

Dottorato di Ricerca in
SCIENZE BIOMEDICHE
(Morfologia e Morfogenesi Umana)

CICLO XXVIII

COORDINATORE *Prof. Persio Dello Sbarba*

*Effetti biologici del cadmio sul sistema nervoso centrale umano
e suo ruolo nelle malattie neurodegenerative*

Settore Scientifico Disciplinare BIO/16

Dottorando

Dott. Jacopo Junio Valerio Branca

Tutore

Prof. Massimo Gulisano

Coordinatore

Prof. Persio Dello Sbarba

Anni 2012/2015

INDICE

PREMESSA	2
1 INTRODUZIONE	4
1.1 MALATTIE NEURODEGENERATIVE	4
1.1.1 Malattia di Alzheimer	4
1.1.2 Morbo di Parkinson	9
1.1.3 Disturbi dello Spettro Autistico (DSA)	12
1.2 RISCHIO AMBIENTALE	15
1.2.1 Cadmio (Cd)	18
1.3 MICROGLIA ED INFIAMMAZIONE DEL SNC	26
2 OBIETTIVO DELLA RICERCA	32
3 MATERIALI E METODI	33
3.1 LINEE CELLULARI	33
3.1.1 SH-SY5Y	33
3.1.2 BV-2	35
3.1.3 C13NJ	36
3.2 STIMOLI	38
3.3 SAGGIO DI VITALITÀ CELLULARE (WST-8)	39
3.4 TRYPAN BLUE – PROLIFERAZIONE CELLULARE	41
3.5 MORFOLOGIA CELLULARE	42
3.6 WESTERN BLOTTING	44
3.7 CO-COLTURA NEURONI/MICROGLIA	46
3.8 ANALISI STATISTICA	47
4 RISULTATI	48
4.1 CLORURO DI CADMIO (CdCl₂)	48
4.2 CLORURO DI ZINCO (ZnCl₂)	50
4.3 CANNABIDILOLO (CBD)	56
4.4 SELENITO DI SODIO (Na₂SeO₃)	59
4.5 MICROGLIA MURINA (BV-2)	64
4.6 MICROGLIA UMANA (C13NJ)	69
4.7 CO-COLTURA	74
5 DISCUSSIONE	77
6 CONCLUSIONI	90

PREMESSA

In base a quanto reso noto dal Dipartimento di Sanità Pubblica della Commissione Europea, le malattie neurodegenerative sono comunemente definite come condizioni sporadiche, ereditarie, caratterizzate da una progressiva disfunzione del sistema nervoso (http://ec.europa.eu/health/major_chronic_diseases/diseases/brain_neurological/index_en.htm). Tali disordini sono per lo più associati ad atrofia cellulare a livello del sistema nervoso centrale (SNC) o periferico. Le patologie che colpiscono il SNC sono più di 600 e, tra queste, vi sono la malattia di Alzheimer, il morbo di Parkinson e i disturbi dello spettro autistico (DSA).

Ciò che caratterizza queste patologie è la progressiva perdita di una o più funzioni nervose che portano i soggetti a situazioni altamente invalidanti e che, ad oggi, non risultano ancora efficacemente trattabili.

Secondo le stime redatte dall'Organizzazione Mondiale di Sanità (OMS), le malattie classificate all'interno del "Manuale diagnostico e statistico dei disturbi mentali" (DMS-5) (American Psychiatric Association, 2013. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 5th ed. American Psychiatric Association, Arlington, VA) affliggono circa 36 milioni di persone.

Nell'ambito di questo ampio spettro di patologie, secondo indagini statistiche promosse dall'ISTAT 2013 (<http://dati.istat.it/>) in Italia, i soggetti che soffrono di malattia di Alzheimer sono circa 600.000 quelli affetti da morbo di Parkinson circa 250.000 mentre le stime sono decisamente meno precise per quanto riguarda il numero di soggetti affetti da DSA (infatti solo un soggetto su ottantotto sembra soffrirne).

Questi numeri sono destinati a crescere sia per l'innalzamento dell'età media della popolazione sia a causa dell'eziologia ignota che a sua volta si associa ad una ridotta o assente capacità di prevenzione e trattamenti terapeutici specifici e mirati.

1 INTRODUZIONE

1.1 MALATTIE NEURODEGENERATIVE

1.1.1 Malattia di Alzheimer

Come precedentemente accennato, si stima che nel mondo ci siano circa 35 milioni di persone affette da Alzheimer, con la convinzione che il numero quadruplicherà nel 2050 a causa dell'aumento dell'età media della popolazione. L'Alzheimer è una patologia che colpisce il SNC e si associa ad un progressivo declino delle capacità cognitive e motorie che, inevitabilmente, interferiscono con le normali funzioni giornaliere: tali condizioni infatti sono la prima causa della dipendenza e della disabilità che si avverte tra la popolazione affetta da tale patologia (Wimo A. *et al.*, 2013; World Health Organization (WHO), 2012; Alzheimer's Disease International, 2013).

Per quanto riguarda il quadro neuropatologico utile ai fini della diagnosi, l'Alzheimer è determinato principalmente dalla formazione di placche amiloidi extracellulari e da ammassi neurofibrillari intraneuronali, elementi associati ad una perdita sinaptica e neuronale che a sua volta si traduce in una progressiva diminuzione dello spessore della corteccia cerebrale (figura 1).

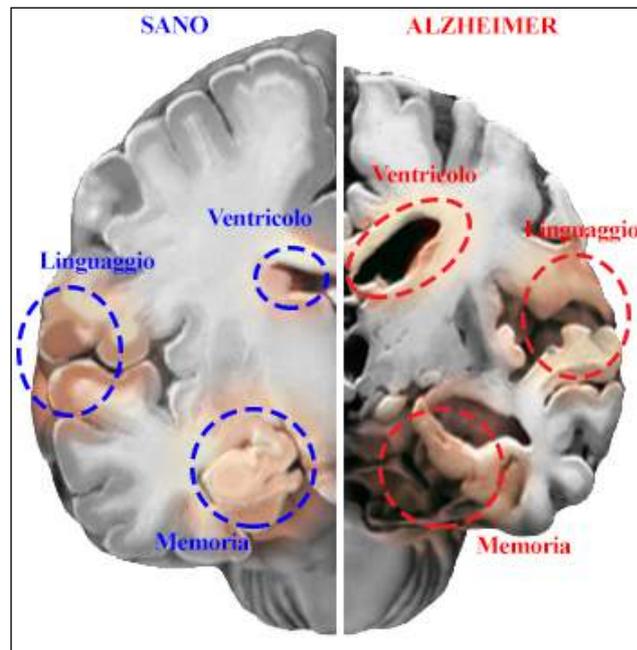


Figura 1: sezione frontale di encefalo di soggetto sano (sinistra) e di un soggetto affetto da Alzheimer (destra). Nell'encefalo di soggetto malato è possibile notare un aumento volumetrico dei ventricoli ed una atrofizzazione particolarmente evidente nella zona corticale corrispondente all'ippocampo.

La prima diagnosi di questa malattia risale al secolo scorso: era il 1907 quando il Dott. Alois Alzheimer riportò per primo la patologia in una sua paziente (Alzheimer A., 1907). Dal manoscritto si apprende che l'encefalo della paziente, sottoposto ad autopsia, presentava delle placche amiloidi e degli ammassi fibrillari, elementi questi che spalancarono le porte all'avanzare di una nuova patologia differente da quella che ai tempi era identificata come "demenza". Difatti con il passare del tempo, le indagini istopatologiche rivelarono che le placche e gli ammassi neurofibrillari rappresentavano una caratteristica comune nei soggetti di età avanzata, tanto da far argomentare al Dott. Katzman nel 1976 che l'Alzheimer e la demenza senile dovessero essere considerate come aspetti della stessa patologia (Katzman R., 1976).

Ad oggi l'eziologia di questa malattia non è chiara, sebbene molti studi osservazionali abbiano elencato una serie di fattori di rischio legati essenzialmente a diversi stili di vita (Mangialasche F. *et al.*, 2013; Mi W. *et al.*, 2013) o ad altre patologie (Ojo O. *et al.*, 2015).

La mole principale di dati disponibili in letteratura sembra evidenziare come principale fattore di rischio l'avanzamento dell'età del soggetto poiché l'incidenza di Alzheimer aumenta di pari passo con il progredire dell'età (Solomon A. *et al.*, 2014; Prince M. *et al.*, 2013). Tuttavia altri fattori vanno sempre più prendendo corpo.

Tra i fattori di rischio associati allo stile di vita, si possono elencare il grande gruppo dei rischi vascolari (tra cui deve essere collocata l'ipertensione), il fumo, il diabete mellito e l'obesità, l'infarto ed altre malattie legate al sistema cardiocircolatorio; tali fattori accrescono l'incidenza di malattia di Alzheimer in particolare quando si manifestano dopo i 40-50 anni di età (Mangialasche F. *et al.*, 2013).

Anche la nutrizione ricopre un ruolo importante: antiossidanti, vitamine, cibi ricchi in omega 3 e grassi insaturi (Mi W. *et al.*, 2013) riducono significativamente l'incidenza di tale patologia.

Infine, fattori psicosociali quali l'isolamento sociale e la depressione si associano ad un aumento del rischio di demenza/Alzheimer (Mangialasche F. *et al.*, 2013; Johansson L. *et al.*, 2013).

Nel corso degli anni, sono state numerose le ipotesi volte a mettere in relazione fattori genetici, ambientali e patofisiologici alla base della patologia, (tra quest'ultime particolare rilievo è stato attribuito allo stress ossidativo e alle vie di segnalazione vascolari-infiammatorie (Wyss-Coray T., 2012; Orsucci D. *et al.*, 2013)) ma, le più accreditate sono quelle che vedono protagoniste la cascata amiloide, la cascata mitocondriale e il ruolo svolto dagli inquinanti ambientali.

L'ipotesi della cascata amiloide si basa sull'osservazione che le placche localizzate a livello della corteccia cerebrale nei pazienti affetti da Alzheimer sono prevalentemente costituite dalla proteina β -Amiloide ($A\beta$), un peptide di 36-43 aminoacidi il cui gene è localizzato sul cromosoma 21. Nella sua prima formulazione, tale ipotesi proponeva che il

precursore della proteina amiloide (APP) fosse metabolizzato in modo anomalo, promuovendo così la formazione del peptide A β (costituente delle placche amiloidi) con conseguente neuro-degenerazione e perdita neuronale, aspetto clinico tipico dei quadri di demenza e Alzheimer (Hardy J.A. *et al.*, 1992). Questa tesi fu ampiamente validata negli anni successivi, quando Scheuner e colleghi (Scheuner D. *et al.*, 1996) osservarono che mutazioni di altri due geni, il gene della presenilina 1 (sul cromosoma 14) e quello della presenilina 2 (sul cromosoma 1) erano associate ad una over-produzione di peptide A β , dimostratosi tossico per le cellule in coltura (Levy-Lahad E. *et al.*, 1995; Iversen L.L. *et al.*, 1995). La tossicità del suddetto peptide risiedeva nella capacità di formare complessi oligomerici dalla cui spontanea aggregazione si generano fibrille insolubili, le placche senili, responsabili della degenerazione vascolare e neuronale caratteristica dei soggetti affetti da Alzheimer (Hardy J., 2009).

L'ipotesi della cascata mitocondriale si concentra invece sul meccanismo fisiologico dei mitocondri e come la loro alterazione funzionale sia alla base dell'avanzamento dell'età cerebrale e quindi della patologia di Alzheimer. Questa teoria si basa essenzialmente sull'ipotesi postulata da Harman nel 1956 secondo la quale l'aumento di radicali liberi sarebbe una delle potenziali cause dell'invecchiamento del SNC (Harman D., 1956); secondo questa ipotesi, infatti, l'accumulo intracellulare dei prodotti derivanti dal metabolismo ossidativo indurrebbe danni strutturali irreversibili. Qualche anno più tardi questa teoria fu coadiuvata dall'identificazione dei mitocondri quali sede elettiva di produzione di radicali liberi (Miquel J., 1980), e quindi di "orologi biologici" cellulari (Harman D., 1972). La conferma della validità di questa ipotesi è derivata dal reperimento di alcune disfunzioni di tale organulo in tessuti biotici ottenuti da pazienti affetti da Alzheimer; in particolare Gibson e colleghi (Gibson G.E. *et al.*, 1998) osservarono alterazioni a carico di 3 enzimi mitocondriali: il complesso della piruvato deidrogenasi, dell'alfa-chetoglutarato deidrogenasi e della citocromo ossidasi. Inoltre, studi *in vitro*

evidenziarono che un alterato funzionamento della citocromo ossidasi, si associava ad una sovrapproduzione di A β -42 (Gabuzda D. *et al.*, 1994; Khan S.M. *et al.*, 2000).

Il metabolismo mitocondriale è strettamente correlato all'invecchiamento tissutale e sue alterazioni si associano ad una cascata di eventi negativi: basti pensare che il malfunzionamento di questi organuli comporta una fuoriuscita di specie reattive all'ossigeno (ROS – Reactive Oxygen Species), un aumento dello stress ossidativo e un'attivazione delle caspasi che, a loro volta, esitano nella morte cellulare (Orrenius S., 2007), nel deterioramento delle spine dendritiche e delle sinapsi neuronali e nell'alterazione della comunicazione intracellulare che sussiste tra cellule gliali (astrociti, oligodendrociti, microglia) e neuroni (Talantova M. *et al.*, 2013). Oltre ai ROS quali maggiori responsabili del danno mitocondriale, nel 2003 Li e colleghi (Li M. *et al.*, 2003) dimostrarono che un metallo pesante, il cadmio (Cd), era in grado, non solo di causare stress ossidativo ed attivare la caspasi 3 (e quindi di innescare una via di segnalazione apoptotica a partenza mitocondriale), ma anche di aumentare la permeabilità dell'organulo (Risso-de Faverney C. *et al.*, 2004).

Partendo da tali osservazioni e dall'osservazione che soggetti affetti da Alzheimer presentavano elevate concentrazioni epatiche (Lui E. *et al.*, 1990) e nervose (Panayi A. *et al.*, 2002) di Cd, negli ultimi anni l'attenzione della comunità scientifica si è concentrata sul ruolo rivestito dagli inquinanti ambientali e dai metalli pesanti, tra cui il Cd, nelle alterazioni neurologiche che soggiacciono alla perdita della memoria al ritardo mentale (Wang B. *et al.*, 2013). Tale correlazione è stata ulteriormente consolidata grazie a studi che hanno messo in evidenza il ruolo del Cd nella formazione degli ammassi fibrillari (Jiang L.F. *et al.*, 2007) e nell'aumento dell'espressione della proteina amiloide sia in pazienti affetti dalla patologia (Syme C.D. *et al.*, 2006; Yano K. *et al.*, 2003), che in modelli murini (Li X. *et al.*, 2012).

1.1.2 Morbo di Parkinson

A livello nazionale approssimativamente 250.000 persone sono affette da morbo di Parkinson e, secondo le statistiche, il 2% dei soggetti mostra segni e sintomi della malattia oltre il sessantesimo anno di età anche se, nel 5 % dei casi, i primi segni possono manifestarsi intorno ai 50 anni di età (http://www.salute.gov.it/portale/salute/p1_5.jsp?lingua=italiano&id=167&area=Malattie_del_sistema_nervoso).

Dal punto di vista storico, il morbo di Parkinson sembra avere origini antiche. Come è stato riportato da García Rui nel 2004 (García Ruiz P.J. *et al.*, 2004), la malattia era stata in parte descritta in tempi biblici: descrizioni dei sintomi del morbo sono presenti nei testi egiziani ed indiani, e Galeno di Pergamo (Pergamo 129 – Roma 199) pose la propria attenzione sui tremori a riposo. Certo è che i sintomi furono dettagliatamente descritti solo dal francese Jean-Martin Charcot, neurologo della seconda metà dell'800, che portò avanti gli studi iniziati da James Parkinson nel 1817 (Lees A.J., 2007).

Il morbo Parkinson è una patologia neurodegenerativa, multifattoriale e progressiva caratterizzata da 4 sintomi cardinali: tremore a riposo, rigidità, bradicinesia ed instabilità posturale. Si tratta di una tra le più comuni patologie neurodegenerative il cui fenotipo è dovuto ad una morte massiccia (60%) di neuroni dopaminergici nigro-striatali (Jankovic J., 2008; Wirdefeldt K. *et al.*, 2011) e da una riduzione dell'85% del contenuto di dopamina (figura 2).

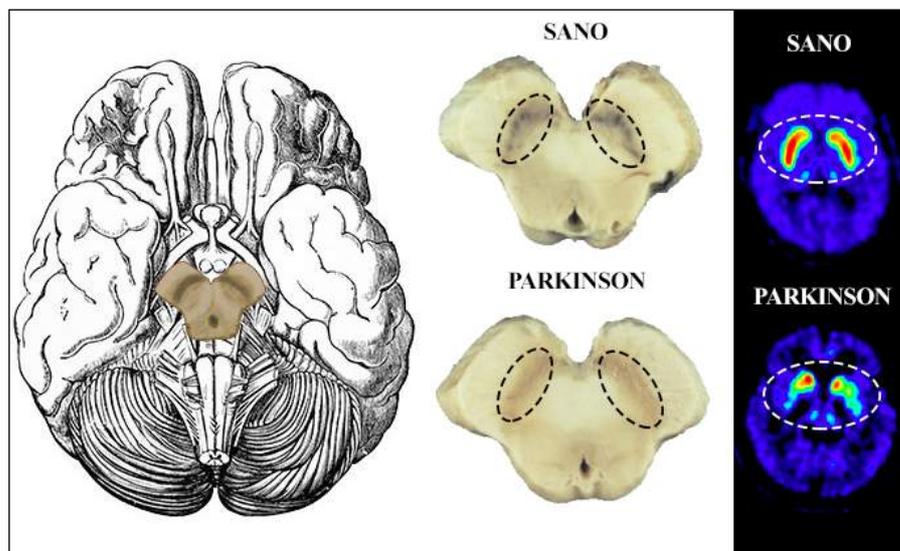


Figura 2: confronto anatomo-funzionale tra un encefalo normale (in alto) ed uno affetto da morbo di Parkinson (in basso). Nella parte centrale dell'immagine è chiaramente evidente (cerchio nero tratteggiato) la diminuzione della "substantia nigra" in un soggetto affetto da Parkinson (sezione trasversale del mesencefalo). A destra (<http://feinsteinneuroscience.org/about-us-2/research#Parkin>), esame PET (Positron Emission Tomography) che indica la diminuzione della funzione dopaminergica (cerchio bianco tratteggiato) in un soggetto affetto dal morbo.

La morte neuronale dipende essenzialmente da un malfunzionamento delle vie di segnalazione che assicurano un corretto ed efficiente metabolismo cellulare. Tra queste rivestono particolare importanza il sistema ubiquitina/proteosoma, atto alla rimozione dall'ambiente intracellulare delle proteine che posseggono un'alterata conformazione tridimensionale, e l'autofagia, grazie alla quale gli aggregati cellulari e gli organuli citoplasmatici danneggiati vengono degradati.

Si capisce quindi come la mancata rimozione di componenti cellulari alterate costituisca il *primum movens* per la formazione di oligomeri ed aggregati proteici quali cause principali della patogenesi del morbo di Parkinson (McNaught K.S. *et al.*, 2002; McNaught K.S. *et al.*, 2003; Rideout H.J. *et al.*, 2001).

La correlazione tra alterato funzionamento dei meccanismi proteolitici e processi neurodegenerativi che comportino la morte neuronale è stata ampiamente dimostrata in numerosi modelli animali e cellulari. In particolare, alcuni dati hanno dimostrato che l'esposizione a Cd di cellule murine in coltura induce profonde alterazioni del sistema ubiquitina/proteosoma caratterizzato dall'accumulo di proteine poliubiquitinate ad elevato peso molecolare, dall'aumento dello stress ossidativo e dalla diminuzione della vitalità cellulare (Yu X. *et al.*, 2008; Figueiredo-Pereira M.E. *et al.*, 1999); parallelamente, Lafuente e colleghi (Lafuente A. *et al.*, 2005) hanno evidenziato come, *in vivo*, il Cd alteri i ritmi circadiani della produzione ipofisaria di neurotrasmettitori quali la serotonina e la dopamina.

Un altro fattore che gioca un ruolo importante nella funzione nervosa e nella trasmissione dei segnali, è il mitocondrio. L'omeostasi ed il corretto funzionamento di questo organulo è importante per il suo ruolo primario nella produzione di ATP, molecola necessaria per l'attività ionica di pompe e canali e per la trasmissione sinaptica. Così come è stato osservato per la malattia di Alzheimer, tra le cause patogenetiche del morbo di Parkinson sono state evidenziate un'alterata funzionalità mitocondriale (Exner N. *et al.*, 2012), lo stile di vita e l'esposizione ai pesticidi, in particolar modo a quelli contenenti metalli pesanti (Gorell J.M. *et al.*, 1998; Gorell J.M. *et al.*, 2004; Costello S. *et al.*, 2009). Tuttavia, nonostante la letteratura sia ampiamente ricca di dati riguardanti il tipo di causa alla base del morbo di Parkinson, sono invece rare le ricerche che stabiliscano un rapporto di causa-effetto tra gli stili di vita e/o il rischio ambientale e l'eziologia della malattia. In tal senso, ricerche più approfondite sono state condotte sul ruolo di alcuni pesticidi nello sviluppo della malattia di Parkinson. In particolare Uversky e colleghi (Uversky V.N. *et al.*, 2001) hanno dimostrato che i pesticidi e i metalli ivi contenuti causano una variazione conformazionale dell' α -sinucleina, una proteina di 140 aminoacidi molto abbondante nel sistema nervoso, il cui ruolo fisiologico è quello di mantenere un corretto svolgimento dei

segnali sinaptici che assicurano il normale sviluppo cognitivo (Kokhan V.S. *et al.*, 2012). Tale variazione tridimensionale oltre ad impedire una corretta degradazione della proteina, è alla base della formazione di aggregati fibrillari che si accumulano nei neuroni dopaminergici della *substantia nigra* e ne provocano la perdita, segno patognomonico della malattia di Parkinson.

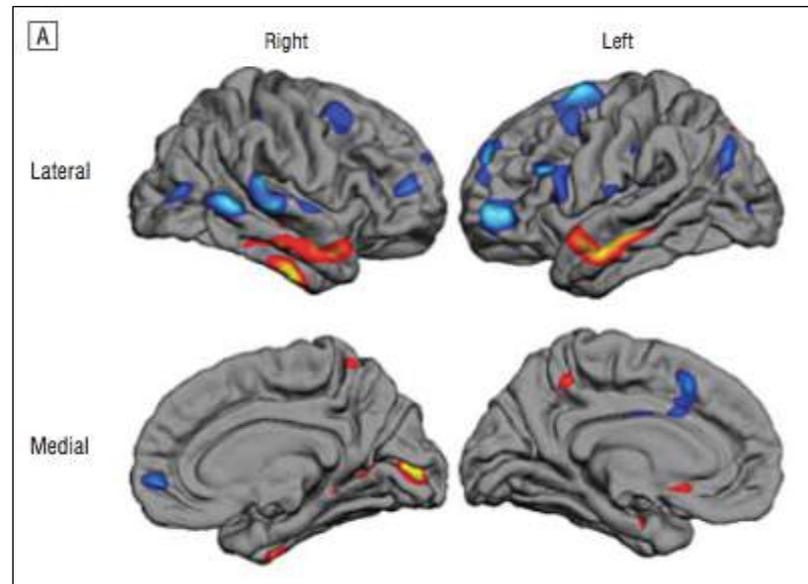
Successivamente, Andrée colleghi (André C. *et al.*, 2005), hanno confermato questi dati assegnando all' α -sinucleina un ruolo critico nella patogenesi del morbo di Parkinson.

Negli ultimi quindici anni la comunità scientifica ha esplorato la possibilità che la patogenesi della malattia potesse avere cause genetiche; alcuni studi in questo ambito hanno portato all'identificazione di sequenze nucleotidiche responsabili di alcune forme ereditabili della patologia (Petrucci S. *et al.*, 2014), corrispondente peraltro solo ad una piccola quota di soggetti affetti. Purtroppo, nemmeno l'avvento di tecniche di biologia molecolare fortemente avanzate, come la tecnica NSG (New Sequencing Generation) è riuscita a trovare nuovi geni la cui alterazione ci possa aiutare a chiarire quanta importanza abbia l'ereditarietà della malattia (Quadri M. *et al.*, 2015).

1.1.3 Disturbi dello Spettro Autistico (DSA)

L'autismo, o meglio i disordini dello spettro autistico (DSA) comprendono una serie di disfunzioni neuro-comportamentali, con differente grado di severità, che si manifestano prima del terzo anno di età. Da un punto di vista clinico, il DSA presenta alcune caratteristiche descritte nell'ultima edizione del DMS-5 del 2013 ed includono, tra le principali, disordini nelle interazioni sociali, nelle capacità comunicative e nel comportamento abituale (American Psychiatric Association, 2013. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 5th ed. American Psychiatric Association, Arlington, VA). Questi sintomi sono per lo più dovuti ad una perdita della connettività

neuronale a livello di alcune aree della corteccia cerebrale (Cheng W. *et al.*, 2015) (figura 3).



*Figura 3: rappresentazione schematica di aree corticali di un soggetto affetto da DSA (immagine tratta da Cheng W. *et al.*, 2015). Le aree blu indicano un aumento nello spessore della corteccia cerebrale; le aree rosse indicano una diminuzione nello spessore della sostanza grigia rispetto a soggetti di controllo.*

Il DSA è entrato a far parte della conoscenza comune circa 20 anni fa, anche se le origini del termine risalgono alla seconda guerra mondiale. Il primo medico a dare una definizione di “autismo infantile” fu Leo Kanner nel 1943 (Kanner L., 1943) che così identificò e classificò un gruppo di bambini socialmente isolati e caratterizzati da severi disturbi comportamentali. In maniera del tutto indipendente, nello stesso periodo, Hans Asperger (Asperger H., 1944) identificò bambini con le stesse caratteristiche comportamentali sebbene meno marcate, tanto da raggrupparli nella “sindrome di Asperger”.

Sebbene queste due patologie percorrano strade molto simili, esse tuttavia presentano delle differenze che Yu e colleghi (Yu K.K. *et al.*, 2011) hanno descritto mediante una meta-analisi di risonanze magnetiche nucleari a cui erano stati sottoposti alcuni soggetti affetti da tali disordini. Da tali studi è emerso che, per quanto riguarda i soggetti affetti da DSA

rispetto ai casi di controllo, il volume totale di sostanza grigia risulta diminuito in varie aree del cervelletto e in alcune porzioni dell'ippocampo. D'altra parte, il volume di sostanza grigia è aumentato nelle aree del nucleo caudato ed in porzioni del lobo prefrontale e temporale. Invece, per quanto riguarda la sindrome di Asperger, la corteccia cerebrale appare diminuita di volume nelle zone amigdala/ippocampo, nel lobo prefrontale, nel giro occipitale, nel porzione destra del cervelletto, nel *putamen* e nel precuneo mentre, un aumento della sostanza grigia è stato riscontrato nella porzione inferiore del lobo parietale e nella circonvoluzione del lobo temporale sinistro. Sostanzialmente questo studio evidenzia come la riduzione del volume di sostanza grigia, rispetto ai controlli, sia più limitato nei soggetti affetti da sindrome di Asperger che nei soggetti affetti dai disordini dello spettro autistico.

Altre caratteristiche comuni, sebbene non universalmente distribuite nei bambini affetti da DSA, sono rappresentate da una diminuzione dell'attenzione, disturbi dell'apprendimento, anomalie sensitive e motorie ed epilessia (Geschwind D.H., 2009; Voineagu I. *et al.*, 2013).

Negli ultimi anni l'attenzione della comunità scientifica si è concentrata sul ruolo dell'apparato gastrointestinale e del il sistema immunitario ad esso connesso per spiegare la patogenesi del DSA. Infatti sono state osservate correlazioni tra disbiosi intestinale, alterazioni del sistema immunitario, disfunzioni mitocondriali e DSA (Cao X. *et al.*, 2013; Noriega D.B. *et al.*, 2014; Legido A. *et al.*, 2013).

I disordini dello spettro autistico, come del resto la gran parte delle patologie che affliggono il sistema nervoso ed altri tessuti, dipendono da una combinazione di fattori ambientali e genetici. Ad oggi si stima che tra il 40 e 90% dei casi di DSA condividano alterazioni genetiche (Hallmayer J. *et al.*, 2011).

Poiché qualsiasi organismo vivente possiede la naturale capacità di adattamento ai fattori ambientali e ai suoi vari cambiamenti, non sorprende vedere che nei soggetti affetti da

DSA le mutazioni epigenetiche sono più comuni di quelle a carico delle sequenze nucleotidiche (Qiu J. *et al.*, 2006). Difatti queste mutazioni rappresentano un ottimo compromesso tra l'adattabilità dell'organismo e i cambiamenti ambientali. Recentemente un gruppo di ricerca inglese (Wong C.C. *et al.*, 2013) ha messo in evidenza l'associazione tra alcuni tratti di DNA soggetti a metilazione (espressione o silenziamento genico) e la severità dei disordini autistici. Lo studio si è focalizzato solo su gemelli monozigoti, così da escludere il fattore genetico. Il lavoro evidenzia considerevoli differenze nel grado di metilazione del DNA di gemelli monozigoti discordanti per la patologia (Wong C.C *et al.*, 2013).

Disfunzioni a carico genico ed epigenetico si riflettono in un'alterata connettività sinaptica e, come conseguenza, in un'anomala morfogenesi tissutale che si manifesta in una intricata rete di connessioni che è caratteristica dei soggetti affetti da disordini autistici.

È assodato che gli inquinanti ambientali rivestano un ruolo primario nella patogenesi di malattie genetiche (Arita A. *et al.*, 2009) ed in particolar modo il Cd viene considerato un "mutageno" con un forte ruolo nella patogenesi del DSA (Jin Y.H. *et al.*, 2003).

A questo proposito, un gruppo di ricercatori giapponesi ha condotto uno studio sui livelli di alcuni metalli in bambini di età compresa tra 0 e 3 anni concludendo che un aumento della concentrazione di alcuni ioni metallici, quali alluminio (Al), Cd e piombo (Pb), così come una diminuzione dei livelli di zinco (Zn) e magnesio (Mg) possono essere alla base dello spettro autistico (Yasuda H. *et al.*, 2013).

1.2 RISCHIO AMBIENTALE

Il ruolo che i fattori ambientali svolgono nei riguardi della patogenesi e nella progressione dei disturbi neurodegenerativi è stato caratterizzato soprattutto dopo un'attenta analisi della

relazione tra esposizione a pesticidi e persone affette da Parkinson ed Alzheimer (Grant W.B. *et al.*, 2002; Priyadarshi A. *et al.*, 2001).

La meta-analisi di Priyadarshi e colleghi (Priyadarshi A. *et al.*, 2011) ha evidenziato che vivere in zone rurali, trovandosi a stretto contatto con pesticidi, aumenta il rischio di sviluppare il morbo di Parkinson rispetto ad individui che risiedono in aree geografiche differenti.

Infatti i pesticidi, che sono classificati tra gli inquinanti ambientali, stimolano la produzione di ROS il cui ruolo nella degenerazione e morte neuronale è stato accreditato da alcuni anni (Braconi D. *et al.*, 2011). I metalli pesanti sono tra i più noti e diffusi inquinanti ambientali distribuiti a livello globale. Ormai da molti anni vengono estratti dalle miniere e la loro dispersione nell'ambiente è principalmente dovuta alle attività industriali dell'uomo. Non tutti i metalli di estrazione sono tossici, anzi alcuni di essi sono addirittura essenziali per il corretto funzionamento di alcuni sistemi enzimatici, ma quelli che non possiedono un ruolo fisiologico (come arsenico (As), Pb, mercurio (Hg) e Cd) comportano elevati danni biologici che scaturiscono dal loro accumulo in organi e tessuti e che si traducono nell'insorgenza di una tossicità cronica.

Ogni anno l'Agenzia federale ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry) stila una classifica delle sostanze tossiche con le quali è possibile entrare in contatto. L'elenco è ordinato in base alla prevalenza ed alla tossicità delle sostanze relative corredate dell'indicazione del ruolo svolto nel determinare l'insorgenza di malattia. Nell'ultimo aggiornamento del 2013, il Cd si trova al settimo posto preceduto soltanto da altri tre metalli pesanti: As, Pb e Hg rispettivamente collocati al primo, secondo e terzo posto

(http://www.atsdr.cdc.gov/spl/resources/ATSDR_2013_SPL_Detailed_Data_Table.pdf)

(figura 4).

