

Università degli Studi di Milano

**Corso di Dottorato di Ricerca in
“Scienze Endocrinologiche e Metaboliche” ciclo XXIII**

**Facoltà di Farmacia
Dipartimento di Endocrinologia, Fisiopatologia
e Biologia Applicata**

**L'ATTIVAZIONE DI TSPO E DI LXR STIMOLA LA
NEUROSTEROIDOGENESI ED E' PROTETTIVA IN
UN MODELLO DI NEUROPATIA PERIFERICA
DI RATTO DIABETICO**

Settori scientifico-disciplinari: BIO/09-BIO/13-MED/13

Tutor:

Chiar.mo Prof. Roberto C. MELCANGI

Tesi presentata da:

Dott. Silvia GIATTI

matricola n. R07467

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. Paolo BECK-PECCOZ

Anno Accademico: 2009/2010

RIASSUNTO

Il diabete mellito è attualmente una delle malattie di tipo non trasmissibile più diffuse nel mondo. Esso rappresenta una delle principali cause di morte in numerosi paesi ad alto reddito e ci sono sostanziali evidenze che lo indicano come epidemico in molti paesi economicamente sviluppati. A queste considerazioni vanno aggiunte preoccupanti valutazioni epidemiologiche. Infatti, negli ultimi vent'anni, è stato registrato un drammatico aumento dei nuovi casi di diabete, ed è stato previsto che il numero di pazienti affetti da questa patologia e da alterata tolleranza al glucosio aumenterà di circa una volta e mezzo entro l'anno 2030 (Atlas, 2009).

Inoltre, è importante sottolineare che le complicazioni del diabete, come le patologie vascolari periferiche e a carico delle arterie coronariche, l'infarto, le amputazioni, la cecità, i disturbi renali e la neuropatia diabetica provocano un aumento del numero di persone disabili, una riduzione dell'aspettativa di vita ed enormi costi in previdenza sociale per tutta la società. In particolare, la neuropatia periferica diabetica, per la quale tutt'oggi non è ancora disponibile alcuna cura, è la causa di circa il 50-75% delle amputazioni non traumatiche; appare perciò evidente che il diabete e le sue complicazioni sono senza dubbio uno dei più importanti problemi di salute del 21esimo secolo.

E' stato recentemente dimostrato che in un modello sperimentale di neuropatia periferica, il ratto reso diabetico tramite iniezione di streptozotocina (STZ), i livelli di steroidi neuroattivi osservati nel plasma e nel nervo sciatico di questi animali sono ridotti in modo drammatico (Caruso, et al., 2008, Leonelli, et al., 2007). Risultati incoraggianti sono però stati ottenuti in questo stesso modello sperimentale grazie alla somministrazione di progesterone e dei suoi derivati (Leonelli, et al., 2007) così come quella di testosterone e dei suoi derivati (Roglio, et al., 2007). Una interessante strategia terapeutica potrebbe perciò essere rappresentata dall'utilizzo di molecole in grado di aumentare la sintesi di steroidi neuroattivi nel sistema nervoso, così da evitare i numerosi effetti collaterali associati ad una terapia ormonale sistemica.

Utilizzando il modello sperimentale del ratto maschio indotto con STZ, in questa tesi sono stati affrontati due differenti approcci farmacologici con lo scopo di

valutare gli eventuali effetti neuroprotettivi associati ad un incremento dei livelli di steroidi neuroattivi nel sistema nervoso periferico.

Nella prima parte del lavoro descritto in questa tesi è stato utilizzato il Ro5-4864, un ligando sintetico della proteina traslocatrice di 18 kDa (TSPO). Tale proteina è un fattore chiave nella sintesi degli steroidi neuroattivi in quanto è implicata nel passaggio limitante della steroidogenesi, il trasporto del colesterolo dal citoplasma all'interno del mitocondrio, dove avviene la prima reazione enzimatica della biosintesi degli steroidi. Infatti, è stato precedentemente riportato che la somministrazione di Ro5-4864, così come quella di alcuni ligandi del TSPO, è in grado di promuovere la steroidogenesi nella corteccia surrenale, nella placenta, nei testicoli, nell'ovaio e nelle cellule gliali (Brown and Papadopoulos, 2001, Giatzakis and Papadopoulos, 2004, Lacapere and Papadopoulos, 2003, Papadopoulos, et al., 2001)

Nella seconda parte di questa tesi, un ligando sintetico del Liver X Receptor (LXR), la molecola GW3965, è stata utilizzata per valutarne i possibili effetti neuroprotettivi nel ratto STZ. LXR regola l'omeostasi del colesterolo, attraverso la sua azione diretta sull'espressione di numerosi geni. L'attivazione di LXR aumenta la steroidogenesi nelle ghiandole surrenaliche (Cummins and Mangelsdorf, 2006, Cummins, et al., 2006), probabilmente attraverso una maggiore biodisponibilità del colesterolo.

Gli esperimenti sono stati quindi condotti utilizzando ratti maschi indotti con STZ. Durante il terzo mese dall'induzione del diabete, gli animali sono stati trattati sottocute con il veicolo di scioglimento dei farmaci (olio), con il Ro5-4864, 16 o 4 volte a seconda del protocollo applicato, o con il GW3965, per un totale di 4 somministrazioni.

Gli animali sono stati sottoposti a test comportamentali e funzionali, come il test della piastra calda e la determinazione della velocità di conduzione nervosa, per valutare gli effetti neuroprotettivi dei trattamenti. Inoltre, sono state condotte analisi biochimiche per valutare i livelli di steroidi neuroattivi nel plasma e nel nervo sciatico. Sono stati anche valutati i livelli d'espressione genica di alcune proteine della mielina nel nervo sciatico e l'attività della pompa Na⁺,K⁺-ATPasi; dopo il trattamento con il Ro5-4864 è stata valutata la densità delle fibre intraepidermiche nelle zampe posteriori dei ratti, mentre a seguito della

somministrazione del GW3965 sono stati valutati i livelli d'espressione genica dei target di LXR e degli enzimi implicati nella steroidogenesi nel nervo sciatico di questi animali.

I dati ottenuti mostrano che il trattamento con il Ro5-4864 e con il GW3965 esercita effetti neuroprotettivi sul ratto STZ dopo un trattamento settimanale nel corso dell'ultimo mese di sperimentazione. In particolare, i livelli di steroidi neuroattivi determinati nel nervo sciatico dei ratti e che risultano diminuiti dal diabete, sono incrementati dopo il trattamento con entrambe le molecole. Al contrario, i 16 trattamenti con il Ro5-4864 non hanno prodotto alcun effetto.

I meccanismi d'azione delle due molecole sembrano però diverse in quanto ci sono alcune differenze negli steroidi neuroattivi aumentati. Un altro aspetto da non sottovalutare è l'incremento degli stessi nel plasma, ad opera dei 4 trattamenti del Ro5-4864, ma non del GW3965. Questo aspetto dovrebbe essere preso in considerazione se le molecole venissero studiate per un possibile approccio clinico.

All'incremento degli steroidi neuroattivi nel nervo sciatico corrisponde un miglioramento dei parametri funzionali e biochimici alterati dal diabete. Infatti entrambe le molecole, quando somministrate per 4 volte nell'ultimo mese di diabete, migliorano la sensibilità termica e la velocità di conduzione nervosa. Anche l'attività della pompa $\text{Na}^+, \text{K}^+ \text{-ATPasi}$, un indice di funzionalità nervosa, aumenta nel ratto che ha ricevuto uno dei due ligandi rispetto al diabetico. L'azione del Ro5-4864 e del GW3965 è però differente quando viene analizzata l'espressione genica delle proteine della mielina nel nervo periferico. Infatti il trattamento con il Ro5-4864 è in grado di aumentare l'espressione della glicoproteina zero, la più abbondante proteina della mielina periferica, mentre il trattamento con GW3965 non è in grado di alterare la ridotta espressione osservata nel ratto diabetico.

Gli effetti osservati dopo il trattamento con il Ro5-4864 e con il GW3965 sono dovuti probabilmente alla loro capacità di innalzare il livello di steroidi neuroattivi e non passano attraverso un controllo della glicemia, che rimane alta nei ratti trattati così come nei diabetici.

In conclusione i dati riportati in questa tesi mostrano che le molecole Ro5-4864 e GW3965 sono neuroprotettive in un modello di neuropatia periferica diabetica nel ratto. Dal momento che attualmente non sono disponibili terapie per curare tale

patologia, queste molecole potrebbero rappresentare un interessante punto di partenza per lo sviluppo di nuovi farmaci contro la neuropatia diabetica.

SOMMARIO

RIASSUNTO	2
SOMMARIO	6
1. INTRODUZIONE	9
1.1. STEROIDI NEUROATTIVI	10
1.1.1 Scoperta e definizione degli steroidi neuroattivi	10
1.1.2 Evidenze della biosintesi dei neurosteroidi	11
1.2. STEROIDI NEUROATTIVI E SISTEMA NERVOSO	15
1.2.1 Effetti neuroprotettivi sul SNC	20
1.2.2 Effetti neuroprotettivi sul SNP	22
1.3 IL DIABETE MELLITO	25
1.3.1. La neuropatia diabetica	25
1.3.2. Meccanismi patogenetici della neuropatia periferica diabetica	27
1.3.3. Danni della neuropatia periferica diabetica	36
1.3.4 Effetto protettivo degli steroidi neuroattivi sulla neuropatia periferica diabetica	40
1.4 PROTEINA TRASLOCATRICE DI 18kDa (TSPO)	41
1.4.1 TSPO e steroidogenesi	46
1.4.2 Altre funzioni di TSPO	47
1.4.3 TSPO e neuroprotezione	49
1.5 LIVER X RECEPTORS (LXRs)	50
1.5.1 Omeostasi del colesterolo	52
1.5.2 Ruolo biologico di LXRs	53
1.5.3. LXRs come induttori della steroidogenesi nel surrene	57
1.5.4 LXRs nell'omeostasi del colesterolo nella ghiandola surrenale.	58
	60
2. SCOPO	61
	6

3. MATERIALI E METODI	64
3.1 REAGENTI	65
3.2. ANIMALI	65
3.2.1 Induzione del diabete	66
3.2.2 Trattamento farmacologico	66
3.3. ANALISI DEGLI STEROIDI NEUROATTIVI	67
3.4 ANALISI FUNZIONALI E BIOCHIMICHE	69
3.4.1 Velocità di conduzione nervosa	69
3.4.2 Analisi della soglia termica nocicettiva	69
3.4.3 Attività della pompa Na ⁺ , K ⁺ -ATPasi	70
3.4.4 Valutazione della densità delle fibre intraepidermiche	71
3.4.5 Valutazione di parametri biochimici nel sangue.	72
3.5 ANALISI DELL' ESPRESSIONE GENICA	72
3.5.1 RNase Protection Assay.	73
3.5.2 Real-time PCR	74
3.6 ANALISI STATISTICA	75
4. RISULTATI E DISCUSSIONE	76
4.1. EFFETTI NEUROPROTETTIVI DI UN LIGANDO DEL TRASLOCATORE DA 18kDa (Ro5-4864) NELLA NEUROPATIA DIABETICA SPERIMENTALE	77
4.1.1 Risultati	77
4.1.2 Discussione	86
4.2. L'ATTIVAZIONE DEL LIVER X RECEPTOR AUMENTA I LIVELLI DI STEROIDI NEURO-ATTIVI E PROTEGGE DALLA NEUROPATIA PERIFERICA INDOTTA DAL DIABETE	90
4.2.1 Risultati	90
4.2.2 Discussione	100

5. CONCLUSIONI	104
6. BIBLIOGRAFIA	109

1.

INTRODUZIONE

1.1. STEROIDI NEUROATTIVI

Negli ultimi decenni, è emerso in modo chiaro che il sistema nervoso non è solo un target dell'azione endocrina esercitata dagli ormoni steroidei rilasciati dalle ghiandole steroidogeniche periferiche, ma è anche controllato in maniera paracrina ed autocrina da steroidi sintetizzati direttamente dai neuroni e dalle cellule gliali, che vengono denominati neurosteroidi (Baulieu, 1999). Oltre agli ormoni steroidei e neurosteroidi prodotti dall'organismo, molti steroidi esogeni e sintetici sono in grado di regolare l'attività del sistema nervoso. Il termine steroidi neuroattivi (Paul and Purdy, 1992) è attualmente usato per indicare quindi tutti gli steroidi che sono in grado di regolare le funzioni neuronali, includendo gli ormoni steroidei, i neurosteroidi e gli steroidi sintetici. Negli ultimi decenni gli steroidi neuroattivi hanno ricevuto una grande attenzione grazie alla loro capacità di controllare sia parametri omeostatici che meccanismi patofisiologici cruciali, come i processi neurodegenerativi e numerose vie di segnalazione implicate tra le altre, anche nella morte di cellule neuronali (Dubrovsky, 2006, Melcangi and Garcia-Segura, 2006a, Melcangi and Panzica, 2006b). Per questo motivo numerosi studi pubblicati negli ultimi anni hanno indicato negli steroidi neuroattivi dei buoni candidati per lo sviluppo di terapie atte a contrastare eventi neurodegenerativi.

1.1.1 Scoperta e definizione degli steroidi neuroattivi

Un punto fondamentale nella ricerca riguardante gli steroidi neuroattivi è stata l'identificazione della capacità dei neuroni e delle cellule gliali di sintetizzare i neurosteroidi (Baulieu, 1999). Questa importante scoperta deriva da una serie di lavori pionieristici che mostrano la persistenza di sostanziali quantità di pregnenolone (PREG), deidroepiandrosterone (DHEA) e dei loro derivati solfati nel cervello di roditori dopo gonadectomia e adrenalectomia (Corpechot, et al., 1981, Corpechot, et al., 1983). In ogni caso, prima della sua accettazione unanime da parte della comunità scientifica, il concetto di neurosteroidi ha necessitato di numerosi studi effettuati da vari gruppi di ricerca e su diverse specie animali (Baulieu, 1999, Compagnone and Mellon, 2000, Mensah-Nyagan, et al., 1999). Tali studi hanno permesso di incrementare le conoscenze di base sui neurosteroidi e di

restringere la definizione di neurosteroidi sulla base di criteri specifici. La definizione oggi accettata considera queste molecole come composti endogeni di natura steroidea sintetizzati nei neuroni o nelle cellule gliali del sistema nervoso centrale (SNC) o periferico (SNP). Per essere classificato come neurosteroidi, la molecola steroidea in esame deve persistere in quantità sostanziali nel sistema nervoso anche dopo la rimozione della ghiandole steroidogeniche periferiche, quali le ghiandole surrenali e le gonadi (Baulieu, 1999). Inoltre, è stato dimostrato che i neurosteroidi agiscono come fattori paracrini ed autocrini, regolando l'attività dei classici recettori nucleari per gli steroidi oppure attraverso la modulazione di recettori di membrana, come i recettori per gli steroidi di membrana accoppiati alle proteine G (Zhu, et al., 2003), dell'acido γ -amino butirrico (GABA_A) e i canali del calcio di tipo T (Hosie, et al., 2006), o attraverso i recettori dell'N-metil-D-aspartato (NMDA; (Wu, et al., 1991)), P2X (De Roo, et al., 2003) e sigma1 (Maurice, et al., 2006)

1.1.2 Evidenze della biosintesi dei neurosteroidi

La dimostrazione della biosintesi degli steroidi neuroattivi ha richiesto la dimostrazione dell'espressione e dell'attività biologica degli enzimi chiave della steroidogenesi nelle cellule nervose (Baulieu, 1999). La formazione dei neurosteroidi è stata evidenziata nel sistema nervoso attraverso differenti studi sia biochimici che molecolari, che hanno dimostrato l'espressione, nei neuroni e/o nelle cellule gliali, delle proteine implicate nel trasporto del colesterolo all'interno del mitocondrio e di numerosi enzimi chiave della steroidogenesi. I processi implicati nella sintesi degli steroidi nel sistema nervoso centrale sono schematicamente rappresentati in figura 1.

La conversione del colesterolo a pregnenolone, che rappresenta il primo passaggio enzimatico nella sintesi di tutte le classi di ormoni steroidei, è catalizzato dall'enzima mitocondriale citocromo P450 side chain cleavage (P450_{sc}, figura 1). In realtà, esiste un passaggio precedente che rappresenta il punto limitante di tutto il processo steroidogenico ed è controllato ormonalmente: il trasferimento del colesterolo dalla membrana mitocondriale esterna a quella interna, dove è localizzato l'enzima P450_{sc}. In questo contesto, due proteine poste sulla

membrana mitocondriale esterna, il traslocatore proteico da 18 kDa, TSPO (Papadopoulos, et al., 2006), e la Steroidogenic Acute Regulatory protein, StAR (Lavaque, et al., 2006), esercitano un ruolo attivo (figura 1).

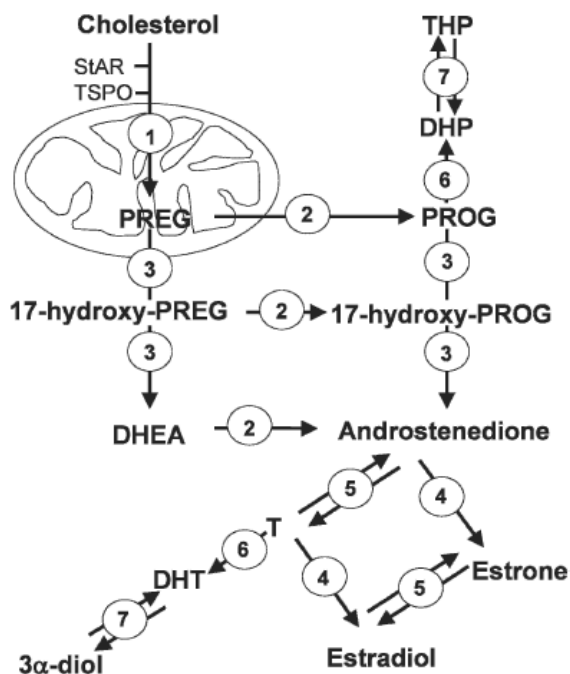


Figura 1: Biosintesi degli steroidi nel sistema nervoso. Per il significato delle sigle vedere il testo. I numeri rappresentano gli enzimi implicati nei specifici passaggi di reazione: 1, citocromo P450sc; 2, 3 β idrossisteroide deidrogenasi; 3, citocromo P450c17; 4, aromatasi; 5, 17 β idrossisteroide deidrogenasi; 6, 5 α riduttasi; 7, 3 α idrossisteroide deidrogenasi.

Il precursore di StAR è una proteina da 37 kDa, che dopo la sintesi viene trasportata nel mitocondrio dove viene trasformata, attraverso un processo proteolitico, nella forma matura di 30 kDa intramitocondriale, che è inattiva. StAR è distribuita ampiamente nel cervello, anche se sono stati riportati differenti livelli di trascrizione a seconda dell'area considerata. In particolare, l'espressione di StAR sembra ristretta a specifiche popolazioni neuronali e astrogliali in tutte le aree cerebrali, anche se la sua espressione risulta predominante nei neuroni (Sierra, et al., 2003). Nel sistema nervoso periferico invece, StAR è maggiormente espressa nelle cellule di Schwann (Benmessahel, et al., 2004).

Il TSPO è una proteina mitocondriale da 18kDa, espressa principalmente nelle cellule gliali sia del sistema nervoso centrale che periferico. La sua caratterizzazione sarà oggetto di un capitolo successivo.

Il gene dell'enzima citocromo P450sc fu clonato e studiato per la prima volta nel ratto nel 1990 (Oonk, et al., 1990), sulla base di studi precedenti effettuati nell'encefalo (Le Goascogne, et al., 1987). Successivamente, altri gruppi di ricerca hanno localizzato la sua proteina anche nel midollo spinale, nei gangli delle radici dorsali (Compagnone, et al., 1995), e nella componente gliale del SNP, le cellule di Schwann (Schumacher, et al., 2004).

Altri e numerosi enzimi sono coinvolti nella sintesi degli steroidi neuroattivi. Tra questi è importante citare la 3β -idrossisteroide deidrogenasi (3β -HSD), la 5α reduttasi (5α R), la 3α -idrossisteroide deidrogenasi (3α -HSD) e l'aromatasi (ARO). L'enzima 3β -idrossisteroide deidrogenasi catalizza la conversione dei 3β -idrossisteroidi in configurazione Δ^5 , come ad esempio il PREG, il DHEA e il 17OH-PREG, nei relativi 3-chetosteroidi in configurazione Δ^4 come ad esempio il progesterone (PROG), il 17OH-PROG e l'androstenedione (figura 1). Nel ratto sono presenti 4 isoforme di questo enzima (Zhao, et al., 1991), mentre nel topo ne sono state individuate 6 (Simard, et al., 1996).

L'enzima 5α reduttasi (figura 1) è responsabile della trasformazione del testosterone (T) e del PROG in diidrotestosterone (DHT) e in diidroprogesterone (DHP). Sia nell'uomo che nel ratto sono state clonate due isoforme di questo enzima, chiamate tipo 1 (5α R1) e tipo 2 (5α R2) (Andersson and Russell, 1990). L'espressione della 5α reduttasi cerebrale è stata molto studiata nel corso degli anni (Saitoh, et al., 1982, Stoffel-Wagner, 2003). Sebbene non sia stato ancora raggiunto un accordo sul ruolo neurofisiologico assunto dall'isoforma di tipo 1 e di tipo 2, sembrerebbe che la 5α R1 svolga prevalentemente un ruolo catabolico e neuroprotettivo, mentre la 5α R2 sia principalmente implicata nella differenziazione sessuale del SNC. Nel midollo spinale invece, è assodata una maggiore presenza di RNA messaggero (mRNA) per l'isoforma di tipo 2 rispetto a quella di 5α R1 (Pozzi, et al., 2003), la cui localizzazione, ristretta agli oligodendrociti e astrociti della materia bianca, sarebbe in accordo con la localizzazione nelle strutture mielinizzate del cervello maschile e femminile di ratto (Melcangi, et al., 1988, Poletti, et al., 1997).

L'enzima 3α -idrossisteroide deidrogenasi, chiamato anche 3α -idrossisteroide ossido reduttasi, catalizza la reazione reversibile tra il DHT e il DHP in 3α -diolo e in $3\alpha,5\alpha$ -tetraidroprogesterone (THP) rispettivamente, come mostrato in figura 1.

Questo enzima è membro della superfamiglia delle aldo-cheto reduttasi e, mentre nell'uomo ne sono stati clonati 4 isoenzimi, finora nel ratto ne è stato individuato uno solo (Pawlowski, et al., 1991, Penning, et al., 2003). Un'analisi comparativa dell'immunoreattività della 3 α -HSD e della 5 α R1 e 5 α R2 condotta nel midollo spinale, ha evidenziato che corpi cellulari e fibre possono esprimere tutti e tre gli enzimi o solo combinazioni di essi. Tale constatazione lascia supporre che certe cellule gliali e neuroni del midollo spinale siano in grado di biosintetizzare steroidi neuroattivi *de novo* o di metabolizzare quelli già esistenti, in modo da controllare meccanismi neurobiologici come la nocicezione, il dolore e la locomozione, attraverso la modulazione allosterica del recettore GABA_A (Majewska, 1992, Patten-Mensah, et al., 2004). La presenza di questi enzimi è stata anche confermata con saggi di attività enzimatica, indicando che l'immunoreattività determinata nel midollo spinale corrisponde ad una proteina enzimaticamente attiva (Patten-Mensah, et al., 2004). La presenza e l'attività degli enzimi in grado di convertire il PROG e il T nei loro derivati 5 α ridotti (il DHP e il DHT) e successivamente in quelli 5 α ,3 α -ridotti è stata confermata anche nei nervi periferici così come anche nelle cellule di Schwann (Melcangi, et al., 1990).

L'aromatasi è l'enzima deputato alla conversione degli androgeni in estrogeni (figura 1). Nel cervello di ratto, l'attività dell'enzima ARO è stata dimostrata da diversi studi biochimici che mostravano la conversione di androstenedione in estrone (Naftolin, et al., 1972, Roselli, et al., 1985). Come osservato in studi di immunistochemica, la presenza di questo enzima è limitata alle cellule neuronali, e non alla glia (Lephart, 1996). Inoltre, esistono delle differenze nei livelli di trascrizione del gene per l'aromatasi durante lo sviluppo. Questa considerazione, unita al fatto che gli estrogeni stimolano l'espressione del recettore per gli androgeni (AR) e aumentano la durata di occupazione di AR stesso nel cervello di ratto (Roselli and Fasasi, 1992), lascia supporre che estrogeni e androgeni cooperino attivamente nel controllo genico dell'espressione dell'aromatasi nel sistema nervoso centrale.

1.2. STEROIDI NEUROATTIVI E SISTEMA NERVOSO

Uno dei principali ruoli esercitati dagli steroidi, sia derivanti dalle gonadi che direttamente convertiti dal sistema nervoso, è sicuramente quello implicato nel differenziamento sessuale del SNC durante la vita fetale e nel periodo post-natale. Il principale ormone implicato in questo processo è il T, metabolizzato a livello locale dal tessuto neuronale ad estradiolo o a DHT, per opera rispettivamente dall'aromatasi e dalla 5 α R. L'estradiolo è il ligando del recettore degli estrogeni (ER), mentre il DHT lega l'AR, ed entrambi questi recettori nucleari sono coinvolti nei meccanismi che permettono l'organizzazione strutturale del sistema nervoso mediato dal T. Gli effetti del T e del DHT generano tratti che contraddistinguono il genere maschile in specifiche regioni del cervello e del midollo spinale, come differenze nella morfologia, dimensione e numero di neuroni e cellule gliali, di densità dei processi neuronali e gliali nei neurofilii e del numero di sinapsi (per approfondimenti (Cooke, et al., 1998, Morris, et al., 2004)).

Anche nel sistema nervoso dell'adulto, gli steroidi svolgono importanti funzioni. La loro azione è implicata nel controllo del comportamento sessuale e nella regolazione neuroendocrina, nella modulazione del rilascio dei neurotrasmettitori e nell'espressione e funzione dei recettori per i neurotrasmettitori stessi. Anche i processi legati alla glia (Garcia-Segura, et al., 1994, Garcia-Segura, et al., 1994) e al rimodellamento delle sinapsi (Parducz, et al., 2002) sono in parte controllate dalle molecole di natura steroidea.

Certamente di non trascurabile importanza è l'azione degli ormoni legati allo stress sia nella vita prenatale che nell'adulto. Infatti lo stress e gli ormoni ad esso legati producono effetti sull'organizzazione cerebrale che possono permanere fino all'età adulta. Lo stress prenatale o subito nel periodo successivo alla nascita possono alterare le risposte dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene nell'adulto e provocare modificazioni nello sviluppo del cervello e nei fattori di rischio per l'insorgenza di patologie psichiatriche e cognitive. Nel cervello dell'adulto invece, lo stress regola le facoltà cognitive e la risposta all'ansia. Tali effetti sono associati a modificazioni morfologiche e funzionali in diverse aree cerebrali, tra cui alterazioni nella

neurogenesi ippocampale adulta (Mirescu, et al., 2004), nella morfologia dendritica dell'amigdala (Vyas, et al., 2004), nella corteccia prefrontale (Cook and Wellman, 2004, Radley and Morrison, 2005) e nell'ippocampo (Donohue, et al., 2006, Sousa, et al., 2000).

Gli effetti appena descritti, e più in generale quelli prodotti dagli steroidi neuroattivi, avvengono mediante azioni autocrine o paracrine che implicano il controllo dell'espressione genica mediante l'interazione con i recettori nucleari steroidei e attraverso la modulazione della neurotrasmissione agendo su canali ionici di membrana e recettori per neurotrasmettitori. In particolare, il PROG, prodotto dalle cellule di Schwann in risposta agli stimoli dei neuroni adiacenti, regola la sintesi delle proteine della mielina attraverso il suo recettore, il recettore del progesterone (PR) (Plassart-Schiess and Baulieu, 2001). I metaboliti 3α ridotti del PROG (il THP e il $3\alpha,5\beta$ -tetraidroprogesterone) sono modulatori allosterici positivi del recettore GABA_A. L'attivazione di quest'ultimo aumenta la durata e la frequenza dell'apertura del canale del cloro, che permette perciò una ridotta eccitabilità della membrana neuronale, attraverso l'iperpolarizzazione (Majewska, 1992). Da un punto di vista comportamentale, la modulazione esercitata attraverso il controllo del recettore GABA_A nel SNC provoca sedazione, una minore ansietà e una diminuzione nell'attività delle scariche (Mellon, et al., 2001). Il neurosteroido THP regola la crescita, sopravvivenza e differenziazione neuronale, provoca la regressione delle terminazioni neuronali prima che abbiano stabilito contatti con altri neuroni o cellule gliali, e protegge i neuroni dalla morte indotta dalla picrotossina (Griffin, et al., 2004). Al contrario degli steroidi 3α ridotti derivati dal PROG, il pregnenolone solfato (PREGS) così come il DHEA solfato (DHEAS) presentano attività antagonistiche nei confronti del recettore del GABA_A (Majewska, 1992). La sua inibizione perciò provoca stati d'ansia e di eccitabilità (Trojnar, et al., 2002).

PREGS e DHEA, ma non DHEAS, potenziano l'effetto dell'NMDA sull'aumento dei livelli intracellulari di calcio. Tale meccanismo potrebbe essere responsabile della crescita degli assoni indotta dal DHEA. Il DHEAS invece promuove la crescita dendritica, anche se il meccanismo alla base di tale processo non è ancora stato chiarito (Mellon, et al., 2001). Inoltre il DHEAS è in grado di interagire come agonista con il recettore sigma₁, mentre, sullo stesso recettore, il PREGS sembra

che svolga un'azione da agonista inverso. Sempre su sigma1, il progesterone ha invece una decisa azione antagonizzante (Monnet, et al., 1995). I ligandi selettivi di questo recettore esercitano un'azione neuromodulatoria a carico del sistema neurotrasmettitoriale eccitatorio, compreso il sistema glutammatergico e colinergico. La modulazione della neurotrasmissione glutammatergica mediata dall'NMDA attraverso ligandi selettivi del recettore sigma1 gioca un ruolo fondamentale nei maggiori fenomeni di neuroadattamento, come il potenziamento a lungo termine, l'apprendimento e la memoria, scariche, la morte neuronale acuta e la neurodegenerazione (Maurice, et al., 1999, Monnet, et al., 1995).

La capacità neuromodulatoria degli steroidi neuroattivi include anche la loro azione sui recettori nicotinici, muscarinici, serotoninergici, del kainato e della glicina (Compagnone and Mellon, 2000, Maurice, et al., 1999, Stoffel-Wagner, 2001).

Anche il sistema nervoso periferico, come è già stato sottolineato, è in grado di rispondere all'azione degli steroidi neuroattivi. In particolare le cellule di Schwann sono target di numerose loro azioni. Evidenze ottenute alla fine degli anni novanta hanno mostrato che l'espressione della proteina zero (Po) e della proteina della mielina periferica di 22 kDa (PMP22), che rappresentano le due più importanti proteine della mielina periferica prodotte dalle cellule di Schwann, sono modulate dagli steroidi neuroattivi, come schematizzato in figura 2.

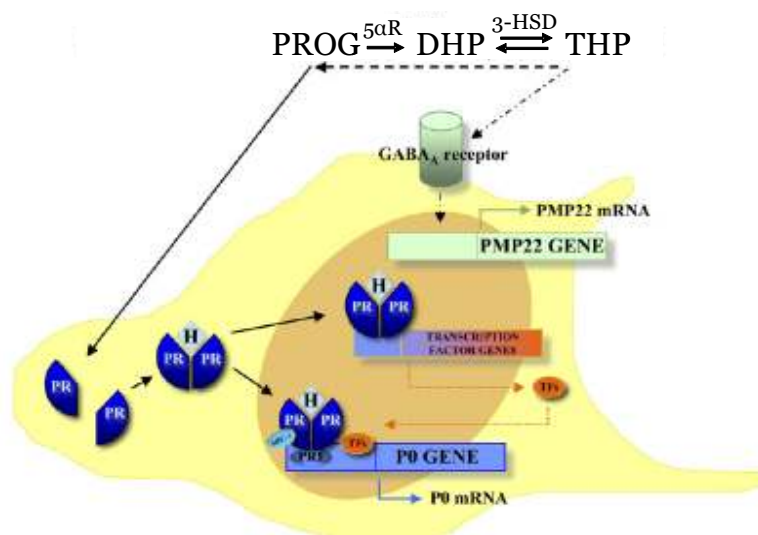


Figura 2: Rappresentazione schematica dei possibili meccanismi d'azione del progesterone (PROG), diidroprogesterone (DHP) e tetraidroprogesterone (THP) sull'espressione genica di due proteine della mielina, la glicoproteina zero (Po) e la proteina della mielina periferica (PMP22) nelle cellule di Schwann.

In particolare esperimenti condotti sia *in vivo*, sul nervo sciatico di ratti maschi, che *in vitro*, in colture di cellule di Schwann di ratto, hanno evidenziato come l'espressione di Po sia aumentata a seguito del trattamento con il PROG, il DHP o il THP, mentre quella di PMP22 è modulata solo dal THP (Melcangi, et al., 1998a, Melcangi, et al., 2001a, Melcangi, et al., 2001b). Similmente a quanto osservato per il PROG e i suoi derivati, anche il T e i suoi metaboliti sono in grado di influenzare l'espressione di queste importanti componenti della guaina mielinica (figura 3). Infatti, la castrazione di ratti adulti diminuisce l'espressione di Po nel nervo sciatico (Magnaghi, et al., 1999) e il trattamento successivo con il DHT o il 3 α -diolo riporta l'espressione comparabile ai livelli del controllo (Magnaghi, et al., 1999).

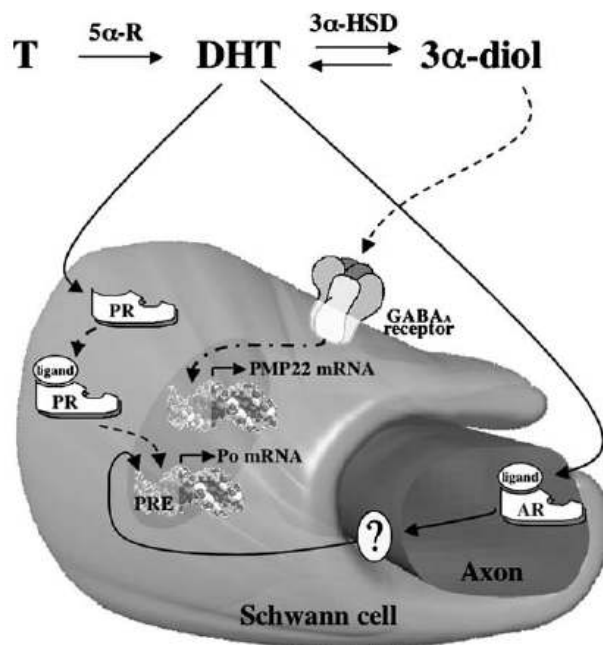


Figura 3: rappresentazione schematica dei possibili meccanismi d'azione di T, DHT e 3 α -diolo sull'assone e sulla cellula di Schwann nella modulazione dell'espressione di Po e PMP22.

Anche i livelli di espressione genica di PMP22 nel nervo sciatico di ratto vengono diminuiti a seguito della castrazione dell'animale, ma in questo caso solo il trattamento con il 3 α -diolo risulta efficace nel revertire la diminuzione (Magnaghi, et al., 2004). Un simile andamento è stato riscontrato anche in esperimenti *in vitro*, dove colture di cellule di Schwann derivate da ratto sono state trattate con il DHT o con il 3 α -diolo, provocando un aumento dell'espressione genica

rispettivamente di Po e PMP22 (Magnaghi, et al., 1999, Melcangi, et al., 2000b). Come mostrato in figura 3, le osservazioni appena descritte hanno suggerito che l'espressione della proteina Po possa essere sotto il controllo del recettore del progesterone e degli androgeni, mentre un recettore non classico, come quello per il GABA_A, possa controllare l'espressione di PMP22 (Melcangi, et al., 2005). Tale ipotesi sembra essere confermata da studi effettuati utilizzando una serie di inibitori o agonisti selettivi dei recettori PR, AR e GABA_A (Magnaghi, et al., 2007, Magnaghi, et al., 2001, Melcangi, et al., 2003a), e dall'evidenza che putative sequenze responsive al PROG sono state individuate sul gene codificante Po (Magnaghi, et al., 1999).

Oltre agli importanti effetti su Po e PMP22, gli steroidi neuroattivi sono in grado di modulare importanti fattori di trascrizione coinvolti nei processi fisiologici delle cellule di Schwann e nel processo di mielinizzazione. In particolare, l'espressione di fattori quali Krox-20, Krox-24, Egr-3 e FosB è influenzata dal trattamento con progesterone in colture di cellule di Schwann derivanti da ratto (Guennoun, et al., 2001, Mercier, et al., 2001), mentre il fattore Sox-10 è stimolato solo dopo trattamento con DHP (Magnaghi, et al., 2007). Le osservazioni qui riportate, unite alla considerazione che gli steroidi neuroattivi sono in grado di influenzare direttamente l'espressione di importanti proteine della mielina suggerisce che tali molecole siano in grado di controllare il processo di mielinizzazione mediato dalle cellule di Schwann attraverso differenti meccanismi intracellulari.

Anche il compartimento assonale del SNP risente dell'influenza degli steroidi neuroattivi. Infatti, evidenze ottenute *in vitro* con co-culture di neuroni e cellule di Schwann, hanno mostrato che il trattamento con PROG è in grado di aumentare l'espressione di due importanti geni coinvolti nel processo di mielinizzazione come la piccola proteina legante il GTP Ras-like (RAB-1) e la proteina associata alla fosforibosil difosfato sintasi (Chan, et al., 2000, Rodriguez-Waitkus, et al., 2003). Inoltre, durante lo sviluppo, l'utilizzo di mifepristone, un antagonista del PR, provoca una riduzione del diametro assonale rispetto allo spessore della mielina ed un aumento della densità dei neurofilamenti (Melcangi, et al., 2003a).

Da ultimo è importante sottolineare l'effetto che gli steroidi neuroattivi possiedono sulla proliferazione delle cellule di Schwann. Infatti sia il PROG che il T sono modulatori positivi della proliferazione di questi fondamentali elementi gliali nel

sistema nervoso periferico (Lubischer and Bebinger, 1999, Svenningsen and Kanje, 1999). Gli effetti del PROG e degli estrogeni sulla proliferazione delle cellule di Schwann è stata anche analizzata in colture di segmenti di nervo sciatico prelevati da ratti adulti o appena nati, sia maschi che femmine. In questi esperimenti è stato osservato che questi steroidi neuroattivi sono in grado di aumentare l'incorporazione di timidina triziata nelle cellule di Schwann, in modo sesso- ed età-specifici. Infatti gli estrogeni esplicano tali effetti sul nervo dei ratti adulti maschi o appena nati, senza avere effetto sulle femmine. Al contrario, il PROG esercita la sua azione proliferativa sul nervo delle femmine adulte e dei ratti neonati (Svenningsen and Kanje, 1999). Un'altra osservazione a carico della proliferazione delle cellule di Schwann indica che questa viene modulata anche dai livelli dei coattivatori degli steroidi. Infatti, se il coattivatore SRC-1 viene overespresso nella linea cellulare MSC80 (una linea di cellule di Schwann immortalizzate) la proliferazione è più lenta che nelle cellule dove tale fattore è downregolato. La situazione è invece diversa se si altera l'espressione del cofattore SRA (steroid receptor RNA activator), che negli eucarioti agisce come regolatore dell'espressione dei geni controllati dai recettori degli steroidi. SRA è presente sia nelle cellule di Schwann che nelle MSC80 e, diversamente da quello che accade per SRC-1, la sua overespressione aumenta la proliferazione delle MSC80 (Lanz, et al., 2003, McKenna, et al., 1999). E' anche interessante notare che la proliferazione delle cellule di Schwann è influenzata non solo dell'attivazione dei classici recettori degli steroidi, ma anche da quelli non classici. Ad esempio, è stato dimostrato che in cellule di Schwann di ratto in coltura, il trattamento con gli agonisti del recettore del GABA_B, come il baclofene, è in grado di diminuire la proliferazione (Magnaghi, et al., 2004).

1.2.1 Effetti neuroprotettivi sul SNC

Gli steroidi neuroattivi sono in grado di esercitare una serie di azioni neuromodulatorie nel sistema nervoso in condizioni fisiologiche. La loro mancanza o diminuzione può portare all'insorgenza di alterazioni patologiche, ma è anche da sottolineare la loro capacità di esercitare azioni neuroprotettive in situazioni patologiche o di danno.

La patofisiologia della malattia di Alzheimer (AD) viene attribuita agli effetti della β -amiloide, un peptide che si accumula nel cervello e causa neurotossicità e degenerazione (Vajda, 2002). Weil-Engerer e collaboratori (Weill-Engerer, et al., 2002), hanno dimostrato che oltre all'aumento di questo peptide, certe aree cerebrali di pazienti con AD, comparate con le stesse regioni provenienti da persone anziane che non presentavano la patologia, presentavano anche ridotti livelli di steroidi neuroattivi. Inoltre, sono stati osservati diminuiti livelli di DHEAS in ipotalamo e di PREGS in cervelletto e striato che correlano con le aumentate concentrazioni delle proteine implicate nella formazioni di placche e di aggregati neurofibrillari, come appunto la β -amiloide e la proteina Tau fosforilata (Weill-Engerer, et al., 2002).

Gli effetti degli steroidi neuroattivi sono stati valutati anche su un modello sperimentale di Parkinson (PD), ottenuto usando la neurotossina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina (MPTP), che mima in certi aspetti la patologia umana (Vajda, 2002). I risultati ottenuti hanno dimostrato che la somministrazione di DHEA a topi trattati con MPTP protegge dalla neurotossina i neuroni dopaminergici nello striato (D'Astous, et al., 2003). Questo risulta importante poiché la loro ridotta attività causa la morte neuronale nella *pars compacta* della sostanza *nigra* che è considerata la causa principale della comparsa del Parkinson nell'uomo.

Studi condotti da Mao e Barger (Mao and Barger, 1998), hanno evidenziato come il DHEA solfato, ma non equivalenti dosi di DHEA, siano in grado di proteggere i neuroni ippocampali dalla neurotossicità indotta dal glutammato. Secondo gli autori, questa azione specifica del metabolita solfato risiederebbe nella sua capacità di aumentare l'attività di un fattore di trascrizione kappa-B dipendente, ipotesi che sembra essere confermata dal fatto che la soppressione del legame di kappa-B al DNA prevenga l'attività neuroprotettiva esercitata dal DHEAS (Mao and Barger, 1998). Il DHEAS sembra possedere un'efficace azione neuroprotettiva anche in un modello di ischemia *in vitro* (deprivazione di ossigeno e glucosio a cellule granulari cerebellari di ratto in coltura). Lo steroide neuroattivo protegge in maniera quasi totale le cellule in coltura, eliminando le caratteristiche manifestazioni apoptotiche provocate dalla deprivazione di ossigeno e glucosio. Tali effetti vengono inibiti sia da un agonista del recettore GABA_A, il pentobarbital,

sia da un suo antagonista, la picrotossina (Kaasik, et al., 2001). Il DHEAS è in grado di fornire anche una parziale neuroprotezione nei confronti della neurotossicità indotta da MPTP, colchicina, glutammato e NMDA (Kaasik, et al., 2001). In un modello *in vivo* di ischemia reversibile nel midollo spinale, Lapchak e collaboratori (Lapchak, et al., 2000), hanno dimostrato che il DHEAS è in grado di esercitare degli effetti neuroprotettivi, se somministrato a 5 minuti dall'occlusione dell'arteria, ma non a tempi successivi. Dal momento che tali effetti benefici vengono bloccati dalla somministrazione di bicucullina, un antagonista del recettore GABA_A, è possibile un coinvolgimento di questo recettore negli effetti neuroprotettivi esercitati dal DHEAS (Lapchak, et al., 2000).

Veiga e collaboratori (Veiga, et al., 2003) hanno suggerito che gli effetti neuroprotettivi esercitati da PREG e DHEA possano essere dovuti alla loro conversione a testosterone prima e estradiolo poi, le cui proprietà protettive sul sistema nervoso sono oggetto di un'estensiva letteratura. Infatti come da loro dimostrato, il PROG e il DHEA proteggono i neuroni dell'ilo nell'ippocampo, in maniera dose dipendente, dalla morte neuronale indotta dall'acido kainico. Tali effetti vengono però soppressi dall'uso del fadrozolo, un inibitore dell'aromatasi, che quindi blocca la conversione a estrogeni (Veiga, et al., 2003).

