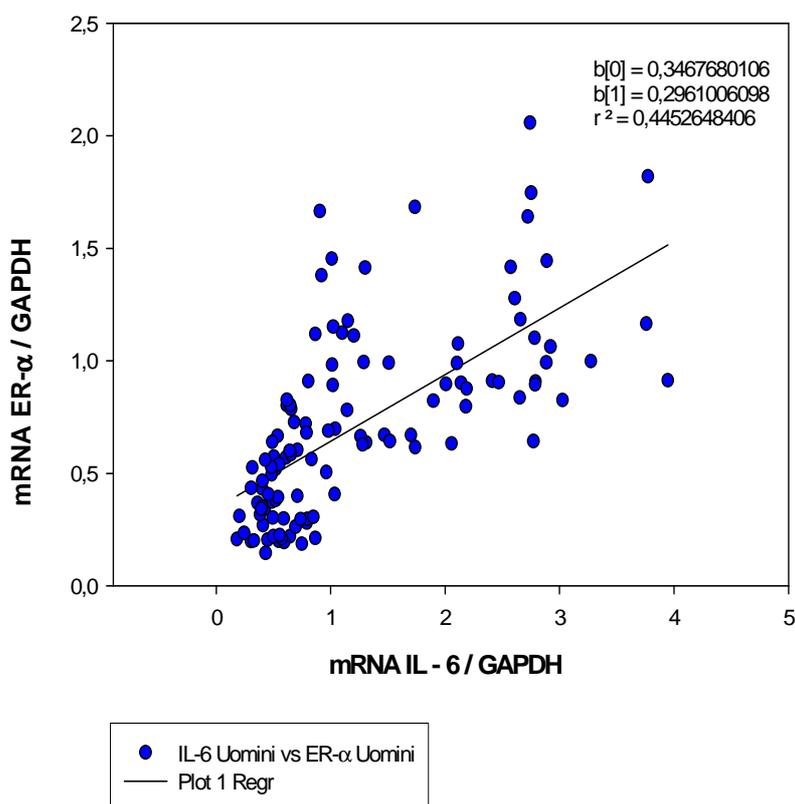


FIGURA 3.5. Correlazione lineare tra l'espressione leucocitaria di ER- α e IL-6 nella popolazione controllo maschile. I valori sono espressi come MEDIA \pm SEM. $R^2 = 0,4453$; $P < 0,05$

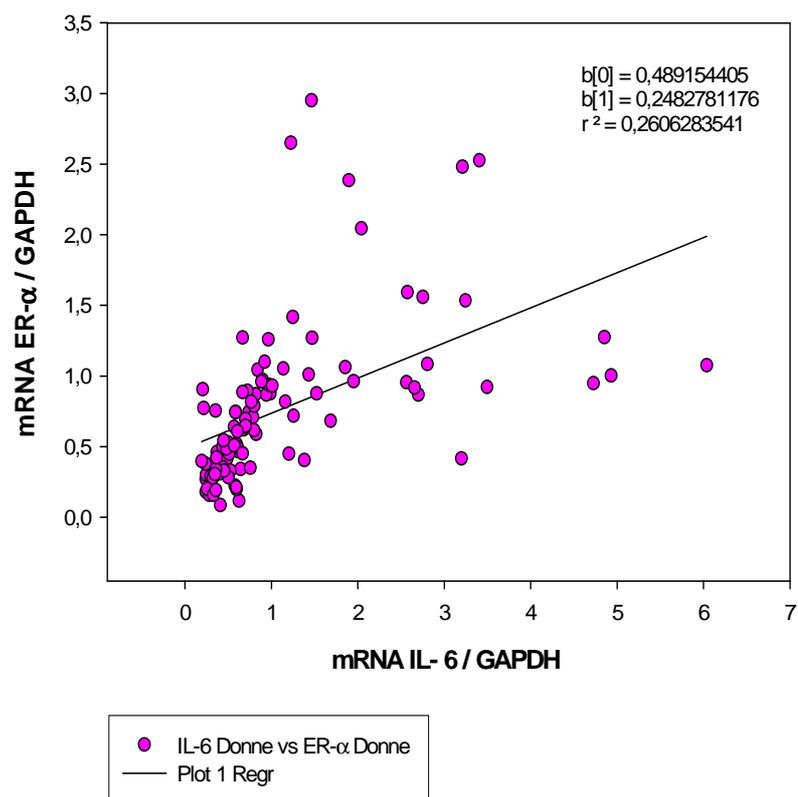


FIGURA. 3.6. Correlazione lineare tra l'espressione leucocitaria di ER- α e IL-6 nella popolazione controllo femminile. I valori sono espressi come MEDIA \pm SEM. $R^2 = 0,2606$; $P < 0,05$

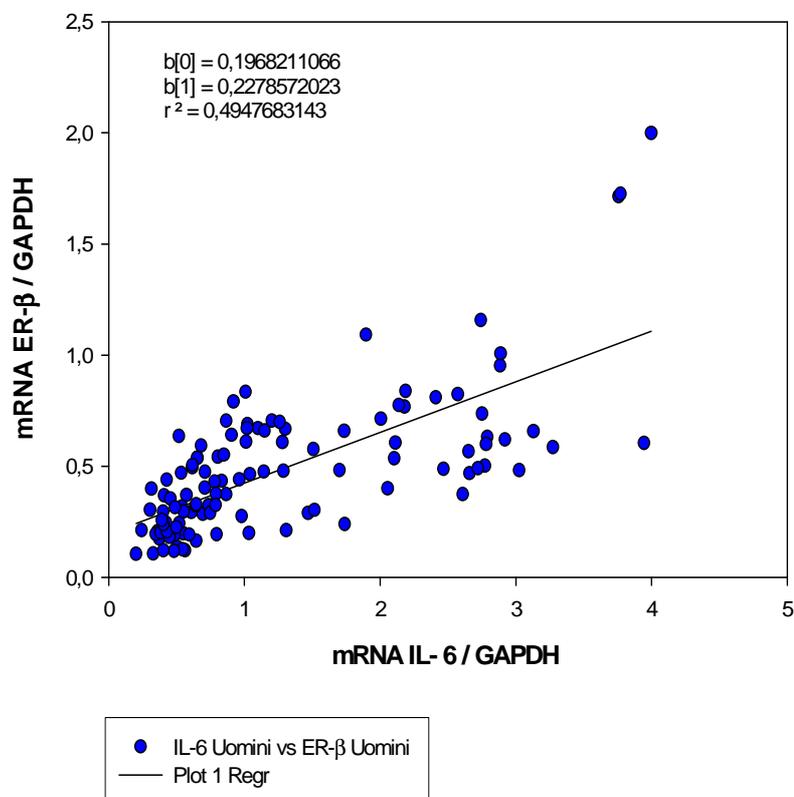


FIGURA 3.7. Correlazione lineare tra l'espressione leucocitaria di ER- β e IL-6 nella popolazione controllo maschile. I valori sono espressi come MEDIA \pm SEM. $R^2 = 0,4948$; $P < 0,05$

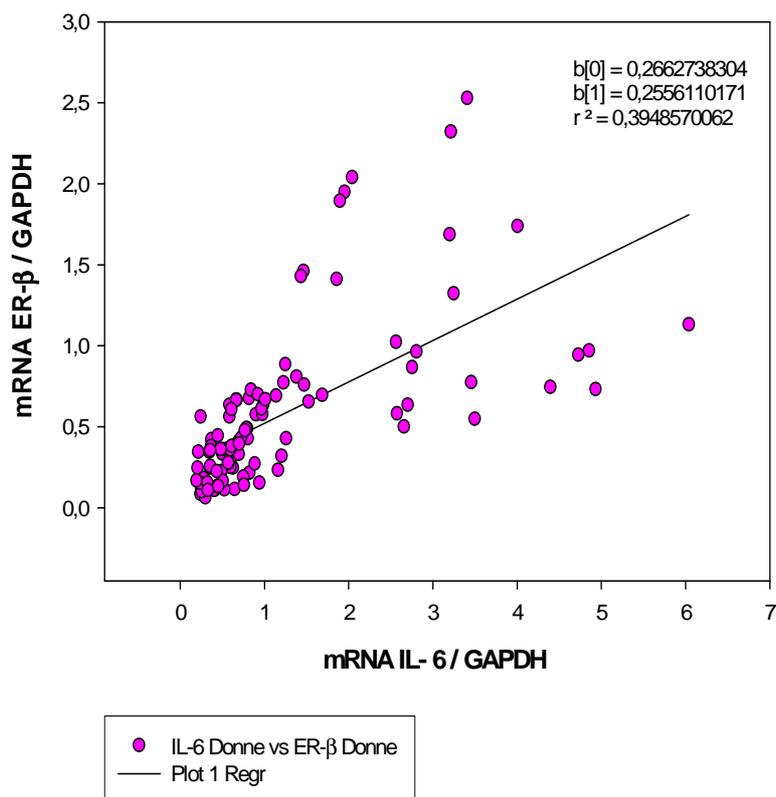


Fig. 3.8. Correlazione lineare tra l'espressione leucocitaria di ER-β e IL-6 nella popolazione controllo femminile. I valori sono espressi come MEDIA ± SEM. $R^2 = 0,3948$; $P < 0,05$

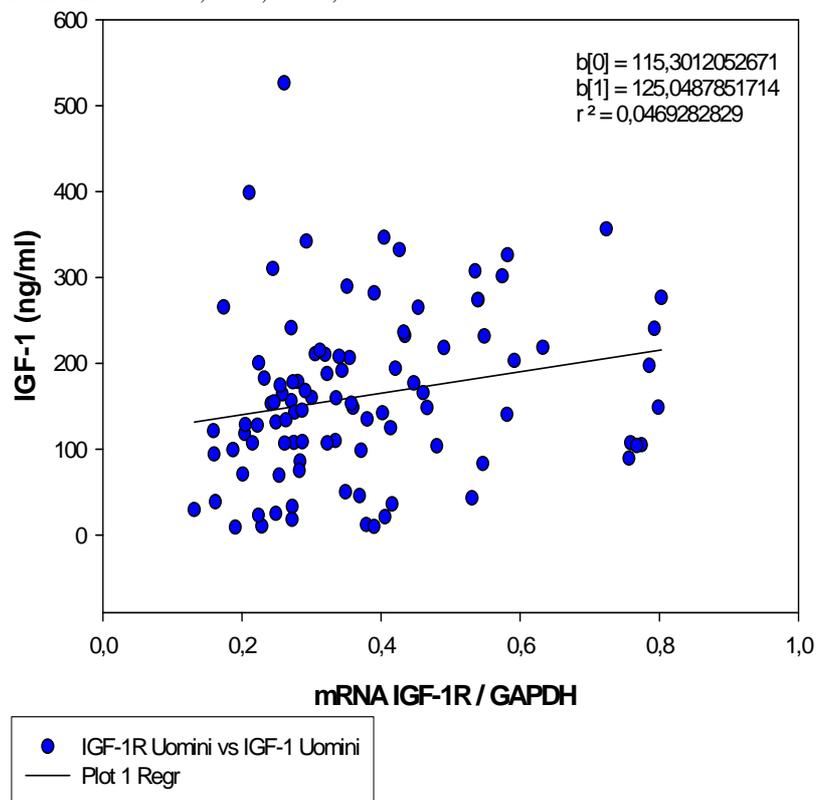


FIGURA 3.9. Correlazione lineare tra i livelli plasmatici di IGF-1 e l'espressione leucocitaria di IGF-1R nella popolazione controllo maschile. I valori sono espressi come MEDIA ± SEM. $R^2 = 0,0469$; $P < 0,05$

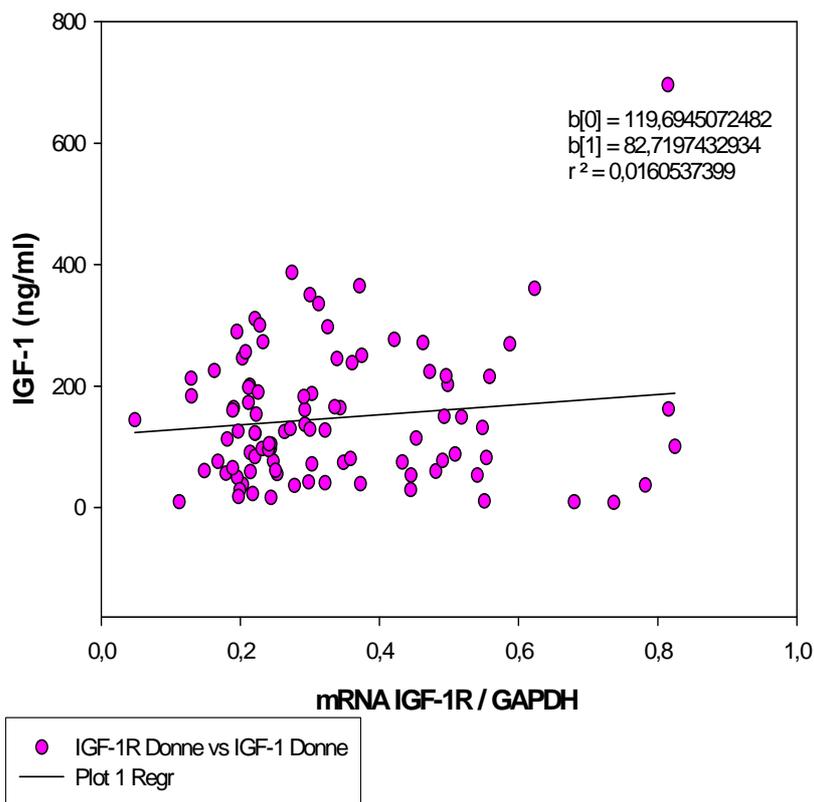


FIGURA 3.10. Correlazione lineare tra i livelli plasmatici di IGF-1 e l'espressione leucocitaria di IGF-1R nella popolazione controllo femminile. I valori sono espressi come MEDIA \pm SEM. $R^2 = 0,0160$; $P < 0,05$

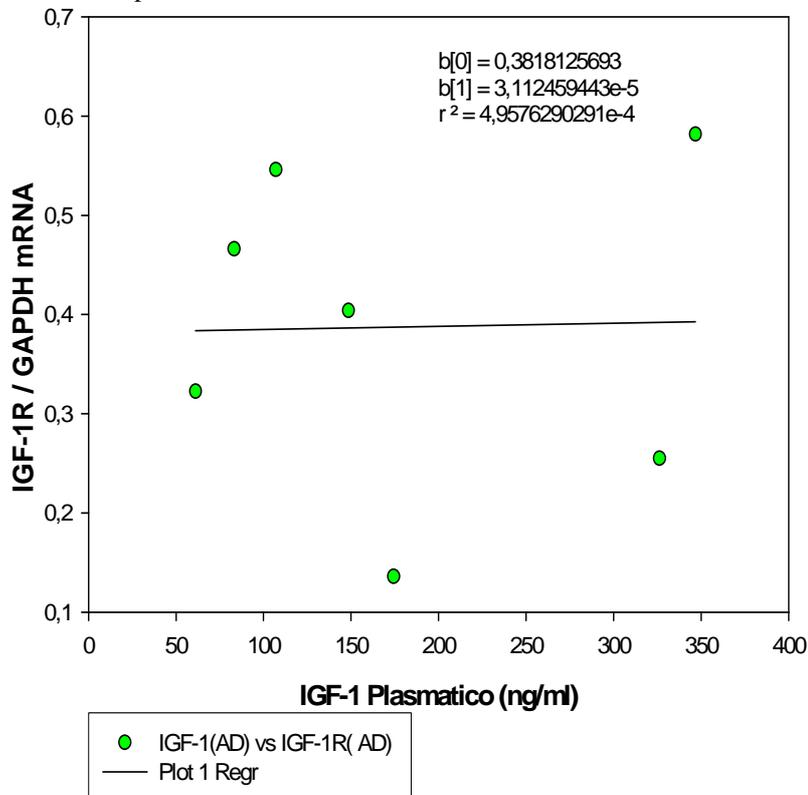


FIGURA 3.11. Correlazione tra i livelli plasmatici di IGF-1 e l'espressione leucocitaria di IGF-1R nella popolazione AD maschile. I valori sono espressi come MEDIA \pm SEM. $R^2 = 4,9576e^{-4}$; $P = NS$

Per valutare il ruolo di IGF-1 nella transizione menopausale, la popolazione femminile pre- e post-menopausale veniva ulteriormente suddivisa nei gruppi con livelli di IGF-1 normali o ridotti sulla base di un cut-off predefinito (vedi Materiali e Metodi). L'intervallo di concentrazioni di IGF-1 varia a seconda della fascia d'età considerata: 95-231 ng/ml nella fascia 20-30 anni; 55-144 ng/ml per la fascia 30-40 anni; e infine 45-114 ng/ml nelle donne con età superiore ai 40 anni. Si ottenevano i seguenti risultati:

- nelle donne in pre-menopausa con livelli normali di IGF-1 si evidenziava una correlazione positiva tra le concentrazioni plasmatiche di IGF-1 e l'espressione leucocitaria di PR-A/B (Fig. 3.13.) ($P < 0,05$; $R = 0,8034$), la quale veniva persa nel gruppo pre-menopausale con livelli ridotti di IGF-1 (Fig. 3.14.) ($P = \text{NS}$);
- nelle donne in post-menopausa sia nel gruppo con livelli normali che ridotti di IGF-1 non si osservava alcuna correlazione statisticamente significativa tra i due parametri in esame (Fig. 3.15. e 3.16.) ($P = \text{NS}$).

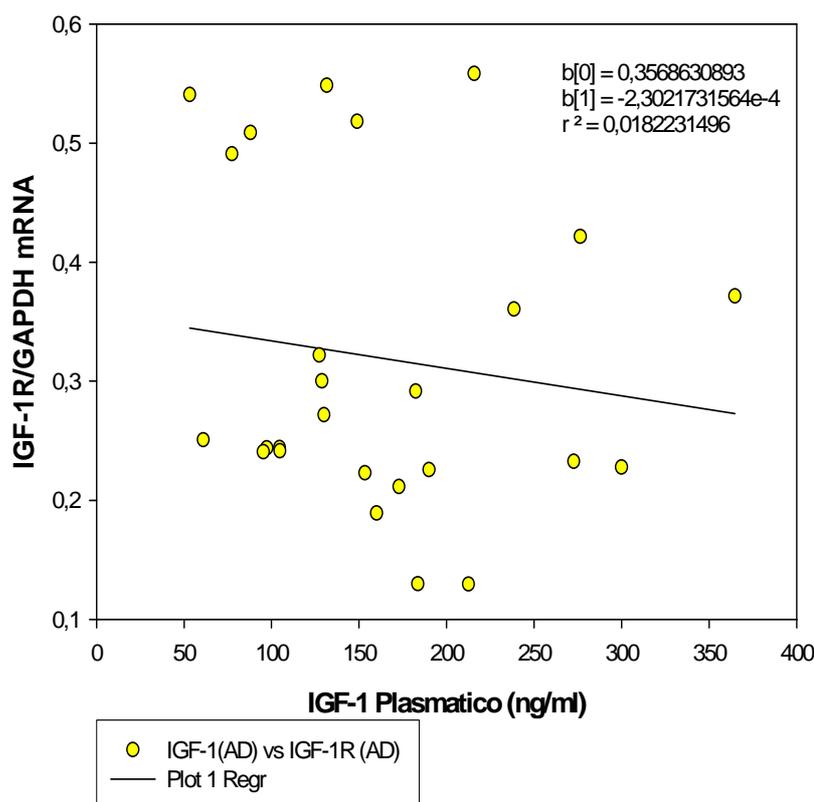


FIGURA 3.12. Correlazione tra i livelli plasmatici di IGF-1 e l'espressione leucocitaria di IGF-1R nella popolazione AD femminile. I valori sono espressi come MEDIA \pm SEM. $R^2 = 0,0182$; $P = \text{NS}$

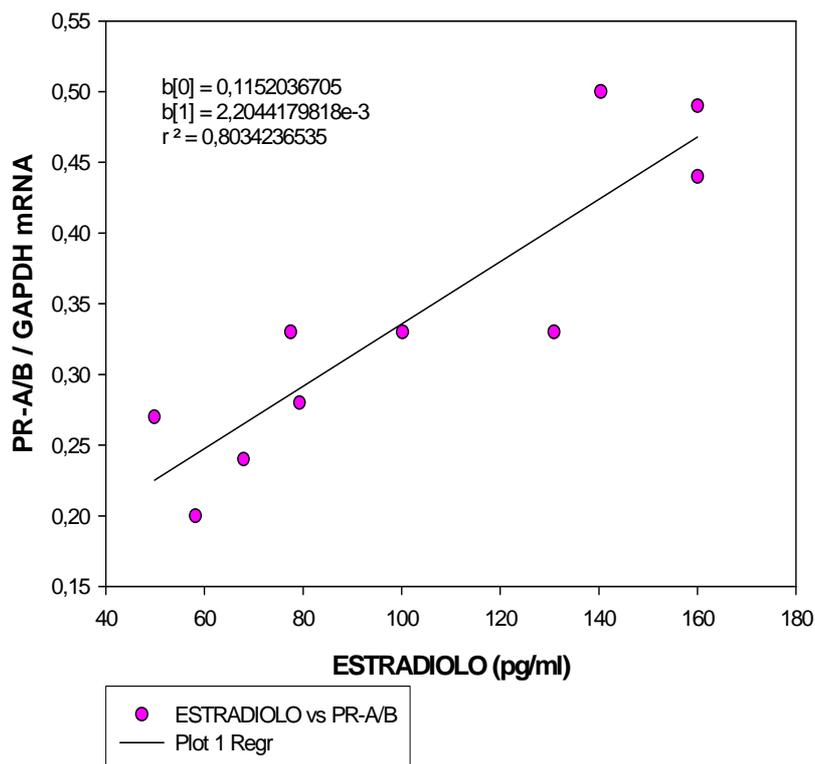


FIGURA 3.13. Correlazione diretta tra i livelli plasmatici di estradiolo e l'espressione leucocitaria di PR-A/B nelle donne in pre-menopausa con livelli normali di IGF-1. I valori sono espressi come MEDIA \pm SEM. $R^2 = 0,8034$; $P < 0,05$

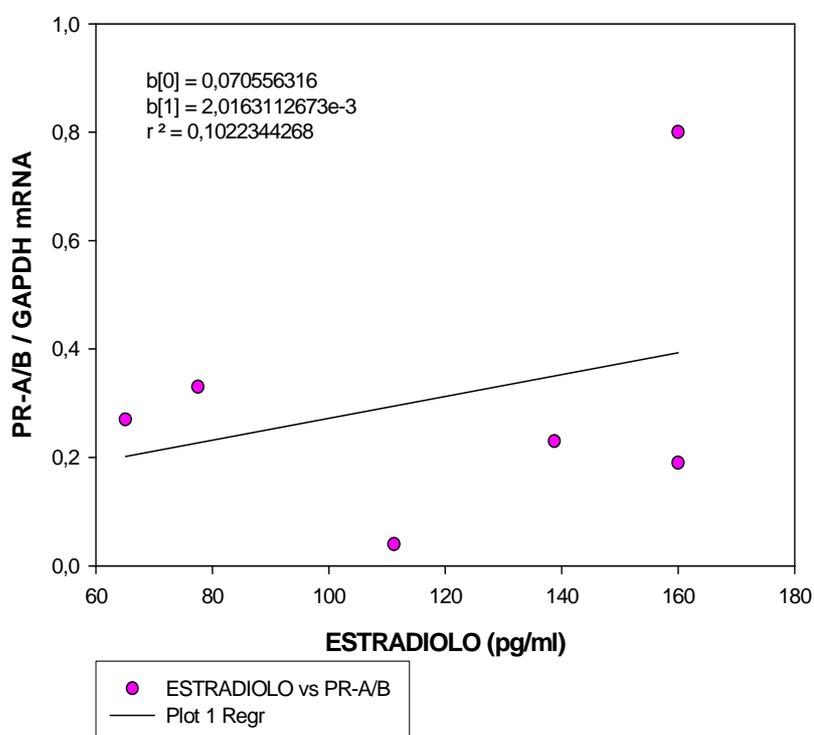


FIGURA 3.14. Correlazione tra i livelli plasmatici di estradiolo e l'espressione leucocitaria di PR-A/B nelle donne in pre-menopausa con livelli bassi di IGF-1. I valori sono espressi come MEDIA \pm SEM. $R^2 = 0,1022$; $P = NS$

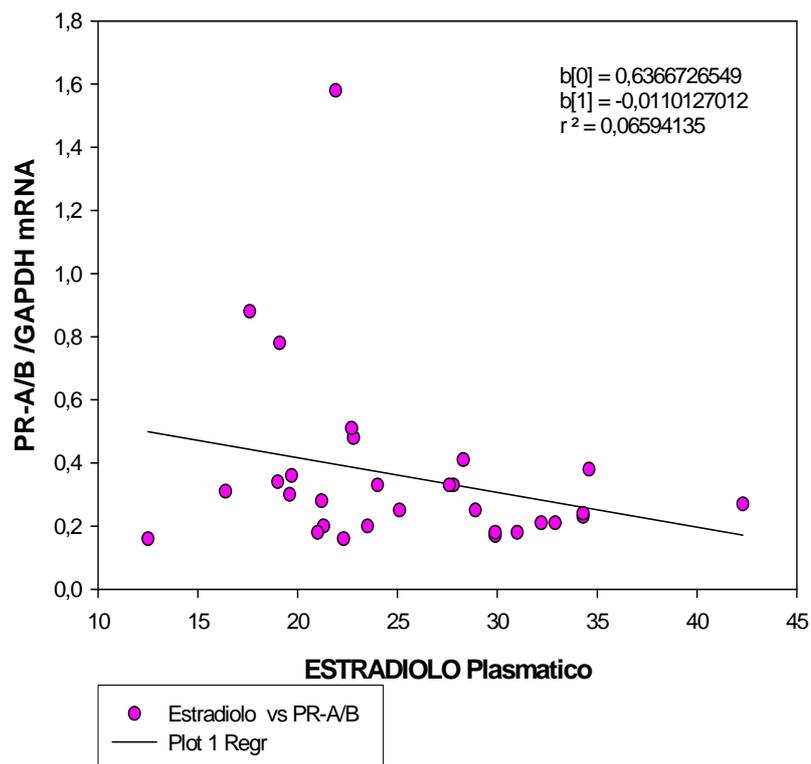


FIGURA 3.15. Correlazione tra i livelli plasmatici di estradiolo e l'espressione leucocitaria di PR-A/B nelle donne in post-menopausa con livelli normali di IGF-1. I valori sono espressi come MEDIA \pm SEM. $R^2 = 0,0659$; $P = NS$

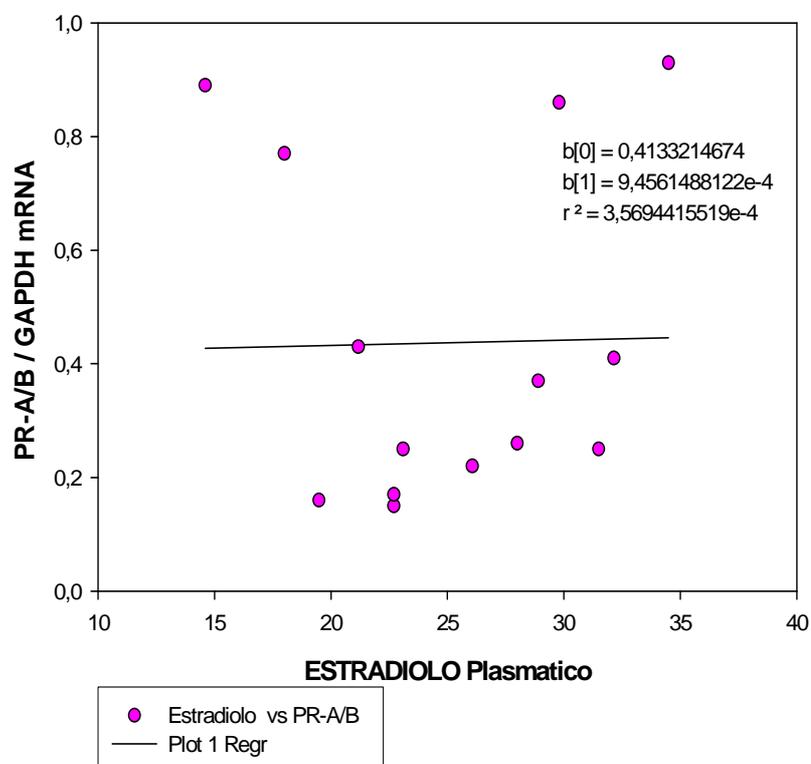


FIGURA 3.16. Correlazione tra i livelli plasmatici di estradiolo e l'espressione leucocitaria di PR-A/B nelle donne in post-menopausa con livelli normali di IGF-1. I valori sono espressi come MEDIA \pm SEM. $R^2 = 3,5694e^{-4}$; $P = NS$

STUDIO NELL'ANIMALE**4. ANALISI DELLA VARIAZIONE DEL PESO CORPOREO IN RATTO IN TRATTAMENTO CON TERAPIA ORMONALE SOSTITUTIVA**

In seguito ad ovariectomia si riscontrava un aumento significativo del peso corporeo degli animali ovariectomizzati, che ricevevano il veicolo, rispetto ai controlli intatti; il trattamento estrogenico sostitutivo con 17- β -estradiolo manteneva il peso corporeo dei ratti più basso, seppure non perfettamente comparabile a quello del gruppo intatto (Fig. 4.1 e Tab 5.1.).

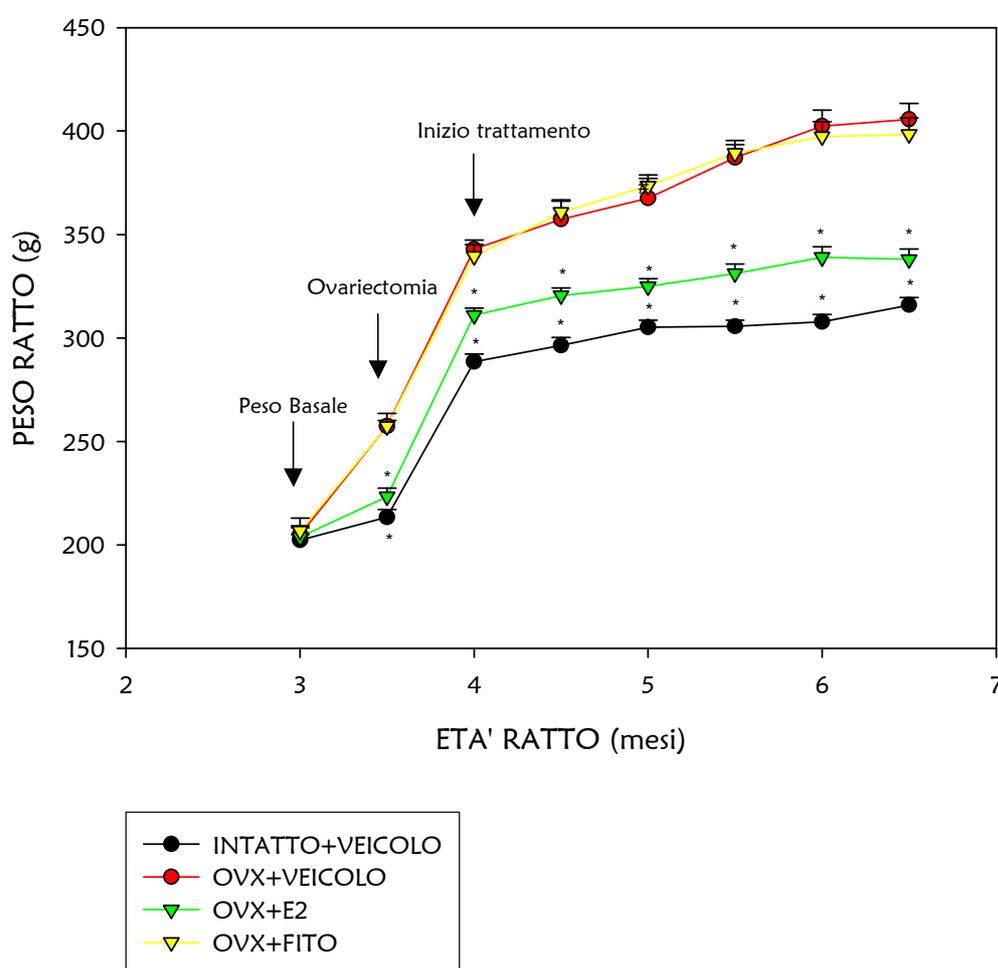


FIGURA 4.1. Effetto dell'ovariectomia e del trattamento ormonale sostitutivo sul peso corporeo di ratte intatte, ovariectomizzate (OVX), ovariectomizzate trattate con 17- β -estradiolo (OVX+E2) ed ovariectomizzate trattate con fitoestrogeni (OVX+FITO). I dati sono espressi come media \pm SEM di 10-12 animali per gruppo. * $P < 0.001$ vs OVX ed OVX+FITO.

5. ANALISI DELLA VARIAZIONE DEL PESO DELL'UTERO IN RATTO IN TRATTAMENTO CON TERAPIA ORMONALE SOSTITUTIVA

Come atteso, gli animali ovariectomizzati trattati con veicolo presentavano uteri atrofici del peso pari a circa un terzo rispetto a quanto osservato nei controlli (Tab. 5.1.). Ad una prima analisi di tipo visivo il trattamento estrogenico sostitutivo con 17- β -estradiolo riportava alla normalità il peso degli uteri nei ratti ovariectomizzati, mentre il fitoestrogeno era inefficace (Fig. 5.1).

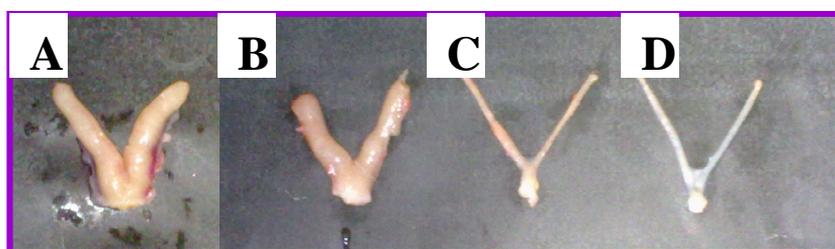


FIGURA 5.1. Effetto dell'ovariectomia e del trattamento ormonale sostitutivo sul peso dell'utero di ratte intatte, ovariectomizzate (OVX), ovariectomizzate trattate con 17- β -estradiolo (OVX+E2) ed ovariectomizzate trattate con fitoestrogeni (OVX+FITO). *A* = intatto + veicolo; *B* = OVX + E2; *C* = OVX + fito; *D* = OVX + veicolo

Effettuate le pesate, veniva riconfermato il dato, ma tale ripristino del peso dell'utero da parte dell'estradiolo, risultava solo parziale (Fig. 5.2)

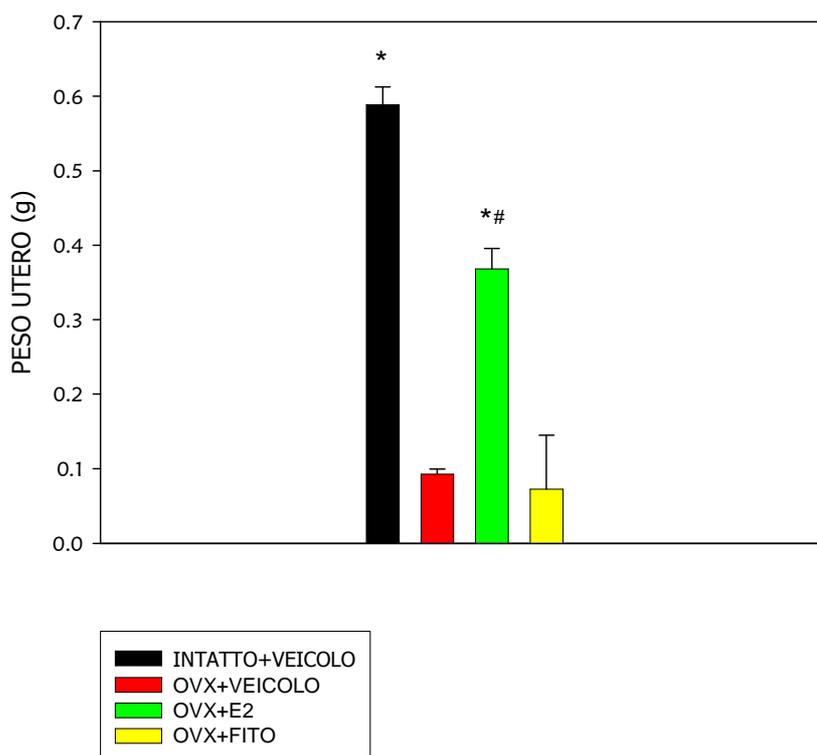


FIGURA 5.2. Effetto dell'ovariectomia e del trattamento ormonale sostitutivo sul peso dell'utero di ratti intatti, ovariectomizzati (OVX), ovariectomizzati trattati con 17- β -estradiolo (OVX+E2) od ovariectomizzati trattati con fitoestrogeni (OVX+FITO). I dati sono espressi come media \pm SEM di 10-12 animali per gruppo. * P<0.001 vs OVX ed OVX+FITO; # P<0.05 vs intatto+veicolo.