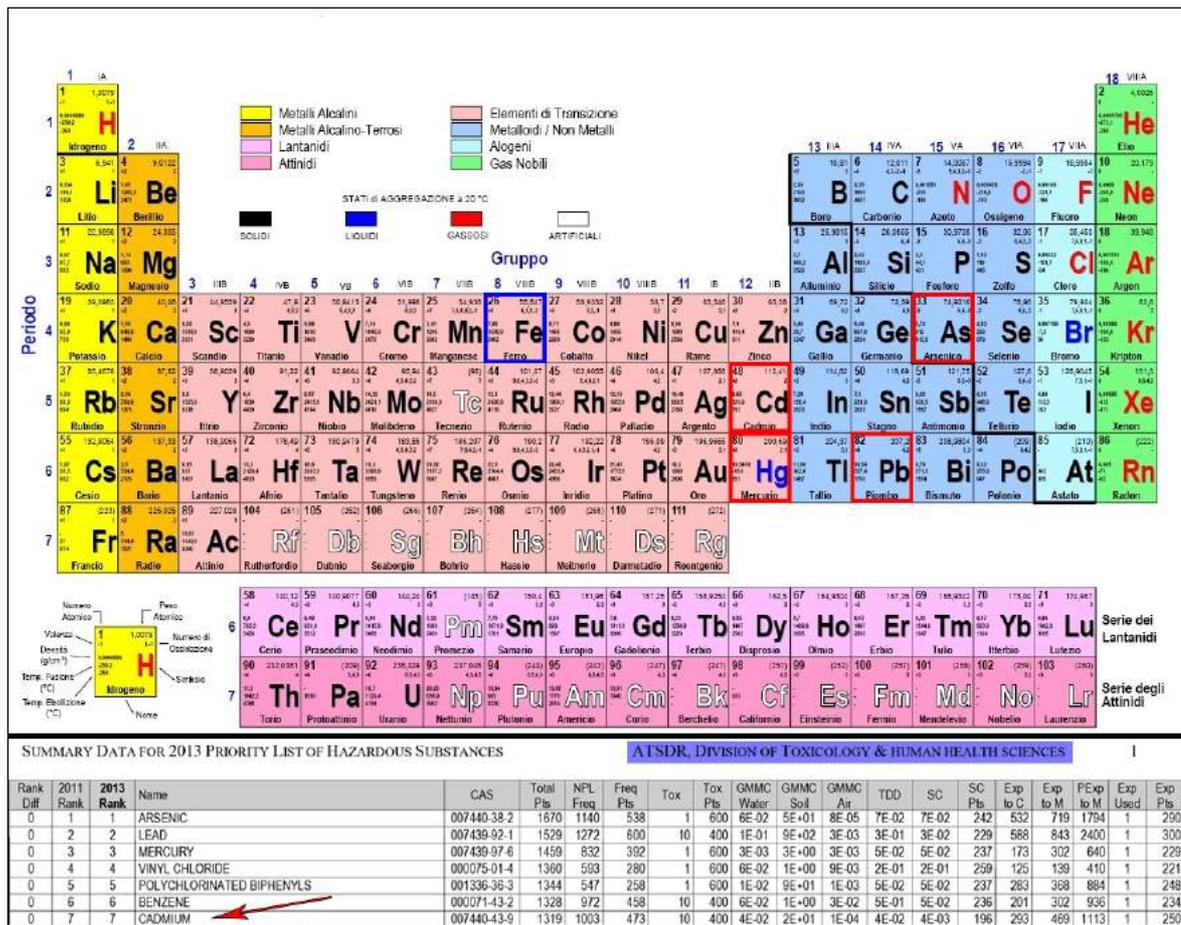


Figura 4: (in alto) tavola periodica degli elementi con indicati il ferro (Fe) (riquadro blu) dopo il quale si inizia a parlare di metalli pesanti (riquadri rossi) come l'arsenico (As), il cadmio (Cd), il mercurio (Hg) ed il piombo (Pb) ordinati secondo il peso atomico. In basso, la lista delle sostanze tossiche redatta dalla ATSDR (il Cd si trova al settimo posto) aggiornata al 7 maggio 2014 e rimasta invariata.

Solitamente i metalli pesanti penetrano nell'organismo per inalazione (fumi industriali ed urbani) o per ingestione (cibi ed acque contaminate) anche se il loro assorbimento a livello del tratto respiratorio, come quello digerente, varia da individuo ad individuo a seconda dell'età e dello stato nutrizionale del soggetto (Howard H., 2002).

Dal primo contatto con le vie respiratorie e/o digerenti, attraverso il torrente circolatorio, il metallo va rapidamente a localizzarsi a livello epatico e renale. In particolare il rene rappresenta il primo bersaglio dei metalli pesanti poiché l'escrezione del metallo attraverso la minzione è troppo lento per non consentirne un accumulo.

L'As è noto da anni come una delle principali cause di cancro sia dopo un'esposizione acuta che cronica (Tsai S.M. *et al.*, 1999). Per quanto riguarda il Pb, questo metallo pesante è caratterizzato da una patogenesi che va dall'ipertensione, all'insufficienza renale sino alla morte (US Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Lead. Toxicological profiles. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention; 1999. PB/99/166704). Il Hg invece induce danni principalmente a livello epatico e neurologico (Nierenberg D.W. *et al.*, 1998).

Infine, il Cd, oltre ad essere associato alla tossicità renale (Jarup L. *et al.*, 2000) e ossea (Staessen J.A. *et al.*, 1999) è fortemente coinvolto sia nell'insorgenza di neoplasie (Ye J. *et al.*, 2000) che allo sviluppo di malattie neurodegenerative (André C. *et al.*, 2005).

1.2.1 Cadmio (Cd)

Il Cd è un metallo pesante presente come contaminante nelle falde acquifere in quanto sottoprodotto di smaltimento dei processi industriali, in particolare quelli che si occupano di coloranti, di lavorazioni metallurgiche, di plastiche e di produzione di batterie. Esso è inoltre componente integrale di molti fertilizzanti (Loganathan P. *et al.*, 2008) e pesticidi (<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp5.pdf>). La contaminazione delle acque e quindi del suolo estende la contaminazione da Cd anche ai prodotti agricoli esponendo in maniera cronica l'uomo. Per quanto riguarda l'inquinamento atmosferico, il Cd può provenire dalle aree municipali a causa della combustione dei rifiuti gestita in maniera non corretta (in particolar modo da oggetti contenenti batterie al nichel-Cd e materiale plastico), dal fumo di sigaretta e dagli scarichi dei veicoli, fattori questi che contribuiscono all'aumento della diffusione del Cd mediante inalazione (Howard H. *et al.*, 2002).

Il livello di tollerabilità/tossicità del Cd è dovuto all'incapacità dell'organismo nell'espellerlo, con conseguente suo accumulo.

Anche in assenza di esposizioni acute, i danni da esposizione cronica possono essere molto gravi causando l'instaurarsi e la progressione di differenti patologie.

Il principale organo di escrezione, il rene, è uno dei bersagli primari del Cd che ne compromette l'integrità ed il meccanismo delle sue unità funzionali (i nefroni). La tossicità è legata al fatto che il Cd compete e sostituisce ioni, quali il calcio, indispensabili per il corretto metabolismo dell'organo; in particolare, le proteine che maggiormente risultano coinvolte in tale meccanismo sono le metallothioneine e le calmoduline (Satarug S. *et al.*, 2000). La sostituzione del calcio con il Cd ha come ripercussione più evidente quella di provocare un impoverimento sistemico dello ione. Tale carenza si manifesta in maniera particolarmente evidente come indebolimento del tessuto osseo, la più grande riserva di calcio dell'organismo.

Il fenomeno che lega il danno indotto dalla tossicità del Cd alla rarefazione del tessuto osseo è stato per la prima volta studiato in Giappone. Infatti, nei primi del '900, l'isola nipponica è stata vittima di un'imponente contaminazione da Cd a causa dell'incessante estrazione mineraria che ebbe inizio già nel XVI secolo, intaccando principalmente i fiumi ed il raccolto di riso. In seguito a tale contaminazione, i soggetti che abitavano nelle zone rurali circostanti, iniziarono a presentare disfunzioni renali e del metabolismo osseo sviluppando la cosiddetta sindrome "itai itai" (Kobayashi E. *et al.*, 2009; Baba H. *et al.*, 2014) il cui sintomo più evidente è rappresentato dall'aumento dell'incidenza di fratture e dalla presenza di deformazioni del rachide per demineralizzazione vertebrale (figura 5) (Staessen J.A. *et al.*, 1999).



Figura 5: a sinistra, veduta aerea del fiume Jinzū, nella prefettura di Toyama, Giappone, usato principalmente per l'irrigazione dei campi di riso (centro) e che subì una massiccia contaminazione di Cd intorno al 1912. A destra, un paziente affetto dalla sindrome "itai itai" in cui è evidente la deformazione ossea a carico della colonna vertebrale.

A livello occupazionale, studi scientifici hanno dimostrato che l'esposizione al Cd induce notevoli danni anche a livello epatico, testicolare (Benoff S. *et al.*, 2000) e prostatico (in quest'ultimo caso annoverato fra le cause di insorgenza di neoplasie (Ye J. *et al.*, 2000)).

Trattandosi di un inquinante ambientale, è possibile trovare tracce di Cd anche a livello atmosferico (<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp5.pdf>); esso è infatti abbondante nelle polveri sottili che, oltre a presentare elevati livelli di monossido di carbonio (il più noto inquinante), contengono anche ossido, cloruro e solfato di Cd che rendono il metallo volatile (<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp5.pdf>).

Le sorgenti dell'inquinamento atmosferico possono essere molteplici: tubi di scappamento, fumi provenienti da raffinerie o dai processi industriali che trattano metalli/plastiche, e dalle combustioni in generale. Ovviamente i metalli pesanti volatili, così come tutti gli altri componenti delle polveri sottili, vengono introdotti nell'organismo *in primis* attraverso la mucosa olfattiva, *in secundis* attraverso le vie aeree che li conducono fino al polmone; la

localizzazione intrapolmonare è stata tradizionalmente associata ad un aumentato rischio di sviluppare patologie a carico proprio di quest'organo (Riedl M.A., 2008) ma, la capacità di tali sostanze di superare la barriera aria-sangue, entrare nel torrente circolatorio e quindi raggiungere tutti gli altri organi e tessuti (Muhlfeld C. *et al.*, 2008), rendono ragione del fatto che tali metalli vengano annoverati anche tra le cause dell'instaurarsi di patologie neurodegenerative quali il morbo di Parkinson o la malattia di Alzheimer (Calderon-Garciduenas L. *et al.*, 2002).

Molte evidenze sono emerse circa la capacità degli inquinanti ambientali, in particolar modo quelli atmosferici, di alterare la barriera ematoencefalica (Shukla A. *et al.*, 1996; Oberdorster G. *et al.*, 2004), e di penetrare nel SNC promuovendo fenomeni infiammatori a carico della microglia (Qin L. *et al.*, 2007).

Ad oggi, le statistiche mostrano un legame di tipo causa/effetto tra inquinamento aereo e rischio neurodegenerativo. Inoltre, nei primi anni del XXI secolo, alcuni studi effettuati in modelli animali, nella maggior parte dei casi cani, esposti ad alte dosi e concentrazioni di inquinanti atmosferici hanno mostrato un incremento nella degenerazione del tessuto nervoso presente a livello della mucosa nasale, del bulbo olfattivo e della corteccia frontale (Calderon-Garciduenas L. *et al.*, 2002; Calderon-Garciduenas L. *et al.*, 2003). In stretta similarità, marcati segni di neurodegenerazione a livello dei bulbi olfattivi, sono stati descritti come primo sintomo del danno neuronale in soggetti affetti da Alzheimer e Parkinson. Come ulteriore riscontro, nel 2008 uno studio ha evidenziato come l'inquinamento atmosferico tenda ad aumentare l'invecchiamento cerebrale (Calderon-Garciduenas L. *et al.*, 2008a). Dunque, gli inquinanti ambientali colpiscono differenti organi e tessuti culminando, stando a quanto descritto dall'ipotesi del "colpo multiplo", in patologie a carico del SNC (Carvey P.M. *et al.*, 2006), tanto che la malattia di Alzheimer e il morbo di Parkinson sono le principali patologie a carico del SNC associate all'inquinamento ambientale.

L'estrema suscettibilità dell'encefalo nei confronti di stimoli esterni ha resa necessaria la presenza di una barriera difensiva, la barriera emato-encefalica, capace di serrare la strada a tutte le sostanze ritenute dannose (Dallas S. *et al.*, 2006). Tuttavia, la presenza di sostanze tossiche genera nella barriera una risposta di tipo infiammatorio che esita in un aumentato rilascio di ROS, citochine ed altre molecole che trasmettono l'infiammazione a livello del parenchima cerebrale e contribuiscono all'instaurarsi ed al progredire di patologie neurodegenerative (Long T.C. *et al.*, 2007).

Alcuni studi hanno messo in evidenza come, sia in animali che in soggetti umani, l'esposizione a inquinanti ambientali/metalli pesanti provochi un aumento di alcuni antigeni microgliali quali CD-14, CD-68, CD-163 (tutti indicativi di uno stato attivato), così come di altri marcatori localizzati prevalentemente a livello della corteccia frontale, della *substantia nigra* e del nervo vago (Calderon-Garciduenas L. *et al.*, 2008a). In accordo con quanto detto sopra, il danno strutturale a carico della corteccia cerebrale frontale è associato a sintomi quali disfunzioni cognitive (Calderon-Garciduenas L. *et al.*, 2008b), diminuzione dell'attenzione e disturbi della socialità (Bao Q.S. *et al.*, 2009), tipici di Alzheimer, Parkinson e DSA. Questi studi hanno confermato precedenti ricerche concernenti la contaminazione da metalli pesanti associata ad un incremento della disabilità motoria e dell'apprendimento (Bonithon-Kopp C. *et al.*, 1986).

Il Cd, come accennato, è in grado di danneggiare il SNC, raggiungendolo mediante la "via olfattiva" (ovvero tramite la mucosa nasale) (Lafuente A. *et al.*, 1999) e/o aumentando la permeabilità della barriera emato-encefalica (Shukla G.S. *et al.*, 1987).

Inizialmente, secondo la FAO/OMS (Food and Agriculture Organization (Organizzazione dell'Alimentazione e dell'Agricoltura)/Organizzazione Mondiale di Sanità), la dose di Cd tollerabile per una persona era stimata attorno a 400-500 µg settimanali (FAO/WHO, "Evaluation of certain food additives and contaminants (Thirty-third report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives)", WHO Technical Report Series No.

776, WHO, Geneva, Switzerland, 1988). Nel 2010, l'ultima stima del CPSC (Consumer Product Safety Commission) valuta la dose di Cd tollerabile per soggetto come 0,1 µg/Kg/giorno (Mead M.N., 2010). È noto da tempo che la vita media di questo metallo pesante a livello dell'organismo, oscilla tra i 15 e i 20 anni e che sia proprio questa la causa responsabile del suo accumulo a livello di organi e tessuti ove induce la formazione di neoplasie e/o di altre patologie come quelle neurodegenerative (Waalkes M.P., 2000; López E. *et al.*, 2003; Cao Y. *et al.*, 2009). Alcune delle prime associazioni tra contaminazione da Cd e neurodegenerazione si ebbero nei primi anni ottanta (Thatcher R.W. *et al.*, 1982; Marlowe M. *et al.*, 1983). Questi studi misero in relazione i livelli del metallo pesante nei capelli dei soggetti in esame con le loro difficoltà di apprendimento, con il loro quoziente intellettivo, e con problemi di dislessia. Molte ricerche, con il passare del tempo, hanno consolidato queste correlazioni (Calderon-Garciduenas L. *et al.*, 2008b; Bao Q.S. *et al.*, 2009; Bonithon-Kopp C. *et al.*, 1986).

Il SNC è particolarmente vulnerabile ad agenti esterni nelle prime fasi del suo sviluppo, ed il Cd è considerato tossico soprattutto a questo stadio; esso è infatti in grado di superare la placenta ed arrivare sino al feto; tracce di Cd sono state anche trovate a livello del latte materno (Korpela H. *et al.*, 1986). Il principale motivo a cui si deve la vulnerabilità del SNC durante la vita fetale è legato al fatto che la barriera emato-encefalica non è completamente sviluppata durante questa fase: in tal modo il metallo pesante è in grado di superarla e di provocare danni neurologici prima della nascita (Pal R. *et al.*, 1993). Già nel 1984, in uno studio *post-mortem*, era stato descritto un accumulo di Cd ed altri metalli pesanti a livello dei plessi corioidei e del fluido cerebrospinale (Manton W.I. *et al.*, 1984). Il conseguente danno ultrastrutturale è causa di una maggior permeabilità al metallo pesante che tende, di conseguenza, ad accumularsi a livello cerebrale provocando neurodegenerazione (Shukla G.S. *et al.*, 1987; Gonçalves J.F. *et al.*, 2010; Mendez-Armenta M. *et al.*, 2007). I plessi corioidei costituiscono un facile bersaglio in quanto

questa regione cerebrale è particolarmente ricca di proteine che legano metalli. Come già accennato, il Cd può raggiungere la corteccia cerebrale mediante le terminazioni nervose dei bulbi olfattivi, evitando così la barriera emato-encefalica (Tjalve H. *et al.*, 1999); tale via di intossicazione spiega anche come l'inalazione del Cd possa essere dannosa al senso dell'olfatto (Bondier J.R. *et al.*, 2008). Poiché i neuroni olfattivi sono cellule nervose di senso, e poiché sono le prime cellule nervose ad entrare in contatto con agenti presenti nell'ambiente esterno, un danno a livello olfattivo (che potrebbe essere utilizzato come biomarker) rappresenta il primo livello di danno a carico del sistema nervoso.

Il Cd, come metallo pesante e come inquinante ambientale, promuove stress ossidativo con la produzione di ROS a livello encefalico (Fern R. *et al.*, 2003). Inoltre, studi *in vitro* su neuroni corticali hanno evidenziato, dopo 24 ore di trattamento con Cd alla concentrazione 1µM, cambiamenti morfologici soprattutto a carico dei prolungamenti citoplasmatici e morte (necrosi) cellulare (López E. *et al.*, 2003). Le stesse osservazioni sono state evidenziate in altre linee cellulari non corticali (Yoshida S., 2011). L'aumento della produzione di ROS e quindi del grado di stress ossidativo, unitamente alle alterazioni morfologiche e alla morte cellulare suggeriscono che il Cd induca morte cellulare per via apoptotica (ne sarebbero "sintomo" i ROS e lo stress ossidativo) che si trasforma in necrosi all'aumentare della dose.

Ulteriori conferme dei dati sopra accennati, descrivono le stesse alterazioni in linee cellulari differenti come le SH-SY5Y (neuroblastoma umano, neuroni dopaminergici) e le PC12 (feocromocitoma murino, cellule neuronali di *Rattus norvegicus*) dove, a seguito della generazione dei ROS viene innescata la via di segnalazione delle MAPKinasi (Yuan Y. *et al.*, 2013; Chen L. *et al.*, 2008a) che si conclude con apoptosi cellulare. Inoltre è stato dimostrato come il Cd induca l'apoptosi nei motoneuroni delle corna ventrali del midollo spinale di feti umani di età compresa tra le 10 ed 11 settimane di gestazione (Sarchielli E. *et al.*, 2011).

Il ruolo del Cd a livello del SNC è stato valutato anche *in vivo*. In questo caso ne è stato visto l'effetto sulla perdita di peso del SNC sull'inibizione dell'attività di alcuni enzimi funzionalmente importanti nel sistema colinergico come l'acetilcolinesterasi e l'ATPasi (Gupta A. *et al.*, 1991). Infatti il Cd, oltre a danneggiare il citoscheletro, altera le vie di segnalazione innescate dall'acetilcolina e dall'acido glutammico, (Desi I. *et al.*, 1998; Borges V.C. *et al.*, 2007), entrambi importanti nella plasticità sinaptica e nelle funzioni cognitive. Inoltre il glutammato, ha un ruolo fondamentale durante la crescita dei neuriti servendosi dello ione calcio, noto secondo messaggero, per la sua regolazione (Ryan S.K. *et al.*, 2007).

Il calcio, ione bivalente positivo ubiquitariamente diffuso a livello cellulare, presenta tra le altre funzioni, la peculiarità di regolare la crescita, il differenziamento e la morte cellulare. Il Cd è capace di danneggiarne l'omeostasi intracellulare provocando così apoptosi neuronale, come provato in varie ricerche scientifiche (Xu B. *et al.*, 2011; Yuan Y. *et al.*, 2013), proprio grazie al suo legame con proteine calcio specifiche, le calmoduline.

Per quanto riguarda i meccanismi di difesa nei riguardi di questo metallo pesante, uno dei principali è rappresentato dalle metallotioneine. Si tratta di proteine caratterizzate da un basso peso molecolare (da 500 Da a 14 kDa) che hanno una elevata affinità per gli ioni metallici grazie alla numerosa presenza di residui cisteinici (Jin T. *et al.*, 1998). Sono state classificate varie isoforme di metallotioneine; il sistema nervoso è caratterizzato dalla presenza di metallotioneine di tipo III ed è stato dimostrato che in pazienti affetti da Alzheimer la sua concentrazione tende a diminuire (Uchida Y. *et al.*, 1991).

Le metallotioneine III a livello cerebrale sono ricche in Zn e, svariati studi hanno sottolineato il ruolo del Cd nell'inibire l'assorbimento di Zn nel SNC (Jin T. *et al.*, 1998; Ishitobi H. *et al.*, 2005; Senger M.R. *et al.*, 2006).

Infine, il Cd non è considerato un agente mutageno ovvero non risulta in grado di provocare effetti a carico del genotipo, mentre sembra promuoverli a livello fenotipico.

Questa ipotesi è stata portata alla luce da uno studio che ha evidenziato come, in seguito ad esposizione a metalli pesanti, si verifichi una diminuzione del grado di metilazione del DNA e come quest'ultima si manifesti clinicamente, a livello cerebrale, con ritardo mentale e comportamenti autistico simili (Shahbazian M.D. *et al.*, 2002).

Nell'insieme i dati dimostrano come il Cd sia associabile alle variazioni biochimiche e funzionali responsabili degli effetti tossici del metallo nel SNC.

1.3 MICROGLIA ED INFIAMMAZIONE DEL SNC

Oggi giorno l'infiammazione è ampiamente riconosciuta dalla comunità scientifica come uno dei fattori scatenanti le patologie che riguardano il SNC (Block M.L. *et al.*, 2007a).

Nuove ricerche hanno evidenziato come la vascolarizzazione encefalica e la glia siano dei fattori al centro del danno cellulare causato dalla flogosi.

I tipi gliali maggiormente coinvolti da questi fenomeni, proprio perché la loro funzione fisiologica è quella di fornire supporto trofico e regolare l'omeostasi neuronale, sono gli astrociti e la microglia.

Gli astrociti hanno svariate funzioni tra le quali quelle di regolare il trasporto di metaboliti diretti al neurone, di permettere il trasporto degli stessi (Theusen O.B. *et al.*, 2010), di mantenere l'omeostasi ionica a livello della barriera emato-encefalica, tamponando l'eccesso di neurotrasmettitori, di favorire la secrezione di fattori neurotrofici e, infine, di contribuire al mantenimento delle connessioni glia-neuroni (Seifert G. *et al.*, 2006). Alcuni studi hanno messo in evidenza come, sia nell'animale che nell'uomo, l'esposizione a inquinanti ambientali provochi, a livello cerebrale, un'attivazione astrocitaria caratterizzata da aumento dell'espressione di GFAP (glial fibrillary acidic protein), IL-6 (interleuchina-6) e TNF- α (tumor necrosis factor α) (Calderon-Garciduenas L. *et al.*, 2008a; Araneda S. *et al.*, 2008).

La microglia, viene considerata alla stregua di un cellula macrofagica e quindi responsabile della difesa immunitaria all'interno del SNC.

L'attività macrofagica delle cellule microgliali si estrinseca solo in particolari condizioni patologiche, di cui Alzheimer e Parkinson ne sono un tipico esempio. Al riguardo, alcuni studi effettuati su campioni autoptici prelevati da soggetti affetti da patologie neurodegenerative, hanno riscontrato che, in risposta a esposizione cronica di inquinanti ambientali, si registra un elevato livello di CD-14, la cui espressione si manifesta solo in caso di danno tissutale (Calderon-Garciduenas L. *et al.*, 2008a).

Se da una parte l'attivazione della microglia ha un ruolo protettivo nei confronti del SNC (come si verifica ad esempio in presenza delle proteine A β delle placche amiloidi nei soggetti affetti da Alzheimer (Koenigsknecht J. *et al.*, 2004)), dall'altra la cronicizzazione di tale attivazione può diventare dannosa (Block M.L. *et al.*, 2007b).

Infatti, studi *in vitro* su co-culture neuroni-microglia hanno dimostrato che l'attivazione delle cellule microgliali conseguente a stimoli tossici, provoca il rilascio di fattori pro-infiammatori che, a loro volta, innescano una lunga cascata segnalatoria che ha come effetto finale quello di indurre la morte neuronale (Block M.L. *et al.*, 2004). Queste osservazioni sono state confermate da svariati studi sia su animali che nell'uomo in cui è stato visto come l'esposizione ad inquinanti ambientali a livello cerebrale provochi un aumento di CD-14, CD-68 e CD-163, (rispettivamente, co-recettore per il legame con i lipopolisaccaridi batterici, glicoproteina che lega le lipoproteine a bassa densità, recettore per il complesso emo-aptoglobulina, tutti espressi sulla membrana di cellule appartenenti al sistema immunitario) proprio in quelle aree cerebrali, (corteccia frontale, nervo vago e *substantia nigra*) maggiormente interessate nella patologie degenerative (Calderon-Garciduenas L. *et al.*, 2008a; Calderon-Garciduenas L. *et al.*, 2008b).

Oltre allo stadio attivato, la microglia è caratterizzata da altri due stati di attività; uno di questi è rappresentato dalla microglia "a riposo" il cui compito è quello di sorvegliare e

proteggere le aree neuronali circostanti da eventuali danni (Stollg G. *et al.*, 1999). Morfologicamente le cellule sono caratterizzate da un corpo cellulare piccolo da cui emergono prolungamenti più o meno ramificati che hanno il compito di scansionare l'ambiente circostante. In risposta ad eventi traumatici o patologici, le cellule si attivano assumendo un aspetto ameboide, che varia da una forma globulare e con pochi e corti prolungamenti, nel caso la cellula stia svolgendo funzioni macrofagiche (Wake H. *et al.*, 2009), a quella globosa e priva di prolungamenti nel caso l'attività si estrinsechi principalmente nella secrezione di molecole pro-infiammatorie (figura 6).

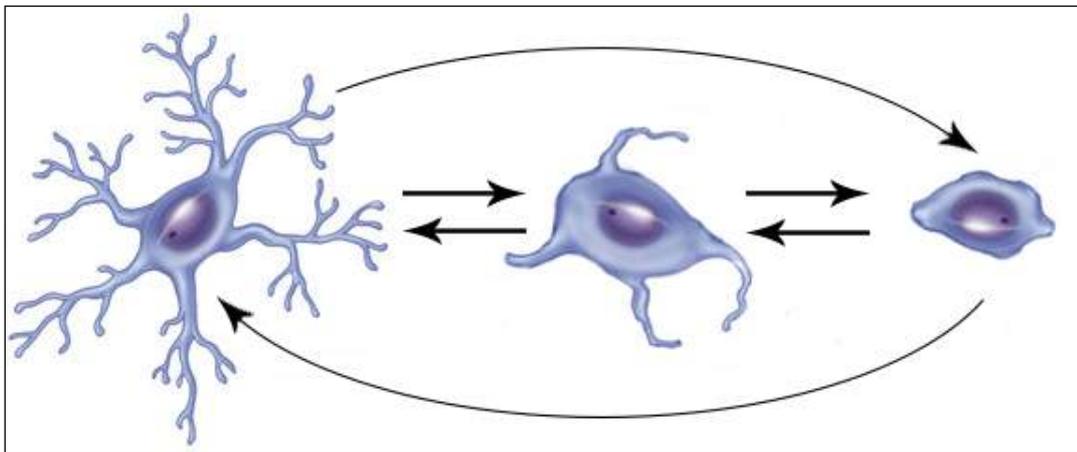


Figura 6: rappresentazione schematica dei tre stadi microgliali. A sinistra, cellula microgliale "a riposo" caratterizzata da numerosi prolungamenti ramificati. Nel centro, una cellula attiva "ameboide" con pochi prolungamenti principalmente atti alla fagocitosi. A destra, cellula "attiva" non fagocitica caratterizzata dall'assenza dei prolungamenti citoplasmatici ma in grado di produrre molecole pro-infiammatorie. Inoltre, le cellule microgliali sono in grado di passare da uno stato all'altro come indicato dalle frecce.

È fondamentale sottolineare che l'importanza della microglia non si esplica solo quando si trova nello stato attivato, ma che essa ha anche l'importante ruolo di mantenere l'omeostasi neuronale quando si trova nello stato cosiddetto "a riposo". Infatti, grazie ai numerosi prolungamenti citoplasmatici possiede un'elevata mobilità (Nimmerjahn A. *et al.*, 2005) che le permette di stabilire contatti transienti con sinapsi, neuroni, astrociti e vasi sanguigni (Wake H. *et al.*, 2009). Quest'ultima caratteristica, accompagnata dal rilascio di fattori

neurotrofici, rende la microglia fondamentale nella plasticità neuronale, nella neurogenesi e nella formazione della memoria, come dimostrato in individui non affetti da patologie neurodegenerative (Morris G.P. *et al.*, 2013). A questo proposito, nel 2013 è stato evidenziato come l'invecchiamento di tale popolazione gliale sia implicato nel deterioramento della plasticità sinaptica e nella diminuzione della connettività neuronale (Wong W.T., 2013).

Precedentemente infatti, alcuni ricercatori avevano messo in evidenza come la microglia fosse in grado di fagocitare le connessioni sinaptiche deboli e/o inattive, favorendo così la nascita di nuove connessioni e ridefinendo i circuiti neuronali (Schafer D.P. *et al.*, 2012; Paolicelli R. *et al.*, 2011).

Considerando tutte le informazioni sopra descritte, è abbastanza ragionevole dedurre che in pazienti affetti da Alzheimer e DSA, danni alla connettività neuronale possano essere causati dall'alterazione del complesso circuito che si stabilisce tra gli elementi della triade neuroni-astrociti-microglia.

Durante le prime fasi dello sviluppo la microglia ha l'importante ruolo di controllare ed eliminare le sinapsi che sono presenti in eccesso per stabilire una corretta connettività neuronale (Campbell G. *et al.*, 1992; Huberman A.D. *et al.*, 2008; Tang G. *et al.*, 2014). Quest'ultima considerazione ci fa comprendere come nel DSA, una malattia fortemente legata al neurosviluppo, il malfunzionamento microgliale causi uno squilibrio tra sinapsi eccitatorie e sinapsi inibitorie, aggravando la malattia sino a livelli critici (Paolicelli R.C. *et al.*, 2011).

Suzuki e colleghi hanno inoltre dimostrato che la microglia è particolarmente attiva in alcune regioni encefaliche, quali il cervelletto e il giro del cingolo in soggetti affetti da DSA (Suzuki K. *et al.*, 2013).

Considerando invece l'Alzheimer, durante la progressione della malattia è stato visto un aumento del numero di cellule microgliali attive. Tale attivazione sembra causata dall'adesione tra la cellula di microglia e la porzione N-terminale delle proteine A β (Kitazawa M. *et al.*, 2004) e scaturisce dall'esigenza di eliminare le placche amiloidi che vengono avvertite come strutture estranee. Una volta attivata, la microglia produce fattori infiammatori come citochine, TNF- α , IL-1, IL-6, prostaglandine, che accelerano la degenerazione e la morte neuronale per necrosi (McDonald D.R. *et al.*, 1997; Block M.L. *et al.*, 2007a). L'attivazione della risposta immunitaria in questo caso esita inevitabilmente in apoptosi neuronale e deterioramento sinaptico promuovendo un decremento cognitivo cronico e progressivo (Akiyama H. *et al.*, 2000).