I traumi al midollo spinale rappresentano un grave problema e molti studi si sono quindi focalizzati sull'utilizzo di modelli sperimentali di trauma al fine di studiarne meccanismi molecolari e possibili approcci terapeutici. Tra i tanti, in un modello di transezione del midollo nel ratto, la somministrazione di PROG è stata in grado di riportare al livello del controllo la presenza della colina acetiltransferasi (CHAT), l'espressione delle subunità regolatorie della pompa Na⁺,K⁺-ATPasi ridotte dal danno e di incrementare, nei neuroni delle corna ventrali, l'RNA messaggero di GAP-43 che potrebbe essere responsabile del processo di riparo dopo il trauma (Labombarda, et al., 2002).

1.2.2 Effetti neuroprotettivi sul SNP

Dal momento che gli steroidi neuroattivi sono in grado di agire sia sulla componente assonale che gliale del sistema nervoso periferico, numerosi studi si sono concentrati nella valutazione dei loro effetti neuroprotettivi.

L'invecchiamento è una situazione fisiologica che produce numerose alterazioni sia biochimiche che morfologiche nei nervi periferici. L'aumento dell'età è infatti associato ad una diminuzione della sintesi di Po e PMP22, le larghe fibre mielinizzate vanno incontro ad atrofia, mentre la guaina mielinica aumenta di spessore e presenta numerose anormalità, come formazioni a palloncino, invaginazioni, sdoppiamenti e processi di rimielinizzazione (Azcoitia, et al., 2003, Melcangi, et al., 2003b). Gli steroidi neuroattivi, come è stato già ricordato, sono in grado di aumentare l'espressione di Po e PMP22 nel nervo sciatico di ratti adulti, ed è stata provata la loro efficacia anche nel caso di ratti anziani. In particolare il progesterone e il DHP sono in grado di aumentare i bassi livelli di Po, mentre l'espressione di PMP22 viene aumentata a seguito del trattamento con il THP (Melcangi, et al., 2003b, Melcangi, et al., 1998a, Melcangi, et al., 1999, Melcangi, et al., 2000a). Anche le anormalità della mielina possono essere migliorate grazie al trattamento con il PROG e i suoi derivati (Azcoitia, et al., 2003, Melcangi, et al., 2003b). Gli effetti più pronunciati osservati dopo trattamento di ratti in età avanzata sono a carico delle fibre mielinizzate di piccolo calibro (<5 µm), con un significativo aumento del loro numero e della loro *g ratio*, cioè del rapporto tra il diametro assonale e quello dell'intera fibra. Tali dati suggeriscono che, a seguito del trattamento di ratti in età avanzata con gli steroidi neuroattivi, nel nervo sciatico ci sia un aumento della rimielinizzazione a carico delle fibre di piccolo calibro. Un altro dato importante è la riduzione della frequenza di assoni con anormalità nella mielina e di fibre con forma irregolare. Tali effetti sono evidenti dopo il trattamento con il PROG, il DHP e il THP, mentre il T e derivati non sono risultati efficaci, suggerendo un'azione specifica dei soli progestinici (Azcoitia, et al., 2003, Melcangi, et al., 2003b).

Numerose e gravi alterazioni del nervo periferico possono mostrarsi in seguito a trauma del nervo stesso come quelle da schiacciamento da taglio. L'effetto neuroprotettivo esercitato dagli steroidi neuroattivi anche in questo caso è stato studiato da diversi gruppi di ricerca e su diversi tipi di danno. Il trattamento con il PROG e il DHP è in grado di aumentare i bassi livelli d'espressione genica di Po nella porzione distale del nervo sciatico a seguito di resezione del nervo (Melcangi, et al., 2000b), e sempre il PROG, insieme al suo precursore PREG, se somministrato localmente, è in grado di bilanciare la diminuzione delle membrane

mieliniche osservata dopo criolesione del nervo sciatico in un modello murino (Koenig, et al., 1995). Inoltre, in un modello di rigenerazione guidata del nervo facciale di coniglio, i risultati migliori sono stati ottenuti quando la protesi biodegradabile in chitosan era stata impregnata di PROG; in questo modo è stato ottenuto un aumento del numero dei nuclei delle cellule di Schwann, di fibre mielinizzate e non mielinizzate e un aumento della *g ratio* delle fibre mielinizzate (Chavez-Delgado, et al., 2005). Non solo i progestinici sono stati utilizzati in modelli di danno ai nervi periferici, ma anche gli androgeni, e in particolare il T, il DHT e il DHEA hanno dimostrato la loro efficacia (Ayhan, et al., 2003, Huppenbauer, et al., 2005, Jones, et al., 2001).

Una crescente preoccupazione nei confronti della neurotossicità periferica indotta dagli agenti chemioterapici ha stimolato la ricerca di composti che potessero esercitare azioni neuroprotettive sul SNP. Attualmente non è disponibile nessun efficace trattamento per questo tipo di effetto collaterale, sebbene esistano dei modelli preclinici che tentativamente cercano di prevenire la neurotossicità attraverso l'uso di tioli, fattori neurotrofici e antiossidanti (Apfel, 2000, Quasthoff and Hartung, 2002, Windebank and Grisold, 2008). Ad esempio, il docetaxel, un taxano semisintetico utilizzato diffusamente come farmaco antineoplastico per il trattamento del cancro alla mammella, ovaie e nel carcinoma al polmone, causa una tossicità specifica a livello del SNP (Apfel, 2000, Cavaletti, et al., 1997, Quasthoff and Hartung, 2002, Roytta, et al., 1984, Sahenk, et al., 1994, Windebank and Grisold, 2008).

Nei modelli animali, il trattamento con progesterone o DHP allevia tale neurotossicità impedendo le alterazioni della velocità di conduzione nervosa e della sensibilità termica e la degenerazione dei nervi sensitivi della pelle nelle zampe posteriori (Roglio, et al., 2009).

Appare quindi evidente come la somministrazione di steroidi neuroattivi a seguito di danno possa rappresentare un'interessante strategia terapeutica. In particolare una neuropatia periferica con elevata incidenza e per la quale non è disponibile nessuna terapia al momento è la neuropatia diabetica.

1.3 IL DIABETE MELLITO

Il diabete mellito è una sindrome metabolica caratterizzata da iperglicemia, cioè dall'aumento cronico dei livelli di glucosio nel sangue, ed è causato da un deficit assoluto della secrezione di insulina, dalla riduzione della sua efficacia biologica o da entrambi questi difetti. La patologia viene classificata in diabete tipo 1 e diabete tipo 2; in particolare, il diabete tipo 1 è caratterizzato dalla distruzione delle cellule β delle isole pancreatiche, determinata da un processo autoimmune in circa il 95% dei casi ed è idiopatica nel restante 5%. I pazienti con diabete tipo 1 sono generalmente predisposti all'acidosi e necessitano di una terapia sostitutiva con insulina.

Il diabete tipo 2, ad insorgenza in età adulta, è la forma di gran lunga prevalente di questa sindrome (80-90% dei casi); è una malattia eterogenea che comprende un insieme di difetti che in alcuni casi consistono in un malfunzionamento delle cellule β , ma, più comunemente, sono associati a resistenza all'insulina da parte dei tessuti periferici, con conseguente instaurazione di un circolo vizioso che porta alla compromissione della secrezione di insulina.

La maggior parte dei pazienti diabetici va incontro ad un certo numero di complicanze, dovute agli squilibri metabolici causati dall'eccessivo livello di glucosio nel sangue, che si instaurano ad intervalli di tempo variabili dall'inizio della malattia. Tali complicanze interessano prevalentemente il sistema cardiovascolare, la pelle, i reni, gli occhi, le ossa, le articolazioni ed il sistema nervoso centrale e periferico (causando rispettivamente encefalopatia e neuropatia periferica). In aggiunta a queste complicanze, i pazienti diabetici presentano un aumento dell'incidenza di certi tipi di infezione ed una diminuzione della capacità di contrastarle.

1.3.1. La neuropatia diabetica

La neuropatia periferica diabetica, o più semplicemente neuropatia diabetica (ND), è una delle complicanze più importanti del diabete mellito, sia da un punto di vista epidemiologico che clinico. Infatti studi epidemiologici hanno evidenziato che circa il 50% dei soggetti diabetici, dopo 15 anni di malattia, manifesta i segni clinici della

neuropatia. È importante, però, specificare che la presenza di quest'ultima dipende dal tipo di indagine effettuata per la sua diagnosi. Nei vari studi effettuati, infatti, la prevalenza varia dal 10% quando vengono ricercati solo dei segni clinici, a oltre l'80% quando la diagnosi viene effettuata mediante esame elettromiografico. L'incidenza annuale di nuovi casi è invece di circa 6/100 considerando sia pazienti affetti da diabete tipo 1 che quelli affetti dal tipo 2. Da un punto di vista clinico, la ND è in grado di causare tutti i sintomi della NP ma risulta particolarmente aggressiva a livello degli arti inferiori, dove è causa del caratteristico "piede diabetico". Quest'ultimo infatti, già di per sé estremamente debilitante, nei paesi occidentali è implicato nel 50-75% delle amputazioni dovute a eventi non traumatici. La neuropatia diabetica, comunque, può assumere diverse sintomatologie a seconda della sede anatomica del nervo interessato e dall'entità del danno, e può essere classificata in tre principali forme:

- polineuropatia distale simmetrica è la forma più comune di neuropatia periferica diabetica, nella quale la perdita di sensibilità sembra a forma di "calza" o di "guanto" ed è causata da un processo neuropatico assonico. Sono particolarmente vulnerabili i nervi lunghi, che sono spesso colpiti simmetricamente, e per questo motivo l'impatto è solitamente a carico dei piedi. Nei nervi periferici è osservabile una riduzione della conduzione nervosa che interessa sia le fibre afferenti che quelle efferenti. Il dolore, quando presente, può variare dal lieve fastidio a sintomi gravi ed invalidanti, dovuti alla denervazione dei piccoli muscoli del piede (piede diabetico);
- neuropatia periferica isolata è caratterizzata da un'insorgenza improvvisa e dalla successiva ripresa della maggior parte o di tutte le funzioni. Può essere attribuita ad eventi ischemici o a danni traumatici e può coinvolgere un singolo nervo (mononeuropatia) o più nervi (mononeuropatia multipla);
- neuropatia diabetica dolorosa è caratterizzata dall'ipersensibilità al tocco lieve e talvolta dal dolore urente intenso, che, particolarmente di notte, può diventare fisicamente ed emotivamente invalidante (Gardner and Shoback, 2009).

1.3.2. Meccanismi patogenetici della neuropatia periferica diabetica

I due maggiori trials clinici effettuati in soggetti affetti da diabete di tipo 1 e 2, il Diabetes Control and Complication Trial (DCCT) e il UK Prospective Diabetes Study (UKPDS), hanno indicato che un rigoroso controllo farmacologico della glicemia riduce l'incidenza e la progressione della neuropatia diabetica, individuando nell'iperglicemia la principale causa di questa patologia (Boulton, 1998, Stratton, et al., 2000, Writing Team for the Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Research Group, 2002). Sono stati proposti numerosi meccanismi per correlare l'iperglicemia ai deficit motori e sensoriali, tra cui la ridotta velocità di conduzione nervosa (NCV), e, più in generale, allo sviluppo della neuropatia. La teoria attualmente accettata e condivisa è quella della disfunzione endoteliale indotta dal diabete: si ritiene che il ridotto flusso ematico al nervo, la reattività vascolare e l'ipossia endoneurale abbiano un ruolo centrale nello sviluppo delle variazioni strutturali e funzionali del nervo del soggetto diabetico, illustrate in figura 4 (Cameron, et al., 2001). Le modificazioni endoteliali nei *vasa nervorum* sono state attribuite a molteplici meccanismi tra i quali un'elevata condizione di stress ossidativo, l'attivazione della via dei polioli e dell'esossamina nel metabolismo del glucosio, glicosilazioni non enzimatiche, l'attivazione della proteina chinasi C (PKC), alterazioni del metabolismo dell'acido arachidonico, delle prostaglandine (PG) (Cameron, et al., 2001) e, più recentemente, l'attivazione della poliADP-ribosio polimerasi-1 (PARP) (Obrosova, et al., 2004) e del fattore nucleare κ B (NF- κ B) (Cameron and Cotter, 2008). Meccanismi simili sembrano avvenire anche negli elementi neurali del SNP, come le cellule di Schwann, gli oligodendrociti del midollo spinale e i neuroni dei gangli della radice dorsale (DRG). Infatti, anche in questi tipi cellulari sono state individuate anomalie metaboliche, come ad esempio la riduzione dell'attività della Na^+, K^+ -ATPasi (Sima and Sugimoto, 1999), uno stato di "pseudoipossia" (Williamson, et al., 1993), modificazioni del metabolismo degli acidi grassi (Kuruvilla and Eichberg, 1998) ed un'alterazione della trasduzione del segnale, particolarmente accentuata nei DRG (Purves, et al., 2001).

LA NEUROPATIA PERIFERICA DIABETICA

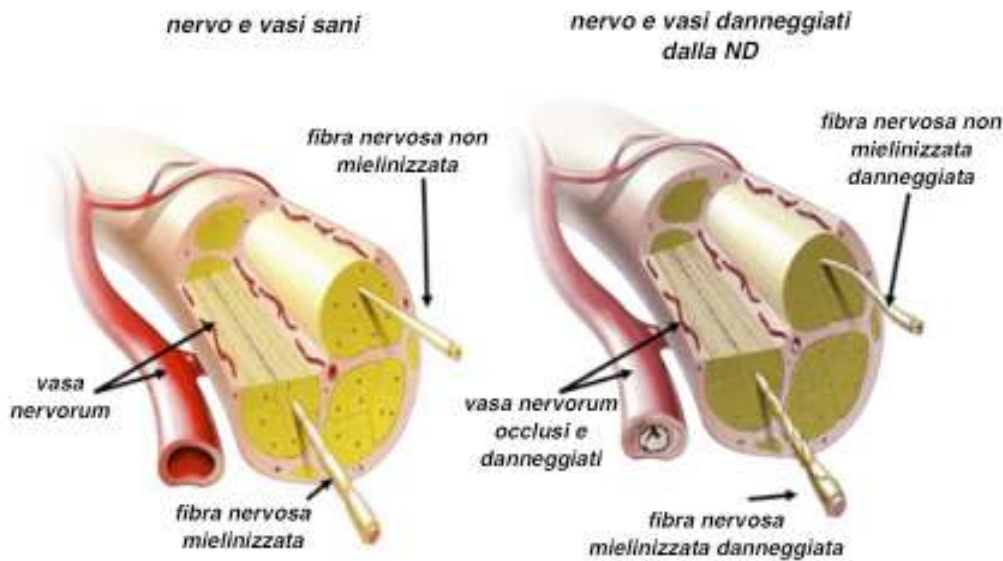


Figura 4: rappresentazione del nervo sano (a sinistra) e del nervo neuropatico (a destra). In quest'ultimo si possono osservare occlusioni a livello dei vasi e danni alla guaina mielinica e all'assone.

È quindi interessante notare come l'alterazione di un singolo parametro (il glucosio), alla base della patologia diabetica, sia in grado di scatenare un'enorme quantità di risposte, enzimatiche e non, che tutte insieme contribuiscono alla generazione di uno stato patologico estremamente complesso ed ancora non del tutto caratterizzato.

Stress ossidativo e nitrosativo

E' provocato dall'incremento della produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) o dell'azoto (RNS), che l'organismo non è in grado di eliminare.

Il danno ossidativo

Lo stato di iperglicemia e l'attivazione degli altri meccanismi patogenetici ad esso associati portano ad una condizione di elevato stress ossidativo nei nervi periferici del soggetto diabetico. Studi recenti hanno inoltre confermato l'accumulo di prodotti di perossidazione lipidica, una deplezione di glutathione ridotto (GSH)

parallela ad un aumento di glutatione ossidato (GSSG) ed una riduzione dell'attività della superossido desmutasi (SOD) nel nervo periferico del soggetto diabetico (Cheng and Zochodne, 2003, Coppey, et al., 2001, Obrosova, et al., 2001, Stevens, et al., 2000). A supporto di queste osservazioni è stata riscontrata la presenza di numerosi markers del danno indotto dai ROS nel nervo periferico, nel midollo spinale, nei *vasa nervorum* e nei DRG, come ad esempio la riduzione dell'attività della catalasi e della chinone reduttasi e la deplezione di ascorbato e taurina (Obrosova, et al., 2001, Stevens, et al., 2000).

Il danno nitrosativo

Un accumulo di nitrotirosina, un indicatore dello stress nitrosativo, è stato recentemente documentato nelle cellule endoteliali e di Schwann del nervo periferico, nella glia e nei neuroni dei DRG e negli astrociti, oligodendrociti e neuroni del midollo spinale.

Nel nervo periferico la maggiore fonte di NO, principale responsabile dello stress nitrosativo, sembra essere la NO sintasi inducibile (iNOS), che viene indotta dall'infiammazione (Obrosova, 2009). Inoltre, numerosi studi hanno dimostrato che i parametri caratteristici della ND, come ad esempio la ridotta NCV e i deficit del flusso ematico nervoso, sono migliorati in seguito alla somministrazione di sostanze antiossidanti (Cameron, et al., 2001, Inkster, et al., 2007, Nagamatsu, et al., 1995, Obrosova, et al., 2005).

Meccanismi di danno

Le specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto agiscono per mezzo di diversi meccanismi che danneggiano componenti strutturali e funzionali essenziali per la sopravvivenza della cellula, e che sono riassunti in figura 5. Le principali vie di danno possono essere così raggruppate:

- lipoperossidazione, che comporta un'alterata integrità di membrana e funzionalità dei recettori ed enzimi ad essa annessi;
- ossidazione dei gruppi tiolici delle proteine e conseguente compromissione della loro funzionalità;
- danno diretto al DNA;

- deplezione delle sostanze antiossidanti endogene, che causa una progressiva riduzione della capacità di compensare lo stress ossidativo ed un'incapacità nello svolgimento delle normali attività biochimiche cellulari (Galli, et al., 2008).

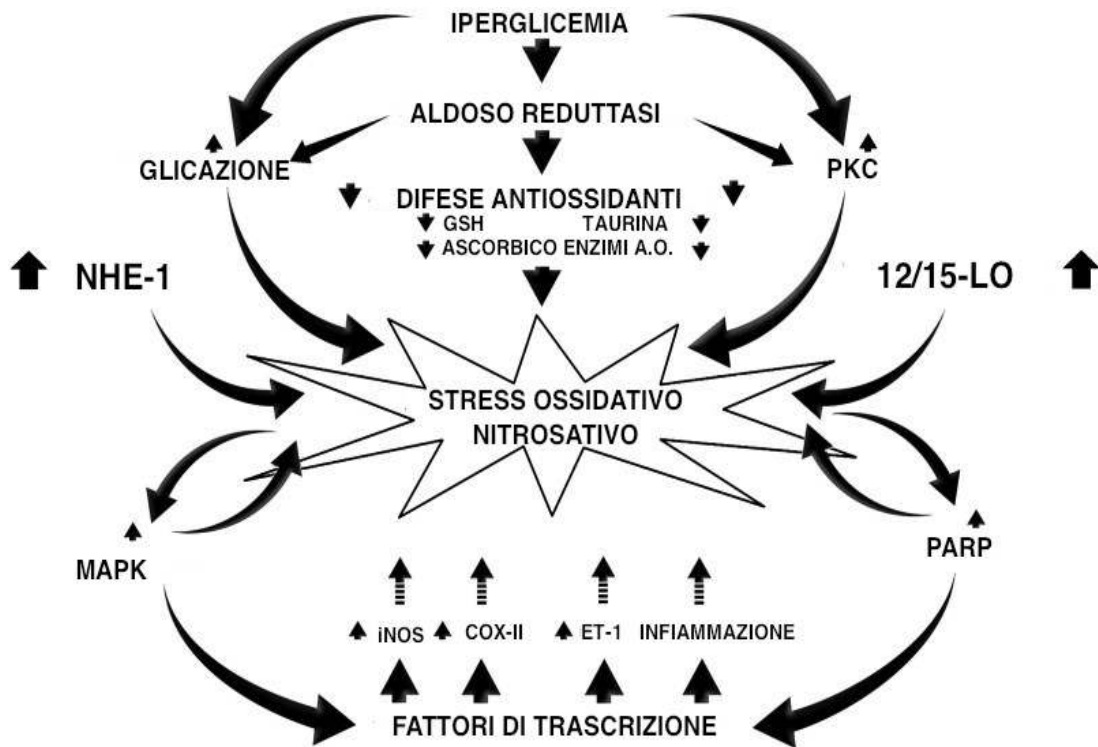


Figura 5: rappresentazione schematica dei vari fattori che contribuiscono allo stress ossidativo-nitrosativo nella ND.

Alterazioni del metabolismo del glucosio

Via dei polioli

Nel metabolismo del glucosio, la via dei polioli, o via del sorbitolo, consiste di due reazioni: nella prima il glucosio è ridotto a sorbitolo ad opera della aldoso reduttasi (A-R) NADPH-dipendente e nella seconda il sorbitolo è ossidato a fruttosio ad opera della sorbitolo deidrogenasi (SDH) NAD-dipendente. In condizioni fisiologiche la via dei polioli funziona solo in minima parte (vi entra circa il 3% di glucosio) in quanto il glucosio viene preferenzialmente indirizzato alla via glicolitica. In condizioni patologiche di iperglicemia però, la via glicolitica è saturata dal glucosio, che tende, quindi, ad entrare in buona parte (fino al 33% (Cheng and Gonzalez, 1986)) anche nella via dei polioli (rappresentata in figura 6).

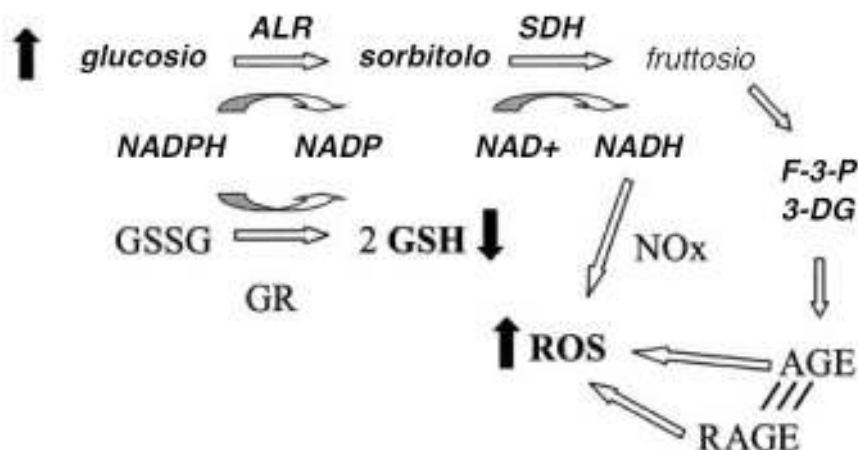


Figura 6: rappresentazione schematica della via dei polioli.

A livello cellulare le conseguenze sono un accumulo di sorbitolo, accompagnato da stress osmotico, ed un'eccessiva produzione di fruttosio, che risulta essere un agente glicante 10 volte più potente del glucosio (Obrosova, et al., 2005). Questa situazione causa sbilanci metabolici che si traducono in danni tissutali in vari distretti, come il cristallino, la retina, i glomeruli renali ed i nervi periferici, bersagli tipici delle complicanze del diabete. L'accumulo di sorbitolo è anche ben documentato dagli studi sui nervi periferici dei roditori usati come modello sperimentale (Obrosova, et al., 2000, Yagihashi, et al., 2001). Il ruolo dell'aldoso reductasi nella patologia diabetica è stato ben documentato (Oates, 2008, Obrosova, 2002rev) con l'osservazione che l'incrementata attività di tale enzima è in grado di portare ad uno stato di pseudoipossia dovuto ad un incremento del rapporto NADH/NAD⁺. Inoltre numerosi studi hanno confermato il coinvolgimento dell'attivazione dell'A-R nello stress ossidativo indotto dal diabete (El-Remessy, et al., 2003, Gupta, et al., 2002, Obrosova, et al., 2002).

Via dell'esossamina

Così come nel caso della via dei polioli, un eccesso di glucosio causa anche un aumento del flusso attraverso la via dell'esossamina, schematicamente rappresentata in figura 7. In condizioni normali, questa via metabolica converte solo una piccola parte del fruttosio 6-fosfato, un importante intermedio della glicolisi, a glucosamina-6-fosfato, ad opera della glutamina-fruttosio-6-fosfato-

amidotransferasi (Thornalley, 2005). La glucosamina-6-fosfato è quindi convertita ad uridina-difosfato-N-acetil-glucosamina (UDP-GlcNAc).

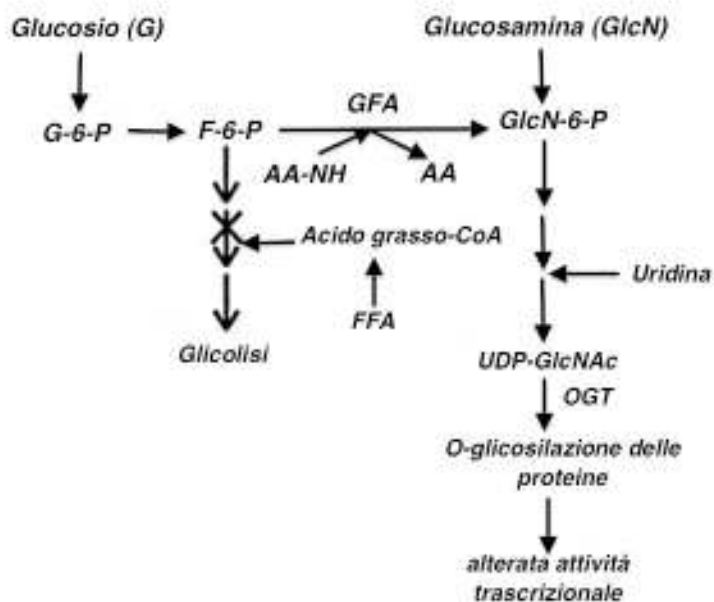


Figura 7: la via dell'esossamina.

Quest'ultimo è un substrato obbligato della UDP-GlcNAc transferasi, che lo lega a residui di serina o treonina di alcuni fattori di trascrizione, influenzando l'espressione genica (Brownlee, 2001, Kolm-Litty, et al., 1998, Sayeski and Kudlow, 1996). Nella neuropatia diabetica, l'aumentato flusso di glucosio attraverso questa via contribuisce ad alterare l'espressione di numerosi geni. Inoltre, ulteriori studi hanno evidenziato un coinvolgimento della via dell'esossamina nello sviluppo di insulino-resistenza e complicazioni vascolari (Dias and Hart, 2007, Love and Hanover, 2005).

Glicazione

La glicazione, detta anche glicosilazione non enzimatica, è il prodotto della reazione tra uno zucchero, come il fruttosio o il glucosio, ed una proteina o un lipide senza l'azione catalitica di un enzima. La glicazione è un processo casuale che compromette il funzionamento delle molecole biologiche ed i composti che si formano vengono chiamati prodotti avanzati della glicazione (Advanced Glycation End products - AGEs). Importanti proteine citoscheletriche assionali e componenti

mieliniche subiscono glicosilazione non enzimatica. Questo può provocare degenerazione assonale e demielinizzazione; la rigenerazione dei nervi può essere compromessa dalla presenza degli AGEs: loro depositi nei microvasi endoneurali possono infatti causare alterazioni microvascolari.

Negli ultimi anni il ruolo degli AGEs nella ND è stato ampiamente studiato e numerose osservazioni hanno dimostrato un loro coinvolgimento nello sviluppo di questa patologia (Ahmed, 2005, Thornalley, 2002). Gli AGEs agiscono attraverso il legame ad uno specifico recettore di membrana (il recettore degli AGEs, RAGE (Neeper, et al., 1992)), localizzato sia nell'endotelio che nelle cellule di Schwann, la cui attivazione è ritenuta portare alla trascrizione di alcuni geni pro-infiammatori, tra cui NF- κ B e IL-6 (Bierhaus, et al., 2001). L'elevato livello di AGEs presente nei pazienti diabetici è in grado quindi di causare un'eccessiva stimolazione di RAGE, determinando uno stato di infiammazione a livello dei nervi periferici (Bierhaus, et al., 2004, Karachalias, et al., 2003, Wada and Yagihashi, 2005).

Attivazione della proteina chinasi C

Con proteina chinasi C si intende una superfamiglia di isoenzimi (molti dei quali sono attivati dal 1,2-diacilglicerolo (DAG) in presenza di fosfatidilserina) che sono coinvolti nella trasduzione del segnale ed agiscono fosforilando un'ampia varietà di substrati proteici cellulari.

L'iperglicemia è in grado di incrementare la sintesi di DAG con conseguente attivazione della PKC e l'over-attivazione di questo enzima causa la maggiore espressione di numerosi fattori coinvolti nel danno vascolare, come NF- κ B, PAI-1, VEGF e TGF- β (rispettivamente fattore nucleare-kappa B, attivatore tissutale del plasminogeno 1, fattore di crescita dell'endotelio vascolare e fattore di crescita trasformante beta). Purtroppo l'esatto meccanismo d'azione con cui la PKC contribuisce alla neuropatia diabetica non è ben chiaro e necessita di ulteriori studi; tuttavia si ritiene che l'anomala stimolazione di questo enzima sia in grado di alterare le normali funzioni fosforilative coinvolte nella trasduzione del segnale, determinando fenomeni di vasocostrizione, alterazione della permeabilità capillare, ipossia e alterazioni della membrana basale nervosa (Arikawa, et al., 2007, Das Evcimen and King, 2007). L'attivazione della PKC è stata correlata allo sviluppo di retinopatie, nefropatie e danni vascolari che sono coinvolti nella ND

(Arikawa, et al., 2007, Das Evcimen and King, 2007, Veves and King, 2001). Inoltre sono stati osservati alcuni fenomeni di insulino-resistenza che sembrano essere dovuti in buona parte anche a questo meccanismo, suggerendo che la PKC sia ampiamente coinvolta nell'instaurazione del diabete e delle sue complicanze (Cortright, et al., 2000, Naruse, et al., 2006).

Infiammazione

L'infiammazione nel contesto della neuropatia diabetica è un fenomeno multifattoriale e molto complesso, in quanto è in parte causato dai fenomeni citati sinora ed è in grado a sua volta di alimentarli, instaurando, per così dire, un "circolo vizioso" nella patogenesi di questa malattia. Come è stato appena discusso, la condizione di iperglicemia può risultare nell'attivazione delle vie dell'esochinasi e della PKC, nella sovrapproduzione di AGEs e in una condizione di elevato stress ossidativo. Tutti questi fenomeni sono in grado di promuovere lo stato infiammatorio attraverso l'up-regolazione di numerosi fattori, tra cui NF- κ B, la cicloossigenasi di tipo II (COX II), e la 12/15-lipoossigenasi (12/15-LO).

NF- κ B

NF- κ B è un fattore di trascrizione up-regolato dall'iperglicemia, dallo stress ossidativo (Kabe, et al., 2005) ed anche dagli AGEs. NF- κ B stimola la trascrizione di numerosi fattori che hanno una nota attività infiammatoria, come iNOS, COX II, endotelina-I (ET-1) e molecole di adesione (Ha, et al., 2002, Minchenko, et al., 2003), ed è stato trovato in forma attiva nel perinevrio, vasi epineurali ed endonevrio del nervo surale di soggetti marcatamente diabetici (Bierhaus, et al., 2004). Inoltre è stato trovato attivo anche in colture di cellule di Schwann isolate, in presenza di un medium ad elevata concentrazione di glucosio (Suzuki, et al., 2004). Queste osservazioni hanno quindi evidenziato il ruolo centrale che NF- κ B ha nello sviluppo della ND e non sorprende che la somministrazione di inibitori di tale fattore abbiano apportato miglioramenti ai deficit di NCV e flusso ematico epineurale di ratti diabetici (Cameron and Cotter, 2008).

Cicloossigenasi di tipo II e 12/15-lipoossigenasi

COX II e 12/15-LO rivestono un ruolo centrale nel metabolismo dell'acido arachidonico e nell'infiammazione. Tali enzimi, infatti, sono responsabili della trasformazione dell'acido arachidonico rispettivamente in prostanoidei (come il trombossano A₂, la prostaciclina e le prostaglandine stabili) e in leucotrieni (LTC₄ e LTD₄), ed il loro coinvolgimento nello sviluppo delle complicanze diabetiche è diventato sempre più evidente. In particolare sia l'espressione che l'attività di COX II sono risultate aumentate nei nervi periferici e nel midollo spinale di soggetti diabetici (Pop-Busui, et al., 2002) e la somministrazione di inibitori di COX II è rivelata positiva sui deficit di NCV e flusso ematico nel nervo periferico parallelamente ad una riduzione dello stress ossidativo e dell'infiammazione (Kellogg, et al., 2007, Pop-Busui, et al., 2002).

12/15-LO è un enzima ampiamente espresso nell'organismo umano e la sua espressione aumenta significativamente in condizioni di iperglicemia (Reilly, et al., 2004, Zatechka, et al., 2003). In un contesto di neuropatia periferica è interessante notare che la sua espressione già abbondante nelle cellule di Schwann, aumenta notevolmente a sole 24 ore dall'esposizione ad alti livelli di glucosio (Obrosova, et al., 2007). Recenti studi *in vitro* ed *in vivo* hanno inoltre evidenziato che l'attivazione di 12/15-LO indotta dall'iperglicemia è in grado di interferire con numerose vie metaboliche, di trasduzione del segnale e di regolazione genica (Natarajan and Nadler, 2003, Reilly, et al., 2004).

Attivazione di poliADP-ribosio polimerasi-1

La poliADP-ribosio polimerasi-1 (PARP) è un enzima localizzato nel nucleo e nei mitocondri, dove svolge la funzione di scindere NAD⁺ in nicotinamide e ADP-ribosio. Questi due prodotti vengono quindi legati a proteine del nucleo e a PARP stesso, con la formazione di polimeri di proteine poliADP-ribosilate (Jagtap and Szabo, 2005). L'attivazione di questo enzima riveste un ruolo importante nell'induzione della disfunzione neuronale e dell'infiammazione, contribuendo, inoltre, all'instaurazione di altri meccanismi di danno, come l'attivazione di PKC e della via dell'esossamina (Homburg, et al., 2000, Kauppinen, et al., 2006, Obrosova, et al., 2005).

Le principali conseguenze dell'attivazione di PARP sono:

- deplezione di NAD⁺ e compromissione del metabolismo energetico. Infatti, l'eccessivo metabolismo del glucosio genera un eccesso di NADH e porta ad un sovraccarico della catena di trasporto degli elettroni, causando stress ossidativo, danno mitocondriale ed ulteriore attivazione di PARP (Jagtap and Szabo, 2005, Li and Glass, 2004, Obrosova, et al., 2004);
- alterazioni dell'espressione genica (Ha, et al., 2002, Jagtap and Szabo, 2005, Minchenko, et al., 2003);
- poliADP-ribosilazione ed inibizione dell'enzima gliceraldeide-3 fosfato deidrogenasi (GAPDH) che provoca una deviazione del glucosio e dei suoi derivati dalla glicolisi verso altre vie metaboliche coinvolte nelle complicazioni diabetiche (Brownlee, 2005).

Recenti studi hanno inoltre dimostrato che l'attivazione di PARP avviene a livello dei nervi periferici, del midollo spinale, dei DRG, dell'endotelio e delle cellule di Schwann dei ratti diabetici; inoltre questo è ritenuto un meccanismo precoce e fondamentale nello sviluppo della neuropatia diabetica (Ilnytska, et al., 2006, Obrosova, et al., 2004).

1.3.3. Danni della neuropatia periferica diabetica

La neuropatia periferica vede quindi come causa scatenante la costante iperglicemia, che si accompagna nel tempo all'instaurarsi dei meccanismi sopra descritti e riassunti schematicamente in figura 8. Le conseguenze ultime di tali meccanismi sulla funzionalità del nervo includono una diminuzione della velocità di conduzione dell'impulso nervoso (NCV), degenerazione assonale, demielinizzazione paranodale e perdita di fibre mielinizzate (Sugimoto, et al., 2000, Vinik, et al., 2000). Inoltre, è osservabile la variazione di una serie di parametri biochimici tra i quali il più significativo è la riduzione dell'attività dell'enzima Na⁺,K⁺-ATPasi, in quanto la sua variazione insieme a quella della NCV contraddistingue la neuropatia diabetica (Berry, 1997, Greene, et al., 1989).

È importante sottolineare che la variazione di questi parametri nell'uomo, è osservabile anche nella ND sperimentale, ottenuta a seguito dell'induzione con streptozotocina (STZ) nei ratti e nei topi (Biessels, et al., 1999, Cameron and Cotter, 1994, Dyck, et al., 1988, Eckersley, 2002, Yagihashi, et al., 2001). Grazie

all'utilizzo di questi modelli è stato possibile osservare che il diabete altera l'espressione delle glicoproteine della mielina nel nervo sciatico. In particolare, la ridotta espressione di Po e di PMP22 sembra giocare un ruolo fondamentale nella perdita di funzionalità dei nervi, in quanto la loro diminuita presenza non è più in grado di garantire la compattazione della mielina (Carenini, et al., 1999). Il mantenimento di tale struttura è fondamentale per assicurare la corretta trasmissione dell'impulso nervoso lungo l'assone.

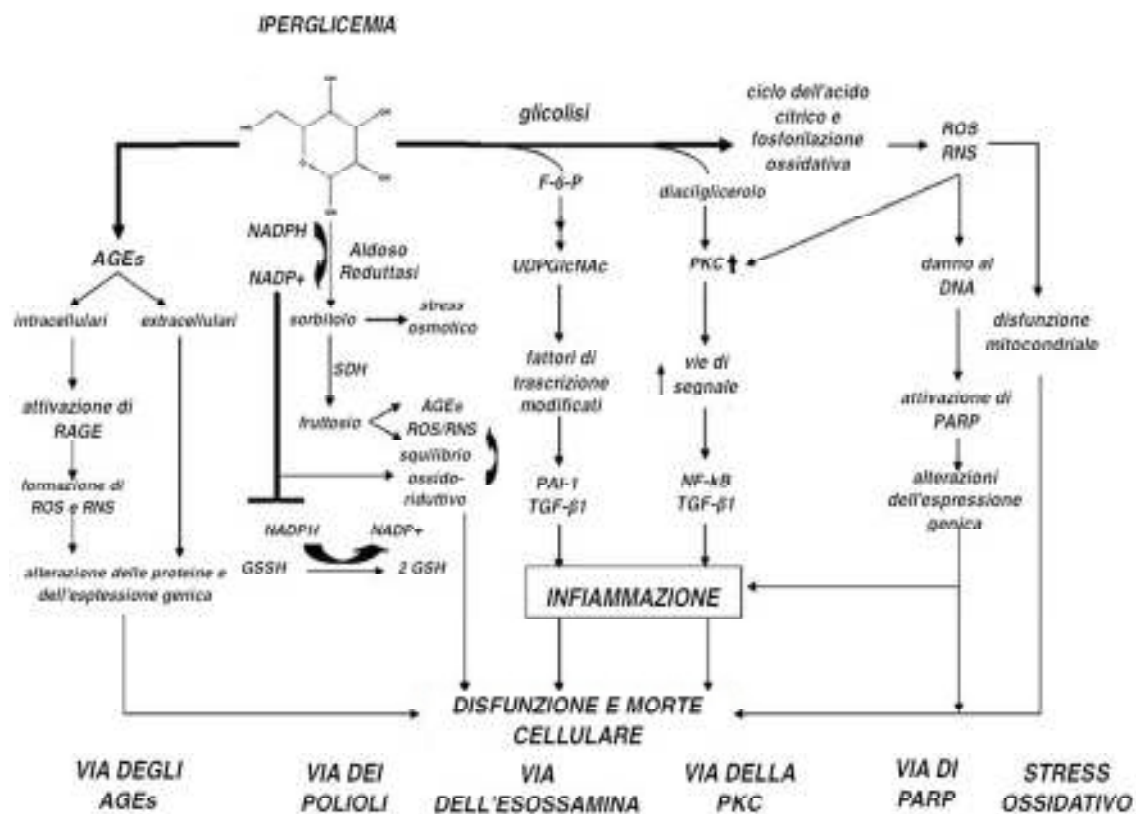


Figura 8: rappresentazione schematica degli effetti dell'iperlicemia sulle vie metaboliche nella ND. L'eccessivo metabolismo del glucosio genera un eccesso di NADH e porta ad un sovraccarico della catena di trasporto degli elettroni, causando stress ossidativo, danno mitocondriale ed attivazione di PARP. L'attivazione di PARP ad opera delle ROS è in collegamento con la via dell'esossamina e con l'attivazione della PKC nell'induzione dell'infiammazione e della disfunzione neuronale. Una combinazione dello stress ossidativo e dell'iperlicemia, inoltre, attiva RAGE, la via dei polioli, la via dell'esossamina e la PKC determinando uno squilibrio ossido-riduttivo, alterazioni dell'espressione genica ed ulteriore stress ossidativo.

La membrana dell'assone mielinizzato esprime numerose proteine fisiologicamente attive che intervengono direttamente nella trasmissione dell'impulso nervoso. Queste includono i canali del sodio voltaggio-dipendenti, direttamente responsabili della propagazione del potenziale d'azione lungo

l'assone, e che sono concentrati in segmenti assonali non mielinizzati chiamati nodi di Ranvier, così come i canali del potassio (sia lenti che veloci) responsabili di varie attività elettrofisiologiche secondarie, coinvolte nel recupero dello stato di riposo dopo il passaggio di un impulso nervoso; la pompa Na^+, K^+ -ATPasi rientra in questa categoria. La distribuzione di tali molecole lungo la membrana assonale è strettamente associata con la struttura discontinua della guaina mielinica. Quest'ultima, attraverso la sua resistenza elettrica e bassa capacità, permette la depolarizzazione della membrana internodale assonale con un minimo consumo di energia. Infatti, i canali del sodio, particolarmente concentrati nei nodi di Ranvier, sono attivati dalla depolarizzazione della membrana assonale indotta dall'arrivo di un'onda di ioni sodio, permettendone così l'entrata massiccia nell'assone e provocando una nuova ondata di depolarizzazione, che viene trasmessa passivamente fino al successivo nodo di Ranvier, in cui è generato un nuovo potenziale d'azione. E' dunque chiaro che la perdita di compattazione della guaina comporta una dissipazione del potenziale d'azione che non è più in grado di "saltare" da un nodo di Ranvier all'altro, diminuendo la velocità di propagazione dell'impulso (riduzione dell'NCV). Come già accennato, accanto a tale alterazione, nella ND umana e sperimentale si assiste ad una diminuzione dell'attività della pompa Na^+, K^+ -ATPasi (figura 9). Tale enzima è localizzato a livello della membrana plasmatica e permette di trasportare contro gradiente di concentrazione tre ioni Na^+ verso l'ambiente extracellulare e due ioni K^+ verso l'ambiente intracellulare, sfruttando l'energia derivante dall'idrolisi dell'ATP. Col progredire del processo si determina una differenza di potenziale tra ambiente intracellulare ed extracellulare, indispensabile per la propagazione dell'impulso.

In aggiunta alle alterazioni appena descritte, è stato riportato che nei ratti STZ il quadro ormonale risulta alterato dal diabete, come alcune evidenze cliniche già indicavano (Andreis, et al., 1990, Chan, et al., 2005, El'tseva, et al., 1993, Salonia, et al., 2006). In particolare, nel plasma di ratti maschi STZ, il diabete provoca una diminuzione generale dei livelli di steroidi neuroattivi, tranne per quelli di PREG e THP, che rimangono invariati (Leonelli, et al., 2007). Successivamente è stato dimostrato che i livelli di steroidi neuroattivi determinati nel plasma non riflettono la concentrazione di queste molecole nel sistema nervoso periferico. Infatti, i livelli osservati nel nervo sciatico sono diminuiti dal diabete, anche se presentano alcune

differenze sostanziali con quanto osservato nel plasma, indicando che la patologia in quanto tale è in grado di alterare il contenuto steroideo, ma influenza in modo differente i livelli degli steroidi neuroattivi presenti nel nervo e nel plasma (Roglio, et al., 2007).