Gruppo	Peso animali(g)	Peso utero(g)
INTATTO+VEICOLO	316 \pm 3,71	0,62 \pm 0,04
OVX+VEICOLO	419 \pm 8,37	0,09 \pm 0,01
OVX+E2	348 \pm 5,63	0,37 \pm 0,03
OVX+FITO	412 \pm 8,81	0,07 \pm 0,01

TABELLA 5.1. Effetto dell'ovariectomia e del trattamento estrogenico sostitutivo per 4 mesi sul peso corporeo e degli uteri di ratte intatte, ovariectomizzate (OVX), ovariectomizzate trattate con 17- β -estradiolo (OVX+E2) ed ovariectomizzate trattate con fitoestrogeni (OVX+FITO). I dati sono espressi come media \pm SEM di 10-12 animali per gruppo.

6. ANALISI DELLA STRUTTURA OSSEA FEMORALE IN RATTO IN TRATTAMENTO CON TERAPIA ORMONALE SOSTITUTIVA

Come atteso, a livello del femore considerato *in toto*, l'ovariectomia influiva negativamente sulla densità minerale ossea (BMD), con una differenza statisticamente significativa rispetto al gruppo controllo intatto (ovariectomia + veicolo, 312 \pm 3.7 mg/cm² vs intatto + veicolo, 346 \pm 3.5 mg/cm²; P<0.05). La terapia sostitutiva, al contrario, evitava che l'animale andasse incontro alla perdita ossea, ripristinando livelli paragonabili a quelli del gruppo intatto

(ovariectomia + 17- β -estradiolo, 337 ± 3.6 mg/cm² vs ovariectomia + veicolo, 312 ± 3.7 mg/cm²; $P < 0.001$). Il trattamento con il fitoestrogeno non era in grado di ovviare alla perdita ossea ovarioectomia-dipendente. (ovariectomia + fitoestrogeno, 316 ± 5.5 mg/cm² vs ovariectomia + veicolo, 312 ± 3.7 mg/cm²; $P = \text{NS}$) (Fig. 6.1.)

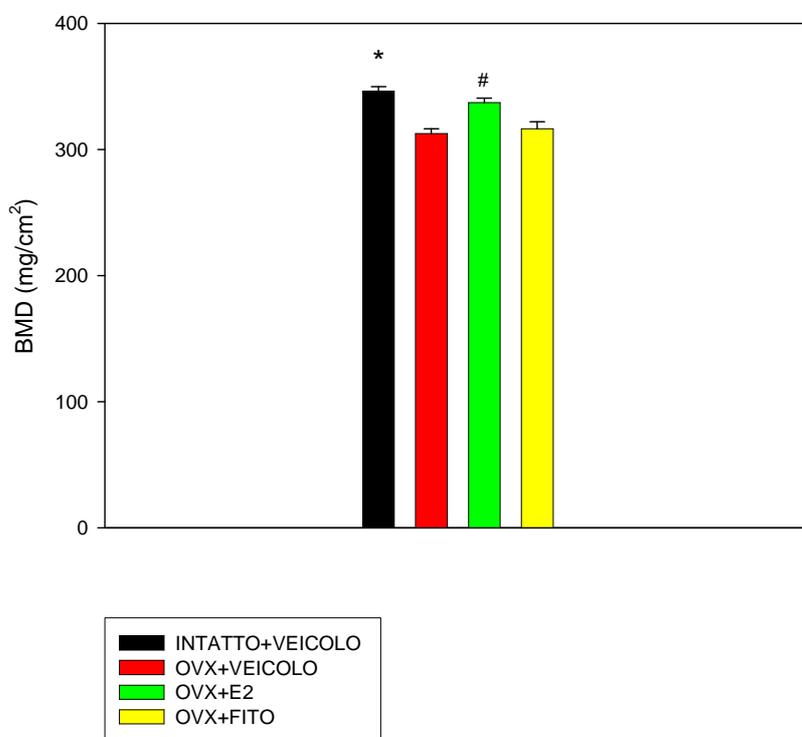


FIGURA 6.1. Effetto dell'ovariectomia e del trattamento ormonale sostitutivo sulla BMD in ratte intatte, ovariectomizzate (OVX), ovariectomizzate trattate con 17- β -estradiolo (OVX+E2) ed ovariectomizzate trattate con fitoestrogeni (OVX+FITO). I dati sono espressi come media \pm SEM di 6 animali per gruppo. * $P < 0.001$ vs OVX; # $P < 0.05$ vs OVX.

A livello della metafisi la BMD si riduceva negli animali ovariectomizzati in modo molto evidente e significativo rispetto al gruppo controllo intatto (ovariectomia + veicolo, 239 ± 3.5 mg/cm² vs intatto + veicolo, 304 ± 10.1 mg/cm²; $P < 0.001$). Di nuovo il trattamento con il 17- β -estradiolo manteneva i valori di BMD a livello normale (ovariectomia + 17- β -estradiolo, 267 ± 6.1 mg/cm² vs ovariectomia + veicolo, 239 ± 3.5 mg/cm²; $P < 0.001$), mentre la terapia sostitutiva con fitoestrogeno si dimostrava, ancora una volta, inefficace. (ovariectomia + fitoestrogeno, 239 ± 4.6 mg/cm² vs ovariectomia + veicolo, 239 ± 3.5 mg/cm²; $P = \text{NS}$) (Fig. 6.2.)

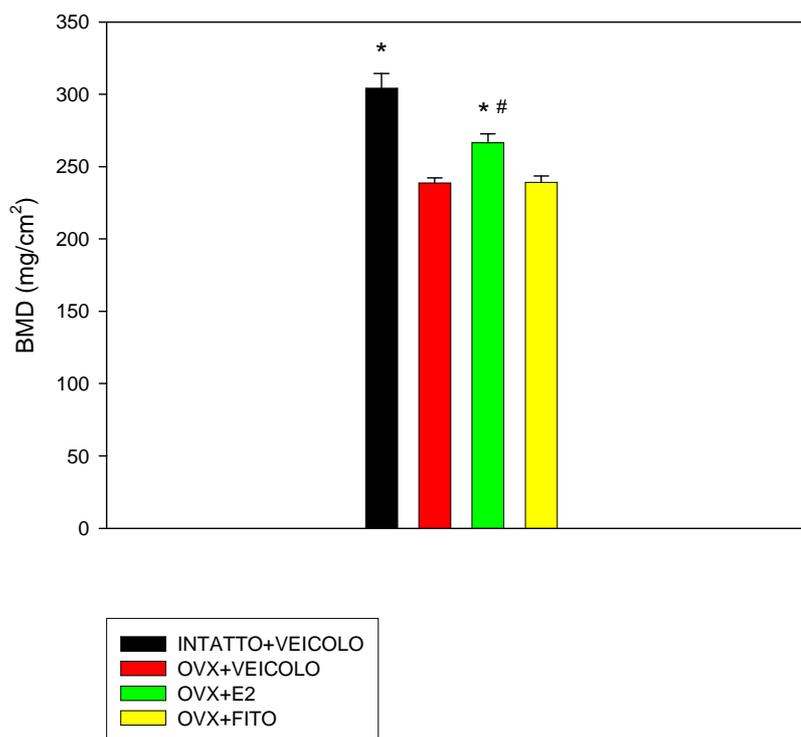


FIGURA 6.2. Effetto dell'ovariectomia e del trattamento ormonale sostitutivo sulla BMD in ratte intatte, ovariectomizzate (OVX), ovariectomizzate trattate con 17- β -estradiolo (OVX+E2) ed ovariectomizzate trattate con fitoestrogeni (OVX+FITO). I dati sono espressi come media \pm SEM di 6 animali per gruppo. * $P < 0.001$ vs OVX; # $P < 0.05$ vs intatto.

A livello della diafisi, infine, l'ovariectomia riduceva la BMD, sebbene in modo non più significativo, rispetto al gruppo intatto (ovariectomia + veicolo, 340 ± 2.2 mg/cm² vs intatto + veicolo, 355 ± 5.4 mg/cm²; $P = \text{NS}$). Questa volta il trattamento con il 17- β -estradiolo riusciva ad evitare solo in parte, seppure in modo significativo, la perdita di densità minerale ossea, non riportando la BMD di questi animali a livello di quella del gruppo degli intatti (ovariectomia + 17- β -estradiolo, 361 ± 4.8 mg/cm² vs, ovariectomia + veicolo, 340 ± 2.2 mg/cm²; $P < 0.05$). Anche in questo caso il fitoestrogeno di per sé non era in grado di ovviare alla perdita in BMD (ovariectomia + fitoestrogeno, 340 ± 6.6 mg/cm² vs ovariectomia + veicolo, 340 ± 2.2 mg/cm²; $P = \text{NS}$) (Fig. 6.3.).

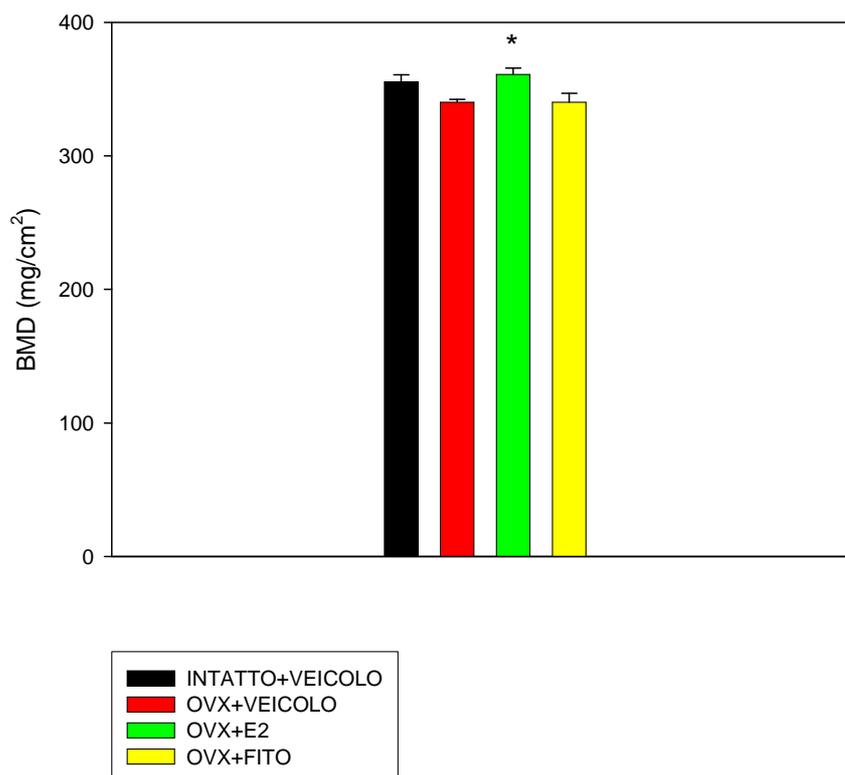


FIGURA 6.3. Effetto dell'ovariectomia e del trattamento ormonale sostitutivo sulla BMD in ratte intatte, ovariectomizzate (OVX), ovariectomizzate trattate con 17- β -estradiolo (OVX+E2) ed ovariectomizzate trattate con fitoestrogeni (OVX+FITO). I dati sono espressi come media \pm SEM di 6 animali per gruppo. * $P < 0.05$ vs OVX.

7. ESPRESSIONE CEREBRALE E LEUCOCITARIA DI CD36 IN RATTO IN TRATTAMENTO CON TERAPIA ORMONALE SOSTITUTIVA

Espressione genica di CD36 a livello della corteccia frontotemporale e dell'ippocampo di ratto

A livello cortico-frontotemporale l'ovariectomia riduceva significativamente i livelli di CD36 rispetto al gruppo controllo intatto (ovariectomia + veicolo, $8.77 \times 10^5 \pm 9.4 \times 10^6$ vs intatto + veicolo, $1.10 \times 10^4 \pm 1.5 \times 10^5$; $P < 0.05$) Solo il trattamento con estradiolo ripristinava i livelli di CD36 (ovariectomia + 17- β -estradiolo, $1.2 \times 10^4 \pm 1.3 \times 10^5$ vs intatto + veicolo, $1.10 \times 10^4 \pm 1.5 \times 10^5$; $P < 0.05$); il trattamento con fitoestrogeno, infatti, risultava inefficace (ovariectomia + fitoestrogeno, $7.00 \times 10^5 \pm 8.4 \times 10^5$ vs intatto + veicolo, $1.10 \times 10^4 \pm 1.5 \times 10^5$; $P = \text{NS}$) (Fig. 7.1.).

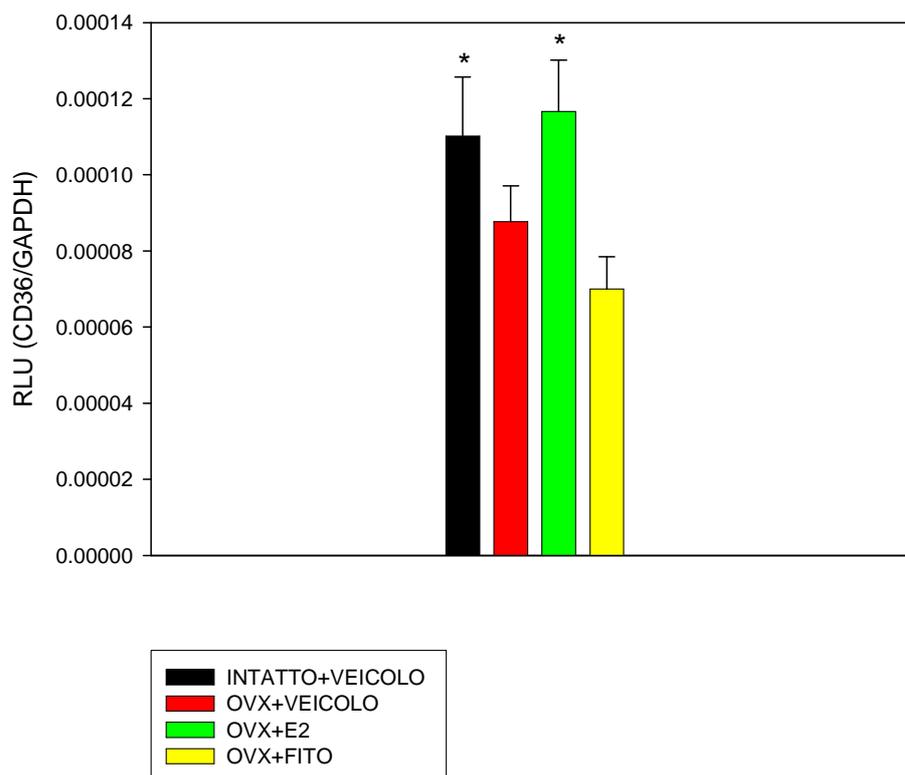


FIGURA 7.1. Espressione cortico-frontotemporale di CD36 mRNA in ratte intatte, ovariectomizzate (OVX), ovariectomizzate trattate con 17- β -estradiolo (OVX+E2) ed ovariectomizzate trattate con fitoestrogeni (OVX+FITO). I valori sono espressi come MEDIA \pm SEM di 10-12 animali per gruppo. * $P < 0.05$ vs OVX.

A livello ippocampale l'andamento si presentava simile a quello corticale, con livelli significativamente ridotti di CD36 nel gruppo dei ratti ovariectomizzati (ovariectomia + veicolo, $1.50 \times 10^4 \pm 2.82 \times 10^5$ vs intatto + veicolo, $1.7 \times 10^4 \pm 3.5 \times 10^5$; $P < 0.05$) e livelli di CD36 ripristinati in modo significativo con la terapia sostitutiva con estradiolo (ovariectomia + 17- β -estradiolo, $1.8 \times 10^4 \pm 4.0 \times 10^5$ vs intatto + veicolo, $1.7 \times 10^4 \pm 3.5 \times 10^5$; $P < 0.05$). Di nuovo il trattamento con fitoestrogeni non mostrava alcuna efficacia (ovariectomia + fitoestrogeno, $1.30 \times 10^4 \pm 2.9 \times 10^5$ vs intatto + veicolo, $1.7 \times 10^4 \pm 3.5 \times 10^5$; $P = \text{NS}$) (Fig. 7.2.).

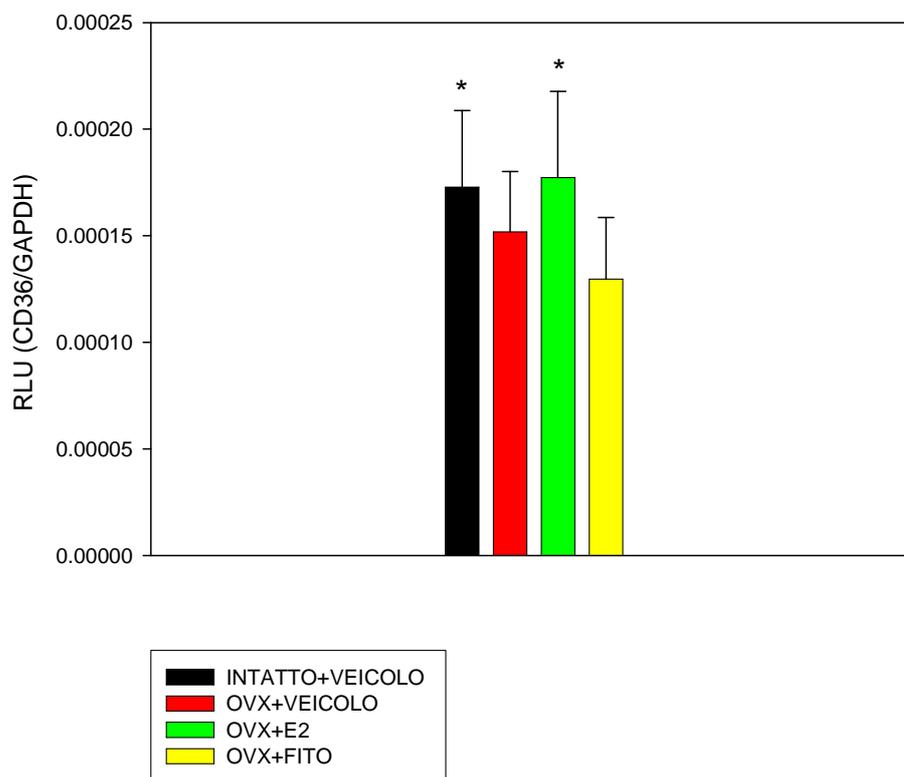


FIGURA 7.2. Espressione ippocampale di CD36 mRNA in ratte intatte, ovariectomizzate (OVX), ovariectomizzate trattate con 17- β -estradiolo (OVX+E2) ed ovariectomizzate trattate con fitoestrogeni (OVX+FITO). I valori sono espressi come MEDIA \pm SEM di 10-12 animali per gruppo. * P<0.05 vs OVX.

Espressione di mRNA di CD36 in leucociti isolati da milza di ratto

A livello leucocitario non si osservava alcuna differenza statisticamente significativa tra i 4 gruppi sperimentali (ovariectomia + veicolo, 0.070 ± 0.01 ; ovariectomia + 17- β -estradiolo, 0.066 ± 0.00 ; ovariectomia + fitoestrogeno, 0.084 ± 0.01 vs intatto + veicolo, 0.050 ± 0.01 ; P = NS in tutti i casi; Fig. 7.3.)

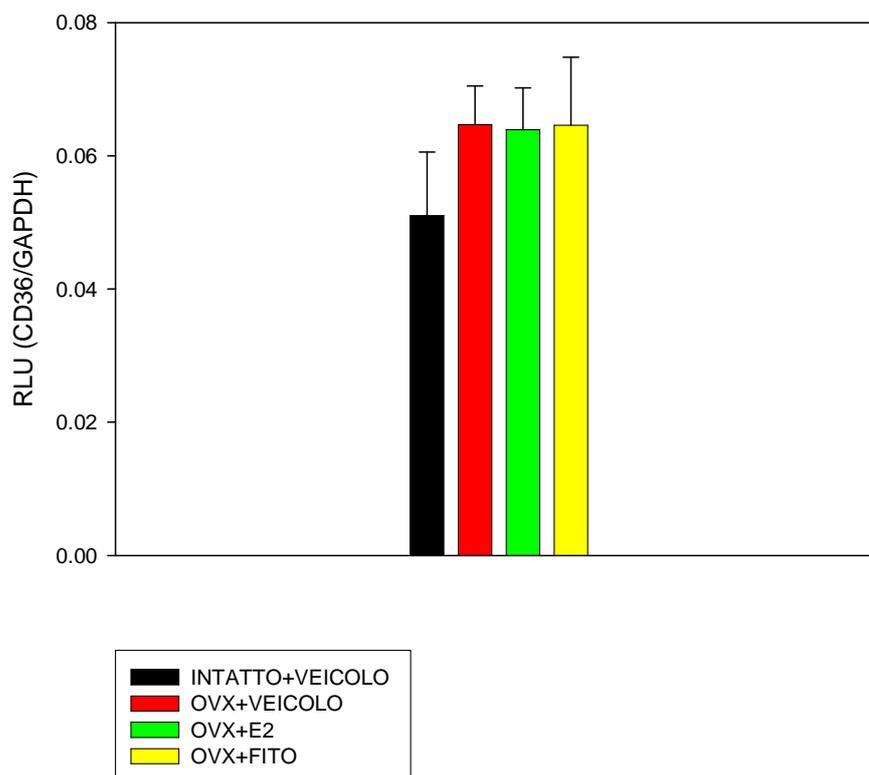


FIGURA 7.3. Espressione leucocitaria di CD36 mRNA in ratte intatte, ovariectomizzate (OVX), ovariectomizzate trattate con 17- β -estradiolo (OVX+E2) ed ovariectomizzate trattate con fitoestrogeni (OVX+FITO). I valori sono espressi come MEDIA \pm SEM di 10-12 animali per gruppo. P = NS.

Espressione proteica cerebrale di CD36, GFAP e Ferritina

Le colorazioni con ematossilina ed eosina non rivelavano alcuna differenza a livello macroscopico fra i cervelli dei 4 diversi gruppi sperimentali (Fig.7.4.).

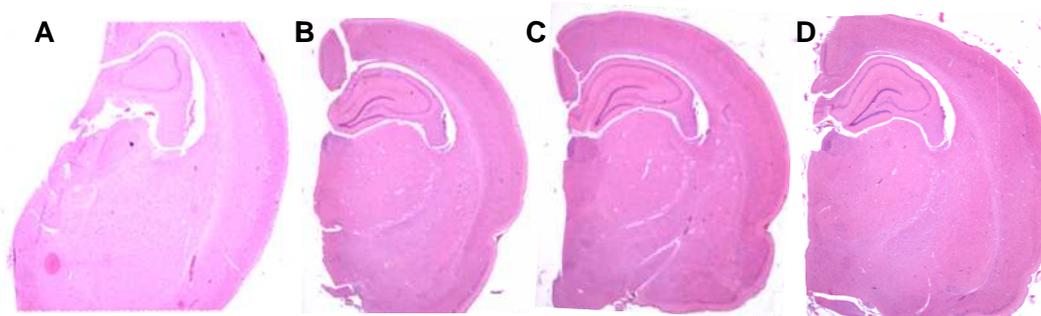


FIGURA 7.4. Colorazione con ematossilina-eosina di cervelli di ratte intatte, ovariectomizzate (OVX), ovariectomizzate trattate con 17- β -estradiolo (OVX+E2) ed ovariectomizzate trattate con fitoestrogeni (OVX+FITO). Ingrandimento 1x. A = intatto + veicolo; B = OVX + E2; C = OVX + fito; D = OVX + veicolo.

L'espressione proteica di CD36 risultava bassa già nel gruppo di controllo intatto e tendeva a formare dei *clusters*, ovvero una sorta di ammassi densamente colorati attorno ai vasi (Figg. 7.5, 7.6).

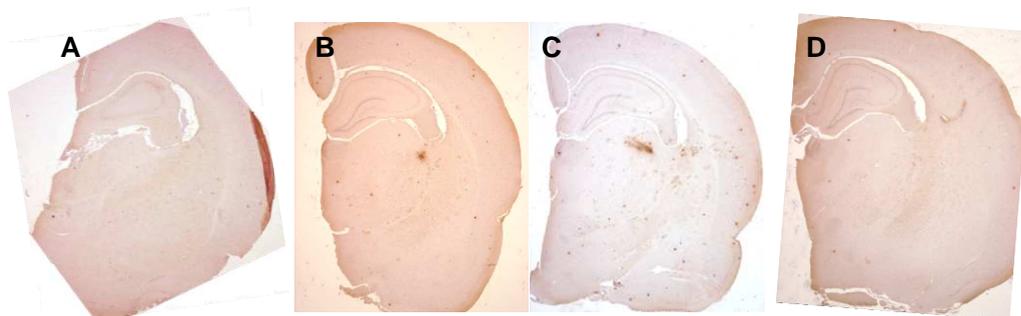


FIGURA 7.5. Colorazione immunohistochimica per CD36 in ratte intatte, ovariectomizzate (OVX), ovariectomizzate trattate con 17- β -estradiolo (OVX+E2) ed ovariectomizzate trattate con fitoestrogeni (OVX+FITO). Ingrandimento 1x. A = intatto + veicolo; B = OVX + E2; C = OVX + fito; D = OVX + veicolo.

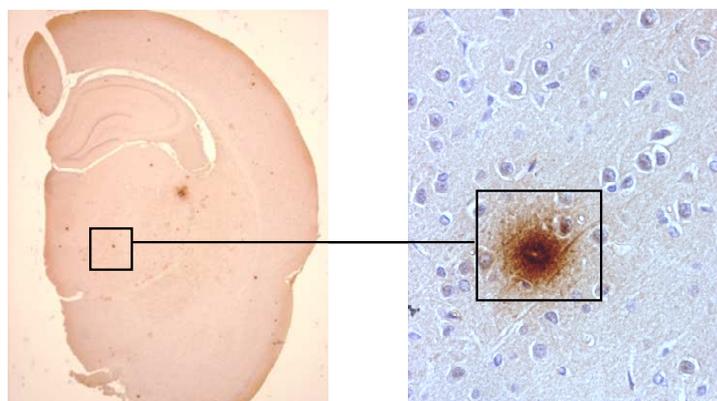


FIGURA 7.6. Immagine di *cluster* colorato immunohistochimicamente con CD36 a minore (1x) ed a maggiore ingrandimento (40x).

Non si evidenziavano differenze significative nei livelli di CD36 tra i diversi gruppi di trattamento, né a livello di numero di cellule CD36 positive, né a livello di numero di *clusters* (Fig. 7.7.).

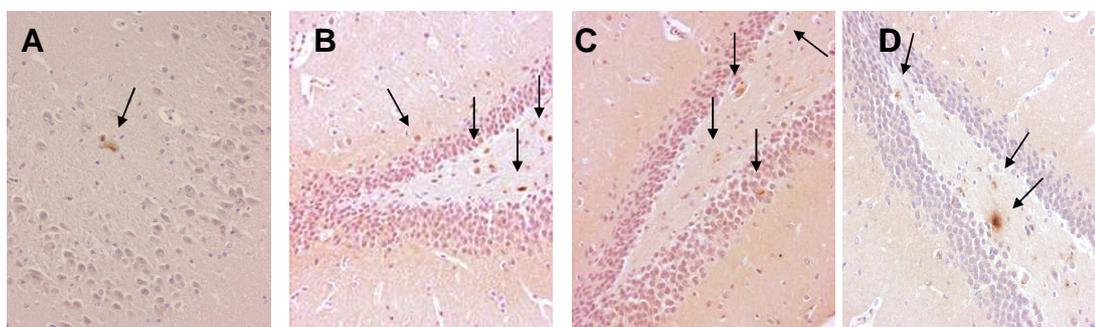


FIGURA 7.7. Colorazione immunohistochimica per CD36 in ratte intatte, ovariectomizzate (OVX), ovariectomizzate trattate con 17- β -estradiolo (OVX+E2) ed ovariectomizzate trattate con fitoestrogeni (OVX+FITO). Ingrandimento 20x. A = intatto + veicolo; B = OVX + E2; C = OVX + fito; D = OVX + veicolo.

Come atteso, trattandosi di animali di circa 10 mesi di età al momento del sacrificio, in tutti i cervelli si presentava un forte stato di gliosi, come evidenziato dalla colorazione con GFAP, che evidenzia la popolazione astrocitaria, senza, però, differenze tra i vari gruppi sperimentali (Fig. 7.8.).

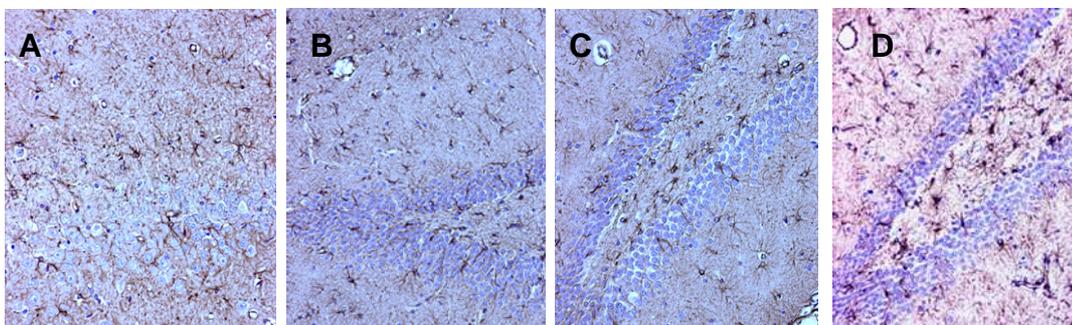


FIGURA 7.8. Colorazione immunohistochemica per GFAP in ratte intatte, ovariectomizzate (OVX), ovariectomizzate trattate con 17- β -estradiolo (OVX+E2) ed ovariectomizzate trattate con fitoestrogeni (OVX+FITO). Ingrandimento 20x. A = intatto + veicolo; B = OVX + E2; C = OVX + fito; D = OVX + veicolo.

Infine la colorazione con ferritina si presentava simile a quella per CD36, riconfermando che CD36 marca le cellule a carattere istiocitario, sebbene i due quadri non fossero sovrapponibili, poiché CD36 marca anche le cellule endoteliali, a differenza della ferritina (Fig. 7.9.).

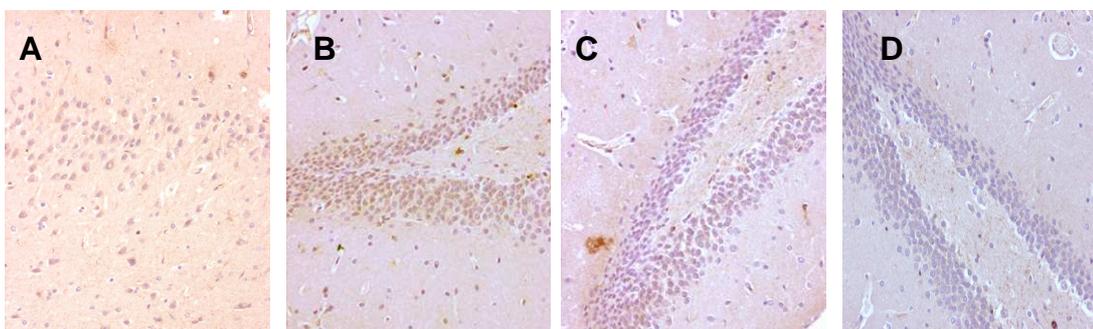


FIGURA 7.9. Colorazione immunohistochemica per Ferritina in ratte intatte, ovariectomizzate (OVX), ovariectomizzate trattate con 17- β -estradiolo (OVX+E2) ed ovariectomizzate trattate con fitoestrogeni (OVX+FITO). Ingrandimento 20x. A = intatto + veicolo; B = OVX + E2; C = OVX + fito; D = OVX + veicolo.

8. LIVELLI PLASMATICI DI ESTRADIOLO IN RATTO

Come atteso si assisteva ad un brusco crollo dei livelli di 17- β -estradiolo nel gruppo dei ratti ovariectomizzati e lo stesso accadeva in quello dei ratti in terapia ormonale con fitoestrogeni rispetto ai controlli intatti; al contrario nel gruppo dei ratti trattati con l'estrogeno, l'ipoestrogenismo ovariectomia-indotto veniva contrastato dall'estrogeno somministrato esogenamente.

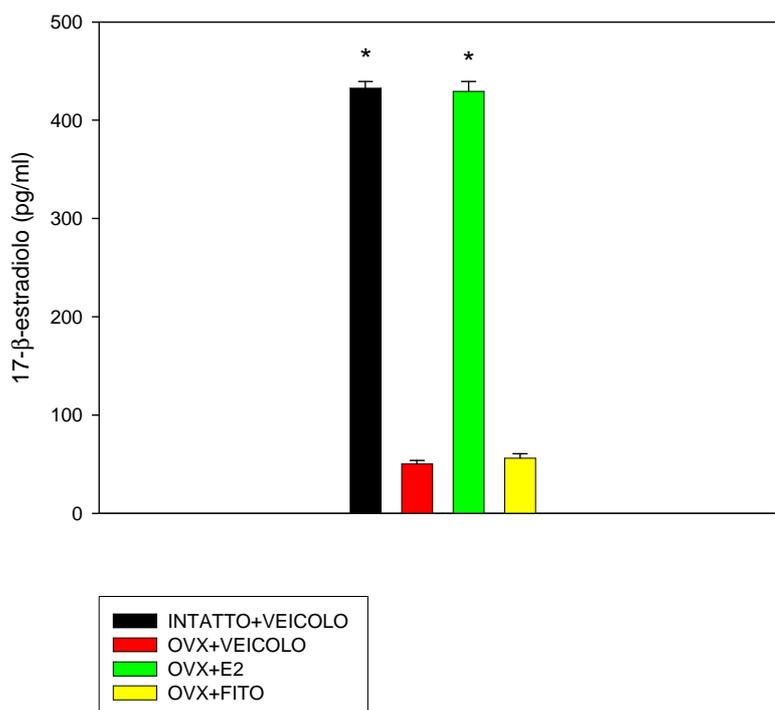


FIGURA 8.1. Livelli plasmatici di 17-β-estradiolo in ratte intatte, ovariectomizzate (OVX), ovariectomizzate trattate con 17-β-estradiolo (OVX+E2) ed ovariectomizzate trattate con fitoestrogeni (OVX+FITO). I valori sono espressi come MEDIA ± SEM di 10-12 animali per gruppo. P<0.05 vs OVX.

9. ESPRESSIONE CEREBRALE E LEUCOCITARIA DI CD36 IN TOPO

APP23

Espressione genica di CD36 a livello della corteccia frontotemporale e dell'ippocampo di topo APP23

A livello della corteccia frontotemporale si osservava un andamento bifasico dei livelli di CD36, con una fase iniziale crescente fino al picco massimo del gruppo di topi di 6 mesi di età e poi valori che si riducevano senza, però, ritornare ai livelli basali (Fig. 9.1.).