In letteratura sono presenti numerosi studi che sottolineano come il rilascio di questi fattori pro-infiammatori sia particolarmente abbondante a livello della *substantia nigra*, affliggendo di conseguenza i neuroni di natura dopaminergica. Questo è il principale motivo per cui molte cure prevedono l'impiego di farmaci che proteggano le cellule dopaminergiche da morte per necrosi neuronale (Kurkowska-Jastrzebska I. *et al.*, 2002).

D'altra parte però, l'attivazione microgliale nella patologia di Alzheimer possiede anche un'altra peculiarità: infatti essa è adibita alla rimozione dei depositi delle proteine A β e a secernere fattori neurotrofici per il sostentamento neuronale e la protezione cerebrale (Surh Y.J. *et al.*, 2009; D'Andrea M.R. *et al.*, 2004; Koenigsnecht J. *et al.*, 2004).

Inoltre, la microglia è anche in grado di promuovere da parte del neurone la secrezione di fattori di crescita in grado di promuovere la riparazione tissutale (Polazzi E. *et al.*, 2002) e l'interazione con altre cellule del sistema immunitario a livello dell'area infiammata (Raivich G. *et al.*, 2004).

Spostando l'attenzione sul morbo di Parkinson, per molti anni hanno avuto notevole considerazione le ipotesi circa un coinvolgimento della componente microgliale. In particolare, a livello della *substantia nigra*, l'aumento dello stress ossidativo che si

riscontra nei neuroni dopaminergici sembra essere causato dall'attivazione delle cellule microgliali e quindi dal rilascio di molecole pro-infiammatorie che promuovono il deterioramento progressivo del tessuto nervoso (Bronstein D.M. *et al.*, 1995; Araki E. *et al.*, 2001; Liu B. *et al.*, 2002; Qin L. *et al.*, 2002). Questi dati sono stati ampiamente confermati dal ruolo neuroprotettivo posseduto da stimoli e/o farmaci anti-infiammatori, (Liu Y. *et al.*, 2003; Qian L. *et al.*, 2006; Qian L. *et al.*, 2007) risultati molto efficaci nell'inibire la progressione o addirittura nel revertire il corso della patologia (Rock R.B. *et al.*, 2006; Mosley R.L. *et al.*, 2006).

2 OBIETTIVO DELLA RICERCA

Lo scopo della ricerca proposta è quello di determinare i meccanismi molecolari che sottendono ai danni neuronali indotti dalla presenza di Cd, in modo da poter comprendere come meglio contrastare la tossicità del metallo pesante. Inoltre, lo studio si propone di valutare come altre componenti cellulari del sistema nervoso, in particolare la microglia, possa essere di aiuto nel ristabilire la plasticità sinaptica contrastando la perdita di connessioni interneuronali in un modello di studio *in vitro*.

3 MATERIALI E METODI

3.1 LINEE CELLULARI

L'attività di ricerca durante il periodo di dottorato si è concentrata su tre differenti linee cellulari del sistema nervoso: una linea cellulare neuronale (SH-SY5Y) e due linee cellulari microgliali, una murina (BV-2) e l'altra umana (C13NJ) allo scopo di valutare l'azione neuroprotettiva e neurotossica di alcune molecole.

3.1.1 SH-SY5Y

La linea cellulare continua SH-SY5Y deriva da cellule di neuroblastoma umano, rappresentativa di neuroni dopaminergici tipici dell'area nigro-striatale. Questa linea cellulare, sebbene sia derivata da neuroblastoma, nel campo delle neuroscienze è considerata un valido modello cellulare (Agholme L. *et al.*, 2010). Infatti tali cellule non solo rappresentano un ottimo strumento per studiare la biologia di malattie neurodegenerative (Xie H.R. *et al.*, 2010) ma sono anche utilizzate per valutare gli effetti neuroprotettivi di molte sostanze (Thapa A. *et al.*, 2013).

Dal punto di vista morfologico (figura 7), la linea cellulare presenta le tipiche caratteristiche dei neuroni in coltura, dotati di un corpo di forma poligonale, a volte allungato/fusiforme, da cui emergono prolungamenti citoplasmatici più o meno lunghi che si distendono sul substrato per raggiungere i vicini gruppi di neuroni in modo da stabilire multiple e talora complesse connessioni.

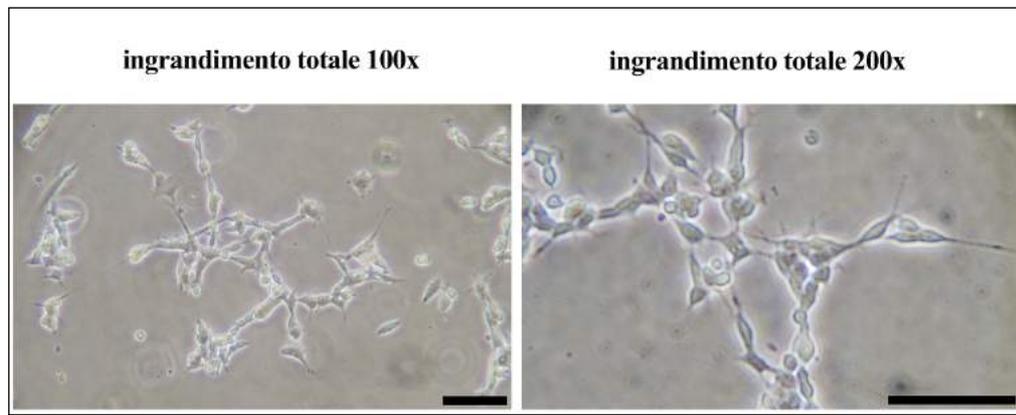


Figura 7: immagine digitale a contrasto di fase della linea cellulare SH-SY5Y. Barra = 100 μ m.

La linea cellulare è stata acquistata dall'Istituto Zooprofilattico dell'Emilia e della Romagna (Brescia) e all'arrivo in laboratorio è stata espansa su capsule Petri (100 mm di diametro) per poterne ottenere delle aliquote da crio-conservare in azoto liquido. La coltura cellulare è stata mantenuta nel suo terreno di crescita formato da 50 %DMEM/50% Ham's F12 (EuroClone S.p.A., Milano) con l'aggiunta di L-Glutamina 2 mM (Carlo Erba Reagents, Milano) e 10% FBS (Foetal Bovine Serum - siero bovino fetale) (Carlo Erba Reagents, Milano). Al raggiungimento della sub-confluenza (80% della superficie della piastra) le cellule, una volta staccate dal substrato tramite una soluzione di Tripsina/EDTA 0,05%/0,02% (EuroClone S.p.A., Milano) sono state suddivise in rapporto 1:2 o 1:3 e coltivate su nuovi supporti. Le cellule sono state mantenute in incubatore alla temperatura di 37°C, 5% di CO₂ e in condizioni di atmosfera umidificata. Il terreno di coltura è stato rinnovato ogni 3-4 giorni. Al fine di condurre gli esperimenti, le cellule sono state staccate dal substrato, contate mediante emocitometro e piastrate a densità differente a seconda degli esperimenti.

Per valutare la vitalità cellulare, sono state piastrate 2×10^4 cellule per pozzetto su di un multipozzetto da 96 pozzetti in un volume totale di 100 μ l per pozzetto. Per quanto riguarda invece le indagini di morfologia cellulare, il numero di cellule utilizzato è stato di 10^5 cellule per vetrino copri-oggetto/pozzetto in un volume iniziale totale di 200 μ l per

vetrino. Infine, per valutare l'espressione di specifiche proteine mediante la tecnica di western blotting, è stato necessario utilizzare 10^7 cellule in piastre Petri da 100 mm di diametro.

3.1.2 BV-2

La linea cellulare BV-2 è stata ottenuta infettando con un retrovirus murino, utilizzato come veicolo degli oncogeni *v-raf* e *v-myc*, colture cellulari primarie microgliali di topi appena nati C57Bl/6 (Blasi E. *et al.*, 1990). Nel nostro caso, la linea cellulare è stata acquistata dalla Banca Biologica e Cell Factory - Centro di Risorse Biologiche-IRCCS Azienda Ospedaliera Universitaria, San Martino - IST - Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro (Genova), ed è stata scelta in base ai dati riportati in letteratura (Lin Y.C. *et al.*, 2007; Gibbons H.M. *et al.*, 2006). Morfologicamente la linea cellulare presenta tutte le caratteristiche proprie della microglia in cui sono apprezzabili le cellule "a riposo" particolari per la presenza di estroflessioni citoplasmatiche più o meno ramificate (figura 8).

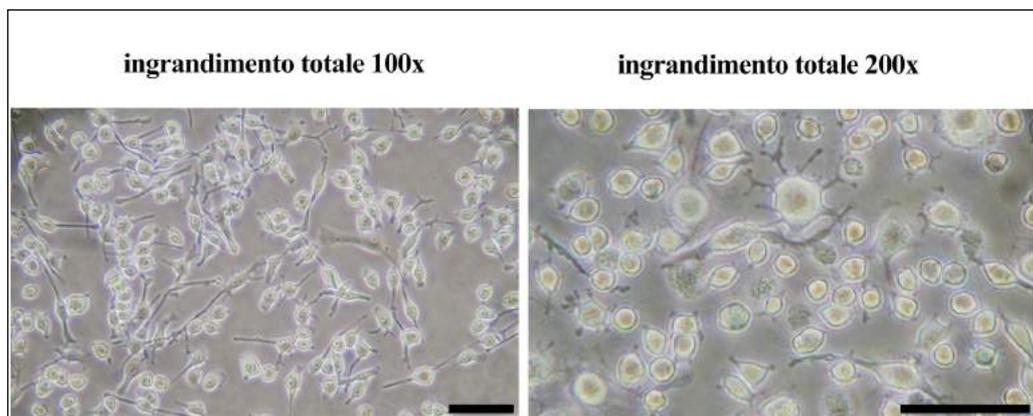


Figura 8: immagine digitale a contrasto di fase della linea cellulare BV-2. Barra = 100 μ m.

La quota di cellule ramificate presenti nella coltura è esigua poiché, anche in assenza di stimolo, come riportato in letteratura, le cellule microgliali risultano in uno stato parzialmente attivato.

La linea cellulare è mantenuta in terreno di crescita completo composto da RPMI 1640 (EuroClone S.p.A., Milano), L-Glutamina 2 mM e 10% FBS; all'arrivo in laboratorio è stata espansa su capsule Petri (100 mm di diametro) per poterne ottenere delle aliquote da crio-conservare. La linea cellulare è stata mantenuta in incubatore alla temperatura di 37°C, 5% di CO₂ e in condizioni di atmosfera umidificata. Le caratteristiche di questa linea cellulare sono quelle di crescere in semi-sospensione e di possedere un alto tasso di duplicazione, tanto da richiedere dei passaggi 1:2 o 1:3 ogni due/tre giorni in nuove piastre. Al fine di valutare gli effetti di alcune sostanze sulla vitalità cellulare, sono state piastrate 3×10^3 BV-2 in ciascun pozzetto di un multipozzetto da 96 pozzetti in un volume totale di 100 µl per pozzetto. Per quanto riguarda la valutazione della proliferazione mediante colorazione vitale Trypan Blue, sono state utilizzate 10^5 cellule per punto sperimentale, piastrate nei pozzetti di un multipozzetto da 6 pozzetti in un volume totale di 1 ml. Le osservazioni al microscopio ottico dopo colorazione citologica con ematossilina/eosina, hanno richiesto un numero pari a 3×10^4 cellule su vetrino copri-oggetto/pozzetto in un volume iniziale totale di 200 µl su ciascun vetrino. Invece, 4×10^6 cellule, che corrispondono ad uno stato di confluenza sulla superficie di una piastra Petri di 100 mm di diametro, sono state utilizzate per poter valutare l'espressione di proteine specifiche, come ad esempio marcatori di attivazione microgliale, mediante western blotting.

3.1.3 C13NJ

Poiché la linea cellulare BV-2 è di origine murina, e poiché il passo successivo alla valutazione degli effetti di alcuni stimoli sulle due linee cellulari ci ha portato ad effettuare

una co-coltura neuroni-microglia, si è reso necessario cercare una linea cellulare microgliale umana.

La linea cellulare C13NJ (Peudenier S. *et al.*, 1991), gentilmente donata dal Dott. Jean Mazella (Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, Centre National de la Recherche Scientifique, Université de Nice-Sophia Antipolis, Valbonne, Francia), è stata mantenuta in DMEM, L-Glutamina 2 mM, 10% FBS con l'aggiunta di antibiotici (penicillina-streptomina) all'1% (Carlo Erba Reagents, Milano). La linea cellulare prevede cambiamenti di terreno di coltura ogni 2 giorni e passaggi 1:2 su nuove piastre quando la superficie cellulare ricopriva l'80% del substrato. Le cellule, come di consueto, sono state mantenute in incubatore a 37°C 5% CO₂ e atmosfera umidificata. Dal punto di vista morfologico (figura 9) la linea cellulare microgliale umana non rispecchia le caratteristiche microgliali comunemente descritte per le linee murine; in questo caso infatti non sono distinguibili le tre differenti tipologie di microglia come invece lo erano per la linea cellulare microgliale murina.

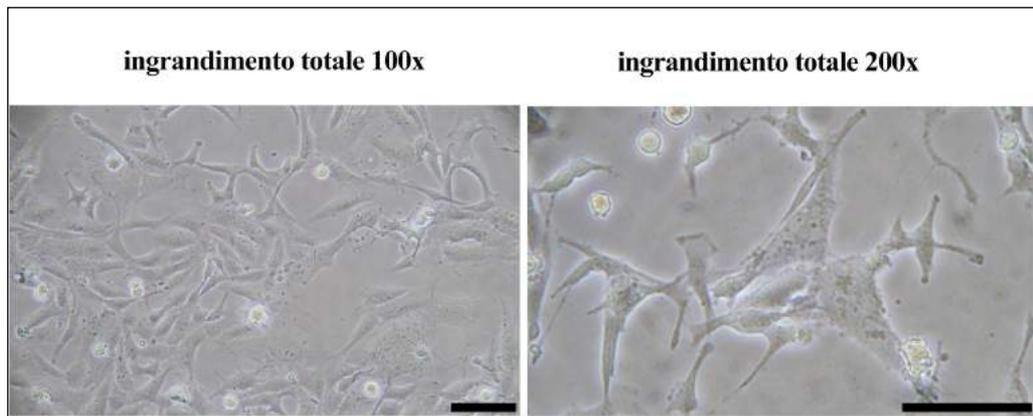


Figura 9: immagine digitale a contrasto di fase della linea cellulare C13NJ. Barra = 100 μ m.

Tutte le cellule presentano un aspetto prevalentemente fusiforme con pochi e corti prolungamenti citoplasmatici che certamente non riflette la tipica morfologia microgliale. Per i saggi di vitalità cellulare sono state necessarie 10⁴ cellule per pozzetto di un

multipozzetto da 96 pozzetti in un volume totale di 100 μl per pozzetto. La proliferazione cellulare mediante colorazione vitale Trypan Blue ha richiesto la piastratura di 10^5 cellule/pozzetto per punto sperimentale, utilizzando un multipozzetto da 6 pozzetti in un volume totale di 1 ml. Per quanto riguarda invece le analisi di morfologia cellulare sono state necessarie 5×10^4 cellule per vetrino copri-oggetto/pozzetto in un volume iniziale totale di 200 μl . L'analisi dell'espressione proteica mediante western blotting ha richiesto invece, ancora una volta, la confluenza cellulare sul substrato che si raggiunge quando le cellule sono in numero di 4×10^6 .

3.2 STIMOLI

Cloruro di cadmio - CdCl_2 : si tratta di un sale di Cd che è stato acquistato dalla ditta Sigma Aldrich (Milano) disciolto in 1 ml di soluzione fisiologica alla concentrazione di 0,1 M, sterile. Le differenti diluizioni sono state eseguite in PBS (Phosphate Buffer Saline - tampone fosfato salino); lo stesso volume è stato aggiunto ai punti sperimentali di controllo corrispondenti a cellule non trattate.

Cloruro di zinco - ZnCl_2 : anche il sale di Zn è stato acquistato dalla ditta Sigma Aldrich (Milano) ed è arrivato disciolto in 50 ml di soluzione fisiologica sterile alla concentrazione di 0,1 M. Le differenti diluizioni, necessarie per i punti sperimentali degli esperimenti, sono tutte state eseguite in PBS sterile sino ad ottenere le concentrazioni desiderate nelle differenti prove.

Cannabidiolo – CBD: il CBD è stato acquisito dalla ditta Sigma Aldrich (Milano) ed è arrivato in polvere da sospendere in Etanolo (EtOH). Le concentrazioni necessarie, una volta ottenuta una concentrazione di partenza di 32 mM in EtOH e filtrata con filtri di porosità 0,2 μm , sono state effettuate in PBS sterile in modo tale da ridurre al minimo le

tracce di EtOH che avrebbe potuto interferire con la vitalità cellulare e con le altre valutazioni da noi effettuate.

Selenito di sodio - Na_2SeO_3 : si tratta di un sale selenio (Se) acquistato dalla Sigma Aldrich (Milano). Il Na_2SeO_3 è arrivato in polvere che è stata prima diluita in PBS, poi filtrata con filtri di porosità 0,2 μm , e successivamente diluita nuovamente in PBS sterile sino ad ottenere le concentrazioni idonee per condurre gli esperimenti.

Vitamin D Binding Protein-Oleic Acid - VDBP-OA: si tratta della proteina di legame della vitamina D con l'aggiunta dell'Acido Oleico (OA, Oleic Acid) cui è stato complessato al fine di poterne aumentare la stabilità a livello della membrana plasmatica ed aumentare l'effetto di attivatore macrofagico (Williams M.H. *et al.*, 1988; Camell C. *et al.*, 2013). La molecola è stata acquistata dalla ditta ImmunoBiotech Ltd. (Guernesey, UK) ed è arrivata in laboratorio sterile, diluita in PBS alla concentrazione di 8 nM. Per tale motivo la concentrazione massima che è stata utilizzata negli esperimenti era di 800 pM. Tutte le diluizioni sono state effettuate in PBS sterile.

3.3 SAGGIO DI VITALITÀ CELLULARE (WST-8)

Per valutare la tossicità o la neuro-protezione delle molecole sopra elencate, è stato deciso di impostare un saggio di vitalità cellulare che consiste nell'utilizzo di un sale di tetrazolio 2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitro-phenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H (WST-8) che viene ridotto dall'attività delle deidrogenasi cellulari totali a formazano, un prodotto cromogenico artificiale il cui colore vira dal giallo all'arancio intenso a seconda della attività metabolica delle cellule oggetto dell'analisi. Il saggio, che consiste in una soluzione di 5 ml di colore rosa contenente il sale di tetrazolio (WST-8), è stato acquistato dalla ditta Sigma Aldrich (Milano). Al fine di valutare l'attività metabolica delle differenti linee cellulari in presenza dei diversi stimoli, le cellule sono state prima staccate dal loro

substrato, poi sono state contate mediante emocitometro ed un numero adeguato è stato piastrato in ciascun pozzetto di un multipozzetto da 96 pozzetti in modo da ottenere 5 replicati per ciascun punto sperimentale. Passate 24 ore dalla piastratura delle linee cellulari nell'appropriato terreno di crescita, il tempo necessario alle cellule per aderire al substrato dei pozzetti, il terreno di coltura è stato sostituito con del terreno di starvazione, cioè terreno completo di crescita privo di FBS, che è stato lasciato per 24 ore in modo da indurre le cellule ad arrestare la loro progressione nel ciclo cellulare. Le 24 ore di starvazione hanno caratterizzato tutti gli esperimenti qui riportati prima di effettuare qualsiasi tipo di stimolazione sulle diverse linee cellulari. Dopo il periodo di starvazione, le cellule sono state trattate con i differenti stimoli a differenti concentrazioni per 24 e/o 48 ore a seconda della tipologia di esperimento.

Per quanto riguarda gli esperimenti di vitalità cellulare impostati per indagare gli effetti neuroprotettivi di $ZnCl_2$, CBD, Na_2SeO_3 e VDBP-OA nei confronti di $CdCl_2$, questi sono stati aggiunti al terreno di starvazione 24 ore prima che fosse aggiunto il $CdCl_2$ e mantenuto per la durata di 24 ore; in tal modo, gli stimoli neuroprotettivi sono rimasti nel terreno di starvazione per un totale di 48 ore. Al termine di ciascun trattamento, il terreno di starvazione contenente i differenti stimoli, è stato sostituito con del nuovo terreno di starvazione nel volume finale di 100 μ l a cui sono stati aggiunti 10 μ l di soluzione cromogena WST-8. Il multipozzetto così allestito è stato posto in incubatore alla temperatura di 37°C. Dopo 3 ore di incubazione, il multipozzetto da 96 pozzetti è stato alloggiato all'interno di un fotometro MULTISCAN FC (Thermo Scientific, Milano) con filtro posizionato alla lunghezza d'onda di 450 nm. L'assorbanza (O.D. - Optical Density) è stata letta direttamente dallo strumento che ha registrato i dati per ciascun pozzetto. Ciascun punto sperimentale è stato effettuato in quintuplicato, e ciascun esperimento è stato ripetuto tre volte.

3.4 TRYPAN BLUE – PROLIFERAZIONE CELLULARE

Poiché il test di vitalità cellulare è molto spesso utilizzato come saggio di proliferazione cellulare, è stato deciso di verificare se un aumento della vitalità cellulare fosse dovuto ad un aumento del numero di cellule oppure ad un aumento dell'attività metabolica delle stesse. A questo proposito un incremento di vitalità cellulare/attività metabolica può essere dovuto ad un differenziamento della linea cellulare oltre che ad una proliferazione cellulare. A questo scopo, le cellule sono state prima staccate dal substrato su cui sono state fatte crescere in terreno di crescita completo, sono state contate mediante emocitometro e sono state piastrate in dei pozzetti di un multipozzetto da 6 in terreno di crescita completo. Passate 24 ore, le cellule hanno subito il processo di starvazione e successivamente, sempre in terreno di starvazione, sono state stimulate. Dopo 24 o 48 ore di trattamento, il terreno di starvazione contenente gli stimoli è stato rimosso, le cellule sono state staccate dai substrati mediante una soluzione di Tripsina/EDTA e risospese in 1 ml di volume di terreno di starvazione. Un'aliquota è stata prelevata dalla sospensione cellulare e miscelata in una provetta da 2 ml con uno stesso volume di colorante vitale Trypan Blue (Sigma Aldrich, Milano). Dopo 1 minuto circa, il tempo necessario al colorante di penetrare la membrana delle cellule morte, è stato contato il numero di cellule vive mediante emocitometro (figura 10). Ciascun punto sperimentale è stato effettuato in duplicato, e ciascun esperimento è stato ripetuto tre volte.

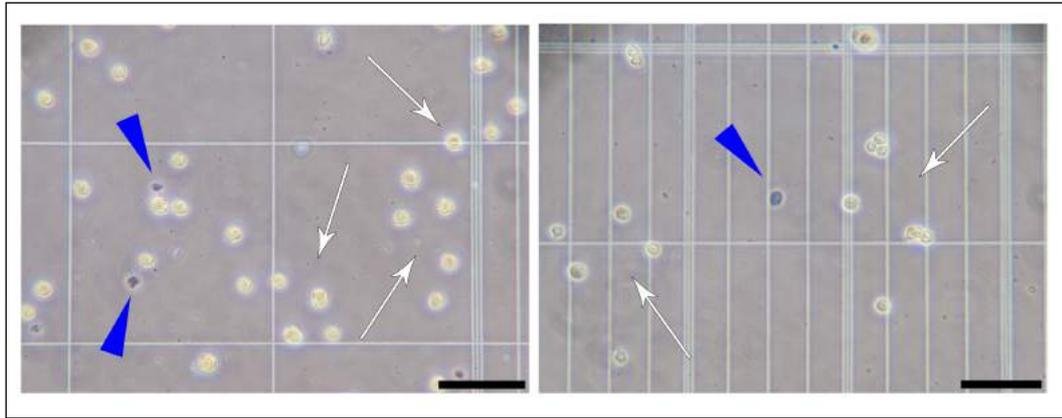


Figura 10: conteggio cellulare mediante colorante vitale Trypan Blue. Immagini a contrasto di fase di sospensione cellulare posizionata su emocitometro. Sono evidenti cellule morte, colorate in blu (teste di freccia blu) e cellule vive rifrangenti (freccie bianche). Barra = 100 μm .

3.5 MORFOLOGIA CELLULARE

Al fine di valutare la morfologia cellulare mediante l'ausilio della microscopia ottica, è stata effettuata una colorazione citologica con ematossilina-eosina. Dopo aver staccato le cellule dal substrato su cui precedentemente erano state fatte crescere, queste sono state contaminate ed un numero adeguato è stato sospeso in un volume totale di terreno completo di 200 μl . Con l'ausilio di una micropipetta, la sospensione cellulare è stata distribuita solo sulla superficie del vetrino copri-oggetto sterile precedentemente alloggiato nei pozzetti di un multipozzetto da 6 pozzetti. Passate circa 8 ore, in modo da permettere alle cellule di aderire al vetrino, è stato aggiunto il restante (800 μl) terreno completo fino al raggiungimento di 1 ml totale di soluzione appropriata alla linea cellulare in esame. Il giorno seguente, alle cellule è stato sostituito il terreno completo con il terreno di starvazione. Passate 24 ore, gli stimoli sono stati aggiunti a del nuovo terreno di starvazione per 24 e/o 48 ore a seconda delle esigenze sperimentali. Al termine della stimolazione, il terreno di starvazione contenente i vari stimoli è stato rimosso e sono stati eseguiti due lavaggi sequenziali in PBS. Rimosso il PBS, ad ogni vetrino copri-oggetto/pozzetto è stato aggiunto 1 ml di paraformaldeide (PFA) allo 0,5% che è stata

lasciare agire per 10 minuti. La PFA 0,5% è stata così rimossa dai vetrini copri-oggetto/pozzetti, ed ulteriori due lavaggi in PBS sono stati effettuati. La procedura di fissazione è terminata lasciando asciugare i vetrini, inclinati di 45° su carta assorbente, a temperatura ambiente sotto cappa chimica. I vetrini così manipolati possono essere conservati a -20°C. Al momento della colorazione con ematossilina-eosina, i vetrini sono stati lasciati a temperatura ambiente per 10 minuti e successivamente è stata seguita una procedura standard di colorazione definita nei seguenti passaggi eseguiti sotto cappa chimica:

- acqua distillata (3-5 secondi);
- ematossilina (6 minuti);
- acqua corrente (5 minuti);
- acqua distillata (3-5 secondi);
- eosina (3 minuti);
- alcol 80% (3 secondi);
- alcol 95% (3 secondi);
- alcol 100% (3 secondi);
- xilolo (3 secondi).

I vetrini a questo punto sono stati sovrapposti a dei vetrini porta-oggetto, in modo che le cellule si trovassero tra le due superfici di vetro, e fatti aderire tra loro mediante balsamo del Canada (Carlo Erba Reagents, Milano). I vetrini così montati sono stati lasciati ad asciugare a temperatura ambiente tutta la notte ed il giorno seguente sono stati osservati al microscopio ottico Zeiss Axioskop 20 (Carl Zeiss S.p.A., Milano); grazie all'ausilio di una fotocamera digitale Nikon Coolpix 990 (Nikon Instrument, Milano) connessa al microscopio sono state acquisite immagini a differenti ingrandimenti.

3.6 WESTERN BLOTTING

Per poter determinare l'espressione di specifiche proteine intracellulari, si è resa necessaria la tecnica del western blotting. Le cellule, dopo essere state staccate dal substrato e contate, sono state piastrate in terreno completo, alla densità desiderata, su dei nuovi supporti di una piastra Petri da 100 mm di diametro. Il giorno successivo hanno subito il processo di starvazione e successivamente le differenti linee cellulari sono state stimolate con differenti sostanze a varie concentrazioni per 24 e/o 48 ore di trattamento. Terminato il periodo di stimolazione, le cellule sono state staccate mediante uno scraper e sono state raccolte con il proprio terreno di starvazione, contenente i differenti stimoli, in delle provette da 15 ml. La sospensione cellulare è stata centrifugata per 10 minuti, a 1.000 rpm, a temperatura ambiente. Il sovrnatante ottenuto è stato rimosso ed è stato effettuato un lavaggio in PBS al fine di rimuovere i possibili residui di stimolo e di terreno di starvazione. La nuova sospensione cellulare, in PBS, è stata nuovamente centrifugata per 10 minuti, a temperatura ambiente, a 1.000 rpm. Il sovrnatante è stato nuovamente rimosso ed il pellet ottenuto è stato trattato con una soluzione di tampone di lisi a pH 7 (composto da: Tris 50 mM pH 7 – NaCl 150 mM – Triton X-100 1% – EDTA 1,5 mM – SDS 0,25 mM) con l'aggiunta di una miscela di inibitori di proteasi (Protease inhibitors cocktail – 100x solution, Sigma Aldrich, Milano). La soluzione, 200 μ l per ciascun punto sperimentale/pellet, è stata lasciata agire per 30 minuti in delle provette da 2 ml agitandole mediante vortex ogni 5 minuti. Al termine dei 30 minuti, l'omogenato è stato sottoposto a centrifugazione a 12.000 rpm, per 10 minuti, alla temperatura di 4°C. Al termine della centrifugazione, il pellet è stato scartato ed il sovrnatante è stato analizzato con il metodo Bradford (Bradford M.M., 1976) per determinare la concentrazione proteica del lisato cellulare. Una volta ottenuta la concentrazione proteica del lisato cellulare, una concentrazione uguale di proteine (30 μ g) è stata aggiunta ad una soluzione tampone (Sample Buffer, contenente: Tris 250 mM – Glicerolo 20% – SDS 8% – β -

Mercaptoetanolo 20% – Blu di Bromofenolo – acqua distillata). Quindi la soluzione è stata caricata nei pozzetti di un gel al 12% di poliacrilammide (acrylamide/bis-acrylamide 30% solution, Sigma Aldrich, Milano) precedentemente preparato mediante gli appositi supporti della camera per corsa elettroforetica (Bio-Rad Laboratories S.r.l., Milano) ed immerso in una soluzione tampone (Tris 250 mM – Glicina 2 M – SDS 10% – acqua distillata). La corsa elettroforetica è stata effettuata a 120 volts per 1 ora e 30 minuti circa al termine della quale le proteine sono state trasferite su di una membrana di nitrocellulosa (Porablot NPC; Macherey-Nagel, Carlo Erba Reagents, Milano) (figura 11). Il trasferimento è stato effettuato in tampone Tris 125 mM – Glicina 960 mM – Metanolo 10% – acqua distillata, a 100 volts, per 1 ora.

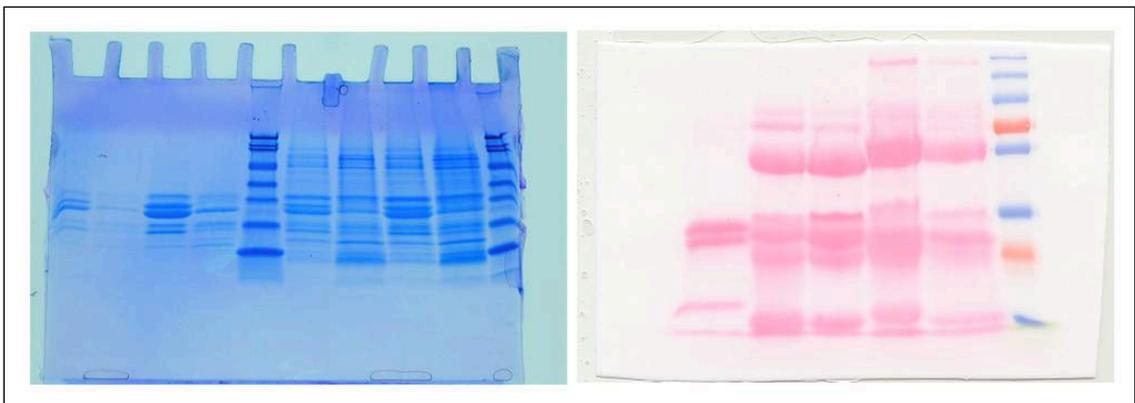


Figura 11: a destra, proteine distribuite lungo il gel di acrilamide al 12% e messe in risalto dopo colorazione con Blue Comassie. A sinistra, proteine trasferite sulla membrana di nitrocellulosa e messe in evidenza dalla colorazione con Rosso Ponceau.