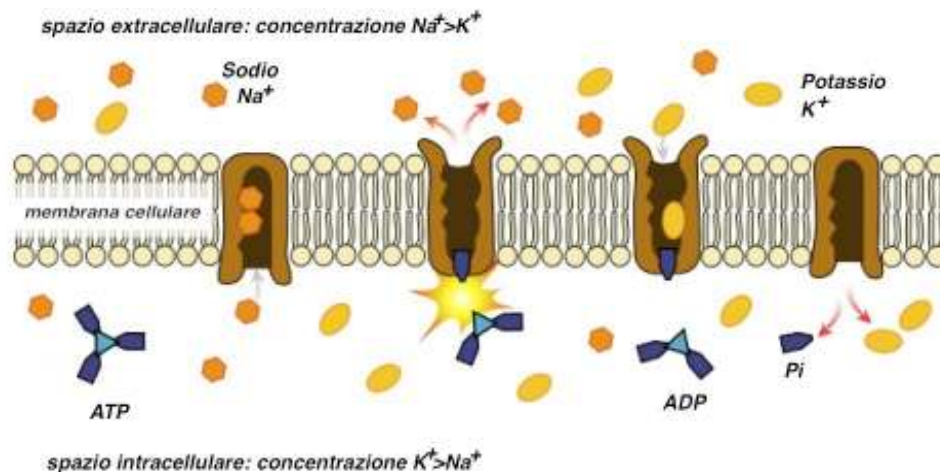


Figura 9: rappresentazione schematica dell'attività della pompa $Na^+,K^+-ATPasi$. Progressivamente da sinistra verso destra, si possono osservare le varie fasi della sua attività: nella prima rappresentazione, tre ioni Na^+ si legano ad un dominio intracellulare della pompa favorendo il legame con l'ATP; nella seconda, l'energia rilasciata dall'idrolisi dell'ATP permette il cambio di conformazione ed il rilascio dei 3 ioni Na^+ all'esterno della cellula; nella terza, 2 ioni K^+ extracellulari si legano alla pompa; nella quarta, la pompa ritorna alla conformazione iniziale con il rilascio nel citosol dei 2 ioni K^+ e del Pi che era legato all'ATP.

Ulteriori osservazioni sono state condotte a livello del sistema nervoso centrale. Queste hanno mostrato ancora una volta che la patologia è in grado di alterare i livelli tissutali di steroidi neuroattivi e che in particolare il quadro steroideo cambia a seconda dell'area presa in esame (Caruso, et al., 2008). In generale si osserva una diminuzione dei livelli di steroidi neuroattivi, suggerendo che il diabete possa alterare la macchina biosintetica a livello del sistema nervoso o dell'uptake dal plasma. Tuttavia si osservano anche degli incrementi di steroidi, come ad esempio, del THP e del 17β estradiolo nel midollo spinale di ratti diabetici. Queste evidenze possono indicare un tentativo dell'organismo di superare il danno provocato dall'iperglicemia, cercando di produrre in maggiore quantità alcuni ormoni, ma tale tentativo non sembra essere sufficiente, indicando comunque le molecole steroidee come buoni candidati per una terapia contro la neuropatia. Inoltre, lo studio puntuale del quadro ormonale di un dato tessuto o di una data area cerebrale può permettere lo sviluppo di terapie mirate.

1.3.4 Effetto protettivo degli steroidi neuroattivi sulla neuropatia periferica diabetica

Studi condotti da numerosi gruppi di ricerca hanno evidenziato che gli steroidi neuroattivi possono esercitare un'azione protettiva sul sistema nervoso periferico durante l'invecchiamento o a seguito dell'instaurarsi di neuropatie periferiche, ad esempio quella indotta da trauma, dal diabete o da malattie genetiche (Azcoitia, et al., 2003, Koenig, et al., 1995, Melcangi, et al., 2003b).

Nel modello di neuropatia indotta da streptozotocina, dopo 8 mesi di diabete, si possono osservare severe alterazioni della morfologia del nervo sciatico di ratto, come, ad esempio, irregolarità morfologiche, assottigliamento e ridotta compattazione della guaina mielinica ed una diminuita espressione di Po e PMP22. Inoltre, in questo modello sperimentale la somministrazione per un mese di steroidi neuroattivi, come il PROG o il DHP, riesce a contrastare la comparsa di tali alterazioni nel nervo (Veiga, et al., 2006). Nello stesso modello, ma dopo soli tre mesi dall'induzione del diabete, il trattamento cronico con steroidi neuroattivi è in grado di correggere la riduzione dell'NCV, della sensibilità termica, della densità delle fibre nervose intraepidermiche (IENF) e dei livelli di mRNA delle proteine della mielina (specialmente Po e PMP22) e di aumentare l'attività dell'enzima $\text{Na}^+, \text{K}^+ \text{-ATPasi}$ (Leonelli, et al., 2007).

Anche il T ed i suoi metaboliti esercitano un effetto protettivo nella neuropatia diabetica indotta da STZ. Il trattamento con T induce il solo ripristino della densità delle IENF, mentre il DHT contrasta la riduzione della NCV, delle fibre nervose intraepidermiche, dell'attività della pompa $\text{Na}^+, \text{K}^+ \text{-ATPasi}$, dell'espressione genica di Po e aumenta la soglia nocicettiva termica. Il 3α -diolo sembra essere efficace nel contrastare gli effetti del diabete sulla NCV, sulla soglia nocicettiva termica e sulla densità delle IENF (Roglio, et al., 2007). Il meccanismo d'azione che sottende questi effetti può essere molteplice. In quanto tale, il 3α diolo non lega AR (Roselli, et al., 1987) ma può farlo dopo essere riconvertito a DHT, in quanto la conversione mediata dall'enzima $3\alpha\text{-HSD}$, è un processo reversibile (Melcangi, et al., 2001b). In alternativa, il 3α -diolo potrebbe spiegare il suo effetto attraverso l'interazione con il recettore GABA_A , che è presente sia nel nervo sciatico che nelle colture di

cellule di Schwann (Frye, et al., 1996, Gee, et al., 1988, Melcangi, et al., 1999). Un terzo meccanismo d'azione potrebbe essere l'interazione con il recettore degli estrogeni β (ER β). Diverse osservazioni hanno infatti dimostrato che il 3α -diolo è in grado di interagire con questo recettore e che è in grado di modulare la trascrizione specialmente attraverso la variante ER β 2 (Pak, et al., 2005). ER β 2 è stato identificato in molti tessuti di ratto, incluso il cervello. La sua espressione è molto bassa in colture di cellule di Schwann di nervo sciatico di ratti neonati (Groyer, et al., 2006), ma è abbondante nei motoneuroni del midollo spinale in seguito a danno del nervo sciatico (Islamov, et al., 2003). Quindi, ER β potrebbe essere coinvolto nei meccanismi di rigenerazione del nervo.

Complessivamente queste osservazioni indicano che gli steroidi neuroattivi possono svolgere un'efficace azione protettiva nei confronti della neuropatia diabetica. Quest'ultima osservazione è particolarmente importante in quanto, nonostante i notevoli passi avanti compiuti nella comprensione delle cause metaboliche della ND, non sono ancora disponibili per la clinica trattamenti farmacologici che agiscano su di esse per correggerle. L'attuale approccio terapeutico è quindi rappresentato dal controllo della glicemia, dalla correzione dei fattori di rischio cardiovascolare e dal trattamento dei sintomi, specialmente il dolore. I farmaci maggiormente prescritti per il controllo di quest'ultimo sono gli antidepressivi triciclici, gli inibitori della ricaptazione della serotonina ed alcuni farmaci antiepilettici, che nei casi più gravi possono essere usati in associazione con gli analgesici classici.

1.4 PROTEINA TRASLOCATRICE DI 18kDa (TSPO)

TSPO è una proteina transmembrana di 18 kDa localizzata a livello della membrana mitocondriale esterna. Sebbene oggi l'acronimo TSPO e cioè proteina traslocatrice di 18 kDa (Papadopoulos, et al., 2006), sia comunemente utilizzato per indicarla, fino a pochi anni fa questa proteina era nota a tutti come il recettore periferico delle benzodiazepine (PBR).

TSPO fu identificato per la prima volta nel 1977 a seguito del tentativo da parte di alcuni ricercatori di individuare un sito di legame per il diazepam anche nei tessuti periferici (Braestrup and Squires, 1977, Gavish, et al., 1999, Lacapere and Papadopoulos, 2003). La caratterizzazione di questo sito di legame per il diazepam fuori dal cervello ha portato all'assegnazione del nome di recettore "periferico" per le benzodiazepine, o PBR appunto, per poterlo distinguere dal recettore "centrale" delle benzodiazepine, che è parte del complesso recettoriale del GABA_A (Gavish, et al., 1999, Lacapere and Papadopoulos, 2003). Sebbene il termine fosse già largamente utilizzato, soprattutto per ragioni storiche, già prima del 2006 diversi nomi furono assegnati per indicare questa proteina, tra cui recettore mitocondriale per le benzodiazepine, complesso recettoriale mitocondriale per l'inibitore del legame del diazepam (DBI), sito di legame per PK11195, proteina legante l'isochinolona (IBP), pk18 e recettore ω 3. Sebbene questi nomi definiscano alcune caratteristiche della proteina, nessuna era in grado di descriverla appieno.

Oltre alla sua capacità di legare le benzodiazepine, il TSPO riveste un ruolo importante nella steroidogenesi (Besman, et al., 1989) come verrà discusso in seguito, e in altri processi come la regolazione della proliferazione cellulare (Alho, et al., 1994), l'immunomodulazione (Zavala, 1997), il trasporto delle porfirine, la sintesi del gruppo eme (Taketani, et al., 1995), il trasporto anionico (Basile, et al., 1988) e l'apoptosi (Hirsch, et al., 1998).

Da un punto di vista strutturale, il TSPO è costituito da 5 α -eliche di circa 21 aminoacidi ciascuna che attraversano la membrana mitocondriale esterna formando una struttura a canale (Joseph-Liauzun, et al., 1998) (figura 10). La regione C-terminale è rivolta verso il citoplasma e contiene un sito di legame per il colesterolo (Li and Papadopoulos, 1998). La parte N-terminale è invece rivolta verso la membrana mitocondriale interna.

Il gene del TSPO possiede molte caratteristiche comuni ai geni housekeeping. La sua sequenza codificante è molto conservata attraverso l'evoluzione, dai batteri al genere umano, è presente anche nelle piante (come ad esempio nella patata (Corsi, et al., 2004)) e la delezione dell'intera sequenza produce un fenotipo di morte embrionica precoce (Gavish, et al., 1999)

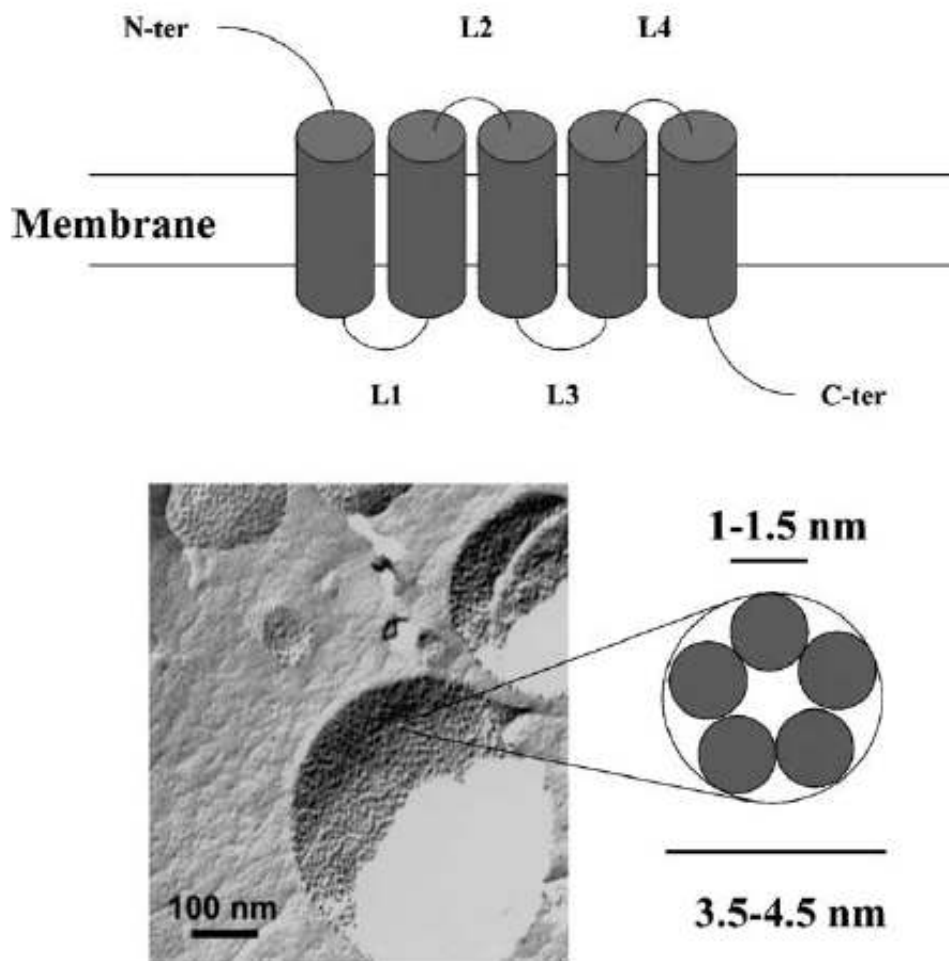


Figura 10: struttura del TSPO. In alto, predizione della struttura secondaria del TSPO, consistente di 5 eliche transmembrana. Sotto a sinistra, immagine al microscopio elettronico di una frazione di proteoliposoma congelata di TSPO ricostituito. Sotto a destra, Visione dall'alto di un monomero del TSPO; considerando il diametro di un'elica transmembrana (1-1.5 nm) l'ipotetico monomero del TSPO risulterebbe possedere un diametro tra 3.5 e 4.5 nm, identico a quello osservato nel proteoliposoma. Tratto da (Lacapere and Papadopoulos, 2003).

La proteina è espressa ampiamente in tutto l'organismo ma è particolarmente presente (dalle 20 alle 50 volte in più) nei tessuti in cui vengono sintetizzati gli steroidi (Gavish, et al., 1999, Lacapere and Papadopoulos, 2003), e questo è in linea con l'importanza che riveste nella sintesi di queste molecole. Nel cervello invece la sua espressione è limitata alle cellule ependimali e nella glia (Lacapere and Papadopoulos, 2003), mentre nel sistema nervoso periferico si trova espressa nelle cellule di Schwann.

A livello subcellulare, il TSPO è localizzato principalmente nella membrana mitocondriale esterna (OMM), specialmente nelle zone dove prende contatto con

quella interna (IMM) (Lacapere and Papadopoulos, 2003). Il TSPO è stato trovato associato al poro di transizione della permeabilità mitocondriale (MPTP), ma non è ancora stato chiarito se tale interazione sia accidentale o se il TSPO faccia parte del complesso. Sebbene i ligandi del traslocatore regolino l'MPTP (Kinnally, et al., 1993), resta da definire se il ruolo assunto dal TSPO sia attivo o passivo.

Oltre alla localizzazione sulla membrana mitocondriale esterna, il TSPO è stato rilevato anche nel compartimento nucleare di cellule umane sia normali che cancerose del fegato (Venturini, et al., 1998); successivamente è stata riportata una simile distribuzione nucleare e perinucleare in cellule di tumore (Hardwick, et al., 1999), a seguito della quale è stata proposta una correlazione con la presenza della proteina nel nucleo e il ritmo di proliferazione cellulare. Inoltre, il TSPO è presente sulla membrana plasmatica e su quella di diversi organelli in molti tipi cellulari (Antkiewicz-Michaluk, et al., 1988, Oke, et al., 1992, Olson, et al., 1988). Sebbene sia possibile che la diversa localizzazione della proteina sia indice di differenti funzioni, ad oggi il significato di tali osservazioni non è stato ancora chiarito.

Il TSPO è in grado di legare diverse molecole, che presentano natura strutturale anche molto diversa. Tra queste si possono individuare derivati benzodiazepinici (Pedigo, et al., 1981), dell'isochinolina carbossamide (Le Fur, et al., 1983), delle pirrolobenzossazepine (Campiani, et al., 1996), della 2-fenil-imidazo[1,2- α]piridina (Serra, et al., 1999), della fenossifenil-acetilamide (Culty, et al., 2001), del piridazinoindolo (Trapani, et al., 2005) e dell'8-ossididrossipurina (Kita, et al., 2004).

In aggiunta a questi ligandi ad alta affinità, anche le porfirine dicarbossili legano il TSPO e seppure lo facciano con minore affinità, è stato proposto che esse possano essere dei ligandi endogeni (Snyder, et al., 1987). Anche il polipeptide DBI è stato indicato, così come i suoi prodotti di processamento, come un possibile ligando endogeno (Lacapere and Papadopoulos, 2003). Inoltre, più recentemente, il colesterolo è stato identificato come un ligando ad alta affinità per la proteina (Lacapere and Papadopoulos, 2003), come accennato in precedenza.

Studi di binding e di espressione hanno dimostrato che la proteina di 18kDa nei roditori possiede la capacità di legare sia l'isochinolina carbossamide che le benzodiazepine (che però è anche dipendente da una proteina associata al TSPO,

VDAC). Tuttavia, sia nell'uomo che nel bovino, seppure la proteina abbia caratteristiche di legame simili, la sua affinità è dalle 50 alle 100 volte inferiore a quella osservata nei roditori (Farges, et al., 1993, Gavish, et al., 1999). Tali discordanze tra le specie possono essere spiegate dalle differenze nella sequenza aminoacidica della proteina stessa (Farges, et al., 1993), anche se non è chiaro il suo significato da un punto di vista evolutivo.

Il TSPO è il componente fondamentale di un complesso multimerico di circa 140-200 kDa, illustrato in figura 11, localizzato nella membrana mitocondriale esterna e particolarmente arricchito nelle zone di contatto con quella interna (Gavish, et al., 1999). Tra le proteine che compongono tale complesso è stato identificato il TSPO stesso (Antkiewicz-Michaluk, et al., 1988, Lacapere, et al., 2001), il canale anionico voltaggio-dipendente (voltage-dependent anion channel, VDAC) di 32 kDa che lega le benzodiazepine ed è importante per il legame fra il TSPO e il DBI (Garnier, et al., 1994) e il traslocatore del nucleotide adenina (adenine nucleotide translocator, ANT) di 30 kDa con funzioni ancora non ben definite (McEnery, et al., 1992) e che è accoppiato al TSPO.

Altre due proteine associate al TSPO sono state identificate in questo complesso, e sono PRAX-1 (PBR-associated protein 1) (Galiegue, et al., 1999) e PAP7 (PBR and protein kinase A regulatory subunit RI α -associated protein) (Li, et al., 2001a). PRAX-1 è localizzata a livello del citoplasma ed è in grado di interagire con TSPO entrando nella membrana mitocondriale esterna. Il suo ruolo è ancora incerto ma è probabile che il legame con il TSPO serva a modulare l'attività del traslocatore (Galiegue, et al., 1999). PAP7 è una proteina associata alla protein-chinasi A (PKA) la quale ha la funzione di fosforilare StAR.

Sulla base della sua struttura proteica, precedentemente descritta, sono stati ipotizzati 3 maggiori funzioni attribuibili al TSPO:

1. il legame al colesterolo seguito dal suo trasporto, cruciale nella biosintesi degli steroidi e in quella dei sali biliari;
2. l'importo di proteine, fondamentale nella biogenesi delle membrane;
3. il legame con le porfirine e il loro trasporto, coinvolte nella biosintesi del gruppo eme.

Tutti gli altri ruoli attribuibili al TSPO possono essere realizzati, in modo diretto o indiretto, a partire da queste 3 funzioni.

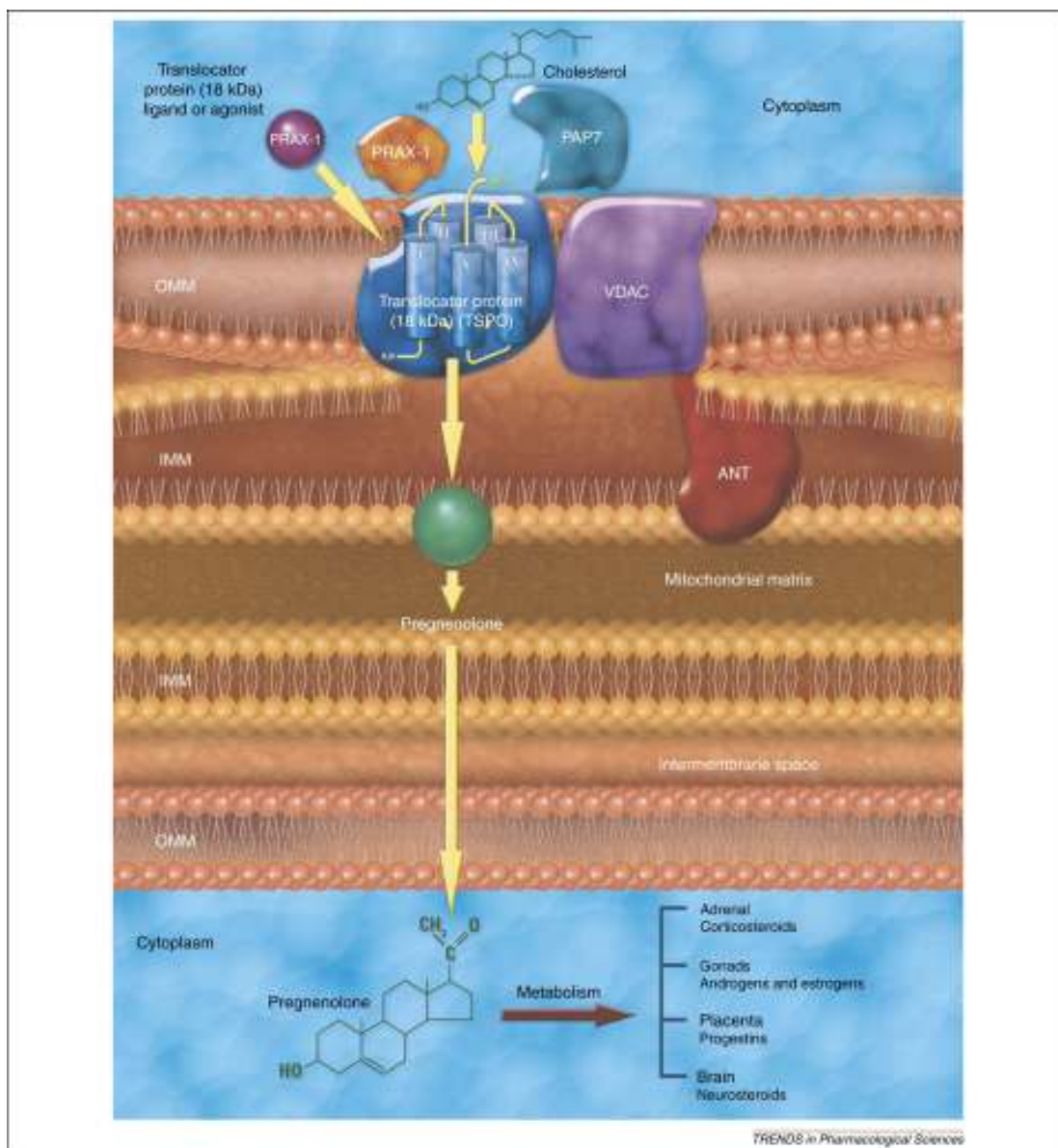


Figura 11: struttura del TSPO ed entrata del colesterolo nel mitocondrio: il colesterolo a livello della IMM viene convertito in pregnenolone il quale esce dal mitocondrio e viene metabolizzato. Per il significato delle sigle fare riferimento al testo.

1.4.1 TSPO e steroidogenesi

Come precedentemente descritto la biosintesi degli steroidi consiste in una serie di reazioni enzimatiche a partire dal precursore comune colesterolo. Il primo passaggio enzimatico converte il colesterolo in pregnenolone per opera del

citocromo P450sc_c situato a livello della membrana mitocondriale interna delle cellule steroidogeniche.

E' stato dimostrato che il TSPO è in grado di legare il colesterolo citoplasmatico mediante una sequenza aminoacidica consenso per il colesterolo all'estremità C-terminale (Li, et al., 2001b) e consentirne la traslocazione nella membrana mitocondriale interna (Besman, et al., 1989, Papadopoulos, et al., 1997) (figura 11). Si pensa che la StAR possa legare il colesterolo nel citoplasma e facilitarne il legame con il TSPO (Bose, et al., 2002a, Bose, et al., 2002b). Una volta trasferito all'interno del mitocondrio, il colesterolo incontra l'enzima P450sc_c e viene così convertito in pregnenolone. Questo processo di traslocazione viene stimolato da specifici ligandi che hanno un'elevata affinità per il TSPO. DBI, come precedentemente accennato, è un ligando endogeno di questa proteina. E' un polipeptide di 11 kDa e studi condotti nel ratto hanno evidenziato che lega in modo specifico il TSPO. Sia il DBI che i suoi prodotti proteolitici stimolano la steroidogenesi sia *in vitro* (Lacapere and Papadopoulos, 2003, Papadopoulos, et al., 2006) che *in vivo* (Costa, et al., 1994, Lacapere and Papadopoulos, 2003) attraverso la facilitazione del passaggio del colesterolo all'interno del mitocondrio.

1.4.2 Altre funzioni di TSPO

Importo proteico.

Il ruolo del TSPO nel processamento proteico mitocondriale è stato proposto per la prima volta sulla base di studi che indicavano che i ligandi del TSPO erano in grado di aumentare il processamento mitocondriale della superossido dismutasi (Wright and Reichenbecher, 1999). Tali studi sono stati successivamente confermati da osservazioni che indicano la presenza del traslocatore nella membrana mitocondriale esterna come necessario per l'ingresso della StAR nel mitocondrio (Hauet, et al., 2005), un passaggio cruciale per la regolazione della sintesi degli steroidi.

Trasporto delle porfirine e biosintesi dell'eme.

Le porfirine dicarbossiliche legano il TSPO, il quale è anche coinvolto nel metabolismo nei mammiferi dei tetrapirroli (Taketani, et al., 1995). Inoltre,

l'omologo del TSPO dei mammiferi nel *Rhodobacter sphaeroides*, chiamato trasportatore dell'ossigeno sensibile all'arricchimento in triptofano regola la formazione del complesso fotosintetico di membrana ed è coinvolto nel trasporto degli intermedi delle porfirine (Yeliseev and Kaplan, 2000).

Una relazione tra il TSPO e la biosintesi dell'eme è stata indicata nell'interferenza che il metilmercurio produce sulla biosintesi dell'eme stesso mediata dal TSPO (O'Hara, et al., 2002). Nonostante i notevoli passi in avanti nella comprensione della struttura e funzione del TSPO, non è ancora stato chiarito in modo preciso come il TSPO agisca nel legare e trasferire il colesterolo e i tetrapirroli.

Trasporto ionico.

Il trasporto del Ca^{2+} nel citoplasma delle cellule della mucosa gastrica legato al TSPO possiede un potenziale effetto protettivo che è legato alla secrezione degli ioni Cl^- , Ca^{2+} -dipendente (Ostuni, et al., 2004).

Immunomodulazione.

Il TSPO modula la funzione delle cellule immunocompetenti (Gavish, et al., 1999), e la sua espressione è stata legata alla risposta infiammatoria che avviene in seguito al danno da ischemia-riperfusion in un modello di autotrapianto nel maiale (Faure, et al., 2003), oltre che su modelli murini di infiammazione (Torres, et al., 2000).

Respirazione cellulare e coinvolgimento nel processo ossidativo.

I ligandi del TSPO aumentano il ritmo dello stadio IV della respirazione e diminuiscono lo stadio III (Gavish, et al., 1999, Lacapere, et al., 2001, Larcher, et al., 1989), producendo una significativa diminuzione del controllo della respirazione. I ligandi PK11195 e Ro5-4864 sono anche in grado di alterare il consumo dell'ossigeno nelle cellule di neuroblastoma di topo C-1300 e nei mitocondri della corteccia cerebrale di ratto (Larcher, et al., 1989). Inoltre, l'esposizione di cellule neuronali ai ligandi di TSPO *in vitro* genera radicali non legati all'ossigeno con un processo che probabilmente coinvolge l'MPTP (Larcher, et al., 1989). PK11195 modula i cambiamenti mediati dell'ossigeno nell'espressione del fattore respiratorio nucleare 1, e blocca le malformazioni oculari durante lo

sviluppo embrionale indotti dall'ipossia e dalla 2'-desossiadenosina (Charlap, et al., 2003, O'Hara, et al., 2003). Questi risultati indicano il TSPO come un potenziale mediatore nei meccanismi di risposta allo stress durante la fase embrionale.

1.4.3 TSPO e neuroprotezione

Per studiare le caratteristiche farmacocinetiche del traslocatore e le sue implicazioni in processi fisiologici e patologici, sono stati sintetizzati ligandi con elevata affinità per il TSPO. Tra questi, il Ro5-4864 è un derivato benzodiazepinico che agisce come agonista, mentre il PK11195 è un derivato isochinolinico ed agisce, *in vivo*, come antagonista (Benavides, et al., 1984). Queste due molecole sono state utilizzate anche come modulatori dell'attività del TSPO. Ad esempio, in un modello di invecchiamento, dove è nota la degenerazione a cui vanno incontro le fibre nervose, è stato osservato come il ligando Ro5-4864, modulando l'attività del TSPO, sia in grado di migliorare alcuni parametri morfologici delle fibre nervose in ratti maschi in età avanzata. Infatti, è stato riscontrato un aumento del numero di fibre mielinizzate e una diminuzione della percentuale di fibre con decompattazione mielinica a livello del nervo sciatico negli animali trattati col ligando rispetto a quelli che non l'hanno ricevuto (Leonelli, et al., 2005). Al contrario, un altro ligando, il PK11195, che lega il TSPO in un sito differente rispetto al Ro5-4864 (Le Fur, et al., 1983) sul modello dell'invecchiamento risulta inefficace (Leonelli, et al., 2005).

Il TSPO esercita un effetto neuroprotettivo anche attraverso altre sue funzioni come la regolazione dei processi ossidativi. Per esempio è stato dimostrato che tale proteina può modulare la sensibilità mitocondriale ai ROS, i quali sono una delle cause principali degli eventi neurodegenerativi che avvengono con l'invecchiamento (Casellas, et al., 2002).

Inoltre, è stato osservato che nel SNP, dopo lesione alle fibre nervose, l'espressione del TSPO aumenta a livello delle cellule di Schwann e dei macrofagi presenti nella sede della lesione. La sua espressione torna a livelli basali dopo reinnervazione (Lacor, et al., 1999). Il ruolo che il TSPO ha in questo processo di rigenerazione

nervosa non è ancora definito; ad esempio potrebbe regolare alcuni processi infiammatori che intervengono dopo la lesione (Casellas, et al., 2002).

Per studiare il ruolo del TSPO in processi di rigenerazione nervosa sono stati eseguiti esperimenti su ratti sottoposti a lesione ai gangli dorsali (DRG). Il trattamento con il Ro5-4864 provoca un aumento della produzione di pregnenolone e progesterone nei DRG con effetto neurotrofico sulle fibre nervose in via di rigenerazione (Akwa, et al., 1993, Mills, et al., 2005). La contemporanea somministrazione del PK11195 blocca la produzione di steroidi osservata dopo trattamento con il Ro5-4864, mentre la sola somministrazione del PK11195 non ha alcun effetto (Lacor, et al., 1999).

Si pensa che il TSPO possa intervenire nella rigenerazione nervosa anche attraverso un aumento della disponibilità di ATP, essenziale molecola per numerosi processi e quindi implicata anche nella crescita nervosa (D'Ambrosi, et al., 2001). Il TSPO è infatti associato al poro di transizione mitocondriale (MPTP) che permette la produzione del gradiente elettrochimico necessario per la sintesi di ATP. Alcuni studi hanno dimostrato che i ligandi del TSPO possono regolare questo gradiente elettrochimico ma la specificità di tali ligandi nel controllo della respirazione cellulare non è ancora del tutto definita (Casellas, et al., 2002).

1.5 LIVER X RECEPTORS (LXRS)

I liver X receptors (LXR) sono 2 isoforme di un fattore di trascrizione attivato da ligando, membro della superfamiglia dei recettori nucleari. La classica struttura di un recettore nucleare si compone da domini funzionalmente distinti: la parte N-terminale altamente variabile, il dominio di legame al DNA, che contiene 2 zinc fingers, ed è coinvolto anche nella dimerizzazione del recettore, la zona di collegamento, che conferisce flessibilità al recettore, e la zona C-terminale, che ha un ruolo fondamentale nel legame al ligando, nella localizzazione nucleare, nella dimerizzazione e nell'interazione con coattivatori e corepressori. Le 2 isoforme vengono chiamate LXR α (NR1H3) e LXR β (NR1H2), e hanno il 78% di omologia nella sequenza (Ulven, et al., 2005). Gli LXRs furono identificati per la prima volta nel 1994, da due distinti gruppi di ricerca (Apfel, et al., 1994, Song, et al., 1994), e furono inizialmente classificati come un unico recettore orfano in quanto i suoi

ligandi naturali non erano ancora noti. Negli anni successivi, però, tali ligandi furono identificati in una serie di derivati ossidati del colesterolo, chiamati comunemente “ossisteroli”. Il nome LXR deriva dal fatto che questi recettori sono stati identificati a partire da una libreria di cDNA da fegato, che sono altamente espressi in questo tessuto e che formano eterodimeri con un altro membro della superfamiglia dei recettori nucleari, il retinoid X receptor (RXR – (Willy, et al., 1995)). Sia LXR α che LXR β sono ampiamente espressi, con LXR β ad espressione ubiquitaria (Li and Glass, 2004), mentre LXR α è particolarmente espresso in fegato, intestino, rene, milza, tessuto adiposo, macrofagi, muscolo e nelle ghiandole surrenali (Lu, et al., 2001). In seguito all’attivazione indotta dal ligando, entrambe le isoforme formano degli eterodimeri obbligati con il recettore dell’acido retinoico (RXR) e regolano l’espressione genica mediante il legame a specifiche sequenze geniche dette LXR response elements (LXREs) composte da 2 sequenze esanucleotidiche separate da 4 basi situate nella regione promotrice dei geni target. Il complesso LXR/RXR viene anche chiamato “eterodimero permissivo”, in quanto può essere attivato indipendentemente da agonisti sia dell’uno che dell’altro recettore. In assenza di ligando, invece, LXR recluta dei complessi di corepressori che, al momento dell’attivazione del recettore, vengono scambiati con complessi di coattivatori (figura 12) (Willy, et al., 1995, Wojcicka, et al., 2007).

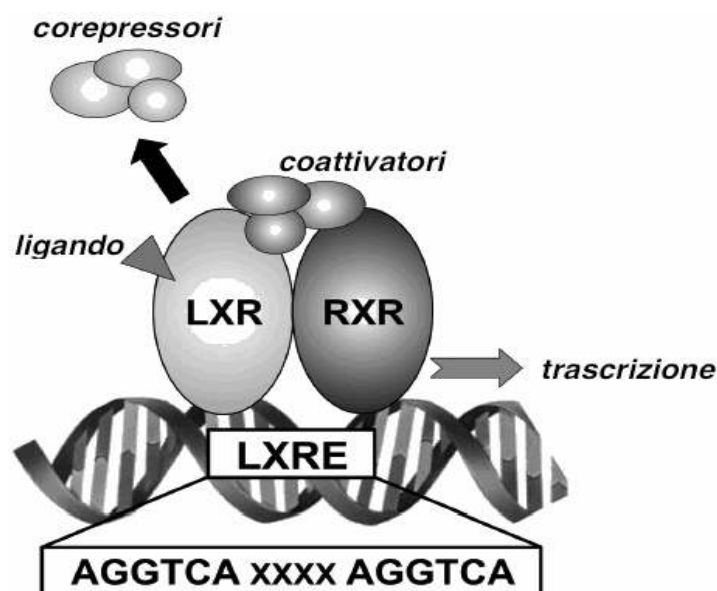


Figura 12: meccanismo di regolazione della trascrizione mediato da LXR. Si può notare che LXRE consiste di 2 sequenze esanucleotidiche separate da 4 basi.

I ligandi endogeni più potenti di LXR sono rappresentati dal 22(R)-idrossicolesterolo, dal 20(S)-idrossicolesterolo (intermedio della steroidogenesi), dal 24(S)-idrossicolesterolo (prodotto specialmente nel cervello ed ossisterolo più abbondante nel plasma umano) e dal 24(S),25-epossicolesterolo (abbondante nel fegato) (Janowski, et al., 1999, Janowski, et al., 1996, Lehmann, et al., 1997).

Osservazioni più recenti hanno, inoltre, dimostrato che il D-glucosio ed il D-glucosio-6-fosfato sono agonisti endogeni di LXR dotati di efficacia comparabile a quella degli ossisteroli (Mitro, et al., 2007). In aggiunta ai ligandi naturali di LXR, sono stati sviluppati anche vari agonisti sintetici utilizzati come tool farmacologici per lo studio del recettore. Tra gli agonisti sintetici, il GW3965 ed il To901317 (la cui struttura è rappresentata in figura 13) sono i più usati in quanto i loro valori di EC50 sono dell'ordine delle nanomoli.

Esistono anche degli antagonisti endogeni che, nel contesto fisiologico, contribuiscono alla regolazione di LXR. Gli antagonisti più importanti sono: il geranilgeranilpirofosfato (intermedio della biosintesi del colesterolo), gli ossisteroli-3-solfato (metaboliti steroidei normalmente presenti nel plasma umano) ed alcuni acidi grassi polinsaturi.

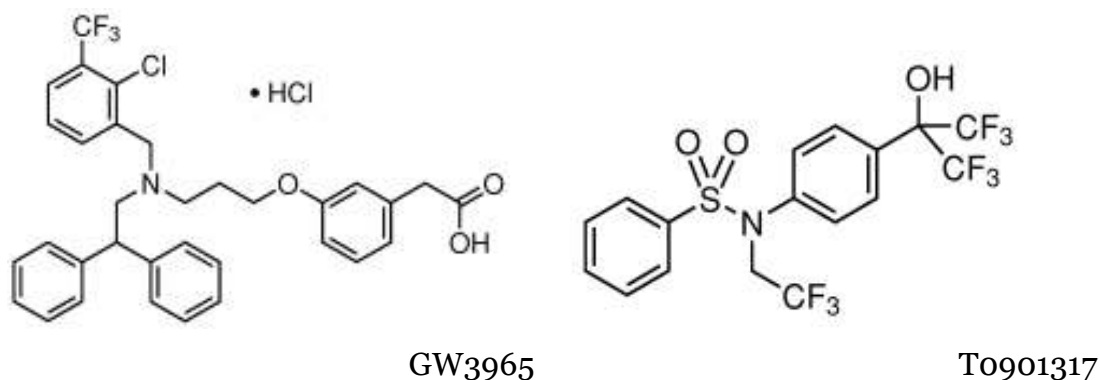


Figura 13: strutture chimiche dei ligandi sintetici di LXR, GW3965 e To901317.

1.5.1 Omeostasi del colesterolo

Per meglio comprendere l'importanza di LXR è necessario elencare i processi in cui è coinvolto il colesterolo. Questa molecola lipidica è di fondamentale importanza nel nostro organismo, in quanto è un componente essenziale delle membrane cellulari e rappresenta il precursore degli acidi biliari, della vitamina D

e soprattutto, degli ormoni steroidei. E' presente nei tessuti e nelle lipoproteine plasmatiche come colesterolo libero o sotto forma di estere, se combinato con acidi grassi a catena lunga.

L'omeostasi del colesterolo è un processo complesso, ma brevemente i punti chiave possono essere così sintetizzati:

- il colesterolo può essere assunto con la dieta oppure sintetizzato de novo nell'organismo a partire dall'acetil-CoA attraverso una complessa via metabolica, in cui lo step limitante è catalizzato dalla HMG-CoA reduttasi (3-idrossi-3-metilglutaril-Coa reduttasi);
- nel fegato, la sintesi del colesterolo è in parte regolata dall'ingresso del colesterolo proveniente dalla dieta;
- nei tessuti, il bilancio del colesterolo è regolato dai fattori che ne causano l'aumento (sintesi, assorbimento dalle LDL plasmatiche, idrolisi dei depositi) e dai fattori che ne causano la perdita (sintesi degli steroidi, formazione di esteri, retrotrasporto mediato dalle HDL);
- l'attività dei recettori delle LDL è regolata negativamente da un alto livello intracellulare di colesterolo e positivamente dalla situazione opposta. È importante che le concentrazioni del colesterolo rimangano sempre all'interno di un range fisiologico, in quanto un'esposizione a concentrazioni elevate (specialmente se cronica) risulta tossica. In particolare, livelli elevati di LDL sono associati ad aterosclerosi, mentre alti livelli di HDL sono associati ad un effetto protettivo;
- l'eccesso di colesterolo presente nel fegato è secreto nella bile, tuttavia una buona parte viene riassorbita del attraverso il ricircolo enteroepatico.

1.5.2 Ruolo biologico di LXRs

Negli ultimi anni numerosi studi si sono concentrati sulla caratterizzazione del significato biologico di LXRs ed è ormai stato ampiamente dimostrato che svolgono un ruolo chiave nell'omeostasi del colesterolo e in quella dei lipidi e dei carboidrati (Edwards, et al., 2002, Schultz, et al., 2000, Wang, et al., 2002). Infatti, in seguito all'identificazione dei suoi ligandi endogeni si è potuto osservare che gli LXRs funzionano da "sensori degli steroli". Attraverso la modulazione dei

geni responsivi proteggono le cellule dal sovraccarico di colesterolo, stimolandone i meccanismi di espulsione ed attivando la sua conversione ad acidi biliari, a livello epatico, o ad ormoni steroidei, in altri tessuti (Cummins, et al., 2006). LXR controlla infatti un gruppo di geni che codificano enzimi e proteine coinvolti nel metabolismo dei lipidi e del colesterolo, quali (Chiang, et al., 2001, Cummins and Mangelsdorf, 2006, Cummins, et al., 2006):

- l'ATP Binding Cassette Trasporter (ABC), isoforme A1, G1, G5 e G8;
- l'apolipoproteina E (ApoE);
- la CholEsterylester Transfer Protein;
- il citocromo P450 7A1 (CYP7A1), meglio noto come colesterolo 7 α -idrossilasi;
- la sintasi degli acidi grassi;
- la lipasi lipoproteica;
- la Sterol Regulatory Element Binding Protein (SREBP) l'isoforma 1c;
- LXR α (Laffitte, et al., 2001).

Inoltre, è stato recentemente osservato che LXRs sono capaci di modulare in maniera diretta anche l'espressione della StAR nella ghiandola surrenale, andando quindi a stimolare il primo fondamentale step della steroidogenesi (l'ingresso del colesterolo nel mitocondrio) (Cummins and Mangelsdorf, 2006, Cummins, et al., 2006).

LXRs nel fegato

La produzione di una linea di topi knock-out (k.o.) di LXR α è stata fondamentale per capire il ruolo di questo recettore nell'omeostasi del colesterolo. I topi k.o., quando alimentati con una dieta ricca di grassi, sviluppano una severa epatomegalia a causa di un eccessivo accumulo di colesterolo, associato ad un alterato metabolismo degli acidi biliari (che rappresentano i principali metaboliti del colesterolo nel fegato). Infatti, come già anticipato, uno dei geni target dell'azione di LXR è CYP7A1, che codifica per la colesterolo-7 α -idrossilasi, l'enzima coinvolto nello step limitante della conversione del colesterolo in acidi biliari (Peet, et al., 1998). Inoltre, tale effetto sembra specifico per LXR α , in quanto LXR β non è

in grado di compensare la mancanza di LXR α , e il topo LXR β k.o. non esibisce lo stesso fenotipo, se alimentato con dieta ricca di colesterolo.

Successivamente è stato scoperto che, a livello epatico, LXRs controllano SREBP-1c, un fattore di trascrizione chiave nella sintesi degli acidi grassi (Repa, et al., 2000c). Quest'ultima evidenza ha fornito la prova del collegamento tra l'apporto di colesterolo dalla dieta e la sintesi di trigliceridi (formati da tre acidi grassi a lunga catena). Nel fegato il colesterolo viene immagazzinato sotto forma di estere, quindi un aumento nella sintesi di trigliceridi potrebbe fornire maggiori substrati per l'esterificazione. L'aumento dei trigliceridi, però, rappresenta anche uno dei principali effetti collaterali dell'attivazione di LXR: il trattamento con agonisti di LXR comporta un forte aumento della trigliceridemia.

I ligandi di LXRs attivano anche l'espressione ABCG5 e ABCG8, trasportatori del colesterolo nella bile (Repa, et al., 2002a), una delle principali vie di escrezione del colesterolo.

LXR nell'intestino

Il colesterolo arriva all'intestino attraverso l'assunzione con la dieta e da quello presente dalla bile nel duodeno superiore. L'attivazione di LXR nell'intestino causa l'up-regolazione dei trasportatori ABCG5, ABCG8 e ABCA1. È stato dimostrato che questi trasportatori sono implicati nel limitare l'assorbimento di colesterolo (ed altri steroli naturali) della dieta (Costet, et al., 2000, Repa, et al., 2002a, Repa and Mangelsdorf, 2002b).