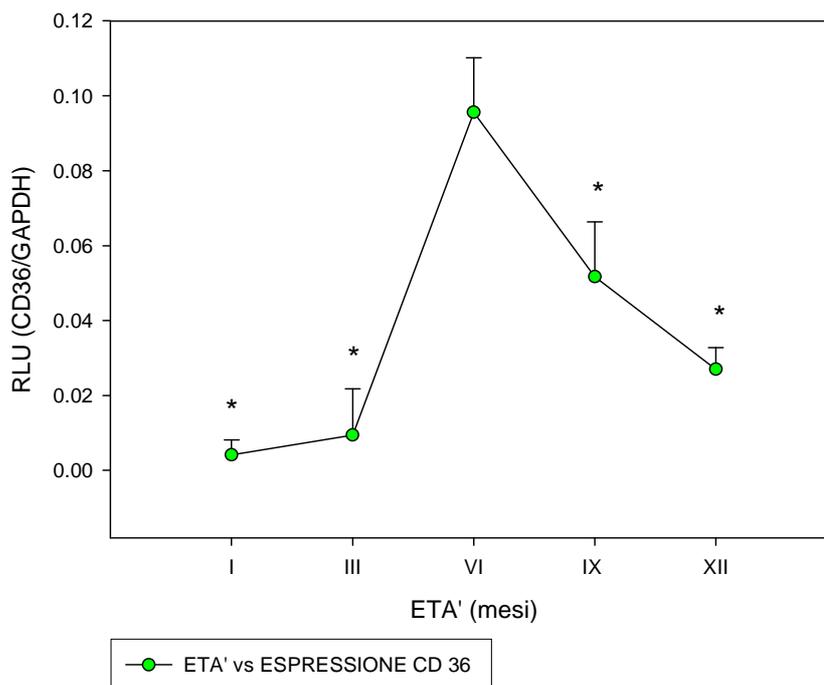


FIGURA 9.1. Espressione di CD36 mRNA nella corteccia fronto-temporale di topi APP23 di 1, 3, 6, 9, e 12 mesi di età. I dati sono espressi come MEDIA \pm SEM di 5 animali per gruppo. *P<0.05 vs VI° mese.

A livello dell'ippocampo si ripeteva un andamento simile a quello cortico-frontale, con un picco massimo di espressione di CD36 in topi di 6 mesi di età e poi valori che si riducevano senza tornare a quelli basali (Fig. 9.2.).

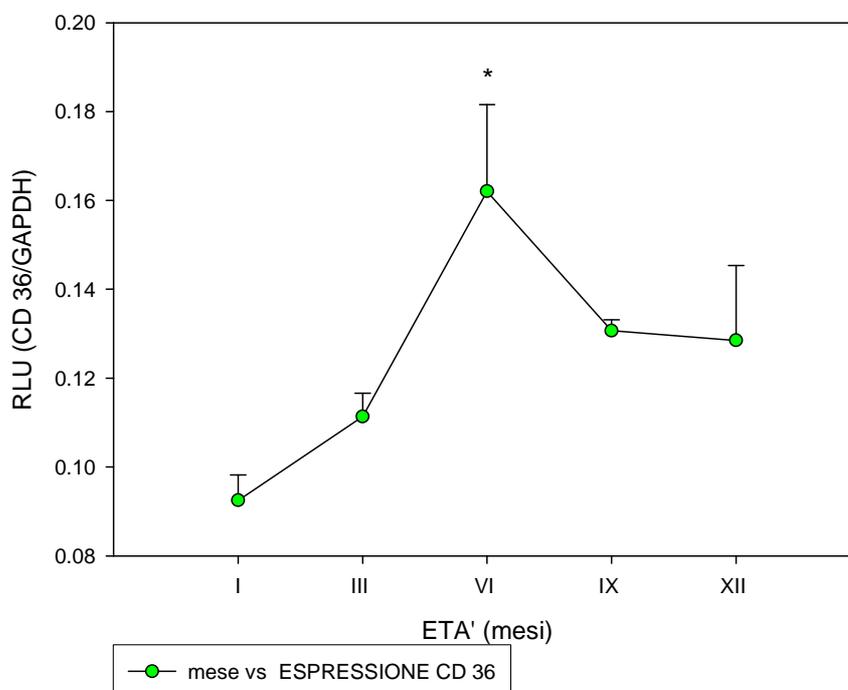


FIGURA 9.2. Espressione di CD36 mRNA nell'ippocampo di topi APP23 di 1, 3, 6, 9, e 12 mesi di età. I dati sono espressi come MEDIA \pm SEM di 5 animali per gruppo. *P<0.05 vs I° mese.

Espressione genica di CD36 in leucociti isolati da milza di topo APP23

A livello leucocitario CD36 risultava maggiormente espresso nei primi mesi di vita di questi topi e si riduceva con l'aumentare dell'età, fino ad un minimo attorno ai 9 mesi di età. Nei topi più anziani (12 mesi) si assisteva ad un aumento, seppur non significativo, di CD36 (Fig. 9.3.).

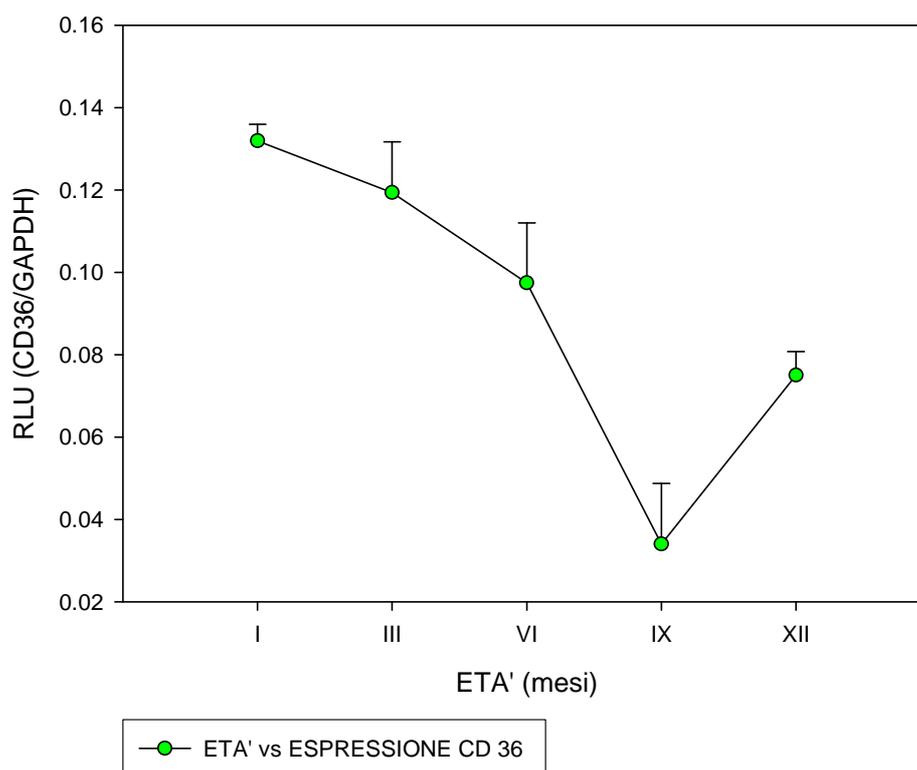


FIGURA 9.3. Espressione di CD36 mRNA nei leucociti di topi APP23 di 1, 3, 6, 9, e 12 mesi di età. I dati sono espressi come MEDIA \pm SEM di 5 animali per gruppo. P = NS

Espressione proteica cerebrale di CD36 in topo APP23

I dati immunocistochimici riconfermavano quelli ottenuti con PCR Real-Time. L'espressione di CD36 risultava essere marcatamente aumentata nei topi di 6 mesi di età, mentre era quasi assente in topi giovani. I topi vecchi mostravano una marcatura positiva per CD36, sebbene più ridotta rispetto ai topi al sesto mese di età. In particolare, a 3 mesi si osservavano sporadiche cellule in posizione prevalentemente attorno alle cellule epidendimali e perivascolari (Fig. 9.4.).

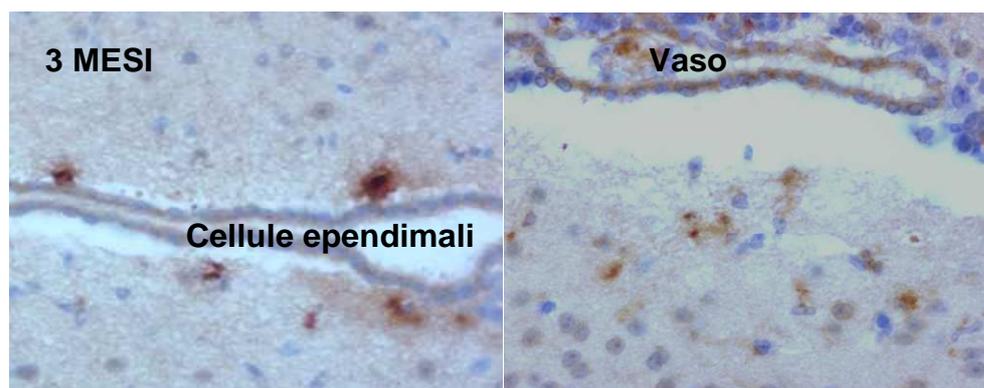


FIGURA 9.4. Colorazione immunohistochimica con CD36 in topi APP23 di 3 mesi di età.

A 6 mesi, invece, si aveva la massima espressione di CD36; permaneva e si intensificava quella attorno ai ventricoli, ma compariva positività corticale, sia sparsa che in forma di noduli, ed intensa positività nella circonvoluzione para-ippocampale (Fig. 9.5.).

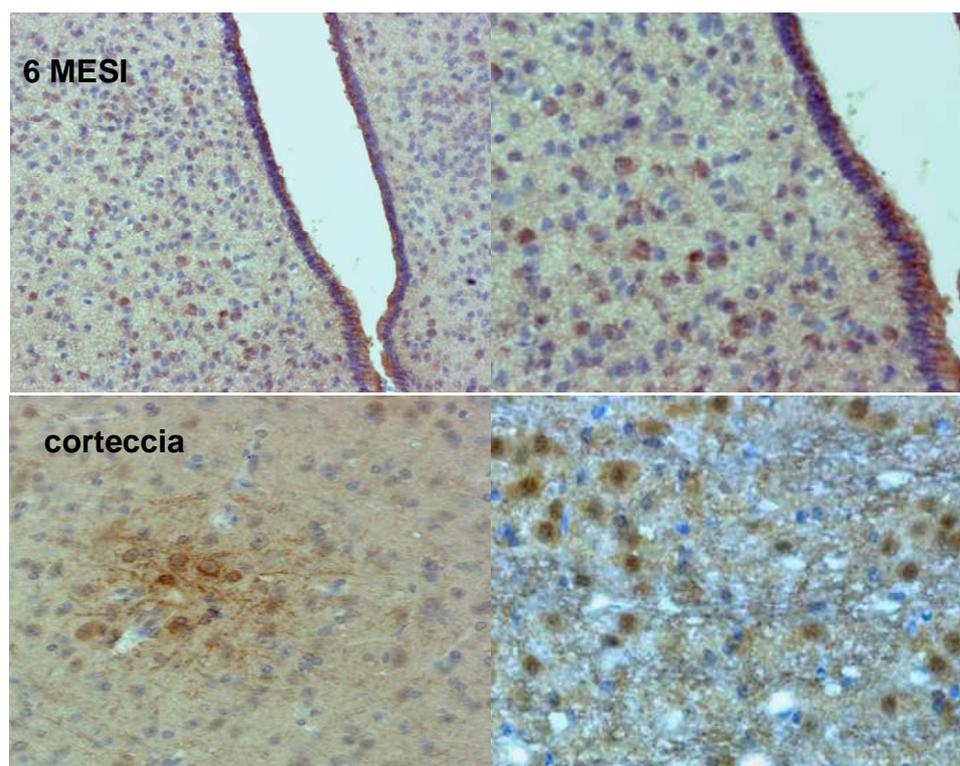


FIGURA 9.5. Colorazione immunohistochimica con CD36 in topi APP23 di 6 mesi di età.

In topi di 9 mesi di età permaneva modesta positività corticale ed in quelli di 12 mesi la positività si manteneva ridotta e simile a quella dei 3 mesi (Fig. 9.6).

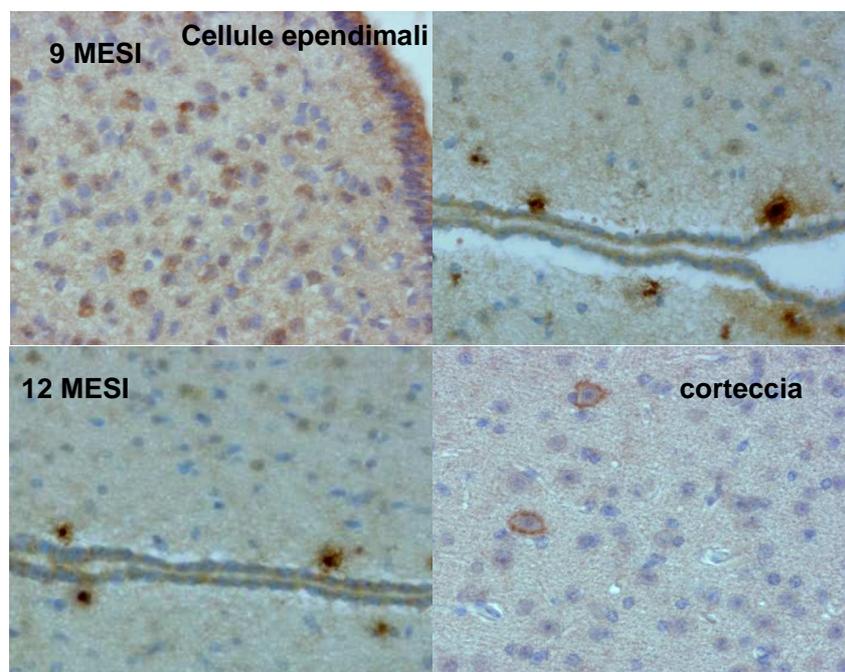


FIGURA 9.6. Colorazione immunoistochimica con CD36 in topi APP23 di 9 e di 12 mesi di età.

Correlazione tra espressione proteica cerebrale di CD36 e deposizione di placche di β -amiloide in topo APP23

Come atteso, le prime placche a livello corticale erano ven visibili, seppur sporadiche, attorno ai 9 mesi di età. A 12 mesi le placche si intensificavano, ma non si osservava alcuna co-localizzazione tra quest'ultime e l'espressione di CD36 (Fig. 9.7.).

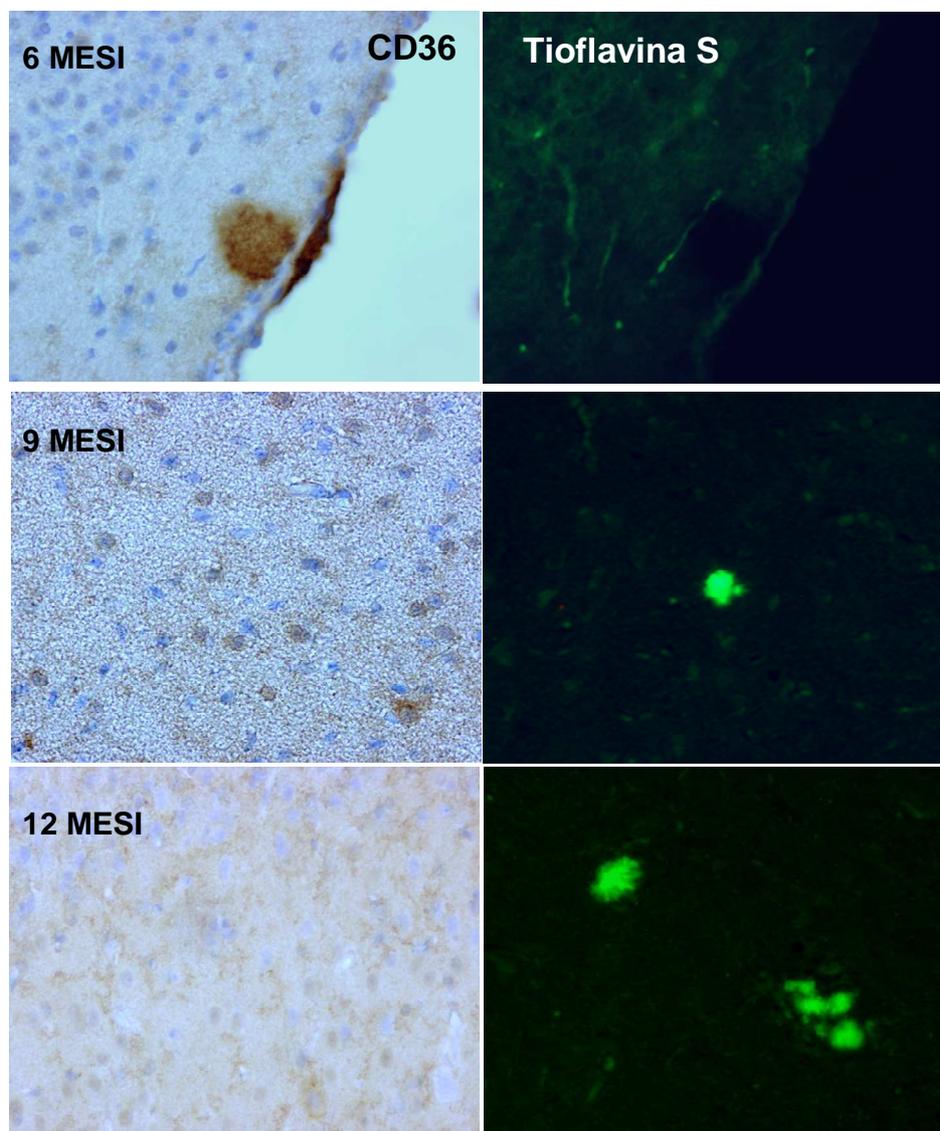


FIGURA 9.7. Colorazione immunistochemica con CD36 e tioflavina S in topi APP23 di 6, 9 e 12 mesi di età.

10. ESPRESSIONE GENICA DI CD36 IN CELLULE N9

L'espressione di CD36 veniva significativamente ridotta in seguito a trattamento con TNF- α . Il trattamento con estrogeni risultava essere tempo-dipendente: l'effetto del TNF- α sembrava revertito, anche se solo in parte, solo da un trattamento preventivo con 17- β -estradiolo (E2 prima di TNF- α). Inefficace, al contrario, risultava essere un trattamento simultaneo (E2+TNF- α) o tardivo (E2 dopo TNF- α) con estrogeno. Il trattamento con il solo estrogeno di per sé non mostrava alcun effetto sull'espressione di CD36.

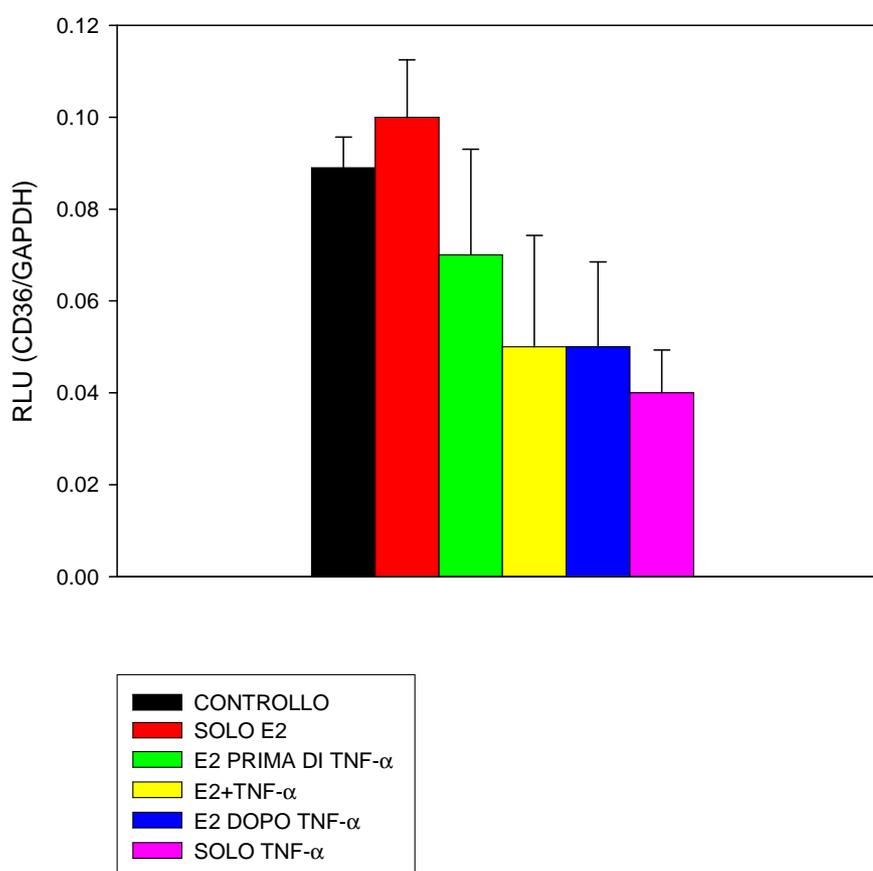


FIGURA 10.1. Espressione di CD36 mRNA in microglia murina N9 trattata con 17- β -estradiolo o TNF- α . Il 17- β -estradiolo è stato somministrato 8 ore prima, 8 ore dopo oppure insieme al TNF- α . Le cellule sono state sottoposte a danno da parte di TNF- α *overnight*. I valori sono espressi come MEDIA \pm SEM di 10-12 animali per gruppo. P = NS.

DISCUSSIONE

1. DISCUSSIONE

Con il progressivo aumento dell'età media della popolazione le patologie dementigene, in particolare la patologia di Alzheimer (AD), stanno diventando un problema sempre più rilevante per la salute pubblica, sia da un punto di vista sociale che economico, in tutto il mondo ed, in particolare, nei paesi industrializzati. Molti sono stati gli studi condotti al fine di comprendere meglio la neurodegenerazione e, tra questi, uno studio in particolare si è occupato di indagare se esistesse una differenza di genere nel rischio di ammalarsi di demenza: è stata unanimemente riconosciuta la maggior incidenza nella donna. Questo ha portato la comunità scientifica a focalizzare una maggior attenzione sulle variazioni ormonali, che interessano la donna durante il periodo di ingresso in menopausa e durante la menopausa stessa, periodo coincidente anche con la comparsa di eventi neurodegenerativi.

Dal punto di vista ormonale si individuano tre fasi al termine della vita fertile della donna: la pre-menopausa, caratterizzata da un'alterazione dei modulatori ormonali, prodotti dall'ipotalamo, che stimolano l'ipofisi; la perimenopausa, durante la quale aumentano progressivamente gli ormoni ipofisari che stimolano le ovaie e diminuiscono i due ormoni femminili tipici, l'estradiolo ed il progesterone; la postmenopausa, infine, durante la quale compare un altro ormone, l'estrone, e hanno il sopravvento gli ormoni androgeni prodotti da ovaie e surrene.

Esistono in letteratura numerosi studi che assegnano all'estradiolo una funzione neuroprotettiva ed altrettanto interessanti sono le evidenze di una cooperazione tra estradiolo e progesterone nel mediare un'azione riparatrice contro numerosi insulti neurotossici. E' stata documentata anche una cross-regolazione (*cross-talk*) dei recettori degli estrogeni (ERs) e del fattore di crescita insulino.dipendente (IGF-1R) in alcune aree del SNC. Durante lo sviluppo del SNC, IGF-1 promuove la sopravvivenza e la differenziazione di specifiche popolazioni neuronali, mentre nel SNC adulto, esso è un neuromodulatore, che regola la plasticità sinaptica, ed è coinvolto nelle risposte del tessuto neuronale ad insulti neurodegenerativi.

Il presente lavoro di tesi si è proposto di verificare l'esistenza di alterazioni dell'espressione leucocitaria di diversi parametri biochimici correlati con l'AD, quali il recettore *scavenger* CD36, i recettori per gli estrogeni, ER- α ed ER- β , il recettore per il progesterone PR-A/B, il recettore di IGF-1 (IGF-1R), la citochina IL-6 ed altri parametri plasmatici specifici, quali estradiolo, progesterone ed IGF-1. L'obbiettivo era di identificare una possibile correlazione tra il quadro neuroendocrino e la neurodegenerazione, in modo particolare analizzando quella decade di età corrispondente alla transizione menopausale, al fine di verificare se tale

fenomeno potesse originare un *milieu* ormonale in cui i fattori proneurotossici predominano rispetto a quelli neuroprotettivi.

Nessuno dei parametri biologici studiati era associato con l'età ad eccezione dei livelli plasmatici di estradiolo e progesterone nella donna e di IGF-1 in entrambi i sessi. Tuttavia tutte le alterazioni potenzialmente proneurotossiche trovate nelle donne non dementi nella fase perimenopausale, come la drastica diminuzione dei livelli di espressione leucocitaria di CD36 e dei livelli circolanti di estradiolo e progesterone, e l'aumentata espressione di IL-6, non erano più presenti nelle fasce d'età più estreme della popolazione femminile. Questa osservazione conferma l'ipotesi che la grande prevalenza di AD nella popolazione anziana non è un effetto diretto dell'aumento dell'età, ma, molto probabilmente, dipende dalla presenza di fattori di rischio per AD, che emergono solo in presenza di possibili eventi scatenanti età-dipendenti. A sostegno di questa ipotesi vi sono studi epidemiologici (su incidenza e prevalenza di AD), che dimostrano che in gruppi di età molto avanzata l'incidenza di AD si porta a valori pari a zero o, comunque, mostra una tendenza a diminuire.

I fattori di rischio per AD, che sono stati riconosciuti avere un ruolo marcatamente determinante, sono le mutazioni in entrambe le due proteine adibite alla formazione del peptide A β : presenilina-1 e 2, fenomeni di stress ossidativo, alterazioni nel metabolismo degli ioni metallici e fenomeni di infiammazione cronica. Tuttavia, una semplice perturbazione di uno o più di questi elementi, in singole cellule neuronali in coltura e in modelli animali non determina i molteplici cambiamenti biochimici e cellulari riscontrati nella patologia.

Queste osservazioni e l'elevata incidenza di AD inducono a ritenere che la brusca caduta del tasso estrogenico abbia un ruolo importante nella genesi di fenomeni di neurodegenerazione nella popolazione femminile.

La transizione menopausale è caratterizzata da una diminuzione dell'attività e dell'efficacia regolatoria dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi (HPG), questo potrebbe rappresentare la causa di una iperespressione dei recettori per gli estrogeni riscontrata dall'analisi dei profili di espressione leucocitaria nella donna in perimenopausa (*up-regulation* recettoriale).

Un fenomeno simile è stato descritto nell'ipofisi di ratto (Schreihofner *et al.*, 2000) e nel cervello di topo (Chakraborty *et al.*, 2005) in seguito all'induzione di alterazioni dell'asse gonadico. Si potrebbe presupporre che l'espressione dei recettori per gli estrogeni sia uno di quegli eventi scatenanti la neurodegenerazione; tuttavia, vi sono scarse informazioni riguardo ai processi che regolano l'espressione di ER- α e di ER- β nella menopausa.

Nell'uomo l'espressione di entrambe le isoforme ER- α ed ER- β non diminuisce con l'età ed, inoltre, si verifica un mantenimento migliore, rispetto alla donna, della produzione di steroidi con l'avanzare dell'età. Generalmente, negli uomini anziani è possibile trovare livelli normali di testosterone (Vermeulen *et al.*, 1996; Beth *et al.*, 2005); tuttavia i livelli circolanti di estradiolo e progesterone negli uomini sono stati trovati simili a quelli delle donne in postmenopausa e con un andamento stabile.

Nel presente lavoro di tesi i pazienti AD presentavano livelli di estradiolo e progesterone plasmatici simili a quelli riscontrati in individui di pari età e sesso non dementi; lo stesso comportamento si osservava per i recettori degli estrogeni e del progesterone. Questo dimostra che non vi è una diretta relazione con la malattia per questi parametri e che, quindi, le alterazioni a carico dell'asse HPG risultano età-correlate e non come conseguenza della demenza o una sua possibile causa.

Nel presente studio un'osservazione interessante è rappresentata dagli aumentati livelli plasmatici di IGF-1 nei soggetti AD rispetto ai soggetti controllo di pari età e sesso. Il dato è sorprendente in quanto fisiologicamente IGF-1 tende a diminuire con l'avanzare dell'età nella donna e nell'uomo non dementi, come è stato riscontrato in questo studio; tale fenomeno rientra nel quadro meglio noto come somatopausa, che consiste in una ridotta produzione dell'ormone somatotropo e, quindi, anche dei mediatori dell'azione somatotropa, ovvero le somatomedine, note anche come fattori di crescita insulino-simili (IGF), peptidi prodotti principalmente dal fegato.

Nonostante organi come encefalo e midollo spinale siano responsabili della sintesi locale di IGF-1 nel SNC (Armstrong *et al.*, 2000), tale peptide si dimostra in grado di attraversare la barriera emato-encefalica (Reindhardt *et al.*, 1994) attraverso un meccanismo di trasporto attivo. Pertanto, variazioni dei livelli plasmatici di IGF-1 si ripercuotono sulla sua disponibilità a livello cerebrale e, quindi, possono influenzare le funzioni di questo fattore neurotrofico a livello del tessuto nervoso. In linea con quanto detto, la causa degli aumentati livelli di IGF-1 in AD potrebbe riflettere la risposta compensatoria dell'organismo alla perdita di responsività ad IGF-1 del tessuto neuronale, che risulta alterato dai processi neurodegenerativi.

Tale fenomeno di resistenza al segnale di IGF-1 è stato ipotizzato anche da altri ricercatori, che hanno riscontrato alterazioni metaboliche, consistenti in un' inadeguata utilizzazione del glucosio ed in una compromissione del metabolismo energetico, con caratteristiche molto simili a quelle del diabete mellito di tipo 2 (Hoyer S, 2000). Tale tipo di diabete è la forma più

comune di diabete ed è caratterizzato da insensibilità dei tessuti periferici all'azione dell'insulina (insulino-resistenza); questo fenomeno è in parte mediato da una *down-regulation* dell'espressione dei recettori per l'insulina, da una riduzione nell'attività dei recettori tirosin-chinasici e dell'enzima PI3K, e da una ridotta espressione delle molecole IRS. A questo riguardo, è interessante ricordare l'esistenza di un aumentato rischio di AD in soggetti diabetici portatori dell'allele ApoE4 rispetto ad individui con il solo polimorfismo nel gene di ApoE: nelle biopsie *post-mortem* di tali individui si rilevano livelli significativamente più elevati di depositi di A β e NFT (Messier, 2003).

Dai risultati ottenuti nel presente studio l'ipotesi di una resistenza in AD si basa non solo su un aumento nei livelli circolanti di IGF-1, ma anche su un' *up-regulation* del recettore IGF-1R; la sua espressione risulta, infatti, significativamente aumentata nei leucociti dei pazienti AD rispetto alla popolazione controllo di pari età, nella quale l'espressione di IGF-1R diminuiva con il progredire dell'età.

I dati ottenuti per i livelli di IGF-1 e l'espressione leucocitaria del suo recettore suggeriscono che, di fronte ai meccanismi neurodegenerativi che si instaurano in AD, primo fra tutti l'accumulo del peptide A β neurotossico, l'organismo cerchi di riparare a tali lesioni innalzando i livelli di fattori neuroprotettivi tra cui IGF-1, che, in esperimenti *in vitro* su neuroni ippocampali, si dimostra coinvolto nella risposta del tessuto contro il peptide A β (Dore *et al.*, 1997). La perdita di sensibilità all'azione di IGF-1 è, probabilmente, associata ad una disfunzione della cascata di trasduzione del segnale attivata dal fattore neurotrofico, dal momento che l'espressione di IGF-1R è aumentata.

Tale ipotesi è avvalorata da studi *post-mortem* in pazienti AD, che rivelano una riduzione dei livelli di attività dei recettori tirosin-chinasici rispetto ad individui controllo (Frolich *et al.*, 1999); inoltre, si è dimostrato in esperimenti *in vitro* che l'inadeguato segnale di IGF-1, dovuto ad una ridotta attivazione di PI3K ed Akt, determina un'iperfosforilazione di tau, proteina citoscheletrica che si ritrova nei NFTs, riscontrabili, insieme alle placche senili, in AD (Schubert *et al.*, 2003; Schubert *et al.*, 2004).

Nel presente lavoro di tesi si è osservato che nella donna il decremento fisiologico dei livelli del fattore neurotrofico IGF-1 si manifesta in modo più marcato e precoce rispetto al genere maschile; tale dato depone, ancora una volta, a favore dell'ipotesi che, durante la menopausa, si instauri un quadro neuroendocrino favorente la neurodegenerazione, che coinvolge l'azione sinergica di numerosi fattori, come estrogeni ed IGF-1. In base ai nostri risultati, in corrispondenza della menopausa si assiste ad una perdita delle funzioni endocrine dell'asse

HPG, con riduzione dei livelli di estradiolo e progesterone, cui si accompagna un significativo decremento fisiologico dei livelli di IGF-1, con esordio più precoce rispetto all'uomo e che raggiunge il culmine nella fascia di transizione menopausale.

Numerosi sono i lavori che dimostrano l'esistenza di un'interazione tra estrogeni ed IGF-1 nei meccanismi di neuroprotezione, che potrebbe sottendere un possibile coinvolgimento dei due fattori in AD. Tali effetti neuroprotettivi e neuromodulatori degli estrogeni si esplicano, in parte, tramite l'attivazione del gene di PR-A/B, che presenta nel promotore un elemento responsivo per gli estrogeni.

E' stato proposto, inoltre, che alcune azioni trofiche e plastiche dell'estradiolo sul tessuto nervoso siano mediate dall'attivazione del segnale di IGF-1; in specifiche popolazioni neuronali gli estrogeni regolano l'espressione di alcuni fattori neurotrofici, tra cui BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*; Singh *et al.*, 1995) e NGF (*nerve growth factor*; Gibbs *et al.*, 1994). In aggiunta, gli estrogeni esercitano azioni neuronali "rapide" od extra-nucleari attraverso l'attivazione di segnali intracellulari mediati da MAPK (Singh *et al.*, 1999) e da PI3K (Honda *et al.*, 2000), o tramite la modulazione dei livelli di calcio intracellulari (Mermelstein *et al.*, 1996). Tutti questi effetti ormonali rappresentano potenziali punti di convergenza tra il segnale degli estrogeni e di IGF-1. In modo analogo in modelli sperimentali di neurodegenerazione indotta da acido kainico, è stato dimostrato che l'attivazione di ER risulta necessaria per spiegare l'azione neuroprotettiva di IGF-1, la quale viene abolita dopo trattamento con antagonisti di ER (Azcoitia *et al.*, 1999).

Nel presente studio, la popolazione femminile pre- e post-menopausale è stata suddivisa nei gruppi con livelli di IGF-1 normali o ridotti, secondo un *cut-off* predefinito. Nella popolazione pre-menopausale con livelli normali di IGF-1, le concentrazioni plasmatiche di estradiolo risultano positivamente correlate con l'espressione di PR-A/B; tale correlazione si perdeva considerando, nella stessa popolazione, il gruppo con livelli ridotti di IGF-1. L'assenza di correlazione positiva tra livelli di estradiolo ed espressione di PR-A/B si ripresenta nella popolazione post-menopausale in entrambi i gruppi, con livelli normali o ridotti di IGF-1.

Dal momento che nel primo caso considerato (donne in pre-menopausa con livelli normali di IGF-1) non si è ancora verificata la caratteristica caduta dei livelli di estrogeni e di IGF-1 età-correlata, la regolazione del gene di PR-A/B da parte degli estrogeni è mantenuta intatta, come atteso. Considerando l'espressione di PR-A/B come indice di un'adeguata attività degli estrogeni, la perdita di correlazione tra PR-A/B ed estrogeni nella donna in perimenopausa con ridotti livelli di IGF-1 suggerisce che, nonostante l'esistenza di un asse gonadico intatto,

senza un'adeguata attività somatotropa (IGF-1), gli effetti ormonali e, quindi, neuroprotettivi esercitati dagli estrogeni vengano compromessi.

Nella condizione post-menopausale, come atteso, la drastica riduzione dei livelli di estrogeni si accompagna ad una ridotta espressione di PR-A/B; il fatto che non sussista una differenza del parametro valutato nel gruppo con livelli normali o ridotti di IGF-1, suggerisce che lo stato ipoestrogenico rende inefficace l'azione di IGF-1 sull'attivazione di ER e sulla conseguente espressione di PR-A/B.

Dai risultati ottenuti si osserva che estrogeni ed IGF-1 cooperano nel promuovere l'espressione del gene di PR-A/B e, dato ancora più importante, i due parametri necessitano l'uno dell'altro nell'esercitare tale funzione. Dal momento che il gene di PR-A/B risulta sotto stretta regolazione degli estrogeni, i dati ottenuti si spiegano attraverso una convergenza del segnale di IGF-1 sull'attività degli estrogeni e dei relativi recettori; i possibili meccanismi molecolari sono molteplici, tuttavia, si potrebbe ipotizzare che l'azione degli estrogeni utilizzi elementi appartenenti alla via di trasduzione del segnale di IGF-1.