Una volta trasferite le proteine sulla membrana di nitrocellulosa, questa è stata immersa in una soluzione di BSA (Bovine Serum Albumin – albumina di siero bovino) al 5% in TBS-Tween (Tris-Buffered Saline – soluzione salina tamponata con Tris contenente Tween-20 allo 0,1%), in modo tale da bloccare tutti i siti aspecifici. La membrana è stata successivamente incubata a 4°C per tutta la notte con una soluzione di anticorpi primari specifici per GAP-43 (neuromodulina) e B7-2 (CD86) (Santa Cruz Biotechnology, Santa

Cruz, CA, USA) alla diluizione di 1:1.000 in BSA 5%. Il giorno successivo, la soluzione contenente l'anticorpo primario è stata scartata e sono stati eseguiti 3 lavaggi sequenziali in TBS-Tween per rimuovere l'anticorpo primario in eccesso. Al termine dei lavaggi, alle membrane è stato aggiunto l'anticorpo secondario goat anti-mouse HRP (Horse-Radish Peroxidase) IgG (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) alla diluizione 1:5.000 in TBS-Tween. Dopo un'incubazione di 1 ora a temperatura ambiente, l'anticorpo secondario è stato scartato e sono stati seguiti tre lavaggi sequenziali in TBS-Tween, ed un ultimo lavaggio in TBS. Le membrane così trattate sono state incubate per 5 minuti con una soluzione di substrato chemiluminiscente (Amersham ECL Plus Western Blotting Detection Reagent, EuroClone S.p.A., Milano) che, ossidato dall'enzima HRP, emette luce. La luce emessa è rivelata esponendo la membrana di nitrocellulosa ad una lastra autoradiografica (Amersham Hyperfilm ECL, GE Healthcare, Sigma Aldrich, Milano). Le lastre sono state quindi sviluppate, sciacquate in acqua corrente, asciugate e le lastre impressionate sono state scansionate. L'analisi densitometrica delle bande è stata compiuta mediante il software ImageJ (ImageJ; National Institutes of Health; <http://imagej.nih.gov/ij>, 1.47t). I risultati ottenuti sono stati riportati come istogrammi. Ciascun esperimento di western blotting è stato ripetuto 3 volte.

3.7 CO-COLTURA NEURONI/MICROGLIA

Le analisi morfologiche di co-coltura sono state ottenute mettendo insieme due linee cellulari, quella neuronale umana SH-SY5Y, e quella microgliale murina BV-2. Per tale scopo, dopo avere staccato le cellule dai substrati su cui erano state fatte crescere, e dopo averne contato il numero, sono state unite nella stessa soluzione di terreno completo (composto da: DMEM, L-Glutammina 2 mM, FBS 10%) in rapporto 1:10, rispettivamente BV-2 (10.000 cellule) ed SH-SY5Y (100.000 cellule). La notevole differenza nel numero di cellule piastrate per la co-coltura, si è resa necessaria per il fatto che le cellule

microgliali si moltiplicano molto più velocemente rispetto alla linea cellulare neuronale. La sospensione contenente le due linee cellulari in rapporto 1:10 (BV-2:SH-SY5Y) è stata piastrata su dei vetrini copri-oggetto sterili alloggiati all'interno dei pozzetti di un multipozzetto da 6 pozzetti in un volume totale di 200 μ l. Dopo circa 8 ore, alle cellule è stato aggiunto del terreno di crescita completo (800 μ l) per raggiungere il volume totale di 1 ml. Il giorno successivo le cellule hanno subito il processo di starvazione a cui è seguita la stimolazione per 24 e/o 48 ore. Terminato il periodo di stimolazione, il terreno di starvazione contenente i diversi stimoli è stato scartato e sono stati effettuati due lavaggi sequenziali in PBS. A seguire le cellule sono state fissate su vetrino copri-oggetto con PFA 0,5% per 10 minuti e, successivamente alla fissazione, altri due lavaggi in PBS sono stati eseguiti in modo tale da eliminare qualsiasi residuo di PFA 0,5%. I vetrini sono stati così fatti asciugare a temperatura ambiente, inclinandoli di 45° su carta assorbente, per 1 ora e quindi conservati a -20°C. La colorazione citologica con ematossilina-eosina è stata eseguita ricalcando la procedura sperimentale standard descritta nella sezione "3.5 - Morfologia cellulare". Una volta allestiti i vetrini di co-coltura, questi sono stati osservati al microscopio ottico catturando immagini dei campi più rappresentativi mediante fotocamera digitale connessa al microscopio ottico.

3.8 ANALISI STATISTICA

Tutti i dati riportati in questo studio sono espressi come media \pm S.E.M. (Standar Error of the Mean – errore standard della media) come indicato nelle legende delle figure relative. Per determinare differenze statisticamente significative tra i risultati ottenuti, il *t* di Student è stato applicato in tutte le valutazioni sperimentali. Il $p < 0,05$ è stato considerato statisticamente significativo.

4 RISULTATI

4.1 CLORURO DI CADMIO ($CdCl_2$)

L'azione neurotossica del $CdCl_2$ è stata valutata sulla linea cellulare SH-SY5Y, neuroni umani dopaminergici. Nella prima fase dello studio il danno cellulare è stato valutato in termini di vitalità ed attività metabolica trattando le cellule SH-SY5Y con dosi crescenti di $CdCl_2$ per 24 ore. I risultati, riportati in figura 12, hanno evidenziato come le cellule siano suscettibili alla presenza del metallo pesante e come la loro vitalità diminuisca in maniera dose-dipendente all'aumentare della concentrazione di $CdCl_2$ presente nel terreno di coltura. Dall'istogramma si evince inoltre come la concentrazione di $CdCl_2$ 10 μ M sia tossica per le cellule, in quanto ne abbassa l'attività metabolica, ma non letale. Questo punto può essere reso ancora più evidente da un'attenta analisi morfologica. A tale scopo, le cellule sono state piastrate su vetrini copri-oggetto di dimensioni idonee per essere alloggiati all'interno di pozzetti di un multipozzetto da 6 pozzetti; quindi, dopo avere fatto aderire le cellule al substrato le abbiamo trattate con le stesse concentrazioni crescenti di $CdCl_2$ e successivamente fissate in PFA 0,5%. Le immagini, a differenti ingrandimenti, sono state catturate mediante l'ausilio di una fotocamera digitale connessa al microscopio ottico (figura 13). La valutazione morfologica ha messo in evidenza come danni cellulari siano già riscontrabili a carico del citoplasma e della membrana plasmatica dopo un trattamento di 24 ore con $CdCl_2$ 10 μ M. Sono infatti ben riconoscibili detriti cellulari (teste di freccia bianche) e cellule altamente danneggiate in particolare a carico della membrana plasmatica (teste di freccia nere). A questa concentrazione di $CdCl_2$, che è possibile definire sub-letale, sono comunque ancora presenti cellule che hanno mantenuto la tipica morfologia poligonale delle cellule di controllo, non trattate, caratterizzate dalla presenza di prolungamenti citoplasmatici che protrudono dai corpi cellulari (freccie nere). Le tipologie di alterazioni citoplasmatiche sopra descritte, si possono riscontrare a maggior

ragione su cellule trattate con CdCl_2 20 μM dove, tra l'altro, la presenza di detriti cellulari (teste di freccia bianche) e di cellule danneggiate e prive di prolungamenti risulta essere maggiore. Come atteso e come evidenziato dai saggi di vitalità cellulare, all'aumentare della concentrazione del metallo pesante si assiste ad una significativa riduzione del numero di cellule adese al substrato mentre quelle ancora adese mostrano alterazioni molto marcate. I risultati ottenuti sia dall'attività metabolica che dalla analisi morfologica ci hanno fatto scegliere per le nostre indagini come concentrazione ottimale di CdCl_2 quella 10 μM , cioè una dose in grado di danneggiare le cellule ma non così tanto come osservato a concentrazioni più elevate. Tale scelta inoltre è in accordo con quanto riscontrato in letteratura (Chen L. *et al.*, 2008a; Chen L. *et al.*, 2008b) e si colloca nell'ambito della dose tollerabile per l'uomo (0,1 $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{giorno}$).

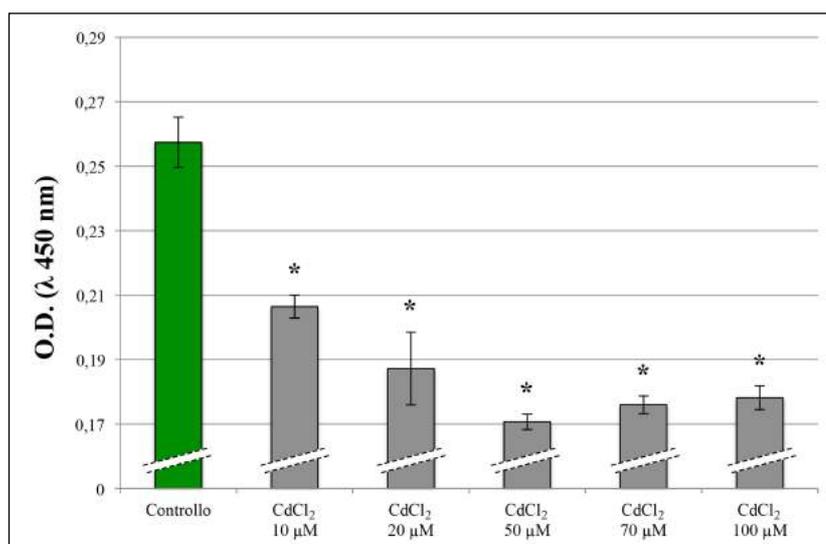


Figura 12: saggio di vitalità cellulare (WST-8) su linea cellulare SH-SY5Y trattata per 24 ore con dosi crescenti di CdCl_2 . I risultati mostrano come la vitalità cellulare e di conseguenza l'attività metabolica diminuiscano in modo dose-dipendente all'aumentare della concentrazione di CdCl_2 . I risultati sono espressi come media \pm S.E.M.. * $p < 0,05$. Ciascun punto sperimentale è stato effettuato in quintuplicato.

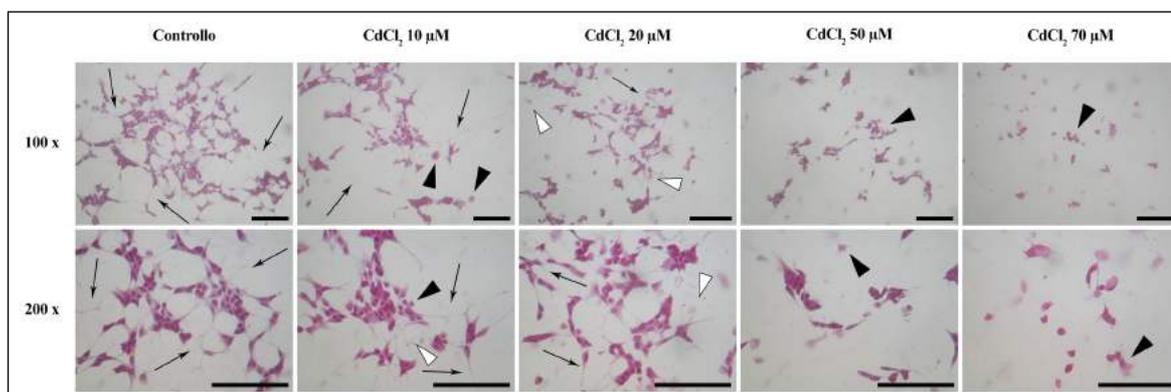


Figura 13: immagini di microscopia ottica. Colorazione citologica con ematossilina-eosina sulla linea cellulare SH-SY5Y trattata per 24 ore con dosi crescenti di CdCl₂. La diminuzione del numero di cellule all'aumentare della concentrazione di CdCl₂ è chiaramente visibile. Inoltre è possibile notare, nei punti sperimentali CdCl₂ 10-20 µM una diminuzione del numero dei prolungamenti citoplasmatici (connessioni intercellulari) rispetto alle cellule non trattate (sinistra). Cellule morte di forma rotondeggiante e con visibile deterioramento dei contorni cellulari sono rappresentate nei restanti pannelli, relativi a CdCl₂ 50-70 µM. Barra = 100 µm.

4.2 CLORURO DI ZINCO (ZnCl₂)

Come noto dalla letteratura scientifica (Chan H.M. *et al.*, 1993; Nordberg M., 1984), uno dei meccanismi utilizzati per rimuovere i metalli pesanti dall'ambiente intracellulare sono le metallotioneine. Le metallotioneine di tipo III sono presenti a livello neuronale, e poiché sono ricche in Zn, è stato valutato anzitutto quali fossero le concentrazioni non tossiche per la linea cellulare SH-SY5Y effettuando una curva dose risposta. Un accurato studio della letteratura scientifica ci ha consentito di individuare le concentrazioni di ZnCl₂ da utilizzare sulla linea cellulare SH-SY5Y. Dai risultati di vitalità cellulare è emerso che le dosi utilizzate non modificano in modo significativo la vitalità cellulare in confronto alle cellule di controllo, non trattate (figura 14). È comunque necessario aggiungere che la concentrazione di ZnCl₂ 70 µM, seppur in modo non significativo, tende ad abbassare l'attività metabolica delle SH-SY5Y che diminuisce significativamente a concentrazioni maggiori come atteso dalla curva dose risposta (dati non mostrati). Tali risultati sono stati

confermati da analisi al microscopio ottico sia a contrasto di fase sia dopo colorazione con ematossilina-eosina; in entrambi i casi l'aspetto morfologico della linea cellulare rimane inalterato rispetto al punto sperimentale di controllo rappresentato da cellule non trattate, (dati non mostrati). Anche in questo caso le cellule sono state esposte alle differenti concentrazioni di $ZnCl_2$ per 24 ore.

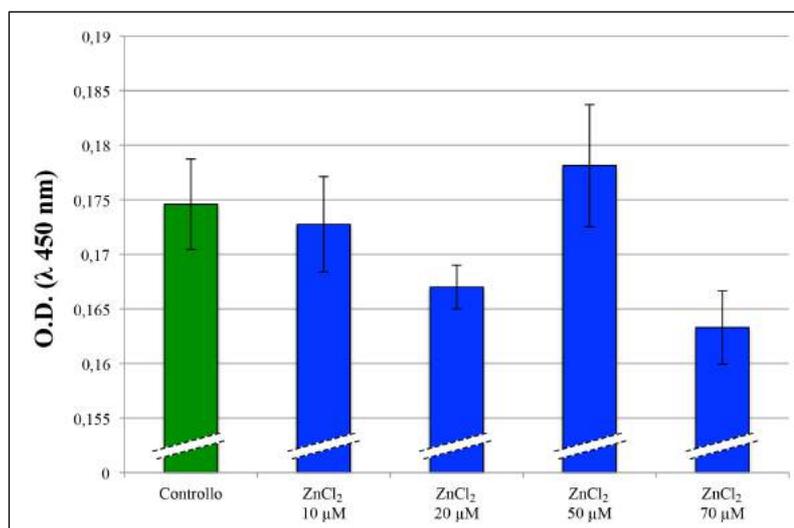


Figura 14: saggio di vitalità cellulare (WST-8) sulla linea cellulare SH-SY5Y trattata per 24 ore con dosi crescenti di $ZnCl_2$. L'istogramma evidenzia come la vitalità cellulare dei neuroni trattati con $ZnCl_2$ non sia alterata rispetto al punto sperimentale di controllo dopo 24 ore di stimolazione. I risultati sono espressi come media \pm S.E.M.. Ciascun punto sperimentale è stato effettuato in quintuplicato. L'aspetto morfologico della linea cellulare rimane inalterato rispetto al punto sperimentale di controllo, rappresentato da cellule non trattate (dati non mostrati).

Dai risultati sopra descritti, abbiamo deciso di utilizzare la concentrazione di $ZnCl_2$ 50 μ M come pre-trattamento sulla linea cellulare neuronale seguito da un trattamento con $CdCl_2$ 10 μ M, dose sub-letale che danneggia le cellule sia dal punto di vista metabolico (figura 12) che da punto di vista morfologico (figura 13). Dopo aver pre-trattato le cellule per 24 ore con $ZnCl_2$ 50 μ M e dopo aver aggiunto al terreno di starvazione $CdCl_2$ 10 μ M, è stata valutata la vitalità cellulare delle SH-SY5Y. I risultati emersi dal saggio hanno messo in evidenza come lo $ZnCl_2$ alla concentrazione di 50 μ M riesca a prevenire in modo

significativo i danni metabolici a cui le cellule vanno incontro quando trattate con il solo CdCl₂ 10 µM per 24 ore (figura 15, pannello A). È infatti evidente come il pre-trattamento con ZnCl₂ 50 µM non permetta al CdCl₂ di interagire con i meccanismi biomolecolari delle cellule SH-SY5Y portando i livelli di vitalità cellulare statisticamente sopra quelli del punto sperimentale CdCl₂ 10 µM e molto vicini al livello di controllo corrispondente alle cellule non trattate. Questo dato è stato confermato dall'analisi di morfologia cellulare (figura 15, pannello B). Come precedentemente osservato in figura 13, le cellule trattate con CdCl₂ 10 µM presentano alterazioni morfologiche importanti (teste di freccia nere); in particolare si osserva una perdita di prolungamenti citoplasmatici con conseguente scomparsa dei classici circuiti neuronali, osservabili anche in studi *in vitro* (Pak E.J. *et al.*, 2014). D'altra parte, lo ZnCl₂ alla concentrazione di 50 µM non altera l'aspetto morfologico delle SH-SY5Y in confronto al punto di controllo delle cellule non trattate. Quando il CdCl₂ viene aggiunto al terreno di starvazione assieme allo ZnCl₂ e dopo che questo era già presente nelle 24 ore precedenti, il metallo pesante non intacca l'aspetto morfologico delle cellule. Infatti lo ZnCl₂ previene e contrasta gli effetti tossici del CdCl₂ mantenendo le cellule di forma poligonale con citoplasma ampio e non alterato, la membrana compatta e la presenza di prolungamenti citoplasmatici (frecce nere) è apprezzabile ed in misura visibilmente superiore rispetto al punto sperimentale in cui le cellule erano state trattate con CdCl₂ 10 µM per 24 ore.

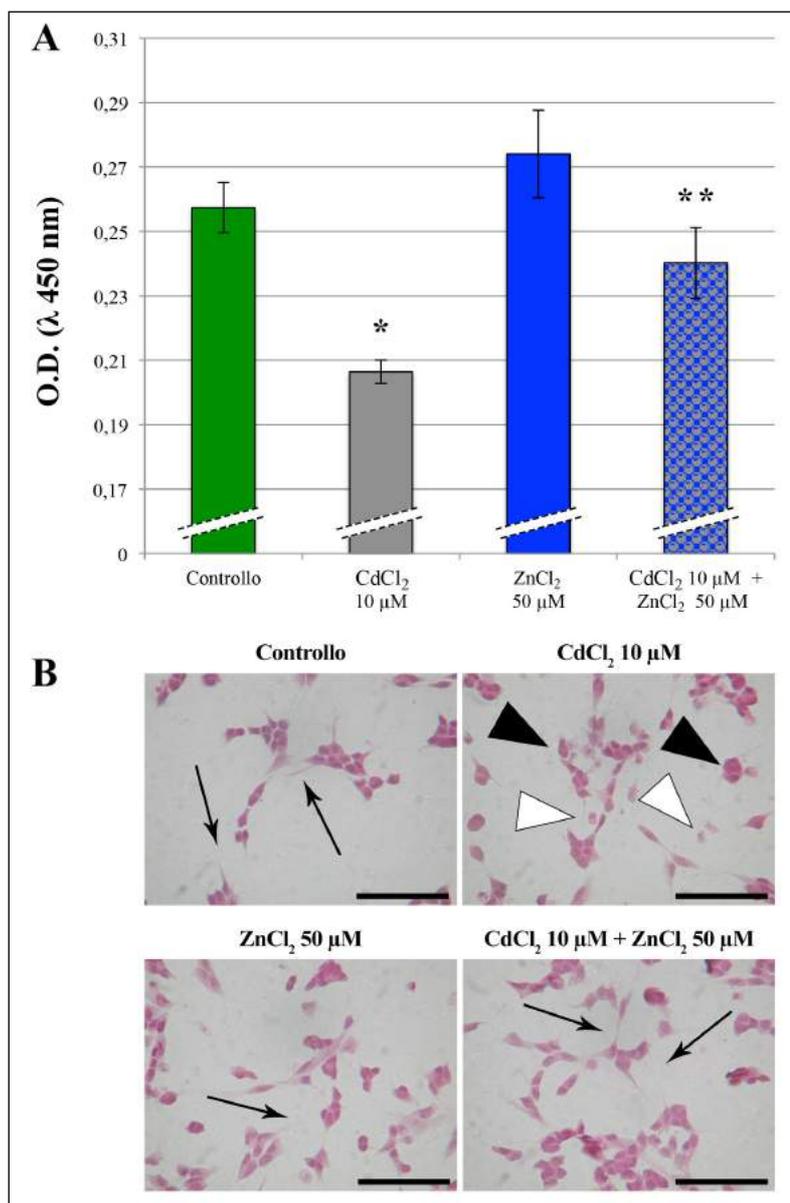


Figura 15: saggio di vitalità cellulare (WST-8) (pannello A) e analisi di microscopia ottica (pannello B) della linea cellulare SH-SY5Y trattata con CdCl₂ 10 μ M dopo pre-trattamento con ZnCl₂ 50 μ M. È evidente come la linea cellulare neuronale sia protetta dallo ZnCl₂ dai danni indotti dal metallo pesante sia dal punto di vista metabolico (pannello A), sia dal punto di vista morfologico (pannello B). I risultati sono espressi come media \pm S.E.M.. * p <0,05 rispetto al punto sperimentale di controllo; ** p <0,05 rispetto al punto sperimentale CdCl₂ 10 μ M. Ingrandimento totale 200x; barra = 100 μ m.

Per confermare se lo ZnCl₂ è in grado di revertire gli effetti tossici del CdCl₂ ed in particolare se è in grado di conservare l'integrità dei prolungamenti citoplasmatici che mantengono le connessioni tra i neuroni, è stato deciso di valutare la presenza di proteine

specifiche presenti a livello dei coni assonici delle cellule nervose ed in particolare ci siamo concentrati sulla neuromodulina (Growth-Associated Phosphoprotein 43, GAP-43). Si tratta di un marcatore della plasticità sinaptica poiché ha un ruolo chiave nella generazione dei neuriti durante lo sviluppo; infatti la sua espressione aumenta durante la crescita o rigenerazione neuritica.

A questo scopo le cellule hanno subito lo stesso trattamento dei precedenti esperimenti sia per durata che per concentrazione degli stimoli ed i risultati del western blotting (figura 16) hanno confermato le osservazioni ottenute dalle analisi morfologiche al microscopio ottico. Il CdCl₂ 10 μM, come atteso, dopo solo 24 ore di trattamento è in grado di diminuire la presenza della proteina GAP-43 all'interno dei neuroni SH-SY5Y in maniera statisticamente significativa. Dall'altra parte, lo ZnCl₂ 50 μM non sembra aumentare o diminuire la presenza di questa proteina rispetto al punto di controllo, cellule non trattate. Lo ZnCl₂ però è in grado di prevenire la perdita di GAP-43 dal cono assonico quando le cellule vengono trattate con il CdCl₂; infatti, la presenza della proteina aumenta significativamente rispetto al punto sperimentale trattato con CdCl₂ 10 μM riportando i livelli della proteina a quelli di controllo.

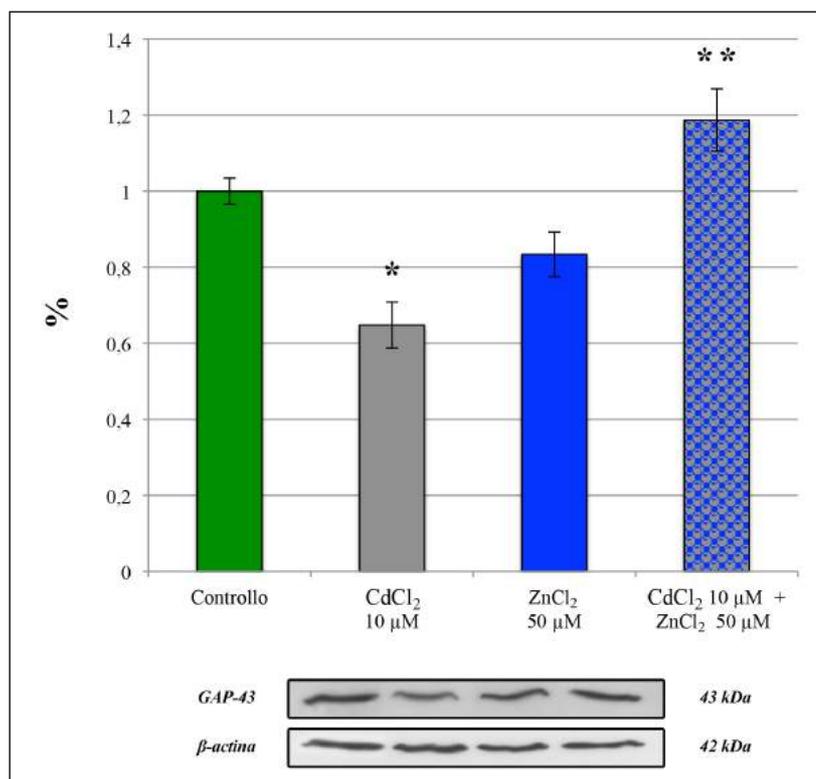


Figura 16: espressione di GAP-43 mediante analisi di western blotting sulla linea cellulare SH-SY5Y. Il CdCl₂ 10 μM inibisce significativamente l'espressione della proteina, i cui livelli sono paragonabili a quelli di controllo quando la linea cellulare è pre-trattata con ZnCl₂ 50 μM. I risultati sono espressi come media ± S.E.M.. * $p < 0,05$ rispetto al punto sperimentale di controllo: ** $p < 0,05$ rispetto al punto sperimentale CdCl₂ 10 μM.

Questa prima serie di risultati sottolinea il ruolo dello ZnCl₂, uno degli elementi essenziali nel nostro organismo e presente nelle metallotioneine, nel prevenire e contrastare i danni neuronali indotti dal CdCl₂ 10 μM. Infatti, lo ZnCl₂ 50 μM è in grado di prevenire la morte neuronale delle SH-SY5Y riportando la vitalità cellulare ai livelli di controllo. Inoltre, per quanto riguarda la connettività neuronale, lo ZnCl₂ è in grado di mantenere le connessioni interneuronali inibendo gli effetti tossici che il CdCl₂ provoca mantenendo elevata e paragonabile a quella del controllo, l'espressione di GAP-43, una proteina localizzata a livello dei coni assonici indispensabile per promuovere la formazione di nuovi prolungamenti citoplasmatici mantenendo integro il network interneuronale.

4.3 CANNABIDILOLO (CBD)

Da alcuni anni si sta portando avanti il dibattito sull'utilizzo del CBD, molecola estratta dalla *Cannabis sativa*, come sostanza neuro-attiva e terapeutica. Ultimamente a Firenze, lo Stabilimento Chimico Farmaceutico Militare (<http://www.farmaceuticomilitare.it/attivita.aspx?Inrid=8>) sta portando avanti la coltivazione sperimentale della *Cannabis sativa* a scopo puramente terapeutico. Inoltre, l'efficacia e gli effetti del CBD sono stati valutati anche a livello di organi diversi dall'encefalo per la sua capacità nel contrastare gli effetti tossici indotti dal Cd (Fouad A.A. *et al.*, 2013). Data quindi l'attualità del tema e le potenzialità della sostanza, abbiamo deciso di valutare gli effetti del principio attivo CBD sulla linea cellulare SH-SY5Y. Anzitutto, ne è stata valutata l'efficacia a livello di vitalità cellulare (figura 17). Dopo 24 ore di trattamento, i risultati hanno mostrato che all'aumentare della concentrazione del CBD aumenta di pari passo la vitalità cellulare; queste osservazioni sono state confermate anche a 48 ore (dati non mostrati). Questa prima analisi ha permesso di focalizzare i successivi esperimenti sulla concentrazione di CBD 1 μ M che mantiene i livelli di vitalità cellulare significativamente più alti rispetto al punto sperimentale di controllo, cellule non trattate.

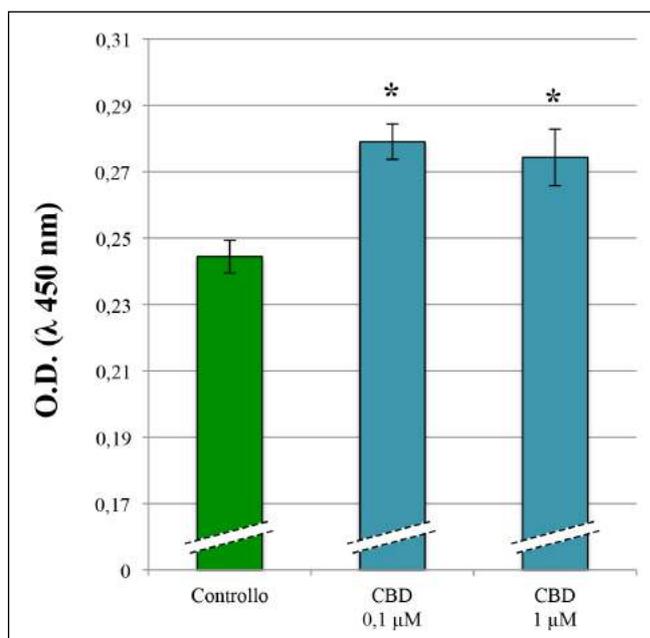


Figura 17: saggio di vitalità cellulare (WST-8) sulla linea cellulare SH-SY5Y trattata per 24 ore con dosi crescenti di CBD. La vitalità cellulare aumenta significativamente rispetto al controllo quando i neuroni sono trattati con CBD 0,1-1 µM. I risultati sono espressi come media ± S.E.M.. * $p < 0,05$. Ciascun punto sperimentale è stato effettuato in quintuplicato. L'aspetto morfologico della linea cellulare rimane inalterato rispetto al punto sperimentale di controllo, cellule non trattate (dati non mostrati).

Quando il CBD 1 µM viene utilizzato come pre-trattamento nei confronti di eventuali danni tossici che il CdCl₂ 10 µM induce alle SH-SY5Y (figure 12, 13), esso si mostra in grado di mantenere stabile l'attività metabolica della linea cellulare neuronale (figura 18, pannello A). Inoltre, l'aspetto morfologico delle SH-SY5Y sottolinea come il CBD mantenga intatto il network interneurone ed eviti il danneggiamento della componente citoplasmatica e la morte cellulare (figura 18, pannello B) rispetto a quanto accade quando le cellule sono in presenza di solo CdCl₂ 10 µM. La diminuzione del numero di cellule danneggiate a seguito del pre-trattamento con CBD è ancora più marcata rispetto a quella osservata pre-trattando le cellule con ZnCl₂ 50 µM (figura 15, pannello B).