LXR nei macrofagi

L'accumulo di colesterolo nei tessuti periferici può essere limitato attraverso un processo di retro-trasporto, in cui il colesterolo viene trasferito dai tessuti alle HDL che lo veicolano al fegato per essere metabolizzato. Questo processo è particolarmente importante nei macrofagi circolanti per evitare la formazione di "cellule schiuma", evento precedente l'aterosclerosi. Alcuni dei geni implicati nel meccanismo di retro-trasporto sono controllati da LXR e sono, in particolare, ABCA1, ABCG1 ed ApoE. I primi due sono dei trasportatori del colesterolo e fosfolipidi alle lipoproteine, mentre la secrezione di ApoE facilita l'incorporazione del colesterolo nelle HDL (Laffitte, et al., 2001). In un modello sperimentale di

aterosclerosi nel topo, il trattamento con agonisti di LXR ha ridotto significativamente l'area di lesione della placca aterosclerotica, suggerendo che LXR potrebbe rappresentare un target promettente per il trattamento o la prevenzione dell'aterosclerosi (Joseph, et al., 2002, Repa and Mangelsdorf, 2002b). In questo contesto è opportuno ricordare che il diabete rappresenta uno dei maggiori fattori di rischio cardiovascolare e che il danno vascolare ricopre un ruolo centrale nello sviluppo della neuropatia periferica.

LXR nel tessuto adiposo

LXR è espresso anche nel tessuto adiposo, dove svolge un'importante funzione nella regolazione del metabolismo energetico. Studi condotti su topi privi di LXR, sia α che β , infatti, hanno evidenziato la presenza di adipociti piccoli ed incapaci di aumentare di dimensioni anche durante l'invecchiamento o se prelevati da animali sottoposti ad una dieta ad alto contenuto lipidico (Gerin, et al., 2005, Korach-Andre, et al.). Inoltre, il trattamento di adipociti, *in vitro*, con un agonista di LXR comporta un aumento dell'uptake di glucosio - probabilmente dovuto all'induzione sia di GLUT1 che di GLUT4 (Laffitte, et al., 2003) - della sintesi del glicogeno e del rilascio di acidi grassi non esterificati (NEFA), suggerendo un'aumentata lipolisi (Ross, et al., 2002). Questi dati sono in linea con quelli ottenuti *in vivo* (su topo), in cui l'attivazione di LXR con il T0901317 (ma non con il GW3965) ha fatto registrare aumentate concentrazioni plasmatiche di NEFA e di glicerolo (Grefhorst, et al., 2002, Grefhorst, et al., 2005).

In aggiunta all'effetto sul metabolismo dei lipidi, l'attivazione di LXRs influenza anche l'omeostasi del glucosio. In particolare, nel fegato, i loro agonisti riducono l'output di glucosio e ne aumentano l'utilizzo tramite l'induzione della glucochinasi e la repressione della fosfoenolpiruvato carbossichinasi e della glucosio-6-fosfatasi (Miao, et al., 2004). Questi enzimi, infatti, sono in grado di regolare l'utilizzo del glucosio catalizzando rispettivamente:

- il primo step della glicolisi, in cui il glucosio reagisce con l'ATP a formare glucosio-6-fosfato (G6P);
- la conversione dell'ossalacetato in fosfoenolpiruvato, uno step della gluconeogenesi;
- la conversione del G6P a glucosio.

1.5.3. LXR come induttori della steroidogenesi nel surrene

Il surrene è un organo costituito da due ghiandole, ad attività endocrina, poste al di sopra dei reni. Il parenchima della ghiandola surrenale è diviso in due regioni istologicamente e funzionalmente distinte: una più grande detta corticale o corteccia surrenale, deputata alla produzione di ormoni steroidei, ed una più piccola detta midollare, che produce specialmente catecolamine.

La regione corticale, a sua volta, è divisa in tre zone:

1. zona glomerulare: è la zona più esterna e deve il suo nome alla particolare organizzazione del tessuto ghiandolare in cordoni cellulari avvolti su se stessi a formare strutture arrotondate dette glomeruli. È specializzata nella produzione di mineralcorticoidi ed in particolare aldosterone, che viene secreto in seguito allo stimolo dell'angiotensina II e della concentrazione ematica di potassio ed esplica i suoi affetti a livello del tubulo renale;
2. zona fasciolata: è lo strato intermedio della corteccia surrenale, posto tra la zona glomerulare e la zona reticolata. È specializzata nella sintesi dei glucocorticoidi, molto importanti per il metabolismo di carboidrati, grassi e proteine, ed una piccola quantità di androgeni (DHEA o DHEAS). La zona fasciolata si trova sotto il controllo dell'asse ipotalamo-ipofisario, che, in risposta a condizioni di stress, rilascia l'ormone adrenocorticotropo (ACTH), che fa aumentare l'espressione degli enzimi steroidogenici;
3. zona reticolata: è la zona più interna ed è formata da cordoni cellulari ramificati, tortuosi ed anastomizzanti tra loro. È specializzata nella produzione di androgeni, specialmente DHEA e DHEAS. Fisiologicamente, nell'organismo maschile hanno scarsa importanza, perché secreti in scarsa quantità rispetto a quanto avviene a livello testicolare. Nella donna, invece, contribuiscono a regolare il desiderio sessuale, la secrezione sebacea e lo sviluppo di peli pubici ed ascellari.

1.5.4 LXRs nell'omeostasi del colesterolo nella ghiandola surrenale.

La ghiandola surrenale, similmente al fegato, necessita del colesterolo come precursore obbligato nella formazione dei suoi metaboliti principali, gli ormoni steroidei. Ci sono tre fonti principali di colesterolo per la steroidogenesi: l'idrolisi dei depositi di colesterolo esterificato nella cellula, la sintesi de novo e, la più importante, la captazione dalle lipoproteine circolanti (HDL).

In condizioni basali o di riposo, il colesterolo della ghiandola surrenale è principalmente immagazzinato come colesterolo estere, o secreto nella circolazione sanguigna. In condizioni di stress acuto, invece, prevalgono la captazione dalle lipoproteine e la mobilitazione dai depositi intracellulari. Similmente, in condizioni di stress cronico, la richiesta di colesterolo può aumentare ma al termine della risposta allo stress il sistema deve ritornare alle condizioni basali, per evitare effetti tossici.

La ghiandola surrenale, comunque, come il fegato, è capace di sopportare anche grandi flussi di colesterolo grazie all'attivazione di diverse vie metaboliche di efflusso, immagazzinamento e metabolismo, molte delle quali controllate da LXR, sia α che β (Repa and Mangelsdorf, 2000b).

Cummins e collaboratori, nel 2006, hanno condotto alcuni studi su topi $LXR\alpha^{-/-}$, $LXR\beta^{-/-}$ e $LXR\alpha/\beta^{-/-}$ evidenziando che:

- gli animali k.o. pesano il 30-40% in più dei wild type;
- l'assenza di LXR comporta adrenomegalia ed ipercorticosteronemia: l'adrenomegalia è un effetto specifico della deficienza di $LXR\alpha$, dal momento che le ghiandole surrenali dei topi $LXR\beta^{-/-}$ sono normali. Il livello ematico di corticosterone, invece, risulta raddoppiato negli animali doppio knock-out, e nessuna differenza significativa è stata osservata nei livelli circolanti di aldosterone, dimostrando un effetto specifico sui glucocorticoidi (però non sono stati valutati i livelli di androgeni). Inoltre i livelli plasmatici dell'ACTH risultano invariati, dimostrando un'intatta funzionalità dell'asse ipotalamo-ipofisario;

- l'assenza di LXR α comporta un'eccessiva quantità di esteri del colesterolo a livello surrenale. È stato osservato, infatti, un eccessivo numero di vacuoli contenenti materiale lipidico;
- LXR è critico per l'omeostasi del colesterolo in condizioni di stress alimentare: se sottoposti ad una dieta ad elevato contenuto lipidico, i topi LXR $\alpha/\beta^{-/-}$, accumulano più esteri del colesterolo dei topi wild type, senza osservare differenze nei livelli di trigliceridi;
- nei topi LXR $\alpha/\beta^{-/-}$ trattati con il ligando sintetico T0901317 non si osserva l'aumentata espressione dei geni coinvolti nel trasporto e nel metabolismo del colesterolo che invece è osservabile negli animali wild type sottoposti allo stesso trattamento, fornendo una spiegazione all'accumulo di colesterolo e all'adrenomegalia negli animali LXR $\alpha/\beta^{-/-}$;
- LXR è in grado di controllare l'espressione dei geni steroidogenici indipendentemente dall'azione mediata dall'ACTH. È stata valutata l'espressione di StAR, CYP11A1 e 3β -HSD in topi trattati con desametasone, un soppressore dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene. Animali wild type e quelli privi di LXR non presentano di base significative differenze nell'espressione di questi tre geni, mentre in seguito alla somministrazione del T0901317 gli animali wild type presentano un'espressione tre volte maggiore.

Questi dati confermano l'importanza cruciale di LXR nel metabolismo del colesterolo: la sua molteplice azione è infatti in grado di controllarne il delicato equilibrio nel fegato e nella ghiandola surrenalica, sia in condizioni di riposo che in condizioni di stress (figura 14).

Infine, sempre nello studio di Cummins del 2006 è stato dimostrato che LXR controlla la trascrizione della StAR anche nella ghiandola surrenalica: nella regione promotrice del gene è infatti presente LXRE e specifici test ne hanno confermato una diretta interazione con gli eterodimeri LXR/RXR. Inoltre l'espressione basale della StAR è diminuita nei topi LXR $\alpha/\beta^{-/-}$, spiegando così gli elevati livelli basali di corticosterone in questi stessi animali e l'inducibilità del corticosterone con gli agonisti di LXR.

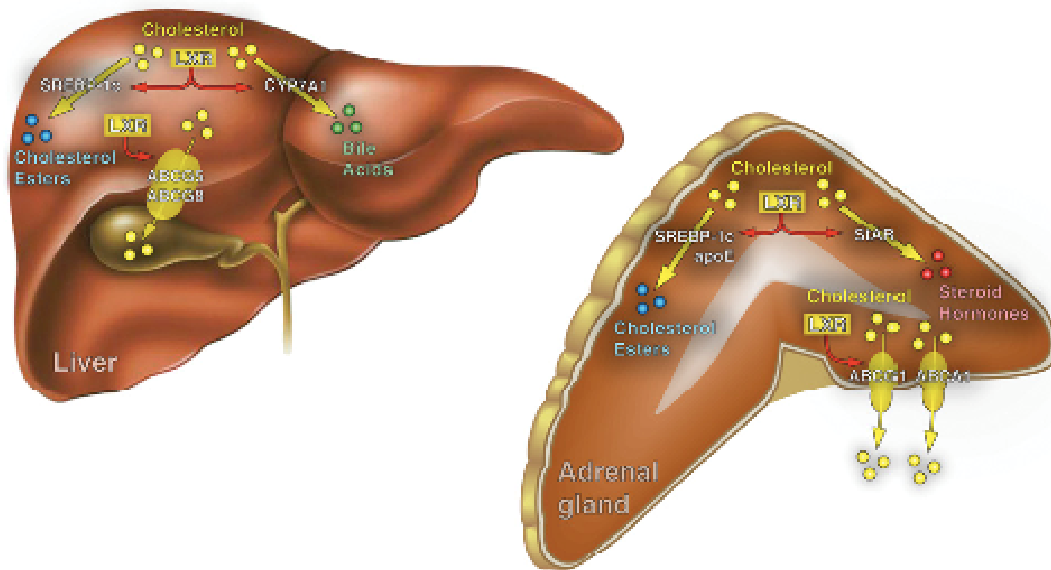


Figura 14: ruoli complementari di LXR nel fegato (liver) e nella ghiandola surrenale (adrenal gland). Nel fegato LXR controlla l'immagazzinamento del colesterolo attraverso SREBP-1c e ApoE, l'efflusso attraverso ABCG5 e ABCG8 ed il metabolismo attraverso CYP7A1. Nella ghiandola surrenale ci sono delle vie simili mediate da un set di enzimi o uguali complementari (rispettivamente SREBP-1c ed ApoE, ABCA1 ed ABCG1, StAR).

2. SCOPO

Il diabete mellito, sia di tipo 1 che di tipo 2, nel 60-70% dei casi può provocare una neuropatia periferica anche molto debilitante e per la quale attualmente non è disponibile alcuna terapia. La causa di tale neuropatia è probabilmente l'elevata e persistente iperglicemia, anche se i meccanismi molecolari alla sua base non sono stati ancora completamente compresi.

In un modello sperimentale di neuropatia diabetica, come quella che si sviluppa nel ratto dopo la somministrazione di streptozotocina (STZ), il trattamento con steroidi neuroattivi ha portato ad un generale miglioramento dei parametri comportamentali, funzionali e biochimici alterati dal diabete (Leonelli, Roglio). Inoltre, nello stesso modello è stato recentemente dimostrato che i livelli di steroidi neuroattivi osservati nel plasma e nel nervo sciatico di questi animali sono drammaticamente ridotti (Caruso, et al., 2008, Leonelli, et al., 2007). La somministrazione di progesterone e dei suoi derivati (Leonelli, et al., 2007) così come quella di testosterone e dei suoi derivati (Roglio, et al., 2007) nel ratto STZ ha però fornito dei risultati incoraggianti. Una interessante strategia terapeutica potrebbe essere rappresentata dall'utilizzo di molecole in grado di aumentare la sintesi di steroidi neuroattivi nel sistema nervoso, così da evitare i numerosi effetti collaterali associati ad una terapia ormonale sistemica.

Lo scopo di questa tesi sarà perciò quello di valutare i possibili effetti neuroprotettivi di due differenti approcci farmacologici, volti ad incrementare la sintesi steroidea nel nervo periferico del ratto diabetico.

Nella prima parte del lavoro verrà utilizzato il Ro5-4864, un ligando sintetico della proteina traslocatrice di 18 kDa (TSPO). Tale proteina è un fattore chiave nella sintesi degli steroidi neuroattivi in quanto è implicata nel passaggio limitante della steroidogenesi, il trasporto del colesterolo dal citoplasma all'interno del mitocondrio. In diversi modelli *in vivo* ed *in vitro*, l'utilizzo di ligandi del TSPO, tra cui anche il Ro5-4864, ha mostrato di avere effetti neuroprotettivi (Casellas, et al., 2002, D'Ambrosi, et al., 2001, Lacor, et al., 1999, Leonelli, et al., 2005). E' stato anche riportato che la loro somministrazione è in grado di promuovere la steroidogenesi nella corteccia surrenale, nella placenta, nei testicoli, nell'ovaio e nelle cellule gliali (Brown and Papadopoulos, 2001, Giatzakis and Papadopoulos, 2004, Lacapere and Papadopoulos, 2003, Papadopoulos, et al., 2001).

Nella seconda parte di questa tesi, sarà utilizzato lo stesso modello sperimentale per valutare il trattamento con la molecola GW3965, un ligando sintetico del Liver X Receptor (LXR). Tale recettore nucleare regola l'omeostasi del colesterolo, attraverso la sua azione diretta sull'espressione di numerosi geni implicati, tra le altre cose, nella mobilitazione del colesterolo nella cellula. L'attivazione di LXR aumenta la steroidogenesi a livello delle ghiandole surrenaliche (Cummins and Mangelsdorf, 2006, Cummins, et al., 2006), promuovendo una maggiore biodisponibilità del substrato di tutto il processo steroidogenico.

Ratti maschi STZ saranno quindi mantenuti per due mesi dopo l'insorgenza del diabete al fine di permettere l'instaurarsi della neuropatia. Durante il terzo mese, i ligandi verranno somministrati sotto cute secondo differenti protocolli. In particolare, il Ro5-4864 verrà somministrato 16 (protocollo sperimentale 1) o 4 volte (protocollo sperimentale 2), mentre il GW3965 verrà somministrato solo 4 volte.

Nel corso della sperimentazione verranno effettuati dei test comportamentali e funzionali, come il test della piastra calda e la determinazione della velocità di conduzione nervosa, per valutare gli effetti neuroprotettivi dei trattamenti. Al termine dell'esperimento i tessuti, sangue e nervo sciatico in particolare, saranno prelevati per la determinazione dei livelli di steroidi neuroattivi. Inoltre, sono previste analisi biochimiche volte a caratterizzare la neuropatia e gli effetti neuroprotettivi delle somministrazioni.

3. MATERIALI E METODI

3.1 REAGENTI

I reagenti usati in queste sperimentazioni sono stati: il 5-Pregnen-3 β -ol-20-one (PREG), progesterone (PROG), il 5 α -pregnano-3,20-dione (DHP), il 3 α -idrossi-5 α -pregnen-20-one (THP), il 3 β -idrossi-5 α -pregnen-20-one (isopregnanolone), il testosterone (T), il 5 α -androstano-17 β -ol-3-one (DHT), il 5 α -androstano-3 α ,17 β -diolo (3 α -diolo) e il deidroepiandrosterone (DHEA), acquistati da Sigma-Aldrich Italia. Il 2,2,4,6,6-17 α ,21,21,21-D₉-PROG (D₉-PROG) acquistato da Medical Isotopes; il 2,4,16,16-D₄-17 β -estradiolo (D₄-17 β -E) acquistato da CDN Isotopes. Il 17,21,21,21-D₄-PREG (D₄-PREG) è stato gentilmente sintetizzato dal Prof. P. Ferraboschi (Dipartimento di Chimica Farmaceutica, Biochimica e Biotecnologia, Università degli Studi di Milano, Milano, Italia).

Le cartucce di estrazione in fase solida (SPE) (Discovery DS-C18 500 mg) sono state acquistate da Supelco. Tutti i solventi ed i reagenti hanno un grado di purezza da HPLC (Sigma-Aldrich).

Per i trattamenti farmacologici sono stati utilizzati: streptozotocina (Sigma-Aldrich), R05-4864 (Sigma-Aldrich), mentre il GW3965 è stato sintetizzato come descritto altrove (Marino, et al., 2009).

3.2. ANIMALI

Gli animali utilizzati in tutte le sperimentazioni qui riportate sono stati ratti maschi Sprague Dawley Crl:CD BR (Charles River Italia) di circa 2 mesi di età. Questi sono stati mantenuti nello stabulario del Dipartimento di Endocrinologia, Fisiopatologia e Biologia Applicata dell'Università di Milano in condizioni di temperatura e umidità controllate, esposti a 14 ore di luce (a partire dalle 6:30) e 10 ore di buio. Gli animali sono stati mantenuti seguendo l'European Union Normative (Council Directive 86/609/EEC).

È stata usata la massima cura per minimizzare la sofferenza degli animali, che sono stati usati nel minor numero possibile, necessario per ottenere dati statistici attendibili.

3.2.1 Induzione del diabete

Il diabete è stato indotto con una singola iniezione intraperitoneale di streptozotocina (STZ, 65 mg/kg;) sciolta al momento dell'uso in un tampone citrato 0,09 M, pH 4,8. Gli animali controllo sono stati trattati con il solo tampone citrato, privo di STZ.

L'iperglicemia è stata confermata 48 ore dopo l'iniezione di STZ misurando il livello di glucosio, proveniente dal sangue prelevato dalla vena caudale, con un misuratore di glicemia Glucomen (Menarini, Napoli, Italia) o con il tester OneTouch Ultra2 (LifeScan). Soltanto gli animali con una glicemia maggiore di 300 mg/dl sono stati classificati come diabetici.

La glicemia è stata misurata anche 2 mesi dopo l'induzione del diabete, prima dell'inizio dei trattamenti e alla fine degli esperimenti (3 mesi dopo l'induzione del diabete).

3.2.2 Trattamento farmacologico

Per quanto riguarda entrambe le sperimentazioni descritte in questa tesi, i trattamenti farmacologici sono stati effettuati tramite iniezioni sottocutanee due mesi dopo l'insorgenza del diabete, durante il terzo ed ultimo mese della sperimentazione. Entrambi gli esperimenti sono quindi terminati dopo un totale di 3 mesi di diabete, per una età complessiva degli animali di 5 mesi. Il termine dell'esperimento è stato fissato 24 ore dopo l'ultimo trattamento.

Trattamento farmacologico con R05-4864.

La sostanza è stata sciolta in olio di sesamo ad una concentrazione tale per cui la dose di 3 mg/kg potesse essere somministrata in un volume finale di 200 µl. Sia i ratti controllo normoglicemici, che i ratti diabetici trattati col solo veicolo hanno ricevuto negli stessi giorni degli animali STZ R05-4864 iniezioni di pari volume di olio di sesamo.

In questo lavoro sono stati seguiti due differenti protocolli sperimentali.

Protocollo sperimentale 1: gli animali sono stati trattati a giorni alterni per un totale di 16 somministrazioni.

Protocollo sperimentale 2: gli animali sono stati trattati una volta a settimana per un totale di 4 somministrazioni.

Trattamento farmacologico con GW3965.

La sostanza è stata sciolta in olio di sesamo ad una concentrazione tale per cui la dose di 50 mg/kg potesse essere somministrata in un volume finale di 200 µl. Sia i ratti controllo normoglicemici, che i ratti diabetici trattati col solo veicolo hanno ricevuto negli stessi giorni degli animali STZ GW3965 iniezioni di pari volume di olio di sesamo.

Sulla base dei risultati precedentemente ottenuti, è stato utilizzato un unico protocollo sperimentale che prevede una somministrazione settimanale per un totale di 4 somministrazioni.

Al termine degli esperimenti, gli animali sono stati sacrificati mediante decapitazione e sangue e tessuti sono stati prelevati per le analisi successive.

In particolare, i nervi sciatici e tibiali sono stati rapidamente rimossi, congelati e mantenuti a -80°C fino al loro utilizzo.

A seguito del trattamento con Ro5-4864, da ciascun animale sono stati anche prelevati dei campioni di cute delle zampe posteriori per la determinazione della densità delle fibre intraepidermiche come descritto in seguito, e sono stati mantenuti in una soluzione di fissaggio a 4°C.

3.3. ANALISI DEGLI STEROIDI NEUROATTIVI

L'analisi è stata condotta attraverso l'uso accoppiato della cromatografia liquida e della spettrometria di massa.

I campioni sono stati estratti e purificati seguendo la procedura indicata da Caruso e collaboratori nel 2008 (Caruso, et al., 2008). Brevemente, ai campioni (100 mg/tessuto) sono stati aggiunti gli standard di riferimento interni e sono stati omogenizzati in 2 ml di MeOH/acido acetico (99:1, v/v) con un omogenizzatore ultrasonico (Branson Ultrasonics). Dopo una notte di incubazione a 4°C, i campioni sono stati centrifugati a 12000 rpm per 5 minuti ed il pellet è stato estratto 2 volte con 1 ml di MeOH/acido acetico (99:1, v/v). La fase organica è

stata, quindi, combinata ed asciugata con un leggero flusso di azoto in un bagnetto ad acqua a 40°C. I campioni sono stati risospesi con 3 ml di MeOH/H₂O (10:90, v/v) e fatti passare attraverso una cartuccia SPE, precedentemente attivata con 5 ml di MeOH e 5 ml di MeOH/H₂O (10:90, v/v). Gli steroidi sono stati eluiti in MeOH, concentrati e trasferiti in vials prima dell'analisi con cromatografia liquida accoppiata a spettrometria di massa.

L'analisi quantitativa è stata effettuata sulla base di curve di calibrazione estratte ed analizzate come i campioni con standard di riferimento interni deuterati.

Gli esperimenti in modalità ionica positiva a pressione atmosferica (APCI) sono stati eseguiti, usando uno spettrometro di massa a trappola ionica lineare (LTQ, Thermo Electron) equipaggiato con una pompa per cromatografia liquida SURVEYOR Plus e con autocampionatore Plus (Thermo Electron).

Le fasi mobili utilizzate in cromatografia liquida sono H₂O/acido formico 0.1% (A) e MeOH/acido formico 0.1% (B). Il gradiente usato (velocità di flusso 0.5 ml/min) è come segue: T_{0,0} 70% A, T_{1,5} 70% A, T_{2,0} 55% A, T_{3,0} 55% A, T_{35,0} 36% A, T_{40,0} 25% A, T_{41,0} 1% A, T_{45,0} 1% A, T_{45,2} 70% A, T_{55,0} 70% A. La valvola split è stata settata in posizione di scarico da 0 – 6.99 min, indirizzata alla sorgente tra 6.99 – 43.93 min e di nuovo allo scarico tra 43.93–55 min. La colonna Hypersil Gold (100 X 3 mm, 3 µm; Thermo Electron) è stata mantenuta a 40°C. È stato usato un volume d'iniezione di 25µl e l'ago di iniezione è stato lavato con MeOH/H₂O (1/1, v/v). I picchi della LC-MS/MS sono stati analizzati con una workstation Dell dotata di software Excalibur 2.0 SR2 (Thermo Electron).

Lo spettrometro di massa è stato usato in modalità ionica positiva con la sorgente APCI usando l'azoto come gas sheath, auxiliary e sweep a velocità di flusso rispettivamente di: 23, 8 e 2 (unità arbitrarie). Gli altri parametri della sorgente ionica sono stati: temperatura del vaporizzatore 450°C, energia di collisione della sorgente ionica (SID) 20 V, temperatura del capillare 275°C.

Lo spettrometro di massa è stato usato in modalità MS/MS usando l'elio come gas di collisione. L'energia relativa di collisione è stata impostata al 35% per il D4-17β-E e per il 3α-diolo ed al 35% in modalità Wide Band Activation (Thermo Electron) per tutti gli altri steroidi.

3.4 ANALISI FUNZIONALI E BIOCHIMICHE

3.4.1 Velocità di conduzione nervosa

Al termine dei trattamenti, la velocità di conduzione nervosa è stata misurata lungo il nervo caudale dell'animale usando il Myto EBNeuro elettromiografo (EBNeuro, Firenze, Italia) come descritto da Tredici e collaboratori (Tredici, et al., 1998). Quest'analisi si esegue ponendo un elettrodo registratore ad anello distalmente sulla coda del ratto e 2 elettrodi stimolatori ad anello rispettivamente a 5 e 10 cm dal punto di registrazione del segnale. Vengono determinati i tempi di latenza dei potenziali, registrati in corrispondenza dei due siti, dopo una stimolazione nervosa pari a 8 mA (da picco a picco, la durata dello stimolo è di 100 ms, la frequenza variabile da 1 Hz a 5 MHz) è stata calcolata la velocità di conduzione nervosa. Tutti gli studi neurofisiologici sono stati effettuati in condizioni standard in un ambiente a temperatura e umidità controllate, nella stanza adiacente a quella di stabulazione degli animali.

3.4.2 Analisi della soglia termica nocicettiva

La soglia nocicettiva al calore radiante in ratti affetti da neuropatia diabetica è stata quantificata usando l'hot plate test, o test della piastra calda (Bianchi, et al., 2004), che prevede la determinazione del tempo di latenza della risposta riflessa di allontanamento dell'arto del ratto da una fonte di calore applicata alla superficie plantare delle zampe.

Un cilindro di plexiglas dell'altezza di 40 cm viene posizionato su una piastra calda dove la temperatura viene mantenuta a $50 \pm 0,2^\circ\text{C}$. Si misura, quindi, la latenza di allontanamento della zampa posteriore, ossia il tempo che intercorre tra il momento in cui il ratto è stato posizionato sulla piastra e quello in cui l'animale allontana la zampa dalla fonte di calore, la lecca o manifesta altri segni di disturbo a causa del calore. E' stato fissato un cut-off massimo di 45 secondi, oltre il quale il

ratto è stato comunque allontanato al fine di evitare un danno alla zampa in assenza di risposta.

Il test è stato effettuato ogni 2 settimane a partire dalla seconda settimana dopo l'induzione del diabete e, ogni volta, le misurazioni sono state ripetute 2 volte per animale con un intervallo di minimo 30 minuti.

3.4.3 Attività della pompa Na⁺, K⁺-ATPasi

Omogenizzazione dei tessuti.

I nervi tibiali, liberati dalla guaina mielinica, sono stati omogenati utilizzando una soluzione contenente saccarosio 0,25 M, EGTA 1,25 mM e Tris 10 mM, a pH 7,5 in un potter di vetro. Durante l'omogenizzazione, il potter con il campione è stato mantenuto in ghiaccio per evitarne il surriscaldamento. Una volta omogenato, il campione è stato trasferito in una pipovetta e conservato a -80°C fino al momento dell'analisi.

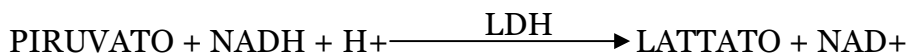
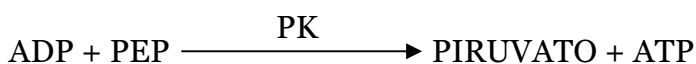
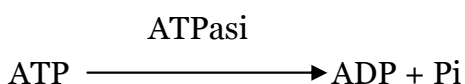
Analisi spettrofotometrica.

La misurazione dell'attività della pompa Na⁺,K⁺-ATPasi è stata effettuata spettrofotometricamente attraverso un metodo indiretto che ne prevede la determinazione come differenza tra l'attività ATPasica totale e della Mg⁺⁺-ATPasi. Quest'ultima è stata determinata inibendo, in maniera specifica, l'attività della Na⁺,K⁺-ATPasi con l'ouabaina. La determinazione dell'attività è stata eseguita secondo il metodo di Scharschmidt (Scharschmidt, et al., 1979) che prevede l'uso di ouabaina, ATP (vanadato <10 ppm), fosfoenolpiruvato (PEP), NADH, piruvato chinasi (PK) e lattato deidrogenasi (LDH) (Sigma, Italia).

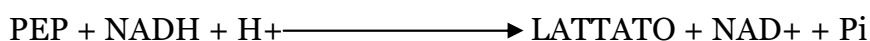
Per tale analisi è stato dunque necessario un buffer di reazione è costituito da: Tris 130,9 mM pH 7,4 a 37°C, EGTA 10,5 mM, NaCl 125,6 mM, KCl 13,09 mM e NaN₃ 5,24 mM. Il giorno dell'analisi, sono stati aggiunti al buffer di reazione nicotinamide adenina-dinucleotide ridotta (nicotinamide adenine dinucleotide reduced, NADH) e fosfoenolpiruvato (phosphoenolpyruvate, PEP) in quantità tale da averli ad una concentrazione rispettivamente di 0,52 mM e 2,62 mM. Una parte di questa soluzione è stata utilizzata tal quale, mentre ad una parte è stata aggiunta ouabaina in concentrazione pari a 1,06 mM. E' stata anche preparata una soluzione di MgCl₂ 200 mM per sciogliere l'adenosina tri-fosfato (ATP). A tali soluzioni sono

stati poi aggiunti gli enzimi piruvato chinasi (pyruvate kinase, PK) e lattato deidrogenasi (lactic dehydrogenase, LDH).

Al fine dell'analisi, sono state utilizzate delle cuvette di quarzo riempite del buffer contenente o meno ouabaina e incubate per 3 minuti a 37°C all'interno dello spettrofotometro (Eppendorf, Italia). Per l'inizio della reazione sono stati aggiunti 20 µl del complesso enzimatico PK-LDH, 10 µl del campione precedentemente scongelato e 25 µl di ATP. Si è proceduto all'agitazione mediante rapida inversione. Le reazioni che avvengono sono le seguenti:



Somma delle reazioni:



La reazione di ossidazione del NADH è stata monitorata per 12 minuti e misurata spettrofotometricamente a 340 nm. L'attività della Mg⁺⁺-ATPasi, misurata in presenza di ouabaina (3mM finale), è stata espressa come attività specifica (µmoli Pi/h/mg proteina). L'attività della Na⁺,K⁺-ATPasi è stata calcolata per sottrazione dell'attività rilevata in presenza di ouabaina da quella misurata in assenza.

Tutti i valori sono stati espressi come la media±S.E.M. dell'attività specifica di almeno due determinazioni. La quantità di proteina è stata determinata mediante il metodo di Lowry usando l'albumina di siero bovino come standard (Lowry, et al., 1951).

3.4.4 Valutazione della densità delle fibre intraepidermiche

Nella sperimentazione con il Ro5-4864, il danno ai nervi periferici è stato valutato anche mediante un esame patologico delle fibre intraepidermiche delle zampe posteriori. La parte inferiore delle zampe posteriori dei ratti è stata prelevata al momento della morte. Dopo aver separato dalle ossa del metatarso la porzione plantare della zampa, che include epidermide e derma, sono state prelevate delle

sezioni di circa 3 mm di diametro: queste sono state immediatamente fissate in una soluzione di paraformaldeide e lisina periodato al 2% per 24h a 4°C, crioprotette tutta la notte e successivamente tagliate con un criostato in modo tale da ottenere sezioni dello spessore di circa 20 µm. Due sezioni di ogni porzione plantare sono state selezionate e immunomarcate con un anticorpo policlonale anti-PGP 9.5 (protein gene product; Biogenesis, Poole, UK) prodotto nel coniglio, usando un protocollo di libero galleggiamento (Lauria, et al., 2005). Due osservatori in cieco, hanno contato indipendentemente il numero totale delle fibre intraepidermiche (IENF) positive al PGP 9.5 in ogni sezione, utilizzando un microscopio ad alta definizione, con l'ausilio di una video-camera montata sopra di esso. Sono state contate solo le fibre localizzate a cavallo del derma e dell'epidermide, mentre sono state escluse le diramazioni secondarie all'interno dell'epidermide. La lunghezza delle fibre è stata misurata usando un sistema computerizzato (Microscienze Inc., Seattle, WA, USA), ottenendo così la densità lineare delle IENF (IENF/mm).

3.4.5 Valutazione di parametri biochimici nel sangue.

Le analisi dei livelli di trigliceridi e degli acidi grassi non esterificati (NEFA) sono state eseguite mediante l'utilizzo di kit diagnostici. In particolare per il livello di trigliceridi è stato utilizzato il kit Trigliceridi della Sentinel Diagnostic, mentre per l'analisi dei NEFA è stato utilizzato un kit Wako.

3.5 ANALISI DELL' ESPRESSIONE GENICA

Le analisi di espressione genica nelle diverse parti di questo lavoro sono state effettuate attraverso l'utilizzo di differenti sistemi. A seguito del trattamento dei ratti diabetici con Ro5-4864, l'espressione genica di Po e PMP22 è stata effettuata tramite saggio di protezione dall'RNasi, (RNase Protection Assay, RPA). Successivamente, per l'analisi dell'espressione genica effettuata a seguito del trattamento con GW3965, è stato utilizzato un sistema di Real Time PCR. La dissezione del nervo sciatico è stata operata nello stesso modo in entrambi gli

esperimenti, ma il processamento successivo è stato scelto in dipendenza del metodo analitico finale.

3.5.1 RNase Protection Assay.

Estrazione di RNA totale dal nervo sciatico.

Tale estrazione è stata effettuata con il metodo del fenolo cloroformio descritto da Chomczynski e Sacchi (Chomczynski and Sacchi, 1987). In particolare, il tessuto è stato omogenato in una soluzione contenente guanidina:β-mercaptoetanololo (1ml:7,2μl) attraverso un metodo meccanico (politron - AKI WORKS). Ad ogni campione è stato aggiunto sodio acetato 2M pH 4, fenolo acido e successivamente una soluzione di cloroformio e acido isoamilico (in rapporto 24:1). Dopo una centrifugazione (20 minuti a 13000 rpm) che permette la formazione di una fase organica ed una acquosa, è stata prelevata la fase acquosa sovrastante contenente RNA, successivamente conservata in isopropanolo a -20° C per almeno una notte.

Quantizzazione dell'RNA

I campioni in isopropanolo sono stati centrifugati e il pellet, dopo un ulteriore lavaggio in etanolo 70%, è stato essiccato e risospeso in acqua sterile apirogena. La quantificazione è stata ottenuta misurando l'assorbanza a 260 nm allo spettrofotometro. Da tale misurazione sono state preparate delle aliquote di RNA (sodio acetato 3M pH 5.2, tRNA, H₂O e etanolo) conservate a -20°C fino all'utilizzo della stessa per effettuare l'analisi dei trascritti di interesse.

RPA

E' stata preparata, *in vitro*, una sonda di RNA marcata con ³²P, complementare (antisenso) all'mRNA di interesse (cRNA). Le aliquote di RNA precedentemente preparate e conservate a -20°C, sono state sottoposte a centrifugazione in modo da formare un pellet, che dopo essiccazione in campana a vuoto, è stato risospeso in una soluzione di ibridazione contenente 0,5 M PIPES a pH 6.4, 0,5 M EDTA a pH 8.4, sodio acetato a pH 6.4, 80% formamide, H₂O e 50000 cpm per ogni sonda di cRNA marcata con ³²P (Po, PMP22 e 18S). I campioni sono stati denaturati a 85°C per 10 minuti e lasciati per una notte a 45°C, per poter permettere l'ibridazione delle sonde con gli mRNA endogeni. Terminata l'ibridazione, i campioni sono stati diluiti con un tampone di digestione, contenente NaCl 5 M, Tris HCl 1 M pH 7.4, EDTA 0,5 M pH 7.5 e una miscela di RNAsi 1:400 rispetto alla soluzione stock (1 μg/μl RNAsi A e 20 μg/μl di RNAsi T1); tale digestione è

stata condotta a temperatura ambiente per 30 minuti. Per bloccare tale processo, ai campioni è stata aggiunta una soluzione 1:2 di proteinasi K e di SDS al 10% e incubati a 37°C per 15 minuti. Gli ibridi ³²Pc-RNA-RNA sono stati purificati attraverso diversi passaggi utilizzando fenolo basico e cloroformio. Gli ibridi, così purificati, sono stati precipitati con etanolo 100% freddo e tRNA 1 ora in ghiaccio secco e, al termine, centrifugati. Il pellet ottenuto è stato successivamente essiccato, risospeso in un colorante contenente formamide, EDTA 0,5 M pH 8, H₂O, blu di bromo fenolo, cianolo xilene, e incubato per 10 minuti a 90°C. Al termine i campioni sono stati caricati su un gel denaturante al 5% di poliacrilamide (urea 60,06 M, acrilamide 40%, TBE 10X, H₂O free), a cui è stata applicata una corrente elettrica di 75-80 Watt ed un voltaggio che non superi i 2000 Volt. Una volta terminata la separazione elettroforetica, il gel è stato trasferito su carta, essiccato ed esposto a pellicola fotografica (Kodak Scientific Imaging film Ready-pack, Sigma) per evidenziare i frammenti protetti mediante esposizione autoradiografica.

Analisi delle lastre autoradiografiche

Per calcolare i livelli di mRNA ottenuti è stata misurata l'intensità delle bande utilizzando un programma di analisi densitometrica (NHI Image J 1.60); le bande da analizzare sono state scelte su lastre con tempi di esposizione differenti, in modo che le loro intensità rientrassero in un intervallo di linearità. I valori ottenuti sono stati poi normalizzati rapportandoli a quelli relativi allo standard interno, il segnale del rRNA codificante per la subunità ribosomiale 18S.

3.5.2 Real-time PCR

L'RNA è stato preparato usando il kit Nucleospin RNA II (Macherey-Nagel) ed analizzato da uno strumento TaqMan qRT-PCR (CFX 384 real time system, Bio-Rad Laboratories) usando il kit iScript one-step RT-PCR per le sonde. I campioni sono stati caricati in triplo in piastre da 384 pozzetti con un normalizzatore interno (36B4). Le sonde e le sequenze di primers sono state acquistate da Eurofins MWG-Operon.

3.6 ANALISI STATISTICA

I dati quantitativi ottenuti sono stati analizzati con metodi statistici che potessero adattarsi ai protocolli sperimentali ed alla natura dei dati stessi. Quindi, dopo averne verificato la normalità con il test di Kolmogorov-Smirnov, i dati sono stati analizzati con lo Student's T-test non appaiato, in caso di coppie di parametri indipendenti, o con ANOVA ad una via seguito dal post-test Tukey-Kramer, in caso di esperimenti con più di due variabili. Una $p \leq 0,5$ indica che il parametro osservato è statisticamente significativo. Tutte le analisi statistiche sono state eseguite con PRISM GraphPad (versione 4).

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1. EFFETTI NEUROPROTETTIVI DI UN LIGANDO DEL TRASLOCATORE DA 18kDa (R05-4864) NELLA NEUROPATIA DIABETICA SPERIMENTALE

4.1.1 Risultati

Nella prima parte di questa tesi si è voluto indagare l'effetto di un ligando sintetico del traslocatore di 18kDa, la molecola R05-4864, in un modello di neuropatia periferica diabetica nel ratto. A tale scopo è stato utilizzato un modello animale già in uso nel laboratorio, il ratto reso diabetico attraverso singola iniezione di streptozotocina (STZ), sul quale erano stati condotti esperimenti precedenti con la somministrazione diretta di steroidi neuroattivi.

Nel corso della sperimentazione è stato applicato un protocollo sperimentale precedentemente utilizzato nella valutazione degli effetti neuroprotettivi degli steroidi neuroattivi nella neuropatia periferica (Leonelli, et al., 2007, Roglio, et al., 2008). Gli animali hanno perciò ricevuto 16 trattamenti di R05-4864 sotto cute e a giorni alterni (protocollo sperimentale 1). I risultati ottenuti con questo protocollo sperimentale sono stati confrontati con un diverso paradigma in cui era stata diminuita la frequenza delle somministrazioni. In questo secondo caso, gli animali hanno ricevuto il ligando una volta a settimana per un totale di quattro somministrazioni (protocollo sperimentale 2).

Come riportato in tabella 1, i ratti diabetici presentano una maggiore quantità di glucosio nel sangue alla fine dell'esperimento, e, come atteso, un minore aumento ponderale rispetto ai ratti di controllo non diabetici.

In entrambi i protocolli sperimentali, il trattamento con il R05-4864 non ha modificato significativamente il peso corporeo e la glicemia dei ratti STZ quando comparati con i ratti diabetici trattati col solo veicolo (tabella 1).

Tabella 1: Peso corporeo e livello di glucosio nel sangue di ratti controllo, STZ e STZ trattati con Ro5-4864 a seguito del protocollo sperimentale 1 e 2.

Animali	Peso corporeo prima dell'iniezione di STZ (g)	Peso corporeo al sacrificio (g)	Glucosio nel sangue al sacrificio (mg/dl)
Protocollo 1			
Controllo	238.4±5.1 (n=14)	561.6±10.6 (n=14)	111.4±2.1 (n=14)
Diabetico+veicolo	248.4±5.2 (n=15)	244.6±16.7*** (n=15)	592.6±4.1*** (n=15)
Diabetico+Ro5-4864	241.9±5.6 (n=15)	244.6±12.3*** (n=15)	589.5±5.0*** (n=15)
Protocollo 2			
Controllo	246.7±12.7 (n=15)	566.5±11.26 (n=15)	94.4±3.5 (n=15)
Diabetico+veicolo	255.7±14.1 (n=13)	273.9±15.3*** (n=13)	590.5±5.3*** (n=13)
Diabetico+Ro5-4864	255.8±15.5 (n=13)	308.3±15.5*** (n=13)	552.61±19.6*** (n=13)

I dati sono espressi come la media±S.E.M. (il numero di animali usati in ciascun gruppo è indicato in parentesi). Come analisi statistica è stata eseguita l'ANOVA ad una via seguita dal post-test di Tukey-Kramer; *** p<0,001 vs controllo.

Come è stato recentemente dimostrato con analisi di cromatografia liquida accoppiata a spettrometria di massa (LC-MS/MS), nel nervo periferico del ratto STZ si osserva una generale diminuzione dei livelli di steroidi neuroattivi (Caruso, et al., 2008, Pesaresi, et al., 2010). Si è perciò voluto verificare se il trattamento con il Ro5-4864 fosse in grado di aumentare i livelli di steroidi neuroattivi nel nervo sciatico del ratto diabetico.

Come mostrato in tabella 2, a seguito del protocollo sperimentale 1, il ligando del TSP0 non è in grado di modificare i livelli di steroidi neuroattivi presenti nel nervo sciatico.

Al contrario, applicando il protocollo sperimentale 2, il Ro5-4864 si è rivelato in grado di aumentare i livelli di PREG e del suo derivato PROG.

Tabella 2: Analisi dei livelli degli steroidi neuroattivi attraverso LC-MS/MS nel nervo sciatico di ratti controllo, STZ e STZ trattati con Ro5-4864 a seguito del protocollo sperimentale 1 e 2.

	PREG	PROG	DHP	THP	Isopregna nolone	T	DHT	3 α -diol
Protocollo 1								
Diabetico+ veicolo	0.79±0.09 (n=7)	0.50±0.04 (n=7)	2.09±0.71 (n=7)	0.44±0.02 (n=7)	1.06±0.03 (n=7)	1.5±0.09 (n=6)	0.36±0.15 (n=7)	0.65±0.19 (n=7)
Diabetico+ Ro5-4864	0.81±0.09 (n=7)	0.57±0.15 (n=7)	2.09±0.13 (n=7)	<LOQ (n=7)	1.45±0.16 (n=5)	0.88±0.12 (n=7)	0.24±0.11 (n=7)	0.41±0.13 (n=7)
Protocollo 2								
Diabetico+ veicolo	0.86±0.05 (n=7)	0.52±0.06 (n=7)	2.73±0.43 (n=7)	0.29±0.04 (n=7)	1.05±0.4 (n=7)	0.43±0.11 (n=7)	0.09±0.02 (n=7)	0.64±0.14 (n=7)
Diabetico+ Ro5-4864	1.17±0.12 [#] (n=7)	1.03±0.06 ^{####} (n=7)	2.09±0.16 (n=7)	0.26±0.04 (n=7)	0.86±0.19 (n=7)	0.64±0.11 (n=7)	0.22±0.04 [#] (n=7)	1.06±0.16 (n=7)

I dati sono espressi come pg/mg tessuto e sono espressi come la media±S.E.M. (il numero di animali usati in ciascun gruppo è indicato in parentesi). Il limite di quantificazione (LOQ) per il THP è 0,1 pg/mg di tessuto. Come analisi statistica è stato eseguito un T-test di Student non appaiato, # p<0,05 vs diabetico trattato col veicolo, ### p<0,001 vs diabetico trattato col veicolo.