Dati interessanti derivano anche dal confronto dell'espressione di CD36 tra la popolazione controllo e quella AD: in entrambi l'espressione del recettore *scavenger* risultava significativamente diminuita nel paziente AD rispetto al soggetto controllo, sia giovane che anziano.

Le cellule microgliali esprimono un'ampia gamma di recettori capaci di riconoscere e legare le forme fibrillari e non del peptide A β in condizioni sia fisiologiche che patologiche (Rodrigo A *et al.*, 2005). Tali recettori includono i recettori *scavenger* di tipo A (SR-A) e di tipo B (SR-B), tra cui il CD36, i quali mediano, rispettivamente, l'adesione e l'endocitosi delle fibrille di A β da parte della microglia e degli astrociti (El Koury *et al.*, 1996; Coraci *et al.*, 2002). In particolare CD36 partecipa alla secrezione di numerose molecole proinfiammatorie, tra cui le specie reattive dell'ossigeno, le citochine e l'ossido nitrico (Coraci *et al.*, 2002); in corso di AD l'esposizione persistente della microglia al peptide A β evoca una risposta infiammatoria cronica, che gioca un ruolo fondamentale nella degenerazione neuronale; per tali motivi Coraci e colleghi (2002) ipotizzano un coinvolgimento di CD36 nella patogenesi e progressione di AD.

Un'attenta analisi dei risultati ottenuti nel presente lavoro di tesi rivela che, mentre nella popolazione maschile l'espressione di CD36 mostra un andamento costante e regolare nelle diverse decadi di età, nella donna il profilo di espressione di CD36 subisce un brusco declino nella fascia d'età peri- e post-menopausale, per poi ritornare a valori normali nell'ultima

decade di età analizzata (81-90); nella finestra di transizione menopausale il livello di espressione leucocitaria del recettore è assimilabile a quello riscontrato nei pazienti AD.

La variazione significativa di CD36 nella popolazione AD rispetto a quella controllo, unitamente all'osservazione che tale riduzione si ritrova già nei pazienti con decadimento cognitivo lieve (MCI) (Giunta *et al.*, 2007), conferisce a questo parametro un valore predittivo per la AD abbastanza elevato. Pertanto, CD36 potrebbe essere utilizzato come *marker* precoce di malattia, nel riconoscimento diagnostico del paziente con disturbi cognitivi (MCI e AD). La riduzione di CD36 nella donna in peri-menopausa, che non ha sviluppato ancora un decadimento cognitivo clinicamente evidente, è presumibilmente solo temporanea: le donne che supereranno felicemente la fase peri-menopausale (fattori neuroprotettivi prevalenti su quelli neurotossici), torneranno a esprimere livelli normali di CD36.

Recenti lavori suggeriscono che i processi infiammatori giochino un ruolo rilevante in AD. A sostegno di questo argomento, è stato scoperto che nella corteccia e nel *liquor* di pazienti AD risultano incrementati i livelli di una serie di molecole proinfiammatorie, tra cui proteine del complemento, citochine (soprattutto IL-1, IL-6 e TNF- α) e chemochine e loro recettori. Nei processi infiammatori cronici, che conducono a morte neuronale, un ruolo essenziale è svolto dalla microglia. L'attivazione persistente della microglia derivante dalla cronica esposizione ai depositi di β -amiloide determina il rilascio da parte di essa di numerose molecole proinfiammatorie, tra cui radicali liberi dell'ossigeno, ossido nitrico e diverse citochine proinfiammatorie tra cui IL-6 e TNF- α .

Un dato interessante è emerso nel presente studio dalla determinazione dei livelli leucocitari di IL-6 nelle donne, suddivise in diverse decadi di età. Si è dimostrato come i livelli di IL-6, con l'ingresso in menopausa, aumentano in modo significativo rispetto ai soggetti di età differenti; pertanto, IL-6 potrebbe promuovere l'azione degli eventi scatenanti la neurodegenerazione. Si ritiene, quindi, che la fase di transizione menopausale sia un periodo critico anche in relazione alle attività infiammatorie mediata da specifiche citochine proinfiammatorie, tra cui IL-6.

Ulteriori studi saranno necessari per verificare l'efficacia della terapia ormonale sostitutiva in AD. Yue e colleghi (2005) hanno dimostrato che, in topi APP23, riconosciuti come valido modello sperimentale di AD, la carenza di estrogeno a livello cerebrale determina un aumento della produzione e deposizione di A β , indicando, quindi, che la carenza di estrogeni a livello cerebrale è un fattore di rischio per lo sviluppo dell'AD. Attualmente, i dati presenti in letteratura a riguardo sono contrastanti: vengono, infatti, attribuiti alla HRT sia la capacità di aumentare l'incidenza di AD sia un effetto neuroprotettivo. Le possibili cause di queste

discrepanze vengono attribuite ai differenti periodi in cui la HRT veniva somministrata nel corso di questi studi. Infatti, anche il recente *trial* WHIMS (i cui risultati indicano che il rischio di demenza aumenterebbe significativamente nelle donne in post-menopausa sottoposte ad HRT) non può essere considerato conclusivo, poiché il campionamento ha riguardato solo donne di età superiore a 65 anni. Secondo alcuni studi esisterebbe un “periodo finestra”, legato in particolare al periodo della transizione menopausale, in cui la HRT potrebbe dare effetti positivi, ma oltre il quale la terapia non è più efficace, ma diventa addirittura potenzialmente negativa. Si ritiene che la fase peri-menopausale sia il momento più appropriato in quanto essa è caratterizzata da un assetto endocrino migliore rispetto alla fase post-menopausale, in cui gli scompensi ormonali e la conseguente disregolazione dell’asse gonadico rendono più difficile l’azione farmacologica della HRT. I risultati ottenuti nello studio *in vitro* con la microglia murina N9, sembrerebbero suggellare questa ipotesi: il trattamento con estrogeni sembrerebbe, infatti, essere tempo-dipendente. Il trattamento con il 17- β -estradiolo, infatti, è in grado di contrastare, seppur in modo non completo, la riduzione di CD36 indotta da TNF- α , solo quando somministrato precocemente. Questo ruolo protettivo viene perso quando l’estradiolo viene somministrato simultaneamente o dopo TNF- α . E’ importante ricordare che molte specie reattive dell’ossigeno e citochine pro-infiammatorie, tra cui TNF- α , sono state trovate iperesprese a livello cerebrale sia in pazienti con AD che in topi con patologia AD-simile (Akiyama *et al.*, 2000, Jimenez *et al.*, 2008) Il TNF- α è una delle maggiori citochine prodotte dalla microglia in risposta alla stimolazione da parte di A β ed è in grado di ridurre l’espressione di CD36, contribuendo, così alla neurodegenerazione. (Hickman *et al.*, 2008). E’ interessante osservare che la riduzione del rischio di AD nelle donne in post-menopausa sembra legata all’utilizzo pregresso di estrogeni e non all’assunzione presente (Zandi *et al.*, 2002). Pertanto, nelle fasi precoci della menopausa, la HRT potrebbe essere in grado di esercitare un’azione neuroprotettiva.

Dal momento che si è dimostrato che l’attivazione di alcuni geni richiede l’azione sinergica e contemporanea di estrogeni ed IGF-1, è plausibile ritenere che HRT eserciti azione neuroprotettiva solo se somministrata in un organismo con una intatta funzione somatotropa: sarebbe il caso delle donne in perimenopausa con livelli normali di IGF-1.

Sebbene siano necessari ulteriori studi per approfondire le complesse interazioni tra le azioni di fattori come estrogeni ed IGF-1, i risultati del presente studio evidenziano l’opportunità di effettuare una caratterizzazione del profilo endocrino femminile prima della somministrazione di HRT. Tale caratterizzazione sarebbe efficace se eseguita prima dell’entrata in menopausa, dal momento che in tale periodo si verificano variazioni endocrine (espressione di ERs, PR-

A/B) che scompaiono nel periodo successivo a causa di un naturale riassetto del profilo endocrino. L'identificazione, al momento dell'analisi, di eventuali fattori di rischio (come livelli ridotti di IGF-1), che potrebbero compromettere l'esito positivo di HRT, fornirebbe indicazioni sull'opportunità di intervenire con terapie farmacologiche mirate a ripristinare un profilo endocrino più vicino a quello fisiologico e, quindi, più responsivo a HRT. Riconsiderando il potenziale coinvolgimento della resistenza per IGF-1 nelle fasi precoci del processo neurodegenerativo in AD, sembra ragionevole ritenere che il mantenimento di un equilibrio tra estrogeni ed IGF-1 sia un valido strumento per prevenire i meccanismi neurodegenerativi, che si instaurano in corso di AD.

I dati discordanti sugli effetti degli estrogeni nella HRT, negli ultimi anni hanno spinto molti ricercatori a studiare la relazione tra l'assunzione di soia e le malattie legate all'entrata della donna in menopausa. In particolare, la minor frequenza di fratture ossee di tipo osteoporotico, di malattie cardiovascolari, di sintomi post-menopausali e di certe forme tumorali nelle popolazioni asiatiche rispetto a quelle occidentali (Adlercreutz e Mazur, 1997) ha concentrato l'attenzione sull'uso dei fitoestrogeni (derivati dalla soia) nella HRT.

In realtà i dati ottenuti nel nostro modello di menopausa indotta chirurgicamente, non sembrano avvalorare l'ipotesi di un utilizzo dei fitoestrogeni in sostituzione degli estrogeni. Infatti, in tutte le indagini effettuate, i risultati ottenuti per il gruppo delle ovariectomizzate + veicolo erano sostanzialmente sovrapponibili a quelli ottenuti per il gruppo delle ovariectomizzate + fitoestrogeno. È noto che il 40% delle donne in menopausa va incontro ad un aumento di peso; questo stesso dato si ripropone nel modello di animale ovariectomizzato + veicolo, che risulta sovrapponibile a quello in terapia con fitoestrogeni. Questo non stupisce particolarmente, perché anche i dati in letteratura sono molto controversi. (Gardner *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2006; Allison *et al.*, 2003; Yamashita *et al.*, 1998; Anderson and Hoie, 2005; Li *et al.*, 2005; Hall *et al.*, 2006; Ikeda *et al.*, 2006; Anderson *et al.*, 2007).

Per quanto riguarda il peso dell'utero, è noto che gli effetti dell'estradiolo sull'utero di ratto sono assai evidenti, tanto che in poche ore, dopo una singola somministrazione, esso risulta aumentato, soprattutto a causa di un'aumentata permeabilità vascolare, dovuta, a sua volta, ad una stimolazione acuta dell'espressione genica e proteica di alcuni fattori di crescita, come VEGF (*vascular endothelial growth factor*), di IGF-1 e di HbEGF (*heparin binding epidermal growth factor*; Cullinan-Bove e Koos, 1993) Nell'animale ovariectomizzato in terapia estrogenica questo effetto era ben visibile, tanto da essere sovrapponibile al controllo (intatto + veicolo), avvalorando l'idea di aver utilizzato una dose efficace di estradiolo.

Anche per quanto riguarda l'osso esistono dati discordanti in letteratura; l'utilizzo di ratti ovariectomizzati è riconosciuto come buon modello di studio per l'osteoporosi, dal momento che essi condividono molte caratteristiche cliniche con la perdita ossea umana post-menopausale (Kalu, 1991; Thorndike e Turner, 1998). L'effetto degli isoflavoni sulla massa ossea sembra essere dose-dipendente: bassi dosi di genisteina, infatti, sembrano essere protettive, mentre le dosi più alte risultano avere un effetto avverso, accelerando, addirittura, l'osteoporosi. (Anderson *et al.*, 1998).

E' noto che la menopausa nella donna causa carenza a livello soprattutto della parte trabecolare dell'osso (metafisi; Wehrly *et al.*, 2008). Come atteso la terapia ormonale sostitutiva con estrogeno è in grado di bloccare l'effetto di distruzione ossea indotto dall'ovariectomia. La presenza, però, di una differenza statisticamente significativa tra questo gruppo ed il gruppo controllo intatto, potrebbe far sembrare ad una terapia sostitutiva non del tutto adeguata: probabilmente prolungare leggermente la durata della terapia avrebbe sortito migliore effetto, sebbene sia importante ricordare che, per quanto efficiente, si tratta pur sempre di un sistema in terapia farmacologica e non di un sistema fisiologico. L'assenza di una differenza statisticamente significativa tra ratto controllo intatto e ratto ovariectomizzato + veicolo a livello diafisario, è giustificabile in considerazione del fatto che a livello della diafisi la carenza ossea menopausa-indotta è meno evidente. Ciò sarebbe avvalorato anche dal dato del gruppo ovariectomizzato + estradiolo, che, addirittura, presenta livelli di densitometria ossea maggiori rispetto al controllo, seppur non in modo significativo.

Come si evince dai dati ottenuti nella prima parte dello studio, in corso di menopausa si assiste ad una riduzione nell'espressione di CD36; questo dato sembrerebbe riconfermato a livello cerebrale nel ratto ovariectomizzato + veicolo. Ciò sembrerebbe rappresentare un fattore biologico di rischio di neurodegenerazione, che, in assenza di fattori scatenanti, come mutazioni, non ha effetto. La riduzione di CD36 può essere vista come un micro-danno, che può essere facilmente riparato da un trattamento con estrogeni e che, solo se al quadro ipoestrogenico si aggiungono altri fattori patogenetici coinvolti nell'AD, può sfociare nella malattia.

L'analisi immunohistochimica, al contrario, non mostra differenze tra i diversi trattamenti né nel numero di cellule CD36 positive, né nel numero di *clusters* CD36 positivi. Con *clusters* si intendono degli ammassi di cellule endoteliali CD36 marcate; è noto, infatti, che CD36 è espresso da tessuti endoteliali ed epiteliali (Febbraio *et al.*, 2001). La discrepanza tra i due risultati (biologia molecolare vs immunohistochimica), può essere giustificata dal fatto che

l'espressione di CD36 in un modello come questo, non di malattia, è troppo bassa per vedere differenze con una metodica caratterizzata da minore sensibilità, come l'immunoistochimica.

I modelli animali sono considerati essenziali nella ricerca nel tentativo di chiarire i processi alla base di alcune malattie umane e, di conseguenza, di testare potenziali strategie terapeutiche. Ciò vale specialmente nel caso delle malattie neurodegenerative, come l'AD, in cui, data l'impossibilità di una diagnosi precoce nell'uomo, le prime fasi della patogenesi non possono essere indagate e le sole analisi possibili sono effettuate solo *post mortem*. L'utilizzo del topo APP23 nel nostro studio, ci ha permesso, così, di analizzare come vari l'espressione cerebrale di CD36 in corso di AD, visto il ruolo di questo recettore nella patogenesi della malattia.

E' noto che il topo APP23 esprime una sola delle caratteristiche neuropatologiche di AD, non presentando grovigli neurofibrillari (NFTs), ma solo della tau iperfosforilata, che ricorda una precoce taupatia all'interno della placca stessa. Nonostante ciò esso è ritenuto un buon modello, poiché gli NFTs non rappresentano una caratteristica diagnostica inequivocabile di AD, essendo comuni ad altre malattie come la sclerosi laterale amiotrofica o la demenza frontotemporale e poiché l'amiloide, in realtà, sembrerebbe rivestire un ruolo centrale nella patologia dell'AD; l'iniezione di A β -42 nell'ippocampo di topi che esprimono una tau mutata causa un'accelerazione nell'assemblaggio dei filamenti di tau iperfosforilata (Götz *et al.*, 2001) e topi che esprimono doppia mutazione, sia di APP che di tau, mostrano un'accelerata formazione di grovigli neurofibrillari rispetto ai topi esperimenti solo la tau mutata (Lewis *et al.*, 2000).

Come atteso i risultati ottenuti per corteccia ed ippocampo seguono lo stesso andamento, essendo le due aree principalmente interessate dall'AD. In particolare, l'analisi sia mediante PCR che mediante colorazione immunoistochimica, evidenzia un massimo di espressione per CD36 proprio nel periodo corrispondente alla prima deposizione delle placche in questo modello di topo, ovvero il VI° mese (Sturchler-Pierrat *et al.*, 1997). Nei topi più anziani, al contrario, l'aggravarsi della malattia non va di pari passo con l'espressione del recettore *scavenger*: esso, infatti, si riduce, seppur non tornando mai a livelli basali. Apparentemente ciò potrebbe sembrare contraddittorio, vista la maggiore necessità di CD36, man mano che le placche aumentano di numero. In realtà, la microglia continua a produrre citochine pro-infiammatorie, ma perde la capacità di eliminare la A β , andando incontro a disfunzione. L'espressione di CD36 ridotta risulta in un ridotto *uptake* della A β e nel conseguente accumulo di quest'ultima. Questo processo è visibile già dal IX° mese di età e sembra procedere in parallelo con l'aumento dei livelli di A β osservato negli APP23 della stessa età

(Johnson-Wood *et al.*, 1997). Pertanto, in contrasto al suo ruolo protettivo nelle prime fasi della malattia, la disfunzione microgliale e la perdita della capacità di fagocitare la A β , contribuirebbero alla progressione della AD. A supporto di ciò, Fiala *et al.* hanno dimostrato che monociti e macrofagi ottenuti da pazienti con AD hanno una inefficiente fagocitosi di A β rispetto a quelli ottenuti da controlli età-correlati (Fiala *et al.*, 2005). Pertanto l'incapacità della microglia nello svolgere la funzione di clearance della A β non è altro che un risultato diretto della risposta infiammatoria alla A β stessa.

CD36, oltre che a livello centrale (Husemann e Silverstein, 2001; Srivastava e Jain, 2002) è espresso anche da elementi cellulari di derivazione macrofagica periferici (Nakata *et al.*, 1995). L'esistenza di una correlazione inversa tra il dato cerebrale e quello periferico risulta essere molto interessante; infatti, mentre a livello cerebrale l'espressione di CD36 segue un andamento crescente con un massimo a 6 mesi e poi livelli ridotti, nei leucociti esso ha un'espressione di base più elevata e con l'aggravarsi della malattia si riduce. Ciò è giustificabile con l'esistenza di una comunicazione tra il SNC ed il sistema immunitario. In particolare, la neuroinfiammazione indurrebbe l'efflusso di proteine del CNS, come la A β o mediatori dell'infiammazione, attraverso la barriera emato-encefalica (BBB); questo può causare una reazione sistemica immunitaria con reclutamento delle cellule mieloidi o linfociti nel CNS (Britschgi e Wyss-Coray, 2007). In questo modo la comunicazione tra il CNS ed il sistema immunitario nell'AD potrebbe influenzare sia la distribuzione leucocitaria nel sangue, sia la produzione di mediatori del sistema immunitario. Infatti, le cellule mononucleate del sangue in pazienti AD producono livelli più alti di citochine, come IL-1 β ed IL-6, rispetto ai soggetti controllo (Reale *et al.*, 2005). Pertanto, la continua deposizione di placche nel cervello di questi topi a partire dal VI° mese di età, richiama a livello centrale cellule CD36 positive, al fine di eliminare la A β , innescando, in realtà, una sorta di circolo vizioso in cui CD36 stesso si auto-inibisce producendo TNF- α .

In conclusione, da questo lavoro di tesi si evince che l'ingresso della donna in menopausa rappresenta una fase critica in cui, lo sviluppo di un'assetto biologico sfavorevole predisporrebbe ad un aumentato rischio di neurodegenerazione; la menopausa di per sé non rappresenta un fattore scatenante di malattia, ma le modificazioni che avvengono durante la fase di transizione menopausale, tra cui la caduta degli estrogeni e la riduzione di CD36, potrebbero dare un contributo evidente allo sviluppo dell'AD se in concomitanza con altri fattori patogenetici di malattia. Inoltre, le variazioni di espressione di CD36 in corso di AD, determinano per questo recettore un ruolo precoce, in particolare di fase acuta della malattia; con il progredire della AD; infatti, tale ruolo protettivo viene meno a causa degli eventi

infiammatori, ai quali esso stesso partecipa. La mancanza di una co-localizzazione tra CD36 e le placche di A β , avvalora, ulteriormente, l'ipotesi di un ruolo per CD36 relegato alle fasi iniziali della malattia, e, quindi, di un suo utilizzo come marcatore biologico precoce di AD. Infine, sebbene l'efficacia della terapia ormonale sostitutiva in AD risulti ancora controversa, gli estrogeni sembrerebbero rivestire un ruolo protettivo, contrastando la riduzione di CD36 in seguito a danno; questo ruolo, però, appare tempo-dipendente, avvalorando ulteriormente l'ipotesi dell'esistenza di una finestra temporale che precede la menopausa, in cui la HRT avrebbe degli effetti benefici.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- Abraham CR, Potter H. Alzheimer's disease: recent advances in understanding brain amyloidosis. *Biotechnology*. 1989;7:147-153.
- Abumrad NA, el-Maghrabi MR, Amri EZ, Lopez E, Grimaldi PA. Cloning of a rat adipocyte membrane protein implicated in binding or transport of long-chain fatty acids that is induced during preadipocyte differentiation. Homology with human CD36. *J Biol Chem*. 1993 Aug 25;268(24):17665-8.
- Adamo M, Raizada MK, LeRoith D. Insulin and insulin-like growth factor receptors in the nervous system. *Mol Neurobiol*. 1989;3(1-2):71-100. Review.
- Adlercreutz H, Bannwart C, Wähälä K, et al. Inhibition of human aromatase by mammalian lignans and isoflavonoid phytoestrogens. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1993;44(2):147-53.
- Agüero-Torres H, Fratiglioni L, Guo Z, Viitanen M, Winblad B. Prognostic factors in very old demented adults: a seven-year follow-up from a population-based survey in Stockholm. *J Am Geriatr Soc*. 1998 Apr;46(4):444-52.
- Aitman TJ, Cooper LD, Norsworthy PJ, Wahid FN, Gray JK, Curtis BR, McKeigue PM, Kwiatkowski D, Greenwood BM, Snow RW, Hill AV, Scott J. Malaria susceptibility and CD36 mutation. *Nature*. 2000 Jun 29;405(6790):1015-6.
- Akama KT and McEwen BS. Estrogen activates the signaling intermediate Akt kinase in H19-7 hippocampal neurons: a putative non-genomic mechanism for neuroprotection. *Soc. Neurosci. Abstr*. 2000, p. 409.
- Akiyama H, Barger S, Barnum S, Bradt B, Bauer J, Cole GM, Cooper NR, Eikelenboom P, Emmerling M, Fiebich BL, Finch CE, Frautschy S, Griffin WS, Hampel H, Hull M, Landreth G, Lue L, Mrak R, Mackenzie IR, McGeer PL, O'Banion MK, Pachter J, Pasinetti G, Plata-Salaman C, Rogers J, Rydel R, Shen Y, Streit W, Strommeyer R, Tooyoma I, Van Muiswinkel FL, Veerhuis R, Walker D, Webster S, Wegrzyniak B, Wenk G, Wyss-Coray T. Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2000 May-Jun;21(3):383-421. Review.
- Akiyama H. Inflammatory response in Alzheimer's disease. *Tohoku J Exp Med*. 1994 Nov;174(3):295-303. Review.
- Albert ML, Pearce SF, Francisco LM, Sauter B, Roy P, Silverstein RL, Bhardwaj N. Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alpha5beta1 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med*. 1998 Oct 5;188(7):1359-68.
- Alessio M, De Monte L, Scirea A, Gruarin P, Tandon NN, Sitia R. Synthesis, processing, and intracellular transport of CD36 during monocytic differentiation. *J Biol Chem*. 1996 Jan 19;271(3):1770-5.
- Alkayed NJ, Harukuni I, Kimes AS, London ED, Traystman RJ, Hurn PD. Gender-linked brain injury in experimental stroke. *Stroke*. 1998;29(1):159-65.
- Allison, D.B., Gadbury, G., Schwartz, L.G., Murugesan, R., Kraker, J.L., Heshka, S., Fontaine, K.R., Heymsfield, S.B., 2003. A novel soy-based meal replacement formula for weight loss among obese individuals: a randomized controlled clinical trial. *Eur. J. Clin. Nutr.* 57, 514-522.
- Allred CD, Ju YH, Allred KF, Chang J, Helferich WG. Dietary genistein stimulates growth of estrogen-dependent breast cancer tumors similar to that observed with genistein. *Carcinogenesis* 22 (2001) 1667-1673.
- Allred DA, Allred KF, Ju YH, Virant SM, Helferich WG. Soy diets containing varying amounts of genistein stimulate growth of estrogen-dependent (MCF-7) tumors in a dose-dependent manner. *Cancer Res*. 61 (2001) 5045-5050.
- Almkvist O, Basun H, Wagner SL, Rowe BA, Wahlund LO, Lannfelt L. Cerebrospinal fluid levels of alpha-secretase-cleaved soluble amyloid precursor protein mirror cognition in a Swedish family with Alzheimer disease and a gene mutation. *Arch Neurol*. 1997 May;54(5):641-4.
- Alvarez A, Muñoz JP, Maccioni RB. A cdk5-p35 stable complex is involved in the beta-amyloid-induced deregulation of cdk5 activity in hippocampal neurons. *Exp Cell Res* 2001;264:266.

- Alvarez-DE-LA-Rosa M, Silva I, Nilsen J, Perez MM, Garcia-Segura LM, Avila J, Naftolin F. Estradiol prevents neural tau hyperphosphorylation characteristic of Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci.* 2005 Jun;1052:210-24.
- Akiyama H, Arai T, Kondo H, Tanno E, Haga C, Ikeda K *Alzheimer Dis Assoc Disord.* 2000;14 Suppl 1:S47-53. Cell mediators of inflammation in the Alzheimer disease brain.
- Akiyama, T., Ishida, J., Nakagawa, S., Ogawara, H., Watanabe, S., Itoh, N., Shibuya, M., Fukami, Y., 1987. Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J. Biol. Chem.* 262, 5592–5595.
- Anderson, J.W., Hoie, L.H., 2005. Weight loss and lipid changes with low-energy diets:comparator study of milk-based versus soy-based liquid meal replacement interventions. *J. Am. Coll. Nutr.* 24, 210–216.
- Anderson, J.W., Fuller, J., Patterson, K., Blair, R., Tabor, A., 2007. Soy compared to casein meal replacement shakes with energy-restricted diets for obese women: randomized controlled trial. *Metabolism* 56, 280–288.
- Anderson JJ, Ambrose, WW. Garner SC, Biphasic effects of genistein on bone tissue in the ovariectomized lactating rat model, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 217 (1998) 345–350.
- Arai H, Terajima M, Miura M, Higuchi S, Muramatsu T, Machida N, Seiki H, Takase S, Clark CM, Lee VM, et al. Tau in cerebrospinal fluid: a potential diagnostic marker in Alzheimer's disease. *Ann Neurol.* 1995 Oct;38(4):649-52.
- Armstrong CS, Wuarin L, Ishii DN. Uptake of circulating insulin-like growth factor-I into the cerebrospinal fluid of normal and diabetic rats and normalization of IGF-II mRNA content in diabetic rat brain. *J Neurosci Res.* 2000;59(5):649-60.
- Asch AS, Liu I, Briccetti FM, Barnwell JW, Kwakye-Berko F, Dokun A, Goldberger J, Pernambuco M. Analysis of CD36 binding domains: ligand specificity controlled by dephosphorylation of an ectodomain. *Science.* 1993 Nov 26;262(5138):1436-40.
- Asthana S, Baker LD, Tate PS. Role of oestrogen in the treatment and prevention of Alzheimer's disease. *Expert Opin Investig Drugs.* 1997 Sep;6(9):1203-9.
- Atack JR, Perry EK, Bonham JR, Perry RH, Tomlinson BE, Blessed G, Fairbairn A. Molecular forms of acetylcholinesterase in senile dementia of Alzheimer type: selective loss of the intermediate (10S) form. *Neurosci Lett.* 1983;40(2):199-204.
- Atkinson C, Bingham SA, Mammographic breast density as a biomarker of effects of isoflavones on the female breast, *Breast Cancer Res.* 4 (2002) 1–4.
- Azcoitia I, Leonelli E, Magnaghi V, Veiga S, Garcia-Segura LM, Melcangi RC. Progesterone and its derivatives dihydroprogesterone and tetrahydroprogesterone reduce myelin fiber morphological abnormalities and myelin fiber loss in the sciatic nerve of aged rats. *Neurobiol Aging.* 2003;24(6):853-60.
- Azcoitia I, Sierra A, Garcia-Segura LM. Neuroprotective effects of estradiol in the adult rat hippocampus: interaction with insulin-like growth factor-I signalling. *J Neurosci Res.* 1999;58(6):815-22.
- Babic I, Schallhorn A, Lindberg FP, Jirik FR. SHPS-1 induces aggregation of Ba/F3 pro-B cells via an interaction with CD47. *J Immunol.* 2000 Apr 1;164(7):3652-8. Erratum in: *J Immunol* 2000 May 15;164(10):5532.
- Bagli M, Papassotiropoulos A, Knapp M, Jessen F, Luise Rao M, Maier W, Heun R. Association between an interleukin-6 promoter and 3' flanking region haplotype and reduced Alzheimer's disease risk in a German population. *Neurosci Lett.* 2000;283(2):109-12.
- Balasubramanian AS. Amyloid beta peptide processing, insulin degrading enzyme, and butyrylcholinesterase. *Neurochem Res.* 2001;26(4):453-6.
- Bales KR, Verina T, Dodel RC, Du Y, Altstiel L, Bender M, Hyslop P, Johnstone EM, Little SP, Cummins DJ, Piccardo P, Ghetti B, Paul SM. Lack of apolipoprotein E dramatically reduces amyloid beta-peptide deposition. *Nat Genet.* 1997;17(3):263-4.

- Bamberger CM, Chrousos GP. The glucocorticoid receptor and RU 486 in man. *Ann N Y Acad Sci.* 1995 Jun 12;761:296-310. Review.
- Bamberger ME, Harris ME, McDonald DR, Husemann J, Landreth GE. A cell surface receptor complex for fibrillar beta-amyloid mediates microglial activation. *J Neurosci.* 2003 Apr 1;23(7):2665-74.
- Banks WA. The source of cerebral insulin. *Eur J Pharmacol.* 2004;490(1-3):5-12. Review.
- Bard F, Cannon C, Barbour R, Burke RL, Games D, Grajeda H, Guido T, Hu K, Huang J, Johnson-Wood K, Khan K, Kholodenko D, Lee M, Lieberburg I, Motter R, Nguyen M, Soriano F, Vasquez N, Weiss K, Welch B, Seubert P, Schenk D, Yednock T. Peripherally administered antibodies against amyloid beta-peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease. *Nat Med.* 2000 Aug;6(8):916-9.
- Barnwell JW, Asch AS, Nachman RL, Yamaya M, Aikawa M, Ingravallo P. A human 88-kD membrane glycoprotein (CD36) functions in vitro as a receptor for a cytoadherence ligand on *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *J Clin Invest.* 1989 Sep;84(3):765-72.
- Barnwell SL, Higashida RT, Halbach VV, Dowd CF, Wilson CB, Hieshima GB. Transluminal angioplasty of intracerebral vessels for cerebral arterial spasm: reversal of neurological deficits after delayed treatment. *Neurosurgery.* 1989 Sep;25(3):424-9.
- Bartus RT. On neurodegenerative diseases, models, and treatment strategies: lessons learned and lessons forgotten a generation following the cholinergic hypothesis. *Exp Neurol.* 2000;163(2):495-529. Review.
- Baruch DI, Ma XC, Pasloske B, Howard RJ, Miller LH. CD36 peptides that block cytoadherence define the CD36 binding region for *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Blood.* 1999 Sep 15;94(6):2121-7.
- Bassett CN, Neely MD, Sidell KR, Markesbery WR, Swift LL, Montine TJ. Cerebrospinal fluid lipoproteins are more vulnerable to oxidation in Alzheimer's disease and are neurotoxic when oxidized ex vivo. *Lipids.* 1999 Dec;34(12):1273-80.
- Baulieu EE, Schumacher M, Koenig H, Jung-Testas I, Akwa Y. Progesterone as a neurosteroid: actions within the nervous system. *Cell Mol Neurobiol.* 1996;16(2):143-54. Review.
- Baum LW. Sex, hormones, and Alzheimer's disease. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2005 Jun;60(6):736-43. Review.
- Baynes JW. The role of AGEs in aging: causation or correlation. *Exp Gerontol.* 2001 Sep;36(9):1527-37. Review.
- Behl C, Holsboer F. The female sex hormone oestrogen as a neuroprotectant. *Trends Pharmacol Sci.* 1999;20(11):441-4. Review.
- Behl C, Widmann M, Trapp T, Holsboer F. 17-beta estradiol protects neurons from oxidative stress-induced cell death in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995;216(2):473-82.
- Ben-Ari Y. Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy. *Neuroscience.* 1985;14(2):375-403. Review.
- Bennett BD, Babu-Khan S, Loeloff R, Louis JC, Curran E, Citron M, Vassar R. Expression analysis of BACE2 in brain and peripheral tissues. *J Biol Chem.* 2000 Jul 7;275(27):20647-51.
- Betmouni S, Perry VH, Gordon JL. Evidence for an early inflammatory response in the central nervous system of mice with scrapie. *Neuroscience.* 1996;74(1):1-5.
- Bhojak TJ, DeKosky ST, Ganguli M, Kamboh MI. Genetic polymorphisms in the cathepsin D and interleukin-6 genes and the risk of Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 2000;288(1):21-4.

- Biessels GJ, Kappelle LJ; Utrecht Diabetic Encephalopathy Study Group. Increased risk of Alzheimer's disease in Type II diabetes: insulin resistance of the brain or insulin-induced amyloid pathology? *Biochem Soc Trans.* 2005;33(Pt 5):1041-4. Review.
- Binetti G, Mega MS, Magni E, Padovani A, Rozzini L, Bianchetti A, Trabucchi M, Cummings JL. Behavioral disorders in Alzheimer disease: a transcultural perspective. *Arch Neurol.* 1998 Apr;55(4):539-44.
- Bird DA, Gillotte KL, Horkko S, Friedman P, Dennis EA, Witztum JL, Steinberg D. Receptors for oxidized low-density lipoprotein on elicited mouse peritoneal macrophages can recognize both the modified lipid moieties and the modified protein moieties: implications with respect to macrophage recognition of apoptotic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 May 25;96(11):6347-52.
- Birge SJ. The role of estrogen in the treatment of Alzheimer's disease. *Neurology.* 1997 May;48(5 Suppl 7):S36-41. Review.
- Blacker D, Wilcox MA, Laird NM, et al. Alpha-2-macroglobulin is genetically associated with Alzheimer disease. *Nat Genet* 1998;19:357-360.
- Blaker D, Albert MS, Bassett SS, et al. Reliability and validity of NINCDS-ADRDA criteria for Alzheimer's disease. The National Institute of Mental Health Genetics Initiative. *Arch neurol* 1994;51:1198-204.
- Blasko I, Marx F, Steiner E, Hartmann T, Grubeck-Loebenstein B. TNFalpha plus IFNgamma induce the production of Alzheimer beta-amyloid peptides and decrease the secretion of APPs. *FASEB J.* 1999;13(1):63-8.
- Blass JP, Gibson GE. Cerebrometabolic aspects of delirium in relationship to dementia. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 1999;10(5):335-8. Review.
- Blass JP, Sheu RK, Gibson GE. Inherent abnormalities in energy metabolism in Alzheimer disease. Interaction with cerebrovascular compromise. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;903:204-21. Review.
- Blennow K, Hampel H. CSF markers for incipient Alzheimer's disease. *Lancet Neurology* 2003;2:605-6013.
- Boccardo F, Puntoni M, Guliellini P, Rubagotti A. Enterolactone as a risk factor for breast cancer: a review of the published evidence. *Clin Chim Acta* 2006;365(1-2):58-67.
- Bodart V, Febbraio M, Demers A, McNicoll N, Pohankova P, Perreault A, Sejlitz T, Escher E, Silverstein RL, Lamontagne D, Ong H. CD36 mediates the cardiovascular action of growth hormone-releasing peptides in the heart. *Circ Res.* 2002 May 3;90(8):844-9.
- Borrás C, Sastre J, García-Sala D, Lloret A, Pallardó FV, Viña J. Mitochondria from females exhibit higher antioxidant gene expression and lower oxidative damage than males. *Free Radic Biol Med.* 2003;34(5):546-52.
- Bowen J, Teri L, Kukull W, McCormick W, McCurry SM, Larson EB. Progression to dementia in patients with isolated memory loss. *Lancet.* 1997 Mar 15;349(9054):763-5.
- Braak H, Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol (Berl).* 1991;82(4):239-59. Review.
- Brayman MJ, Julian J, Mulac-Jericevic B, Conneely OM, Edwards DP, Carson DD. Progesterone receptor isoforms A and B differentially regulate MUC1 expression in uterine epithelial cells. *Mol Endocrinol.* 2006;20(10):2278-91.
- Brinton RD, Chen S, Montoya M, Hsieh D, Minaya J. The estrogen replacement therapy of the Women's Health Initiative promotes the cellular mechanisms of memory and neuronal survival in neurons vulnerable to Alzheimer's disease. *Maturitas.* 2000;34 Suppl 2:S35-52.
- Brinton RD, Proffitt P, Tran J, Luu R. Equilin, a principal component of the estrogen replacement therapy premarin, increases the growth of cortical neurons via an NMDA receptor-dependent mechanism. *Exp Neurol.* 1997;147(2):211-20.
- Britschgi M, Wyss-Coray T (2007) Systemic and acquired immune responses in Alzheimer's disease. *Int Rev Neurobiol* 82, 205-233.