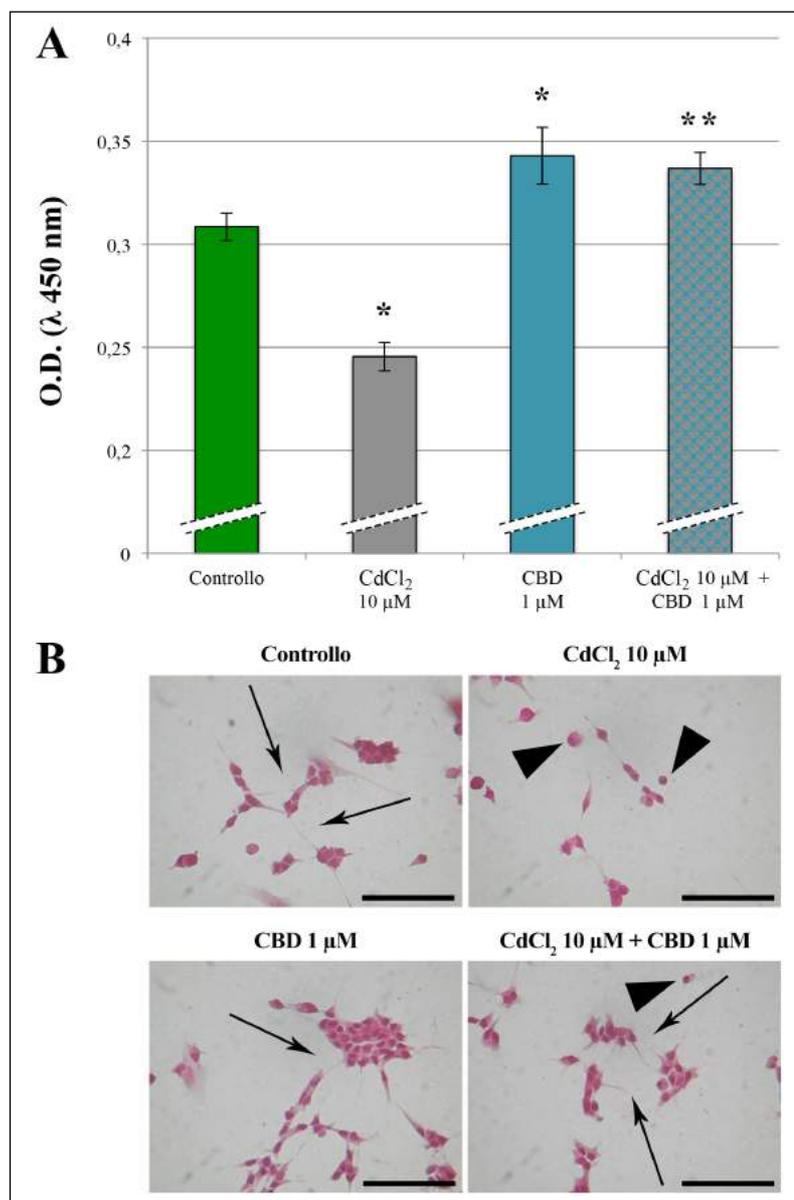


Figura 18: saggio di vitalità cellulare (WST-8) (pannello A) e analisi di microscopia ottica (pannello B) della linea cellulare SH-SY5Y trattata con CdCl_2 10 μM dopo opportuno pre-trattamento con CBD 1 μM . È chiaramente apprezzabile come il CBD aumenti significativamente la vitalità cellulare delle SH-SY5Y rispetto al punto sperimentale CdCl_2 10 μM (pannello A), e come riesca a mantenere le cellule morfologicamente simili al punto di controllo mantenendo le connessioni tra i gruppi cellulari (freccie nere). I risultati sono espressi come media \pm S.E.M.. * $p < 0,05$ rispetto al punto sperimentale di controllo; ** $p < 0,05$ rispetto al punto sperimentale CdCl_2 10 μM . Ingrandimento totale 200x; barra = 100 μm .

Per quanto riguarda il mantenimento delle connessioni neuronali, questo dato sembra non essere confermato con forza dai risultati sull'espressione di GAP-43 (figura 19) come

invece avevamo osservato per lo $ZnCl_2$. È comunque possibile affermare che dal punto di vista morfologico, rispetto al punto sperimentale $CdCl_2$ 10 μM , la popolazione cellulare sia molto più numerosa dopo il pre-trattamento con CBD 1 μM e le connessioni siano rimaste del tutto invariate sia rispetto al punto sperimentale di controllo, cellule non trattate, sia rispetto al punto sperimentale in cui le cellule erano entrate in contatto con il CBD 1 μM per 48 ore.

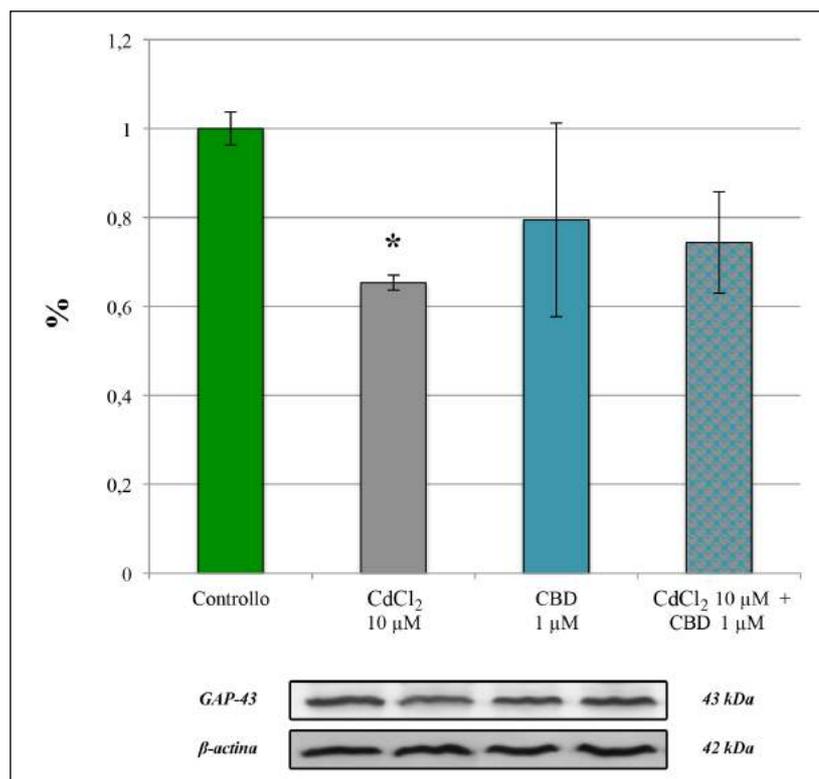


Figura 19: espressione di GAP-43 mediante analisi di western blotting sulla linea cellulare SH-SY5Y. Il $CdCl_2$ 10 μM inibisce significativamente l'espressione della proteina, i cui livelli tendono ad aumentare, seppur non significativamente, quando la linea cellulare è pre-trattata con CBD 1 μM . I risultati sono espressi come media \pm S.E.M.. * $p < 0,05$ rispetto al punto sperimentale di controllo.

4.4 SELENITO DI SODIO (Na_2SeO_3)

Uno dei micronutrienti noto nella comunità scientifica per le sue proprietà nella prevenzione dello stress ossidativo (Liu H. *et al.*, 2012), è il Se. Si tratta di uno degli elementi essenziali per il nostro organismo, soprattutto a livello neuronale, poiché

implicato nei meccanismi di mantenimento della memoria e nello sviluppo delle capacità cognitive (Pillai R. *et al.*, 2014; Cardoso B.R. *et al.*, 2015). L'effetto sortito sulla vitalità cellulare delle SH-SY5Y a concentrazioni crescenti di Na_2SeO_3 dopo 24 ore (figura 20) ci ha consentito di valutare come concentrazione più adatta alle nostre indagini quella di 100 nM. Infatti tale concentrazione mantiene la vitalità cellulare significativamente più alta rispetto al punto sperimentale di controllo anche dopo 48 ore di stimolazione (dati non mostrati).

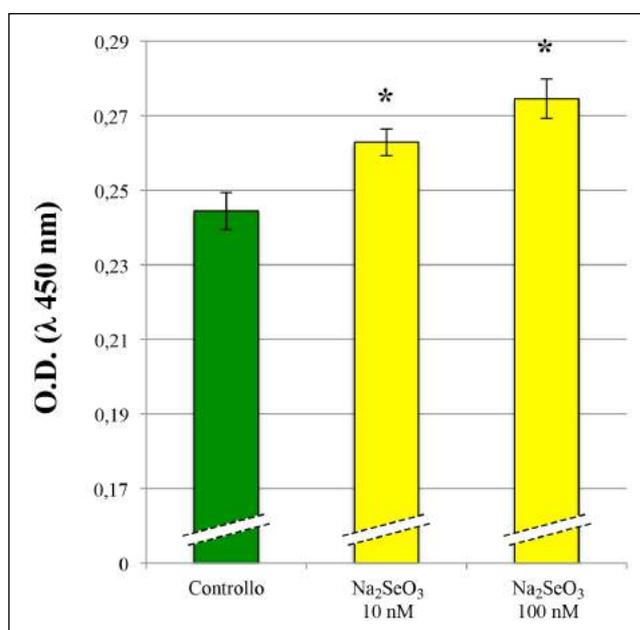


Figura 20: saggio di vitalità cellulare (WST-8) sulla linea cellulare SH-SY5Y trattata per 24 ore con dosi crescenti di Na_2SeO_3 . La vitalità cellulare aumenta significativamente rispetto al punto di controllo quando le SH-SY5Y sono trattate con Na_2SeO_3 10-100 nM. I risultati sono espressi come media \pm S.E.M.. * $p < 0,05$. Ciascun punto sperimentale è stato effettuato in quintuplicato. L'aspetto morfologico della linea cellulare rimane inalterato rispetto al punto sperimentale di controllo, cellule non trattate (dati non mostrati).

Il Na_2SeO_3 è in grado di revertire gli effetti tossici del CdCl_2 10 μM sulla linea cellulare riportando la vitalità cellulare, diminuita a causa della presenza del metallo pesante nel terreno di starvazione, ai livelli di controllo (figura 21, pannello A). Questi dati sono supportati dalle analisi morfologiche che sottolineano come le alterazioni cellulari a carico

della membrana plasmatica (teste di freccia nere) e la presenza di detriti cellulari (teste di freccia bianche) siano assenti quando il trattamento con il CdCl_2 è stato preceduto dalla presenza di Na_2SeO_3 . Inoltre, le connessioni intercellulari (freccie nere) sono mantenute dopo il pre-trattamento con Na_2SeO_3 100 nM (figura 21, pannello B).

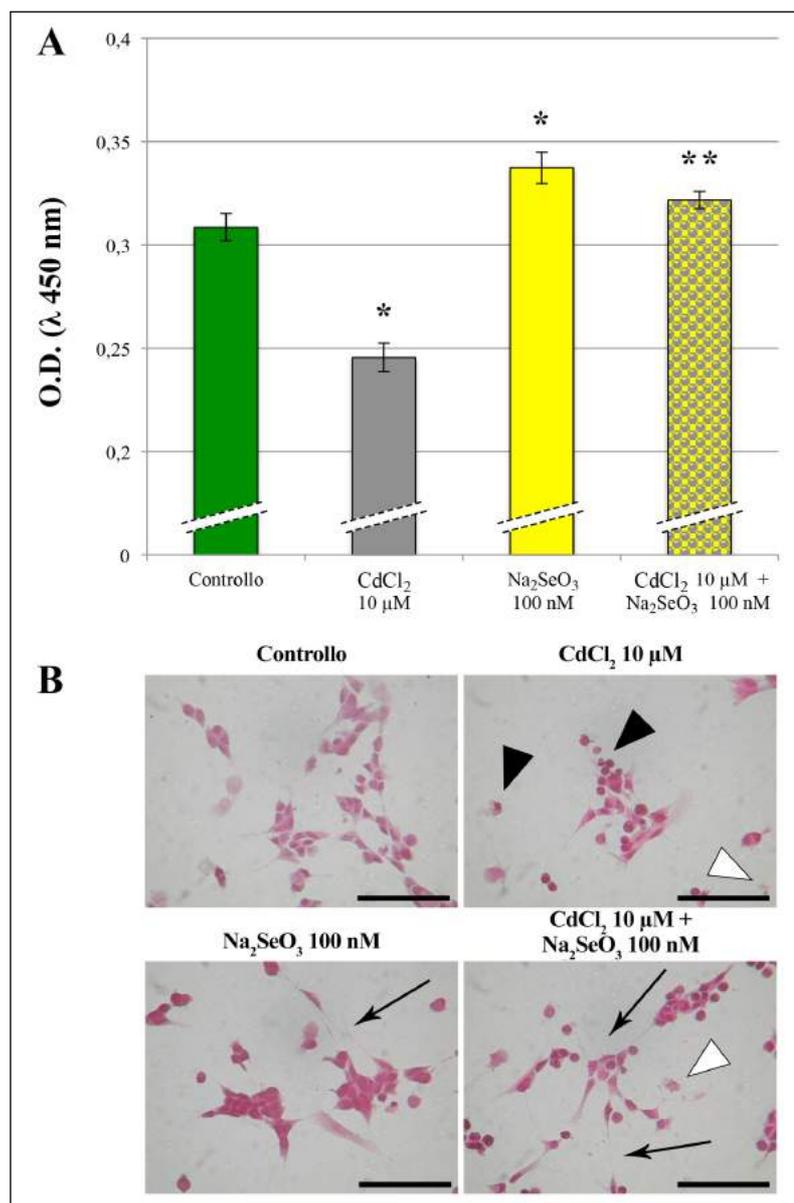


Figura 21: saggio di vitalità cellulare (WST-8) (pannello A) e analisi di microscopia ottica (pannello B) della linea cellulare SH-SY5Y trattata con CdCl_2 10 μM dopo opportuno pre-trattamento con Na_2SeO_3 100 nM. È possibile notare come il Na_2SeO_3 aumenti significativamente la vitalità cellulare delle cellule neuronali rispetto al punto sperimentale CdCl_2 10 μM (pannello A), e come le cellule siano morfologicamente simili al punto di controllo mantenendo le connessioni tra i gruppi cellulari (freccie nere). I risultati sono espressi come media \pm S.E.M.. * $p < 0,05$ rispetto al punto sperimentale di controllo; ** $p < 0,05$ rispetto al punto sperimentale CdCl_2 10 μM . Ingrandimento totale 200x; barra = 100 μm .

Quest'ultima valutazione puramente soggettiva riguardo l'aumento delle connessioni interneuronali, è confermata dall'espressione di GAP-43 (figura 22). Infatti l'analisi delle

proteine mediante western blotting, effettuata nelle stesse condizioni delle procedure sperimentali utilizzate per il saggio di vitalità cellulare e l'analisi morfologica, mostra come il Na_2SeO_3 , aumenti significativamente l'espressione di GAP-43 a livello dei coni assonici neuronali rispetto al punto sperimentale di controllo, cellule non trattate. La presenza di Na_2SeO_3 nel terreno di starvazione fa inoltre in modo che il metallo pesante non alteri l'espressione della proteina in questione, facendo risultare la presenza di GAP-43 significativamente superiore rispetto al punto sperimentale relativo a CdCl_2 10 μM .

Questi ultimi risultati confermano come la connettività neuronale, *in vitro*, possa essere mantenuta dalla presenza di Na_2SeO_3 che, inibendo lo stress ossidativo causato dalla presenza del CdCl_2 , protegge le cellule dalla rottura delle connessioni neuronali e dalla morte cellulare.

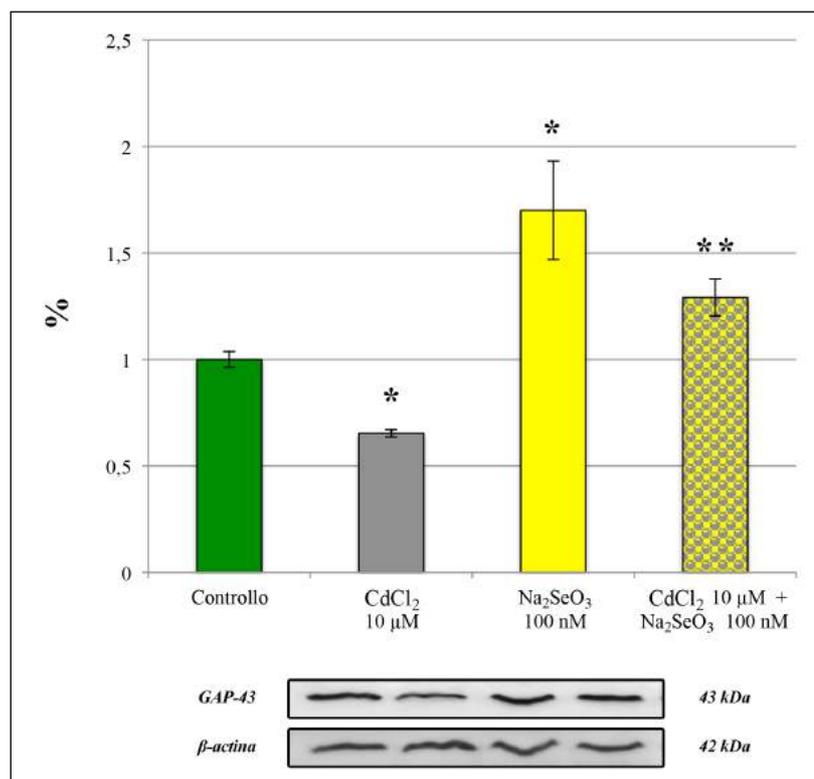


Figura 22: espressione di GAP-43 mediante analisi di western blotting sulla linea cellulare SH-SY5Y. Gli effetti tossici dovuti alla presenza del CdCl₂ 10 µM nel terreno di starvazione, sono inibiti dal pretrattamento con Na₂SeO₃ 100 nM che aumenta significativamente l'espressione di GAP-43. I risultati sono espressi come media ± S.E.M.. **p*<0,05 rispetto al punto sperimentale di controllo; ***p*<0,05 rispetto al punto sperimentale CdCl₂ 10 µM.

4.5 MICROGLIA MURINA (BV-2)

È noto ormai da anni come la glia svolga un ruolo fondamentale a livello del SNC. Il primo ruolo attribuitogli fu quello di supporto per le cellule nervose ma, con il passare del tempo, sono state scoperte altre funzioni non meno importanti. Le cellule microgliali sono infatti definite come i macrofagi del SNC giocando un ruolo molto importante anche nel rimaneggiamento delle connessioni sinaptiche (Tang G. *et al.*, 2014). La letteratura scientifica ha tuttavia messo in risalto come l'attivazione cronica delle cellule microgliali innescata dalla presenza di metalli pesanti possa diventare causa di aumento di stress ossidativo e neuro-infiammazione (Block M.L. *et al.*, 2007a; Liu M.C. *et al.*, 2012). Alla

luce di queste osservazioni, abbiamo deciso di valutare quali fossero gli effetti del trattamento con CdCl₂ su una linea cellulare di microglia murina. Per iniziare è stato deciso di valutare la vitalità cellulare delle BV-2 a dosi crescenti di CdCl₂. Dai risultati ottenuti (figura 23), è emerso che l'attività metabolica della linea cellulare diminuisce in maniera dose-dipendente all'aumentare della concentrazione di CdCl₂. Inoltre, i dati evidenziano che questa linea cellulare è più sensibile alla presenza di CdCl₂ rispetto alla linea cellulare neuronale SH-SY5Y. Infatti, da questa prima analisi emerge come già il CdCl₂ 1 μM, ossia ad una concentrazione 10 volte inferiore a quella che era stata presa in considerazione per le cellule neuronali umane, risulti essere tossico rispetto al punto sperimentale di controllo.

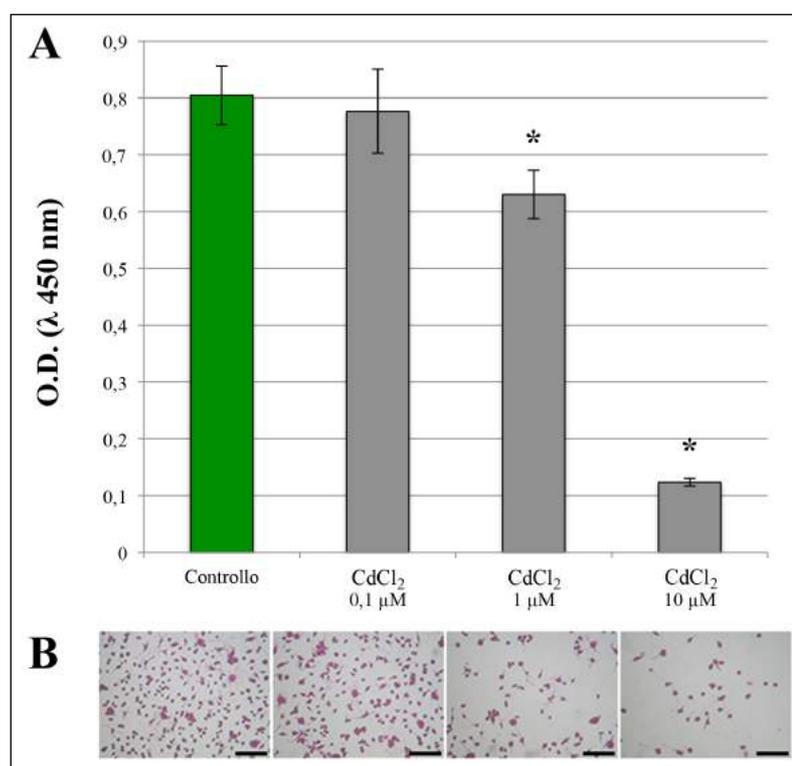


Figura 23: saggio di vitalità cellulare (WST-8) (pannello A) e analisi di microscopia ottica (pannello B) della linea cellulare BV-2, microglia murina, stimolata con CdCl₂ per 24 ore. L'istogramma evidenzia una diminuzione dose-dipendente della vitalità cellulare, significativa rispetto al punto sperimentale di controllo, cellule non trattate, già a concentrazione di 1 μM. I risultati sono espressi come media ± S.E.M.. * $p < 0,05$ rispetto al punto sperimentale di controllo. Ingrandimento 100x; barra = 100 μm.

Trattandosi di una linea cellulare che costituisce il sistema immunitario del SNC, è stato deciso di valutare quali fossero gli effetti di una molecola che fa parte della via di segnalazione della vitamina D, la VDBP (Vitamin D Binding Protein - proteina di legame della vitamina D), nota in letteratura per essere un attivatore macrofagico (Yamamoto N. *et al.*, 1991), unita all'Acido Oleico (OA – Oleic Acid) che stabilizza la struttura della proteina a livello della membrana plasmatica (Williams M.H. *et al.*, 1988; Camell C. *et al.*, 2013). Dalla figura 24 emerge che all'aumentare della concentrazione di VDBP-OA aumenta la vitalità cellulare che risulta significativamente maggiore rispetto al punto di controllo, cellule non trattate, quando le BV-2 sono trattate alla concentrazione massima 800 pM per 24 ore. Gli stessi risultati sono stati ottenuti dopo 48 ore (dati non mostrati).

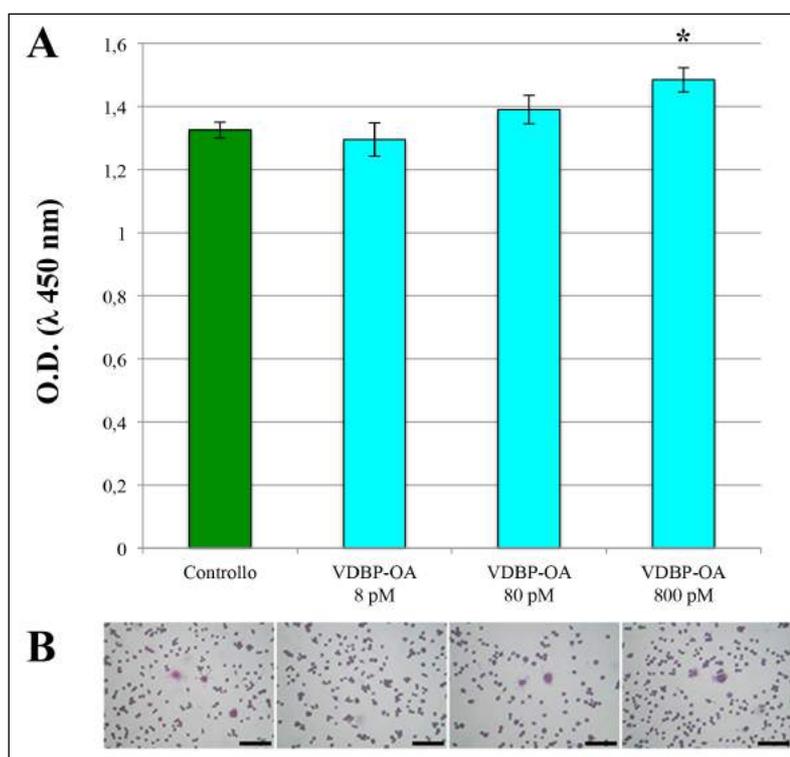


Figura 24: saggio di vitalità cellulare (WST-8) (pannello A) e analisi di microscopia ottica (pannello B) della linea cellulare BV-2, microglia murina, trattata con VDBP-OA per 24 ore. L'istogramma evidenzia come la vitalità cellulare aumenti significativamente rispetto al punto sperimentale di controllo quando le BV-2 sono trattate con VDBP-OA 800 pM. I risultati sono espressi come media \pm S.E.M. * $p < 0,05$ rispetto al punto sperimentale di controllo. Ingrandimento 100x; barra = 100 μ m.

Poiché il saggio di vitalità cellulare è molto spesso considerato una valutazione della proliferazione cellulare, è stato deciso di eseguire un'analisi mirata a tale scopo utilizzando il colorante vitale Trypan Blue. Questo passaggio si è reso necessario in quanto un'elevata proliferazione cellulare della componente microgliale, risulterebbe nociva per l'assetto fisiologico del SNC, una condizione nota come microgliosi. Questo tipo di patologia è infatti caratterizzata da una proliferazione incontrollata di cellule microgliali che finisce per soffocare le cellule neuronali, provocando la morte dei neuroni e dunque un danno irreversibile a carico del SNC. Utilizzando la concentrazione massima di VDBP-OA (800 pM), dopo 24 ore di trattamento (figura 25), il numero di cellule BV-2 rimane invariato rispetto al punto di controllo, cellule non trattate. Lo stesso risultato è stato riscontrato dopo un trattamento di 48 ore sebbene in questo caso, il punto sperimentale VDBP-OA 800 pM abbia fatto diminuire il numero di cellule ma non in maniera significativa rispetto al punto sperimentale di controllo, cellule non trattate.

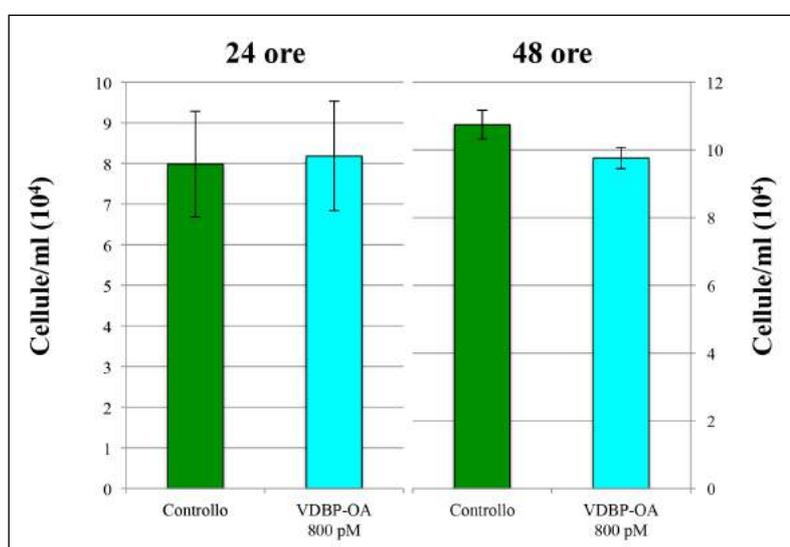


Figura 25: saggio di proliferazione cellulare mediante colorazione vitale Trypan Blue sulla linea cellulare BV-2 trattata con VDBP-OA 800 pM per 24 e 48 ore. I risultati sono espressi come media \pm S.E.M..

La lieve diminuzione osservata a carico del numero di cellule non dipende da una tossicità intrinseca dello stimolo; infatti questo attivatore macrofagico induce un'inibizione della

proliferazione e una concomitante differenziazione delle cellule che è associata alla produzione di sostanze neuro-trofiche e neuro-attive. Considerando che le cellule del controllo non subiscono l'azione del VDBP-OA e quindi non si trovano in uno stato attivato, l'aumento del loro numero è da imputarsi all'alto tasso proliferativo (tempo di duplicazione di circa 34 ore (Stansley B. *et al.*, 2012)) caratteristico delle BV-2.

Il ruolo del VDBP-OA nell'indurre attivazione della linea cellulare BV-2 è stato confermato dalla valutazione, mediante tecnica del western blotting, dei livelli di espressione B7-2 (più noto come CD86), una proteina che viene selettivamente espressa quando le cellule microgliali si trovano nella fase attivata (Sanders P. *et al.*, 2007; Bohatschek M. *et al.*, 2004).

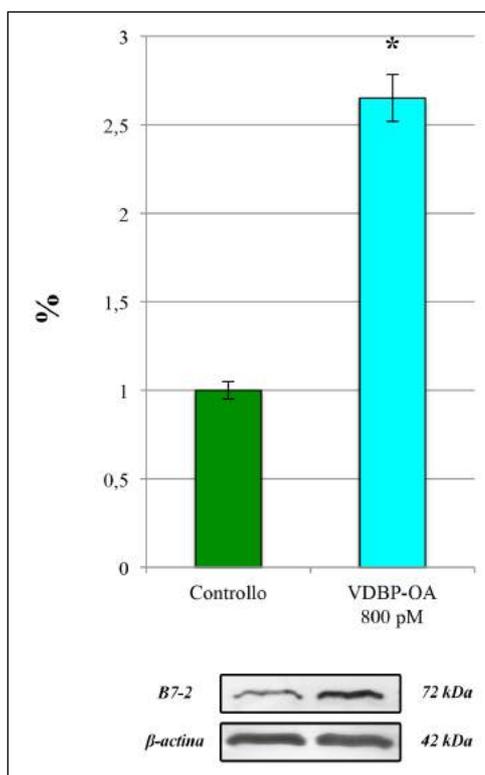


Figura 26: espressione di B7-2 (CD86), marker di attivazione microgliale, mediante analisi di western blotting sulla linea cellulare BV-2 dopo 48 ore di trattamento. I risultati sono espressi come media \pm S.E.M.. * $p < 0,05$ rispetto al punto sperimentale di controllo. Ciascun punto sperimentale è stato effettuato in triplicato.

La valutazione della vitalità cellulare a seguito del trattamento con CdCl_2 10 μM in presenza del VDBP-OA ha mostrato che quest'ultima non ha alcun ruolo protettivo (figura 27).

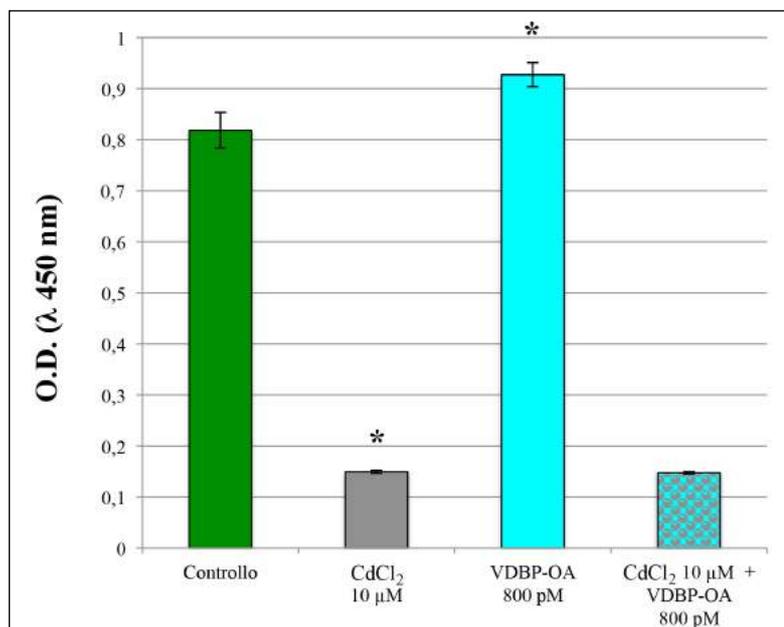


Figura 27: saggio di vitalità cellulare (WST-8) sulla linea cellulare BV-2 trattata con CdCl_2 10 μM dopo pre-trattamento con VDBP-OA 800 pM. I risultati confermano l'aumento della vitalità cellulare indotto sulle cellule microgliali da VDBP-OA 800 pM dopo 48 ore di trattamento. D'altra parte però, i risultati sottolineano che l'attivatore microgliale non è in grado di revertire gli effetti tossici indotti da CdCl_2 10 μM . I risultati sono espressi come media \pm S.E.M.. * $p < 0,05$ rispetto al punto sperimentale di controllo.

Malgrado l'apparente contraddizione, il dato non deve sorprendere, da un lato perchè la dose di CdCl_2 di 10 μM è risultata molto più tossica per questa linea cellulare rispetto a quella neuronale, dall'altro perchè la VDBP-OA non svolge alcun ruolo di chelante nei confronti del metallo pesante o di scavenger nei confronti dei radicali liberi.