I livelli dei metaboliti del PROG, come DHP, THP e isopregnanolone, non sono stati modificati dal trattamento. Il quadro si presenta diverso nel caso di testosterone e derivati. Infatti i livelli di T e 3 α diolo hanno mostrato solo una tendenza all'aumento, che però non ha raggiunto la significatività statistica; al contrario i livelli di DHT sono significativamente aumentati dal trattamento con il Ro5-4864.

Applicando il protocollo sperimentale 2, il trattamento con il ligando del TSPO è stato anche in grado di aumentare i livelli plasmatici di PROG (diabetico (n=7) 0.09±0.009 pg/ μ l vs. i trattati con Ro5-4864 (n=7) 0.17±0.03 pg/ μ l; p<0.05) e di T (diabetico (n=7) 0.68±0.21 pg/ μ l vs. i trattati con Ro5-4864 (n=7) 3.17±1.15 pg/ μ l; p<0.05).

In accordo con quanto osservato sui livelli di steroidi neuroattivi, utilizzando il protocollo sperimentale 1, il trattamento con il Ro5-4864 non si è rivelato efficace neppure su due parametri funzionali e comportamentali, quali la velocità di conduzione nervosa ([figura 15, pannello A](#)) e la sensibilità nocicettiva termica ([figura 15, pannello B](#)).

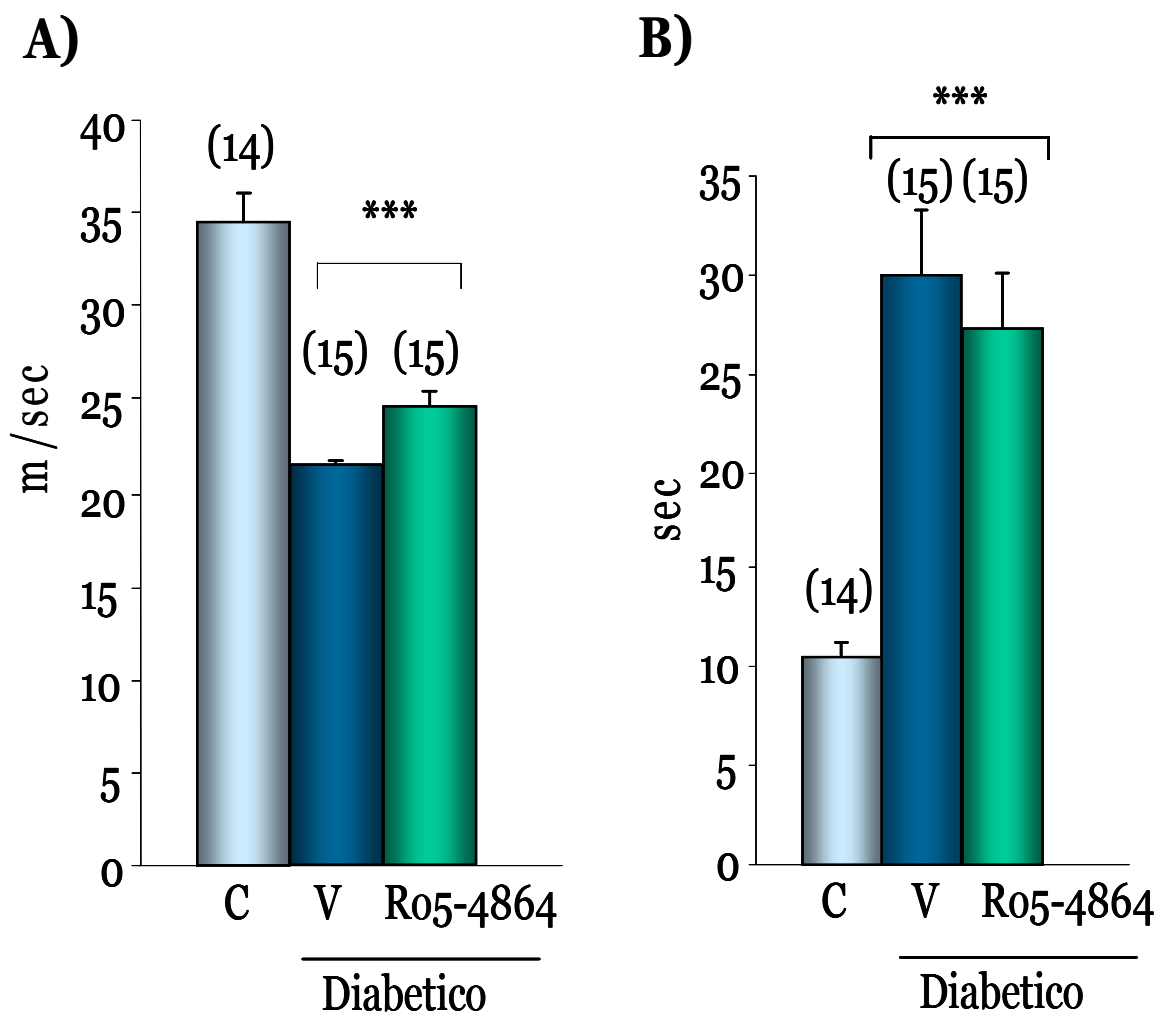


Figura 15: A seguito del protocollo sperimentale 1, il trattamento con Ro5-4864 non è in grado di innalzare la ridotta NCV (pannello A) e di migliorare l'alterata risposta al calore nei ratti diabetici (pannello B). La NCV della coda, espressa in m/sec, e la soglia di sensibilità termica, espressa come latenza nella risposta in secondi, sono stati valutati alla fine dell'esperimento nel gruppo controllo (C) e nel ratto diabetico trattato col solo veicolo (V) o con Ro5-4864. I dati sono stati espressi come media±S.E.M. (il numero di animali usati in ciascun gruppo è indicato in parentesi). Come analisi statistica è stata eseguita l'ANOVA ad una via seguita dal post-test di Tukey-Kramer; *** p<0,001 vs controllo.

Anche da un punto di vista biochimico tale trattamento si è rivelato inefficiente, in quanto non si osservano miglioramenti nell'espressione di PO e PMP22 (figura 16, pannello A, B e C).

Al contrario, utilizzando il protocollo sperimentale 2, è stato osservato che il trattamento col ligando del TSPO è in grado di esercitare effetti neuroprotettivi a livello neurofisiologico, biochimico e funzionale.

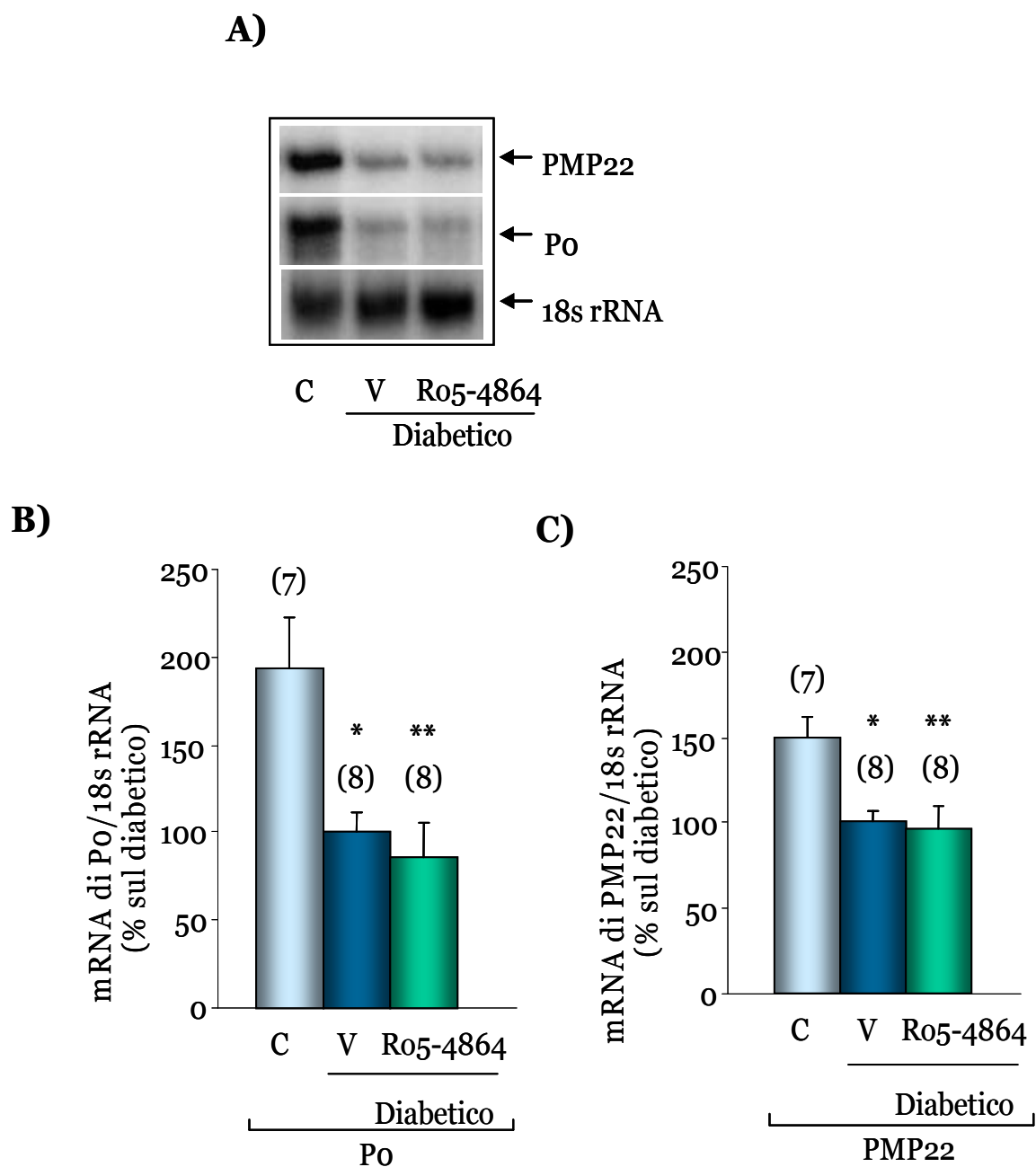


Figura 16: A seguito del protocollo sperimentale 1, il trattamento con Ro5-4864 non è in grado di innalzare la ridotta espressione del messaggero di Po e PMP22 osservata nel nervo sciatico dei ratti maschi STZ. Pannello A): blot rappresentativo di un RNase Protection Assay. Pannello B): livelli di espressione genica (mRNA) di Po e PMP22 (Pannello C) alla fine dell'esperimento nel gruppo controllo (C) e nel ratto diabetico trattato col solo veicolo (V) o con Ro5-4864. I dati sono stati espressi come percentuale rispetto al livello nel ratto diabetico trattato col solo veicolo. Gli istogrammi rappresentano la media±S.E.M. dopo normalizzazione con l'rRNA del 18s (il numero di animali usati in ciascun gruppo è indicato in parentesi). Come analisi statistica è stata eseguita l'ANOVA ad una via seguita dal post-test di Tukey-Kramer; * $p < 0,05$ vs controllo, ** $p < 0,01$ vs controllo.

La figura 17, pannello A mostra che il trattamento con il Ro5-4864 è stato in grado di revertire la diminuzione della NCV indotta dal diabete. I dati riportati in figura

17, pannello B mostrano inoltre che il diabete ha provocato un aumento nella soglia di sensibilità termica e che il trattamento con il R05-4864 con il protocollo sperimentale 2 è stato in grado di migliorare questo parametro parzialmente ma comunque in modo statisticamente significativo.

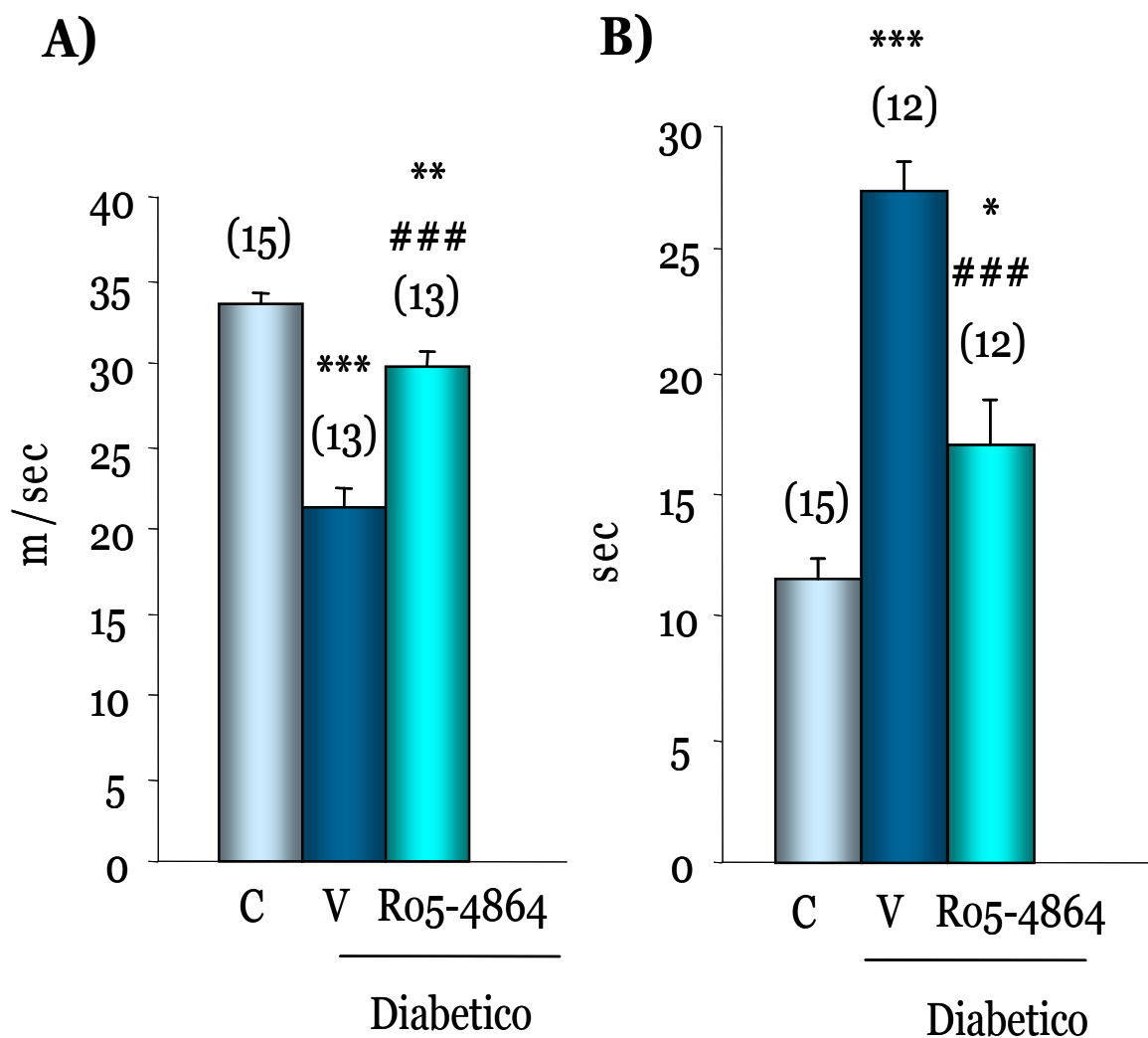


Figura 17: A seguito del protocollo sperimentale 2, il trattamento con R05-4864 è in grado di innalzare parzialmente la ridotta NCV (pannello A) e di migliorare significativamente l'alterata risposta al calore nei ratti diabetici (pannello B). La NCV della coda, espressa in m/sec, e la soglia di sensibilità termica, espressa come latenza nella risposta in secondi, sono stati valutati alla fine dell'esperimento nel gruppo controllo (C) e nel ratto diabetico trattato col solo veicolo (V) o con R05-4864. I dati sono stati espressi come media±S.E.M. (il numero di animali usati in ciascun gruppo è indicato in parentesi). Come analisi statistica è stata eseguita l'ANOVA ad una via seguita dal post-test di Tukey-Kramer; * p<0,05 vs controllo, ** p<0,01 vs controllo, *** p<0,001 vs diabetico trattato col veicolo.

Il diabete inoltre ha provocato una diminuzione nell'espressione delle proteine della mielina, in particolare di Po e PMP22 (figura 18, pannello A, B e C), così

come precedentemente osservato con il protocollo 1. Al contrario però di quella frequenza di somministrazione, il trattamento con il Ro5-4864 con il protocollo sperimentale 2, ha aumentato significativamente i livelli di mRNA di Po.

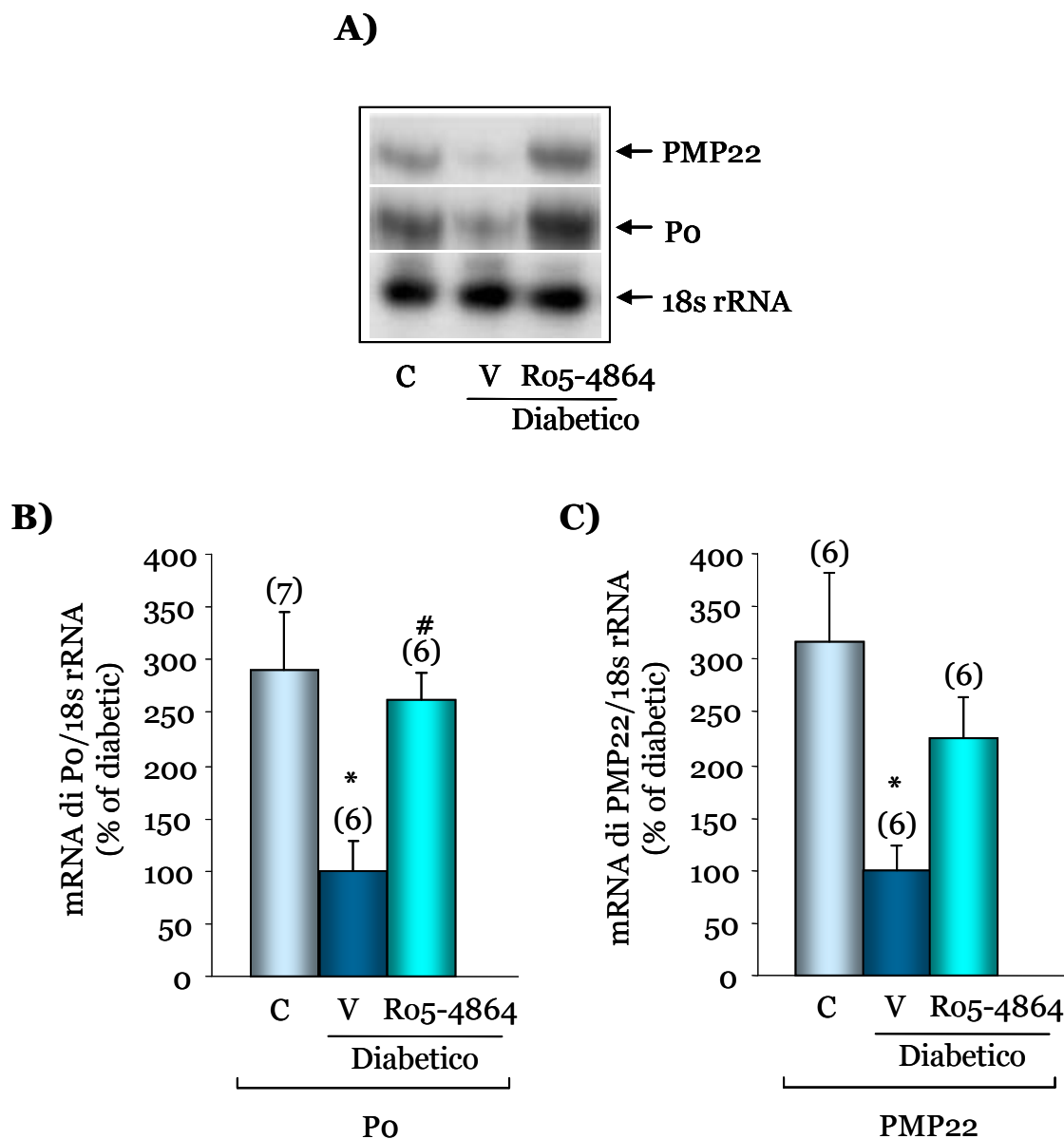


Figura 18: A seguito del protocollo sperimentale 2, il trattamento con Ro5-4864 è in grado di innalzare parzialmente la ridotta espressione del messaggero di Po osservata nel nervo sciatico dei ratti maschi STZ. Pannello A): blot rappresentativo di un RNase Protection Assay. Pannello B): livelli di espressione genica (mRNA) di Po e PMP22 (Pannello C) alla fine dell'esperimento nel gruppo controllo (C) e nel ratto diabetico trattato col solo veicolo (V) o con Ro5-4864. I dati sono stati espressi come percentuale rispetto al livello nel ratto diabetico trattato col solo veicolo. Gli istogrammi rappresentano la media \pm S.E.M. dopo normalizzazione con l'rRNA del 18s (il numero di animali usati in ciascun gruppo è indicato in parentesi). Come analisi statistica è stata eseguita l'ANOVA ad una via seguita dal post-test di Tukey-Kramer; * $p < 0,05$ vs controllo, # $p < 0,05$ vs diabetico trattato col veicolo.

Al contrario i livelli di espressione genica della PMP22 mostrano una tendenza all'aumento, che però non è raggiunge la significatività statistica (figura 18, pannello A e C).

In figura 19 è mostrato l'andamento dell'attività della pompa Na^+, K^+ -ATPasi nel nervo tibiale. E' possibile osservare che il diabete provoca una diminuzione dell'attività di questa pompa, e che il trattamento con il Ro5-4864 utilizzando protocollo sperimentale 2, è stato in grado di riportare tale attività al livello del controllo.

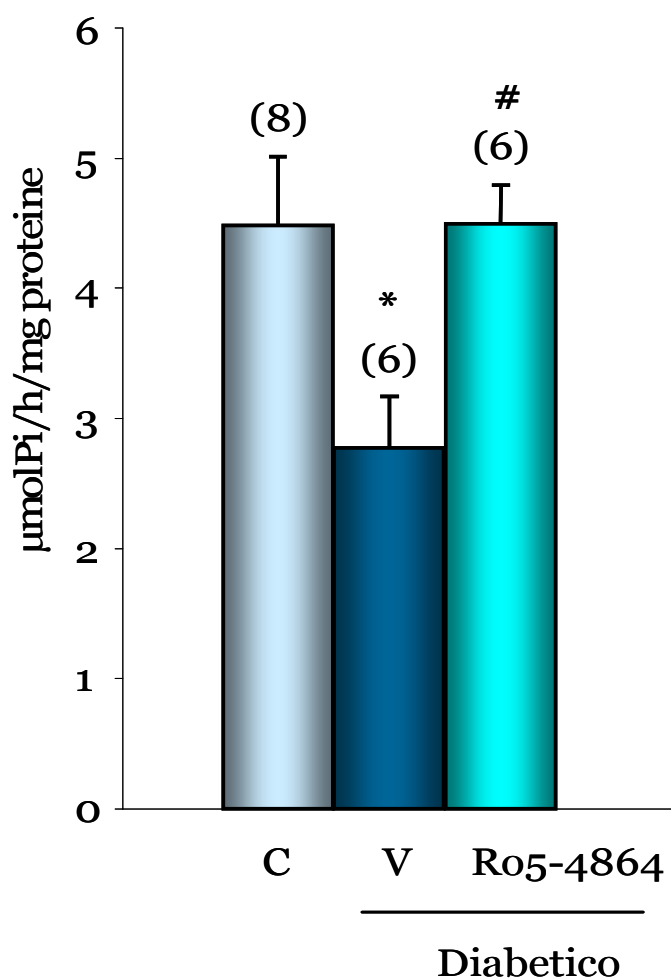


Figura 19: Il trattamento con Ro5-4864 reverte la diminuzione nell'attività della pompa Na^+, K^+ -ATPasi osservata nei ratti diabetici. L'attività dell'enzima è stata misurata alla fine dell'esperimento nel gruppo controllo (C) e nel ratto diabetico trattato col solo veicolo (V) o con Ro5-4864 secondo il protocollo sperimentale 2. I dati sono espressi come $\mu\text{mol} \cdot \text{Pi} / \text{h}$ per mg proteina e sono la media \pm S.E.M. (il numero di animali usati in ciascun gruppo è indicato in parentesi). Come analisi statistica è stata eseguita l'ANOVA ad una via seguita dal post-test di Tukey-Kramer; * $p < 0,05$ vs controllo, # $p < 0,05$ vs diabetico trattato col veicolo.

L'analisi delle biopsie di cute conferma gli effetti neuroprotettivi esercitati dal Ro5-4864 dal punto di vista neuropatologico. Infatti, come mostrato in [figura 20](#), il diabete provoca una diminuzione nell'ordine del 50% della densità delle fibre intraepidermiche (IENF) e che il trattamento con il ligando del TSPO è in grado di ristabilire completamente l'innervazione cutanea.

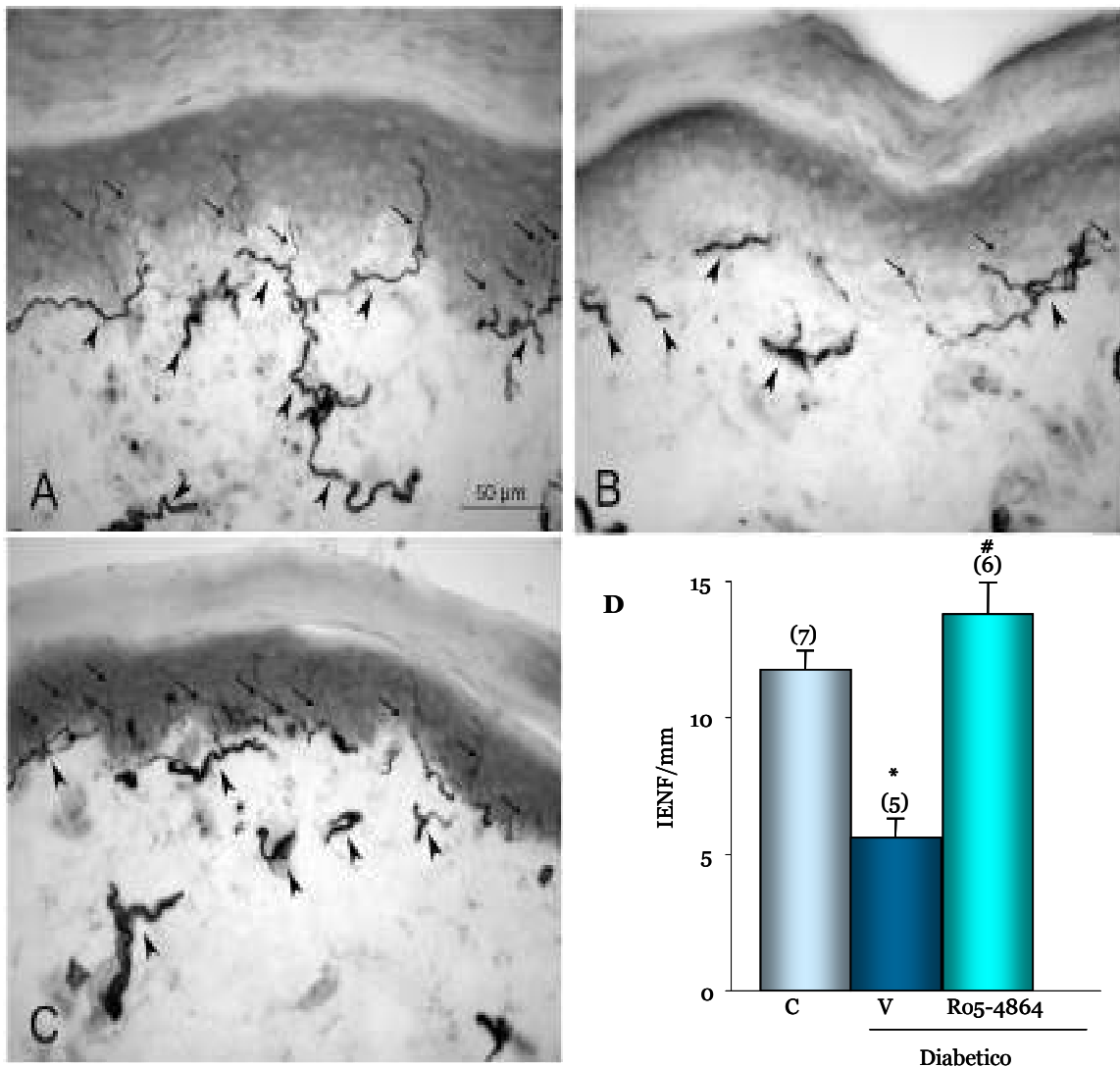


Figura 20: Il trattamento con Ro5-4864 ristabilisce l'innervazione cutanea fortemente diminuita a seguito dell'insorgenza del diabete. Le microfotografie rappresentano dell'immunoistochimica in campo chiaro utilizzando un anticorpo contro PGP 9,5 in sezioni sottili (20 μ m) delle zampe posteriori del gruppo controllo (pannello A), del ratto diabetico trattato col solo veicolo (pannello B) e del ratto diabetico trattato con Ro5-4864 (pannello C), utilizzando il protocollo sperimentale 2. Le frecce indicano le fibre intraepidermiche (IENF), le teste di freccia indicano i fasci di nervi del derma. Nella neuropatia diabetica il plesso nervoso del derma è meno presente e i fasci mostrano una minore immunoreattività che riflette la degenerazione assonale. Il pannello D mostra la quantificazione della densità lineare delle IENF (IENF/mm). I dati sono espressi come la media \pm S.E.M. (il numero di animali usati in ciascun gruppo è indicato in parentesi). Come analisi statistica è stata eseguita l'ANOVA ad una via seguita dal post-test di Tukey-Kramer; * $p < 0,05$ vs controllo (C), # $p < 0,05$ vs diabetico trattato col veicolo (V).

I risultati qui proposti sono stati materiale di pubblicazione in Giatti e collaboratori (Giatti, et al., 2009).

4.1.2 Discussione

I risultati ottenuti precedentemente dalla nostra unità di ricerca avevano suggerito che gli steroidi neuroattivi, come il progesterone, testosterone e i loro derivati, potevano essere proposti come promettenti molecole in grado di migliorare molti parametri molecolari e funzionali che risultano alterati nella neuropatia diabetica (Leonelli, et al., 2007, Roglio, et al., 2008). I risultati presentati nella prima parte di questa tesi mostrano che l'attivazione del TSPO, con il suo ligando R05-4864, è in grado di aumentare i livelli di PREG (il primo steroide sintetizzato a partire dal colesterolo), di PROG e di un metabolita del T, il DHT, direttamente nel nervo sciatico del ratto reso diabetico con iniezione di streptozotocina. L'osservazione che i ligandi del TSPO fossero in grado di aumentare la steroidogenesi, era già stata precedentemente evidenziata in diversi tessuti, non nervosi, quali le ghiandole surrenali, placenta, testicolo, ovaie e cellule gliali (Brown and Papadopoulos, 2001, Giatzakis and Papadopoulos, 2004, Lacapere and Papadopoulos, 2003, Papadopoulos, et al., 2001). Infatti i ligandi di questo recettore promuovono la traslocazione del colesterolo dalla membrana mitocondriale esterna a quella interna, permettendo la conversione del colesterolo in PREG. Come precedentemente menzionato, le cellule di Schwann esprimono il TSPO (Schumacher, et al., 2007) e il trattamento con il R05-4864 aumenta i livelli di PREG nel nervo sciatico del ratto (Lacor, et al., 1999). Precedenti osservazioni ottenute nel nostro laboratorio, mostrano che i livelli di PREG sono diminuiti significativamente nel nervo sciatico dei ratti STZ (Pesaresi, et al., 2009). Una possibile spiegazione per l'osservata diminuzione dei livelli di PREG potrebbe essere attribuita ad un'alterazione nel trasporto del colesterolo nella membrana mitocondriale interna (causando così una mancanza di substrato) oppure ad una ridotta espressione dell'enzima P450_{sc} (il diretto responsabile della conversione del colesterolo in PREG). E' interessante sottolineare che i dati qui riportati mostrano che tale alterazione è reversibile. Infatti, a seguito della somministrazione del ligando del TSPO, non solo i livelli di PREG sono aumentati ma anche quelli del PROG, un suo diretto metabolita. Tale aumento potrebbe

essere dovuto ad un incremento del substrato stesso direttamente nel nervo sciatico. E' comunque importante ricordare che i livelli di uno steroide determinati nel nervo periferico non sono solo ascrivibili ad una sintesi *in situ* ma potrebbero essere anche il risultato di una captazione degli steroidi prodotti dalla periferia. Infatti è noto che il PROG prodotto dai tessuti periferici è largamente captato dal sistema nervoso (Billiar, et al., 1975). Recentemente è stato dimostrato che i livelli di PROG nel plasma di ratti maschi diabetici sono significativamente diminuiti (Leonelli, et al., 2007, Pesaresi, et al., 2009) ed è interessante notare che anche nel plasma il trattamento con il Ro5-4864 è in grado di aumentare leggermente ma significativamente, il livello di questo steroide neuroattivo. E' perciò possibile ipotizzare che l'aumento dei livelli di PROG nel nervo sciatico del ratto STZ sia dovuto, almeno in parte, alla sua captazione dal torrente ematico. Oltre all'aumento dei livelli di PROG, anche il DHT registra nel nervo sciatico dei ratti diabetici un leggero ma significativo aumento dei suoi livelli dopo le somministrazione del ligando del TSPO. Tale aumento non sembra essere legato in modo diretto ad un incremento *in situ* del suo precursore. Infatti, i livelli di T nel nervo sciatico mostrano solamente una tendenza all'aumento che però non raggiunge la significatività statistica. In ogni caso, il trattamento con il Ro5-4864 è in grado di aumentare i livelli plasmatici di testosterone, per cui un contributo dovuto alla captazione dalla periferia non è da escludere.

I dati qui riportati indicano che l'osservato aumento dei livelli di steroidi neuroattivi è avvenuto solo dopo aver ridotto la frequenza delle somministrazioni. Come precedentemente menzionato, il primo approccio sperimentale era stato scelto in base a nostre precedenti osservazioni che indicavano come tale protocollo fosse efficace nel ratto STZ per la somministrazione degli steroidi neuroattivi (Leonelli, et al., 2007, Roglio, et al., 2008). Inaspettatamente il protocollo sperimentale 1 si è rivelato non efficace nell'indurre cambiamenti nei livelli di steroidi neuroattivi. In accordo con queste osservazioni, anche studi effettuati da altre unità di ricerca mostravano che il trattamento cronico con il Ro5-4864 (somministrazione giornaliera per un totale di 21 giorni) fosse inefficace nell'aumentare i livelli plasmatici di PROG (Weizman, et al., 1997). Inoltre, osservazioni preliminari ottenute dalla nostra unità di ricerca, avevano indicato che un trattamento acuto con il Ro5-4864 fosse in grado di aumentare il livello di PREG e PROG nel nervo sciatico del ratto STZ (dati non mostrati). A questo

proposito occorre sottolineare che i dati presenti in letteratura, che riportano aumenti nei livelli di steroidi neuroattivi, sono stati ottenuti per la massima parte *in vitro* o dopo esposizione acuta (Brown and Papadopoulos, 2001, Giatzakis and Papadopoulos, 2004, Lacapere and Papadopoulos, 2003, Lacor, et al., 1996, Papadopoulos, et al., 2001). Pertanto è stato ipotizzato che un'alta frequenza di somministrazioni potesse desensibilizzare il TSPO e conseguentemente portare all'inefficacia nella stimolazione della sintesi degli steroidi neuroattivi. Infatti, come viene dimostrato dai risultati ottenuti col protocollo sperimentale 2, nel quale la frequenza di somministrazione è stata ridotta ad una volta a settimana, è stato ottenuto un aumento dei livelli di steroidi neuroattivi nel nervo sciatico. In accordo con l'efficacia del protocollo sperimentale 2 sui livelli di steroidi neuroattivi, il trattamento con il Ro5-4864 è stato in grado di esercitare degli effetti neuroprotettivi sui ratti diabetici solo a seguito di questo protocollo sperimentale. Infatti, tale tipologia di somministrazione si è rivelata efficace nel contrastare l'alterazione della velocità di conduzione nervosa e della soglia nocicettiva termica, di ripristinare l'innervazione delle fibre nella cute e i livelli di messaggero della Po, e di migliorare l'attività della pompa Na⁺,K⁺-ATPasi. Gli effetti ottenuti in questo studio sono simili a quelli osservati nello stesso modello sperimentale a seguito del trattamento con PROG, T o coi loro metaboliti (Leonelli, et al., 2007, Roglio, et al., 2008). Per questo motivo si potrebbe ipotizzare che il Ro5-4864 eserciti i suoi effetti neuroprotettivi nel ratto diabetico mediante un aumento dei livelli di questi steroidi direttamente nel nervo sciatico. E' però anche opportuno ricordare che la proteina TSPO regola diversi meccanismi cellulari, come la proliferazione (Alho, et al., 1994), l'immunomodulazione (Zavala, 1997), l'apoptosi (Hirsch, et al., 1998) e i processi ossidativi (Casellas, et al., 2002, Floyd, 1999). In particolare, il TSPO è in grado di modulare la sensibilità mitocondriale alle specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Casellas, et al., 2002, Floyd, 1999). E' stato ipotizzato che in numerosi eventi neurodegenerativi, come anche nella neuropatia diabetica, la degenerazione mitocondriale, così come i ROS, svolgano un ruolo chiave (Leininger, et al., 2006, Leininger, et al., 2006, Moreira, et al., 2007, Russell, et al., 2008, Vincent, et al., 2002, Yorek, et al., 2002). Sulla base di queste considerazioni non è possibile escludere un coinvolgimento di qualcuno dei meccanismi sopra citati nell'effetto neuroprotettivo ottenuto a seguito del trattamento con il Ro5-4864 nei ratti diabetici.

Gli effetti neuroprotettivi esercitati dal TSPO sui nervi periferici erano già stati osservati utilizzando altri modelli sperimentali. Ad esempio, l'espressione del traslocatore aumenta dopo danno da congelamento al nervo e ritorna ai livelli del controllo al termine del fenomeno rigenerativo (Lacor, et al., 1996), il che permette di supporre che l'induzione dell'espressione di questo recettore sia implicato nella risposta neuronale come tentativo di contrastare l'evento neurodegenerativo. Inoltre, il Ro5-4864 è in grado di esercitare degli effetti neuroprotettivi sul nervo sciatico di ratti maschi in età avanzata, attraverso l'aumento del numero totale di fibre e diminuendo la percentuale di quelle in cui si osserva decompattazione (Leonelli, et al., 2005). Simili alterazioni si osservano anche nei neuroni delle radici dei gangli dorsali dopo danno al nervo periferico (Mills, et al., 2008, Mills, et al., 2005) e i ligandi del TSPO, come il Ro5-4864 e l'SSR180575 aumentano la sopravvivenza dei neuroni motori e migliorano la rigenerazione del nervo periferico (Ferzaz, et al., 2002, Mills, et al., 2008, Mills, et al., 2005). Da ultimo, è stato recentemente dimostrato che l'etifoxine, un farmaco ansiolitico in grado di legarsi al TSPO e di aumentare i livelli degli steroidi neuroattivi, è in grado di migliorare la rigenerazione del nervo periferico e di permettere il recupero della funzione locomotoria, sensoriale e della coordinazione motoria in un modello di danno a seguito di congelamento del nervo (Girard, et al., 2008).

In conclusione i risultati riportati in questa prima parte della tesi indicano che l'attivazione del TSPO possa rappresentare una interessante strategia terapeutica per contrastare i danni indotti dal diabete a livello del sistema nervoso periferico.

4.2. L'ATTIVAZIONE DEL LIVER X RECEPTOR AUMENTA I LIVELLI DI STEROIDI NEUROATTIVI E PROTEGGE DALLA NEUROPATIA PERIFERICA INDOTTA DAL DIABETE

4.2.1 Risultati

Nella seconda parte di questa tesi, utilizzando il modello sperimentale precedentemente descritto si è voluto indagare se l'attivazione del Liver X Receptor nel nervo sciatico potesse riflettersi in un incremento di steroidi neuroattivi e di conseguenza avere un potenziale effetto neuroprotettivo. Infatti così come per il TSPO, anche per l'LXR esistono evidenze che ne indicano un certo coinvolgimento durante la steroidogenesi, ma per quanto riguarda LXR tali evidenze erano limitate alle ghiandole surrenali. In questo studio si è voluto quindi verificare se l'utilizzo di un ligando sintetico di LXR, la molecola di origine non steroidea GW3965, fosse in grado di esercitare degli effetti neuroprotettivi nella neuropatia periferica diabetica.

Per poter studiare il potenziale ruolo di LXRs nella neuropatia diabetica, è stato ritenuto necessario, prima di tutto verificare che le sue due isoforme fossero presenti nel nervo periferico, come ad esempio nel nervo sciatico di ratto e se tali livelli fossero influenzati dal diabete. Come da noi osservato in [figura 21](#), sia LXR α che LXR β sono entrambi espressi nel nervo sciatico del ratto e i livelli dei loro RNA messaggeri non sono variati dall'induzione del diabete. Delle due isoforme, LXR β è risultata essere la forma più abbondante in questo nervo periferico del ratto. Inoltre, l'espressione sia di LXR α che di LXR β è sostanzialmente minore che nel fegato, che rappresenta il tessuto con la maggiore attività di LXR.

Il passo successivo è stato quello di verificare se i livelli di LXR presenti nel nervo sciatico avessero un significato funzionale. A questo scopo è stata misurata l'espressione di alcuni geni target dell'attivazione di LXR dopo somministrazione del suo ligando sintetico, il GW3965.