- Brooks JD, Thompson LU. Mammalian lignans and genistein decrease the activities of aromatase and 17 α -hydroxysteroid dehydrogenase in MCF-7 cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005;94(5):461-7.
- Brown EJ, Frazier WA. Integrin-associated protein (CD47) and its ligands. *Trends Cell Biol.* 2001 Mar;11(3):130-5. Review.
- Brownlee M. Glycation products and the pathogenesis of diabetic complications. *Diabetes Care.* 1992 Dec;15(12):1835-43. Review.
- Bubber P, Haroutunian V, Fisch G, Blass JP, Gibson GE. Mitochondrial abnormalities in Alzheimer brain: mechanistic implications. *Ann Neurol.* 2005;57(5):695-703.
- Bulgarelli I, Tamiazzo L, Bresciani E, rapetti E, Caporali S, Lattuada D, Locatelli V, Torsello A. Desacyl-ghrelin and sintetic GH-secretagogues modulate the production of inflammatory cytochines in mouse microglia cells stimulates by b-amyloid fibrils. *J Neurosci Res.* 2009;87:2718-27.
- Burger HG, Dudley EC, Hopper JL, Groome N, Guthrie JR, Green A, Dennerstein L. Prospectively measured levels of serum follicle-stimulating hormone, estradiol, and the dimeric inhibins during the menopausal transition in a population-based cohort of women. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999 Nov;84(11):4025-30
- Burns JM, Donnelly JE, Anderson HS, Mayo MS, Spencer-Gardner L, Thomas G, Cronk BB, Haddad Z, Klima D, Hansen D, Brooks WM. Peripheral insulin and brain structure in early Alzheimer disease. *Neurology.* 2007;69(11):1094-104.
- Busciglio J, Gabuzda DH, Matsudaira P, Yankner BA. Generation of beta-amyloid in the secretory pathway in neuronal and nonneuronal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Mar 1;90(5):2092-6.
- Buxbaum JD, Liu KD, Luo Y, Slack JL, Stocking KL, Peschon JJ, et al. Evidence that tumor necrosis factor- α converting enzyme is involved in regulated α -secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor. *J. Biol. Chem* 1998;273:27765-7.
- Cagnin A, Brooks DJ, Kennedy AM, Gunn RN, Myers R, Turkheimer FE, Jones T, Banati RB. In-vivo measurement of activated microglia in dementia. *Lancet.* 2001;358(9280):461-7. Erratum in: *Lancet.* 2001 Sep 1;358(9283):766.
- Calkin, A. C.; Sudhir, K.; Honisett, S.; Williams, M. R. I.; Dawood, T.; Komesaroff, P. A. Rapid potentiation of endothelium-dependent vasodilation by estradiol in postmenopausal women is mediated via cyclooxygenase 2. *J. Clin. Endocr. Metab.* 2002; 87: 5072-5075.
- Calle EE, Miracle-McMahill HL, Thun MJ & Heath CW Jr . Estrogen replacement therapy and risk of fatal colon cancer in a prospective cohort of postmenopausal women. *Journal of the National Cancer Institute.* 1995; 87 517-523.
- Cameron I, Curran S, Newton P, Petty D, Wattis J. Use of donepezil for the treatment of mild-moderate Alzheimer's disease: an audit of the assessment and treatment of patients in routine clinical practice. *Int J Geriatr Psychiatry.* 2000 Oct;15(10):887-91.
- Candore G, Balistreri CR, Grimaldi MP, Listì F, Vasto S, Chiappelli M, Licastro F, Colonna-Romano G, Lio D, Caruso C. Polymorphisms of pro-inflammatory genes and Alzheimer's disease risk: a pharmacogenomic approach. *Mech Ageing Dev.* 2007;128(1):67-75. Review.
- Cappa SF, Binetti G, Pezzini A, Padovani A, Rozzini L, Trabucchi M. Object and action naming in Alzheimer's disease and frontotemporal dementia [see comment] *Neurology.* 1998 Feb;50(2):351-5.
- Caramelli P, Robitaille Y, Laroche-Cholette A, Nitrini R, Gauvreau D, Joannette Y, Lecours AR. Structural correlates of cognitive deficits in a selected group of patients with Alzheimer's disease. *Neuropsychiatry Neuropsychol Behav Neurol.* 1998 Oct;11(4):184-90.
- Cardona-Gómez GP, Trejo JL, Fernandez AM, Garcia-Segura LM. Estrogen receptors and insulin-like growth factor-I receptors mediate estrogen-dependent synaptic plasticity. *Neuroreport.* 2000;11(8):1735-8.

- Cardoso SM, Oliveira CR. Inhibition of NF- κ B renders cells more vulnerable to apoptosis induced by amyloid beta peptides. *Free Radic Res.* 2003;37(9):967-73.
- Cardoso SM, Proença MT, Santos S, Santana I, Oliveira CR. Cytochrome c oxidase is decreased in Alzheimer's disease platelets. *Neurobiol Aging.* 2004;25(1):105-10.
- Carroll JC, Rosario ER, Chang L, Stanczyk FZ, Oddo S, LaFerla FM, Pike CJ. Progesterone and estrogen regulate Alzheimer-like neuropathology in female 3xTg-AD mice. *J Neurosci.* 2007;27(48):13357-65.
- Carusi D. Phytoestrogens as hormone replacement therapy: an evidence-based approach, *Prim. Care Update Obstet./Gynecol.* 7 (2000) 253–259.
- Cash AD, Aliev G, Siedlak SL, Nunomura A, Fujioka H, Zhu X, Raina AK, Vinters HV, Tabaton M, Johnson AB, Paula-Barbosa M, Avila J, Jones PK, Castellani RJ, Smith MA, Perry G. Microtubule reduction in Alzheimer's disease and aging is independent of tau filament formation. *Am J Pathol.* 2003;162(5):1623-7.
- Castellani R, Hirai K, Aliev G, Drew KL, Nunomura A, Takeda A, Cash AD, Obrenovich ME, Perry G, Smith MA. Role of mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *J Neurosci Res.* 2002;70(3):357-60. Review.
- Chang D, Kwan J, Timiras PS. Estrogens influence growth, maturation, and amyloid beta-peptide production in neuroblastoma cells and in a beta-APP transfected kidney 293 cell line. *Adv Exp Med Biol.* 1997;429:261-71.
- Chang, HC, Doerge DR, Dietary genistein inactivates rat thyroid peroxidase in vivo without an apparent hypothyroid effect, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 168 (3) (2000) 244–252.
- Chen LM, Bailey D, Fernandez-Valle C. Association of beta 1 integrin with focal adhesion kinase and paxillin in differentiating Schwann cells. *J Neurosci.* 2000 May 15;20(10):3776-84.
- Chiang CH, Cheng KW, Igarashi S, Nathwani PS, Leung PC. Hormonal regulation of estrogen receptor alpha and beta gene expression in human granulosa-luteal cells in vitro. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000 Oct;85(10):3828-39.
- Choeiri C, Staines W, Messier C. Immunohistochemical localization and quantification of glucose transporters in the mouse brain. *Neuroscience.* 2002;111(1):19-34.
- Choi JM, Romeo RD, Brake WG, Bethea CL, Rosenwaks Z, McEwen BS. Estradiol increases pre- and post-synaptic proteins in the CA1 region of the hippocampus in female rhesus macaques (*Macaca mulatta*). *Endocrinology.* 2003 Nov;144(11):4734-8. Epub 2003 Aug 13.
- Christie RH, Freeman M, Hyman BT. Expression of the macrophage scavenger receptor, a multifunctional lipoprotein receptor, in microglia associated with senile plaques in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 1996; 148:399–403.
- Citron M, Diehl T, Gordon G, Bier A, Seubert P, Selkoe D. Evidence that the 42 and 40 amino acid forms of amyloid β protein are generated from the β -amyloid precursor protein by different protease activities. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;3:13170.
- Claudio L. Ultrastructural features of the blood-brain barrier in biopsy tissue from Alzheimer's disease patients. *Acta Neuropathol (Berl).* 1996;91(1):6-14.
- Clavel T, Fallani M, Lepage P, et al. Isoflavones and functional foods alter dominant intestinal microbiota in postmenopausal women. *J Nutr* 2005;135(12):2786–92
- Combs CK, Johnson DE, Cannady SB, Lehman TM, Landreth GE. Identification of microglial signal transduction pathways mediating a neurotoxic response to amyloidogenic fragments of beta-amyloid and prion proteins. *J Neurosci.* 1999 Feb 1;19(3):928-39.
- Combs CK, Karlo JC, Kao SC, Landreth GE. beta-Amyloid stimulation of microglia and monocytes results in TNF α -dependent expression of inducible nitric oxide synthase and neuronal apoptosis. *J Neurosci.* 2001 Feb 15;21(4):1179-88.

- Cook DG, Forman MS, Sung JC, Leight S, Kolson DL, Iwatsubo T, Lee VM, Doms RW. Alzheimer's A beta(1-42) is generated in the endoplasmic reticulum/intermediate compartment of NT2N cells. *Nat Med.* 1997 Sep;3(9):1021-3.
- Coraci IS, Husemann J, Berman JW, Hulette C, Dufour JH, Campanella GK, Luster AD, Silverstein SC, El-Khoury JB. CD36, a class B scavenger receptor, is expressed on microglia in Alzheimer's disease brains and can mediate production of reactive oxygen species in response to beta-amyloid fibrils. *Am J Pathol.* 2002 Jan;160(1):101-12.
- Corrigan FM, Reynolds GP, Ward NI. Hippocampal tin, aluminum and zinc in Alzheimer's disease. *Biometals.* 1993 Autumn;6(3):149-54.
- Couse JF, Hewitt SC, Bunch DO, Sar M, Walker VR, Davis BJ, Korach KS. Postnatal sex reversal of the ovaries in mice lacking estrogen receptors alpha and beta. *Science.* 1999 Dec 17;286(5448):2328-31.
- Coyle JT, Price DL, DeLong MR. Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervation. *Science.* 1983 Mar 11;219(4589):1184-90. Review.
- Craft S, Peskind E, Schwartz MW, Schellenberg GD, Raskind M, Porte D Jr. Cerebrospinal fluid and plasma insulin levels in Alzheimer's disease: relationship to severity of dementia and apolipoprotein E genotype. *Neurology.* 1998;50(1):164-8.
- Craft S, Watson GS. Insulin and neurodegenerative disease: shared and specific mechanisms. *Lancet Neurol.* 2004;3(3):169-78. Review.
- Crombie R, Silverstein R. Lysosomal integral membrane protein II binds thrombospondin-1. Structure-function homology with the cell adhesion molecule CD36 defines a conserved recognition motif. *J Biol Chem.* 1998 Feb 27;273(9):4855-63.
- Cullinan-Bove K, Koos RD. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor expression in the rat uterus: rapid stimulation by estrogen correlates with estrogen-induced increases in uterine capillary permeability and growth. *Endocrinology* 133 (1993) 829-837
- Dantzer R. Cytokine-induced sickness behaviour: a neuroimmune response to activation of innate immunity. *Eur J Pharmacol.* 2004;500:399-411.
- Daviet L, Buckland R, Puente Navazo MD, McGregor JL. Identification of an immunodominant functional domain on human CD36 antigen using human-mouse chimaeric proteins and homologue-replacement mutagenesis. *Biochem J.* 1995 Jan 1;305 (Pt 1):221-4.
- Daviet L, Morel-Kopp MC, Kaplan C, McGregor JL. A structural/functional domain on human CD36 is involved in the binding of anti-Nak(a) antibodies. *Thromb Haemost.* 1995 Mar;73(3):543-5.
- Dawson DW, Pearce SF, Zhong R, Silverstein RL, Frazier WA, Bouck NP. CD36 mediates the In vitro inhibitory effects of thrombospondin-1 on endothelial cells. *J Cell Biol.* 1997 Aug 11;138(3):707-17.
- de Groot CJ, Hulshof S, Hoozemans JJ, Veerhuis R. Establishment of microglial cell cultures derived from postmortem human adult brain tissue: immunophenotypical and functional characterization. *Microsc Res Tech.* 2001;54(1):34-9.
- de la Monte SM, Neely TR, Cannon J, Wands JR. Ethanol impairs insulin-stimulated mitochondrial function in cerebellar granule neurons. *Cell Mol Life Sci.* 2001;58(12-13):1950-60.
- de la Monte SM, Wands JR. Chronic gestational exposure to ethanol impairs insulin-stimulated survival and mitochondrial function in cerebellar neurons. *Cell Mol Life Sci.* 2002;59(5):882-93.
- de la Monte SM, Wands JR. Review of insulin and insulin-like growth factor expression, signaling, and malfunction in the central nervous system: relevance to Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2005;7(1):45-61. Review.

- De Leon MJ, Convit A, DeSanti S, Bobinski M, George AE, Wisniewski HM, Rusinek H, Carroll R, Saint Louis LA. Contribution of structural neuroimaging to the early diagnosis of Alzheimer's disease. *Int Psychogeriatr*. 1997;9 Suppl 1:183-90; discussion 247-52.
- De Leon MJ, McRae T, Rusinek H, Convit A, De Santi S, Tarshish C, Golomb J, Volkow N, Daisley K, Orentreich N, McEwen B. Cortisol reduces hippocampal glucose metabolism in normal elderly, but not in Alzheimer's disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997 Oct;82(10):3251-9. (a)
- De Leon, MJ, De Santi S, Zinkowski R, et al. Longitudinal CSF and MRI biomarkers improve the diagnosis of mild cognitive impairment. *Neurobiol Aging* 2006;27;394-401.
- De Ronchi D, Fratiglioni L, Rucci P, Paternico A, Graziani S, Dalmonte E. The effect of education on dementia occurrence in an Italian population with middle to high socioeconomic status. *Neurology*. 1998 May;50(5):1231-8.
- De Strooper B, Umans L, Van Leuven F, Van Den Berghe H. Study of the synthesis and secretion of normal and artificial mutants of murine amyloid precursor protein (APP): cleavage of APP occurs in a late compartment of the default secretion pathway. *J Cell Biol*. 1993 Apr;121(2):295-304.
- De Strooper B, Annaert W, Cupers P, et al. A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates roles of Notch intracellular domain. *Nature* 1999;398:518-522.
- Deloncle R, Guillard O, Huguet F, Clanet F. Modification of the blood-brain barrier through chronic intoxication by aluminum glutamate. Possible role in the etiology of Alzheimer's disease. *Biol Trace Elem Res*. 1995 Jan-Mar;47(1-3):227-33.
- D'Ercole AJ, Ye P, Gutierrez-Ospina G. Use of transgenic mice for understanding the physiology of insulin-like growth factors. *Horm Res*. 1996;45 Suppl 1:5-7. Review.
- D'Ercole AJ, Ye P, O'Kusky JR. Mutant mouse models of insulin-like growth factor actions in the central nervous system. *Neuropeptides*. 2002;36(2-3):209-20. Review.
- D'Ercole AJ. Expression of insulin-like growth factor-I in transgenic mice. *Ann N Y Acad Sci*. 1993;692:149-60. Review.
- Dhandapani KM, Brann DW. Protective effects of estrogen and selective estrogen receptor modulators in the brain. *Biol Reprod*. 2002 Nov;67(5):1379-85. Review.
- Di Fede G et al. A recessive mutation in the APP gene with dominant-negative effect on amyloidogenesis. *Science* 2009;323:1473-77.
- Dickson DW, Lee SC, Mattiace LA, Yen SH, Brosnan C. Microglia and cytokines in neurological disease, with special reference to AIDS and Alzheimer's disease. *Glia*. 1993;7(1):75-83. Review.
- Dickson TC, Saunders HL, Vickers JC. Relationship between apolipoprotein E and the amyloid deposits and dystrophic neurites of Alzheimer's disease. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 1997 Dec;23(6):483-91.
- Dixon, R.A., 2004. Phytoestrogens. *Annu. Rev. Plant Biol*. 55, 225–261.
- Dienel GA, Hertz L. Glucose and lactate metabolism during brain activation. *J Neurosci Res*. 2001 Dec 1;66(5):824-38. Review.
- Dik MG, Pluijm SM, Jonker C, Deeg DJ, Lomecky MZ, Lips P. Insulin-like growth factor I (IGF-I) and cognitive decline in older persons. *Neurobiol Aging*. 2003;24(4):573-81. Erratum in: *Neurobiol Aging*. 2004 Feb;25(2):271.
- Dorahy DJ, Lincz LF, Meldrum CJ, Burns GF. Biochemical isolation of a membrane microdomain from resting platelets highly enriched in the plasma membrane glycoprotein CD36. *Biochem J*. 1996 Oct 1;319 (Pt 1):67-72.
- Doré S, Kar S, Quirion R. Insulin-like growth factor I protects and rescues hippocampal neurons against beta-amyloid- and human amylin-induced toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(9):4772-7.
- Drummond AE. The role of steroids in follicular growth. *Reprod Biol Endocrinol*. 2006 Apr 10;4:16. Review.

- Du Y, Dodel RC, Eastwood BJ, Bales KR, Gao F, Lohmüller F, Müller U, Kurz A, Zimmer R, Evans RM, Hake A, Gasser T, Oertel WH, Griffin WS, Paul SM, Farlow MR. Association of an interleukin 1 alpha polymorphism with Alzheimer's disease. *Neurology*. 2000;55(4):480-3.
- Dudek H, Datta SR, Franke TF, Birnbaum MJ, Yao R, Cooper GM, Segal RA, Kaplan DR, Greenberg ME. Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science*. 1997;275(5300):661-5.
- Duelli R, Schröck H, Kuschinsky W, Hoyer S. Intracerebroventricular injection of streptozotocin induces discrete local changes in cerebral glucose utilization in rats. *Int J Dev Neurosci*. 1994;12(8):737-43.
- Dueñas M, Luquín S, Chowen JA, Torres-Alemán I, Naftolin F, Garcia-Segura LM. Gonadal hormone regulation of insulin-like growth factor-I-like immunoreactivity in hypothalamic astroglia of developing and adult rats. *Neuroendocrinology*. 1994;59(6):528-38.
- Eikelenboom P, Hoogendijk WJ, Jonker C, van Tilburg W. Immunological mechanisms and the spectrum of psychiatric syndromes in Alzheimer's disease. *J Psychiatr Res*. 2002;36(5):269-80. Review.
- Eikelenboom P, Veerhuis R. The role of complement and activated microglia in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 1996;17(5):673-80. Review.
- El Khoury J, Hickman SE, Thomas CA, Cao L, Silverstein SC, Loike JD. Scavenger receptor-mediated adhesion of microglia to beta-amyloid fibrils. *Nature*. 1996 Aug 22;382(6593):716-9.
- El Khoury J, Hickman SE, Thomas CA, Loike JD, Silverstein SC. Microglia, scavenger receptors, and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 1998 Jan-Feb;19(1 Suppl):S81-4. Review.
- El Khoury J, Thomas CA, Loike JD, Hickman SE, Cao L, Silverstein SC. Macrophages adhere to glucose-modified basement membrane collagen IV via their scavenger receptors. *J Biol Chem*. 1994 Apr 8;269(14):10197-200.
- El Khoury JB, Moore KJ, Means TK, Leung J, Terada K, Toft M, Freeman MW, Luster AD. CD36 mediates the innate host response to beta-amyloid. *J Exp Med*. 2003 Jun 16;197(12):1657-66. Epub 2003 Jun 9.
- Endemann G, Stanton LW, Madden KS, Bryant CM, White RT, Protter AA. CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein. *J Biol Chem*. 1993 Jun 5;268(16):11811-6.
- Engelhart MJ, Geerlings MI, Ruitenber A, van Swieten JC, Hofman A, Witteman JC, Breteler MM. Dietary intake of antioxidants and risk of Alzheimer disease. *JAMA*. 2002;287(24):3223-9.
- Erol A. An integrated and unifying hypothesis for the metabolic basis of sporadic Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2008;13(3):241-53. Review.
- Esch FS, Keim PS, Beattie EC, Blacher RW, Culwell AR, Oltersdorf T, McClure D, Ward PJ. Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor. *Science*. 1990 Jun 1;248(4959):1122-4.
- Esiri MM, Pearson RC, Powell TP. The cortex of the primary auditory area in Alzheimer's disease. *Brain Res*. 1986 Feb 26;366(1-2):385-7.
- Esler WP, Wolfe MS. A portrait of Alzheimer secretases--new features and familiar faces. *Science*. 2001 Aug 24;293(5534):1449-54. Review.
- Eterkin-Taner N, Graff-Radford N, Younkin LH, Eckman C, Baker M, Adanson J, et al. Linkage of plasma Ab42 to a quantitative locus on chromosome 10 in late-onset Alzheimer's disease pedigrees. *Science* 2000;209:2303-4.
- Etienne P, Dastoor D, Gauthier S, Ludwick R, Collier B. Alzheimer disease: lack of effect of lecithin treatment for 3 months. *Neurology*. 1981 Dec;31(12):1552-4.
- Eves EM, Xiong W, Bellacosa A, Kennedy SG, Tschlis PN, Rosner MR, Hay N. Akt, a target of phosphatidylinositol 3-kinase, inhibits apoptosis in a differentiating neuronal cell line. *Mol Cell Biol*. 1998;18(4):2143-52.

- Evin G, Cappai R, Li Q-X, Culvenor JG, Small DH, Beyreuther K et al. Candidate gamma-secretases in the generation of the carboxyl terminus of the Alzheimer's disease β A4-amyloid: possible involvement of cathepsin D. *Biochemistry* 1995;34:14185-92.
- Falkenstein E, Heck M, Gerdes D, Grube D, Christ M, Weigel M, Buddhikot M, Meisel S, Wehling M. Specific progesterone binding to a membrane protein and related nongenomic effects on Ca^{2+} -fluxes in sperm. *Endocrinology*. 1999;140(12):5999-6002.
- Fassbender K, Simons M, Bergmann C, Stroik M, Lutjohann D, Keller P, et al. Simvastatin strongly reduces levels of Alzheimer's disease β -amyloid peptides A β 42 and A β 40 in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:5856-61.
- Febbraio M, Abumrad NA, Hajjar DP, Sharma K, Cheng W, Pearce SF, Silverstein RL. A null mutation in murine CD36 reveals an important role in fatty acid and lipoprotein metabolism. *J Biol Chem*. 1999 Jul 2;274(27):19055-62.
- Febbraio M, Hajjar DP, Silverstein RL. CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J Clin Invest*. 2001 Sep;108(6):785-91. Review.
- Feng J, Han J, Pearce SF, Silverstein RL, Gotto AM Jr, Hajjar DP, Nicholson AC. Induction of CD36 expression by oxidized LDL and IL-4 by a common signaling pathway dependent on protein kinase C and PPAR-gamma. *J Lipid Res*. 2000 May;41(5):688-96.
- Fernandez AM, Gonzalez de la Vega AG, Planas B, Torres-Aleman I. Neuroprotective actions of peripherally administered insulin-like growth factor I in the injured olivo-cerebellar pathway. *Eur J Neurosci*. 1999;11(6):2019-30.
- Finkbeiner S. CREB couples neurotrophin signals to survival messages. *Neuron*. 2000;25(1):11-4. Review.
- Finnemann SC, Silverstein RL. Differential roles of CD36 and α v β 5 integrin in photoreceptor phagocytosis by the retinal pigment epithelium. *J Exp Med*. 2001 Nov 5;194(9):1289-98.
- Folli F, Ghidella S, Bonfanti L, Kahn CR, Merighi A. The early intracellular signaling pathway for the insulin/insulin-like growth factor receptor family in the mammalian central nervous system. *Mol Neurobiol*. 1996;13(2):155-83. Review.
- Folstein M, Anthony JC, Parhad I, Duffy B, Gruenberg EM. The meaning of cognitive impairment in the elderly. *J Am Geriatr Soc*. 1985 Apr;33(4):228-35.
- Foy MR, Henderson VW, Berger TW, Thompson RF. Estrogen and neural plasticity. *Curr Dir Psychol Sci*. 2000; 9:148-52.
- Frank RA, Galasko D, Hampel H, et al: Biological markers for therapeutic trials in Alzheimer's disease-proceedings of the Biological Measures Working Group: NIA Initiative on Neuroimaging in Alzheimer's Disease. *Neurobiol Aging* 2003;24:521-536.
- Fratiglioni L, Ahlbom A, Viitanen M, Winblad B. Risk factors for late-onset Alzheimer's disease: a population-based, case-control study. *Ann Neurol*. 1993 Mar;33(3):258-66.
- Fratiglioni L, Jorm AF, Grut M, Viitanen M, Holmen K, Ahlbom A, Winblad B. Predicting dementia from the Mini-Mental State Examination in an elderly population: the role of education. *J Clin Epidemiol*. 1993 Mar;46(3):281-7.
- Freedman M, Kaplan E, Delis D, et al. *Clock drawing: a neuropsychological analysis*. Oxford (UK): Oxford University Press; 1994.
- Freeland K, Boxer LM, Latchman DS. The cyclic AMP response element in the Bcl-2 promoter confers inducibility by hypoxia in neuronal cells. *Brain Res Mol Brain Res*. 2001;92(1-2):98-106.
- Friedland RP, Budinger TF, Brant-Zawadzki M, Jagust WJ. The diagnosis of Alzheimer-type dementia. A preliminary comparison of positron emission tomography and proton magnetic resonance. *JAMA*. 1984 Nov 16;252(19):2750-2.

- Frölich L, Blum-Degen D, Bernstein HG, Engelsberger S, Humrich J, Laufer S, Muschner D, Thalheimer A, Türk A, Hoyer S, Zöchling R, Boissl KW, Jellinger K, Riederer P. Brain insulin and insulin receptors in aging and sporadic Alzheimer's disease. *J Neural Transm.* 1998;105(4-5):423-38.
- Frölich L, Blum-Degen D, Riederer P, Hoyer S. A disturbance in the neuronal insulin receptor signal transduction in sporadic Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci.* 1999;893:290-3.
- Fukuda K, Yao H, Ibayashi S, Nakahara T, Uchimura H, Fujishima M, Hall ED. Ovariectomy exacerbates and estrogen replacement attenuates photothrombotic focal ischemic brain injury in rats. *Stroke.* 2000;31(1):155-60.
- Gandy S. Estrogen and neurodegeneration. *Neurochem Res.* 2003 Jul;28(7):1003-8. Review.
- Garcia-Morales P, Saceda M, Kenney N, Kim N, Salomon DS, Gottardis MM, Solomon HB, Sholler PF, Jordan VC, Martin MB. Effect of cadmium on estrogen receptor levels and estrogen-induced responses in human breast cancer cells. *J Biol Chem.* 1994 Jun 17;269(24):16896-901.
- Garcia-Morales P, Saceda M, Kenney N, Kim N, Salomon DS, Gottardis MM, Solomon HB, Sholler PF, Jordan VC, Martin MB. Effect of cadmium on estrogen receptor levels and estrogen-induced responses in human breast cancer cells. *J Biol Chem.* 1994 Jun 17;269(24):16896-901.
- Garcia-Segura LM, Cardona-Gómez GP, Chowen JA, Azcoitia I. Insulin-like growth factor-I receptors and estrogen receptors interact in the promotion of neuronal survival and neuroprotection. *J Neurocytol.* 2000;29(5-6):425-37. Review.
- Garcia-Segura LM, Cardona-Gomez P, Naftolin F, Chowen JA. Estradiol upregulates Bcl-2 expression in adult brain neurons. *Neuroreport.* 1998;9(4):593-7.
- Garcia-Segura LM, Veiga S, Sierra A, Melcangi RC, Azcoitia I. Aromatase: a neuroprotective enzyme. *Prog Neurobiol.* 2003;71(1):31-41. Review.
- Gardner, C.D., Newell, K.A., Cherin, R., Haskell, W.L., 2001. The effect of soy protein with or without isoflavones relative to milk protein on plasma lipids in hypercholesterolemic postmenopausal women. *Am. J. Clin. Nutr.* 73, 728– 735.
- Garver TD, Oyler GA, Harris KA, Polavarapu R, Damuni Z, Lehman RA, Billingsley ML. Tau phosphorylation in brain slices: pharmacological evidence for convergent effects of protein phosphatases on tau and mitogen-activated protein kinase. *Mol Pharmacol.* 1995;47(4):745-56.
- Gasparini L, Gouras GK, Wang R, Gross RS, Beal MF, Greengard P, Xu H. Stimulation of beta-amyloid precursor protein trafficking by insulin reduces intraneuronal beta-amyloid and requires mitogen-activated protein kinase signaling. *J Neurosci.* 2001;21(8):2561-70.
- Gasparini L, Netzer WJ, Greengard P, Xu H. Does insulin dysfunction play a role in Alzheimer's disease? *Trends Pharmacol Sci.* 2002;23(6):288-93. Review.
- Geerlings MI, Schmand B, Braam AW, Jonker C, Bouter LM, van Tilburg W. Depressive symptoms and risk of Alzheimer's disease in more highly educated older people. *J Am Geriatr Soc.* 2000;48(9):1092-7.
- Geldmacher DS, Whitehouse PJ Jr. Differential diagnosis of Alzheimer's disease. *Neurology.* 1997 May;48(5 Suppl 6):S2-9. Review.
- Gershagen S, Lundwall A, Fernlund P. Characterization of the human sex hormone binding globulin (SHBG) gene and demonstration of two transcripts in both liver and testis. *Nucleic Acids Res.* 1989;17(22):9245-58.
- Ghiso J, Matsubara E, Koudinov A, Choi-Miura NH, Tomita M, Wisniewski T, Frangione B. The cerebrospinal-fluid soluble form of Alzheimer's amyloid beta is complexed to SP-40,40 (apolipoprotein J), an inhibitor of the complement membrane-attack complex. *Biochem J.* 1993 Jul 1;293 (Pt 1):27-30.
- Gibbs RB, Wu D, Hersh LB, Pfaff DW. Effects of estrogen replacement on the relative levels of choline acetyltransferase, trkA, and nerve growth factor messenger RNAs in the basal forebrain and hippocampal formation of adult rats. *Exp Neurol.* 1994;129(1):70-80.
- Gibson CL, Constantin D, Prior MJ, Bath PM, Murphy SP. Progesterone suppresses the inflammatory response and nitric oxide synthase-2 expression following cerebral ischemia. *Exp Neurol.* 2005;193(2):522-30.

- Gillett MJ, Martins RN, Clarnette RM, Chubb SA, Bruce DG, Yeap BB. Relationship between testosterone, sex hormone binding globulin and plasma amyloid beta peptide 40 in older men with subjective memory loss or dementia. *J Alzheimers Dis.* 2003;5(4):267-9.
- Giovannone B, Scaldaferrri ML, Federici M, Porzio O, Lauro D, Fusco A, Sbraccia P, Borboni P, Lauro R, Sesti G. Insulin receptor substrate (IRS) transduction system: distinct and overlapping signaling potential. *Diabetes Metab Res Rev.* 2000;16(6):434-41. Review.
- Giulian D. Immune responses and dementia. *Ann N Y Acad Sci.* 1997;835:91-110. Review.
- Giunta M, Rigamonti AE, Scarpini E, Galimberti D, Bonomo SM, Venturelli E, Müller EE, Cella SG. The leukocyte expression of CD36 is low in patients with Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Neurobiol Aging.* 2007 Apr;28(4):515-8. Epub 2006 Mar 23
- Glenner GG, Wong CW, Quaranta V, Eanes ED. The amyloid deposits in Alzheimer's disease: their nature and pathogenesis. *Appl Pathol.* 1984;2(6):357-69. (b)
- Glenner GG, Wong CW. Alzheimer's disease and Down's syndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 1984 Aug 16;122(3):1131-5. (a)
- Goedert M, Fine A, Hunt SP, Ullrich A. Nerve growth factor mRNA in peripheral and central rat tissues and in the human central nervous system: lesion effects in the rat brain and levels in Alzheimer's disease. *Brain Res.* 1986 Jul;387(1):85-92.
- Goedert M, Spillantini MG, Cairns NJ, Crowther RA. Tau proteins of Alzheimer paired helical filaments: abnormal phosphorylation of all six brain isoforms. *Neuron.* 1992 Jan;8(1):159-68.
- Goedert M, Trojanowski JQ, Lee VM-Y, et al. The neurofibrillary pathology of Alzheimer's disease. In: Rosenberg RN, Prusiner SB, DiMauro S, Barchi RL, editors. *The molecular and genetic basis of neurological disease*, 2nd Ed. 1996. pp. 613-627.
- Goldstein JL, Helgeson JA, Brown MS. Inhibition of cholesterol synthesis with compactin renders growth of cultured cells dependent on the low density lipoprotein receptor. *J Biol Chem.* 1979 Jun 25;254(12):5403-9.
- Gong Y, Joseph T, Sneige N. Validation of commonly used immunostains on cell-transferred cytologic specimens. *Cancer.* 2005 Jun 25;105(3):158-64.
- Good DJ, Polverini PJ, Rastinejad F, Le Beau MM, Lemons RS, Frazier WA, Bouck NP. A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990 Sep;87(17):6624-8.
- Goodenough S, Schleusner D, Pietrzik C, Skutella T, Behl C. Glycogen synthase kinase 3beta links neuroprotection by 17beta-estradiol to key Alzheimer processes. *Neuroscience.* 2005;132(3):581-9.
- Goodman Y, Bruce AJ, Cheng B, Mattson MP. Estrogens attenuate and corticosterone exacerbates excitotoxicity, oxidative injury, and amyloid beta-peptide toxicity in hippocampal neurons. *J Neurochem.* 1996;66(5):1836-44.
- Grabowska A. The effect of estrogen on cognitive processing. *Neurol Neurochir Pol.* 2003;37 Suppl 3:9-18. Polish.
- Grady D, Rubin SM, Petitti DB, Fox CS, Black D, Ettinger B, Ernster VL, Cummings SR. Hormone therapy to prevent disease and prolong life in postmenopausal women. *Ann Intern Med.* 1992 Dec 15;117(12):1016-37.
- Granholt AC, Ford KA, Hyde LA, Bimonte HA, Hunter CL, Nelson M, Albeck D, Sanders LA, Mufson EJ, Crnic LS. Estrogen restores cognition and cholinergic phenotype in an animal model of Down syndrome. *Physiol Behav.* 2002 Nov;77(2-3):371-85.
- Granholt AC, Sanders L, Seo H, Lin L, Ford K, Isacson O. Estrogen alters amyloid precursor protein as well as dendritic and cholinergic markers in a mouse model of Down syndrome. *Hippocampus.* 2003;13(8):905-14.
- Green PS, Simpkins JW. Neuroprotective effects of estrogens: potential mechanisms of action. *Int J Dev Neurosci.* 2000;18(4-5):347-58. Review.