4.6 MICROGLIA UMANA (C13NJ)

Una delle critiche che possono presentarsi nell'utilizzo di una linea cellulare umana (SH-SY5Y) e di una linea cellulare murina (BV-2) può scaturire dall'allestimento di una co-

coltura in quanto, una convivenza *in vitro* di due linee cellulari provenienti da due differenti specie, potrebbe dare risultati fuorvianti proprio a causa della loro differente origine. Questo è il principale motivo per cui è stato deciso di focalizzare la nostra attenzione su una linea cellulare microgliale umana.

La linea cellulare C13NJ non rispecchia le tipiche caratteristiche morfologiche della microglia in quanto non è possibile distinguere i tre differenti stadi microgliali, come invece era possibile nella linea murina. Seguendo lo stesso schema sperimentale adottato nei confronti della linea cellulare murina, le C13NJ sono state anzitutto sottoposte al saggio di vitalità cellulare con concentrazioni crescenti di CdCl₂ per 24 ore. Dai risultati ottenuti sulla valutazione dell'attività metabolica della linea cellulare (figura 28) è possibile osservare come la microglia umana sia più resistente rispetto alla sua controparte di origine murina. Infatti la vitalità cellulare diminuisce significativamente rispetto al punto di controllo, cellule non trattate, quando viene raggiunta la concentrazione di 50 µM. Si tratta dunque di una concentrazione 50 volte maggiore rispetto a quella che induceva lo stesso effetto sulla microglia murina (1 µM) e 5 volte superiore rispetto a quella utilizzata negli esperimenti sulle SH-SY5Y (10 µM).

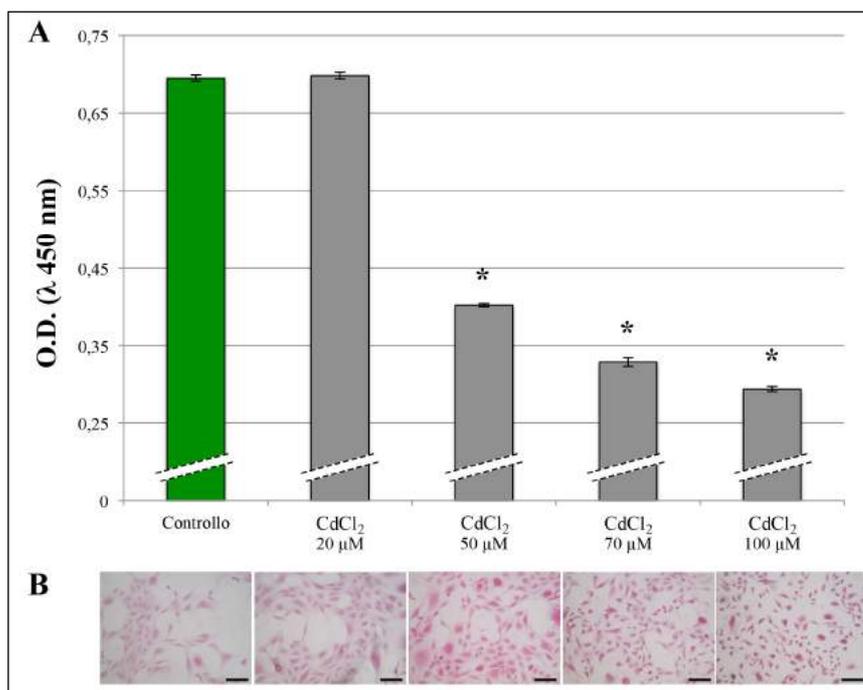


Figura 28: saggio di vitalità cellulare (WST-8) (pannello A) e analisi di microscopia ottica (pannello B) della linea cellulare C13NJ, microglia umana, stimolata con CdCl₂ per 24 ore. L'istogramma evidenzia come la vitalità cellulare diminuisca significativamente rispetto al punto sperimentale di controllo, cellule non trattate, quando le C13NJ sono trattate con CdCl₂ 50 μM per 24 ore. Inoltre i dati riportati mostrano come la linea cellulare microgliale umana sia più resistente rispetto alla controparte murina, anche dal punto di vista morfologico (pannello B): infatti anche in presenza di alte concentrazioni di CdCl₂ le cellule C13NJ restano ben adese al substrato seppur alterazioni morfologiche siano ben visibili come la perdita di importanti porzioni citoplasmatiche e la presenza di detriti cellulari. I risultati sono espressi come media ± S.E.M.. * $p < 0,05$ rispetto al punto sperimentale di controllo. Ingrandimento 100x; barra = 100 μm.

Alla luce di queste osservazioni abbiamo deciso di utilizzare la concentrazione massima di VDBP-OA per valutare il suo ruolo nell'indurre proliferazione cellulare. I risultati ottenuti mediante conta cellulare con colorante vitale Trypan Blue, hanno dato dei risultati del tutto sovrapponibili a quelli osservati sulla microglia murina (figura 29).

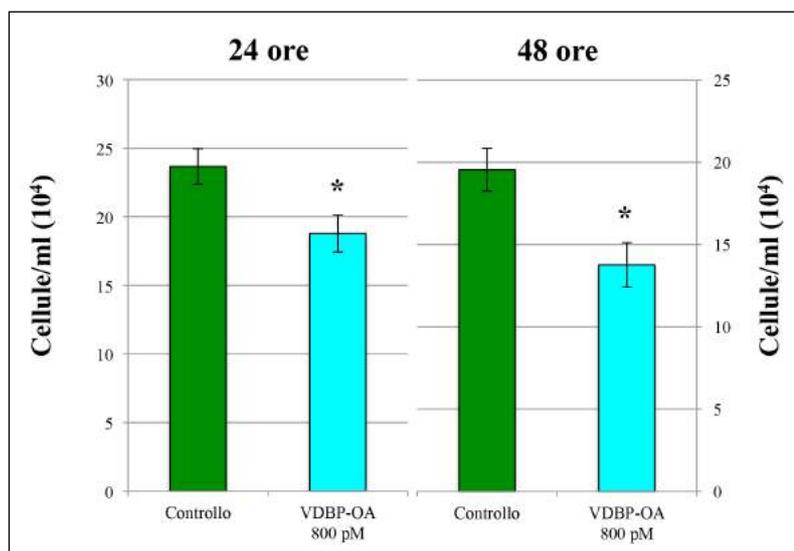


Figura 29: saggio di proliferazione cellulare mediante colorazione vitale Trypan Blue sulla linea cellulare BV-2 trattata con VDBP-OA 800 pM per 24 e 48 ore. I risultati sono espressi come media \pm S.E.M.. * $p < 0,05$ rispetto al punto sperimentale di controllo.

Sebbene la linea cellulare risulti più resistente rispetto alla microglia murina, la linea C13NJ sembra comportarsi nello stesso modo in termini di proliferazione cellulare quando stimolata con VDBP-OA per 24 o 48 ore. La somiglianza tra le due linee cellulari, murina ed umana, è stata sottolineata anche da un altro risultato e cioè l'aumento significativo, rispetto ai controlli, dei livelli di espressione del marcatore di attivazione microgliale B7-2 in presenza di VDBP-OA 800 pM (figura 30). Tra l'altro tale marcatore viene espresso, come atteso, anche nelle cellule di controllo.

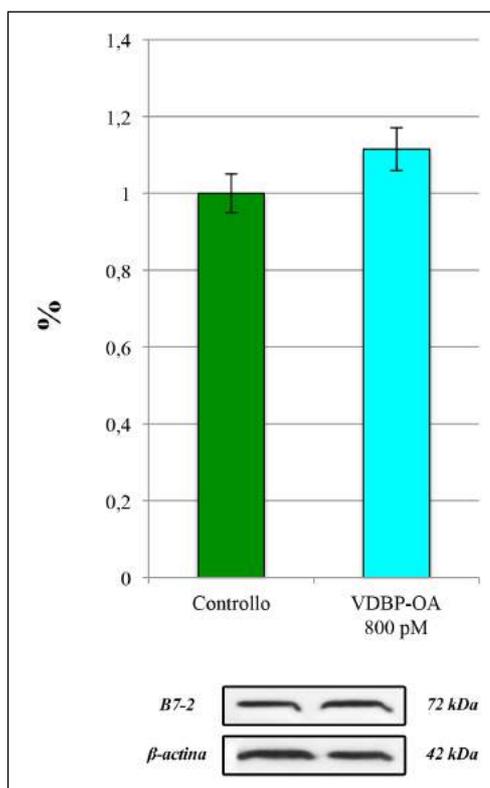


Figura 30: espressione di B7-2 (CD86), marker di attivazione microgliale, mediante analisi di western blotting sulla linea cellulare C13NJ dopo 48 ore di trattamento. I risultati sono espressi come media \pm S.E.M.. * $p < 0,05$ rispetto al punto sperimentale di controllo. Ciascun punto sperimentale è stato effettuato in triplicato.

Ad ulteriore conferma della somiglianza esistente tra le due linee cellulari vi è infine il reperto che la presenza di VDBP-OA 800 pM non è in grado di prevenire e/o tamponare l'effetto tossico indotto dalla presenza di CdCl₂ 50 μ M nel terreno di starvazione come mostrato in figura 31.

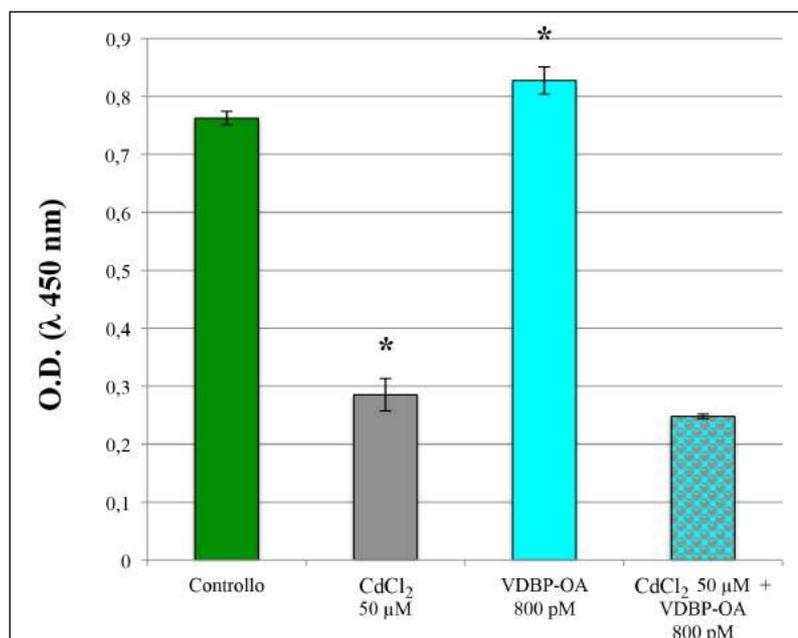


Figura 31: saggio di vitalità cellulare (WST-8) sulla linea cellulare C13NJ trattata con CdCl₂ 50 µM dopo pre-trattamento con VDBP-OA 800 pM. Come riportato in figura 27, i risultati ottenuti sulla linea cellulare C13NJ sottolineano che la VDBP-OA 800 pM non è in grado di revertire e/o prevenire i danni indotti dalla presenza del metallo pesante, sebbene l'attivatore macrofagico aumenti l'attività metabolica della linea cellulare rispetto al controllo, cellule non trattate, come atteso. I risultati sono espressi come media ± S.E.M.. * $p < 0,05$ rispetto al punto sperimentale di controllo.

4.7 CO-COLTURA

Al fine di riprodurre *in vitro* un modello di sistema nervoso più rispondente alla situazione *in vivo*, si è proceduto all'allestimento di una co-coltura neuroni-microglia in modo da valutare se le interazioni che normalmente sussistono tra i due tipi cellulari, potessero modificare le risposte ai differenti tipi di trattamento rispetto a quelle osservate nelle colture singole.

La scelta della linea cellulare microgliale è ricaduta su quella murina BV-2 per due ragioni: la maggiore vicinanza, in termini morfologici, con le cellule microgliali normali, sia nelle condizioni di riposo che nello stato attivato, e l'eccessiva resistenza ai trattamenti dimostrata dalle cellule microgliali umane sia rispetto a quelle murine che rispetto a quelle

neuronal (che avrebbe richiesto un'alterazione delle condizioni sperimentali precedentemente utilizzate).

Come accennato alla fine del precedente sottocapitolo “4.5 - Microglia murina (BV-2)”, non deve sorprendere che la tossicità del CdCl₂ 10 µM non sia contrastata dalla VDBP-OA 800 pM nella linea cellulare BV-2. Infatti questa molecola è un attivatore macrofagico in grado, come illustrato nelle figure 24-26, di attivare le cellule microgliali che possono produrre sostanze neuro-attive e/o neurotrofiche, senza per questo indurre proliferazione cellulare che potrebbe risultare nociva nei confronti dei neuroni.

Le osservazioni al microscopio ottico delle co-culture SH-SY5Y/BV-2 colorate con ematossilina-eosina hanno mostrato come le due linee cellulari siano in grado di interagire tra di loro. Sono infatti chiaramente visibili connessioni tra gruppi di neuroni, tra cellule microgliali e tra neuroni e microglia (figura 32). Come atteso, la stimolazione con CdCl₂ 10 µM per 24 ore danneggia gravemente entrambi i tipi cellulari componenti la co-cultura. Reazione opposta è data invece dal trattamento con VDBP-OA 800 pM dopo 48 ore di stimolazione, che mantiene intatta l'intricata rete di connessioni neuroni-microglia. Quando le cellule sono pre-trattate con VDBP-OA 800 pM e successivamente messe in contatto con CdCl₂ 10 µM, si osserva una conservazione delle connessioni e del tipico aspetto morfologico.

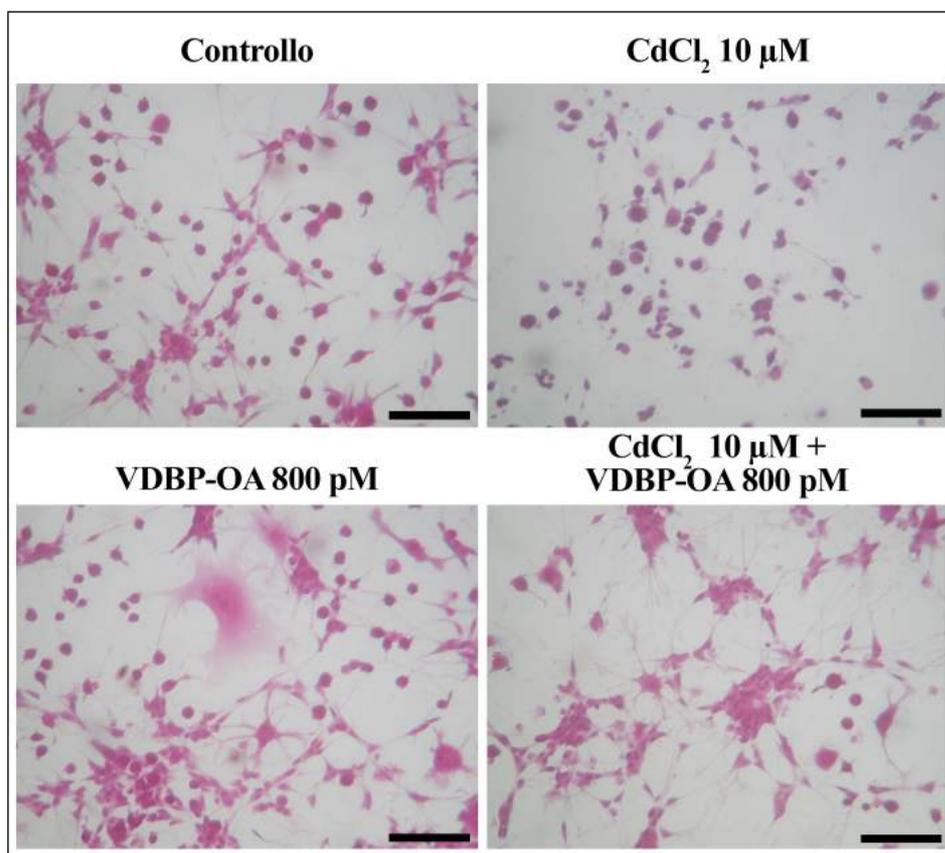


Figura 32: analisi di microscopia ottica sulla co-coltura SH-SY5Y/BV-2 trattata con CdCl_2 10 μM dopo opportuno pre-trattamento con VDBP-OA 800 pM. È possibile notare la completa perdita dei prolungamenti citoplasmatici e quindi delle connessioni intercellulari, accompagnata dal decremento del numero di cellule nel punto sperimentale CdCl_2 10 μM . Quando le due linee cellulari sono pre-trattate con VDBP-OA 800 pM, il CdCl_2 non è in grado di intaccare né la morfologia cellulare né l'intricato network di connessioni. Ciò a dimostrazione di come la microglia sia in grado, una volta attivata, di promuovere la formazione di molecole neuro-attive e/o neurotrofiche che svolgono un ruolo protettivo nei confronti dei neuroni e viceversa. Ingrandimento totale 100x; barra = 100 μm .

5 DISCUSSIONE

Una delle principali cause di decesso nei paesi industrializzati è rappresentata dalle malattie neurodegenerative che affliggono il SNC in varie fasce d'età; si passa infatti da patologie come il DSA, che colpisce i bambini manifestandosi principalmente non oltre il terzo anno di età, sino ad arrivare al morbo di Parkinson e alla malattia di Alzheimer che colpiscono gli individui oltre i cinquanta anni di età.

La caratteristica che accomuna queste patologie è, *in primis*, una degenerazione delle cellule nervose e di altre componenti cellulari del SNC, con successiva morte delle stesse. Oltre al danneggiamento cellulare, queste patologie sono caratterizzate anche dalla costante perdita di connessioni sinaptiche. La mancanza di connessioni nervose o l'interruzione dei segnali sinaptici tra cellule, spiega alcuni dei sintomi di tali patologie, tra i quali vi sono la perdita della memoria, e il mancato coordinamento tra l'informazione in ingresso e la risposta da parte degli organi bersaglio. Per quanto riguarda il caso specifico di DSA, più che di una perdita delle connessioni sinaptiche, è più corretto parlare di sbilanciamento che si instaura tra sinapsi inibitorie ed eccitatore (Tang G. *et al.*, 2014), particolarmente evidenti in alcune regioni specifiche del SNC, come ad esempio l'area 21 di Brodmann coinvolta nell'elaborazione del linguaggio (Campbell G. *et al.*, 1992; Huberman A.D. *et al.*, 2008; Tang G. *et al.*, 2014). I protagonisti che regolano questo bilanciamento sinaptico sono, oltre i neuroni, altre cellule che compongono il SNC come gli astrociti e la microglia (Eroglu C. *et al.*, 2010). Queste due tipologie cellulari hanno importanti funzioni sui neuroni ove, attraverso la produzione di sostanze neurotrofiche e neuro-attive, promuovono la crescita cellulare e regolano il numero di connessioni intercellulari, bilanciando stimoli inibitori e attivatori.

Quest'ultimo ruolo è stato dettagliatamente indagato nella microglia, sia a livello cellulare che molecolare, per capire meglio la patogenesi del DSA (Koyama R. *et al.*, 2015),

facendo emergere la sua fondamentale importanza nello sviluppo e nella funzione dei circuiti neuronali.

Le cellule microgliali, scoperte nei primi anni del XX secolo dal neurologo Pio del Rio-Hortega, presentano una particolare morfologia che è già in grado di indicare la funzione di questa linea cellulare (del Rio-Hortega P., 1937). Del Rio-Hortega identificò delle cellule dalla morfologia ramificata, caratterizzate da importanti prolungamenti che si protrudevano dal corpo cellulare a guisa di braccia, con il compito di supervisionare l'ambiente circostante in cerca di patogeni e/o detriti cellulari e di attuarne la rimozione in modo che non danneggiassero i neuroni e le connessioni sinaptiche. A tutt'oggi alla microglia si riconosce il ruolo fondamentale di inglobare ed eliminare i detriti o i patogeni che si trovano nell'ambito del SNC in modo da evitare la propagazione del danno alle componenti cellulari limitrofe (Hughes V., 2012). Questo è il motivo per cui le cellule microgliali sono universalmente conosciute come i macrofagi del SNC. Si tratta infatti di cellule appartenenti al sistema immunitario in grado di presentare anticorpi a livello della loro membrana plasmatica (Webster S.D. *et al.*, 2001), di esprimere molecole di differenziamento CD (Cluster of Differentiation – cluster di differenziazione) (Remington L.T. *et al.*, 2007) e di promuovere la differenziazione dei linfociti T (Carson M.J. *et al.*, 1999).

La microglia ha un duplice comportamento nei confronti della componente nervosa: può indurre sia uno stato infiammatorio sia rispondere con stimoli anti-infiammatori. Infatti, la microglia può essere attivata in modo da eliminare tutte le sostanze tossiche e i detriti cellulari che possono danneggiare l'encefalo, oppure attivarsi in uno stato pro-infiammatorio accompagnato da un incremento della proliferazione cellulare che può sovrastare fino a “soffocare” i neuroni provocandone la morte (Milligan E.D. *et al.*, 2009).

Gli stati infiammatori che si riscontrano a livello del SNC possono essere causati da molti fattori tra cui la presenza di molecole che inducono stress ossidativo alterando il corretto

metabolismo dei mitocondri (adibiti al controllo dello stato di ossido-riduzione dell'ambiente cellulare). Ai nostri giorni, a causa della forte industrializzazione e di un non corretto smaltimento dei rifiuti, l'inquinamento ambientale (a livello aereo, marino e terrestre) risulta fortemente associato ad un incremento delle patologie neurodegenerative (Chin-Chan M. *et al.*, 2015).

Sono molti gli inquinanti ambientali associati all'insorgere di patologie come Parkinson, Alzheimer e DSA; tra i principali inquinanti che si possono trovare nella quotidianità, si hanno i gas di scarico, le polveri sottili e, non meno importanti, i metalli pesanti. Tra i metalli pesanti più diffusi e tossici con cui entriamo spesso in contatto, vi è il Cd (Mead M.N., 2010). Il Cd è un metallo pesante particolarmente presente nei processi industriali di raffinazione e a livello delle polveri sottili. Esso è in grado di interagire con il SNC in quanto può raggiungerlo per inalazione e alterare la barriera ematoencefalica (Shukla A. *et al.*, 1996) rendendola più permeabile; il Cd infatti è capace di danneggiare le cellule endoteliali, alterando le tight-junction presenti tra di esse e quindi creando la formazione di pori nella membrana (Cao X. *et al.*, 2015). Il SNC è ancor più sensibile alla presenza di Cd nelle prime fasi del suo sviluppo, ossia quando la barriera ematoencefalica non è ancora del tutto sviluppata. Infatti, tra molti ricercatori nel campo della neuroscienza, c'è la forte convinzione che alcune patologie neurodegenerative che colpiscono i soggetti più giovani, siano proprio causate dagli inquinanti ambientali tra cui il Cd. Tale metallo pesante è infatti in grado di alterare la morfogenesi del SNC non solo direttamente ma anche indirettamente mediante il passaggio attraverso la placenta materna (Korpela H. *et al.*, 1986).

Numerosi studi hanno evidenziato come gli effetti tossici del Cd siano principalmente dovuti ad alterazioni che riguardano il sistema di difesa anti-ossidativo (Ognlanovic B. *et al.*, 1995); infatti il Cd è in grado di alterare la funzionalità di sistemi come il glutatione ridotto (GSH) (Sian J. *et al.*, 1994), la glutatione perossidasi ed altre molecole che

proteggono i sistemi biologici dai danni indotti da radicali liberi (El-Sharaky A.S. *et al.*, 1987; Sarkar S. *et al.*, 1998). Un aumento dei livelli di radicali liberi e di ROS provoca danni a livello di cellule e tessuti, alla funzione e/o alla struttura di proteine e di acidi nucleici (Spatz L. 1992). Inoltre, sono numerosi gli elementi in letteratura che sottolineano come lo stress ossidativo porti alla morte cellulare dei neuroni dopaminergici nigrostriatali coinvolti nella patogenesi della malattia di Parkinson (Ebadi M., 1991; Ebadi M. *et al.*, 1995; Ebadi M. *et al.*, 1998; Kumari M.N.R. *et al.*, 1998; Kumari M.N.R. *et al.*, 2000; Przedborski S. *et al.*, 2000).

La presenza di ROS e/o radicali liberi può essere contrastata enzimaticamente, grazie all'azione di superossido dismutasi e catalasi oppure tramite la via non enzimatica, grazie all'azione delle metallotioneine (Ebadi M. *et al.*, 1996; Ebadi M. *et al.*, 2000; Palmiter R.D. *et al.*, 1998). Queste proteine di basso peso molecolare, espresse sia a livello gliale sia neuronale (Ebadi M. *et al.*, 2000; Itoh M. *et al.*, 1983), sembrano regolare il potenziale redox delle cellule ponendosi a difesa dei tessuti e degli organi bersaglio di radicali liberi e ROS. Inoltre le metallotioneine sono note per essere dei validi sostituti della superossido dismutasi nel proteggere le cellule dallo stress ossidativo (Ebadi M. *et al.*, 1996) svolgendo dunque un ruolo critico a livello del SNC. Ad ulteriore riprova del loro coinvolgimento, è noto che l'espressione di metallotioneine è down-regolata in pazienti affetti da Alzheimer (Tsuji S. *et al.*, 1992; Uchida Y. *et al.*, 1991).

Lo Zn è un elemento fondamentale per numerose proteine: la sua presenza è richiesta per l'attività ottimale di molti enzimi partecipando alle funzioni metaboliche, al mantenimento della stabilità strutturale ed alle funzioni regolatorie (Vallee B.L. *et al.*, 1990). Dati disponibili in letteratura e confermati dal nostro gruppo di ricerca hanno dimostrato come lo Zn sia in grado di prevenire la morte cellulare dei neuroni umani indotta dalla presenza di Cd. Lo Zn aumenta i livelli intracellulari di metallotioneine, la cui regolazione biomolecolare è stata ben documentata già negli anni '80 sia a livello cerebrale, che a

livello epatico (Ebadi M., 1986) promuovendone l'azione anti-ossidante. Infatti, anche dai nostri dati sperimentali emerge che l'attività metabolica dei neuroni umani in coltura, dopo pre-trattamento con dosi non letali di $ZnCl_2$, aumenta rispetto a cellule esposte a $CdCl_2$.

Come precedentemente accennato, a livello del SNC è presente una particolare isoforma di metallotioneina, la metallotioneina III, importante per reclutare e rimuovere le molecole di metallo pesante dall'ambiente circostante. In uno studio *in vivo* sui topi knockout per la metallotioneina I e II, è stato registrato un accumulo di un metallo pesante, Hg, proprio a livello della metallotioneina III sottolineandone il ruolo di difesa a livello del sistema nervoso (Kameo S. *et al.*, 2005). Sapendo che i neuroni umani in coltura esprimono di base le metallotioneine (Wanpen S. *et al.*, 2004), il significato del pre-trattamento con $ZnCl_2$ può trovare la sua spiegazione nel fatto che le metallotioneine, la cui espressione aumenta in presenza di Zn, sono capaci di legare e sequestrare dall'ambiente cellulare i metalli pesanti, in questo caso il Cd, prevenendo così la degenerazione dei neuroni dopaminergici in coltura.

Oltre a controllare i livelli intracellulari dei metalli pesanti, le metallotioneine controllano anche la concentrazione di Zn, nelle connessioni cellulari, in particolare a livello dei bottoni sinaptici (Cole T.B. *et al.*, 2000; Erickson J.C. *et al.*, 1997). Lo Zn dunque svolge anche un ruolo da protagonista a livello della connettività neuronale. A questo proposito, il pre-trattamento con $ZnCl_2$ nei confronti della esposizione a $CdCl_2$, ha mostrato nei nostri studi, morfologicamente, un ripopolamento delle connessioni inter-neuronali. Questo evento è stato inoltre sottolineato dagli esperimenti di western blotting che hanno portato alla luce un incremento della proteina GAP-43, dopo trattamento con $ZnCl_2$.

Le metallotioneine giocano un ruolo fondamentale nella plasticità neuronale, in particolare quando si parla di aumento dei prolungamenti citoplasmatici. Infatti, le metallotioneine di tipo III sono importanti per la crescita dei neuriti (Fitzgerald M. *et al.*, 2007; Chung R.S. *et al.*, 2003) oltre ad avere effetti neuro-protettivi nei confronti dei neuroni maturi (Uchida Y.

et al., 2002). La loro importanza a livello della crescita dei neuriti è anche sottolineata sperimentalmente, in quanto il trattamento con Zn, che aumenta a livello cerebrale i livelli di metallotioneina come noto in letteratura (Ebadi M., 1986), aumenta anche l'espressione di GAP-43 una proteina localizzata a livello del cono assonico nelle cellule nervose.

È possibile quindi che lo Zn, stimolando la produzione di metallotioneine a livello neuronale, protegga le cellule dallo stress ossidativo provocato dalla presenza dei metalli pesanti come il Cd. Infatti le metallotioneine sequestrano i metalli pesanti e conseguentemente evitano l'instaurarsi dello stress ossidativo, aumentando la crescita dei neuriti e la connettività tra le cellule.

A sottolineare il fondamentale ruolo delle metalloproteine, nel 2004 (Hozumi I. *et al.*, 2004) è stato creato un simposio specifico sul ruolo delle metallotioneine nei confronti delle patologie neurodegenerative, facendo emergere il loro fondamentale contributo nella prevenzione e nella terapia di patologie a carico del SNC.

Negli ultimi anni in ambito neurologico, il CBD, un fitocannabinioide identificato nella *Cannabis sativa* e privo di qualsiasi effetto psicotropo, ha rappresentato un promettente agente con ampi orizzonti in campo terapeutico.

Infatti il CBD possiede potenziali terapeutici di natura anti-epilettica, ansiolitica, anti-infiammatoria e proprietà anti-psicotiche grazie all'antagonismo nei confronti dei recettori cannabinoidi specifici CB1 e CB2 (Drysdale A.J. *et al.*, 2003; Pertwee R.G., 2004); in particolare, il recettore CB2 può essere utilizzato come bersaglio terapeutico nei confronti di DSA (Siniscalco D. *et al.*, 2013). Inoltre, studi *in vitro* ed *in vivo* hanno confermato il suo ruolo neuro-protettivo (Lastres-Becker I. *et al.*, 2005; Esposito G. *et al.*, 2006) ed antiossidante, in particolar modo dovuto alla presenza di due gruppi idrofilici (-OH) nella struttura della molecola (Mechoulam R. *et al.*, 1970).

Dai risultati di attività metabolica condotti dal nostro gruppo di ricerca sulla linea neuronale umana, è stato visto come il pre-trattamento con CBD sia in grado di prevenire e contrastare il danno neuronale indotto da CdCl₂. Questo dato è reso ancora più evidente da un'attenta analisi di morfologia cellulare.

Il ruolo del CBD nel contrastare gli effetti dello stress ossidativo causati dal metallo pesante, possono essere anche dovuti ad un aumento dei livelli di ossido nitrico (NO – Nitric Oxide) che a sua volta inibisce la via di segnalazione che porta a morte cellulare tramite la cascata delle caspasi (Fouad A.A. *et al.*, 2013).

Lo studio condotto da Fouad e colleghi nel 2013, ha messo in evidenza come il CBD sia in grado di inibire la generazione di ROS e di altri radicali liberi, prevenendo la diminuzione di NO, di GSH e l'attività delle catalasi, i cui livelli erano diminuiti a causa della presenza di Cd a livello epatico (Fouad A.A. *et al.*, 2013). Inoltre il GSH, grazie alla presenza del gruppo tiolico (R-SH), ha la caratteristica di legare i metalli pesanti con alta affinità, giocando un ruolo fondamentale nella detossificazione intracellulare (Satoh M. *et al.*, 2000; Rooney J.P. 2007).

Solitamente, quando si parla di sopravvivenza neuronale in condizioni patologiche, i meccanismi essenziali a tale scopo si riscontrano nei processi relativi alla funzionalità mitocondriale, alla sua attività metabolica e di conseguenza ai livelli intracellulari di calcio (Ca²⁺) (Ryan D. *et al.*, 2009).