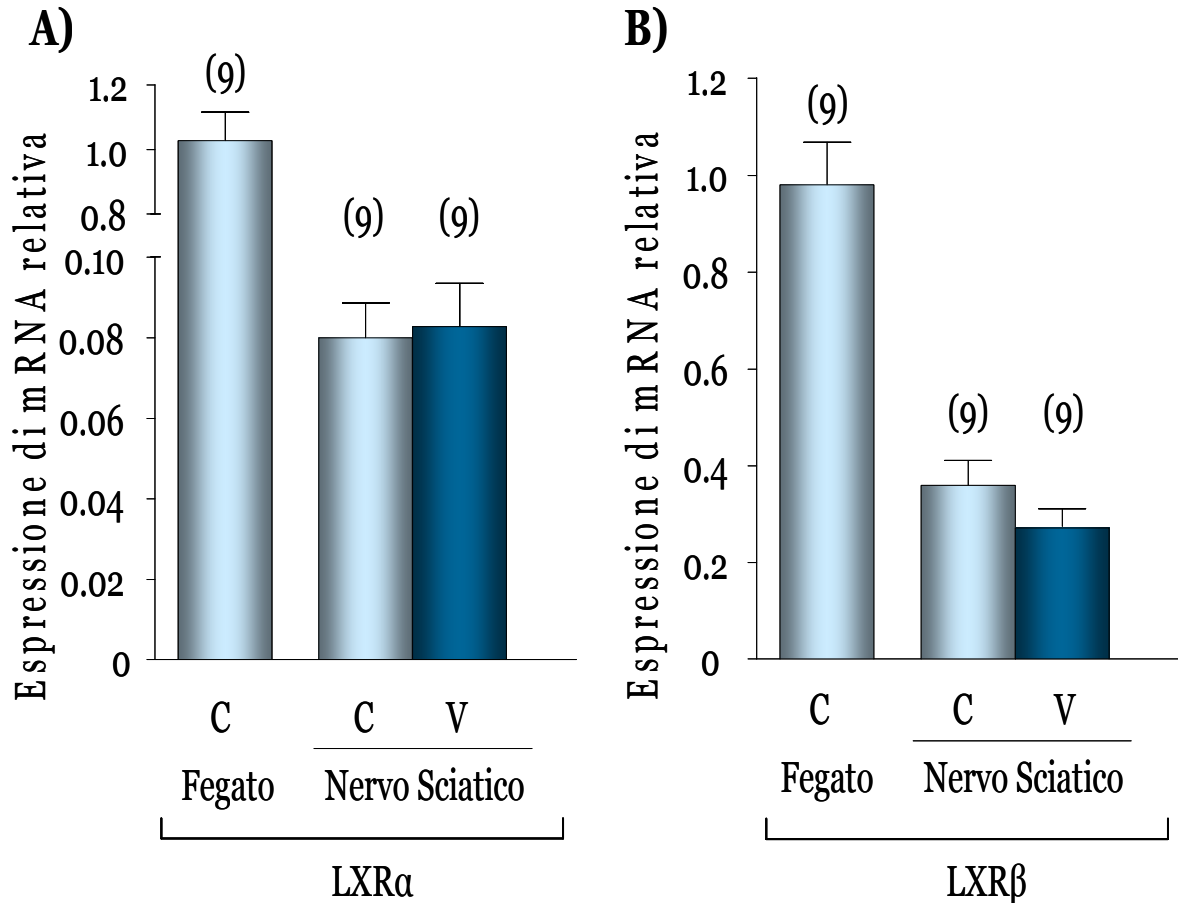
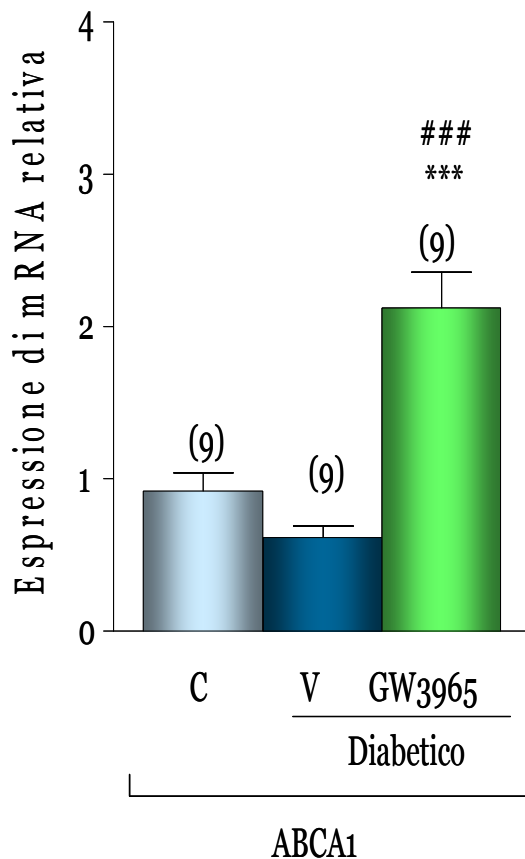


Figura 21: LXR α e LXR β sono espressi nel nervo sciatico e i loro livelli non sono variati tra controllo e ratto STZ. Pannello A) livelli di espressione di LXR α ; pannello B) livelli di espressione di LXR β . Il livello dei messaggeri di questi due geni, analizzato alla fine dell'esperimento nel gruppo controllo (C) o nel ratto diabetico trattato col solo veicolo (V), non è alterato dal diabete e presenta livelli minori che nel fegato. Gli istogrammi rappresentano l'espressione dell'mRNA dei geni indicati normalizzata per quella del gene housekeeping 36B4. I dati sono espressi come la media \pm S.E.M. (il numero di animali usati in ciascun gruppo è indicato in parentesi).

Tale molecola è stata somministrata ai ratti STZ tramite iniezione sotto cutanea una volta a settimana per un mese, per un totale di quattro somministrazioni, due mesi dopo l'accertata insorgenza del diabete. E' stata quindi valutata l'espressione di due noti geni target di LXR coinvolti nell'efflusso del colesterolo dalla cellula, in particolare di ABCA1 e ABCG1. Come è possibile osservare in [figura 22](#), i livelli dei messaggeri di questi due geni non sono stati modificati dal diabete nel nervo sciatico, ma vengono significativamente innalzati a seguito della somministrazione del GW3965 ([figura 22](#)), indicando che la molecola ha raggiunto il compartimento periferico del sistema nervoso e che gli LXRs presenti nel nervo sciatico sono regolatori trascrizionalmente attivi.

A)



B)

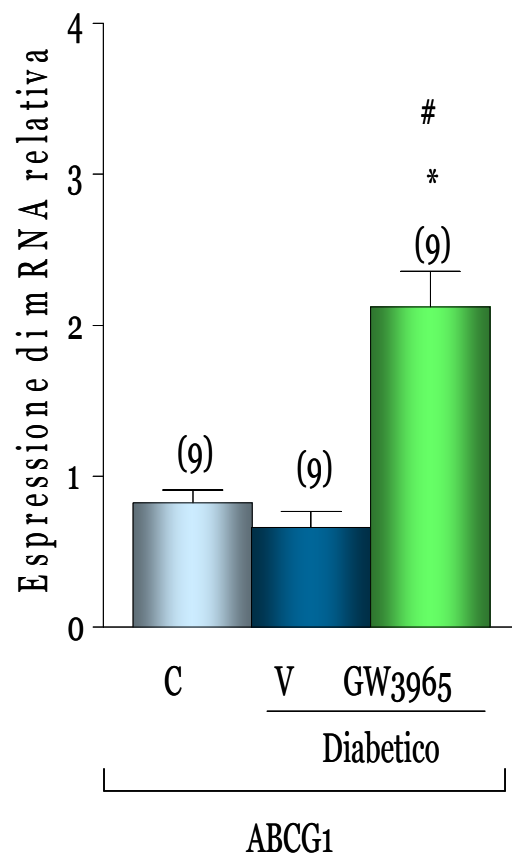


Figura 22: L'attivazione di LXR a seguito del trattamento col ligando sintetico GW3965 produce un aumento dei livelli di espressione genica di ABCA1 e ABCG1, due classici geni target di LXR coinvolti nell'efflusso di colesterolo nel nervo sciatico. Pannello A) espressione di ABCA1 e ABCG1 (pannello B). Questi dati indicano che il ligando raggiunge il nervo sciatico e che gli LXR sono attivati. Il livello dei messaggeri di questi due geni, analizzato alla fine dell'esperimento nel gruppo controllo (C), nel ratto diabetico trattato col solo veicolo (V) o con GW3965, non è cambiato dal diabete mentre viene innalzato fortemente a seguito del trattamento con GW3965. Gli istogrammi rappresentano l'espressione dell'mRNA dei geni indicati normalizzata per quella del gene housekeeping 36B4. I dati sono espressi come la media±S.E.M. (il numero di animali usati in ciascun gruppo è indicato in parentesi). Come analisi statistica è stata eseguita l'ANOVA ad una via seguita dal post-test di Tukey-Kramer; * $p < 0,05$ vs controllo *** $p < 0,001$ vs controllo, # $p < 0,05$ vs diabetico trattato col veicolo, ### $p < 0,001$ vs diabetico trattato col veicolo.

Al contrario, il trattamento con il GW3965 non ha modificato l'espressione di due fattori chiave nella regolazione della sintesi del colesterolo, la HMGCoA reduttasi e SREBP-2 (figura 23), indicando che né il diabete né il trattamento con il ligando di LXR sono stati in grado di modificare la sintesi del colesterolo.

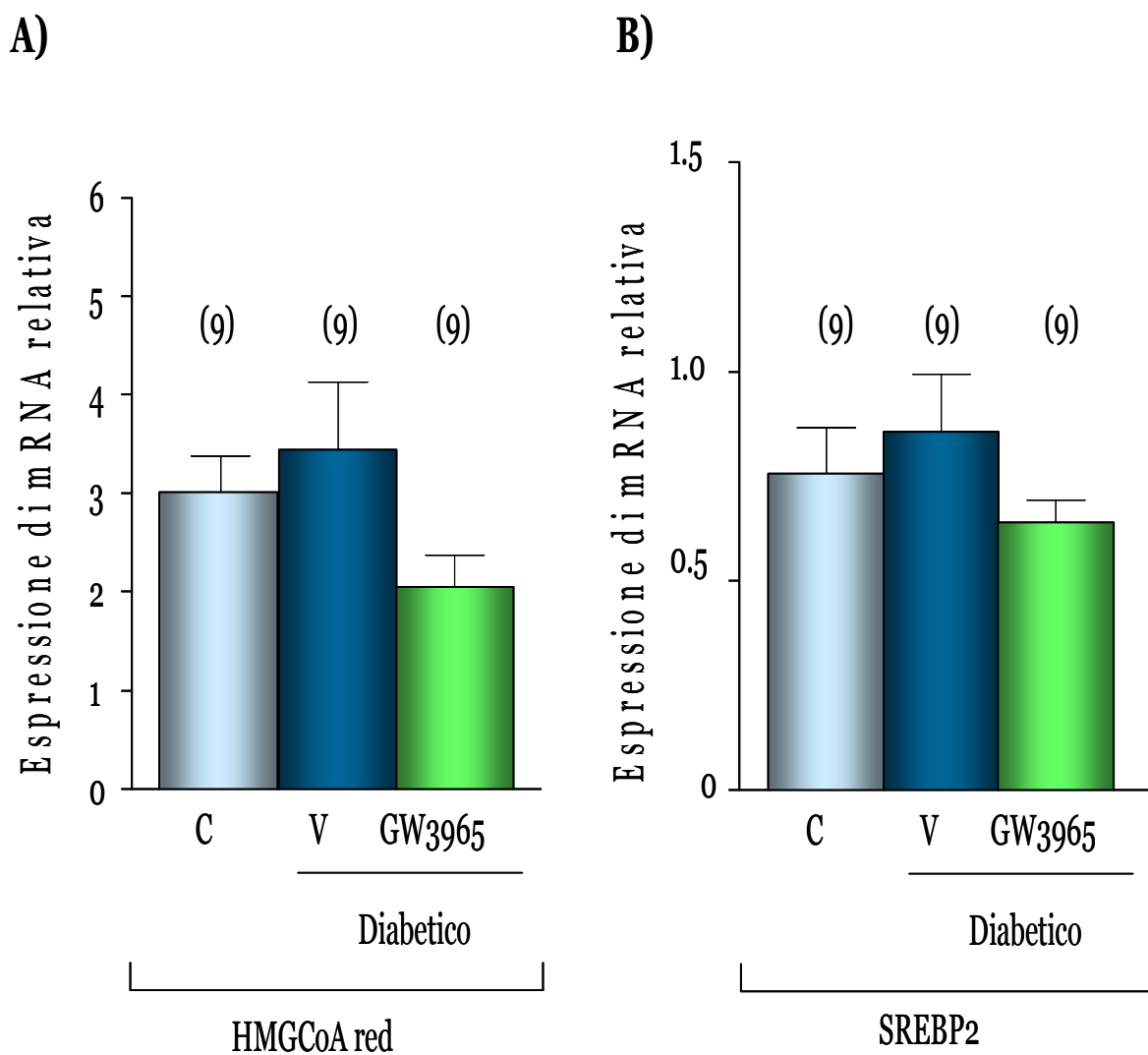


Figura 23: L'espressione di due importanti geni coinvolti nella sintesi del colesterolo non è variata dal diabete e/o dal trattamento con GW3965. Pannello A) Livelli d'espressione di HMGCoA reduttasi e SREBP-2 (pannello B). Il livello dei messaggeri di questi due geni, è stato analizzato alla fine dell'esperimento nel gruppo controllo (C), nel ratto diabetico trattato col solo veicolo (V) o con GW3965. Gli istogrammi rappresentano l'espressione dell'mRNA dei geni indicati normalizzata per quella del gene housekeeping 36B4. I dati sono espressi come la media±S.E.M. (il numero di animali usati in ciascun gruppo è indicato in parentesi).

Come precedentemente riportato, i livelli di steroidi neuroattivi determinati con LC-MS/MS sono diminuiti nel nervo sciatico dei ratti diabetici. In particolare, nei nervi periferici dei ratti STZ, la somministrazione di streptozotocina è in grado di ridurre in modo statisticamente significativo i livelli di PREG, PROG, DHP, isopregnanolone, T e dei suoi derivati, DHT e del 3 α diolo, come mostrato in [tabella 3](#). La somministrazione del ligando di LXRs ha permesso di revertire la diminuzione diabete-dipendente dei livelli di PREG, PROG, DHP e 3 α diolo ([tabella 3](#)).

Tabella 3: Analisi dei livelli degli steroidi neuroattivi attraverso LC-MS/MS nel nervo sciatico di ratti controllo, STZ e STZ trattati con GW3965.

	PREG	PROG	DHP	THP	Isopregna nolone	DHEA	T	DHT	3 α -diol
Controllo	1.52±0.23 (n=8)	1.58±0.22 (n=8)	8.86±0.59 (n=8)	1.00±0.16 (n=8)	2.19±0.38 (n=8)	0.24±0.04 (n=8)	1.52±0.23 (n=8)	0.80±0.11 (n=8)	1.01±0.13 (n=8)
STZ	0.63±0.05* (n=8)	0.62±0.09* (n=8)	5.89±0.24** (n=8)	0.65±0.03 (n=8)	0.61±0.07** (n=8)	0.17±0.02 (n=8)	0.24±0.05** (n=8)	0.18±0.03** (n=8)	0.57±0.10* (n=8)
STZ+ GW3965	1.45±0.33# (n=6)	1.71±0.24## (n=6)	9.17±0.59# (n=6)	0.92±0.05 (n=6)	1.07±0.06* (n=6)	0.29±0.04 (n=6)	0.27±0.13** (n=6)	0.20±0.04** (n=6)	1.09±0.13# (n=6)

I dati sono espressi come pg/mg tessuto e sono espressi come la media±S.E.M. (il numero di animali usati in ciascun gruppo è indicato in parentesi). Come analisi statistica è stata eseguita l'ANOVA seguita dal post-test di Tukey-Kramer; * p<0,05 vs controllo, *** p<0,001 vs controllo, # p<0,05 vs diabetico trattato col veicolo, ### p<0,001 vs diabetico trattato col veicolo.

E' interessante notare che anche i livelli degli steroidi neuroattivi nel plasma sono ridotti a seguito dell'insorgenza del diabete, ma che il trattamento con il GW3965 non esercita nessun effetto su di essi (tabella 4).

Tabella 4: Analisi dei livelli degli steroidi neuroattivi attraverso LC-MS/MS nel plasma di ratti controllo, STZ e STZ trattati con GW3965.

	PREG	PROG	DHP	THP	Isopregnan olone	DHEA	T	DHT	3 α -diol
Controllo	0.64±0.07 (n=8)	0.82±0.12 (n=8)	1.22±0.11 (n=8)	0.49±0.10 (n=8)	0.33±0.10 (n=8)	0.059±0.007 (n=8)	4.12±0.57 (n=8)	0.065±0.006 (n=8)	1.63±0.27 (n=8)
STZ	0.32±0.09* (n=8)	0.28±0.05** (n=8)	0.83±0.04* (n=8)	0.36±0.12 (n=8)	0.28±0.09 (n=8)	0.058±0.009 (n=8)	0.70±0.021** (n=8)	0.064±0.01 (n=8)	0.54±0.13** (n=8)
STZ+ GW3965	0.29±0.03* (n=6)	0.68±0.19 (n=6)	0.78±0.16* (n=6)	0.75±0.17 (n=6)	0.68±0.19 (n=6)	0.065±0.008 (n=6)	0.25±0.08** (n=6)	0.055±0.005 (n=6)	0.71±0.21* (n=6)

I dati sono espressi come pg/ μ l di plasma e sono espressi come la media±S.E.M. (il numero di animali usati in ciascun gruppo è indicato in parentesi). Come analisi statistica è stata eseguita l'ANOVA seguita dal post-test di Tukey-Kramer; * p<0,05 vs controllo, *** p<0,001 vs controllo.

Al fine di verificare se l'aumento dei livelli di steroidi neuroattivi a seguito della somministrazione del ligando di LXRs fosse dovuto ad una modulazione degli enzimi implicati nella steroidogenesi, sono stati valutati i livelli di espressione genica di alcuni di questi fattori. Infatti, quando comparati con i controlli normoglicemici, i ratti diabetici hanno mostrato significative differenze nell'espressione di diverse proteine implicate nella steroidogenesi e nel metabolismo degli steroidi neuroattivi. In particolare, la riduzione osservata nei ratti STZ dei livelli di PREG, correla con la diminuzione nell'espressione genica di StAR, TSPO e P450sc (figura 24, pannello A, B e C).

Le prime due proteine, come precedentemente descritto, sono infatti implicate nel trasporto del colesterolo dal citoplasma alla membrana interna del mitocondrio, dove risiede l'enzima P450sc che converte il colesterolo in PREG. Anche i ridotti livelli di DHP e DHT osservati nei nervi dei ratti STZ sono in accordo con la diminuzione dell'espressione genica dell'enzima deputato alla loro conversione dai precursori PROG e T, e cioè della 5 α reduttasi (figura 24, pannello D).

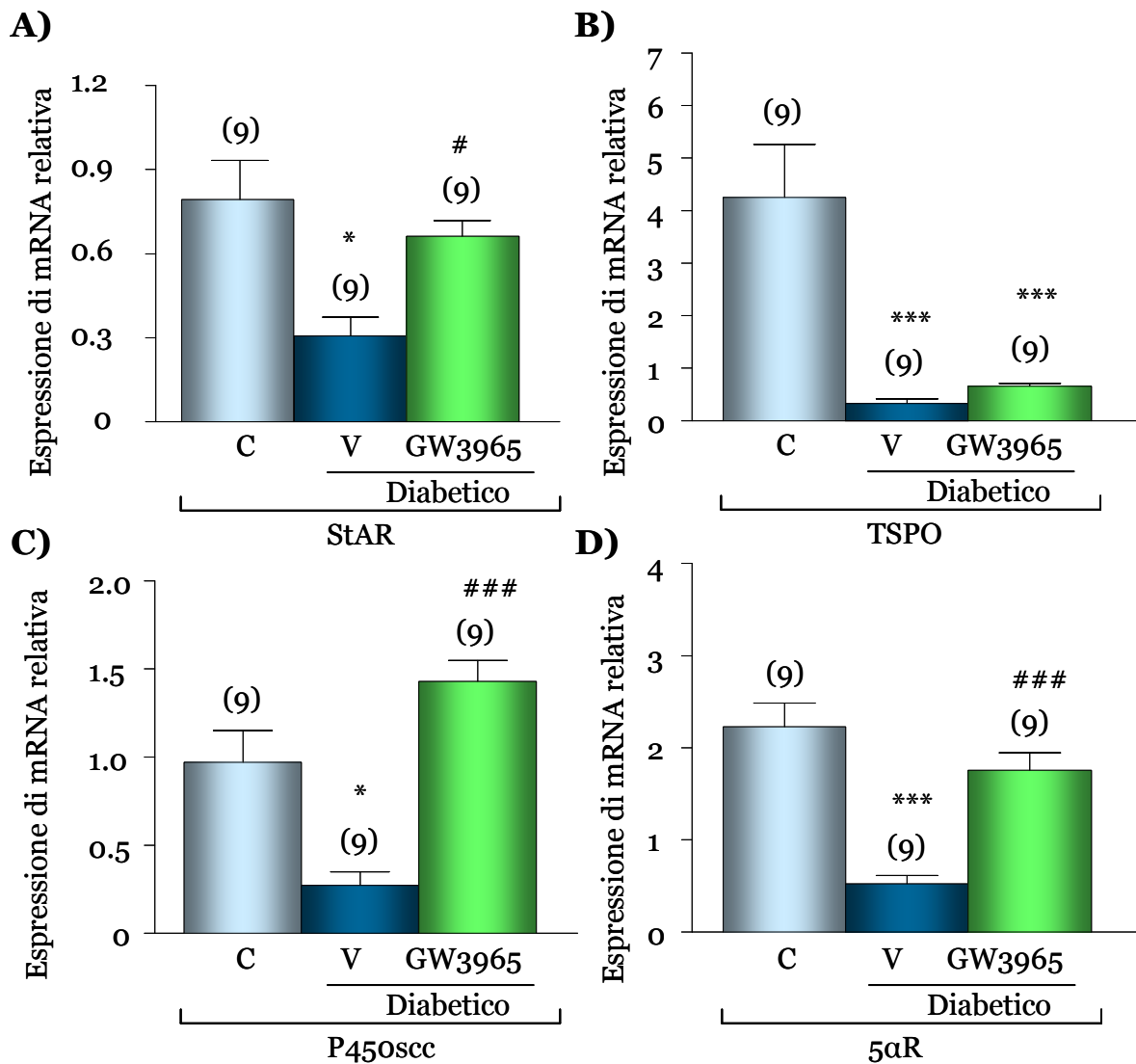


Figura 24: L'attivazione di LXR operata dal trattamento con GW3965 nel nervo sciatico di ratti diabetici riporta al livello del controllo l'espressione di StAR, P450sc e 5α-R, ma non influenza quella di TSPO. Pannello A) Espressione genica di StAR, TSPO (pannello B), P450sc (pannello C) e 5αR (pannello D) nel nervo sciatico. Gli mRNA sono stati analizzati alla fine dell'esperimento nel gruppo controllo (C), nel ratto diabetico trattato col solo veicolo (V) o con GW3965. Gli istogrammi rappresentano l'espressione dell'mRNA dei geni indicati normalizzata per quella del gene housekeeping 36B4. I dati sono espressi come la media±S.E.M. (il numero di animali usati in ciascun gruppo è indicato in parentesi). Come analisi statistica è stata eseguita l'ANOVA seguita dal post-test di Tukey-Kramer; * p<0,05 vs controllo *** p<0,001 vs controllo # p<0,05 vs diabetico trattato col veicolo, ### p<0,001 vs diabetico trattato col veicolo.

Il trattamento degli animali diabetici con il GW3965 è risultata in grado di riportare i livelli di mRNA di StAR, P450sc e di 5αR ai livelli del controllo non diabetico, mentre non ha esercitato alcun effetto sull'espressione di TSPO (figura 24).

Dal momento che l'attivazione di LXR nel nervo sciatico dei ratti diabetici ha riportato gli steroidi neuroattivi a livelli simili al controllo, è stato ritenuto

interessante valutare se questo aumento, mediato da LXR, potesse essere associato ad effetti neuroprotettivi.

In [tabella 5](#) sono riportati i livelli di glicemia degli animali dopo 3 mesi di diabete. Come atteso, i ratti STZ presentavano un livello di glucosio ematico più elevato rispetto ai ratti controllo non diabetici, mentre i livelli di trigliceridi e di acidi grassi non esterificati circolanti nel plasma non sono stati modificati dall'insorgenza della patologia. La somministrazione per un mese dell'attivatore di LXR non ha modificato questi parametri, suggerendo che il ripristino dei livelli di steroidi neuroattivi non è correlato con una riduzione del livello di glicemia nel sangue.

Tabella 5: Peso corporeo e analisi del sangue di ratti controllo, STZ e STZ trattati con GW3965.

	Controllo	Diabetico+veicolo	Diabetico+GW3965
Peso (g)	524.1±60.4 (n=14)	270.4±46.4***(n=14)	288.8±50.4***(n=14)
Glicemia (mg/dl)	82.4±19.2 (n=14)	953.1±238.1***(n=14)	949.7±207.9***(n=14)
Trigliceridi (mg/dl)	68.9±19.2 (n=14)	83.6±38.6 (n=14)	89.5±47 (n=14)
NEFA (mEq/l)	0.70±0.24 (n=14)	0.67±0.31 (n=14)	0.72±0.28 (n=14)

I dati sono espressi come la media±S.E.M. (il numero di animali usati in ciascun gruppo è indicato in parentesi). Come analisi statistica è stata eseguita l'ANOVA seguita dal post-test di Tukey-Kramer; * p<0,05 vs controllo, *** p<0,001 vs controllo. NEFA, acidi grassi non esterificati.

La somministrazione del GW3965 è tuttavia stato in grado di esercitare significativi effetti neuroprotettivi, come indicato dai parametri funzionali e biochimici presi in considerazione. Infatti, il trattamento col ligando di LXR ha ridotto l'aumento registrato nella latenza di risposta allo stimolo del calore, osservato mediante test della piastra calda, negli animali STZ ([figura 25](#)).

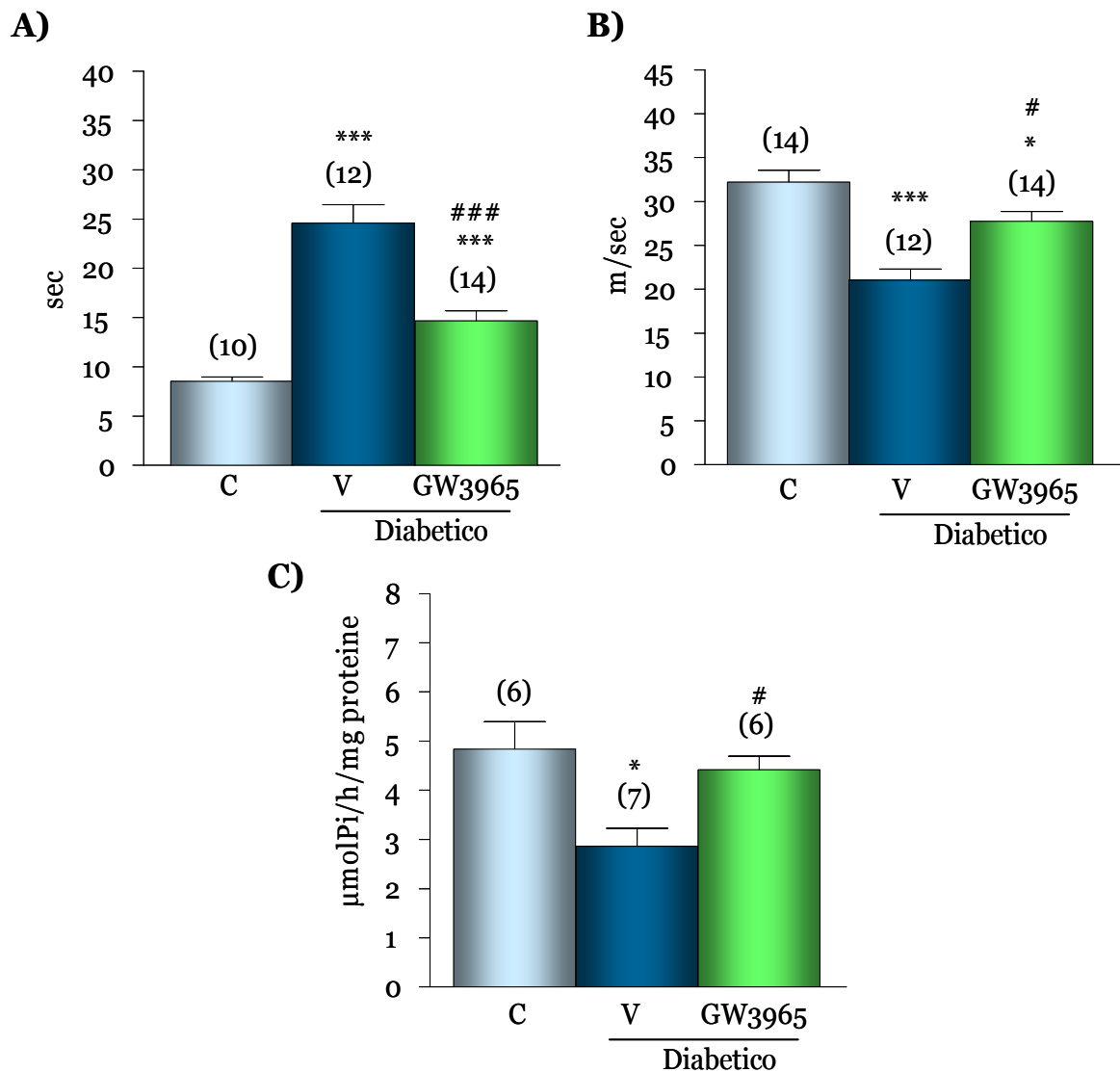


Figura 25: I parametri funzionali e biochimici alterati dal diabete vengono migliorati a seguito del trattamento con GW3965. Pannello A) Sensibilità termica, velocità di conduzione nervosa (pannello B) e attività dell'enzima $\text{Na}^+, \text{K}^+ \text{-ATPasi}$ (pannello C) misurate alla fine dell'esperimento nel gruppo controllo (C), nel ratto diabetico trattato col solo veicolo (V) o con GW3965. I dati sono espressi come latenza nella risposta in secondi, per determinare la soglia di sensibilità termica, come m/sec per l'NCV e come $\mu\text{mol} \cdot \text{Pi} / \text{h}$ per mg di proteina per l'attività dell'enzima $\text{Na}^+, \text{K}^+ \text{-ATPasi}$. Gli istogrammi rappresentano la media \pm S.E.M. (il numero di animali usati in ciascun gruppo è indicato in parentesi). Come analisi statistica è stata eseguita l'ANOVA seguita dal post-test di Tukey-Kramer; * $p < 0,05$ vs controllo, *** $p < 0,001$ vs controllo, # $p < 0,05$ vs diabetico trattato col veicolo, ### $p < 0,001$ vs diabetico trattato col veicolo.

In aggiunta alla diminuzione della soglia di percezione del calore osservata nei diabetici, anche la velocità di conduzione nervosa antidromica misurata nella coda del ratto è diminuita dal diabete, ma è stata innalzata a seguito del trattamento con il GW3965 (figura 25). Inoltre, l'attività della pompa $\text{Na}^+, \text{K}^+ \text{-ATPasi}$, che risulta

dimezzata nel nervo tibiale dei ratti STZ, è stata quasi totalmente ristabilita dopo somministrazione del ligando di LXR, come mostrato in [figura 25](#).

A differenza degli effetti neuroprotettivi esercitati dall'attivazione di LXR, il trattamento con il GW3965 non è in grado di contrastare significativamente il calo osservato nel nervo sciatico dei ratti STZ nei livelli d'espressione genica delle proteine della mielina, come mostrato in [figura 26, pannello A, B, C e D](#).

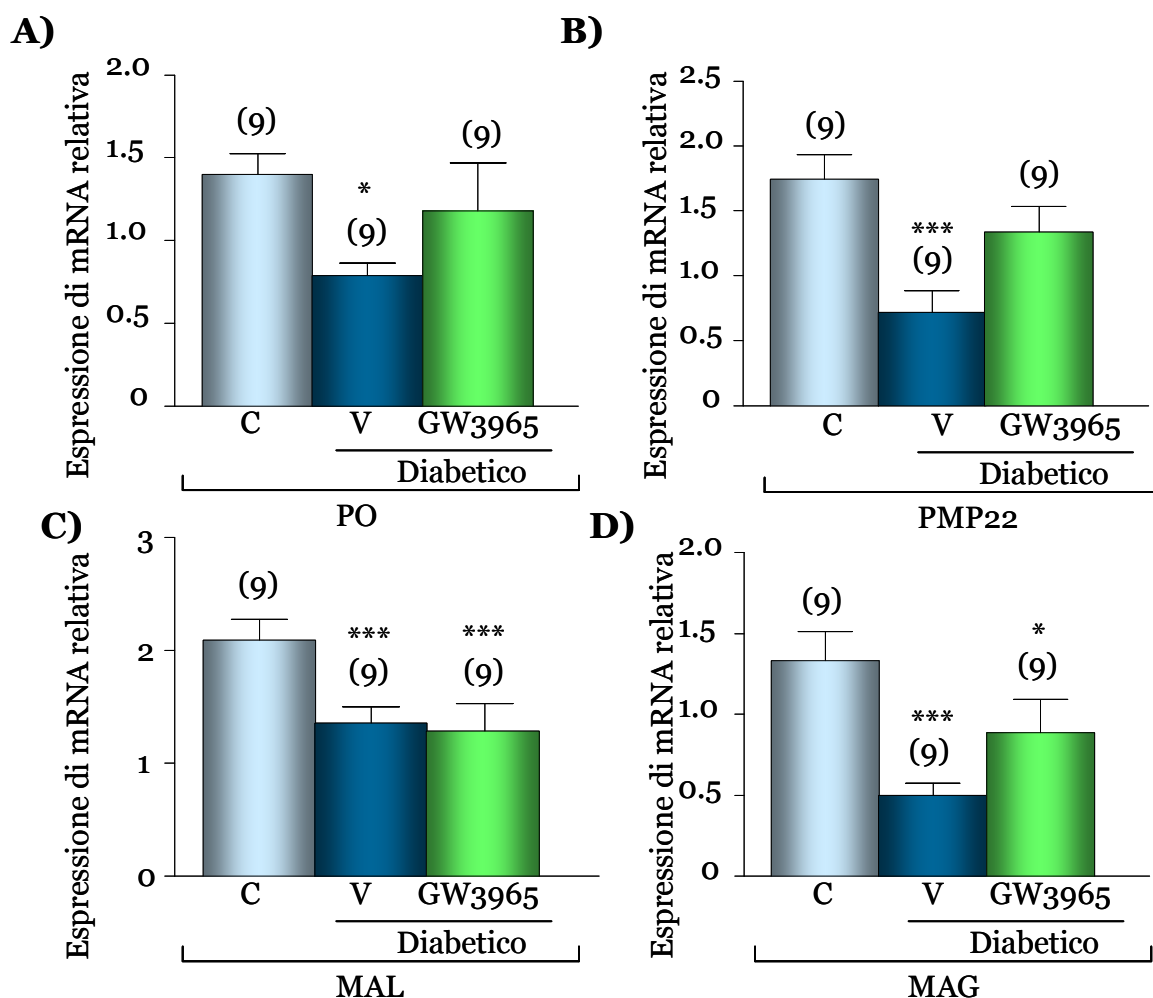


Figura 26: Il diabete produce una diminuzione dei livelli di espressione delle proteine della mielina e il trattamento con GW3965 non è in grado di modificare tale parametro. Espressione genica delle proteine della mielina nel nervo sciatico. Pannello A) Po, pannello B) PMP22, pannello C) MAL e pannello D) MAG. Gli istogrammi rappresentano l'espressione dell'mRNA dei geni indicati normalizzata per quella del gene housekeeping 36B4. I dati sono espressi come la media±S.E.M. (il numero di animali usati in ciascun gruppo è indicato in parentesi). Come analisi statistica è stata eseguita l'ANOVA seguita dal post-test di Tukey-Kramer; * $p < 0,05$ vs controllo, *** $p < 0,001$ vs controllo.

Infatti, l'espressione di Po, PMP22, MAL (proteina linfocitaria associata alla mielina) e MAG (glicoproteina associata alla mielina), è diminuita dalla comparsa

del diabete, seppure una tendenza all'incremento, che però non raggiunge la significatività statistica, è stata osservata nel caso di Po e PMP22 (figura 26, pannello A e B).

I risultati qui proposti sono stati materiale di pubblicazione in Cermenati e collaboratori (Cermenati, et al., 2010).

4.2.2 Discussione

Gli steroidi neuroattivi si sono rivelati in grado di esercitare degli effetti neuroprotettivi in un modello di neuropatia diabetica (Leonelli, et al., 2007). In questa seconda parte della tesi vengono riportati simili risultati ottenuti attraverso la somministrazione di un attivatore sintetico del recettore nucleare LXR. I bassi livelli di PREG (il primo steroide che si forma a partire dal colesterolo) che si misurano nel nervo sciatico di ratti STZ (Pesaresi, et al., 2010) vengono innalzati a seguito della somministrazione del ligando di LXR. L'attivazione di questo recettore produce un aumento della steroidogenesi nella ghiandola surrenalica, dove direttamente regola l'espressione di StAR, una importante proteina implicata nei primi passaggi del processo steroidogenico (Cummins, et al., 2006). In accordo con questi risultati, è stato osservato che nel nervo periferico, e in particolare nel nervo sciatico, l'attivazione di LXR in un contesto di diabete riporta ai livelli del controllo l'espressione genica di StAR. Inoltre, è stato osservato che il livello del messaggero di P450_{scc}, cioè dell'enzima che converte il colesterolo in PREG, è stato completamente revertito dopo la somministrazione del ligando di LXR, il GW3965. Al contrario, l'espressione di TSPO non è stata influenzata dal trattamento col ligando, e se sia necessaria una stimolazione simultanea sia di TSPO che di StAR per attivare la steroidogenesi è ancora oggetto di dibattito (Bogan, et al., 2007, Rone, et al., 2009). Nello studio qui presentato, la normalizzazione dei livelli di espressione di StAR e di P450_{scc}, può essere sufficiente per spiegare gli aumentati livelli di PREG misurati nel nervo sciatico dei ratti STZ. E' stato possibile osservare anche un ripristino dei livelli di PROG e del suo metabolita DHP, così come quello di un metabolita del T, il 3 α diolo, nel nervo sciatico dei ratti diabetici trattati con il ligando di LXR. Almeno per quanto riguarda il PROG e il DHP, il loro aumento può essere dovuto ad una maggiore

espressione dell'enzima che converte l'uno nell'altro, la 5 α reduttasi. E' interessante sottolineare che il trattamento con il GW3965 non aumenta i livelli plasmatici di PREG, PROG, DHP e 3 α diolo, indicando che l'attivazione di LXR provoca un aumento dei livelli degli steroidi neuroattivi nel nervo periferico in modo specifico, senza coinvolgere la produzione steroidea della periferia. Tale osservazione è molto importante, in quanto un aumento della steroidogenesi direttamente nel sistema nervoso e non nel plasma può evitare i probabili effetti endocrini associati alle molecole steroidee.

Dal momento che l'attivazione di LXR provoca un innalzamento dei bassi livelli di steroidi neuroattivi nel nervo sciatico dei ratti diabetici, sono stati condotti degli esperimenti per valutare se a tale aumento fossero associati altri effetti neuroprotettivi sul sistema nervoso periferico. Il trattamento con il GW3965 migliora la ridotta velocità di conduzione nervosa osservata nei ratti STZ, così come permette un recupero della sensibilità termica e dell'attività dell'enzima Na⁺,K⁺-ATPasi, alterati nello stato diabetico.

Tali risultati sono in accordo con precedenti osservazioni nello stesso modello animale, a seguito della somministrazione di PROG, T o dei loro metaboliti (Leonelli, et al., 2007, Roglio, et al., 2008). E' quindi ipotizzabile che l'attivazione di LXR eserciti i suoi effetti neuroprotettivi sul nervo periferico attraverso l'incremento dei livelli di PREG, PROG, DHP e 3 α diolo. In questo contesto è opportuno ricordare che gli effetti mediati da questi steroidi neuroattivi possono passare attraverso l'attivazione di recettori per gli steroidi sia classici che non classici; in particolare, PROG e DHP legano il recettore del progesterone, mentre 3 α diolo è un ligando del recettore GABA_A e del recettore degli estrogeni (Melcangi, et al., 2008). Per questo motivo, un'azione degli steroidi attraverso questi recettori nell'esercitare gli effetti neuroprotettivi osservati non è da escludere.

L'attivazione di LXR potrebbe influenzare i livelli di steroidi neuroattivi attraverso la sua abilità di regolare la trascrizione dei geni coinvolti nell'omeostasi del colesterolo. In questo studio, l'espressione della HMGCoA reduttasi e di SREBP-2, due fondamentali regolatori nella sintesi del colesterolo, non presentano variazioni nei tre gruppi sperimentali considerati, suggerendo che l'aumento dei livelli degli steroidi neuroattivi nel nervo sciatico dei ratti diabetici a seguito dell'attivazione di LXR non è dovuta ad un incremento nella sintesi del colesterolo. Per questo

motivo, l'ipotesi qui proposta è che i benefici osservati a seguito dell'attivazione di LXR siano dovuti ad una maggiore utilizzazione del colesterolo, similmente a quanto avviene nel caso della ghiandola surrenalica come precedentemente riportato (Cummins, et al., 2006). A supporto di questa ipotesi, nel modello sperimentale di ratto STZ, a seguito del trattamento con il GW3965 è stato osservato nel nervo sciatico un aumento dell'espressione dei geni coinvolti nell'efflusso di colesterolo, come ABCA1 e ABCG1. Questi geni sono due targets diretti di LXR e la loro induzione promuove un efflusso di colesterolo che dovrebbe mantenere il livello di colesterolo libero entro i limiti di sicurezza per la cellula.

In conclusione, come mostrato in figura 27, nella seconda parte di questa tesi è stato dimostrato che l'attivazione di LXR, in un contesto di diabete che provoca neuropatia periferica, porta a benefici effetti neuroprotettivi, in particolare attraverso una promozione della steroidogenesi, un'aumentata disponibilità del colesterolo e quindi ad un incremento locale dei livelli di steroidi neuroattivi. Questi effetti sono associati alla neuroprotezione contro la neuropatia periferica indotta dal diabete. I dati qui riportati estendono le azioni neuroprotettive esercitate da LXR osservate finora in diversi modelli di danno nervoso, come nel danno ischemico al cervello, nella malattia di Alzheimer e in quella di Niemann-Pick (Cheng, et al., Morales, et al., 2008, Repa, et al., 2007, Sironi, et al., 2008, Zelcer, et al., 2007).

Da ultimo, alla luce dei risultati qui presentati, è possibile proporre per la prima volta che l'attivazione di LXR potrebbe rappresentare un promettente strumento terapeutico per la neuropatia diabetica.

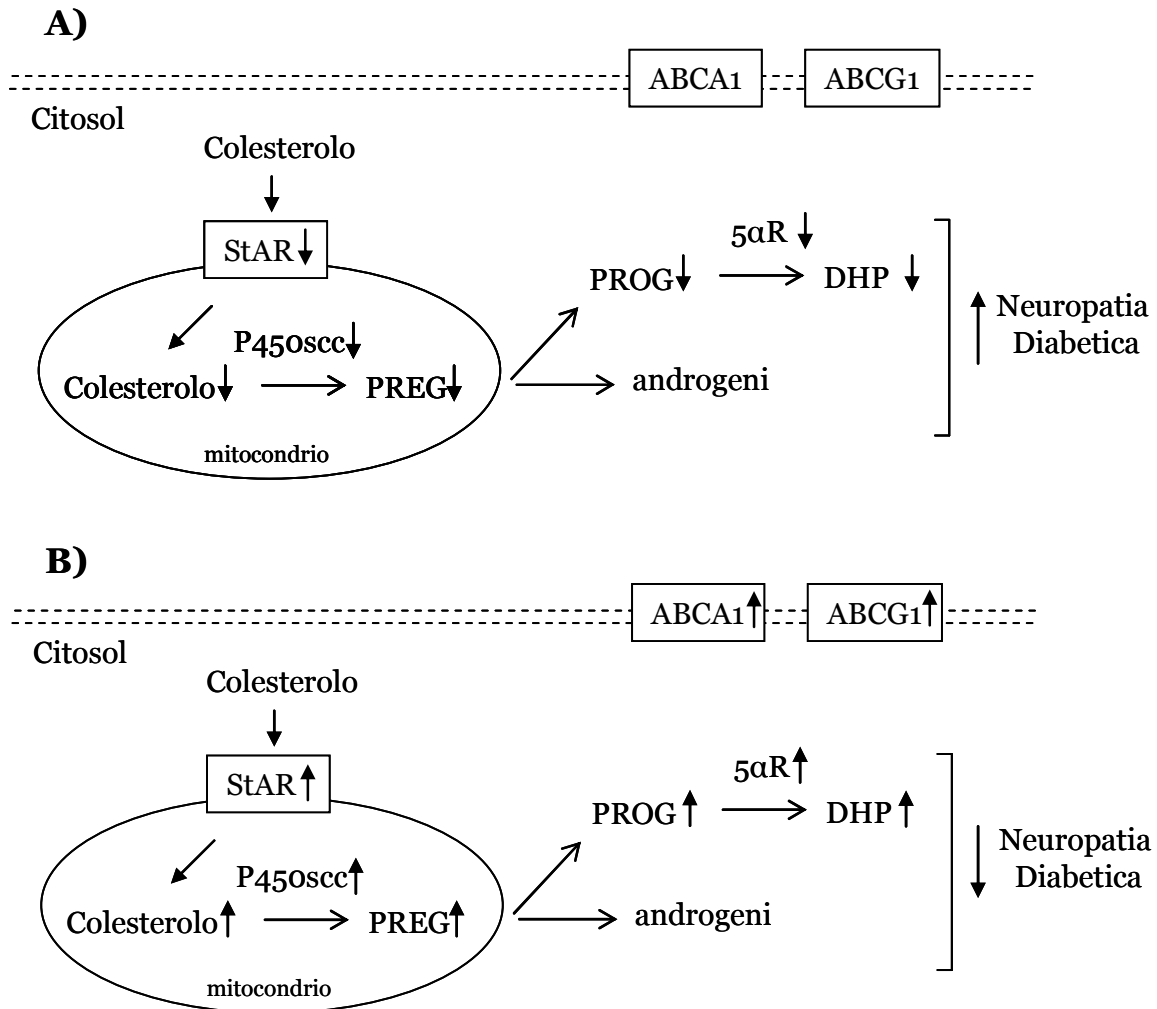


Figura 27: Modello proposto di attivazione di LXR nella neuropatia diabetica. L'ingresso del colesterolo nel mitocondrio è compiuto dalla proteina StAR, un trasportatore che regola il trasferimento del colesterolo dalla membrana mitocondriale esterna a quella interna. Qui, il colesterolo diventa substrato per l'enzima P450scc che lo converte in pregnenolone, rappresentando il primo passaggio enzimatico della steroidogenesi. Pannello A) In una condizione di diabete, è stata osservata una marcata riduzione della sintesi degli steroidi neuroattivi nel nervo sciatico dovuto ad una diminuzione nell'espressione di StAR, P450scc e 5 α riduttasi (5 α R). Pannello B) Il trattamento di ratti diabetici con un attivatore sintetico di LXR, GW3965, è in grado di ripristinare l'espressione degli enzimi della steroidogenesi, e i livelli degli steroidi neuroattivi, alterati dalla neuropatia diabetica. Inoltre, l'attivazione di LXR produce un aumento dell'espressione dei geni coinvolti nell'efflusso di colesterolo, come ABCA1 e ABCG1. In conclusione, l'attivazione degli LXR promuove l'utilizzazione del colesterolo e protegge in ultima analisi dalla neuropatia periferica indotta dal diabete.