- Gregg RE, Zech LA, Schaefer EJ, Stark D, Wilson D, Brewer HB Jr. Abnormal in vivo metabolism of apolipoprotein E4 in humans. *J Clin Invest.* 1986 Sep;78(3):815-21.
- Griffin WS, Stanley LC, Ling C, White L, MacLeod V, Perrot LJ, White CL 3rd, Araoz C. Brain interleukin 1 and S-100 immunoreactivity are elevated in Down syndrome and Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989;86(19):7611-5.
- Grilli M, Ferrari Toninelli G, Uberti D, Spano P, Memo M. Alzheimer's disease linking neurodegeneration with neurodevelopment. *Funct Neurol.* 2003;18(3):145-8. Review.
- Grimaldi LM, Casadei VM, Ferri C, Veglia F, Licastro F, Annoni G, Biunno I, De Bellis G, Sorbi S, Mariani C, Canal N, Griffin WS, Franceschi M. Association of early-onset Alzheimer's disease with an interleukin-1alpha gene polymorphism. *Ann Neurol.* 2000;47(3):361-5.
- Grodstein F, Newcomb PA & Stampfer MJ 1999 Postmenopausal hormone therapy and the risk of colorectal cancer: a review and meta-analysis. *American Journal of Medicine* 106 574–582.
- Groshong SD, Owen GI, Grimison B, Schauer IE, Todd MC, Langan TA, Sclafani RA, Lange CA, Horwitz KB. Biphasic regulation of breast cancer cell growth by progesterone: role of the cyclin-dependent kinase inhibitors, p21 and p27(Kip1). *Mol Endocrinol.* 1997;11(11):1593-607.
- Grossman KJ, Goss CW, Stein DG. Effects of progesterone on the inflammatory response to brain injury in the rat. *Brain Res.* 2004;1008(1):29-39.
- Gruarin P, Thorne RF, Dorahy DJ, Burns GF, Sitia R, Alessio M. CD36 is a ditopic glycoprotein with the N-terminal domain implicated in intracellular transport. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000 Aug 28;275(2):446-54.
- Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Quinlan M, Tung YC, Zaidi MS, Wisniewski HM. Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *J Biol Chem.* 1986 May 5;261(13):6084-9.
- Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, Quinlan M, Wisniewski HM, Binder LI. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986 Jul;83(13):4913-7.
- Gu G, Rojo AA, Zee MC, Yu J, Simerly RB. Hormonal regulation of CREB phosphorylation in the anteroventral periventricular nucleus. *J Neurosci.* 1996;16(9):3035-44.
- Gu M, Owen AD, Toffa SE, Cooper JM, Dexter DT, Jenner P, Marsden CD, Schapira AH. Mitochondrial function, GSH and iron in neurodegeneration and Lewy body diseases. *J Neurol Sci.* 1998;158(1):24-9.
- Haass C, Hung AY, Selkoe DJ. Processing of beta-amyloid precursor protein in microglia and astrocytes favors an internal localization over constitutive secretion. *J Neurosci.* 1991 Dec;11(12):3783-93.
- Haass C, Koo EH, Mellon A, Hung AY, Selkoe DJ. Targeting of cell-surface beta-amyloid precursor protein to lysosomes: alternative processing into amyloid-bearing fragments. *Nature.* 1992 Jun 11;357(6378):500-3.
- Haass C, Lemere CA, Capell A, Citron M, Seubert P, Schenk D, Lannfelt L, Selkoe DJ. The Swedish mutation causes early-onset Alzheimer's disease by beta-secretase cleavage within the secretory pathway. *Nat Med.* 1995 Dec;1(12):1291-6.
- Haass C, Schlossmacher MG, Hung AY, Vigo-Pelfrey C, Mellon A, Ostaszewski BL, Lieberburg I, Koo EH, Schenk D, Teplow DB, et al. Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature.* 1992 Sep 24;359(6393):322-5.
- Hall KE, Sheng HC, Srinivasan S, Spitsbergen JM, Tuttle JB, Steers WD, Wiley JW. Treatment of aged rat sensory neurons in short-term, serum-free culture with nerve growth factor reverses the effect of aging on neurite outgrowth, calcium currents, and neuronal survival. *Brain Res.* 2001 Jan 5;888(1):128-137.

- Hall, W.L., Vafeiadou, K., Hallund, J., Bugel, S., Reimann, M., Koebnick, C., Zunft, H.J., Ferrari, M., Branca, F., Dadd, T., Talbot, D., Powell, J., Minihane, A.M., Cassidy, A., Nilsson, M., Dahlman-Wright, K., Gustafsson, J.A., Williams, C.M., 2006. Soy-isoflavone-enriched foods and markers of lipid and glucose metabolism in postmenopausal women: interactions with genotype and equol production. *Am. J. Clin. Nutr.* 83, 592–600.
- Halliday G, Robinson SR, Shepherd C, Kril J. Alzheimer's disease and inflammation: a review of cellular and therapeutic mechanisms. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2000;27:1-8.
- Hansson O, Zetterberg H, Buchhave P, et al. Association between CSF biomarkers and incipient Alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment: a follow up study. *Lancet Neurol* 2006;5:228-234.
- Harrell LE, Kolasa K, Parsons DS, Ayyagari V. Hippocampal sympathetic ingrowth and cholinergic denervation uniquely alter muscarinic receptor subtypes in the hippocampus. *Brain Res.* 1995 Apr 10;676(2):386-93.
- Hawk T, Zhang YQ, Rajakumar G, Day AL, Simpkins JW. Testosterone increases and estradiol decreases middle cerebral artery occlusion lesion size in male rats. *Brain Res.* 1998;796(1-2):296-8.
- He Z, He YJ, Day AL, Simpkins JW. Proestrus levels of estradiol during transient global cerebral ischemia improves the histological outcome of the hippocampal CA1 region: perfusion-dependent and-independent mechanisms. *J Neurol Sci.* 2002;193(2):79-87.
- Hebert-Croteau N. A meta-analysis of hormone replacement therapy and colon cancer in women. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* 7. 1998; 653–659.
- Heine PA, Taylor JA, Iwamoto GA, Lubahn DB, Cooke PS. Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor-alpha knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Nov 7;97(23):12729-34.
- Henderson VW. Abstract Oestrogens and dementia. *Novartis Found Symp.* 2000;230:254-65; discussion 265-73. Review.
- Henderson VW. The neurology of menopause. *Neurologist.* 2006 May;12(3):149-59.
- Hetman M, Cavanaugh JE, Kimelman D, Xia Z. Role of glycogen synthase kinase-3beta in neuronal apoptosis induced by trophic withdrawal. *J Neurosci.* 2000;20(7):2567-74.
- Hickey WF. Migration of hematogenous cells through the blood-brain barrier and the initiation of CNS inflammation. *Brain Pathol.* 1991 Jan;1(2):97-105. Review.
- Hirai K, Aliev G, Nunomura A, Fujioka H, Russell RL, Atwood CS, Johnson AB, Kress Y, Vinters HV, Tabaton M, Shimohama S, Cash AD, Siedlak SL, Harris PL, Jones PK, Petersen RB, Perry G, Smith MA. Mitochondrial abnormalities in Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 2001;21(9):3017-23
- Hirata S, Shoda T, Kato J, Hoshi K. Isoform/variant mRNAs for sex steroid hormone receptors in humans. *Trends Endocrinol Metab.* 2003;14(3):124-9. Review.
- Honda K, Sawada H, Kihara T, Urushitani M, Nakamizo T, Akaike A, Shimohama S. Phosphatidylinositol 3-kinase mediates neuroprotection by estrogen in cultured cortical neurons. *J Neurosci Res.* 2000;60(3):321-7.
- Hong M, Lee VM. Insulin and insulin-like growth factor-1 regulate tau phosphorylation in cultured human neurons. *J Biol Chem.* 1997;272(31):19547-53.
- Hong-Goka BC, Chang FL. Estrogen receptors alpha and beta in choroid plexus epithelial cells in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 2004 Apr 29;360(3):113-6.
- Honjo H, Iwasa K, Kawata M, Fushiki S, Hosoda T, Tatsumi H, Oida N, Mihara M, Hirasugi Y, Yamamoto H, Kikuchi N, Kitawaki J. Progestins and estrogens and Alzheimer's disease. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2005 Feb;93(2-5):305-8. Epub 2005 Jan 24.
- Hoozemans JJ, Brückner MK, Rozemuller AJ, Veerhuis R, Eikelenboom P, Arendt T. Cyclin D1 and cyclin E are co-localized with cyclo-oxygenase 2 (COX-2) in pyramidal neurons in Alzheimer disease temporal cortex. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2002;61(8):678-88.

- Hoyer S, Lannert H. Inhibition of the neuronal insulin receptor causes Alzheimer-like disturbances in oxidative/energy brain metabolism and in behavior in adult rats. *Ann N Y Acad Sci.* 1999;893:301-3.
- Hoyer S, Lee SK, Löffler T, Schliebs R. Inhibition of the neuronal insulin receptor. An in vivo model for sporadic Alzheimer disease? *Ann N Y Acad Sci.* 2000;920:256-8.
- Hoyer S. Brain glucose and energy metabolism abnormalities in sporadic Alzheimer disease. Causes and consequences: an update. *Exp Gerontol.* 2000 Dec;35(9-10):1363-72. Review.
- Hoyer S. Is sporadic Alzheimer disease the brain type of non-insulin dependent diabetes mellitus? A challenging hypothesis. *J Neural Transm.* 1998;105(4-5):415-22.
- Hoyer S. Memory function and brain glucose metabolism. *Pharmacopsychiatry.* 2003;36 Suppl 1:S62-7. Review.
- Hoyer S. Risk factors for Alzheimer's disease during aging. Impacts of glucose/energy metabolism. *J Neural Transm Suppl.* 1998;54:187-94. Review.
- Hoyer S. The brain insulin signal transduction system and sporadic (type II) Alzheimer disease: an update. *J Neural Transm.* 2002;109(3):341-60. Review.
- Huang JT, Welch JS, Ricote M, Binder CJ, Willson TM, Kelly C, Witztum JL, Funk CD, Conrad D, Glass CK. Interleukin-4-dependent production of PPAR-gamma ligands in macrophages by 12/15-lipoxygenase. *Nature.* 1999 Jul 22;400(6742):378-82.
- Huell M, Strauss S, Volk B, Berger M, Bauer J. Interleukin-6 is present in early stages of plaque formation and is restricted to the brains of Alzheimer's disease patients. *Acta Neuropathol.* 1995;89(6):544-51.
- Huh HY, Pearce SF, Yesner LM, Schindler JL, Silverstein RL. Regulated expression of CD36 during monocyte-to-macrophage differentiation: potential role of CD36 in foam cell formation. *Blood.* 1996 Mar 1;87(5):2020-8.
- Hung AY, Selkoe DJ. Selective ectodomain phosphorylation and regulated cleavage of beta-amyloid precursor protein. *EMBO J.* 1994 Feb 1;13(3):534-42.
- Hwang EH, Taki J, Yasue S, Fujimoto M, Taniguchi M, Matsunari I, Nakajima K, Shiobara S, Ikeda T, Tonami N. Absent myocardial iodine-123-BMIPP uptake and platelet/monocyte CD36 deficiency. *J Nucl Med.* 1998 Oct;39(10):1681-4.
- Hwang, C.S., Kwak, H.S., Lim, H.J., Lee, S.H., Kang, Y.S., Choe, T.B., Hur, H.G., Han, K.O., 2006. Isoflavone metabolites and their in vitro dual functions: they can act as an estrogenic agonist or antagonist depending on the estrogen concentration. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 101, 246–253.
- Hyman BT, Van Hoesen GW, Damasio AR, Barnes CL. Alzheimer's disease: cell-specific pathology isolates the hippocampal formation. *Science.* 1984 Sep 14;225(4667):1168-70.
- Ichihara N, Wu J, Chui DH, Yamazaki K, Wakabayashi T, Kikuchi T. Axonal degeneration promotes abnormal accumulation of amyloid beta-protein in ascending gracile tract of gracile axonal dystrophy (GAD) mouse. *Brain Res.* 1995 Oct 16;695(2):173-8.
- Illenberger S, Zheng-Fischhofer Q, Preuss U, Stamer K, Baumann K, Trinczek B, Biernat J, Godemann R, Mandelkow EM, Mandelkow E. The endogenous and cell cycle-dependent phosphorylation of tau protein in living cells: implications for Alzheimer's disease. *Mol Biol Cell.* 1998 Jun;9(6):1495-512.
- Ikeda, Y., Iki, M., Morita, A., Kajita, E., Kagamimori, S., Kagawa, Y., Yoneshima, H., 2006. Intake of fermented soybeans, natto, is associated with reduced bone loss in postmenopausal women: Japanese Population-based Osteoporosis (JPOS) Study. *J. Nutr.* 136, 1323–1328.
- Inestrosa NC, Marzolo MP, Bonnefont AB. Cellular and molecular basis of estrogen's neuroprotection. Potential relevance for Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol.* 1998 Winter;17(1-3):73-86. Review.
- Ito Y.; Fisher, C. R.; Conte, F. A.; Grumbach, M. M.; Simpson, E. R. Molecular basis of aromatase deficiency in an adult female with sexual infantilism and polycystic ovaries. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 90: 11673-11677, 1993.

- Iwata N, Tsubuki S, Takaki Y, Watanabe K, Sekiguchi M, Hosoki E, et al. Identification of the major Ab1-42-degrading catabolic pathway in brain parenchyma: suppression leads to biochemical and pathological deposition. *Nat Med* 2000;6:143-50.
- Iwatsubo T, Mann DM, Odaka A, Suzuki N, Ihara Y. Amyloid beta protein (A beta) deposition: A beta 42(43) precedes A beta 40 in Down syndrome. *Ann Neurol*. 1995 Mar;37(3):294-9.
- Iwatsubo T, Odaka A, Suzuki N, Mizusawa H, Nukina N, Ihara Y. Visualization of A beta 42(43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is A beta 42(43). *Neuron*. 1994 Jul;13(1):45-53.
- Jacqmin-Gadda H, Commenges D, Letenneur L, Dartigues JF. Silica and aluminum in drinking water and cognitive impairment in the elderly. *Epidemiology*. 1996 May;7(3):281-5.
- Janabi M, Yamashita S, Hirano K, Matsumoto K, Sakai N, Hiraoka H, Kashiwagi H, Tomiyama Y, Nozaki S, Matsuzawa Y. Reduced adhesion of monocyte-derived macrophages from CD36-deficient patients to type I collagen. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001 Apr 27;283(1):26-30.
- Jantzen PT, Connor KE, DiCarlo G, Wenk GL, Wallace JL, Rojiani AM, Coppola D, Morgan D, Gordon MN. Microglial activation and beta -amyloid deposit reduction caused by a nitric oxide-releasing nonsteroidal anti-inflammatory drug in amyloid precursor protein plus presenilin-1 transgenic mice. *J Neurosci*. 2002 Mar 15;22(6):2246-54.
- Jarret JT, Berger EP, Lansbury Jr PT. The carboxy terminus of the b-amyloid is critical for the seeding of amyloid formation: implication for the pathogenesis of Alzheimer disease. *Biochemistry* 1993;32:4693-7.
- Jellinger KA, Janetzky B, Attems J, Kienzl E. Biomarkers for early diagnosis of Alzheimer disease: 'ALzheimer ASsociated gene'--a new blood biomarker?. *J Cell Mol Med*. 2008;12:1094-117.
- Jiang P, Lagenaur CF, Narayanan V. Integrin-associated protein is a ligand for the P84 neural adhesion molecule. *J Biol Chem*. 1999 Jan 8;274(2):559-62.
- Jick H, Zornberg GL, Jick SS, Seshadri S, Drachman DA. Statin and the risk of dementia. *Lancet* 2000;356:1627-31.
- Jimenez B, Volpert OV, Crawford SE, Febbraio M, Silverstein RL, Bouck N. Signals leading to apoptosis-dependent inhibition of neovascularization by thrombospondin-1. *Nat Med*. 2000 Jan;6(1):41-8.
- Jimenez S, Baglietto-Vargas D, Caballero C, Moreno-Gonzalez I, Torres M, Sanchez-Varo R, Ruano D, Vizuete M, Gutierrez A, Vitorica J. Inflammatory response in the hippocampus of PS1M146L/APP751SL mouse model of Alzheimer's disease: age-dependent switch in the microglial phenotype from alternative to classic. *J Neurosci*. 2008 Nov 5;28(45):11650-61.
- Johnson EB, Muto MG, Yanushpolsky EH, Mutter GL. Phytoestrogen supplementation and endometrial cancer, *Obstet. Gynecol*. 98 (2001) 947-950.
- Jung ME, Lal H, Gatch MB. The discriminative stimulus effects of pentylenetetrazol as a model of anxiety: recent developments. *Neurosci Biobehav Rev*. 2002;26(4):429-39. Review.
- Juul A. The effects of oestrogens on linear bone growth. *Hum Reprod Update*. 2001;7(3):303-13. Review
- Kalaria RN, Sromek SM, Grahovac I, Harik SI. Transferrin receptors of rat and human brain and cerebral microvessels and their status in Alzheimer's disease. *Brain Res*. 1992 Jul 10;585(1-2):87-93.
- Kalaria RN. Microglia and Alzheimer's disease. *Curr Opin Hematol*. 1999 Jan;6(1):15-24. Review.
- Kalaria RN. The immunopathology of Alzheimer's disease and some related disorders. *Brain Pathol*. 1993;3(4):333-47. Review.
- Kamal A, Stockin GB, Yang Z, Xia C, Goldstein LS. Axonal transport of amyloid precursor protein is mediated by directing binding to the kinesin light chain subunit of kinesin-I. *Neuron* 2000;28:499.

- Kampen DL, Sherwin BB. Estrogen use and verbal memory in healthy postmenopausal women. *Obstet Gynecol.* 1994 Jun;83(6):979-83.
- Kanda N, Watanabe S. 17beta-estradiol inhibits oxidative stress-induced apoptosis in keratinocytes by promoting Bcl-2 expression. *J Invest Dermatol.* 2003 Dec;121(6):1500-9.
- Kanemaru K, Takio K, Miura R, Titani K, Ihara Y. Fetal-type phosphorylation of the tau in paired helical filaments. *J Neurochem.* 1992 May;58(5):1667-75.
- Kantarci K, Jack CR Jr. Neuroimaging in Alzheimer disease: an evidence-based review. *Neuroimaging Clin N Am.* 2003 May;13(2):197-209. Review.
- Kariagina A, Aupperlee MD, Haslam SZ. Progesterone receptor isoforms and proliferation in the rat mammary gland during development. *Endocrinology.* 2007;148(6):2723-36
- Kawas C, Resnick S, Morrison A, Brookmeyer R, Corrada M, Zonderman A, Bacal C, Lingle DD, Metter E. A prospective study of estrogen replacement therapy and the risk of developing Alzheimer's disease: the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *Neurology.* 1997 Jun;48(6):1517-21. Erratum in: *Neurology* 1998 Aug;51(2):654.
- Keller JN, Hanni KB, Gabbita SP, Friebe V, Mattson MP, Kindy MS. Oxidized lipoproteins increase reactive oxygen species formation in microglia and astrocyte cell lines. *Brain Res.* 1999 May 29;830(1):10-5.
- Khachaturian ZS. An overview of Alzheimer's disease research. *Am J Med.* 1998 Apr 27;104(4A):26S-31S; discussion 39S-42S. Review.
- Khachaturian ZS. Diagnosis of Alzheimer's disease. *Arch Neurol.* 1985 Nov;42(11):1097-105.
- Kibbey MC, Jucker M, Weeks BS, Neve RL, Van Nostrand WE, Kleinman HK. β -Amyloid precursor protein binds to the neurite-promoting IKVAV site of laminin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 1993;90:10150-3.
- Kish SJ, Bergeron C, Rajput A, Dozic S, Mastrogiacomo F, Chang LJ, Wilson JM, DiStefano LM, Nobrega JN. Brain cytochrome oxidase in Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 1992;59(2):776-9.
- Kivatinitz SC, Pelsman MA, Alonso AC, Bagatolli L, Quiroga S. High-density lipoprotein aggregated by oxidation induces degeneration of neuronal cells. *J Neurochem.* 1997 Nov;69(5):2102-14.
- Klein R, Berlin L (1996) Benefits and risks of hormone replacement therapy. In: Pavlik EJ (ed) *Estrogens, progestins and their antagonists.* Birkhauser, Boston pp 3-50
- Koenig HL, Schumacher M, Ferzaz B, Thi AN, Ressousches A, Guennoun R, Jung-Testas I, Robel P, Akwa Y, Baulieu EE. Progesterone synthesis and myelin formation by Schwann cells. *Science.* 1995;268(5216):1500-3.
- Koo EH, Sisodia SS, Archer DR, Martin LJ, Weidemann A, Beyreuther K, Fischer P, Masters CL, Price DL. Precursor of amyloid protein in Alzheimer disease undergoes fast anterograde axonal transport. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990 Feb;87(4):1561-5.
- Koo EH, Squazzo SL. Evidence that production and release of amyloid beta-protein involves the endocytic pathway. *J Biol Chem.* 1994 Jul 1;269(26):17386-9.
- Korach KS. Selected biochemical actions of ovarian hormones. *Environ Health Perspect.* 1981 Apr;38:39-45. Review.
- Kosik KS, Joachim CL, Selkoe DJ. Microtubule-associated protein tau (tau) is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986 Jun;83(11):4044-8.
- Krebs CJ, Jarvis ED, Chan J, Lydon JP, Ogawa S, Pfaff DW. A membrane-associated progesterone-binding protein, 25-Dx, is regulated by progesterone in brain regions involved in female reproductive behaviors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(23):12816-21.
- Kretz O, Fester L, Wehrenberg U, Zhou L, Brauckmann S, Zhao S, Prange-Kiel J, Naumann T, Jarry H, Frotscher M, Rune GM. Hippocampal synapses depend on hippocampal estrogen synthesis. *J Neurosci.* 2004 Jun 30;24(26):5913-21.

- Krieger M, Stern DM. Series introduction: multiligand receptors and human disease. *J Clin Invest.* 2001 Sep;108(5):645-7.
- Krieger M. Scavenger receptor class B type I is a multiligand HDL receptor that influences diverse physiologic systems. *J Clin Invest.* 2001 Sep;108(6):793-7. Review.
- Krieger M. The other side of scavenger receptors: pattern recognition for host defense. *Curr Opin Lipidol.* 1997 Oct;8(5):275-80. Review.
- Kuhl DE, Metter EJ, Riege WH. Patterns of cerebral glucose utilization in depression, multiple infarct dementia, and Alzheimer's disease. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis.* 1985;63:211-26.
- Kukull WA, Schellenberg GD, Bowen JD, McCormick WC, Yu CE, Teri L, Thompson JD, O'Meara ES, Larson EB. Apolipoprotein E in Alzheimer's disease risk and case detection: a case-control study. *J Clin Epidemiol.* 1996 Oct;49(10):1143-8.
- Kuiper, G.G., Carlsson, B., Grandien, K., Enmark, E., Haggblad, J., Nilsson, S., Gustafsson, J.A., 1997. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 138, 863– 870.
- Kuiper, G.G., Lemmen, J.G., Carlsson, B., Corton, J.C., Safe, S.H., van der Saag, P.T., van der Burg, B., Gustafsson, J.A., 1998. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology* 139, 4252–4263.
- Kuo YM, Kokjohn TA, Watson MD, Woods AS, Cotter RJ, Sue LI, et al. Elevated A β 42 in skeletal muscle of Alzheimer disease patients suggests peripheral alterations of A β PP metabolism. *Am. J. Pathol* 2000;156:797–805.
- Kurzer MS. Phytoestrogen supplement use by women. *J Nutr* 2003;133(6): 1983S–6S.
- LaDu MJ, Shah JA, Reardon CA, Getz GS, Bu G, Hu J, Guo L, van Eldik LJ. Apolipoprotein E receptors mediate the effects of beta-amyloid on astrocyte cultures. *J Biol Chem.* 2000 Oct 27;275(43):33974-80.
- LaFerla FM, Tinkle BT, Bieberich CJ, Haudenschild CC, Jay G. The Alzheimer's A beta peptide induces neurodegeneration and apoptotic cell death in transgenic mice. *Nat Genet.* 1995 Jan;9(1):21-30.
- Lalowski M, Golabek A, Lemere CA, Selkoe DJ, Wisniewski HM, Beavis RC, Frangione B, Wisniewski T. The "nonamyloidogenic" p3 fragment (amyloid beta17-42) is a major constituent of Down's syndrome cerebellar preamyloid. *J Biol Chem.* 1996 Dec 27;271(52):33623-31.
- Lamartiniere CA, Protection against breast cancer with genistein: a component of soy, *Am. J. Clin. Nutr.* 71 (2000) 1705–1709S.
- Landfield PW, Baskin RK, Pitler TA. Brain aging correlates: retardation by hormonal-pharmacological treatments. *Science.* 1981 Oct 30;214(4520):581-4.
- Lannert H, Hoyer S. Intracerebroventricular administration of streptozotocin causes long-term diminutions in learning and memory abilities and in cerebral energy metabolism in adult rats. *Behav Neurosci.* 1998;112(5):1199-208.
- Lannfelt L, Basun H, Vigo-Pelfrey C, Wahlund LO, Winblad B, Lieberburg I, Schenk D. Amyloid beta-peptide in cerebrospinal fluid in individuals with the Swedish Alzheimer amyloid precursor protein mutation. *Neurosci Lett.* 1995 Oct 27;199(3):203-6.
- Larsson T, et al. Senile dementia: a clinical, sociomedical and genetic study. *Acta Psych Scand* 1963 39:167.
- Lee H, Woodman SE, Engelman JA, Volonte D, Galbiati F, Kaufman HL, Lublin DM, Lisanti MP. Palmitoylation of caveolin-1 at a single site (Cys-156) controls its coupling to the c-Src tyrosine kinase: targeting of dually acylated molecules (GPI-linked, transmembrane, or cytoplasmic) to caveolae effectively uncouples c-Src and caveolin-1 (TYR-14). *J Biol Chem.* 2001 Sep 14;276(37):35150-8. Epub 2001 Jul 12.

- Lee MS, Tsai LH. Cdk5: one of the links between senile plaques and neurofibrillary tangles? *J Alzheimers Dis.* 2003 Apr;5(2):127-37. Review.
- Lee SJ, Campomanes CR, Sikat PT, Greenfield AT, Allen PB, McEwen BS. Estrogen induces phosphorylation of cyclic AMP response element binding (pCREB) in primary hippocampal cells in a time-dependent manner. *Neuroscience.* 2004;124(3):549-60.
- Lee VM, Balin BJ, Otvos L Jr, Trojanowski JQ. A68: a major subunit of paired helical filaments and derivatized forms of normal Tau. *Science.* 1991 Feb 8;251(4994):675-8.
- Lemere CA, Lopera F, Kosik KS, Lendon CL, Ossa J, Saido TC, Yamaguchi H, Ruiz A, Martinez A, Madrigal L, Hincapie L, Arango JC, Anthony DC, Koo EH, Goate AM, Selkoe DJ, Arango JC. The E280A presenilin 1 Alzheimer mutation produces increased A beta 42 deposition and severe cerebellar pathology. *Nat Med.* 1996 Oct;2(10):1146-50.
- Lephart ED, Husmann DA. Altered brain and pituitary androgen metabolism by prenatal, perinatal or pre- and postnatal finasteride, flutamide or dihydrotestosterone treatment in juvenile male rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 1993;17(6):991-1003.
- LeRoith D, Werner H, Faria TN, Kato H, Adamo M, Roberts CT Jr. Insulin-like growth factor receptors. Implications for nervous system function. *Ann N Y Acad Sci.* 1993;692:22-32. Review.
- Lester-Coll N, Rivera EJ, Soscia SJ, Doiron K, Wands JR, de la Monte SM. Intracerebral streptozotocin model of type 3 diabetes: relevance to sporadic Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2006;9(1):13-33.
- Levy-Lahad E, Wasco W, Poorkai P, et al. Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science* 1995;269:973-977.
- Li L, Hölscher C. Common pathological processes in Alzheimer disease and type 2 diabetes: a review. *Brain Res Rev.* 2007;56(2):384-402. Review.
- Li, Z., Hong, K., Saltsman, P., DeShields, S., Bellman, M., Thames, G., Liu, Y., Wang, H.J., Elashoff, R., Heber, D., 2005. Long-term efficacy of soy-based meal replacements vs an individualized diet plan in obese type II DM patients: relative effects on weight loss, metabolic parameters, and C-reactive protein. *Eur. J. Clin. Nutr.* 59, 411–418.
- Liang WS, Reiman EM, Valla J, Dunckley T, Beach TG, Grover A, Niedzielko TL, Schneider LE, Mastroeni D, Caselli R, Kukull W, Morris JC, Hulette CM, Schmechel D, Rogers J, Stephan DA. Alzheimer's disease is associated with reduced expression of energy metabolism genes in posterior cingulate neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(11):4441-6.
- Licastro F, Parnetti L, Morini MC, Davis LJ, Cucinotta D, Gaiti A, Senin U. Acute phase reactant alpha 1-antichymotrypsin is increased in cerebrospinal fluid and serum of patients with probable Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord.* 1995;9(2):112-8.
- Lin TH, Rosales C, Mondal K, Bolen JB, Haskill S, Juliano RL. Integrin-mediated tyrosine phosphorylation and cytokine message induction in monocytic cells. A possible signaling role for the Syk tyrosine kinase. *J Biol Chem.* 1995 Jul 7;270(27):16189-97.
- Ling X, Martins RN, Racchi M, Craft S, Helmerhorst E. Amyloid beta antagonizes insulin promoted secretion of the amyloid beta protein precursor. *J Alzheimers Dis.* 2002;4(5):369-74.
- Lisanti MP, Scherer PE, Tang Z, Sargiacomo M. Caveolae, caveolin and caveolin-rich membrane domains: a signalling hypothesis. *Trends Cell Biol.* 1994 Jul;4(7):231-5.
- Liu Y, Liu F, Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Gong CX. Decreased glucose transporters correlate to abnormal hyperphosphorylation of tau in Alzheimer disease. *FEBS Lett.* 2008;582(2):359-64.
- Lopez-Perez E, Zhang Y, Frank SJ, Creemers J, Seidah N, Checler F. Constitutive α -secretase cleavage of the β -amyloid precursor protein in the furin-deficient LoVo cell line: involvement of the pro-hormone convertase 7 and the disintegrin metalloprotease ADAM-10. *J. Neurochem* 2001;76:1532–9.

- Lorenzo A, Yankner BA. Beta-amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by congo red. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Dec 6;91(25):12243-7.
- Lovestone S, Reynolds CH, Latimer D, Davis DR, Anderton BH, Gallo JM, Hanger D, Mulot S, Marquardt B, Stabel S, et al. Alzheimer's disease-like phosphorylation of the microtubule-associated protein tau by glycogen synthase kinase-3 in transfected mammalian cells. *Curr Biol*. 1994;4(12):1077-86.
- Lu YP, Zeng M, Hu XY, Xu H, Swaab DF, Ravid R, Zhou JN. Estrogen receptor alpha-immunoreactive astrocytes are increased in the hippocampus in Alzheimer's disease. *Exp Neurol*. 2003 Oct;183(2):482-8.
- Lukiw WJ, Zhao Y, Cui JG. An NF-kappaB-sensitive micro RNA-146a-mediated inflammatory circuit in Alzheimer disease and in stressed human brain cells. *J Biol Chem*. 2008;283:31315-22.
- Maes M, DeVos N, Wauters A, Demedts P, Maurits VW, Neels H, Bosmans E, Altamura C, Lin A, Song C, Vandenbroucke M, Scharpe S. Inflammatory markers in younger vs elderly normal volunteers and in patients with Alzheimer's disease. *J Psychiatr Res*. 1999;33(5):397-405.
- Maki PM, Zonderman AB, Resnick SM. Enhanced verbal memory in nondemented elderly women receiving hormone-replacement therapy. *Am J Psychiatry*. 2001 Feb;158(2):227-33.
- Makela, S., Davis, V.L., Tally, W.C., Korkman, J., Salo, L., Vihko, R., Santti, R., Korach, K.S., 1994. Dietary estrogens act through estrogen receptor-mediated processes and show no antiestrogenicity in cultured breast cancer cells. *Environ. Health Perspect*. 102, 572–578.
- Makela, S., Santti, R., Salo, L., McLachlan, J.A., 1995. Phytoestrogens are partial estrogen agonists in the adult male mouse. *Environ. Health Perspect*. 103 (Suppl 7), 123–127.
- Mandelkow EM, Stamer K, Vogel R, Thies E, Mandelkow E. Clogging of axons by tau, inhibition of axonal traffic and starvation of synapses. *Neurobiol Aging*. 2003;24(8):1079-85.
- Manly JJ, Merchant CA, Jacobs DM, Small SA, Bell K, Ferin M, Mayeux R. Endogenous estrogen levels and Alzheimer's disease among postmenopausal women. *Neurology*. 2000 Feb 22;54(4):833-7.
- Mann DMA, Iwatsubo T, Cairns NJ, et al. Amyloid beta protein (Abeta) deposition in chromosome 14-linked Alzheimer's disease predominance of A-beta (42/43). *Ann Neurol* 1996;40:149-156.
- Marcus DL, Thomas C, Rodriguez C, Simberkoff K, Tsai JS, Strafci JA, Freedman ML. Increased peroxidation and reduced antioxidant enzyme activity in Alzheimer's disease. *Exp Neurol*. 1998;150(1):40-4.
- Marilyn MR. Preliminary Evaluation of Besipirdine for the Treatment of Alzheimer's Disease. - THE NEUROBIOLOGY OF ALZHEIMER'S DISEASE, Vol. 777 of the Annals of the New York Academy of Sciences, January 17, 1996 – Contributing author as participating investigator. Member of The Besipirdine Study Group.
- Marin DB, Green CR, Schmeidler J, Harvey PD, Lawlor BA, Ryan TM, Aryan M, Davis KL, Mohs RC. Noncognitive disturbances in Alzheimer's disease: frequency, longitudinal course, and relationship to cognitive symptoms. *J Am Geriatr Soc*. 1997 Nov;45(11):1331-8.
- Marshburn PB, Zhang J, Bahrani-Mostafavi Z, Matthews ML, White J, Hurst BS. Variant progesterone receptor mRNAs are co-expressed with the wild-type progesterone receptor mRNA in human endometrium during all phases of the menstrual cycle. *Mol Hum Reprod*. 2005;11(11):809-15.
- Matsumoto K, Hirano K, Nozaki S, Takamoto A, Nishida M, Nakagawa-Toyama Y, Janabi MY, Ohya T, Yamashita S, Matsuzawa Y. Expression of macrophage (Mphi) scavenger receptor, CD36, in cultured human aortic smooth muscle cells in association with expression of peroxisome proliferator activated receptor-gamma, which regulates gain of Mphi-like phenotype in vitro, and its implication in atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000 Apr;20(4):1027-32.
- Mattson MP, Barger SW, Cheng B, Lieberburg I, Smith-Swintosky VL, Rydel RE. beta-Amyloid precursor protein metabolites and loss of neuronal Ca²⁺ homeostasis in Alzheimer's disease. *Trends Neurosci*. 1993 Oct;16(10):409-14. Review.