Infatti, una diminuzione dell'energia libera a livello delle cellule cerebrali o comunque a livello del SNC, è correlata ad un invecchiamento progressivo dell'organo e, in questo caso, i mitocondri e le fluttuazioni del Ca²⁺ giocano un ruolo molto importante.

La modulazione dell'omeostasi del Ca²⁺ è una condizione vitale per il corretto funzionamento del SNC ed il CBD aumenta i livelli intracellulari di questo secondo messaggero, in particolare nella regione dell'ippocampo ed in vari modelli cellulari, come

dimostrato in letteratura (Ligresti A. *et al.*, 2006; Giudice E.D. *et al.*, 2007). L'ampio spettro di azione da parte del CBD a livello mitocondriale è dovuto in particolare modo alla sua natura lipofila (Bartova A. *et al.*, 1976; Sarafian T.A. *et al.*, 2003; Athanasiou A. *et al.*, 2007).

Dall'analisi di morfologia cellulare, oltre alla protezione da stress ossidativo, appare evidente dai nostri risultati, come il CBD sia capace di rigenerare l'intricato network di connessioni che si instaurano tra i neuroni in coltura. Questo fenomeno può essere spiegato volgendo l'attenzione sui recettori dei cannabinoidi (CB1, particolarmente abbondante a livello encefalico e CB2, dislocati soprattutto a livello delle cellule del sistema immunitario), che appartengono alla famiglia di recettori accoppiati alle proteine G.

Infatti quanto un agonista si lega ai recettori accoppiati alle proteine G, si innesca una via metabolica che porta all'attivazione, mediante fosforilazione, di una serie di proteine che hanno il compito di inibire e/o promuovere l'espressione di specifiche proteine a valle. Nel caso specifico del CBD, il legame al suo specifico recettore CB1, induce la fosforilazione di PKB (Protein Kinase B, Protein Chinasi B, nota anche come AKT) che, nelle cellule nervose, si riflette in un incremento dell'espressione di GAP-43 (Stanley C.P., *et al.*, 2015; Secondo A. *et al.*, 2015), responsabile dell'accrescimento dei neuriti (Dent E.W. *et al.*, 1998).

Il Se è un componente fondamentale delle selenoproteine, enzimi che contengono un residuo di selenocisteina, estremamente presenti nei differenti organi come muscoli, cuore, fegato, polmoni, rene e cervello (Gu Q.P. *et al.*, 1999; Yeh J.Y. *et al.*, 1997a; Allan C.B. *et al.*, 1999). Ovviamente, la presenza di queste proteine è dovuta ad un incremento delle scorte di Se che si accumulano nell'organismo grazie ad una adeguata dieta. D'altra parte, è da sottolineare il fatto di come le selenoproteine siano presenti a livello encefalico anche in carenza di Se (Yeh J.Y. *et al.*, 1997b) evidenziando così il fondamentale ruolo di queste proteine a livello cerebrale.

Alterazioni nei livelli di selenoproteine sono implicate nella patogenesi di malattie neurodegenerative, di miopatie e nella carcinogenesi (Bjorkhem-Bergman L. *et al.*, 2005; Chen J. *et al.*, 2003; Ferreiro A. *et al.*, 2004). Sono numerose infatti le vie metaboliche che richiedono la presenza di Se a partire dal metabolismo ormonale della tiroide, dal sistema di difesa anti-ossidante e per la corretta funzione del sistema immunitario (Brown K.M. *et al.*, 2001).

I risultati ottenuti sulle cellule neuronali umane hanno mostrato come il Na_2SeO_3 ne aumenti l'attività metabolica quando questo è presente nel terreno di coltura; inoltre, il pre-trattamento con Na_2SeO_3 prima dell'esposizione dei neuroni dopaminergici umani al CdCl_2 ha effetti significativamente positivi sulla vitalità cellulare che torna ai livelli di controllo.

È noto da tempo che la presenza di Se nel terreno di coltura aumenta l'attività delle selenoproteine grazie all'aumento dei livelli di selenocisteine (Berggren M.M. *et al.*, 1999; Saito Y. *et al.*, 2002). Inoltre, è stato valutato come il Se e quindi le selenoproteine, siano in grado di diminuire la presenza di radicali liberi oltre a rigenerare i livelli di GSH (Gan L. *et al.*, 2002).

I ROS, la cui produzione è causata dalla presenza di Cd, promuovendo la depolarizzazione della membrana mitocondriale, innescano irreversibilmente il processo della cascata apoptotica con conseguente morte cellulare (Chatterjee S. *et al.*, 2008; Pathak N. *et al.*, 2007; Pelicano H. *et al.*, 2003; Stohs S.J. *et al.*, 1995). L'attività del Se nei sistemi anti-ossidativi è nota da tempo (Stadtman T.C., 1991) e alcune selenoproteine, come la glutatione perossidasi, hanno il compito di prevenire il collasso delle membrane lipidiche e i danni indotti alle macromolecole dalla presenza di perossidi (Hsu Y.T. *et al.*, 1997). Ad esempio, a livello renale, il Se protegge le cellule bloccando la generazione di ROS, ristabilendo il potenziale di membrana dei mitocondri, prevenendo così il rilascio di citocromo C ed infine inibendo l'attivazione delle caspasi modulando i livelli di

espressione di proteine come BCL-2 (B-Cell Lymphoma 2) e BAX (Bcl-2 Associated X protein) con funzioni rispettivamente anti- e pro-apoptotiche. (Zhou Y.J. *et al.*, 2009).

A livello epatico il Se, come lo Zn, riduce lo stress ossidativo e quindi la morte cellulare indotta dalla presenza di Cd, rappresentando un elemento fondamentale per l'azione di enzimi anti-ossidanti (Jihen el H. *et al.*, 2009). Questo meccanismo d'azione può risultare vero anche a livello cerebrale come è stato evidenziato dai nostri risultati ottenuti sia morfologicamente che dai saggi di vitalità cellulare. Per di più, ad avvalorare questa ipotesi vi è anche il fatto che la morte cellulare indotta da Cd è guidata dall'attivazione della via metabolica di ERK (Chen L. *et al.*, 2008a; Chen L. *et al.*, 2008b), via di segnalazione inibita dal Se nel contrastare lo stress ossidativo (Liu H. *et al.*, 2010; Liu H. *et al.*, 2012).

Recentemente, Deng e colleghi (Deng Z. *et al.*, 2015) hanno valutato gli effetti del Se, sia *in vitro* che *in vivo*, nei confronti di intossicazione da Pb. Questo metallo pesante, come del resto si verifica dopo intossicazione da Cd, causa perdita della memoria ed è implicato nella formazione delle placche amiloidi nei pazienti affetti da Alzheimer. Nel lavoro di Deng e colleghi, è messo in evidenza come il Se sia in grado di tamponare l'alterazione della proteina APP e la conseguente formazione del peptide A β , oltre a ridurre i livelli di proteine pro-apoptotiche come BAX (Deng Z. *et al.*, 2015). Questi dati sono confermati dalle nostre analisi morfologiche e in western blotting ottenute sulla linea neuronale umana: infatti è evidente come il Se protegga le cellule mantenendone la forma poligonale dei corpi e le numerose estroflessioni citoplasmatiche.

Il fatto che la presenza di Na₂SeO₃ aumenti la concentrazione di GAP-43 a livello dei coni assonici della linea neuronale umana può essere spiegato considerando che le selenoproteine sono localizzate a livello dei margini estremi dei neuriti (Miyaguchi K., 2004). Oltre all'importante ruolo anti-ossidante, il Se sembra vincolato anche agli eventi di crescita dei neuriti determinandone la direzione di crescita mediante il reclutamento dei monomeri di actina globulare (G-actina). Lo studio di Miyaguchi evidenzia come le SBP

(Selenium Binding Protein – proteine che legano il Se) siano presenti all'estremità del neurite e come nella stessa regione sia presente la G-actina, reclutata dalle SBP; ciò consente al processo di polimerizzazione dei filamenti di actina (F-actina) di avere inizio.

Le modificazione morfologiche a livello dei neuriti ovvero le ramificazioni, l'estensione e la retrazione dei prolungamenti citoplasmatici, la rigenerazione dei neuriti, sono eventi strettamente dipendenti dall'organizzazione dei filamenti di actina coordinata a sua volta da diverse ABP (Actin Binding Protein – proteine che legano l'actina) (Letourneau P.C., 2009).

Inoltre, uno studio *in vitro* su gangli delle radici dorsali, ha messo in evidenza come GAP-43 sia importante nel regolare finemente il comportamento della F-actina, la cui cinetica di polimerizzazione è a sua volta importante nel regolare la motilità e la differenziazione cellulare (He Q. *et al.*, 1997); infatti GAP-43 si ancora alla F-actina a livello del cono assonico in modo da stabilizzarne la struttura.

Inoltre le SBP, all'estremità del neurite, reclutano i monomeri di G-actina per continuare la polimerizzazione dei filamenti di actina e permettere così la crescita dei prolungamenti citoplasmatici (Denny J.B. 2006).

Ricapitolando, il Se, legandosi alle SBP, permette di reclutare e concentrare le molecole di G-actina, monomero utile per la formazione e l'allungamento dei filamenti di actina (F-actina) che alla fine sono stabilizzati da GAP-43, una proteina la cui concentrazione è aumentata dalla presenza di actina filamentosa.

Quando si parla di SNC, occorre considerarlo nella sua interezza, completo di tutte le componenti cellulari, glia e neuroni. Questo è il motivo per cui abbiamo deciso di coltivare, *in vitro*, due linee cellulari, quella microgliale e quella neuronale, cercando così di riprodurre un modello di sistema nervoso.

Le due linee cellulari microgliali umana e murina, C13NJ e BV-2, sono state esposte a VDBP-OA ed entrambe le linee hanno dato risposte positive in particolare dal punto di vista di “switch” cellulare. Infatti, l’aumento dell’attività metabolica che è stato riscontrato dai saggi di vitalità cellulare non è dovuto ad un aumento della proliferazione cellulare, ma bensì ad un “switch” cellulare. L’analisi di western blotting ha evidenziato infatti un incremento del marker di attivazione microgliale B7-2 (CD86). Purtroppo, l’elevata concentrazione di CdCl₂ non è stata contrastata dalla bassa concentrazione di VDBP-OA che ha la funzione principale di trasportare la vitamina D, ed è nota in letteratura anche per stimolare il sistema immunitario (Wagner C.L. *et al.*, 2008).

Il ruolo di attivatore microgliale è stato messo in risalto soprattutto quando le linee cellulari, microgliale e neuronale, sono state coltivate in co-cultura. Infatti la microglia attivata ha la caratteristica di controllare ed eventualmente eliminare dall’ambiente circostante i detriti cellulari e le molecole neuro-tossiche che si possono accumulare dopo l’esposizione a CdCl₂. La capacità di eliminare elementi che possono incrementare lo stress ossidativo e provocare quindi la neuro-degenerazione è stato precedentemente dimostrato da Morucci e colleghi nei confronti dell’oxaliplatino, composto organico del platino (un metallo pesante) utilizzato come agente chemioterapico (Morucci G. *et al.*, 2015) e noto in letteratura per indurre neuropatia (Pasetto L.M. *et al.*, 2006). In questo caso infatti, negli esperimenti di co-cultura, la VDBP-OA è in grado di ristabilire chiaramente le connessioni neuronali tra i differenti gruppi cellulari, riorganizzando l’intricato network tra neuroni e cellule microgliali.

In un lavoro pubblicato dal nostro gruppo di ricerca, è stato inoltre dimostrato come i livelli di morte neuronale e microgliale diminuiscano visibilmente quando due co-culture (SH-SY5Y/BV-2 e SH-SY5Y/C13NJ) sono stimulate con oxaliplatino dopo opportuno pre-trattamento con VDBP-OA (figura 33) (Branca J.J.V. *et al.*, 2015). In base ai dati descritti, considerando che il Cd è un metallo pesante come il platino, e che entrambi

hanno effetti dannosi a livello del SNC, è possibile dedurre che la VDBP-OA è in grado di stimolare le cellule microgliali in modo da prevenire e contrastare la morte neuronale per apoptosi provocata dalla presenza di metalli pesanti (Cd) nel terreno di coltura.

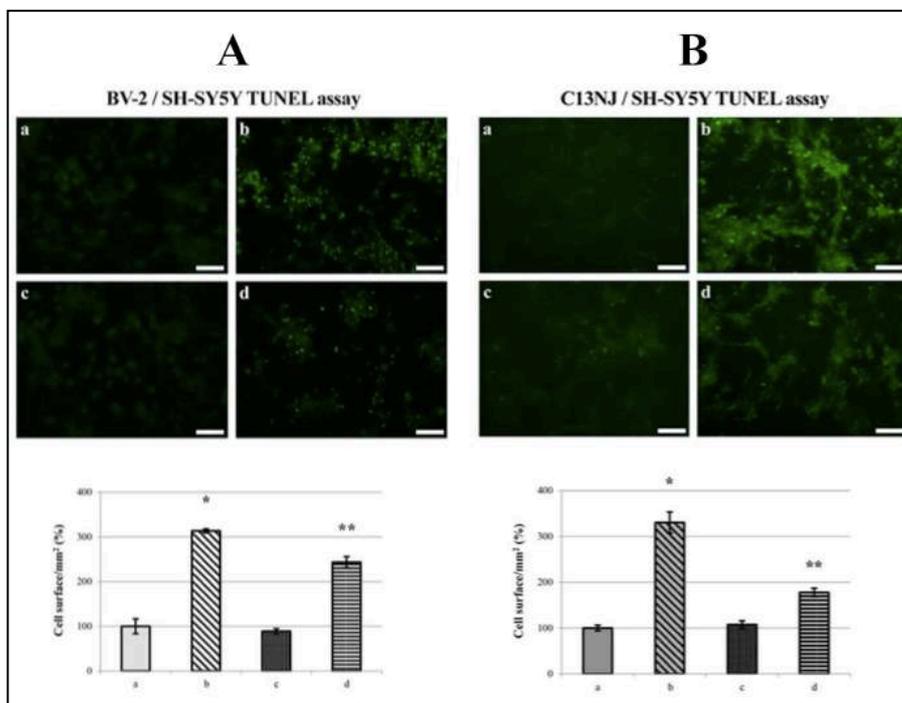


Figura 33: TUNEL assay sulla co-coltura SH-SY5Y/BV-2 (pannello A, in alto) e sulla co-coltura SH-SY5Y/C13NJ (pannello B, in alto) stimulate con oxaliplatino 10 μ M dopo opportuno pre-trattamento con VDBP-OA 800 pM. Nelle cellule di controllo (a) e nelle cellule trattate con VDBP-OA 800 pM (c), è riconoscibile solo un livello basale, fisiologico di apoptosi. Quando le cellule sono trattate con oxaliplatino 10 μ M (b), si osserva un aumento del numero di cellule apoptotiche. L'apoptosi è significativamente ridotta quando le due co-colture sono pre-trattate con VDBP-OA per 24 ore prima di aggiungere l'oxaliplatino (d). In quest'ultimo caso, solo pochi gruppi di cellule danneggiate sono ancora presenti. Le variazioni del numero di cellule apoptotiche sono state successivamente quantificate con apposito software ed espresse come superficie cellulare/mm² (pannelli A e B, in basso). I risultati sono espressi come media \pm S.E.M.. * $p < 0,05$ rispetto al punto sperimentale di controllo (a); ** $p < 0,05$ rispetto al punto sperimentale oxaliplatino 10 μ M (b). Ciascun punto sperimentale è stato effettuato in triplicato. Ingrandimento 200x; barra = 100 μ m. Immagini tratte da (Branca J.J.V. et al., 2015).

6 CONCLUSIONI

I risultati *in vitro* emersi in questi anni di dottorato hanno portato alla luce che elementi come $ZnCl_2$, CBD e Na_2SeO_3 hanno effetti neuro-protettivi nei confronti di esposizione al $CdCl_2$ di cellule in coltura. Questo fenomeno è reso possibile anzitutto grazie all'azione anti-ossidante che queste tre molecole presentano nei confronti dei danni indotti da $CdCl_2$; in secondo luogo, i meccanismi molecolari guidati da Zn, CBD e Se anche se utilizzando vie di segnalazione diverse, convergono verso il riarrangiamento dei filamenti di actina che, a loro volta, promuovono la crescita di prolungamenti citoplasmatici, riorganizzando così la connettività neuronale e la plasticità sinaptica, le cui alterazioni sono alla base di numerose patologie neurodegenerative che, si stima, affliggono, circa 40 milioni di individui.

Anche la microglia svolge un ruolo di notevole importanza; essa infatti rimuovendo elementi dannosi dall'ambiente circostante e, al tempo stesso, producendo sostanze neurotrofiche e neuro-attive che con azione paracrina, stimola i neuroni a proliferare e ad aumentare la produzione di prolungamenti citoplasmatici coordinati dalla microglia stessa, aprendo così la strada a nuovi fronti cellulari per la prevenzione di patologie come Alzheimer, Parkinson e DSA.

Bibliografia

Agholme L., Lindstrom T., Kagedal T., Marcusson J., Hallbeck M., (2010) An in vitro model for neuroscience: Differentiation of SH-SY5Y cells into cells with morphological and biochemical characteristics of mature neurons. *J. Alzheimer's Dis*; 20: 1069-1082.

Akiyama H., Barger S., Barnum S., Bradt B., Bauer J., Cole G.M., Cooper N.R., Eikelenboom P., Emmerling M., Fiebich B.L., Finch C.E., Frautschy S., Griffin W.S., Hampel H., Hull M., Landreth G., Lue L., Mrazek R., Mackenzie I.R., McGeer P.L., O'Banion M.K., Pachter J., Pasinetti G., Plata-Salman C., Rogers J., Rydel R., Shen Y., Streit W., Strohmeyer R., Tooyoma I., Van Muiswinkel F.L., Veerhuis R., Walker D., Webster S., Wegrzyniak B., Wenk G., Wyss-Coray T., (2000) Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*; 21(3): 383–421.

Allan C.B., Lacourciere G.M., Stadtman T.C., (1999) Responsiveness of selenoproteins to dietary selenium, *Annu. Rev. Nutr*; 19: 1– 16.

Alzheimer A., (1907) Uber eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allg Z Psychiat Psych-Gerichtl Med*; 64: 146–8.

Alzheimer's Disease International, (2013) *The Global Impact of Dementia 2013-2050: Policy Brief for Heads of Government*.

American Psychiatric Association, (2013) *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, 5th ed. American Psychiatric Association, Arlington, VA.

André C., Truong T.T., Robert J.F., Guillaume Y.C., (2005) Effect of metals on herbicides-alpha-synuclein association: a possible factor in neurodegenerative disease studied by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*; 26(17): 3256-64.

Araki E., Forster C., Dubinsky J.M., Ross M.E., Iadecola C., (2001) Cyclooxygenase-2 inhibitor NS-398 protects neuronal cultures from lipopolysaccharide-induced neurotoxicity. *Stroke*; 32: 2370–2375.

- Araneda S., Commin L., Atlagich M., Kitahama K., Parraguez V.H., Pequignot J.M., Dalmaz Y., (2008) VEGF overexpression in the astroglial cells of rat brainstem following ozone exposure. *Neurotoxicology*; 29: 920–927.
- Arita A., Costa M., (2009) Epigenetics in metal carcinogenesis: Nickel, arsenic, chromium and cadmium. *Metallomics*; 1: 222–228.
- Asperger H., (1944) Die “Autistischen Psychopathen” im Kindesalter. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci*; 117: 76–136.
- Athanasiou A., Clarke A.B., Turner A.E., Kumaran N.M., Vakilpour S., Smith P.A., Bagiokou D., Bradshaw T.D., Westwell A.D., Fang L., Lobo D.N., Constantinescu C.S., Calabrese V., Loesch A., Alexander S.P., Clothier R.H., Kendall D.A., Bates T.E., (2007) Cannabinoidreceptoragonistsare mitochondrial inhibitors: a unified hypothesis of how cannabinoids modulate mitochondrial function and induce cell death. *Biochem Bio-phys Res Commun*; 364: 131–137.
- Baba H., Tsuneyama K., Kumada T., Aoshima K., Imura J., (2014) Histopathological analysis for osteomalacia and tubulopathy in itai-itai disease. *J Toxicol Sci*; 39(1): 91-6.
- Bao Q.S., Lu C.Y., Songetal H., (2009) Behaviouraldevelopmentof school-aged children who live around a multi-metal sulphide mine in Guangdong province, China: a cross-sectional study. *BMC Public Health*; 9(article217).
- Bartova A., Birmingham M.K., (1976) Effect of delta9-tetrahydrocannabinol on mitochondrial NADH-oxidase activity. *J Biol Chem*; 251: 5002–5006.
- Benoff S., Jacob A., Hurley I.R., (2000) Male infertility and environmental exposure to lead and cadmium. *Hum Reprod Update*; 6: 107-21.
- Berggren M.M., Mangin J.F., Gasdaka J.R., Powis G., (1999) Effect of selenium on rat thioredoxin reductase activity: increase by supranu- tritional selenium and decrease by selenium deficiency. *Biochem. Pharmacol*; 57(2):187–193.

- Bjorkhem-Bergman L., Torndal U.B., Erken S., Nystrom C., Capitanio A., Larsen E.H., Bjornstedt M., Eriksson L.C., (2005) Selenium prevents tumor development in a rat model for chemical carcinogenesis. *Carcinogenesis*; 26; 125–131.
- Blasi E., Barluzi R., Bocchini V., Mazolla R., Bistoni F., (1990) Immortalization of murine microglia cells by a v-raf/v-myc carrying retrovirus. *J Neuroimmunol*; 27: 229–237.
- Block M.L., Wu X., Pei Z., Li G., Wang T., Qin L., Wilson B., Yang J., Hong J.S., Veronesi B., (2004) Nanometer size diesel exhaust particles are selectively toxic to dopaminergic neurons: the role of microglia, phagocytosis, and NADPH oxidase. *FASEB J.*; 18: 1618–1620.
- Block M.L., Hong J.S., (2007b) Chronic microglial activation and progressive dopaminergic neurotoxicity. *Biochemical Society Transactions*; 35(5): 1127–1132.
- Block M.L., Zecca L., Hong J.S., (2007a) Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat Rev Neurosci*; 8(1): 57-69.
- Bohatschek M., Kloss C.U., Pfeffer K., Bluethmann H., Raivich G., (2004) B7.2 on activated and phagocytic microglia in the facial axotomy model: regulation by interleukin-1 receptor type 1, tumor necrosis factor receptors 1 and 2 and endotoxin. *J Neuroimmunol*; 156(1-2): 132-45.
- Bondier J.R., Michel G., Propper A., Badot P.M., (2008) Harmful effects of cadmium on olfactory system in mice. *Inhalation Toxicology*; 20(13): 1169–1177.
- Bonithon-Kopp C., Huel G., and Grasmick C., (1986) Effects of pregnancy on the inter-individual variations in blood levels of lead, cadmium and mercury. *Biological Research in Pregnancy and Perinatology*; 7(1): 37–42.
- Borges V.C., Santos F.W, Rocha J.B.T., Nogueira C.W., (2007) Heavy metals modulate glutamatergic system in human platelets. *Neurochemical Research*; 32(6): 953–958.

Braconi D., Bernardini G., Santucci A., (2011) Linking protein oxidation to environmental pollutants: redox proteomic approaches. *J Proteomics*; 74: 2324–2337.

Bradford M.M., (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*; 72: 248-254.

Branca J.J., Morucci G., Malentacchi F., Gelmini S., Ruggiero M., Pacini S., (2015) Effects of oxaliplatin and oleic acid Gc-protein-derived macrophage-activating factor on murine and human microglia. *J Neurosci Res*; 93(9): 1364-77.

Bronstein D.M., Perez-Otano I., Sun V., Mullis-Sawin S.B., Chan J., Wu G.C., Hudson P.M., Kong L.Y., Hong J.S., McMillian M.K., (1995) Glia-dependent neurotoxicity and neuro-protection in mesencephalic cultures. *Brain Res*; 704: 112–6.

Brown K.M., Arthur J.R., (2001) Selenium, selenoproteins and human health. *Public Health Nutr*; 4: 593–599.

Calderon-Garciduenas L., Azzarelli B., Acuna H., Garcia R., Gambling T.M., Osnaya N., Monroy S., DEL Tizapantzi M.R., Carson J.L., Villarreal-Calderon A., Rewcastle B., (2002) Air pollution and brain damage. *Toxicol. Pathol*; 30: 373–389.

Calderon-Garciduenas L., Maronpot R.R., Torres-Jardon R., Henríquez-Roldán C., Schoonhoven R., Acuña-Ayala H., Villarreal-Calderón A., Nakamura J., Fernando R., Reed W., Azzarelli B., Swenberg J.A., (2003) DNA damage in nasal and brain tissues of canines exposed to air pollutants is associated with evidence of chronic brain inflammation and neurodegeneration. *Toxicol. Pathol*; 31: 524–538.

Calderon-Garciduenas L., Solt A.C., Henríquez-Roldán C., Torres-Jardón R., Nuse B., Herritt L., Villarreal-Calderón R., Osnaya N., Stone I., García R., Brooks D.M., González-Maciel A., Reynoso-Robles R., Delgado-Chávez R., Reed W., (2008a) Long-term air pollution exposure is associated with neuroinflammation, an altered innate immune

response, disruption of the blood-brain barrier, ultrafine particulate deposition, and accumulation of amyloid beta-42 and alpha-synuclein in children and young adults. *Toxicol. Pathol*; 36: 289–310.

Calderon-Garciduenas L., Mora-Tiscareño A., Ontiveros E., Gómez-Garza G., Barragán-Mejía G., Broadway J., Chapman S., Valencia-Salazar G., Jewells V., Maronpot R.R., Henríquez-Roldán C., Pérez-Guillé B., Torres-Jardón R., Herrit L., Brooks D., Osnaya-Brizuela N., Monroy M.E., González-Maciel A., Reynoso-Robles R., Villarreal-Calderon R., Solt A.C., Engle R.W., (2008b) Air pollution, cognitive deficits and brain abnormalities: a pilot study with children and dogs. *Brain Cogn*; 68: 117–127.

Camell C., Smith C.W., (2013) Dietary Oleic Acid Increases M2 Macrophages in the Mesenteric Adipose Tissue. *PLoS One*; 8(9): e75147.

Campbell G., Shatz C.J., (1992) Synapses formed by identified retinogeniculate axons during the segregation of eye input. *J. Neurosci*; 12: 1847–1858;

Cao X., Lin H., Muskhelishvili L., Latendresse J., Richter P., Heflich R.H., (2015) Tight junction disruption by cadmium in an in vitro human airway tissue model. *Respir Res*; 16: 30.

Cao X., Lin P., Jiang P., Li C., (2013) Characteristics of the gastrointestinal microbiome in children with autism spectrum disorder: a systematic review. *Shanghai Arch Psychiatry*; 25: 342–53.

Cao Y., Chen A., Radcliffe J., Dietrich K.N., Jones R.L., Caldwell K., Rogan W.J., (2009) Postnatal cadmium exposure, neurodevelopment, and blood pressure in children at 2, 5, and 7 years of age. *Environmental Health Perspectives*; 117(10): 1580–1586.

Cardoso B.R., Roberts B.R., Bush A.I., Hare D.J., (2015) Selenium, selenoproteins and neurodegenerative diseases. *Metallomics*; 7(8): 1213-28.

- Carson M.J., Sutcliffe J.G., Campbell I.L., (1999) Microglia stimulate naive T-cell differentiation without stimulating T-cell proliferation. *J Neurosci Res*; 55(1): 127-34.
- Carvey P.M., Punati A., Newman M.B., (2006) Progressive dopamine neuron loss in Parkinson's disease: the multiple hit hypothesis. *Cell Transplant*; 15(3): 239–250.
- Chan H.M., Zhu L.F., Zhong R., Grant D., Goyer R.A., Cherian M.G., (1993) Nephrotoxicity in rats following liver transplantation from cadmium-exposed rats. *Toxicol Appl Pharmacol*; 123: 89–96.
- Chatterjee S., Kundu S., Bhattacharyya A., (2008) Mechanism of cadmium induced apoptosis in the immunocyte. *Toxicology Letters*; 177: 83–89.
- Chen J., Berry M.J., (2003) Selenium and selenoproteins in the brain and brain diseases. *J. Neurochem*; 86: 1–12.
- Chen L., Liu L., Huang S., (2008a) Cadmium activates the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway via induction of reactive oxygen species and inhibition of protein phosphatases 2A and 5. *Free Radical Biology and Medicine*; 45(7): 1035–1044.
- Chen L., Liu L., Luo Y., Huang S., (2008b) MAPK and mTOR pathways are involved in cadmium-induced neuronal apoptosis. *J Neurochem*; 105(1): 251-61.
- Cheng W., Rolls E.T., Gu H., Zhang J., Feng J., (2015) Autism: reduced connectivity between cortical areas involved in face expression, theory of mind, and the sense of self. *Brain*; 138(Pt 5): 1382-93.
- Chin-Chan M., Navarro-Yepes J., Quintanilla-Vega B., (2015) Environmental pollutants as risk factors for neurodegenerative disorders: Alzheimer and Parkinson diseases. *Front Cell Neurosci*; 9: 124.
- Chung R.S., Vickers J.C., Chuah M.I., West A.K., (2003) Metallothionein-IIA promotes initial neurite elongation and postinjury reactive neurite growth and facilitates healing after focal cortical brain injury. *J Neurosci*; 23(8): 3336-42.

- Cole T.B., Robbins C.A., Wenzel H.J., Schwartzkroin P.A., Palmiter R.D., (2000) Seizures and neuronal damage in mice lacking vesicular zinc. *Epilepsy Res*; 39(2): 153-69.
- Costello S., Cockburn M., Bronstein J., Zhang X., Ritz B., (2009) Parkinson's disease and residential exposure to maneb and paraquat from agricultural applications in the central valley of California. *Am J Epidemiol*; 169: 919–26.
- D'Andrea M.R., Cole G.M., Ard M.D., (2004) The microglial phagocytic role with specific plaque types in the Alzheimer disease brain. *Neurobiology of Aging*; 25(5): 675–683.
- Dallas S., Miller D.S., Bendayan R., (2006) Multidrug resistance-associated proteins: expression and function in the central nervous system. *Pharmacol. Rev*; 58: 140–161.
- del Rio-Hortega P., (1937) Microglia in Cytology and Cellular Pathology of the Nervous System; 481–534.
- Deng Z., Fu H., Xiao Y., Zhang B., Sun G., Wei Q., Ai B., Hu Q., (2015) Effects of selenium on lead-induced alterations in A β production and Bcl-2 family proteins. *Environ Toxicol Pharmacol*; 39(1): 221-8.
- Denny J.B., (2006) Molecular mechanisms, biological actions, and neuropharmacology of the growth-associated protein GAP-43. *Curr Neuropharmacol*; 4(4): 293-304.
- Dent E.W., Meiri K.F., (1998) Distribution of phosphorylated GAP-43 (neuromodulin) in growth cones directly reflects growth cone behavior. *J. Neurobiol*; 35: 287–299.
- Desi I., Nagymajtenyi L., Schulz H., (1998) Behavioural and neurotoxicological changes caused by cadmium treatment of rats during development. *Journal of Applied Toxicology*. 18(1), 63–70.
- Drysdale A.J., Platt B., (2003) Cannabinoids: mechanisms and therapeutic applications in the CNS. *Curr Med Chem*; 10: 2719 –2732.

- Ebadi M., (1986) Characterization of a metallothionein-like protein in rat brain. *Biol. Truce Elem Res*; 11: 101-116.
- Ebadi M., (1991) Metallothionein and other zinc-binding proteins in brain, *Methods Enzymol*; 205: 363–387.
- Ebadi M., Hiramatsu M., (2000) Glutathione and metallothionein in oxidative stress of Parkinson's disease; G. Poli, E. Cadenas, L. Packer; *Free Radicals in Brain Pathophysiology*, Marcel Dekker, New York: 428–465.
- Ebadi M., Iversen P.L., Hao R., Cerutis D.R., Rojas Castaneda P., Happe H.K., Murrin L.C., Pfeiffer R.F., (1995) Expression and regulation of brain metallothionein, *Neurochem. Int*; 27: 1–22.
- Ebadi M., Kumari M.V.R., Hiramatsu M., Hao R., Pfeiffer R.F., Rojas P., (1998) Metallothionein, neurotrophins and selegiline in providing neuroprotection in Parkinson's disease, *Restor. Neurol. Neurosci*; 12: 103–111.
- Ebadi M., Leuschen M.P., ReFaey H., Hamada F.M., Rojas P., (1996) The antioxidant properties of zinc and metallothionein, *Neurochem. Int*; (29): 159–166.
- El-Sharaky A.S., Mohammed G.B., Kandeel K.M., Wahby M.M., (1987) An electrochemical approach to characterization of metallothionein: direct evidence of interaction of cadmium with cysteine residue. *Proceedings of the XXV-International Conference on Co-ordination Chemistry*, Nanjing, China, July 26–31.
- Erickson J.C., Hollopeter G., Thomas S.A., Froelick G.J., Palmiter R.D., (1997) Disruption of the metallothionein-III gene in mice: analysis of brain zinc, behavior, and neuron vulnerability to metals, aging, and seizures. *J. Neurosci*; 17: 1271–1281.
- Eroglu C., Barres B.A., (2010) Regulation of synaptic connectivity by glia. *Nature*; 468(7321): 223-31.