5. CONCLUSIONI

In questa tesi sono stati valutati gli effetti neuroprotettivi di 2 molecole sintetiche, il Ro5-4864 e il GW3965, rispettivamente un ligando della proteina traslocatrice di 18 kDa (TSPO) e del Liver X Receptor (LXR), in un modello di neuropatia periferica diabetica, il ratto indotto con streptozotocina (STZ).

In particolare, nella prima parte della tesi sono stati descritti e discussi i risultati ottenuti dopo la somministrazione del ligando del TSPO, Ro5-4864, a seguito di due differenti protocolli sperimentali. Nel primo protocollo sono stati effettuati 16 trattamenti durante il terzo ed ultimo mese di diabete. Tale frequenza si era rivelata neuroprotettiva nello stesso modello dopo trattamento con steroidi neuroattivi, quali progesterone (PROG) e derivati (Leonelli, et al., 2007) e testosterone (T) e derivati (Roglio, et al., 2007). Le analisi effettuate a seguito dei 16 trattamenti hanno mostrato che i livelli di steroidi neuroattivi, diminuiti dal diabete nel nervo sciatico dei ratti STZ, non sono stati incrementati dal trattamento con il Ro5-4864. A tale mancato recupero dei livelli di steroidi neuroattivi, è associata l'assenza di effetti neuroprotettivi osservati sulla velocità di conduzione nervosa, sulla sensibilità termica e sull'espressione genica delle proteine della mielina. Tali parametri risultano diminuiti dal diabete e i risultati ottenuti dopo il trattamento mostrano che non sono statisticamente diversi dal ratto diabetico. Alla luce dei dati ottenuti è stata ipotizzata una desensitizzazione del TSPO ed è stato perciò deciso di ripetere l'esperimento diminuendo il numero di somministrazioni.

Perciò, nello stesso modello di ratto STZ, è stato utilizzato il protocollo sperimentale 2 in cui il Ro5-4864 è stato somministrato una volta alla settimana, per un totale di 4 trattamenti, durante l'ultimo mese della sperimentazione. Al contrario di quanto osservato dopo le 16 somministrazioni, i 4 trattamenti con Ro5-4864 hanno aumentato i bassi livelli di steroidi neuroattivi determinati nel nervo sciatico dei ratti STZ. I livelli di PROG e di T sono risultati aumentati anche nel plasma, diversamente da quanto osservato con il protocollo 1, dove, sempre nello stesso tessuto, non sono state determinate differenze tra il diabetico e il ratto STZ trattato con il ligando del TSPO. L'incremento dei livelli di steroidi neuroattivi determinato nel nervo sciatico con il protocollo sperimentale 2 è associato ad un effetto neuroprotettivo osservato nei parametri alterati dal diabete. Infatti, la velocità di conduzione nervosa e l'espressione genica della glicoproteina zero della mielina (Po) sono state aumentate in conseguenza della somministrazione con il

Ro5-4864, la sensibilità termica ha subito un significativo miglioramento e l'attività della pompa Na⁺,K⁺-ATPasi è ritornata al livello del controllo. Da ultimo, anche la densità delle fibre intraepidermiche della cute delle zampe dei ratti, diminuita dalla neuropatia, è stata incrementata dal trattamento con il ligando del TSPO seguendo il protocollo sperimentale 2. L'utilizzo del Ro5-4864 è stato quindi in grado di esercitare degli effetti neuroprotettivi nel modello di ratto STZ, probabilmente attraverso l'incremento dei livelli di steroidi neuroattivi che sono diminuiti nella neuropatia periferica. Infatti sono principalmente i livelli dei primi steroidi prodotti nel processo biosintetico, e cioè pregnenolone (PREG) e PROG, ad essere maggiormente incrementati. Il meccanismo d'azione grazie al quale la somministrazione del Ro5-4864 si è rivelata neuroprotettiva, potrebbe essere quello di un aumentato ingresso del colesterolo nel mitocondrio, che rappresenta la tappa limitante della steroidogenesi.

Un differente approccio, ma sempre volto ad incrementare la sintesi degli steroidi neuroattivi, potrebbe essere quello di rendere più disponibile il colesterolo libero nella cellula, aumentandone l'efflusso, ma non la nuova sintesi, che potrebbe risultare dannosa. Per valutare questa ipotesi è stato scelto il GW3965, un ligando sintetico di LXR. E' noto infatti che l'attivazione di LXR porta all'incremento dell'espressione genica di proteine implicate nell'omeostasi del colesterolo, ed in particolare nel suo efflusso (Chiang, et al., 2001, Cummins and Mangelsdorf, 2006, Cummins, et al., 2006). Inoltre è stato recentemente dimostrato che l'attivazione di LXR aumenta la steroidogenesi nelle ghiandole surrenaliche (Cummins, et al., 2006), ed è stato ipotizzato che questa possa passare attraverso l'induzione dell'espressione di StAR.

Nella seconda parte di questa tesi sono stati perciò valutati gli effetti neuroprotettivi associati alla somministrazione del GW3965 nel modello sperimentale di ratto diabetico. Ratti maschi STZ sono stati quindi trattati durante il terzo mese dall'insorgenza del diabete, con il ligando di LXR sotto cute per un totale di 4 volte, sulla base degli effetti neuroprotettivi del trattamento con Ro5-4864 ottenuti nello stesso modello con questo protocollo sperimentale.

I dati riportati in questa tesi dimostrano, per la prima volta, che LXR α e LXR β , le due isoforme del recettore, sono presenti nel nervo sciatico di ratto e che la loro espressione non è alterata del diabete. E' stato anche osservato che le due isoforme sono in grado di indurre l'espressione dei loro classici geni target dopo

somministrazione del GW3965, a livello del nervo periferico. Successivamente, nello stesso tessuto, è stata valutata l'espressione genica di alcune proteine implicate nella steroidogenesi, come TSPO e StAR, coinvolte nell'ingresso del colesterolo, P450_{scc}, che converte il precursore degli steroidi in PREG, e 5 α R, che converte il PROG e il T nei loro 5 α derivati. Il diabete causa la diminuzione dell'espressione di queste proteine ed il trattamento con il GW3965 aumenta i livelli di StAR, P450_{scc} e 5 α R, ma non quelli di TSPO. Tali osservazioni concordano con i livelli di steroidi neuroattivi determinati nel nervo sciatico di questi animali. Il diabete, come atteso, provoca una diminuzione dei livelli di PREG, PROG, diidroprogesterone (DHP), isopregnanolone, T, diidrotosterone (DHT) e 3 α diolo. Il trattamento con il GW3965 aumenta i livelli di PREG, PROG, DHP e 3 α diolo, in accordo con quanto osservato sull'espressione degli enzimi implicati in questi processi. Tale risultato differisce da quanto riportato precedentemente dopo la somministrazione del ligando del TSPO. Il trattamento con Ro5-4864, infatti, ha aumentato significativamente nel nervo sciatico solo i livelli di PREG, PROG e DHT.

E' anche interessante sottolineare che il trattamento con il GW3965 non ha aumentato i livelli di steroidi neuroattivi nel plasma, indicando che l'attivazione di LXR ha provocato un incremento dei loro livelli nel nervo periferico in modo specifico, senza coinvolgere la produzione steroidea della periferia. Tale osservazione è in contrasto con quanto determinato precedentemente dopo il trattamento di ratti diabetici con il ligando del TSPO. Infatti, a seguito dei 4 trattamenti con il Ro5-4864, è stato osservato un aumento di PROG e T anche nel plasma. Tali osservazioni suggeriscono che probabilmente l'attivazione di LXR e di TSPO sottendono diversi meccanismi, una possibilità da investigare in studi futuri. Il trattamento con il GW3965 è associato anche ad altri effetti neuroprotettivi sul sistema nervoso periferico. Infatti, l'attivazione di LXR ha migliorato la ridotta velocità di conduzione nervosa osservata nei ratti STZ, così come ha permesso un recupero della sensibilità termica e dell'attività dell'enzima Na⁺,K⁺-ATPasi, alterati nello stato diabetico. Come precedentemente riportato, anche il ligando del TSPO è stato in grado di influenzare questi tre parametri funzionali e biochimici. Una importante differenza, però, rispetto a quanto osservato dopo il trattamento con il Ro5-4864, è che l'attivazione di LXR non ha aumentato in modo statisticamente significativo l'espressione delle proteine della mielina, facendo supporre ancora

una volta che i meccanismi implicati nell'attivazione dei due recettori nel nervo periferico sono sostanzialmente differenti.

In questo contesto è anche utile ricordare che gli effetti neuroprotettivi esercitati dai ligandi di TSPO e di LXR non sono conseguenti al controllo della glicemia.

Infatti gli elevati livelli di glucosio nel sangue osservati nei ratti diabetici non sono differenti da quelli determinati nei ratti trattati con il Ro5-4864 o con il GW3965.

In conclusione, i risultati riportati in questa tesi indicano che sia la somministrazione del Ro5-4864 che quella del GW3965 producono un aumento dei livelli di steroidi neuroattivi nel nervo sciatico di ratti con neuropatia periferica diabetica. Entrambe le somministrazioni, quando effettuate una volta alla settimana durante il terzo mese di diabete, esercitano degli effetti neuroprotettivi su diversi parametri comportamentali, funzionali e biochimici alterati dalla patologia. Sebbene ci siano alcune differenze negli effetti ottenuti, che permettono di ipotizzare differenti meccanismi alla base delle loro azioni, l'attivazione sia del TSPO, ottenuta con il trattamento con il Ro5-4864, che di LXR, dopo trattamento con il GW3965, possono rappresentare una nuova e promettente strategia terapeutica per il trattamento della neuropatia diabetica.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Ahmed, N., 2005. Advanced glycation endproducts--role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Res Clin Pract* 67, 3-21.
2. Akwa, Y., Schumacher, M., Jung-Testas, I., and Baulieu, E. E., 1993. Neurosteroids in rat sciatic nerves and Schwann cells. *C R Acad Sci III* 316, 410-414.
3. Alho, H., Varga, V., and Krueger, K. E., 1994. Expression of mitochondrial benzodiazepine receptor and its putative endogenous ligand diazepam binding inhibitor in cultured primary astrocytes and C-6 cells: relation to cell growth. *Cell Growth Differ* 5, 1005-1014.
4. Andersson, S., and Russell, D. W., 1990. Structural and biochemical properties of cloned and expressed human and rat steroid 5 alpha-reductases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 3640-3644.
5. Andreis, P. G., Mazzocchi, G., Cavallini, L., Rebuffat, P., and Nussdorfer, G. G., 1990. Morphology and functional responses of isolated zona glomerulosa cells of streptozotocin-induced diabetic rats. *Exp Pathol* 39, 65-71.
6. Antkiewicz-Michaluk, L., Guidotti, A., and Krueger, K. E., 1988. Molecular characterization and mitochondrial density of a recognition site for peripheral-type benzodiazepine ligands. *Mol Pharmacol* 34, 272-278.
7. Apfel, R., Benbrook, D., Lernhardt, E., Ortiz, M. A., Salbert, G., and Pfahl, M., 1994. A novel orphan receptor specific for a subset of thyroid hormone-responsive elements and its interaction with the retinoid/thyroid hormone receptor subfamily. *Mol Cell Biol* 14, 7025-7035.
8. Apfel, S. C., 2000. Managing the neurotoxicity of paclitaxel (Taxol) and docetaxel (Taxotere) with neurotrophic factors. *Cancer Invest* 18, 564-573.
9. Arikawa, E., Ma, R. C., Isshiki, K., Luptak, I., He, Z., Yasuda, Y., Maeno, Y., Patti, M. E., Weir, G. C., Harris, R. A., Zammit, V. A., Tian, R., and King, G. L., 2007. Effects of insulin replacements, inhibitors of angiotensin, and PKCbeta's actions to normalize cardiac gene expression and fuel metabolism in diabetic rats. *Diabetes* 56, 1410-1420.
10. Atlas, D., 2009. *IDF Diabetic Atlas*. International Diabetes Federation.
11. Ayhan, S., Markal, N., Siemionow, K., Araneo, B., and Siemionow, M., 2003. Effect of subepineurial dehydroepiandrosterone treatment on healing of transected nerves repaired with the epineurial sleeve technique. *Microsurgery* 23, 49-55.
12. Azcoitia, I., Leonelli, E., Magnaghi, V., Veiga, S., Garcia-Segura, L. M., and Melcangi, R. C., 2003. 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* 24, 853-860.
13. Basile, A. S., Lueddens, H. W., and Skolnick, P., 1988. Regulation of renal peripheral benzodiazepine receptors by anion transport inhibitors. *Life Sci* 42, 715-726.
14. Baulieu, E. E. R. P. a. S. M., 1999. *Contemporary Endocrinology*. Humana Press, Totowa.
15. Benavides, J., Quarteronet, D., Plouin, P. F., Imbault, F., Phan, T., Uzan, A., Renault, C., Dubroeuq, M. C., Gueremy, C., and Le Fur, G., 1984. Characterization of peripheral type benzodiazepine binding sites in human

- and rat platelets by using [³H]PK 11195. Studies in hypertensive patients. *Biochem Pharmacol* 33, 2467-2472.
16. Benmessahel, Y., Troadec, J. D., Cadepond, F., Guennoun, R., Hales, D. B., Schumacher, M., and Groyer, G., 2004. Downregulation of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene expression by cyclic AMP in cultured Schwann cells. *Glia* 45, 213-228.
 17. Berry, E. M., 1997. Dietary fatty acids in the management of diabetes mellitus. *Am J Clin Nutr* 66, 991S-997S.
 18. Besman, M. J., Yanagibashi, K., Lee, T. D., Kawamura, M., Hall, P. F., and Shively, J. E., 1989. Identification of des-(Gly-Ile)-endozepine as an effector of corticotropin-dependent adrenal steroidogenesis: stimulation of cholesterol delivery is mediated by the peripheral benzodiazepine receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 4897-4901.
 19. Bianchi, R., Buyukakilli, B., Brines, M., Savino, C., Cavaletti, G., Oggioni, N., Lauria, G., Borgna, M., Lombardi, R., Cimen, B., Comelekoglu, U., Kanik, A., Tataroglu, C., Cerami, A., and Ghezzi, P., 2004. Erythropoietin both protects from and reverses experimental diabetic neuropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 823-828.
 20. Bierhaus, A., Haslbeck, K. M., Humpert, P. M., Liliensiek, B., Dehmer, T., Morcos, M., Sayed, A. A., Andrassy, M., Schiekofer, S., Schneider, J. G., Schulz, J. B., Heuss, D., Neundorfer, B., Dierl, S., Huber, J., Tritschler, H., Schmidt, A. M., Schwaninger, M., Haering, H. U., Schleicher, E., Kasper, M., Stern, D. M., Arnold, B., and Nawroth, P. P., 2004. Loss of pain perception in diabetes is dependent on a receptor of the immunoglobulin superfamily. *J Clin Invest* 114, 1741-1751.
 21. Bierhaus, A., Schiekofer, S., Schwaninger, M., Andrassy, M., Humpert, P. M., Chen, J., Hong, M., Luther, T., Henle, T., Kloting, I., Morcos, M., Hofmann, M., Tritschler, H., Weigle, B., Kasper, M., Smith, M., Perry, G., Schmidt, A. M., Stern, D. M., Haring, H. U., Schleicher, E., and Nawroth, P. P., 2001. Diabetes-associated sustained activation of the transcription factor nuclear factor-kappaB. *Diabetes* 50, 2792-2808.
 22. Biessels, G. J., Cristino, N. A., Rutten, G. J., Hamers, F. P., Erkelens, D. W., and Gispen, W. H., 1999. Neurophysiological changes in the central and peripheral nervous system of streptozotocin-diabetic rats. Course of development and effects of insulin treatment. *Brain* 122 (Pt 4), 757-768.
 23. Billiar, R. B., Little, B., Kline, I., Reier, P., Takaoka, Y., and White, R. J., 1975. The metabolic clearance rate, head and brain extractions, and brain distribution and metabolism of progesterone in the anesthetized, female monkey (*Macaca mulatta*). *Brain Res* 94, 99-113.
 24. Bogan, R. L., Davis, T. L., and Niswender, G. D., 2007. Peripheral-type benzodiazepine receptor (PBR) aggregation and absence of steroidogenic acute regulatory protein (StAR)/PBR association in the mitochondrial membrane as determined by bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *J Steroid Biochem Mol Biol* 104, 61-67.
 25. Bose, H. S., Lingappa, V. R., and Miller, W. L., 2002a. Rapid regulation of steroidogenesis by mitochondrial protein import. *Nature* 417, 87-91.
 26. Bose, H. S., Lingappa, V. R., and Miller, W. L., 2002b. The steroidogenic acute regulatory protein, StAR, works only at the outer mitochondrial membrane. *Endocr Res* 28, 295-308.

27. Boulton, A. J., 1998. Lowering the risk of neuropathy, foot ulcers and amputations. *Diabet Med* 15 Suppl 4, S57-59.
28. Braestrup, C., and Squires, R. F., 1977. Specific benzodiazepine receptors in rat brain characterized by high-affinity (3H)diazepam binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 3805-3809.
29. Brown, R. C., and Papadopoulos, V., 2001. Role of the peripheral-type benzodiazepine receptor in adrenal and brain steroidogenesis. *Int Rev Neurobiol* 46, 117-143.
30. Brownlee, M., 2001. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414, 813-820.
31. Brownlee, M., 2005. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes* 54, 1615-1625.
32. Cameron, N. E., and Cotter, M. A., 1994. The relationship of vascular changes to metabolic factors in diabetes mellitus and their role in the development of peripheral nerve complications. *Diabetes Metab Rev* 10, 189-224.
33. Cameron, N. E., and Cotter, M. A., 2008. Pro-inflammatory mechanisms in diabetic neuropathy: focus on the nuclear factor kappa B pathway. *Curr Drug Targets* 9, 60-67.
34. Cameron, N. E., Eaton, S. E., Cotter, M. A., and Tesfaye, S., 2001. Vascular factors and metabolic interactions in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Diabetologia* 44, 1973-1988.
35. Campiani, G., Nacci, V., Fiorini, I., De Filippis, M. P., Garofalo, A., Ciani, S. M., Greco, G., Novellino, E., Williams, D. C., Zisterer, D. M., Woods, M. J., Mihai, C., Manzoni, C., and Mennini, T., 1996. Synthesis, biological activity, and SARs of pyrrolobenzoxazepine derivatives, a new class of specific "peripheral-type" benzodiazepine receptor ligands. *J Med Chem* 39, 3435-3450.
36. Carenini, S., Neuberg, D., Schachner, M., Suter, U., and Martini, R., 1999. Localization and functional roles of PMP22 in peripheral nerves of P0-deficient mice. *Glia* 28, 256-264.
37. Caruso, D., Scurati, S., Maschi, O., De Angelis, L., Roglio, I., Giatti, S., Garcia-Segura, L. M., and Melcangi, R. C., 2008. Evaluation of neuroactive steroid levels by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in central and peripheral nervous system: effect of diabetes. *Neurochem Int* 52, 560-568.
38. Casellas, P., Galiegue, S., and Basile, A. S., 2002. Peripheral benzodiazepine receptors and mitochondrial function. *Neurochem Int* 40, 475-486.
39. Cavaletti, G., Cavalletti, E., Montaguti, P., Oggioni, N., De Negri, O., and Tredici, G., 1997. Effect on the peripheral nervous system of the short-term intravenous administration of paclitaxel in the rat. *Neurotoxicology* 18, 137-145.
40. Cermenati, G., Giatti, S., Cavaletti, G., Bianchi, R., Maschi, O., Pesaresi, M., Abbiati, F., Volonterio, A., Saez, E., Caruso, D., Melcangi, R. C., and Mitro, N., 2010. Activation of the liver X receptor increases neuroactive steroid levels and protects from diabetes-induced peripheral neuropathy. *J Neurosci* 30, 11896-11901.
41. Chan, J. R., Rodriguez-Waitkus, P. M., Ng, B. K., Liang, P., and Glaser, M., 2000. Progesterone synthesized by Schwann cells during myelin formation regulates neuronal gene expression. *Mol Biol Cell* 11, 2283-2295.

42. Chan, O., Inouye, K., Akirav, E., Park, E., Riddell, M. C., Vranic, M., and Matthews, S. G., 2005. Insulin alone increases hypothalamo-pituitary-adrenal activity, and diabetes lowers peak stress responses. *Endocrinology* 146, 1382-1390.
43. Charlap, J. H., Donahue, R. J., and Knudsen, T. B., 2003. Exposure-disease continuum for 2-chloro-2'-deoxyadenosine, a prototype ocular teratogen. 3. Intervention with PK11195. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 67, 108-115.
44. Chavez-Delgado, M. E., Gomez-Pinedo, U., Feria-Velasco, A., Huerta-Viera, M., Castaneda, S. C., Toral, F. A., Parducz, A., Anda, S. L., Mora-Galindo, J., and Garcia-Estrada, J., 2005. Ultrastructural analysis of guided nerve regeneration using progesterone- and pregnenolone-loaded chitosan prostheses. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 74, 589-600.
45. Cheng, C., and Zochodne, D. W., 2003. Sensory neurons with activated caspase-3 survive long-term experimental diabetes. *Diabetes* 52, 2363-2371.
46. Cheng, H. M., and Gonzalez, R. G., 1986. The effect of high glucose and oxidative stress on lens metabolism, aldose reductase, and senile cataractogenesis. *Metabolism* 35, 10-14.
47. Chiang, J. Y., Kimmel, R., and Stroup, D., 2001. Regulation of cholesterol 7alpha-hydroxylase gene (CYP7A1) transcription by the liver orphan receptor (LXRalpha). *Gene* 262, 257-265.
48. Chomczynski, P., and Sacchi, N., 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162, 156-159.
49. Compagnone, N. A., Bulfone, A., Rubenstein, J. L., and Mellon, S. H., 1995. Expression of the steroidogenic enzyme P450scc in the central and peripheral nervous systems during rodent embryogenesis. *Endocrinology* 136, 2689-2696.
50. Compagnone, N. A., and Mellon, S. H., 2000. Neurosteroids: biosynthesis and function of these novel neuromodulators. *Front Neuroendocrinol* 21, 1-56.
51. Cook, S. C., and Wellman, C. L., 2004. Chronic stress alters dendritic morphology in rat medial prefrontal cortex. *J Neurobiol* 60, 236-248.
52. Cooke, B., Hegstrom, C. D., Villeneuve, L. S., and Breedlove, S. M., 1998. Sexual differentiation of the vertebrate brain: principles and mechanisms. *Front Neuroendocrinol* 19, 323-362.
53. Coppey, L. J., Gellett, J. S., Davidson, E. P., Dunlap, J. A., Lund, D. D., Salvemini, D., and Yorek, M. A., 2001. Effect of M40403 treatment of diabetic rats on endoneurial blood flow, motor nerve conduction velocity and vascular function of epineurial arterioles of the sciatic nerve. *Br J Pharmacol* 134, 21-29.
54. Corpechot, C., Robel, P., Axelson, M., Sjoval, J., and Baulieu, E. E., 1981. Characterization and measurement of dehydroepiandrosterone sulfate in rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 4704-4707.
55. Corpechot, C., Synguelakis, M., Talha, S., Axelson, M., Sjoval, J., Vihko, R., Baulieu, E. E., and Robel, P., 1983. Pregnenolone and its sulfate ester in the rat brain. *Brain Res* 270, 119-125.
56. Corsi, L., Avallone, R., Geminiani, E., Cosenza, F., Venturini, I., and Baraldi, M., 2004. Peripheral benzodiazepine receptors in potatoes (*Solanum tuberosum*). *Biochem Biophys Res Commun* 313, 62-66.

57. Cortright, R. N., Azevedo, J. L., Jr., Zhou, Q., Sinha, M., Pories, W. J., Itani, S. I., and Dohm, G. L., 2000. Protein kinase C modulates insulin action in human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 278, E553-562.
58. Costa, E., Auta, J., Guidotti, A., Korneyev, A., and Romeo, E., 1994. The pharmacology of neurosteroidogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 49, 385-389.
59. Costet, P., Luo, Y., Wang, N., and Tall, A. R., 2000. Sterol-dependent transactivation of the ABC1 promoter by the liver X receptor/retinoid X receptor. *J Biol Chem* 275, 28240-28245.
60. Culty, M., Silver, P., Nakazato, A., Gazouli, M., Li, H., Muramatsu, M., Okuyama, S., and Papadopoulos, V., 2001. Peripheral benzodiazepine receptor binding properties and effects on steroid synthesis of two new phenoxyphenyl-acetamide derivatives, DAA1097 and DAA1106. *Drug Development Research* 52, 475-484.
61. Cummins, C. L., and Mangelsdorf, D. J., 2006. Liver X receptors and cholesterol homeostasis: spotlight on the adrenal gland. *Biochem Soc Trans* 34, 1110-1113.
62. Cummins, C. L., Volle, D. H., Zhang, Y., McDonald, J. G., Sion, B., Lefrancois-Martinez, A. M., Caira, F., Veyssiere, G., Mangelsdorf, D. J., and Lobaccaro, J. M., 2006. Liver X receptors regulate adrenal cholesterol balance. *J Clin Invest* 116, 1902-1912.
63. D'Ambrosi, N., Murra, B., Cavaliere, F., Amadio, S., Bernardi, G., Burnstock, G., and Volonte, C., 2001. Interaction between ATP and nerve growth factor signalling in the survival and neuritic outgrowth from PC12 cells. *Neuroscience* 108, 527-534.
64. D'Astous, M., Morissette, M., Tanguay, B., Callier, S., and Di Paolo, T., 2003. Dehydroepiandrosterone (DHEA) such as 17beta-estradiol prevents MPTP-induced dopamine depletion in mice. *Synapse* 47, 10-14.
65. Das Evcimen, N., and King, G. L., 2007. The role of protein kinase C activation and the vascular complications of diabetes. *Pharmacol Res* 55, 498-510.
66. De Roo, M., Rodeau, J. L., and Schlichter, R., 2003. Dehydroepiandrosterone potentiates native ionotropic ATP receptors containing the P2X2 subunit in rat sensory neurones. *J Physiol* 552, 59-71.
67. Dias, W. B., and Hart, G. W., 2007. O-GlcNAc modification in diabetes and Alzheimer's disease. *Mol Biosyst* 3, 766-772.
68. Donohue, H. S., Gabbott, P. L., Davies, H. A., Rodriguez, J. J., Cordero, M. I., Sandi, C., Medvedev, N. I., Popov, V. I., Colyer, F. M., Peddie, C. J., and Stewart, M. G., 2006. Chronic restraint stress induces changes in synapse morphology in stratum lacunosum-moleculare CA1 rat hippocampus: a stereological and three-dimensional ultrastructural study. *Neuroscience* 140, 597-606.
69. Dubrovsky, B., 2006. Neurosteroids, neuroactive steroids, and symptoms of affective disorders. *Pharmacol Biochem Behav* 84, 644-655.
70. Dyck, P. J., Zimmerman, B. R., Vilen, T. H., Minnerath, S. R., Karnes, J. L., Yao, J. K., and Poduslo, J. F., 1988. Nerve glucose, fructose, sorbitol, myo-inositol, and fiber degeneration and regeneration in diabetic neuropathy. *N Engl J Med* 319, 542-548.
71. Eckersley, L., 2002. Role of the Schwann cell in diabetic neuropathy. *Int Rev Neurobiol* 50, 293-321.

72. Edwards, P. A., Kennedy, M. A., and Mak, P. A., 2002. LXRs; oxysterol-activated nuclear receptors that regulate genes controlling lipid homeostasis. *Vascul Pharmacol* 38, 249-256.
73. El'tseva, T. V., Adamskaya, E. I., Peryshkova, T. A., and Babichev, V. N., 1993. Disturbance of neuroendocrine regulation of sexual behavior of male rats with streptozotocin diabetes. *Neurosci Behav Physiol* 23, 538-544.
74. El-Remessy, A. B., Abou-Mohamed, G., Caldwell, R. W., and Caldwell, R. B., 2003. High glucose-induced tyrosine nitration in endothelial cells: role of eNOS uncoupling and aldose reductase activation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44, 3135-3143.
75. Farges, R., Joseph-Liauzun, E., Shire, D., Caput, D., Le Fur, G., Loison, G., and Ferrara, P., 1993. Molecular basis for the different binding properties of benzodiazepines to human and bovine peripheral-type benzodiazepine receptors. *FEBS Lett* 335, 305-308.
76. Faure, J. P., Baumert, H., Han, Z., Goujon, J. M., Favreau, F., Dutheil, D., Petit, I., Barriere, M., Tallineau, C., Tillement, J. P., Carretier, M., Mauco, G., Papadopoulos, V., and Hauet, T., 2003. Evidence for a protective role of trimetazidine during cold ischemia: targeting inflammation and nephron mass. *Biochem Pharmacol* 66, 2241-2250.
77. Ferzaz, B., Brault, E., Bourliaud, G., Robert, J. P., Poughon, G., Claustre, Y., Marguet, F., Liere, P., Schumacher, M., Nowicki, J. P., Fournier, J., Marabout, B., Sevrin, M., George, P., Soubrie, P., Benavides, J., and Scatton, B., 2002. SSR180575 (7-chloro-N,N,5-trimethyl-4-oxo-3-phenyl-3,5-dihydro-4H-pyridazino[4,5-b]indole-1-acetamide), a peripheral benzodiazepine receptor ligand, promotes neuronal survival and repair. *J Pharmacol Exp Ther* 301, 1067-1078.
78. Floyd, R. A., 1999. Antioxidants, oxidative stress, and degenerative neurological disorders. *Proc Soc Exp Biol Med* 222, 236-245.
79. Frye, C. A., Van Keuren, K. R., and Erskine, M. S., 1996. Behavioral effects of 3 alpha-androstanediol. I: Modulation of sexual receptivity and promotion of GABA-stimulated chloride flux. *Behav Brain Res* 79, 109-118.
80. Galiegue, S., Jbilo, O., Combes, T., Bribe, E., Carayon, P., Le Fur, G., and Casellas, P., 1999. Cloning and characterization of PRAX-1. A new protein that specifically interacts with the peripheral benzodiazepine receptor. *J Biol Chem* 274, 2938-2952.
81. Galli, C. L., Corsini, E., and Marinovich, M., 2008. *Tossicologia*. PICCIN editore, pp. cap 4.2.
82. Garcia-Segura, L. M., Chowen, J. A., Parducz, A., and Naftolin, F., 1994. Gonadal hormones as promoters of structural synaptic plasticity: cellular mechanisms. *Prog Neurobiol* 44, 279-307.
83. Garcia-Segura, L. M., Luquin, S., Parducz, A., and Naftolin, F., 1994. Gonadal hormone regulation of glial fibrillary acidic protein immunoreactivity and glial ultrastructure in the rat neuroendocrine hypothalamus. *Glia* 10, 59-69.
84. Gardner, D. G., and Shoback, D., 2009. *GREENSPAN'S ENDOCRINOLOGIA GENERALE E CLINICA*. PICCIN editore.
85. Garnier, M., Dimchev, A. B., Boujrad, N., Price, J. M., Musto, N. A., and Papadopoulos, V., 1994. In vitro reconstitution of a functional peripheral-type benzodiazepine receptor from mouse Leydig tumor cells. *Mol Pharmacol* 45, 201-211.

86. Gavish, M., Bachman, I., Shoukrun, R., Katz, Y., Veenman, L., Weisinger, G., and Weizman, A., 1999. Enigma of the peripheral benzodiazepine receptor. *Pharmacol Rev* 51, 629-650.
87. Gee, K. W., Bolger, M. B., Brinton, R. E., Coirini, H., and McEwen, B. S., 1988. Steroid modulation of the chloride ionophore in rat brain: structure-activity requirements, regional dependence and mechanism of action. *J Pharmacol Exp Ther* 246, 803-812.
88. Gerin, I., Dolinsky, V. W., Shackman, J. G., Kennedy, R. T., Chiang, S. H., Burant, C. F., Steffensen, K. R., Gustafsson, J. A., and MacDougald, O. A., 2005. LXRbeta is required for adipocyte growth, glucose homeostasis, and beta cell function. *J Biol Chem* 280, 23024-23031.
89. Giatti, S., Pesaresi, M., Cavaletti, G., Bianchi, R., Carozzi, V., Lombardi, R., Maschi, O., Lauria, G., Garcia-Segura, L. M., Caruso, D., and Melcangi, R. C., 2009. Neuroprotective effects of a ligand of translocator protein-18 kDa (Ro5-4864) in experimental diabetic neuropathy. *Neuroscience* 164, 520-529.
90. Giatzakis, C., and Papadopoulos, V., 2004. Differential utilization of the promoter of peripheral-type benzodiazepine receptor by steroidogenic versus nonsteroidogenic cell lines and the role of Sp1 and Sp3 in the regulation of basal activity. *Endocrinology* 145, 1113-1123.
91. Girard, C., Liu, S., Cadepond, F., Adams, D., Lacroix, C., Verleye, M., Gillardin, J. M., Baulieu, E. E., Schumacher, M., and Schweizer-Groyer, G., 2008. Etifoxine improves peripheral nerve regeneration and functional recovery. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 20505-20510.
92. Greene, D. A., Lattimer-Greene, S., and Sima, A. A., 1989. Pathogenesis of diabetic neuropathy: role of altered phosphoinositide metabolism. *Crit Rev Neurobiol* 5, 143-219.
93. Grefhorst, A., Elzinga, B. M., Voshol, P. J., Plosch, T., Kok, T., Bloks, V. W., van der Sluijs, F. H., Havekes, L. M., Romijn, J. A., Verkade, H. J., and Kuipers, F., 2002. Stimulation of lipogenesis by pharmacological activation of the liver X receptor leads to production of large, triglyceride-rich very low density lipoprotein particles. *J Biol Chem* 277, 34182-34190.
94. Grefhorst, A., van Dijk, T. H., Hammer, A., van der Sluijs, F. H., Havinga, R., Havekes, L. M., Romijn, J. A., Groot, P. H., Reijngoud, D. J., and Kuipers, F., 2005. Differential effects of pharmacological liver X receptor activation on hepatic and peripheral insulin sensitivity in lean and ob/ob mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289, E829-838.
95. Griffin, L. D., Gong, W., Verot, L., and Mellon, S. H., 2004. Niemann-Pick type C disease involves disrupted neurosteroidogenesis and responds to allopregnanolone. *Nat Med* 10, 704-711.
96. Groyer, G., Eychenne, B., Girard, C., Rajkowski, K., Schumacher, M., and Cadepond, F., 2006. Expression and functional state of the corticosteroid receptors and 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in Schwann cells. *Endocrinology* 147, 4339-4350.
97. Guennoun, R., Benmessahel, Y., Delespierre, B., Guezou, M., Rajkowski, K. M., Baulieu, E. E., and Schumacher, M., 2001. Progesterone stimulates Krox-20 gene expression in Schwann cells. *Brain Res Mol Brain Res* 90, 75-82.
98. Gupta, S., Chough, E., Daley, J., Oates, P., Tornheim, K., Ruderman, N. B., and Keane, J. F., Jr., 2002. Hyperglycemia increases endothelial

- superoxide that impairs smooth muscle cell Na⁺-K⁺-ATPase activity. *Am J Physiol Cell Physiol* 282, C560-566.
99. Ha, H. C., Hester, L. D., and Snyder, S. H., 2002. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 dependence of stress-induced transcription factors and associated gene expression in glia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 3270-3275.
 100. Hardwick, M., Fertikh, D., Culty, M., Li, H., Vidic, B., and Papadopoulos, V., 1999. Peripheral-type benzodiazepine receptor (PBR) in human breast cancer: correlation of breast cancer cell aggressive phenotype with PBR expression, nuclear localization, and PBR-mediated cell proliferation and nuclear transport of cholesterol. *Cancer Res* 59, 831-842.
 101. Hauet, T., Yao, Z. X., Bose, H. S., Wall, C. T., Han, Z., Li, W., Hales, D. B., Miller, W. L., Culty, M., and Papadopoulos, V., 2005. Peripheral-type benzodiazepine receptor-mediated action of steroidogenic acute regulatory protein on cholesterol entry into leydig cell mitochondria. *Mol Endocrinol* 19, 540-554.
 102. Hirsch, T., Decaudin, D., Susin, S. A., Marchetti, P., Larochette, N., Resche-Rigon, M., and Kroemer, G., 1998. PK11195, a ligand of the mitochondrial benzodiazepine receptor, facilitates the induction of apoptosis and reverses Bcl-2-mediated cytoprotection. *Exp Cell Res* 241, 426-434.
 103. Homburg, S., Visochek, L., Moran, N., Dantzer, F., Priel, E., Asculai, E., Schwartz, D., Rotter, V., Dekel, N., and Cohen-Armon, M., 2000. A fast signal-induced activation of Poly(ADP-ribose) polymerase: a novel downstream target of phospholipase c. *J Cell Biol* 150, 293-307.
 104. Hosie, A. M., Wilkins, M. E., da Silva, H. M., and Smart, T. G., 2006. Endogenous neurosteroids regulate GABAA receptors through two discrete transmembrane sites. *Nature* 444, 486-489.
 105. Huppenbauer, C. B., Tanzer, L., DonCarlos, L. L., and Jones, K. J., 2005. Gonadal steroid attenuation of developing hamster facial motoneuron loss by axotomy: equal efficacy of testosterone, dihydrotestosterone, and 17-beta estradiol. *J Neurosci* 25, 4004-4013.
 106. Ilnytska, O., Lyzogubov, V. V., Stevens, M. J., Drel, V. R., Mashtalir, N., Pacher, P., Yorek, M. A., and Obrosova, I. G., 2006. Poly(ADP-ribose) polymerase inhibition alleviates experimental diabetic sensory neuropathy. *Diabetes* 55, 1686-1694.
 107. Inkster, M. E., Cotter, M. A., and Cameron, N. E., 2007. Treatment with the xanthine oxidase inhibitor, allopurinol, improves nerve and vascular function in diabetic rats. *Eur J Pharmacol* 561, 63-71.
 108. Islamov, R. R., Hendricks, W. A., Katwa, L. C., McMurray, R. J., Pak, E. S., Spanier, N. S., and Murashov, A. K., 2003. Effect of 17 beta-estradiol on gene expression in lumbar spinal cord following sciatic nerve crush injury in ovariectomized mice. *Brain Res* 966, 65-75.
 109. Jagtap, P., and Szabo, C., 2005. Poly(ADP-ribose) polymerase and the therapeutic effects of its inhibitors. *Nat Rev Drug Discov* 4, 421-440.
 110. Janowski, B. A., Grogan, M. J., Jones, S. A., Wisely, G. B., Kliewer, S. A., Corey, E. J., and Mangelsdorf, D. J., 1999. Structural requirements of ligands for the oxysterol liver X receptors LXRalpha and LXRbeta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 266-271.
 111. Janowski, B. A., Willy, P. J., Devi, T. R., Falck, J. R., and Mangelsdorf, D. J., 1996. An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha. *Nature* 383, 728-731.

112. Jones, K. J., Brown, T. J., and Damaser, M., 2001. Neuroprotective effects of gonadal steroids on regenerating peripheral motoneurons. *Brain Res Brain Res Rev* 37, 372-382.
113. Joseph-Liauzun, E., Delmas, P., Shire, D., and Ferrara, P., 1998. Topological analysis of the peripheral benzodiazepine receptor in yeast mitochondrial membranes supports a five-transmembrane structure. *J Biol Chem* 273, 2146-2152.
114. Joseph, S. B., McKilligin, E., Pei, L., Watson, M. A., Collins, A. R., Laffitte, B. A., Chen, M., Noh, G., Goodman, J., Hagger, G. N., Tran, J., Tippin, T. K., Wang, X., Lusic, A. J., Hsueh, W. A., Law, R. E., Collins, J. L., Willson, T. M., and Tontonoz, P., 2002. Synthetic LXR ligand inhibits the development of atherosclerosis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 7604-7609.
115. Kaasik, A., Kalda, A., Jaako, K., and Zharkovsky, A., 2001. Dehydroepiandrosterone sulphate prevents oxygen-glucose deprivation-induced injury in cerebellar granule cell culture. *Neuroscience* 102, 427-432.
116. Kabe, Y., Ando, K., Hirao, S., Yoshida, M., and Handa, H., 2005. Redox regulation of NF-kappaB activation: distinct redox regulation between the cytoplasm and the nucleus. *Antioxid Redox Signal* 7, 395-403.
117. Karachalias, N., Babaei-Jadidi, R., Ahmed, N., and Thornalley, P. J., 2003. Accumulation of fructosyl-lysine and advanced glycation end products in the kidney, retina and peripheral nerve of streptozotocin-induced diabetic rats. *Biochem Soc Trans* 31, 1423-1425.
118. Kauppinen, T. M., Chan, W. Y., Suh, S. W., Wiggins, A. K., Huang, E. J., and Swanson, R. A., 2006. Direct phosphorylation and regulation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 by extracellular signal-regulated kinases 1/2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 7136-7141.
119. Kellogg, A. P., Wiggin, T. D., Larkin, D. D., Hayes, J. M., Stevens, M. J., and Pop-Busui, R., 2007. Protective effects of cyclooxygenase-2 gene inactivation against peripheral nerve dysfunction and intraepidermal nerve fiber loss in experimental diabetes. *Diabetes* 56, 2997-3005.
120. Kinnally, K. W., Zorov, D. B., Antonenko, Y. N., Snyder, S. H., McEnery, M. W., and Tedeschi, H., 1993. Mitochondrial benzodiazepine receptor linked to inner membrane ion channels by nanomolar actions of ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 1374-1378.
121. Kita, A., Kohayakawa, H., Kinoshita, T., Ochi, Y., Nakamichi, K., Kurumiya, S., Furukawa, K., and Oka, M., 2004. Antianxiety and antidepressant-like effects of AC-5216, a novel mitochondrial benzodiazepine receptor ligand. *Br J Pharmacol* 142, 1059-1072.
122. Koenig, H. L., Schumacher, M., Ferzaz, B., Thi, A. N., Ressouches, A., Guennoun, R., Jung-Testas, I., Robel, P., Akwa, Y., and Baulieu, E. E., 1995. Progesterone synthesis and myelin formation by Schwann cells. *Science* 268, 1500-1503.
123. Kolm-Litty, V., Sauer, U., Nerlich, A., Lehmann, R., and Schleicher, E. D., 1998. High glucose-induced transforming growth factor beta1 production is mediated by the hexosamine pathway in porcine glomerular mesangial cells. *J Clin Invest* 101, 160-169.
124. Korach-Andre, M., Parini, P., Larsson, L., Arner, A., Steffensen, K. R., and Gustafsson, J. A., Separate and overlapping metabolic functions of

- LXRalpha and LXRbeta in C57Bl/6 female mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298, E167-178.
125. Kuruvilla, R., and Eichberg, J., 1998. Depletion of phospholipid arachidonoyl-containing molecular species in a human Schwann cell line grown in elevated glucose and their restoration by an aldose reductase inhibitor. *J Neurochem* 71, 775-783.
 126. Labombarda, F., Gonzalez, S. L., Gonzalez, D. M., Guennoun, R., Schumacher, M., and de Nicola, A. F., 2002. Cellular basis for progesterone neuroprotection in the injured spinal cord. *J Neurotrauma* 19, 343-355.
 127. Lacapere, J. J., Delavoie, F., Li, H., Peranzi, G., Maccario, J., Papadopoulos, V., and Vidic, B., 2001. Structural and functional study of reconstituted peripheral benzodiazepine receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 284, 536-541.
 128. Lacapere, J. J., and Papadopoulos, V., 2003. Peripheral-type benzodiazepine receptor: structure and function of a cholesterol-binding protein in steroid and bile acid biosynthesis. *Steroids* 68, 569-585.
 129. Lacor, P., Benavides, J., and Ferzaz, B., 1996. Enhanced expression of the peripheral benzodiazepine receptor (PBR) and its endogenous ligand octadecaneuropeptide (ODN) in the regenerating adult rat sciatic nerve. *Neurosci Lett* 220, 61-65.
 130. Lacor, P., Gandolfo, P., Tonon, M. C., Brault, E., Dalibert, I., Schumacher, M., Benavides, J., and Ferzaz, B., 1999. Regulation of the expression of peripheral benzodiazepine receptors and their endogenous ligands during rat sciatic nerve degeneration and regeneration: a role for PBR in neurosteroidogenesis. *Brain Res* 815, 70-80.
 131. Laffitte, B. A., Chao, L. C., Li, J., Walczak, R., Hummasti, S., Joseph, S. B., Castrillo, A., Wilpitz, D. C., Mangelsdorf, D. J., Collins, J. L., Saez, E., and Tontonoz, P., 2003. Activation of liver X receptor improves glucose tolerance through coordinate regulation of glucose metabolism in liver and adipose tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 5419-5424.
 132. Laffitte, B. A., Joseph, S. B., Walczak, R., Pei, L., Wilpitz, D. C., Collins, J. L., and Tontonoz, P., 2001. Autoregulation of the human liver X receptor alpha promoter. *Mol Cell Biol* 21, 7558-7568.
 133. Lanz, R. B., Chua, S. S., Barron, N., Soder, B. M., DeMayo, F., and O'Malley, B. W., 2003. Steroid receptor RNA activator stimulates proliferation as well as apoptosis in vivo. *Mol Cell Biol* 23, 7163-7176.
 134. Lapchak, P. A., Chapman, D. F., Nunez, S. Y., and Zivin, J. A., 2000. Dehydroepiandrosterone sulfate is neuroprotective in a reversible spinal cord ischemia model: possible involvement of GABA(A) receptors. *Stroke* 31, 1953-1956; discussion 1957.
 135. Larcher, J. C., Vayssiere, J. L., Le Marquer, F. J., Cordeau, L. R., Keane, P. E., Bachy, A., Gros, F., and Croizat, B. P., 1989. Effects of peripheral benzodiazepines upon the O₂ consumption of neuroblastoma cells. *Eur J Pharmacol* 161, 197-202.
 136. Lauria, G., Lombardi, R., Borgna, M., Penza, P., Bianchi, R., Savino, C., Canta, A., Nicolini, G., Marmiroli, P., and Cavaletti, G., 2005. Intraepidermal nerve fiber density in rat foot pad: neuropathologic-neurophysiologic correlation. *J Peripher Nerv Syst* 10, 202-208.