- Mattson MP, Rydel RE. beta-Amyloid precursor protein and Alzheimer's disease: the peptide plot thickens. *Neurobiol Aging*. 1992 Sep-Oct;13(5):617-21. Review.
- Maxeiner H, Husemann J, Thomas CA, Loike JD, El Khoury J, Silverstein SC. Complementary roles for scavenger receptor A and CD36 of human monocyte-derived macrophages in adhesion to surfaces coated with oxidized low-density lipoproteins and in secretion of H₂O₂. *J Exp Med*. 1998 Dec 21;188(12):2257-65.
- Mayeux R, Ottman R, Maestre G, Ngai C, Tang MX, Ginsberg H, Chun M, Tycko B, Shelanski M. Synergistic effects of traumatic head injury and apolipoprotein-epsilon 4 in patients with Alzheimer's disease. *Neurology*. 1995 Mar;45(3 Pt 1):555-7.
- McCusker SM, Curran MD, Dynan KB, McCullagh CD, Urquhart DD, Middleton D, Patterson CC, McIlroy SP, Passmore AP. Association between polymorphism in regulatory region of gene encoding tumour necrosis factor alpha and risk of Alzheimer's disease and vascular dementia: a case-control study. *Lancet*. 2001;357(9254):436-9.
- McDermott JR, Gibson AM. Degradation of Alzheimer's beta-amyloid protein by human and rat brain peptidases: involvement of insulin-degrading enzyme. *Neurochem Res*. 1997;22(1):49-56.
- McDonald D., Bamberger M., Combs C. *et al.*, β -Amyloid fibril activate parallel mitogen-activated protein kinase pathways in and THP-1 monocytes. *J Neurosci* 1998 18:4451-4460.
- McDonald DR, Brunden KR, Landreth GE. Amyloid fibrils activate tyrosine kinase-dependent signaling and superoxide production in microglia. *J Neurosci*. 1997 Apr 1;17(7):2284-94.
- McGeer PL, McGeer EG. Anti-inflammatory drugs in the fight against Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci*. 1996 Jan 17;777:213-20. Review.
- McGeer PL, Schulzer M, McGeer EG. Arthritis and anti-inflammatory agents as possible protective factors for Alzheimer's disease: a review of 17 epidemiologic studies. *Neurology*. 1996 Aug;47(2):425-32.
- McGilvray ID, Serghides L, Kapus A, Rotstein OD, Kain KC. Nonopsonic monocyte/macrophage phagocytosis of *Plasmodium falciparum*-parasitized erythrocytes: a role for CD36 in malarial clearance. *Blood*. 2000 Nov 1;96(9):3231-40.
- McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology*. 1984 Jul;34(7):939-44.
- Meda L, Cassatella MA, Szendrei GI, Otvos L Jr, Baron P, Villalba M, Ferrari D, Rossi F. Activation of microglial cells by beta-amyloid protein and interferon-gamma. *Nature*. 1995 Apr 13;374(6523):647-50.
- Mega MS, Thompson PM, Cummings JL, Back CL, Xu ML, Zohoori S, Goldkorn A, Moussai J, Fairbanks L, Small GW, Toga AW. Sulcal variability in the Alzheimer's brain: correlations with cognition. *Neurology*. 1998 Jan;50(1):145-51.
- Melo JB, Agostinho P, Oliveira CR. Amyloid beta-peptide 25-35 reduces [3H]acetylcholine release in retinal neurons. Involvement of metabolic dysfunction. *Amyloid*. 2002;9(4):221-8.
- Messier C. Diabetes, Alzheimer's disease and apolipoprotein genotype. *Exp Gerontol*. 2003;38(9):941-6. Review.
- Mezey E, Key S, Vogelsang G, Szalayova I, Lange GD, Crain B. Transplanted bone marrow generates new neurons in human brains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Feb 4;100(3):1364-9. Epub 2003 Jan 21.
- Milward EA, Papadopoulos R, Fuller SJ, Moir RD, Small D, Beyreuther K, et al. The amyloid protein precursor of Alzheimer's disease is a mediator of the effects of nerve growth factor on neurite outgrowth. *Neuron* 1992;9:129-37.
- Mirra SS, Hart MN, Terry RD. Making the diagnosis of Alzheimer's disease. A primer for practicing pathologists. *Arch Pathol Lab Med*. 1993 Feb;117(2):132-44. Review.

- Mirra SS, Heyman A, McKeel D, Sumi SM, Crain BJ, Brownlee LM, Vogel FS, Hughes JP, van Belle G, Berg L. The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD). Part II. Standardization of the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Neurology*. 1991 Apr;41(4):479-86.
- Mitchell E Sullivan, Fugate Woods N. Midlife women's attributions about perceived memory changes: observations from the Seattle Midlife Women's Health Study. *J Womens Health Gen Based Med*. 2001 May;10(4):351-62.
- Moloney AM, Griffin RJ, Timmons S, O'Connor R, Ravid R, O'Neill C. Defects in IGF-1 receptor, insulin receptor and IRS-1/2 in Alzheimer's disease indicate possible resistance to IGF-1 and insulin signalling. *Neurobiol Aging*. 2008 May 12.
- Moore KJ, El Khoury J, Medeiros LA, Terada K, Geula C, Luster AD, Freeman MW A CD36-initiated signaling cascade mediates inflammatory effects of beta-amyloid. *J Biol Chem*. 2002 Dec 6;277(49):47373-9.
- Moreira PI, Santos MS, Moreno A, Oliveira C. Amyloid beta-peptide promotes permeability transition pore in brain mitochondria. *Biosci Rep*. 2001;21(6):789-800.
- Moreira PI, Santos MS, Moreno A, Rego AC, Oliveira C. Effect of amyloid beta-peptide on permeability transition pore: a comparative study. *J Neurosci Res*. 2002;69(2):257-67.
- Moreira PI, Santos MS, Moreno AM, Seïça R, Oliveira CR. Increased vulnerability of brain mitochondria in diabetic (Goto-Kakizaki) rats with aging and amyloid-beta exposure. *Diabetes*. 2003;52(6):1449-56.
- Moreira PI, Santos MS, Seïça R, Oliveira CR. Brain mitochondrial dysfunction as a link between Alzheimer's disease and diabetes. *J Neurol Sci*. 2007;257(1-2):206-14. Epub 2007 Feb 20. Review.
- Moreira PI, Siedlak SL, Wang X, Santos MS, Oliveira CR, Tabaton M, Nunomura A, Szweda LI, Aliev G, Smith MA, Zhu X, Perry G. Autophagocytosis of mitochondria is prominent in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2007;66(6):525-32.
- Moreira PI, Siedlak SL, Wang X, Santos MS, Oliveira CR, Tabaton M, Nunomura A, Szweda LI, Aliev G, Smith MA, Zhu X, Perry G. Increased autophagic degradation of mitochondria in Alzheimer disease. *Autophagy*. 2007;3(6):614-5.
- Mori F, Lai CC, Fusi F, Giacobini E. Cholinesterase inhibitors increase secretion of APPs in rat brain cortex. *Neuroreport*. 1995 Mar 7;6(4):633-6.
- Morris JC, Price AL. Pathologic correlates of nondemented aging, mild cognitive impairment, and early-stage Alzheimer's disease. *J Mol Neurosci*. 2001 Oct;17(2):101-18. Review.
- Mosconi L, Tsui WH, De Santi S, Li J, Rusinek H, Convit A, Li Y, Boppana M, de Leon MJ. Reduced hippocampal metabolism in MCI and AD: automated FDG-PET image analysis. *Neurology*. 2005 Jun 14;64(11):1860-7.
- Motter R, Vigo-Pelfrey C, Kholodenko D, Barbour R, Johnson-Wood K, Galasko D, Chang L, Miller B, Clark C, Green R, et al. Reduction of beta-amyloid peptide42 in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. *Ann Neurol*. 1995 Oct;38(4):643-8.
- Multhaup G, Ruppert T, Schlicksupp A, Hesse L, Behr D, Masters CL, et al. The amyloid precursor protein of Alzheimer's disease in the reduction of copper(II) to copper(I). *Science* 1996;271:1406-9.
- Mutisya EM, Bowling AC, Beal MF. Cortical cytochrome oxidase activity is reduced in Alzheimer's disease. *J Neurochem*. 1994;63(6):2179-84.
- Nagy L, Tontonoz P, Alvarez JG, Chen H, Evans RM. Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma. *Cell*. 1998 Apr 17;93(2):229-40.
- Nakagawa-Toyama Y, Yamashita S, Miyagawa J, Nishida M, Nozaki S, Nagaretani H, Sakai N, Hiraoka H, Yamamori K, Yamane T, Hirano K, Matsuzawa Y. Localization of CD36 and scavenger receptor class A in human coronary arteries--a possible difference in the contribution of both receptors to plaque formation. *Atherosclerosis*. 2001 Jun;156(2):297-305.

- Nakai M, Tanimukai S, Yagi K, Saito N, Taniguchi T, Terashima A, Kawamata T, Yamamoto H, Fukunaga K, Miyamoto E, Tanaka C. Amyloid beta protein activates PKC-delta and induces translocation of myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS) in microglia. *Neurochem Int.* 2001 Jun;38(7):593-600.
- Nakata A, Nakagawa Y, Nishida M, Nozaki S, Miyagawa J, Nakagawa T, Tamura R, Matsumoto K, Kameda-Takemura K, Yamashita S, Matsuzawa Y. CD36, a novel receptor for oxidized low-density lipoproteins, is highly expressed on lipid-laden macrophages in human atherosclerotic aorta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999 May;19(5):1333-9.
- Naruse S, Thinakaran G, Luo JJ, et al. Effects of PS1 deficiency on membrane protein trafficking in neurons. *Neuron* 1998;21:1213-1221.
- Navazo MD, Daviet L, Savill J, Ren Y, Leung LL, McGregor JL. Identification of a domain (155-183) on CD36 implicated in the phagocytosis of apoptotic neutrophils. *J Biol Chem.* 1996 Jun 28;271(26):15381-5.
- Nearly D, Snowden JS, Gustafson L, Passant U, Stuss D, Black S, Freedman M, Kertesz A, Robert PH, Albert M, Boone K, Miller BL, Cummings J, Benson DF. Frontotemporal lobar degeneration: a consensus on clinical diagnostic criteria. *Neurology.* 1998 Dec;51(6):1546-54. Review.
- Newbold RR, Banks EP, Bullock B, Jefferson WN, Uterine adenocarcinoma in mice treated neonatally with genistein, *Cancer Res.* 61 (2001) 4325–4328.
- Nicholson AC, Frieda S, Pearce A, Silverstein RL. Oxidized LDL binds to CD36 on human monocyte-derived macrophages and transfected cell lines. Evidence implicating the lipid moiety of the lipoprotein as the binding site. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995 Feb;15(2):269-75.
- Nicoll JA, Mrak RE, Graham DI, Stewart J, Wilcock G, MacGowan S, Esiri MM, Murray LS, Dewar D, Love S, Moss T, Griffin WS. Association of interleukin-1 gene polymorphisms with Alzheimer's disease. *Ann Neurol.* 2000;47(3):365-8.
- Nilsen J, Brinton RD. Impact of progestins on estrogen-induced neuroprotection: synergy by progesterone and 19-norprogesterone and antagonism by medroxyprogesterone acetate. *Endocrinology.* 2002;143(1):205-12.
- Nilsson LN, Bales KR, DiCarlo G, Gordon MN, Morgan D, Paul SM, Potter H. Alpha-1-antichymotrypsin promotes beta-sheet amyloid plaque deposition in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 2001;21(5):1444-51.
- Nishimura M, Yu G, Levesque G, Zhang DM, Ruel L, Chen F, Milman P, Holmes E, Liang Y, Kawarai T, Jo E, Supala A, Rogava E, Xu DM, Janus C, Levesque L, Bi Q, Duthie M, Rozmahel R, Mattila K, Lannfelt L, Westaway D, Mount HT, Woodgett J, St George-Hyslop P, et al. Presenilin mutations associated with Alzheimer disease cause defective intracellular trafficking of beta-catenin, a component of the presenilin protein complex. *Nat Med.* 1999;5(2):164-9.
- Norbury R, Craig M, Cutter WJ, Whitehead M, Murphy DG. Oestrogen: brain ageing, cognition and neuropsychiatric disorder. *J Br Menopause Soc.* 2004 Sep;10(3):118-22. Review
- Nozaki S, Kashiwagi H, Yamashita S, Nakagawa T, Kostner B, Tomiyama Y, Nakata A, Ishigami M, Miyagawa J, Kameda-Takemura K, et al. Reduced uptake of oxidized low density lipoproteins in monocyte-derived macrophages from CD36-deficient subjects. *J Clin Invest.* 1995 Oct;96(4):1859-65.
- Nukina N, Ihara Y. One of the antigenic determinants of paired helical filaments is related to tau protein. *J Biochem (Tokyo).* 1986 May;99(5):1541-4.
- Nunomura A, Perry G, Aliev G, Hirai K, Takeda A, Balraj EK, Jones PK, Ghanbari H, Wataya T, Shimohama S, Chiba S, Atwood CS, Petersen RB, Smith MA. Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2001;60(8):759-67.
- Nunomura A, Perry G, Pappolla MA, Wade R, Hirai K, Chiba S, Smith MA. RNA oxidation is a prominent feature of vulnerable neurons in Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 1999;19(6):1959-64.

- Ockenhouse CF, Ho M, Tandon NN, Van Seventer GA, Shaw S, White NJ, Jamieson GA, Chulay JD, Webster HK. Molecular basis of sequestration in severe and uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria: differential adhesion of infected erythrocytes to CD36 and ICAM-1. *J Infect Dis*. 1991 Jul;164(1):163-9.
- Ockenhouse CF, Magowan C, Chulay JD. Activation of monocytes and platelets by monoclonal antibodies or malaria-infected erythrocytes binding to the CD36 surface receptor in vitro. *J Clin Invest*. 1989 Aug;84(2):468-75.
- Ohgami N, Nagai R, Ikemoto M, Arai H, Kuniyasu A, Horiuchi S, Nakayama H. CD36, a member of class B scavenger receptor family, is a receptor for advanced glycation end products. *Ann N Y Acad Sci*. 2001 Dec;947:350-5. (a)
- Ohgami N, Nagai R, Miyazaki A, Ikemoto M, Arai H, Horiuchi S, Nakayama H. Scavenger receptor class B type I-mediated reverse cholesterol transport is inhibited by advanced glycation end products. *J Biol Chem*. 2001 Apr 20;276(16):13348-55. Epub 2001 Jan 17. (b)
- Oltersdorf T, Ward PJ, Henriksson T, Beattie EC, Neve R, Lieberburg I, Fritz LC. The Alzheimer amyloid precursor protein. Identification of a stable intermediate in the biosynthetic/degradative pathway. *J Biol Chem*. 1990 Mar 15;265(8):4492-7.
- Oquendo P, Hundt E, Lawler J, Seed B. CD36 directly mediates cytoadherence of *Plasmodium falciparum* parasitized erythrocytes. *Cell*. 1989 Jul 14;58(1):95-101.
- Orgogozo JM, Dartigues JF, Lafont S, Letenneur L, Commenges D, Salamon R, Renaud S, Breteler MB. Wine consumption and dementia in the elderly: a prospective community study in the Bordeaux area. *Rev Neurol (Paris)*. 1997 Apr;153(3):185-92.
- Owen GI, Richer JK, Tung L, Takimoto G, Horwitz KB. Progesterone regulates transcription of the p21(WAF1) cyclin-dependent kinase inhibitor gene through Sp1 and CBP/p300. *J Biol Chem*. 1998;273(17):10696-701.
- Padovani A, Borroni B, Colciaghi F, Pastorino L, Archetti S, Cottini E, Caimi L, Cattabeni F, Di Luca M. Platelet amyloid precursor protein forms in AD: a peripheral diagnostic tool and a pharmacological target. *Mech Ageing Dev*. 2001 Nov;122(16):1997-2004. Review.
- Paganini-Hill A, Henderson VW. Estrogen deficiency and risk of Alzheimer's disease in women. *Am J Epidemiol*. 1994 Aug 1;140(3):256-61.
- Parker WD Jr, Mahr NJ, Filley CM, Parks JK, Hughes D, Young DA, Cullum CM. Reduced platelet cytochrome c oxidase activity in Alzheimer's disease. *Neurology*. 1994;44(6):1086-90.
- Patel SV. Pharmacotherapy of cognitive impairment in Alzheimer's disease: a review. *J Geriatr Psychiatry Neurol*. 1995 Apr;8(2):81-95. Review.
- Patrick GN, Zukerberg L, Nikolic M, de la Monte S, Dikkes P, Tsai LH. Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration. *Nature*. 1999;402(6762):615-22.
- Pei JJ, Khatoon S, An WL, Nordlinger M, Tanaka T, Braak H, Tsujio I, Takeda M, Alafuzoff I, Winblad B, Cowburn RF, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Role of protein kinase B in Alzheimer's neurofibrillary pathology. *Acta Neuropathol*. 2003;105(4):381-92.
- Peila R, Rodriguez BL, Launer LJ; Honolulu-Asia Aging Study. Type 2 diabetes, APOE gene, and the risk for dementia and related pathologies: The Honolulu-Asia Aging Study. *Diabetes*. 2002;51(4):1256-62.
- Pelletier G, El-Alfy M. Immunocytochemical localization of estrogen receptors alpha and beta in the human reproductive organs. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000 Dec;85(12):4835-40.
- Peluso JJ, Pappalardo A, Losel R, Wehling M. Progesterone membrane receptor component 1 expression in the immature rat ovary and its role in mediating progesterone's antiapoptotic action. *Endocrinology*. 2006;147(6):3133-40.
- Peluso JJ, Romak J, Liu X. Progesterone receptor membrane component-1 (PGRMC1) is the mediator of progesterone's antiapoptotic action in spontaneously immortalized granulosa cells as revealed by PGRMC1 small

interfering ribonucleic acid treatment and functional analysis of PGRMC1 mutations. *Endocrinology*. 2008;149(2):534-43.

Perez RG, Soriano S, Hayes JD, Ostaszewski B, Xia W, Selkoe DJ, Chen X, Stokin GB, Koo EH. Mutagenesis identifies new signals for beta-amyloid precursor protein endocytosis, turnover, and the generation of secreted fragments, including Abeta42. *J Biol Chem*. 1999 Jul 2;274(27):18851-6.

Perry EK, Perry RH, Tomlinson BE, Blessed G, Gibson PH. Coenzyme A-acetylating enzymes in Alzheimer's disease: possible cholinergic 'compartment' of pyruvate dehydrogenase. *Neurosci Lett*. 1980;18(1):105-10.

Perry VH, Newman TA, Cunningham C. The impact of systemic infection on the progression of neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurosci*. 2003;4(2):103-12. Review.

Petanceska SS, Nagy V, Frail D, Gandy S. Ovariectomy and 17beta-estradiol modulate the levels of Alzheimer's amyloid beta peptides in brain. *Exp Gerontol*. 2000;35(9-10):1317-25.

Petersen RC, Doody R, Kurz A, Mohs RC, Morris JC, Rabins PV, Ritchie K, Rossor M, Thal L, Winblad B. Current concepts in mild cognitive impairment. *Arch Neurol*. 2001 Dec;58(12):1985-92. Review.

Petersen RC, Smith GE, Ivnik RJ, Tangalos EG, Schaid DJ, Thibodeau SN, Kokmen E, Waring SC, Kurland LT. Apolipoprotein E status as a predictor of the development of Alzheimer's disease in memory-impaired individuals. *JAMA*. 1995 Apr 26;273(16):1274-8. Erratum in: *JAMA* 1995 Aug 16;274(7):538.

Petersen RC, Smith GE, Waring SC, Ivnik RJ, Tangalos EG, Kokmen E. Mild cognitive impairment: clinical characterization and outcome. *Arch Neurol*. 1999 Mar;56(3):303-8. Erratum in: *Arch Neurol* 1999 Jun;56(6):760.

Petersen RC. Mild cognitive impairment as a diagnostic entity. *J Intern Med*. 2004 Sep;256(3):183-94. Review.

Petrakis NL, Barnes S, King EB, Lowenstein J, Wiencke J, Lee MM, Miike R, Kirk M, Coward L. Stimulatory influence of soy protein isolate on breast secretion in pre- and postmenopausal women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 5 (1996) 785-794.

Phillips SM, Sherwin BB. Effects of estrogen on memory function in surgically menopausal women. *Psychoneuroendocrinology*. 1992 Oct;17(5):485-95.

Pike C, Overman MJ, Cotman CW. Amino terminal deletion enhanced aggregation of beta amyloid peptide *in vitro*. *J Biol Chem* 1995;270:23895.

Pino P, Taoufiq Z, Nitchou J, Vouldoukis I, Mazier D. Blood-brain barrier breakdown during cerebral malaria: suicide or murder? *Thromb Haemost*. 2005 Aug;94(2):336-40.

Plassman BL, Breitner JC. Recent advances in the genetics of Alzheimer's disease and vascular dementia with an emphasis on gene-environment interactions. *J Am Geriatr Soc*. 1996 Oct;44(10):1242-50. Review.

Platt N, Gordon S. Is the class A macrophage scavenger receptor (SR-A) multifunctional? - The mouse's tale. *J Clin Invest*. 2001 Sep;108(5):649-54. Review.

Plum L, Schubert M, Brüning JC. The role of insulin receptor signaling in the brain. *Trends Endocrinol Metab*. 2005;16(2):59-65. Review.

Podrez EA, Febbraio M, Sheibani N, Schmitt D, Silverstein RL, Hajjar DP, Cohen PA, Frazier WA, Hoff HF, Hazen SL. Macrophage scavenger receptor CD36 is the major receptor for LDL modified by monocyte-generated reactive nitrogen species. *J Clin Invest*. 2000 Apr;105(8):1095-108. Erratum in: *J Clin Invest* 2000 May;105(10):1483. (a)

Podrez EA, Hoppe G, O'Neil J, Sayre LM, Sheibani N, Hoff HF. Macrophage receptors responsible for distinct recognition of low density lipoprotein containing pyrrole or pyridinium adducts: models of oxidized low density lipoprotein. *J Lipid Res*. 2000 Sep;41(9):1455-63. (b)

- Podrez EA, Poliakov E, Shen Z, Zhang R, Deng Y, Sun M, Finton PJ, Shan L, Gugiu B, Fox PL, Hoff HF, Salomon RG, Hazen SL. Identification of a novel family of oxidized phospholipids that serve as ligands for the macrophage scavenger receptor CD36. *J Biol Chem*. 2002 Oct 11;277(41):38503-16. Epub 2002 Jul 8. (a)
- Podrez EA, Poliakov E, Shen Z, Zhang R, Deng Y, Sun M, Finton PJ, Shan L, Febbraio M, Hajjar DP, Silverstein RL, Hoff HF, Salomon RG, Hazen SL. A novel family of atherogenic oxidized phospholipids promotes macrophage foam cell formation via the scavenger receptor CD36 and is enriched in atherosclerotic lesions. *J Biol Chem*. 2002 Oct 11;277(41):38517-23. Epub 2002 Jul 26. (b)
- Podrez EA, Schmitt D, Hoff HF, Hazen SL. Myeloperoxidase-generated reactive nitrogen species convert LDL into an atherogenic form in vitro. *J Clin Invest*. 1999 Jun;103(11):1547-60.
- Poduslo JF, Curran GL, Haggard JJ, Biere AL, Selkoe DJ. Permeability and residual plasma volume of human, Dutch variant, and rat amyloid beta-protein 1-40 at the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis*. 1997;4(1):27-34.
- Poduslo JF, Curran GL, Sanyal B, Selkoe DJ. Receptor-mediated transport of human amyloid beta-protein 1-40 and 1-42 at the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis*. 1999 Jun;6(3):190-9.
- Pollock NJ, Mirra SS, Binder LI, Hansen LA, Wood JG. Filamentous aggregates in Pick's disease, progressive supranuclear palsy, and Alzheimer's disease share antigenic determinants with microtubule-associated protein, tau. *Lancet*. 1986 Nov 22;2(8517):1211.
- Ponglikitmongkol M, Green S, Chambon P. Genomic organization of the human oestrogen receptor gene. *EMBO J*. 1988 Nov;7(11):3385-8.
- Popken GJ, Hodge RD, Ye P, Zhang J, Ng W, O'Kusky JR, D'Ercole AJ. In vivo effects of insulin-like growth factor-I (IGF-I) on prenatal and early postnatal development of the central nervous system. *Eur J Neurosci*. 2004;19(8):2056-68.
- Porte D Jr, Seeley RJ, Woods SC, Baskin DG, Figlewicz DP, Schwartz MW. Obesity, diabetes and the central nervous system. *Diabetologia*. 1998;41(8):863-81. Review.
- Porter JC, Hogg N. Integrins take partners: cross-talk between integrins and other membrane receptors. *Trends Cell Biol*. 1998 Oct;8(10):390-6. Review.
- Possemiers S, Bolca S, Eeckhaut E, Depypere H, Verstraete W. Metabolism of isoflavones, lignans and prenylflavonoids by intestinal bacteria: producer phenotyping and relation with intestinal community. *FEMS Microbiol Ecol* 2007;61(2):372-83.
- Powlishta KK, Von Dras DD, Stanford A, et al. The clock drawing test is a poor screen for very mild dementia. *Neurology* 2002;59:898-903.
- Praprotnik D, Smith MA, Richey PL, Vinters HV, Perry G. Filament heterogeneity within the dystrophic neurites of senile plaques suggests blockage of fast axonal transport in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*. 1996;91(3):226-35.
- Prelevic GM, Kocjan T, Markou A. Hormone replacement therapy in postmenopausal women. *Minerva Endocrinol*. 2005 Mar;30(1):27-36. Review.
- Puente Navazo MD, Daviet L, Ninio E, McGregor JL. Identification on human CD36 of a domain (155-183) implicated in binding oxidized low-density lipoproteins (Ox-LDL). *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996 Aug;16(8):1033-9.
- Qiu WQ, Walsh DM, Ye Z, Vekrellis K, Zhang J, Podlisny MB, Rosner MR, Safavi A, Hersh LB, Selkoe DJ. Insulin-degrading enzyme regulates extracellular levels of amyloid beta-protein by degradation. *J Biol Chem*. 1998;273(49):32730-8.
- Raiha I, Kaprio J, Koskenvuo M, Rajala T, Sourander L. Dementia in twins. *Lancet*. 1996 Jun 15;347(9016):1706.
- Raina AK, Hochman A, Zhu X, Rottkamp CA, Nunomura A, Siedlak SL, Boux H, Castellani RJ, Perry G, Smith MA. Abortive apoptosis in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*;101(4):305-10.

- Rasgon N, Jarvik L. Insulin resistance, affective disorders, and Alzheimer's disease: review and hypothesis. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2004;59(2):178-83. Review.
- Reale M, Iarlori C, Gambi F, Lucci I, Salvatore M, Gambi D (2005) Acetylcholinesterase inhibitors effects on oncostatin- M, interleukin-1 beta and interleukin-6 release from lymphocytes of Alzheimer's disease patients. *Exp Gerontol* **40**, 165- 171.
- Reed T, Perluigi M, Sultana R, Pierce WM, Klein JB, Turner DM, Coccia R, Markesbery WR, Butterfield DA. Redox proteomic identification of 4-hydroxy-2-nonenal-modified brain proteins in amnesic mild cognitive impairment: insight into the role of lipid peroxidation in the progression and pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis.* 2008;30(1):107-20.
- Reinhardt RR, Bondy CA. Insulin-like growth factors cross the blood-brain barrier. *Endocrinology.* 1994;135(5):1753-61.
- Ren Y, Savill J. Proinflammatory cytokines potentiate thrombospondin-mediated phagocytosis of neutrophils undergoing apoptosis. *J Immunol.* 1995 Mar 1;154(5):2366-74.
- Ren Y, Silverstein RL, Allen J, Savill J. CD36 gene transfer confers capacity for phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *J Exp Med.* 1995 May 1;181(5):1857-62.
- Ren MQ, Kuhn G, Wegner J, Chen J, Isoflavones, substances with multi-biological and clinical properties, *Eur. J. Nutr.* 40 (4) (2001) 135–146.
- Resnick SM, Maki PM. Effects of hormone replacement therapy on cognitive and brain aging. *Ann N Y Acad Sci.* 2001 Dec;949:203-14. Review.
- Ricciarelli R, D'Abramo C, Zingg JM, Giliberto L, Markesbery W, Azzi A, Marinari UM, Pronzato MA, Tabaton M. CD36 overexpression in human brain correlates with beta-amyloid deposition but not with Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med.* 2004 Apr 15;36(8):1018-24.
- Richer JK, Lange CA, Manning NG, Owen G, Powell R, Horwitz KB. Convergence of progesterone with growth factor and cytokine signaling in breast cancer. Progesterone receptors regulate signal transducers and activators of transcription expression and activity. *J Biol Chem.* 1998;273(47):31317-26.
- Rickle A, Bogdanovic N, Volkman I, Winblad B, Ravid R, Cowburn RF. Akt activity in Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Neuroreport.* 2004;15(6):955-9.
- Rigotti A, Acton SL, Krieger M. The class B scavenger receptors SR-BI and CD36 are receptors for anionic phospholipids. *J Biol Chem.* 1995 Jul 7;270(27):16221-4.
- Risner ME, Saunders AM, Altman JF, Ormandy GC, Craft S, Foley IM, Zvartau-Hind ME, Hosford DA, Roses AD; Rosiglitazone in Alzheimer's Disease Study Group. Efficacy of rosiglitazone in a genetically defined population with mild-to-moderate Alzheimer's disease. *Pharmacogenomics J.* 2006;6(4):246-54.
- Ritchie CW, Bush AI, Mackinnon A, Macfarlane S, Mastwyk M, MacGregor L, Kiers L, Cherny R, Li QX, Tammer A, Carrington D, Mavros C, Volitakis I, Xilinas M, Ames D, Davis S, Beyreuther K, Tanzi RE, Masters CL. Metal-protein attenuation with iodochlorhydroxyquin (clioquinol) targeting Abeta amyloid deposition and toxicity in Alzheimer disease: a pilot phase 2 clinical trial. *Arch Neurol.* 2003;60:1685-91
- Rivera EJ, Goldin A, Fulmer N, Tavares R, Wands JR, de la Monte SM. Insulin and insulin-like growth factor expression and function deteriorate with progression of Alzheimer's disease: link to brain reductions in acetylcholine. *J Alzheimers Dis.* 2005;8(3):247-68.
- Robertson CL, Puskar A, Hoffman GE, Murphy AZ, Saraswati M, Fiskum G. Physiologic progesterone reduces mitochondrial dysfunction and hippocampal cell loss after traumatic brain injury in female rats. *Exp Neurol.* 2006;197(1):235-43.
- Rogers J, Strohmeyer R, Kovelowski CJ, Li R. Microglia and inflammatory mechanisms in the clearance of amyloid beta peptide. *Glia.* 2002;40(2):260-9. Review.

- Roher AE, Kasunic TC, Woods AS, Cotter RJ, Ball MJ, Fridman R. Proteolysis of A beta peptide from Alzheimer disease brain by gelatinase A. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994 Dec 30;205(3):1755-61.
- Roof RL, Hoffman SW, Stein DG. Progesterone protects against lipid peroxidation following traumatic brain injury in rats. *Mol Chem Neuropathol*. 1997;31(1):1-11.
- Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, Beresford SA, Howard BV, Johnson KC, Kotchen JM, Ockene J; Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA*. 2002 Jul 17;288(3):321-33.
- Rossouw JE. Hormone replacement therapy and cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol*. 1999 Oct;10(5):429-34. Review.
- Rowland IR, Wiseman H, Sanders TAB, Adlercreutz H, Bowey EA. Interindividual variation in metabolism, of soy isoflavones and lignans: influence of habitual diet on equol production by the gut microflora. *Nutr Cancer* 2000;36(1):27-32.
- Rusinol AE, Yang L, Thewke D, Panini SR, Kramer MF, Sinensky MS. Isolation of a somatic cell mutant resistant to the induction of apoptosis by oxidized low density lipoprotein. *J Biol Chem*. 2000 Mar 10;275(10):7296-303.
- Ryeom SW, Silverstein RL, Scotto A, Sparrow JR. Binding of anionic phospholipids to retinal pigment epithelium may be mediated by the scavenger receptor CD36. *J Biol Chem*. 1996 Aug 23;271(34):20536-9.
- Saatman KE, Contreras PC, Smith DH, Raghupathi R, McDermott KL, Fernandez SC, Sanderson KL, Voddi M, McIntosh TK. Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) improves both neurological motor and cognitive outcome following experimental brain injury. *Exp Neurol*. 1997;147(2):418-27.
- Saitoh T, Sundsmo M, Roch JM, Kimura N, Cole G, Schubert D, Oltersdorf T, Schenk DB Secreted form of amyloid beta protein precursor is involved in the growth regulation of fibroblasts. *Cell*. 1989 Aug 25;58(4):615-22.
- Saito M, Mitsui T, Mizuno T, Genistein represses the induction of prostatic buds by testosterone, *J. Soc. Biol.* 194 (2) (2000) 95-97.
- Salituro GM, Pelaez F, Zhang BB. Discovery of a small molecule insulin receptor activator. *Recent Prog Horm Res*. 2001;56:107-26.
- Salkovic-Petrisic M, Hoyer S. Central insulin resistance as a trigger for sporadic Alzheimer-like pathology: an experimental approach. *J Neural Transm Suppl*. 2007;(72):217-33. Review.
- Sambamurti K, Shioi J, Anderson JP, Pappolla MA, Robakis NK. Evidence for intracellular cleavage of the Alzheimer's amyloid precursor in PC12 cells. *J Neurosci Res*. 1992 Oct;33(2):319-29.
- Sankar R, Thamocharan S, Shin D, Moley KH, Devaskar SU. Insulin-responsive glucose transporters-GLUT8 and GLUT4 are expressed in the developing mammalian brain. *Brain Res Mol Brain Res*. 2002;107(2):157-65.
- Savill J, Hogg N, Ren Y, Haslett C. Thrombospondin cooperates with CD36 and the vitronectin receptor in macrophage recognition of neutrophils undergoing apoptosis. *J Clin Invest*. 1992 Oct;90(4):1513-22.
- Sayre LM, Zelasko DA, Harris PL, Perry G, Salomon RG, Smith MA. 4-Hydroxynonenal-derived advanced lipid peroxidation end products are increased in Alzheimer's disease. *J Neurochem*. 1997;68(5):2092-7.
- Schenk D, Barbour R, Dunn W, Gordon G, Grajeda H, Guido T, et al. Immunization with amyloid β attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* 1999;400:173-7.
- Schlageter NL, Carson RE, Rapoport SI. Examination of blood-brain barrier permeability in dementia of the Alzheimer type with [^{68}Ga]EDTA and positron emission tomography. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1987 Feb;7(1):1-8.

- Schmechel DE, Saunders AM, Strittmatter WJ, Crain BJ, Hulette CM, Joo SH, Pericak-Vance MA, Goldgaber D, Roses AD. Increased amyloid beta-peptide deposition in cerebral cortex as a consequence of apolipoprotein E genotype in late-onset Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Oct 15;90(20):9649-53.
- Schmidt R, Schmidt H, Curb JD, Masaki K, White LR, Launer LJ. Early inflammation and dementia: a 25-year follow-up of the Honolulu-Asia Aging Study. *Ann Neurol*. 2002;52(2):168-74.
- Schonknecht P, Pantel J, Kruse A, Schroder J. Prevalence and natural course of aging-associated cognitive decline in a population-based sample of young-old subjects. *Am J Psychiatry*. 2005 Nov;162(11):2071-7.
- Schubert D, Jin LW, Saitoh T, Cole G. The regulation of amyloid beta protein precursor secretion and its modulatory role in cell adhesion. *Neuron*. 1989 Dec;3(6):689-94. Erratum in: *Neuron* 1990 May;4(5):813.
- Schubert M, Brazil DP, Burks DJ, Kushner JA, Ye J, Flint CL, Farhang-Fallah J, Dikkes P, Warot XM, Rio C, Corfas G, White MF. Insulin receptor substrate-2 deficiency impairs brain growth and promotes tau phosphorylation. *J Neurosci*. 2003;23(18):7084-92.
- Schubert M, Gautam D, Surjo D, Ueki K, Baudler S, Schubert D, Kondo T, Alber J, Galldiks N, Küstermann E, Arndt S, Jacobs AH, Krone W, Kahn CR, Brüning JC. Role for neuronal insulin resistance in neurodegenerative diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(9):3100-5.
- Schulinkamp RJ, Pagano TC, Hung D, Raffa RB. Insulin receptors and insulin action in the brain: review and clinical implications. *Neurosci Biobehav Rev*. 2000;24(8):855-72. Review.
- Selkoe DJ. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev*. 2001 Apr;81(2):741-66. Review.
- Selkoe DJ. Notch and presenilins in vertebrates and invertebrates: implication for neuronal development and degeneration. *Curr Opin Neurobiol* 2000;10:50-57.
- Selkoe DJ. Toward a comprehensive theory for Alzheimer's disease. Hypothesis: Alzheimer's disease is caused by the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid beta-protein. *Ann N Y Acad Sci*. 2000;924:17-25. Review.
- Sengupta A, Wu Q, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Singh TJ. Potentiation of GSK-3-catalyzed Alzheimer-like phosphorylation of human tau by cdk5. *Mol Cell Biochem* 1997;167-99.
- Serghides L, Crandall I, Hull E, Kain KC. The Plasmodium falciparum-CD36 interaction is modified by a single amino acid substitution in CD36. *Blood*. 1998 Sep 1;92(5):1814-9.
- Setchell, K.D., 1998. Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones. *Am. J. Clin. Nutr.* 68, 1333S–1346S.
- Seubert P, Oltersdorf T, Lee MG, Barbour R, Blomquist C, Davis DL, Bryant K, Fritz LC, Galasko D, Thal LJ, et al. Secretion of beta-amyloid precursor protein cleaved at the amino terminus of the beta-amyloid peptide. *Nature*. 1993 Jan 21;361(6409):260-3.
- Seubert P, Vigo-Pelfrey C, Esch F, Lee M, Dovey H, Davis D, Sinha S, Schlossmacher M, Whaley J, Swindlehurst C, et al. Isolation and quantification of soluble Alzheimer's beta-peptide from biological fluids. *Nature*. 1992 Sep 24;359(6393):325-7.
- Shang Y, Brown M. Molecular determinants for the tissue specificity of SERMs. *Science*. 2002 Mar 29;295(5564):2465-8.
- Shaw LM, Korecka M, Clark CM, et al. Biomarkers of neurodegeneration for diagnosis and monitoring therapeutics. *Nat Rev Drug Dis* 2007;6:295-303.
- Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, et al. Cloning a novel gene bearing missense mutations in early onset familial Alzheimer disease. *Nature* 1995;375:754-760.
- Shiau AK, Barstad D, Loria PM, Cheng L, Kushner PJ, Agard DA, Greene GL. The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. *Cell*. 1998 Dec 23;95(7):927-37.

- Shin RW, Lee VM, Trojanowski JQ. Aluminum modifies the properties of Alzheimer's disease PHF tau proteins in vivo and in vitro. *J Neurosci*. 1994 Nov;14(11 Pt 2):7221-33.
- Shoji M, Golde TE, Ghiso J, Cheung TT, Estus S, Shaffer LM, Cai XD, McKay DM, Tintner R, Frangione B, et al. Production of the Alzheimer amyloid beta protein by normal proteolytic processing. *Science*. 1992 Oct 2;258(5079):126-9.
- Shumaker SA, Legault C, Kuller L, Rapp SR, Thal L, Lane DS, Fillit H, Stefanick ML, Hendrix SL, Lewis CE, Masaki K, Coker LH; Women's Health Initiative Memory Study. Conjugated equine estrogens and incidence of probable dementia and mild cognitive impairment in postmenopausal women: Women's Health Initiative Memory Study. *JAMA*. 2004 Jun 23;291(24):2947-58.
- Shumaker SA, Legault C, Rapp SR, Thal L, Wallace RB, Ockene JK, Hendrix SL, Jones BN 3rd, Assaf AR, Jackson RD, Kotchen JM, Wassertheil-Smoller S, Wactawski-Wende J; WHIMS Investigators. Estrogen plus progestin and the incidence of dementia and mild cognitive impairment in postmenopausal women: the Women's Health Initiative Memory Study: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2003 May 28;289(20):2651-62.
- Shupnik MA, Pitt LK, Soh AY, Anderson A, Lopes MB, Laws ER Jr. Selective expression of estrogen receptor alpha and beta isoforms in human pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998 Nov;83(11):3965-72.
- Silverstein RL, Asch AS, Nachman RL. Glycoprotein IV mediates thrombospondin-dependent platelet-monocyte and platelet-U937 cell adhesion. *J Clin Invest*. 1989 Aug;84(2):546-52.
- Simoncini T, Genazzani AR, De Caterina R. Towards a molecular understanding of the atheroprotective effects of estrogens: a review of estrogen effects on endothelial activation. *Ital Heart J*. 2000 Feb;1(2):104-7. Review.
- Simons M, Schwärzler F, Lütjohann D, von Bergmann K, Beyreuther K, Dichgans J, Wormstall H, Hartmann T, Schulz JB, et al. Treatment with simvastatin in normocholesterolemic patients with Alzheimer's disease: a 26-week randomized, placebo-controlled, double-blind trial. *Ann Neurol* 2002;52: 346–50.
- Simpkins JW, Dykens JA. Mitochondrial mechanisms of estrogen neuroprotection. *Brain Res Rev*. 2008;57(2):421-30.
- Sims NR, Bowen DM, Allen SJ, Smith CC, Neary D, Thomas DJ, Davison AN. Presynaptic cholinergic dysfunction in patients with dementia. *J Neurochem*. 1983;40(2):503-9.
- Singer CA, Figueroa-Masot XA, Batchelor RH, Dorsa DM. The mitogen-activated protein kinase pathway mediates estrogen neuroprotection after glutamate toxicity in primary cortical neurons. *J Neurosci*. 1999;19(7):2455-63.
- Singh M, Sétáló G Jr, Guan X, Warren M, Toran-Allerand CD. Estrogen-induced activation of mitogen-activated protein kinase in cerebral cortical explants: convergence of estrogen and neurotrophin signaling pathways. *J Neurosci*. 1999;19(4):1179-88.
- Singh M. Ovarian hormones elicit phosphorylation of Akt and extracellular-signal regulated kinase in explants of the cerebral cortex. *Endocrine*. 2001;14(3):407-15.
- Sinha S, Dovey HF, Seubert P, Ward PJ, Blacher RW, Blaber M, Bradshaw RA, Arici M, Mobley WC, Lieberburg I. The protease inhibitory properties of the Alzheimer's beta-amyloid precursor protein. *J Biol Chem*. 1990 Jun 5;265(16):8983-5.
- Sirtori CR, Arnoldi A, Johnson SK. Phytoestrogens: end of a tale? *Ann Med* 2005;37(6):423–38.
- Sisodia SS, Koo EH, Beyreuther K, Unterbeck A, Price DL. Evidence that beta-amyloid protein in Alzheimer's disease is not derived by normal processing. *Science*. 1990 Apr 27;248(4954):492-5.
- Sisodia SS. Beta-amyloid precursor protein cleavage by a membrane-bound protease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Jul 1;89(13):6075-9.

- Skoog I, Berg S, Johansson B, Palmertz B, Andreasson LA. The influence of white matter lesions on neuropsychological functioning in demented and non-demented 85-year-olds. *Acta Neurol Scand.* 1996 Feb-Mar;93(2-3):142-8.
- Small DH, Nurcombe V, Reed G, Clarris H, Moir R, Beyreuther K, et al. A heparin-binding domain in the amyloid protein precursor of Alzheimer's disease is involved in the regulation of neurite outgrowth. *J Neurosci* 1994;14:2117-27.
- Small GW, Komo S, La Rue A, Saxena S, Phelps ME, Mazziotta JC, Saunders AM, Haines JL, Pericak-Vance MA, Roses AD. Early detection of Alzheimer's disease by combining apolipoprotein E and neuroimaging. *Ann N Y Acad Sci.* 1996;802:70-8.
- Small GW, Leuchter AF, Mandelkern MA, La Rue A, Okonek A, Lufkin RB, Jarvik LF, Matsuyama SS, Bondareff W. Clinical, neuroimaging, and environmental risk differences in monozygotic female twins appearing discordant for dementia of the Alzheimer type. *Arch Neurol.* 1993 Feb;50(2):209-19.
- Smith MA, Perry G, Richey PL, Sayre LM, Anderson VE, Beal MF, Kowall N. Oxidative damage in Alzheimer's. *Nature.* 1996;382(6587):120-1.
- Smith MA, Richey Harris PL, Sayre LM, Beckman JS, Perry G. Widespread peroxynitrite-mediated damage in Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 1997;17(8):2653-7.
- Smith MA, Richey PL, Taneda S, Kutty RK, Sayre LM, Monnier VM, Perry G. Advanced Maillard reaction end products, free radicals, and protein oxidation in Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci.* 1994;738:447-54. Review.
- Smith MA, Sayre LM, Monnier VM, Perry G. Radical AGEing in Alzheimer's disease. *Trends Neurosci.* 1995;18(4):172-6. Review.
- Smith PM, Cowan A, White BA The low-density lipoprotein receptor is regulated by estrogen and forms a functional complex with the estrogenregulated protein ezrin in pituitary GH3 somatolactotropes. *Endocrinology.* 2004;145:3075–3083.
- Snow AD, Kinsella MG, Parks E, Sekiguchi RT, Miller JD, Kimata K, Wight TN. Differential binding of vascular cell-derived proteoglycans (perlecan, biglycan, decorin, and versican) to the beta-amyloid protein of Alzheimer's disease. *Arch Biochem Biophys.* 1995 Jun 20;320(1):84-95.
- Sobel E, Davanipour Z, Sulkava R, Erkinjuntti T, Wikstrom J, Henderson VW, Buckwalter G, Bowman JD, Lee PJ. Occupations with exposure to electromagnetic fields: a possible risk factor for Alzheimer's disease. *Am J Epidemiol.* 1995 Sep 1;142(5):515-24.
- Sorbi S, Bird ED, Blass JP. Decreased pyruvate dehydrogenase complex activity in Huntington and Alzheimer brain. *Ann Neurol.* 1983;13(1):72-8.
- Soules MR, Sherman S, Parrott E, Rebar R, Santoro N, Utian W, Woods N. Executive summary: Stages of Reproductive Aging Workshop (STRAW). *Climacteric.* 2001 Dec;4(4):267-72.
- Spinnler H, Della Sala S. The role of clinical neuropsychology in the neurological diagnosis of Alzheimer's disease. *J Neurol.* 1988 May;235(5):258-71. Review.
- Steen E, Terry BM, Rivera EJ, Cannon JL, Neely TR, Tavares R, Xu XJ, Wands JR, de la Monte SM. Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease--is this type 3 diabetes? *J Alzheimers Dis.* 2005;7(1):63-80.
- Steinberg D., Lewis A. Conner Memorial Lecture. Oxidative modification of LDL and atherogenesis. *Circulation.* 1997 95:1062-1071.
- Stoica A, Pentecost E, Martin MB. Effects of arsenite on estrogen receptor-alpha expression and activity in MCF-7 breast cancer cells. *Endocrinology.* 2000 Oct;141(10):3595-602.

- Straface E, Matarrese P, Gambardella L, Vona R, Sgadari A, Silveri MC, Malorni W. Oxidative imbalance and cathepsin D changes as peripheral blood biomarkers of Alzheimer disease: a pilot study. *FEBS Lett.* 2005;579(13):2759-66.
- Strittmatter WJ, Weisgraber KH, Huang DY, Dong LM, Salvesen GS, Pericak-Vance M, Schmechel D, Saunders AM, Goldgaber D, Roses AD. Binding of human apolipoprotein E to synthetic amyloid beta peptide: isoform-specific effects and implications for late-onset Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Sep 1;90(17):8098-102.
- Sugihara K, Sugihara T, Mohandas N, Hebbel RP. Thrombospondin mediates adherence of CD36+ sickle reticulocytes to endothelial cells. *Blood.* 1992 Nov 15;80(10):2634-42.
- Summers WK, Viesselman JO, Marsh GM, Candelora K. Use of THA in treatment of Alzheimer's-like dementia. *Biological Psychiatry.* 1981 16: 95-98.
- Sun YX, Wright HT, Janciauskiene S. Alpha1-antichymo- trypsin/Alzheimer's peptide Abeta(1-42) complex perturbs lipid metabolism and activates transcription factors PPARgamma and NFkappaB in human neuroblastoma (Kelly) cells. *J Neurosci Res* 2002 67:511-522.
- Sunderland T, Linker G, Mirza N, et al. Decreased b-amyloid1-42 and increased Tau levels in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer disease- *JAMA* 2003;289:2094-2103.
- Suzuki H, Kurihara Y, Takeya M, Kamada N, Kataoka M, Jishage K, Sakaguchi H, Kruijt JK, Higashi T, Suzuki T, van Berkel TJ, Horiuchi S, Takahashi K, Yazaki Y, Kodama T. The multiple roles of macrophage scavenger receptors (MSR) in vivo: resistance to atherosclerosis and susceptibility to infection in MSR knockout mice. *J Atheroscler Thromb.* 1997;4(1):1-11. Review.
- Suzuki N, Cheung TT, Cai XD, Odaka A, Otvos L Jr, Eckman C, Golde TE, Younkin SG. An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (beta APP717) mutants. *Science.* 1994 May 27;264(5163):1336-40.
- Tabaton M, Perry G, Smith M, Vitek M, Angelini G, Dapino D, Garibaldi S, Zaccheo D, Odetti P. Is amyloid beta-protein glycosylated in Alzheimer's disease? *Neuroreport.* 1997;8(4):907-9.
- Tagliavini F, Giaccone G, Frangione B, Bugiani O. Preamyloid deposits in the cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease and nondemented individuals. *Neurosc Lett* 1988;93:191-196.
- Tandon NN, Kralisz U, Jamieson GA. Identification of glycoprotein IV (CD36) as a primary receptor for platelet-collagen adhesion. *J Biol Chem.* 1989 May 5;264(13):7576-83.
- Tanzi RE, McClatchey AI, Lamperti ED, Villa-Komaroff L, Gusella JF, Neve RL. Protease inhibitor domain encoded by an amyloid protein precursor mRNA associated with Alzheimer's disease. *Nature.* 1988 Feb 11;331(6156):528-30.
- Tataryn IV, Meldrum DR, Lu KH, Frumar AM, Judd HL, LH, FSH and skin temperature during the menopausal hot flash, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 49 (1979) 152-154.
- Teller JK, Russo C, DeBusk LM, Angelini G, Zaccheo D, Dagna-Bricarelli F, Scartezzini P, Bertolini S, Mann DM, Tabaton M, Gambetti P. Presence of soluble amyloid beta-peptide precedes amyloid plaque formation in Down's syndrome. *Nat Med.* 1996 Jan;2(1):93-5.
- Terry RD, Hansen LA, DeTeresa R, Davies P, Tobias H, Katzman R. Senile dementia of the Alzheimer type without neocortical neurofibrillary tangles. *J Neuropath Exp Neurol* 1987;46:262-268.
- Terry RD., Katzman R., Bick KL. *et al.*, Alzheimer's Disease, Second edition, 1999 Lippincott, Williams and Wilkins.
- Thal, Lj, Kantarci K, Reiman EM, et al. The role of biomarkers in clinical trials for Alzheimer's disease. *Alzheimer Dis assoc Disord* 2006;20;6-15.

- This P, De La Rochefordiere A, Clough K, Fourquet A, Magdelenat H. Phytoestrogens after breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 2001;8(2):129–34. [2] Bringer J, Raingeard I, Lefebvre P, Renard E. Menopause: towards treatment “à la carte”. *Ann Endocrinol* 2003;64(4):337–44.
- Thomas T, Rhodin J. Vascular actions of estrogen and Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci.* 2000 Apr;903:501-9.
- Tokuda T, Fukushima T, Ikeda S, et al. Plasma levels of amyloid beta proteins Abeta1-40 and Abeta1-42(43) are elevated in Down's syndrome. *Ann Neurol* 1997;41:271-273.
- Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM. Regulation of adipocyte gene expression and differentiation by peroxisome proliferator activated receptor gamma. *Curr Opin Genet Dev.* 1995 Oct;5(5):571-6. Review.
- Tontonoz P, Nagy L, Alvarez JG, Thomazy VA, Evans RM. PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell.* 1998 Apr 17;93(2):241-52.
- Torres-Aleman I. Insulin-like growth factors as mediators of functional plasticity in the adult brain. *Horm Metab Res.* 1999;31(2-3):114-9. Review.
- Torsello A, Bresciani E, Rossoni G, Avallone R, Tulipano G, Cocchi D, Bulgarelli I, Deghenghi R, Berti F, Locatelli V. Ghrelin plays a minor role in the physiological control of cardiac function in the rat. *Endocrinology.* 2003 May;144(5):1787-92.
- Toung TJ, Traystman RJ, Hurn PD. Estrogen-mediated neuroprotection after experimental stroke in male rats. *Stroke.* 1998;29(8):1666-70.
- Trevoux R, De Brux J, Castanier M, Nahoul K, Soule JP, Scholler R. Endometrium and plasma hormone profile in the peri-menopause and post-menopause. *Maturitas.* 1986 Dec;8(4):309-26.
- Trigatti B, Rayburn H, Vinals M, Braun A, Miettinen H, Penman M, Hertz M, Schrenzel M, Amigo L, Rigotti A, Krieger M. Influence of the high density lipoprotein receptor SR-BI on reproductive and cardiovascular pathophysiology. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Aug 3;96(16):9322-7.
- Turski L, Ikonomidou C, Turski WA, Bortolotto ZA, Cavalheiro EA. Review: cholinergic mechanisms and epileptogenesis. The seizures induced by pilocarpine: a novel experimental model of intractable epilepsy. *Synapse.* 1989;3(2):154-71. Review.
- Tuszynski MH, Thal L, Pay M, Salmon DP, U HS, Bakay R, Patel P, Blesch A, Vahlsing HL, Ho G, Tong G, Potkin SG, Fallon J, Hansen L, Mufson EJ, Kordower JH, Gall C, Conner J. A phase 1 clinical trial of nerve growth factor gene therapy for Alzheimer disease. *Nat Med.* 2005;11:551-5.
- Uberti D, Rizzini C, Galli P, Pizzi M, Grilli M, Lesage A, Spano P, Memo M. Priming of cultured neurons with sabeluzole results in long-lasting inhibition of neurotoxin-induced tau expression and cell death. *Synapse.* 1997 Jun;26(2):95-103. (b)
- Uberti D, Rizzini C, Spano PF, Memo M. Characterization of tau proteins in human neuroblastoma SH-SY5Y cell line. *Neurosci Lett.* 1997 Oct 17;235(3):149-53. (a)
- Uittenbogaard A, Shaul PW, Yuhanna IS, Blair A, Smart EJ. High density lipoprotein prevents oxidized low density lipoprotein-induced inhibition of endothelial nitric-oxide synthase localization and activation in caveolae. *J Biol Chem.* 2000 Apr 14;275(15):11278-83.
- Ulrich J, Meier-Ruge W, Probst A, Meier E, Ipsen S. Senile plaques: staining for acetylcholinesterase and A4 protein: a comparative study in the hippocampus and entorhinal cortex. *Acta Neuropathol.* 1990;80(6):624-8.
- Unnikrishnan AG, Rajaratnam S. An approach to postmenopausal osteoporosis. *Natl Med J India.* 2000;13(3):145-6.
- Usui *Endocrine Journal* 2006, 53 (1) ,7-20 Pharmaceutical Prospects of Phytoestrogens
- Velentzis LS, Woodside JV, Cantwell MM, Leathem AJ, Keshtgar MR. Do phytoestrogen reduce the risk of breast cancer and breast cancer recurrence? What clinicians need to know. *Eur J Cancer* 2008;44(13):1799–806.

- Valla J, Schneider L, Niedzielko T, Coon KD, Caselli R, Sabbagh MN, Ahern GL, Baxter L, Alexander G, Walker DG, Reiman EM. Impaired platelet mitochondrial activity in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Mitochondrion*. 2006;6(6):323-30.
- van der Heide LP, Ramakers GM, Smidt MP. Insulin signaling in the central nervous system: learning to survive. *Prog Neurobiol*. 2006;79(4):205-21. Review.
- Van Oosten M, van Amersfoort ES, van Berkel TJ, Kuiper J. Scavenger receptor-like receptors for the binding of lipopolysaccharide and lipoteichoic acid to liver endothelial and Kupffer cells. *J Endotoxin Res*. 2001;7(5):381-4.
- Van Oosten M, van de Bilt E, van Berkel TJ, Kuiper J. New scavenger receptor-like receptors for the binding of lipopolysaccharide to liver endothelial and Kupffer cells. *Infect Immun*. 1998 Nov;66(11):5107-12.
- Vanderstichele H, De Meyer G, Engelborghs B, et al. Alzheimer's disease biomarkers: from concept to clinical utility. In: Galimberti D, Scarpini E, eds. *BioMarkers for early diagnosis of Alzheimer's disease*. Nova Science Publishers, Hauppauge, NY. Pp 81-122. 2008.
- Vedavanam, K., Sriyayanta, S., O'Reilly, J., Raman, A., Wiseman, H., 1999. Antioxidant action and potential antidiabetic properties of an isoflavonoid-containing soyabean phytochemical extract (SPE). *Phytother. Res*. 13, 601-608.
- Verbeek MM, Ruiters DJ, de Waal RM. The role of amyloid in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biol Chem*. 1997 Sep;378(9):937-50. Review.
- Verbeek MM, Van Nostrand WE, Otte-Holler I, Wesseling P, De Waal RM. Amyloid-beta-induced degeneration of human brain pericytes is dependent on the apolipoprotein E genotype. *Ann N Y Acad Sci*. 2000 Apr;903:187-99.
- Verdier Y, Zarandi M, Penke B. Amyloid beta-peptide interactions with neuronal and glial cell plasma membrane: binding sites and implications for Alzheimer's disease. *J Pept Sci*. 2004 May;10(5):229-48. Review.
- Vigo-Pelfrey C, Seubert P, Barbour R, Blomquist C, Lee M, Lee D, Coria F, Chang L, Miller B, Lieberburg I, et al. Elevation of microtubule-associated protein tau in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. *Neurology*. 1995 Apr;45(4):788-93.
- Visser PJ, Scheltens P, Verhey FR, Schmand B, Launer LJ, Jolles J, Jonker C. Medial temporal lobe atrophy and memory dysfunction as predictors for dementia in subjects with mild cognitive impairment. *J Neurol*. 1999 Jun;246(6):477-85.
- Wade CB, Dorsa DM. Estrogen activation of cyclic adenosine 5'-monophosphate response element-mediated transcription requires the extracellularly regulated kinase/mitogen-activated protein kinase pathway. *Endocrinology*. 2003;144(3):832-8.
- Walter MF, Mason PE, Mason RP. Alzheimer's disease amyloid beta peptide 25-35 inhibits lipid peroxidation as a result of its membrane interactions. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997 Apr 28;233(3):760-4.
- Wang J, Green PS, Simpkins JW. Estradiol protects against ATP depletion, mitochondrial membrane potential decline and the generation of reactive oxygen species induced by 3-nitropropionic acid in SK-N-SH human neuroblastoma cells. *J Neurochem*. 2001;77(3):804-11.
- Wang J, Xiong S, Xie C, Markesbery WR, Lovell MA. Increased oxidative damage in nuclear and mitochondrial DNA in Alzheimer's disease. *J Neurochem*. 2005;93(4):953-62.
- Wang JZ, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Glycosylation of microtubule-associated protein tau: an abnormal posttranslational modification in Alzheimer's disease. *Nat Med*. 1996 Aug;2(8):871-5.
- Wang PN, Yang CL, Lin KN, Chen WT, Chwang LC, Liu HC. Weight loss, nutritional status and physical activity in patients with Alzheimer's disease. A controlled study. *J Neurol*. 2004 Mar;251(3):314-20.

- Wang X, Su B, Fujioka H, Zhu X. Dynamin-like protein 1 reduction underlies mitochondrial morphology and distribution abnormalities in fibroblasts from sporadic Alzheimer's disease patients. *Am J Pathol.* 2008;173(2):470-82.
- Wang, L.; Andersson, S.; Warner, M.; Gustafsson, J.-A. Estrogen receptor (ER)-beta knockout mice reveal a role for ER-beta in migration of cortical neurons in the developing brain. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 100: 703-708, 2003. Note: Erratum: *Proc. Nat. Acad. Sci.* 103: 8298 only, 2006.
- Watson GS, Cholerton BA, Reger MA, Baker LD, Plymate SR, Asthana S, Fishel MA, Kulstad JJ, Green PS, Cook DG, Kahn SE, Keeling ML, Craft S. Preserved cognition in patients with early Alzheimer disease and amnesic mild cognitive impairment during treatment with rosiglitazone: a preliminary study. *Am J Geriatr Psychiatry.* 2005;13(11):950-8.
- Watson GS, Craft S. Modulation of memory by insulin and glucose: neuropsychological observations in Alzheimer's disease. *Eur J Pharmacol.* 2004;490(1-3):97-113. Review.
- Webber KM, Casadesus G, Marlatt MW, Perry G, Hamlin CR, Atwood CS, Bowen RL, Smith MA. Estrogen bows to a new master: the role of gonadotropins in Alzheimer pathogenesis. *Ann N Y Acad Sci.* 2005 Jun;1052:201-9.
- Webster MT, Francis PT, Procter AW, Stratmann GC, Doshi R, Mann DM, Bowen DM. Postmortem brains reveal similar but not identical amyloid precursor protein-like immunoreactivity in Alzheimer compared with other dementias. *Brain Res.* 1994 May 2;644(2):347-51.
- Weidemann A, Paliga K, Durrwang U, Czech C, Evin G, Masters CL, Beyreuther K. Formation of stable complexes between two Alzheimer's disease gene products: presenilin-2 and beta-amyloid precursor protein. *Nat Med.* 1997 Mar;3(3):328-32.
- Weisgraber KH, Mahley RW. Human apolipoprotein E: the Alzheimer's disease connection. *FASEB J.* 1996 Nov;10(13):1485-94. Review.
- Weiss N.S, Lyon J.L., Rishnamurthy S, Dietert S.E., Liff J.M., Daling J. Non contraceptive estrogens use and the occurrence of ovarian cancer. *J Natl. Cancer Inst.* 1982; 68: 95-98.
- Weitzmann MN, Pacifici R. Free in PMC. Estrogen deficiency and bone loss: an inflammatory tale. *J Clin Invest.* 2006;116(5):1186-94. Review.
- Wenger NK. Postmenopausal hormone therapy. Is it useful for coronary prevention? *Cardiol Clin.* 1998 Feb;16(1):17-25. Review
- White AR, Multhaup G, Maher F, Bellingham S, Camakaris J, Zheng H, et al. The Alzheimer's disease amyloid precursor protein modulates copper-induced toxicity and oxidative stress in primary neuronal cultures. *J Neurosci* 1999;19:9170-79.
- Whitehouse PJ. Pharmacoeconomics of dementia. *Alzheimer Dis Assoc Disord.* 1997;11 Suppl 5:S22-32; discussion S32-3.
- Wise PM, Dubal DB, Wilson ME, Rau SW, Bottner M, Rosewell KL. Estradiol is a protective factor in the adult and aging brain: understanding of mechanisms derived from in vivo and in vitro studies. *Brain Res Brain Res Rev.* 2001 Nov;37(1-3):313-9. Review.
- Wise PM, Dubal DB, Wilson ME, Rau SW, Bottner M. Minireview: neuroprotective effects of estrogen-new insights into mechanisms of action. *Endocrinology.* 2001 Mar;142(3):969-73. Review.
- Wisniewski HM, Wegiel J, Wang KC, Kujawa M, Lach B. Ultrastructural studies of the cells forming amyloid fibers in classical plaques. *Can J Neurol Sci.* 1989 Nov;16(4 Suppl):535-42.
- Wiss-Coray T, Lin C, Yan F, YU GQ, Rohde M, McConlogue L, et al. TGF- β 1 promotes amyloid b clearance and reduces plaque burden in transgenic mice. *Nat Med* 2001;5:612-8.
- Wolf H, Grunwald M, Ecke GM, Zedlick D, Bettin S, Dannenberg C, Dietrich J, Eschrich K, Arendt T, Gertz HJ. The prognosis of mild cognitive impairment in the elderly. *J Neural Transm Suppl.* 1998;54:31-50.

- Wolfe MS, Xia W, Moore CL, et al. Peptidomimetic probes and molecular modelling suggest Alzheimer's γ -secretase in an intramembrane-cleaving aspartyl protease. *Biochemistry* 1999;38:4720-4727.
- Wood JG, Mirra SS, Pollock NJ, Binder LI. Neurofibrillary tangles of Alzheimer disease share antigenic determinants with the axonal microtubule-associated protein tau (tau) *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986 Jun;83(11):4040-3. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986 Dec;83(24):9773.
- Woods NF, Mitchell ES, Adams C. Memory functioning among midlife women: observations from the Seattle Midlife Women's Health Study. *Menopause*. 2000 Jul-Aug;7(4):257-65.
- Wooley CS, Gould E, Frankfurt M, McEwen BS. Naturally occurring fluctuations in dendritic spine density on adult hippocampal pyramidal neurons. *J Neurosci* 1990 10:4035-4039.
- Woolley CS, McEwen BS. Roles of estradiol and progesterone in regulation of hippocampal dendritic spine density during the estrous cycle in the rat. *J Comp Neurol*. 1993; 336(2):293-306.
- Woolley CS. Estrogen-mediated structural and functional synaptic plasticity in the female rat hippocampus. *Horm Behav*. 1998 Oct;34(2):140-8. Review.
- Wozniak M, Rydzewski B, Baker SP, Raizada MK. The cellular and physiological actions of insulin in the central nervous system. *Neurochem Int*. 1993;22(1):1-10. Review.
- Wu, J., Oka, J., Higuchi, M., Tabata, I., Toda, T., Fujioka, M., Fuku, N., Teramoto, T., Okuhira, T., Ueno, T., Uchiyama, S., Urata, K., Yamada, K., Ishimi, Y., 2006. Cooperative effects of isoflavones and exercise on bone and lipid metabolism in postmenopausal Japanese women: a randomized placebo-controlled trial. *Metabolism* 55, 423–433.
- Wuttke W, Jarry H, Westphalen S, Christoffel V, Sidlová-Wuttke D. Phytoestrogens for hormone replacement therapy? *J Steroid Biochem Mol Biol* 2003;83(1):133–7.
- Wuttke W, Jarry H, Sidlová-Wuttke D. Isoflavones-safe food additives or dangerous drugs? *Ageing Res Rev* 2007;6(2):150–88.
- Wyss-Coray T, McConlogue L, Kindy M, Schmidt AM, Du Yan S, Stern DM. Key signaling pathways regulate the biological activities and accumulation of amyloid-beta. *Neurobiol Aging*. 2001 Nov-Dec;22(6):967-73. Review.
- Wyss-Coray T, Yan F, Lin AH, Lambris JD, Alexander JJ, Quigg RJ, Masliah E. Prominent neurodegeneration and increased plaque formation in complement-inhibited Alzheimer's mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Aug 6;99(16):10837-42. Epub 2002 Jul 15.
- Xia W, Zhang J, Perez R, Koo EH, Selkoe DJ. Interaction between amyloid precursor protein and presenilins in mammalian cells: implications for the pathogenesis of Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Jul 22;94(15):8208-13.
- Xie L, Helmerhorst E, Taddei K, Plewright B, Van Bronswijk W, Martins R. Alzheimer's beta-amyloid peptides compete for insulin binding to the insulin receptor. *J Neurosci*. 2002;22(10):RC221. Epub 2002 May 10.
- Xu H, Gouras GK, Greenfield J, Vincent B, Naslund J, Mazzarelli L, et al. Estrogen reduces neuronal generation of Alzheimer β -amyloid peptides. *Nat Med* 1998;4:447–51.
- Xu J, He L, Ahmed SH, Chen SW, Goldberg MP, Beckman JS, Hsu CY. Oxygen-glucose deprivation induces inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine expression in cerebral endothelial cells. *Stroke*. 2000 Jul;31(7):1744-51.
- Yaffe K, Lindquist K, Penninx BW, Simonsick EM, Pahor M, Kritchevsky S, Launer L, Kuller L, Rubin S, Harris T. Inflammatory markers and cognition in well-functioning African-American and white elders. *Neurology*. 2003;61(1):76-80.
- Yamaguchi H, Hirai S, Morimatsu M, Shoji M, Harigata Y. Diffuse type of senile plaques in the brains of Alzheimer-type dementia. *Acta Neuropathol* 1988;77:113-119.

- Yamaguchi H, Yamazaki T, Lemere CA, Frosch MP, Selkoe DJ. Beta amyloid is focally deposited within the outer basement membrane in the amyloid angiopathy of Alzheimer's disease. An immunoelectron microscopic study. *Am J Pathol.* 1992 Jul;141(1):249-59
- Yamamoto N, Akamatsu N, Sakuraba H, Yamazaki H, Tanoue K. Platelet glycoprotein IV (CD36) deficiency is associated with the absence (type I) or the presence (type II) of glycoprotein IV on monocytes. *Blood.* 1994 Jan 15;83(2):392-7.
- Yamashita, T., Sasahara, T., Pomeroy, S.E., Collier, G., Nestel, P.J., 1998. Arterial compliance, blood pressure, plasma leptin, and plasma lipids in women are improved with weight reduction equally with a meat-based diet and a plant-based diet. *Metabolism* 47, 1308–1314.
- Yan SD, Yan SF, Chen X, Fu J, Chen M, Kuppusamy P, Smith MA, Perry G, Godman GC, Nawroth P, et al. Non-enzymatically glycosylated tau in Alzheimer's disease induces neuronal oxidant stress resulting in cytokine gene expression and release of amyloid beta-peptide. *Nat Med.* 1995 Jul;1(7):693-9.
- Yanai H, Chiba H, Morimoto M, Abe K, Fujiwara H, Fuda H, Hui SP, Takahashi Y, Akita H, Jamieson GA, Kobayashi K, Matsuno K. Human CD36 deficiency is associated with elevation in low-density lipoprotein-cholesterol. *Am J Med Genet.* 2000 Aug 14;93(4):299-304.
- Ye P, Umayahara Y, Ritter D, Bunting T, Auman H, Rotwein P, D'Ercole AJ. Regulation of insulin-like growth factor I (IGF-I) gene expression in brain of transgenic mice expressing an IGF-I-luciferase fusion gene. *Endocrinology.* 1997;138(12):5466-75.
- Ye P, Xing Y, Dai Z, D'Ercole AJ. In vivo actions of insulin-like growth factor-I (IGF-I) on cerebellum development in transgenic mice: evidence that IGF-I increases proliferation of granule cell progenitors. *Brain Res Dev Brain Res.* 1996;95(1):44-54.
- Yesner LM, Huh HY, Pearce SF, Silverstein RL. Regulation of monocyte CD36 and thrombospondin-1 expression by soluble mediators. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996 Aug;16(8):1019-25.
- Younkin SG. The role of A beta 42 in Alzheimer's disease. *J Physiol Paris.* 1998 Jun-Aug;92(3-4):289-92. Review.
- Zapatero MD, Garcia de Jalon A, Pascual F, Calvo ML, Escanero J, Marro A. Serum aluminum levels in Alzheimer's disease and other senile dementias. *Biol Trace Elem Res.* 1995 Jan-Mar;47(1-3):235-40.
- Zaulyanov LL, Green PS, Simpkins JW. Glutamate receptor requirement for neuronal death from anoxia-reoxygenation: an in Vitro model for assessment of the neuroprotective effects of estrogens. *Cell Mol Neurobiol.* 1999;19(6):705-18.
- Zhan SS, Veerhuis R, Kamphorst W, Eikelenboom P. Distribution of beta amyloid associated proteins in plaques in Alzheimer's disease and in the non-demented elderly. *Neurodegeneration.* 1995;4(3):291-7.
- Zhang Y, Tatsuno T, Carney JM, Mattson MP. Basic FGF, NGF, and IGFs protect hippocampal and cortical neurons against iron-induced degeneration. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1993;13(3):378-88.
- Zhao W, Chen H, Xu H, Moore E, Meiri N, Quon MJ, Alkon DL. Brain insulin receptors and spatial memory. Correlated changes in gene expression, tyrosine phosphorylation, and signaling molecules in the hippocampus of water maze trained rats. *J Biol Chem.* 1999;274(49):34893-902.
- Zheng P, Eastman J, Vande Pol S, Pimplikar SW. PAT1, a microtubule-interacting protein, recognizes the basolateral sorting signal of amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:14745.
- Zheng WH, Kar S, Doré S, Quirion R. Insulin-like growth factor-1 (IGF-1): a neuroprotective trophic factor acting via the Akt kinase pathway. *J Neural Transm Suppl.* 2000;(60):261-72. Review.
- Zhou Y, Watters JJ, Dorsa DM. Estrogen rapidly induces the phosphorylation of the cAMP response element binding protein in rat brain. *Endocrinology.* 1996;137(5):2163-6.

Zhu X, Lee HG, Raina AK, Perry G, Smith MA. The role of mitogen-activated protein kinase pathways in Alzheimer's disease. *Neurosignals*. 2002;11(5):270-81. Review.

Zhu X, Perry G, Smith MA. Insulin signaling, diabetes mellitus and risk of Alzheimer disease. *J Alzheimers Dis*. 2005;7(1):81-4. Review.

Zhu Y, Bond J, Thomas P. Identification, classification, and partial characterization of genes in humans and other vertebrates homologous to a fish membrane progesterin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(5):2237-42.

Ziegler RG. Phytoestrogens and breast cancer. *AmJ Clin Nutr* 2004;79(2):183-4.

Zingg JM, Ricciarelli R, Andorno E, Azzi A. Novel 5' exon of scavenger receptor CD36 is expressed in cultured human vascular smooth muscle cells and atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002 Mar 1;22(3):412-7.

Zlokovic BV. Cerebrovascular transport of Alzheimer's amyloid beta and apolipoproteins J and E: possible anti-amyloidogenic role of the blood-brain barrier. *Life Sci*. 1996;59(18):1483-97. Review.

Zubenko GS, Moosy J, Kopp U. Neurochemical correlates of major depression in primary dementia. *Arch Neurol*. 1990 Feb;47(2):209-14.