137. Lavaque, E., Sierra, A., Azcoitia, I., and Garcia-Segura, L. M., 2006. Steroidogenic acute regulatory protein in the brain. *Neuroscience* 138, 741-747.
138. Le Fur, G., Vaucher, N., Perrier, M. L., Flamier, A., Benavides, J., Renault, C., Dubroeuq, M. C., Gueremy, C., and Uzan, A., 1983. Differentiation between two ligands for peripheral benzodiazepine binding sites, [3H]RO5-4864 and [3H]PK 11195, by thermodynamic studies. *Life Sci* 33, 449-457.
139. Le Goascogne, C., Robel, P., Gouezou, M., Sananes, N., Baulieu, E. E., and Waterman, M., 1987. Neurosteroids: cytochrome P-450_{sec} in rat brain. *Science* 237, 1212-1215.
140. Lehmann, J. M., Kliewer, S. A., Moore, L. B., Smith-Oliver, T. A., Oliver, B. B., Su, J. L., Sundseth, S. S., Winegar, D. A., Blanchard, D. E., Spencer, T. A., and Willson, T. M., 1997. Activation of the nuclear receptor LXR by oxysterols defines a new hormone response pathway. *J Biol Chem* 272, 3137-3140.
141. Leininger, G. M., Backus, C., Sastry, A. M., Yi, Y. B., Wang, C. W., and Feldman, E. L., 2006. Mitochondria in DRG neurons undergo hyperglycemic mediated injury through Bim, Bax and the fission protein Drp1. *Neurobiol Dis* 23, 11-22.
142. Leininger, G. M., Edwards, J. L., Lipshaw, M. J., and Feldman, E. L., 2006. Mechanisms of disease: mitochondria as new therapeutic targets in diabetic neuropathy. *Nat Clin Pract Neurol* 2, 620-628.
143. Leonelli, E., Bianchi, R., Cavaletti, G., Caruso, D., Crippa, D., Garcia-Segura, L. M., Lauria, G., Magnaghi, V., Roglio, I., and Melcangi, R. C., 2007. Progesterone and its derivatives are neuroprotective agents in experimental diabetic neuropathy: a multimodal analysis. *Neuroscience* 144, 1293-1304.
144. Leonelli, E., Yague, J. G., Ballabio, M., Azcoitia, I., Magnaghi, V., Schumacher, M., Garcia-Segura, L. M., and Melcangi, R. C., 2005. RO5-4864, a synthetic ligand of peripheral benzodiazepine receptor, reduces aging-associated myelin degeneration in the sciatic nerve of male rats. *Mech Ageing Dev* 126, 1159-1163.
145. Lephart, E. D., 1996. A review of brain aromatase cytochrome P450. *Brain Res Brain Res Rev* 22, 1-26.
146. Li, A. C., and Glass, C. K., 2004. PPAR- and LXR-dependent pathways controlling lipid metabolism and the development of atherosclerosis. *J Lipid Res* 45, 2161-2173.
147. Li, H., Degenhardt, B., Tobin, D., Yao, Z. X., Tasken, K., and Papadopoulos, V., 2001a. Identification, localization, and function in steroidogenesis of PAP7: a peripheral-type benzodiazepine receptor- and PKA (RI α)-associated protein. *Mol Endocrinol* 15, 2211-2228.
148. Li, H., and Papadopoulos, V., 1998. Peripheral-type benzodiazepine receptor function in cholesterol transport. Identification of a putative cholesterol recognition/interaction amino acid sequence and consensus pattern. *Endocrinology* 139, 4991-4997.
149. Li, H., Yao, Z., Degenhardt, B., Teper, G., and Papadopoulos, V., 2001b. Cholesterol binding at the cholesterol recognition/ interaction amino acid consensus (CRAC) of the peripheral-type benzodiazepine receptor and inhibition of steroidogenesis by an HIV TAT-CRAC peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 1267-1272.

150. Love, D. C., and Hanover, J. A., 2005. The hexosamine signaling pathway: deciphering the "O-GlcNAc code". *Sci STKE* 2005, re13.
151. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-275.
152. Lu, T. T., Repa, J. J., and Mangelsdorf, D. J., 2001. Orphan nuclear receptors as eLiXIRs and FiXeRs of sterol metabolism. *J Biol Chem* 276, 37735-37738.
153. Lubischer, J. L., and Bebinger, D. M., 1999. Regulation of terminal Schwann cell number at the adult neuromuscular junction. *J Neurosci* 19, RC46.
154. Magnaghi, V., Ballabio, M., Cavarretta, I. T., Froestl, W., Lambert, J. J., Zucchi, I., and Melcangi, R. C., 2004. GABAB receptors in Schwann cells influence proliferation and myelin protein expression. *Eur J Neurosci* 19, 2641-2649.
155. Magnaghi, V., Ballabio, M., Gonzalez, L. C., Leonelli, E., Motta, M., and Melcangi, R. C., 2004. The synthesis of glycoprotein Po and peripheral myelin protein 22 in sciatic nerve of male rats is modulated by testosterone metabolites. *Brain Res Mol Brain Res* 126, 67-73.
156. Magnaghi, V., Ballabio, M., Roglio, I., and Melcangi, R. C., 2007. Progesterone derivatives increase expression of Krox-20 and Sox-10 in rat Schwann cells. *J Mol Neurosci* 31, 149-157.
157. Magnaghi, V., Cavarretta, I., Galbiati, M., Martini, L., and Melcangi, R. C., 2001. Neuroactive steroids and peripheral myelin proteins. *Brain Res Brain Res Rev* 37, 360-371.
158. Magnaghi, V., Cavarretta, I., Zucchi, I., Susani, L., Rupprecht, R., Hermann, B., Martini, L., and Melcangi, R. C., 1999. Po gene expression is modulated by androgens in the sciatic nerve of adult male rats. *Mol Brain Res*. 70, 36-44.
159. Majewska, M. D., 1992. Neurosteroids: endogenous bimodal modulators of the GABAA receptor. Mechanism of action and physiological significance. *Prog Neurobiol* 38, 379-395.
160. Mao, X., and Barger, S. W., 1998. Neuroprotection by dehydroepiandrosterone-sulfate: role of an NFkappaB-like factor. *Neuroreport* 9, 759-763.
161. Marino, J. P., Jr., Kallander, L. S., Ma, C., Oh, H. J., Lee, D., Gaitanopoulos, D. E., Krawiec, J. A., Parks, D. J., Webb, C. L., Ziegler, K., Jaye, M., and Thompson, S. K., 2009. The discovery of tertiary-amine LXR agonists with potent cholesterol efflux activity in macrophages. *Bioorg Med Chem Lett* 19, 5617-5621.
162. Maurice, T., Gregoire, C., and Espallergues, J., 2006. Neuro(active)steroids actions at the neuromodulatory sigma1 (sigma1) receptor: biochemical and physiological evidences, consequences in neuroprotection. *Pharmacol Biochem Behav* 84, 581-597.
163. Maurice, T., Phan, V. L., Urani, A., Kamei, H., Noda, Y., and Nabeshima, T., 1999. Neuroactive neurosteroids as endogenous effectors for the sigma1 (sigma1) receptor: pharmacological evidence and therapeutic opportunities. *Jpn J Pharmacol* 81, 125-155.
164. McEnery, M. W., Snowman, A. M., Trifiletti, R. R., and Snyder, S. H., 1992. Isolation of the mitochondrial benzodiazepine receptor: association with the

- voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide carrier. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 3170-3174.
165. McKenna, N. J., Lanz, R. B., and O'Malley, B. W., 1999. Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr Rev* 20, 321-344.
 166. Melcangi, R. C., Azcoitia, I., Ballabio, M., Cavarretta, I., Gonzalez, L. C., Leonelli, E., Magnaghi, V., Veiga, S., and Garcia-Segura, L. M., 2003b. Neuroactive steroids influence peripheral myelination: a promising opportunity for preventing or treating age-dependent dysfunctions of peripheral nerves. *Prog Neurobiol* 71, 57-66.
 167. Melcangi, R. C., Cavarretta, I. T., Ballabio, M., Leonelli, E., Schenone, A., Azcoitia, I., Miguel Garcia-Segura, L., and Magnaghi, V., 2005. Peripheral nerves: a target for the action of neuroactive steroids. *Brain Res Brain Res Rev* 48, 328-338.
 168. Melcangi, R. C., Celotti, F., Ballabio, M., Poletti, A., Castano, P., and Martini, L., 1988. Testosterone 5 alpha-reductase activity in the rat brain is highly concentrated in white matter structures and in purified myelin sheaths of axons. *J Steroid Biochem* 31, 173-179.
 169. Melcangi, R. C., Celotti, F., Ballabio, M., Poletti, A., and Martini, L., 1990. Testosterone metabolism in peripheral nerves: presence of the 5 alpha-reductase-3 alpha-hydroxysteroid-dehydrogenase enzymatic system in the sciatic nerve of adult and aged rats. *J Steroid Biochem* 35, 145-148.
 170. Melcangi, R. C., and Garcia-Segura, L. M., 2006a. Therapeutic approaches to peripheral neuropathy based on neuroactive steroids. *Expert Rev Neurother* 6, 1121-1125.
 171. Melcangi, R. C., Garcia-Segura, L. M., and Mensah-Nyagan, A. G., 2008. Neuroactive steroids: state of the art and new perspectives. *Cell Mol Life Sci* 65, 777-797.
 172. Melcangi, R. C., Leonelli, E., Magnaghi, V., Gherardi, G., Nobbio, L., and Schenone, A., 2003a. Mifepristone (RU 38486) influences expression of glycoprotein Po and morphological parameters at the level of rat sciatic nerve: in vivo observations. *Exp Neurol* 184, 930-938.
 173. Melcangi, R. C., Magnaghi, V., Cavarretta, I., Martini, L., and Piva, F., 1998a. Age-induced decrease of glycoprotein Po and myelin basic protein gene expression in the rat sciatic nerve. Repair by steroid derivatives. *Neuroscience* 85, 569-578.
 174. Melcangi, R. C., Magnaghi, V., Cavarretta, I., Zucchi, I., Bovolin, P., D'Urso, D., and Martini, L., 1999. Progesterone derivatives are able to influence peripheral myelin protein 22 and Po gene expression: possible mechanisms of action. *J Neurosci Res* 56, 349-357.
 175. Melcangi, R. C., Magnaghi, V., Galbiati, M., Ghelarducci, B., Sebastiani, L., and Martini, L., 2000b. The action of steroid hormones on peripheral myelin proteins: a possible new tool for the rebuilding of myelin? *J Neurocytol* 29, 327-339.
 176. Melcangi, R. C., Magnaghi, V., Galbiati, M., and Martini, L., 2001a. Glial cells: a target for steroid hormones. *Prog Brain Res* 132, 31-40.
 177. Melcangi, R. C., Magnaghi, V., Galbiati, M., and Martini, L., 2001b. Formation and effects of neuroactive steroids in the central and peripheral nervous system. *Int Rev Neurobiol* 46, 145-176.

178. Melcangi, R. C., Magnaghi, V., and Martini, L., 2000a. Aging in peripheral nerves: regulation of myelin protein genes by steroid hormones. *Prog Neurobiol* 60, 291-308.
179. Melcangi, R. C., and Panzica, G. C., 2006b. Neuroactive steroids: old players in a new game. *Neuroscience* 138, 733-739.
180. Mellon, S. H., Griffin, L. D., and Compagnone, N. A., 2001. Biosynthesis and action of neurosteroids. *Brain Res Brain Res Rev* 37, 3-12.
181. Mensah-Nyagan, A. G., Do-Rego, J. L., Beaujean, D., Luu-The, V., Pelletier, G., and Vaudry, H., 1999. Neurosteroids: expression of steroidogenic enzymes and regulation of steroid biosynthesis in the central nervous system. *Pharmacol Rev* 51, 63-81.
182. Mercier, G., Turque, N., and Schumacher, M., 2001. Early activation of transcription factor expression in Schwann cells by progesterone. *Brain Res Mol Brain Res* 97, 137-148.
183. Miao, B., Zondlo, S., Gibbs, S., Cromley, D., Hosagrahara, V. P., Kirchgessner, T. G., Billheimer, J., and Mukherjee, R., 2004. Raising HDL cholesterol without inducing hepatic steatosis and hypertriglyceridemia by a selective LXR modulator. *J Lipid Res* 45, 1410-1417.
184. Mills, C., Makwana, M., Wallace, A., Benn, S., Schmidt, H., Tegeder, I., Costigan, M., Brown, R. H., Jr., Raivich, G., and Woolf, C. J., 2008. Ro5-4864 promotes neonatal motor neuron survival and nerve regeneration in adult rats. *Eur J Neurosci* 27, 937-946.
185. Mills, C. D., Bitler, J. L., and Woolf, C. J., 2005. Role of the peripheral benzodiazepine receptor in sensory neuron regeneration. *Mol Cell Neurosci* 30, 228-237.
186. Minchenko, A. G., Stevens, M. J., White, L., Abatan, O. I., Komjati, K., Pacher, P., Szabo, C., and Obrosova, I. G., 2003. Diabetes-induced overexpression of endothelin-1 and endothelin receptors in the rat renal cortex is mediated via poly(ADP-ribose) polymerase activation. *FASEB J* 17, 1514-1516.
187. Mirescu, C., Peters, J. D., and Gould, E., 2004. Early life experience alters response of adult neurogenesis to stress. *Nat Neurosci* 7, 841-846.
188. Mitro, N., Mak, P. A., Vargas, L., Godio, C., Hampton, E., Molteni, V., Kreuzsch, A., and Saez, E., 2007. The nuclear receptor LXR is a glucose sensor. *Nature* 445, 219-223.
189. Monnet, F. P., Mahe, V., Robel, P., and Baulieu, E. E., 1995. Neurosteroids, via sigma receptors, modulate the [³H]norepinephrine release evoked by N-methyl-D-aspartate in the rat hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 3774-3778.
190. Moreira, P. I., Santos, M. S., Seica, R., and Oliveira, C. R., 2007. Brain mitochondrial dysfunction as a link between Alzheimer's disease and diabetes. *J Neurol Sci* 257, 206-214.
191. Morris, J. A., Jordan, C. L., and Breedlove, S. M., 2004. Sexual differentiation of the vertebrate nervous system. *Nat Neurosci* 7, 1034-1039.
192. Naftolin, F., Ryan, K. J., and Petro, Z., 1972. Aromatization of androstenedione by the anterior hypothalamus of adult male and female rats. *Endocrinology* 90, 295-298.
193. Nagamatsu, M., Nickander, K. K., Schmelzer, J. D., Raya, A., Wittrock, D. A., Tritschler, H., and Low, P. A., 1995. Lipoic acid improves nerve blood

- flow, reduces oxidative stress, and improves distal nerve conduction in experimental diabetic neuropathy. *Diabetes Care* 18, 1160-1167.
194. Naruse, K., Rask-Madsen, C., Takahara, N., Ha, S. W., Suzuma, K., Way, K. J., Jacobs, J. R., Clermont, A. C., Ueki, K., Ohshiro, Y., Zhang, J., Goldfine, A. B., and King, G. L., 2006. Activation of vascular protein kinase C-beta inhibits Akt-dependent endothelial nitric oxide synthase function in obesity-associated insulin resistance. *Diabetes* 55, 691-698.
 195. Natarajan, R., and Nadler, J. L., 2003. Lipoxygenases and lipid signaling in vascular cells in diabetes. *Front Biosci* 8, s783-795.
 196. Neeper, M., Schmidt, A. M., Brett, J., Yan, S. D., Wang, F., Pan, Y. C., Elliston, K., Stern, D., and Shaw, A., 1992. Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. *J Biol Chem* 267, 14998-15004.
 197. O'Hara, M. F., Charlap, J. H., Craig, R. C., and Knudsen, T. B., 2002. Mitochondrial transduction of ocular teratogenesis during methylmercury exposure. *Teratology* 65, 131-144.
 198. O'Hara, M. F., Nibbio, B. J., Craig, R. C., Nemeth, K. R., Charlap, J. H., and Knudsen, T. B., 2003. Mitochondrial benzodiazepine receptors regulate oxygen homeostasis in the early mouse embryo. *Reprod Toxicol* 17, 365-375.
 199. Oates, P. J., 2008. Aldose reductase, still a compelling target for diabetic neuropathy. *Curr Drug Targets* 9, 14-36.
 200. Obrosova, I. G., 2002rev. How does glucose generate oxidative stress in peripheral nerve? *Int Rev Neurobiol* 50, 3-35.
 201. Obrosova, I. G., 2009. Diabetes and the peripheral nerve. *Biochim Biophys Acta* 1792, 931-940.
 202. Obrosova, I. G., Drel, V. R., Oltman, C. L., Mashtalir, N., Tibrewala, J., Groves, J. T., and Yorek, M. A., 2007. Role of nitrosative stress in early neuropathy and vascular dysfunction in streptozotocin-diabetic rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293, E1645-1655.
 203. Obrosova, I. G., Drel, V. R., Pacher, P., Ilnytska, O., Wang, Z. Q., Stevens, M. J., and Yorek, M. A., 2005. Oxidative-nitrosative stress and poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) activation in experimental diabetic neuropathy: the relation is revisited. *Diabetes* 54, 3435-3441.
 204. Obrosova, I. G., Fathallah, L., and Stevens, M. J., 2001. Taurine counteracts oxidative stress and nerve growth factor deficit in early experimental diabetic neuropathy. *Exp Neurol* 172, 211-219.
 205. Obrosova, I. G., Li, F., Abatan, O. I., Forsell, M. A., Komjati, K., Pacher, P., Szabo, C., and Stevens, M. J., 2004. Role of poly(ADP-ribose) polymerase activation in diabetic neuropathy. *Diabetes* 53, 711-720.
 206. Obrosova, I. G., Van Huysen, C., Fathallah, L., Cao, X., Stevens, M. J., and Greene, D. A., 2000. Evaluation of alpha(1)-adrenoceptor antagonist on diabetes-induced changes in peripheral nerve function, metabolism, and antioxidative defense. *FASEB J* 14, 1548-1558.
 207. Obrosova, I. G., Van Huysen, C., Fathallah, L., Cao, X. C., Greene, D. A., and Stevens, M. J., 2002. An aldose reductase inhibitor reverses early diabetes-induced changes in peripheral nerve function, metabolism, and antioxidative defense. *FASEB J* 16, 123-125.

208. Oke, B. O., Suarez-Quian, C. A., Riond, J., Ferrara, P., and Papadopoulos, V., 1992. Cell surface localization of the peripheral-type benzodiazepine receptor (PBR) in adrenal cortex. *Mol Cell Endocrinol* 87, R1-6.
209. Olson, J. M., Ciliax, B. J., Mancini, W. R., and Young, A. B., 1988. Presence of peripheral-type benzodiazepine binding sites on human erythrocyte membranes. *Eur J Pharmacol* 152, 47-53.
210. Oonk, R. B., Parker, K. L., Gibson, J. L., and Richards, J. S., 1990. Rat cholesterol side-chain cleavage cytochrome P-450 (P-450_{sc}) gene. Structure and regulation by cAMP in vitro. *J Biol Chem* 265, 22392-22401.
211. Ostuni, M. A., Marazova, K., Peranzi, G., Vidic, B., Papadopoulos, V., Ducroc, R., and Lacapere, J. J., 2004. Functional characterization and expression of PBR in rat gastric mucosa: stimulation of chloride secretion by PBR ligands. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 286, G1069-1080.
212. Pak, T. R., Chung, W. C., Lund, T. D., Hinds, L. R., Clay, C. M., and Handa, R. J., 2005. The androgen metabolite, 5 α -androstane-3 β , 17 β -diol, is a potent modulator of estrogen receptor-beta1-mediated gene transcription in neuronal cells. *Endocrinology* 146, 147-155.
213. Papadopoulos, V., Amri, H., Boujrad, N., Cascio, C., Culty, M., Garnier, M., Hardwick, M., Li, H., Vidic, B., Brown, A. S., Reversa, J. L., Bernassau, J. M., and Drieu, K., 1997. Peripheral benzodiazepine receptor in cholesterol transport and steroidogenesis. *Steroids* 62, 21-28.
214. Papadopoulos, V., Amri, H., Li, H., Yao, Z., Brown, R. C., Vidic, B., and Culty, M., 2001. Structure, function and regulation of the mitochondrial peripheral-type benzodiazepine receptor. *Therapie* 56, 549-556.
215. Papadopoulos, V., Baraldi, M., Guilarte, T. R., Knudsen, T. B., Lacapere, J. J., Lindemann, P., Norenberg, M. D., Nutt, D., Weizman, A., Zhang, M. R., and Gavish, M., 2006. Translocator protein (18kDa): new nomenclature for the peripheral-type benzodiazepine receptor based on its structure and molecular function. *Trends Pharmacol Sci* 27, 402-409.
216. Papadopoulos, V., Lecanu, L., Brown, R. C., Han, Z., and Yao, Z. X., 2006. Peripheral-type benzodiazepine receptor in neurosteroid biosynthesis, neuropathology and neurological disorders. *Neuroscience* 138, 749-756.
217. Parducz, A., Hoyk, Z., Kis, Z., and Garcia-Segura, L. M., 2002. Hormonal enhancement of neuronal firing is linked to structural remodelling of excitatory and inhibitory synapses. *Eur J Neurosci* 16, 665-670.
218. Patte-Mensah, C., Penning, T. M., and Mensah-Nyagan, A. G., 2004. Anatomical and cellular localization of neuroactive 5 α /3 α -reduced steroid-synthesizing enzymes in the spinal cord. *J Comp Neurol* 477, 286-299.
219. Paul, S. M., and Purdy, R. H., 1992. Neuroactive steroids. *FASEB J* 6, 2311-2322.
220. Pawlowski, J. E., Huizinga, M., and Penning, T. M., 1991. Cloning and sequencing of the cDNA for rat liver 3 α -hydroxysteroid/dihydrodiol dehydrogenase. *J Biol Chem* 266, 8820-8825.
221. Pedigo, N. W., Schoemaker, H., Morelli, M., McDougal, J. N., Malick, J. B., Burks, T. F., and Yamamura, H. I., 1981. Benzodiazepine receptor binding in young, mature and senescent rat brain and kidney. *Neurobiol Aging* 2, 83-88.
222. Peet, D. J., Turley, S. D., Ma, W., Janowski, B. A., Lobaccaro, J. M., Hammer, R. E., and Mangelsdorf, D. J., 1998. Cholesterol and bile acid

- metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Cell* 93, 693-704.
223. Penning, T. M., Jin, Y., Heredia, V. V., and Lewis, M., 2003. Structure-function relationships in 3alpha-hydroxysteroid dehydrogenases: a comparison of the rat and human isoforms. *J Steroid Biochem Mol Biol* 85, 247-255.
 224. Pesaresi, M., Maschi, O., Giatti, S., Garcia-Segura, L. M., Caruso, D., and Melcangi, R. C., 2009. Sex differences in neuroactive steroid levels in the nervous system of diabetic and non-diabetic rats. *Horm Behav* 57, 46-55.
 225. Pesaresi, M., Maschi, O., Giatti, S., Garcia-Segura, L. M., Caruso, D., and Melcangi, R. C., 2010. Sex differences in neuroactive steroid levels in the nervous system of diabetic and non-diabetic rats. *Horm Behav* 57, 46-55.
 226. Plassart-Schiess, E., and Baulieu, E. E., 2001. Neurosteroids: recent findings. *Brain Res Brain Res Rev* 37, 133-140.
 227. Poletti, A., Celotti, F., Rumio, C., Rabuffetti, M., and Martini, L., 1997. Identification of type 1 5alpha-reductase in myelin membranes of male and female rat brain. *Mol Cell Endocrinol* 129, 181-190.
 228. Pop-Busui, R., Marinescu, V., Van Huysen, C., Li, F., Sullivan, K., Greene, D. A., Larkin, D., and Stevens, M. J., 2002. Dissection of metabolic, vascular, and nerve conduction interrelationships in experimental diabetic neuropathy by cyclooxygenase inhibition and acetyl-L-carnitine administration. *Diabetes* 51, 2619-2628.
 229. Pozzi, P., Bendotti, C., Simeoni, S., Piccioni, F., Guerini, V., Marron, T. U., Martini, L., and Poletti, A., 2003. Androgen 5-alpha-reductase type 2 is highly expressed and active in rat spinal cord motor neurones. *J Neuroendocrinol* 15, 882-887.
 230. Purves, T., Middlemas, A., Agthong, S., Jude, E. B., Boulton, A. J., Fernyhough, P., and Tomlinson, D. R., 2001. A role for mitogen-activated protein kinases in the etiology of diabetic neuropathy. *FASEB J* 15, 2508-2514.
 231. Quasthoff, S., and Hartung, H. P., 2002. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *J Neurol* 249, 9-17.
 232. Radley, J. J., and Morrison, J. H., 2005. Repeated stress and structural plasticity in the brain. *Ageing Res Rev* 4, 271-287.
 233. Reilly, K. B., Srinivasan, S., Hatley, M. E., Patricia, M. K., Lannigan, J., Bolick, D. T., Vandenhoff, G., Pei, H., Natarajan, R., Nadler, J. L., and Hedrick, C. C., 2004. 12/15-Lipoxygenase activity mediates inflammatory monocyte/endothelial interactions and atherosclerosis in vivo. *J Biol Chem* 279, 9440-9450.
 234. Repa, J. J., Berge, K. E., Pomajzl, C., Richardson, J. A., Hobbs, H., and Mangelsdorf, D. J., 2002a. Regulation of ATP-binding cassette sterol transporters ABCG5 and ABCG8 by the liver X receptors alpha and beta. *J Biol Chem* 277, 18793-18800.
 235. Repa, J. J., Liang, G., Ou, J., Bashmakov, Y., Lobaccaro, J. M., Shimomura, I., Shan, B., Brown, M. S., Goldstein, J. L., and Mangelsdorf, D. J., 2000c. Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta. *Genes Dev* 14, 2819-2830.

236. Repa, J. J., and Mangelsdorf, D. J., 2000b. The role of orphan nuclear receptors in the regulation of cholesterol homeostasis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16, 459-481.
237. Repa, J. J., and Mangelsdorf, D. J., 2002b. The liver X receptor gene team: potential new players in atherosclerosis. *Nat Med* 8, 1243-1248.
238. Rodriguez-Waitkus, P. M., Lafollette, A. J., Ng, B. K., Zhu, T. S., Conrad, H. E., and Glaser, M., 2003. Steroid hormone signaling between Schwann cells and neurons regulates the rate of myelin synthesis. *Ann N Y Acad Sci* 1007, 340-348.
239. Roglio, I., Bianchi, R., Camozzi, F., Carozzi, V., Cervellini, I., Crippa, D., Lauria, G., Cavaletti, G., and Melcangi, R. C., 2009. Docetaxel-induced peripheral neuropathy: protective effects of dihydroprogesterone and progesterone in an experimental model. *J Peripher Nerv Syst* 14, 36-44.
240. Roglio, I., Bianchi, R., Giatti, S., Cavaletti, G., Caruso, D., Scurati, S., Crippa, D., Garcia-Segura, L. M., Camozzi, F., Lauria, G., and Melcangi, R. C., 2007. Testosterone derivatives are neuroprotective agents in experimental diabetic neuropathy. *Cell Mol Life Sci* 64, 1158-1168.
241. Roglio, I., Bianchi, R., Gotti, S., Scurati, S., Giatti, S., Pesaresi, M., Caruso, D., Panzica, G. C., and Melcangi, R. C., 2008. Neuroprotective effects of dihydroprogesterone and progesterone in an experimental model of nerve crush injury. *Neuroscience* 155, 673-685.
242. Rone, M. B., Fan, J., and Papadopoulos, V., 2009. Cholesterol transport in steroid biosynthesis: role of protein-protein interactions and implications in disease states. *Biochim Biophys Acta* 1791, 646-658.
243. Roselli, C. E., and Fasasi, T. A., 1992. Estradiol increases the duration of nuclear androgen receptor occupation in the preoptic area of the male rat treated with dihydrotestosterone. *J Steroid Biochem Mol Biol* 42, 161-168.
244. Roselli, C. E., Horton, L. E., and Resko, J. A., 1985. Distribution and regulation of aromatase activity in the rat hypothalamus and limbic system. *Endocrinology* 117, 2471-2477.
245. Roselli, C. E., Horton, L. E., and Resko, J. A., 1987. Time-course and steroid specificity of aromatase induction in rat hypothalamus-preoptic area. *Biol Reprod* 37, 628-633.
246. Ross, S. E., Erickson, R. L., Gerin, I., DeRose, P. M., Bajnok, L., Longo, K. A., Misek, D. E., Kuick, R., Hanash, S. M., Atkins, K. B., Andresen, S. M., Nebb, H. I., Madsen, L., Kristiansen, K., and MacDougald, O. A., 2002. Microarray analyses during adipogenesis: understanding the effects of Wnt signaling on adipogenesis and the roles of liver X receptor alpha in adipocyte metabolism. *Mol Cell Biol* 22, 5989-5999.
247. Roytta, M., Horwitz, S. B., and Raine, C. S., 1984. Taxol-induced neuropathy: short-term effects of local injection. *J Neurocytol* 13, 685-701.
248. Russell, J. W., Berent-Spillson, A., Vincent, A. M., Freimann, C. L., Sullivan, K. A., and Feldman, E. L., 2008. Oxidative injury and neuropathy in diabetes and impaired glucose tolerance. *Neurobiol Dis* 30, 420-429.
249. Sahenk, Z., Barohn, R., New, P., and Mendell, J. R., 1994. Taxol neuropathy. Electrodiagnostic and sural nerve biopsy findings. *Arch Neurol* 51, 726-729.
250. Saitoh, H., Hirato, K., Yanaihara, T., and Nakayama, T., 1982. A study of 5 alpha-reductase in human fetal brain. *Endocrinol Jpn* 29, 461-467.
251. Salonia, A., Lanzi, R., Scavini, M., Pontillo, M., Gatti, E., Petrella, G., Licata, G., Nappi, R. E., Bosi, E., Briganti, A., Rigatti, P., and Montorsi, F., 2006.

- Sexual function and endocrine profile in fertile women with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 29, 312-316.
252. Sayeski, P. P., and Kudlow, J. E., 1996. Glucose metabolism to glucosamine is necessary for glucose stimulation of transforming growth factor-alpha gene transcription. *J Biol Chem* 271, 15237-15243.
 253. Scharschmidt, B. F., Keeffe, E. B., Blankenship, N. M., and Ockner, R. K., 1979. Validation of a recording spectrophotometric method for measurement of membrane-associated Mg- and NaK-ATPase activity. *J Lab Clin Med* 93, 790-799.
 254. Schultz, J. R., Tu, H., Luk, A., Repa, J. J., Medina, J. C., Li, L., Schwendner, S., Wang, S., Thoolen, M., Mangelsdorf, D. J., Lustig, K. D., and Shan, B., 2000. Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes Dev* 14, 2831-2838.
 255. Schumacher, M., Guennoun, R., Robert, F., Carelli, C., Gago, N., Ghoumari, A., Gonzalez Deniselle, M. C., Gonzalez, S. L., Ibanez, C., Labombarda, F., Coirini, H., Baulieu, E. E., and De Nicola, A. F., 2004. Local synthesis and dual actions of progesterone in the nervous system: neuroprotection and myelination. *Growth Horm IGF Res* 14 Suppl A, S18-33.
 256. Schumacher, M., Guennoun, R., Stein, D. G., and De Nicola, A. F., 2007. Progesterone: therapeutic opportunities for neuroprotection and myelin repair. *Pharmacol Ther* 116, 77-106.
 257. Serra, M., Madau, P., Chessa, M. F., Caddeo, M., Sanna, E., Trapani, G., Franco, M., Liso, G., Purdy, R. H., Barbaccia, M. L., and Biggio, G., 1999. 2-Phenyl-imidazo[1,2-a]pyridine derivatives as ligands for peripheral benzodiazepine receptors: stimulation of neurosteroid synthesis and anticonflict action in rats. *Br J Pharmacol* 127, 177-187.
 258. Sierra, A., Lavaque, E., Perez-Martin, M., Azcoitia, I., Hales, D. B., and Garcia-Segura, L. M., 2003. Steroidogenic acute regulatory protein in the rat brain: cellular distribution, developmental regulation and overexpression after injury. *Eur J Neurosci* 18, 1458-1467.
 259. Sima, A. A., and Sugimoto, K., 1999. Experimental diabetic neuropathy: an update. *Diabetologia* 42, 773-788.
 260. Simard, J., Durocher, F., Mebarki, F., Turgeon, C., Sanchez, R., Labrie, Y., Couet, J., Trudel, C., Rheume, E., Morel, Y., Luu-The, V., and Labrie, F., 1996. Molecular biology and genetics of the 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta5-delta4 isomerase gene family. *J Endocrinol* 150 Suppl, S189-207.
 261. Snyder, S. H., Verma, A., and Trifiletti, R. R., 1987. The peripheral-type benzodiazepine receptor: a protein of mitochondrial outer membranes utilizing porphyrins as endogenous ligands. *FASEB J* 1, 282-288.
 262. Song, C., Kokontis, J. M., Hiipakka, R. A., and Liao, S., 1994. Ubiquitous receptor: a receptor that modulates gene activation by retinoic acid and thyroid hormone receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 10809-10813.
 263. Sousa, N., Lukoyanov, N. V., Madeira, M. D., Almeida, O. F., and Paula-Barbosa, M. M., 2000. Reorganization of the morphology of hippocampal neurites and synapses after stress-induced damage correlates with behavioral improvement. *Neuroscience* 97, 253-266.
 264. Stevens, M. J., Obrosova, I., Cao, X., Van Huysen, C., and Greene, D. A., 2000. Effects of DL-alpha-lipoic acid on peripheral nerve conduction, blood flow, energy metabolism, and oxidative stress in experimental diabetic neuropathy. *Diabetes* 49, 1006-1015.

265. Stoffel-Wagner, B., 2001. Neurosteroid metabolism in the human brain. *Eur J Endocrinol* 145, 669-679.
266. Stoffel-Wagner, B., 2003. Neurosteroid biosynthesis in the human brain and its clinical implications. *Ann N Y Acad Sci* 1007, 64-78.
267. Stratton, I. M., Adler, A. I., Neil, H. A., Matthews, D. R., Manley, S. E., Cull, C. A., Hadden, D., Turner, R. C., and Holman, R. R., 2000. Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study. *BMJ* 321, 405-412.
268. Sugimoto, K., Murakawa, Y., and Sima, A. A., 2000. Diabetic neuropathy--a continuing enigma. *Diabetes Metab Res Rev* 16, 408-433.
269. Suzuki, T., Sekido, H., Kato, N., Nakayama, Y., and Yabe-Nishimura, C., 2004. Neurotrophin-3-induced production of nerve growth factor is suppressed in Schwann cells exposed to high glucose: involvement of the polyol pathway. *J Neurochem* 91, 1430-1438.
270. Svenningsen, F. A., and Kanje, M., 1999. Estrogen and progesterone stimulate Schwann cell proliferation in a sex- and age-dependent manner. *J Neurosci Res* 57, 124-130.
271. Taketani, S., Kohno, H., Furukawa, T., and Tokunaga, R., 1995. Involvement of peripheral-type benzodiazepine receptors in the intracellular transport of heme and porphyrins. *J Biochem* 117, 875-880.
272. Thornalley, P. J., 2002. Glycation in diabetic neuropathy: characteristics, consequences, causes, and therapeutic options. *Int Rev Neurobiol* 50, 37-57.
273. Thornalley, P. J., 2005. The potential role of thiamine (vitamin B1) in diabetic complications. *Curr Diabetes Rev* 1, 287-298.
274. Torres, S. R., Frode, T. S., Nardi, G. M., Vita, N., Reeb, R., Ferrara, P., Ribeiro-do-Valle, R. M., and Farges, R. C., 2000. Anti-inflammatory effects of peripheral benzodiazepine receptor ligands in two mouse models of inflammation. *Eur J Pharmacol* 408, 199-211.
275. Trapani, G., Laquintana, V., Denora, N., Trapani, A., Lopodota, A., Latrofa, A., Franco, M., Serra, M., Pisu, M. G., Floris, I., Sanna, E., Biggio, G., and Liso, G., 2005. Structure-activity relationships and effects on neuroactive steroid synthesis in a series of 2-phenylimidazo[1,2-a]pyridineacetamide peripheral benzodiazepine receptors ligands. *J Med Chem* 48, 292-305.
276. Tredici, G., Tredici, S., Fabbrica, D., Minoia, C., and Cavaletti, G., 1998. Experimental cisplatin neuronopathy in rats and the effect of retinoic acid administration. *J Neurooncol* 36, 31-40.
277. Trojnar, M. K., Malek, R., Chroscinska, M., Nowak, S., Blaszczyk, B., and Czuczwar, S. J., 2002. Neuroprotective effects of antiepileptic drugs. *Pol J Pharmacol* 54, 557-566.
278. Ulven, S. M., Dalen, K. T., Gustafsson, J. A., and Nebb, H. I., 2005. LXR is crucial in lipid metabolism. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 73, 59-63.
279. Vajda, F. J., 2002. Neuroprotection and neurodegenerative disease. *J Clin Neurosci* 9, 4-8.
280. Veiga, S., Garcia-Segura, L. M., and Azcoitia, I., 2003. Neuroprotection by the steroids pregnenolone and dehydroepiandrosterone is mediated by the enzyme aromatase. *J Neurobiol* 56, 398-406.

281. Veiga, S., Leonelli, E., Beelke, M., Garcia-Segura, L. M., and Melcangi, R. C., 2006. Neuroactive steroids prevent peripheral myelin alterations induced by diabetes. *Neurosci Lett* 402, 150-153.
282. Venturini, I., Zeneroli, M. L., Corsi, L., Avallone, R., Farina, F., Alho, H., Baraldi, C., Ferrarese, C., Pecora, N., Frigo, M., Ardizzone, G., Arrigo, A., Pellicci, R., and Baraldi, M., 1998. Up-regulation of peripheral benzodiazepine receptor system in hepatocellular carcinoma. *Life Sci* 63, 1269-1280.
283. Veves, A., and King, G. L., 2001. Can VEGF reverse diabetic neuropathy in human subjects? *J Clin Invest* 107, 1215-1218.
284. Vincent, A. M., Brownlee, M., and Russell, J. W., 2002. Oxidative stress and programmed cell death in diabetic neuropathy. *Ann N Y Acad Sci* 959, 368-383.
285. Vinik, A. I., Park, T. S., Stansberry, K. B., and Pittenger, G. L., 2000. Diabetic neuropathies. *Diabetologia* 43, 957-973.
286. Vyas, A., Pillai, A. G., and Chattarji, S., 2004. Recovery after chronic stress fails to reverse amygdaloid neuronal hypertrophy and enhanced anxiety-like behavior. *Neuroscience* 128, 667-673.
287. Wada, R., and Yagihashi, S., 2005. Role of advanced glycation end products and their receptors in development of diabetic neuropathy. *Ann N Y Acad Sci* 1043, 598-604.
288. Wang, L., Schuster, G. U., Hultenby, K., Zhang, Q., Andersson, S., and Gustafsson, J. A., 2002. Liver X receptors in the central nervous system: from lipid homeostasis to neuronal degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 13878-13883.
289. Weill-Engerer, S., David, J. P., Sazdovitch, V., Liere, P., Eychenne, B., Pianos, A., Schumacher, M., Delacourte, A., Baulieu, E. E., and Akwa, Y., 2002. Neurosteroid quantification in human brain regions: comparison between Alzheimer's and nondemented patients. *J Clin Endocrinol Metab* 87, 5138-5143.
290. Weizman, R., Leschiner, S., Schlegel, W., and Gavish, M., 1997. Peripheral-type benzodiazepine receptor ligands and serum steroid hormones. *Brain Res* 772, 203-208.
291. Williamson, J. R., Chang, K., Frangos, M., Hasan, K. S., Ido, Y., Kawamura, T., Nyengaard, J. R., van den Enden, M., Kilo, C., and Tilton, R. G., 1993. Hyperglycemic pseudohypoxia and diabetic complications. *Diabetes* 42, 801-813.
292. Willy, P. J., Umesono, K., Ong, E. S., Evans, R. M., Heyman, R. A., and Mangelsdorf, D. J., 1995. LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway. *Genes Dev* 9, 1033-1045.
293. Windebank, A. J., and Grisold, W., 2008. Chemotherapy-induced neuropathy. *J Peripher Nerv Syst* 13, 27-46.
294. Wojcicka, G., Jamroz-Wisniewska, A., Horoszewicz, K., and Beltowski, J., 2007. Liver X receptors (LXRs). Part I: structure, function, regulation of activity, and role in lipid metabolism. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 61, 736-759.
295. Wright, G., and Reichenbecher, V., 1999. The effects of superoxide and the peripheral benzodiazepine receptor ligands on the mitochondrial processing of manganese-dependent superoxide dismutase. *Exp Cell Res* 246, 443-450.

296. Writing Team for the Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Research Group, 2002. Effect of intensive therapy on the microvascular complications of type 1 diabetes mellitus. *JAMA* 287, 2563-2569.
297. Wu, F. S., Gibbs, T. T., and Farb, D. H., 1991. Pregnenolone sulfate: a positive allosteric modulator at the N-methyl-D-aspartate receptor. *Mol Pharmacol* 40, 333-336.
298. Yagihashi, S., Yamagishi, S. I., Wada Ri, R., Baba, M., Hohman, T. C., Yabe-Nishimura, C., and Kokai, Y., 2001. Neuropathy in diabetic mice overexpressing human aldose reductase and effects of aldose reductase inhibitor. *Brain* 124, 2448-2458.
299. Yeliseev, A. A., and Kaplan, S., 2000. TspO of rhodobacter sphaeroides. A structural and functional model for the mammalian peripheral benzodiazepine receptor. *J Biol Chem* 275, 5657-5667.
300. Yorek, M. A., Coppey, L. J., Gellett, J. S., Davidson, E. P., Bing, X., Lund, D. D., and Dillon, J. S., 2002. Effect of treatment of diabetic rats with dehydroepiandrosterone on vascular and neural function. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283, E1067-1075.
301. Zatechka, D. S., Jr., Kador, P. F., Garcia-Castineiras, S., and Lou, M. F., 2003. Diabetes can alter the signal transduction pathways in the lens of rats. *Diabetes* 52, 1014-1022.
302. Zavala, F., 1997. Benzodiazepines, anxiety and immunity. *Pharmacol Ther* 75, 199-216.
303. Zhao, H. F., Labrie, C., Simard, J., de Launoit, Y., Trudel, C., Martel, C., Rheume, E., Dupont, E., Luu-The, V., Pelletier, G., and et al., 1991. Characterization of rat 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-delta 4 isomerase cDNAs and differential tissue-specific expression of the corresponding mRNAs in steroidogenic and peripheral tissues. *J Biol Chem* 266, 583-593.
304. Zhu, Y., Bond, J., and Thomas, P., 2003. Identification, classification, and partial characterization of genes in humans and other vertebrates homologous to a fish membrane progestin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 2237-2242.