Esposito G., De Filippis D., Maiuri M.C., De Stefano D., Carnuccio R., Iuvone T., (2006) Cannabidiol inhibits inducible nitric oxide synthase protein expression and nitric oxide production in beta-amyloid stimulated PC12 neurons through p38 MAP kinase and NF-kappaB involvement. *Neurosci Lett*; 399: 91–95.

Exner N., Lutz A.K., Haass C., Winklhofer K.F., (2012) Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease: molecular mechanisms and pathophysiological consequences. *EMBO J*; 31: 3038–62.

FAO/WHO, (1988) Evaluation of certain food additives and contaminants (Thirty-third report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives). WHO Technical Report Series No. 776, WHO, Geneva, Switzerland.

Fern R., Black J.A., Ransom B.R., Waxman S.G., (1996) Cd²⁺-induced injury in CNS white matter. *Journal of Neurophysiology*; 76(5): 3264–3273.

Ferreiro A., Ceuterick-de Groote C., Marks J.J., Goemans N., Schreiber G., Hanefeld F., Fardeau M., Martin J.J., Goebel H.H., Richard P., Guicheney P., Bönnemann C.G., (2004) Desmin-related myopathy with Mallory body-like inclusions is caused by mutations of the selenoprotein N gene. *Ann. Neurol*; 55: 676–686.

Figueiredo-Pereira M.E., Cohen G., (1999) The ubiquitin/proteasome pathway: friend or foe in zinc-, cadmium-, and H₂O₂-induced neuronal oxidative stress. *Mol Biol Rep*; 26(1-2): 65-9.

Fitzgerald M., Nairn P., Bartlett C.A., Chung R.S., West A.K., Beazley L.D., (2007) Metallothionein-IIA promotes neurite growth via the megalin receptor. *Exp Brain Res*; 183(2): 171-80.

Fouad A.A., Al-Mulhim A.S., Gomaa W., (2013) Protective effect of cannabidiol against cadmium hepatotoxicity in rats. *J Trace Elem Med Biol*; 27(4): 355-363.

- Gabuzda D., Busciglio J., Chen L.B., Matsudaira P., Yankner B.A., (1994) Inhibition of energy metabolism alters the processing of amyloid precursor protein and induces a potentially amyloidogenic derivative. *J Biol Chem*; 269: 13623–8.
- Gan L., Liu Q., Xu H.B., Zhu Y.S., Yang X.L., (2002) Effects of selenium overexposure on glutathione peroxidase and thioredoxin reductase gene expressions and activities. *Biol. Trace Elem. Res*; 89: 165–175.
- García Ruiz P.J., (2004) Prehistory of Parkinson's disease. *Neurologia*; 19(10): 735-737.
- Geschwind D.H., (2009) Advances in autism. *Annu Rev Med*; 60: 367–80.
- Gibbons H.M., Dragunow M., (2006) Microglia induce neural cell death via a proximity-dependent mechanism involving nitric oxide. *Brain Res*; 1084(1): 1-15.
- Gibson G.E., Sheu K.F., Blass J.P., (1998) Abnormalities of mitochondrial enzymes in Alzheimer's disease. *J Neural Transm*; 105: 855–70.
- Giudice E.D., Rinaldi L., Passarotto M., Facchinetti F., D'Arrigo A., Guiotto A., Carbonare M.D., Battistin L., Leon A., (2007) Cannabidiol, unlike synthetic cannabinoids, triggers activation of RBL-2H3 mast cells. *J Leukoc Biol*; 81: 1512–1522.
- Gonçalves J.F., Fiorenza A.M., Spanevello R.M., Fiorenza A.M., Spanevello R.M., Mazzanti C.M., Bochi G.V., Antes F.G., Stefanello N., Rubin M.A., Dressler V.L., Morsch V.M., Schetinger M.R., (2010) N-acetylcysteine prevents memory deficits, the decrease in acetylcholinesterase activity and oxidative stress in rats exposed to cadmium. *Chemico-Biological Interactions*, 186(1): 53–60.
- Gorell J.M., Johnson C.C., Rybicki B.A., Peterson E.L., Richardson R.J., (1998) The risk of Parkinson's disease with exposure to pesticides, farming, well water, and rural living. *Neurology*; 50: 1346–50.
- Gorell J.M., Peterson E.L., Rybicki B.A., Johnson C.C., (2004) Multiple risk factors for Parkinson's disease. *J Neurol Sci*; 217: 169–74.

- Grant W.B., Campbell A., Itzhaki R.F., Savory J., (2002) The significance of environmental factors in the etiology of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*; 4:179–89.
- Gu Q.P., Beilstein M.A., Barofsky E., Ream W., Whanger P.D., (1999) Purification, characterization, and glutathione binding to seleno- protein W from monkey muscle, *Arch. Biochem. Biophys*; 361: 25–33.
- Gupta A., Chandra S.V., (1991) Gestational cadmium exposure and brain development: a biochemical study. *Industrial Health*; 29(2): 65–71.
- Hallmayer J., Cleveland S., Torres A., Phillips J., Cohen B., Torigoe T., Miller J., Fedele A., Collins J., Smith K., Lotspeich L., Croen L.A., Ozonoff S., Lajonchere C., Grether J.K., Risch N., (2011) Genetic heritability and shared environmental factors among twin pairs with autism. *Arch Gen Psychiatry*; 68: 1095–102.
- Hardy J., (2009) The amyloid hypothesis for Alzheimer's disease: a critical reappraisal. *J Neurochem*; 110(4): 1129–34.
- Hardy J.A., Higgins G.A., (1992) Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science*; 256: 184–5.
- Harman D., (1956) Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol*; 11: 298–300.
- Harman D., (1972). A biological clock: The mitochondria? *J Am Ger Soc*; 20: 145–7.
- He Q., Dent E.W., Meiri K.F., (1997) Modulation of actin filament behavior by GAP-43 (neuromodulin) is dependent on the phosphorylation status of serine 41, the protein kinase C site. *J Neurosci*; 17(10): 3515-24.
- Howard H., (2002) Human health and heavy metals exposure. Life support: the environment and human health. Michael McCally, MIT press.

- Hozumi I., Asanuma M., Yamada M., Uchida Y., (2004) Metallothioneins and Neurodegenerative Diseases. *Journal of Health Science*; 50(4): 323-331.
- Hsu Y.T., Wolter K.G., Youle R.J., (1997) Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*; 94: 3668–3672.
- Huberman A.D., Feller M.B., Chapman B., (2008) Mechanisms underlying development of visual maps and receptive fields. *Annu. Rev. Neurosci*; 31: 479–509.
- Hughes V., (2012) Microglia: The constant gardeners. *Nature*; 485(7400): 570-2.
- Ishitobi H., Watanabe C., (2005) Effects of low-dose perinatal cadmium exposure on tissue zinc and copper concentrations in neonatal mice and on the reproductive development of female offspring. *Toxicology Letters*; 159(1): 38–46.
- Itoh M., Ebadi M., Swanson S., (1983) The presence of zinc binding protein in brain. *J. Neurochem*; 41: 823–829.
- Iversen L.L., Mortishire-Smith R.J., Pollack S.J., Shearman M.S., (1995) The toxicity in vitro of beta-amyloid protein. *Biochem J*; 311(Pt 1): 1-16.
- Jankovic J., (2008) Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*; 79: 368–376.
- Jarup L., Hellstrom L., Alfven T., Carlsson M.D., Grubb A., Persson B., Pettersson C., Spång G., Schütz A., Elinder C.G., (2000) Low level exposure to cadmium and early kidney damage: the OSCAR study. *Occup Environ Med*; 57: 668-72.
- Jiang L.F., Yao T.M., Zhu Z.L., Wang C., Ji L.N., (2007) Impacts of Cd(II) on the conformation and self-aggregation of Alzheimer's tau fragment corresponding to the third repeat of microtubule-binding domain. *Biochim Biophys Acta*; 1774: 1414–1421.

- Jihen el H., Imed M., Fatima H., Abdelhamid K., (2009) Protective effects of selenium (Se) and zinc (Zn) on cadmium (Cd) toxicity in the liver of the rat: effects on the oxidative stress. *Ecotoxicol Environ Saf*; 72(5): 1559-64.
- Jin T., Lu J., Nordberg M., (1998) Toxicokinetics and biochemistry of cadmium with special emphasis on the role of metallothionein. *NeuroToxicology*; 19(4-5): 529–536.
- Jin Y.H., Clark A.B., Slebos R.J., Al-Refai H., Taylor J.A., Kunkel T.A., Resnick M.A., Gordenin D.A., (2003) Cadmium is a mutagen that acts by inhibiting mismatch repair. *Nat. Genet*; 34: 239–241.
- Johansson L., Guo X., Hällström T., Norton M.C., Waern M., Ostling S., Bengtsson C., Skoog I., (2013) Common psychosocial stressors in middle-aged women related to longstanding distress and increased risk of Alzheimer's disease: a 38-year longitudinal population study. *BMJ open*; 3: e003142.
- Kameo S., Nakai K., Kurokawa N., Kanehisa T., Naganuma A., Satoh H., (2005) Metal components analysis of metallothionein-III in the brain sections of metallothionein-I and metallothionein-II null mice exposed to mercury vapor with HPLC/ICP-MS. *Anal Bioanal Chem*; 381(8): 1514-9.
- Kanner L., (1943) Autistic disturbances of affective contact. *Nervous Child*; 2: 217–250.
- Katzman R., (1976) The prevalence and malignancy of Alzheimer's disease: a major killer. *Arch Neurol*; 33: 217–8.
- Khan S.M., Cassarino D.S., Abramova N.N., Keeney P.M., Borland M.K., Trimmer P.A., Krebs C.T., Bennett J.C., Parks J.K., Swerdlow R.H., Parker W.D. Jr., Bennett J.P. Jr., (2000) Alzheimer's disease cybrids replicate beta-amyloid abnormalities through cell death pathways. *Ann Neurol*; 48: 148–55.

- Kitazawa M., Yamasaki T.R., LaFerla F.M., (2004) Microglia as a potential bridge between the amyloid -peptide and tau. *Annals of the New York Academy of Sciences*; 1035: 85– 103.
- Kobayashi E., Suwazono Y., Dochi M., Honda R., Kido T., Nakagawa H., (2009) Influence of drinking and/or cooking with Jinzu River water on the development of Itai-itai disease. *Biol Trace Elem Res*; 129(1-3): 46-57.
- Koenigsnecht J., Landreth G., (2004) Microglial phagocytosis of fibrillar beta-amyloid through a beta1 integrin-dependent mechanism. *J Neurosci*; 24(44): 9838-46.
- Kokhan V.S., Afanasyeva M.A., Van'kin G.I., (2012) α -Synuclein knockout mice have cognitive impairments. *Behav. Brain. Res*; 231(1): 226–230.
- Korpela H., Loueniva R., Yrjanheikki E., Kauppila A., (1986) Lead and cadmium concentrations in maternal and umbilical cord blood, amniotic fluid, placenta, and amniotic membranes,” *American Journal of Obstetrics and Gynecology*; 155(5): 1086–1089.
- Koyama R., Ikegaya Y., (2015) Microglia in the pathogenesis of autism spectrum disorders. *Neurosci Res*; pii: S0168-0102(15)00162-5.
- Kumari M.N.R., Hiramatsu M., Ebadi M., (1998) Free radicals scavenging actions of metallothionein isoforms I and II, *Free Radic. Res*; 29: 93–101.
- Kumari M.N.R., Hiramatsu M., Ebadi M., (2000) Free radical scavenging; actions of hippocampal metallothionein isoforms and antimetallothio- nein: an electron spin resonance spectroscopy study, *Cell. Mol. Biol*; 46: 627 – 636.
- Kurkowska-Jastrzebska I., Babiuch M., Joniec I., Przybyłkowski A., Członkowski A., Członkowska A., (2002) Indomethacin protects against neurodegeneration caused by MPTP intoxication in mice. *International Immunopharmacology*; 2(8): 1213–1218.
- Lafuente A., and Esquifino A.I., (1999) Cadmium effects on hypothalamic activity and pituitary hormone secretion in the male. *Toxicology Letters*; 110(3): 209–218.

- Lastres-Becker I., Molina-Holgado F., Ramos J.A., Mechoulam R., Fernández-Ruiz J., (2005) Cannabinoids provide neuroprotection against 6-hydroxydopamine toxicity in vivo and in vitro: relevance to Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*; 19: 96–107.
- Lees A.J., (2007) Unresolved issues relating to the shaking palsy on the celebration of James Parkinson's 250th birthday. *Mov Disord*; 22(17) Suppl. 1: S327-34.
- Legido A., Jethva R., Goldenthal M.J., (2013) Mitochondrial dysfunction in autism. *Semin Pediatr Neurol*; 20(3): 163-75.
- Letourneau P.C., (2009) Actin in axons: stable scaffolds and dynamic filaments. *Results Probl Cell Differ*; 48: 65-90.
- Levy-Lahad E., Wasco W., Poorkaj P., Wasco W., Poorkaj P., Romano D.M., Oshima J., Pettingell W.H., Yu C.E., Jondro P.D., Schmidt S.D., Wang K., (1995) Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science*; 269: 973–7.
- Li M., Xia T., Jiang C.S., Li L.J., Fu J.L., Zhou Z.C., (2003) Cadmium directly induced the opening of membrane permeability pore of mitochondria. Which possibly involved in cadmium triggered apoptosis. *Toxicology*; 194: 19–33.
- Li X., Lv Y., Yu S., Zhao H., Yao L., (2012) The effect of cadmium on Abeta levels in APP/PS1 transgenic mice. *Exp. Ther. Med*; 4: 125–130.
- Ligresti A., Moriello A.S., Starowicz K., Matias I., Pisanti S., De Petrocellis L., Laezza C., Portella G., Bifulco M., Di Marzo V., (2006) Antitumor activity of plant cannabinoids with emphasis on the effect of cannabidiol on human breast carcinoma. *J Pharmacol Exp Ther*; 318: 1375–1387.
- Liu B., Gao H.M., Wang J.Y., Jeohn G.H., Cooper C.L., Hong J.S., (2002) Role of nitric oxide in inflammation-mediated neurodegeneration. *Ann NY Acad Sci*; 962: 256–63.

Liu H., Bian W., Liu S., Huang K., (2012) Selenium protects bone marrow stromal cells against hydrogen peroxide-induced inhibition of osteoblastic differentiation by suppressing oxidative stress and ERK signaling pathway. *Biol Trace Elem Res*; 150(1-3): 441-450.

Liu H., Lu Q., Huang K., (2010) Selenium suppressed hydrogen peroxide-induced vascular smooth muscle cells calcification through inhibiting oxidative stress and ERK activation. *J Cell Biochem*; 111(6): 1556-1564.

Liu M.C., Liu X.Q., Wang W., Shen X.F., Che H.L., Guo Y.Y., Zhao M.G., Chen J.Y., Luo W.J., (2012) Involvement of microglia activation in the lead induced long-term potentiation impairment. *PLoS One.*; 7(8): e43924.

Liu Y., Qin L., Li G., Zhang W., An L., Liu B., Hong J.S., (2003) Dextromethorphan protects dopaminergic neurons against inflammation-mediated degeneration through inhibition of microglial activation. *J Pharmacol Exp Ther*; 305: 1–7.

López E., Figueroa S., Oset-Gasque M.J., González M.P., (2003) Apoptosis and necrosis: two distinct events induced by cadmium in cortical neurons in culture. *British Journal of Pharmacology*; 138(5): 901–911.

Loganathan P., Hedley M.J., Grace N.D., (2008) Pasture soils contaminated with fertilizer-derived cadmium and fluorine: livestock effects. *Rev Environ Contam Toxicol*; 192: 29-66.

Long, T.C., Tajuba J., Sama P., Saleh N., Swartz C., Parker J., Hester S., Lowry G.V., Veronesi B., (2007) Nanosize titanium dioxide stimulates reactive oxygen species in brain microglia and damages neurons in vitro. *Environ. Health Perspect*; 115: 1631–1637.

Lui E., Fisman M., Wong C., Diaz F., (1990) Metals and the liver in Alzheimer's disease. An investigation of hepatic zinc, copper, cadmium and metallothionein. *J. Am. Geriatr. Soc*; 38: 633–639.

- Lin Y.C., Uang H.W., Lin R.J., Chen I.J., Lo Y.C., (2007) Neuroprotective effects of glyceryl nonivamide against microglia-like cells and 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity in SH-SY5Y human dopaminergic neuroblastoma cells. *J Pharmacol Exp Ther*; 323(3): 877-887.
- Mangialasche F., Weili X., Kivipelto M., (2013) Prevention of Alzheimer's Disease: Intervention Studies. In *Understanding Alzheimer's Disease*. Edited by Zerr I; InTech.
- Manton W.I., Cook J.D., (1984) High accuracy (stable isotope dilution) measurements of lead in serum and cerebrospinal fluid. *British Journal of Industrial Medicine*; 41(3): 313–319.
- Marlowe M., Errera J., Jacobs J., (1983) Increased lead and cadmium burdens among mentally retarded children and children with borderline intelligence,” *American Journal of Mental Deficiency*; 87(5): 477–483.
- McDonald D.R., Brunden K.R., Landreth G.E., (1997) Amyloid fibrils activate tyrosine kinase-dependent signaling and superoxide production in microglia. *Journal of Neuroscience*; 17(7):2284–2294.
- McNaught K.S., Belizaire R., Isacson O., Jenner P., Olanow C.W., (2003) Altered proteasomal function in sporadic Parkinson's disease. *Exp Neurol*; 179: 38–46.
- McNaught K.S., Mytilineou C., Jnobaptiste R., Yabut J., Shashidharan P., Jennert P., Olanow CW., (2002) Impairment of the ubiquitin–proteasome system causes dopaminergic cell death and inclusion body formation in ventral mesencephalic cultures. *J Neurochem* 2002; 81: 301–6.
- Mead M.N., (2010) Cadmium confusion: do consumers need protection? *Environ Health Perspect*; 118(12): a528-34.
- Mechoulam R., Shani A., Edery H., Grunfeld Y., (1970) Chemical basis of hashish activity. *Science*; 169: 611–612.

- Mendez-Armenta M., Rios C., (2007) Cadmium neurotoxicity. *Environmental Toxicology and Pharmacology*; 23(3): 350–358.
- Mi W., van Wijk N., Cansev M., Sijben, John W.C., Kamphuis, Patrick J.G.H., (2013) Nutritional approaches in the risk reduction and management of Alzheimer's disease. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif)*; 29: 1080-9.
- Milligan E.D., Watkins L.R., (2009) Pathological and protective roles of glia in chronic pain. *Nat Rev Neurosci*; 10(1): 23-36.
- Miquel J., Economos A.C., Fleming J., Johnson J.E.Jr., (1980) Mitochondrial role in cell aging. *Exp Gerontol*; 15: 575–91.
- Miyaguchi K., (2004) Localization of selenium-binding protein at the tips of rapidly extending protrusions. *Histochem Cell Biol*; 121(5): 371-6.
- Morris G.P., Clark I.A., Zinn R., Vissel B., (2013) Microglia: a new frontier for synaptic plasticity, learning and memory and neurodegenerative disease research. *Neurobiol. Learn. Mem*; 105: 40–53.
- Morucci G., Branca J.J., Gulisano M., Ruggiero M., Paternostro F., Pacini A., Di Cesare Mannelli L., Pacini S., (2015) Gc-protein-derived macrophage activating factor counteracts the neuronal damage induced by oxaliplatin. *Anticancer Drugs*; 26(2): 197-209.
- Mosley R.L., Benner E.J., Kadiu I., Thomas M., Boska M.D., Hasan K., Laurie C., Gendelman H.E., (2006) Neuroinflammation, oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease. *Clin Neurosci Res*; 6: 261–81.
- Mühlfeld C., Rothen-Rutishauser B., Blank F., Vanhecke D., Ochs M., Gehr P., (2008) Interactions of nanoparticles with pulmonary structures and cellular responses. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol*; 294: L817–829.

- Nierenberg D.W., Nordgren R.E., Change M.B., Siegler R.W., Blayney M.B., Hochberg F., Toribara TY, Cernichiari E, Clarkson T., (1998) Delayed cerebellar disease and death after accidental exposure to dimethylmercury. *New Engl J Med*; 338: 1672-6.
- Nimmerjahn A., Kirchhoff F., Helmchen F., (2005) Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science*; 308: 1314–1318.
- Nordberg M., (1984) General aspects of cadmium: transport, uptake and metabolism by the kidney. *Environ Health Perspect*; 54: 13–20.
- Noriega D.B., Savelkoul H.F., (2014) Immune dysregulation in autism spectrum disorder. *Eur J Pediatr*; 173: 33–43.
- Oberdorster G., Sharp Z., Atudorei V., Elder A., Gelein R., Kreyling W., Cox C., (2004) Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. *Inhal. Toxicol*; 16: 437–445.
- Ognlanovic B., Zikic R.V., Stajn A., Potrovic V.M., (1995) The effects of selenium on the antioxidant defense system in the liver of rats exposed to cadmium. *Am. J. Physiol*; 44: 293–300.
- Ojo O., Brooke J., (2015) Evaluating the Association between Diabetes, Cognitive Decline and Dementia. *Int J Environ Res Public Health*; 12(7): 8281-94.
- Orrenius S., (2007) Reactive Oxygen species in mitochondria-mediated cell death. *Drug Metab Rev*; 39: 443–55.
- Orsucci D., Mancuso M., Ienco E.C., Simoncini C., Siciliano G., Bonuccelli U., (2013) Vascular factors and mitochondrial dysfunction: a central role in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Current neurovascular research*; 10: 76-80.
- Pal R., Nath R., Gill K.D., (1993) Influence of ethanol on cadmium accumulation and its impact on lipid peroxidation and membrane bound functional enzymes (Na⁺, K⁺ -ATPase and acetylcholinesterase) in various regions of adult rat brain. *Neurochemistry International*; 23(5): 451–458.

- Palmiter R.D., (1998) The elusive function of metallothioneins, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*; 95: 8428 – 8430.
- Panayi A., Spyrou N., Iversen B., White M., Part P., (2002) Determination of cadmium and zinc in Alzheimer's brain tissue using inductively coupled plasma mass spectrometry. *J Neurol Sci*; 195: 1–10.
- Paolicelli R.C., Bolasco G., Pagani F., Maggi L., Scianni M., Panzanelli P., Giustetto M., Ferreira T.A., Guiducci E., Dumas L., Ragozzino D., Gross C.T., (2011) Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science*; 333: 1456–1458.
- Pasetto L.M., D'Andrea M.R., Rossi E., Monfardini S., (2006) Oxaliplatin-related neurotoxicity: how and why? *Crit Rev Oncol Hematol*; 59: 159–168.
- Pathak N., Khandelwal S., (2007) Role of oxidative stress and apoptosis in cadmium induced thymic atrophy and splenomegaly in mice. *Toxicology Letters*; 169: 95– 108.
- Pelicano H., Feng L., Zhou Y., Carew J.S., Hileman E.O., Plunkett W., (2003) Inhibition of mitochondrial respiration: a novel strategy to enhance drug-induced apoptosis in human leukemia cells by a reactive oxygen species-mediated mechanism. *Journal of Biological Chemistry*; 278(39), 37832–37839.
- Pertwee R.G., (2004) The pharmacology and therapeutic potential of cannabidiol. *Cannabinoids* (Di Marzo V, ed); London: Kluwer Academic/Plenum Publishers: 32–83.
- Petrucci S., Consoli F., Valente E.M., (2014) Parkinson disease genetics: a “continuum” from Mendelian to multifactorial inheritance. *Curr Mol Med*;14:1079–88.
- Peudenier S., Héry C., Montagnier L., Tardieu M., (1991) Human microglial cells: characterization in cerebral tissue and in primary cultures and study of their susceptibility to HIV-I infection. *Ann Neurol*; 29: 152– 161.
- Pillai R., Uyehara-Lock J.H., Bellinger F.P., (2014) Selenium and selenoprotein function in brain disorders. *IUBMB Life*; 66(4): 229-39.

- Polazzi E., Contestabile A., (2002) Reciprocal interactions between microglia and neurons: from survival to neuropathology. *Reviews in the Neurosciences*; 13(3): 221–242.
- Prince M., Bryce R., Albanese E., Wimo A., Ribeiro W., Ferri C.P., (2013) The global prevalence of dementia: a systematic review and metaanalysis. *Alzheimer's & dementia: the journal of the Alzheimer's Association*; 9: 63-75.e2.
- Priyadarshi A., Khuder S.A., Schaub E.A., Priyadarshi S.S., (2001) Environmental risk factors and Parkinson's disease: a metaanalysis. *Environ Res*; 86: 122–7.
- Przedborski S., Jackson-Lewis V., (2000) ROS and Parkinson's disease: a view to a kill. G. Poli, E. Cadenas, L. Packer; *Free Radicals in Brain Pathophysiology*, Marcel Dekker, New York: 273 – 290.
- Qian L., Block M.L., Wei S.J., Lin C.F., Reece J., Pang H., Wilson B., Hong J.S., Flood P.M., (2006) Interleukin-10 protects lipopolysaccharide-induced neurotoxicity in primary midbrain cultures by inhibiting the function of NADPH oxidase. *J Pharmacol Exp Ther*; 319: 44–52.
- Qian L., Tan K.S., Wei S.J., Wu H.M., Xu Z., Wilson B., Lu R.B., Hong J.S., Flood P.M., (2007) Microglia-mediated neurotoxicity is inhibited by morphine through an opioid receptor-independent reduction of NADPH oxidase activity. *J Immunol*; 179: 1198–209.
- Qin L., Wu X., Block M.L., Liu Y., Breese G.R., Hong J.S., Knapp D.J., Crews F.T., (2007) Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. *Glia*; 55: 453–462.
- Qin L., Liu Y.X., Cooper C.L., Liu B., Wilson B., Hong J.S., (2002) Microglia enhance beta-amyloid peptide-induced toxicity in cortical and mesencephalic neurons by producing reactive oxygen species. *J Neurochem*; 83: 973–83.
- Qiu J., (2006) Epigenetics: Unfinished symphony. *Nature*; 441: 143–145.

Quadri M., Yang X., Cossu G., Olgiati S., Saddi V.M., Breedveld G.J., Ouyang L., Hu J., Xu N., Graafland J., Ricchi V., Murgia D., Guedes L.C., Mariani C., Marti M.J., Tarantino P., Asselta R., Valdeoriola F., Gagliardi M., Pezzoli G., Ezquerro M., Quattrone A., Ferreira J., Annesi G., Goldwurm S., Tolosa E., Oostra B.A., Melis M., Wang J., Bonifati V., (2015) An exome study of Parkinson's disease in Sardinia, a Mediterranean genetic isolate. *Neurogenetics*; 16: 55–64.

Raivich G., Banati R., (2004) Brain microglia and blood-derived macrophages: Molecular profiles and functional roles in multiple sclerosis and animal models of autoimmune demyelinating disease. *Brain Research Reviews*; 46(3): 261–281.

Remington L.T., Babcock A.A., Zehntner S.P., Owens T., (2007) Microglial recruitment, activation, and proliferation in response to primary demyelination. *Am J Pathol*; 170(5): 1713-24.

Rideout H.J., Larsen K.E., Sulzer D., Stefanis L., (2001) Proteasomal inhibition leads to formation of ubiquitin/alpha-synuclein-immunoreactive inclusions in PC12 cells. *J Neurochem*; 78: 899–908.

Riedl M.A., (2008) The effect of air pollution on asthma and allergy. *Curr. Allergy Asthma Rep*; 8: 139–146.

Risso-de Faverney C., Orsini N., de Sousa G., Rahmani R., (2004) Cadmium induced apoptosis through the mitochondrial pathway in rainbow trout hepatocytes: involvement of oxidative stress. *Aquat Toxicol*; 69: 247–58.

Rock R.B., Peterson P.K., (2006) Microglia as a pharmacological target in infectious and inflammatory diseases of the brain. *J Neuroimmune Pharmacol*; 1: 117–26.

Rooney J.P., (2007) The role of thiols, dithiols, nutritional factors and interacting ligands in the toxicology of mercury. *Toxicology*; 234(3): 145–56.

- Ryan D., Drysdale A.J., Lafourcade C., Pertwee R.G., Platt B., (2009) Cannabidiol targets mitochondria to regulate intracellular Ca²⁺ levels. *J Neurosci*; 29(7): 2053-63.
- Ryan S.K., Shotts L.R., Hong S.K., Shotts L.R., Hong S.K., Nehra D., Groat C.R., Armstrong J.R., McClellan A.D., (2007) Glutamate regulates neurite outgrowth of cultured descending brain neurons from larval lamprey. *Developmental Neurobiology*; 67(2): 173–188.
- Saito Y., Takahashi K., (2002) Characterization of selenoprotein P as a selenium supply protein. *Eur. J. Biochem*; 269: 5746–5751.
- Sanders P., De Keyser J., (2007) Janus faces of microglia in multiple sclerosis. *Brain Res Rev*; 54(2): 274-85.
- Sarafian T.A., Kouyoumjian S., Khoshaghideh F., Tashkin D.P., Roth M.D., (2003) Delta 9-tetrahydrocannabinol disrupts mitochondrial function and cell energetics. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*; 284: L298 –L306.
- Sarchielli E., Pacini S., Morucci G., Punzi T., Marini M., Vannelli G.B., Gulisano M., (2011) Cadmium induces alterations in the human spinal cord morphogenesis. *BioMetals*; 25(1): 63–74.
- Sarkar S., Yadav P., Bhatnagar D., (1998) Lipid peroxidative damage on cadmium exposure and alterations in antioxidant system in rat erythrocytes: a study with relation to time. *Biomaterials*; 11: 153–157.
- Satarug S., Haswell-Elkins M.R., Moore M.R., (2000) Safe levels of cadmium intake to prevent renal toxicity in human subjects. *Br J Nutr*; 84: 791-802.
- Satoh M., Shimada A., Zhang B., Tohyama C., (2000) Renal toxicity caused by cisplatin in glutathione-depleted metallothionein-null mice. *Biochem Pharmacol*; 60: 1729–34.

Schafer D.P., Lehrman E.K., Kautzman A.G., Koyama R., Mardinly A.R., Yamasaki R., Ransohoff R.M., Greenberg M.E., Barres B.A., Stevens B., (2012) Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. *Neuron*; 74: 691–705.

Scheuner D., Eckman C., Jensen M., Song X., Citron M., Suzuki N., Bird T.D., Hardy J., Hutton M., Kukull W., Larson E., Levy-Lahad E., Viitanen M., Peskind E., Poorkaj P., Schellenberg G., Tanzi R., Wasco W., Lannfelt L., Selkoe D., Younkin S., (1996) Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat Med*; 2: 864–70.

Secondo A., Esposito A., Sirabella R., Boscia F., Pannaccione A., Molinaro P., Cantile M., Ciccone R., Sisalli M.J., Scorziello A., Di Renzo G., Annunziato L., (2015) Involvement of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger isoform 1 (NCX1) in neuronal growth factor (NGF)-induced neuronal differentiation through Ca²⁺-dependent Akt phosphorylation. *J Biol Chem*; 290(3): 1319-31.

Seifert G., Schilling K., Steinhäuser C., (2006) Astrocyte dysfunction in neurological disorders: a molecular perspective. *Nat. Rev. Neurosci*; 7: 194–206.

Senger M.R., Rosemberg D.B., Rico E.P., de Bem Arizi M., Dias R.D., Bogo M.R., Bonan C.D., (2006) In vitro effect of zinc and cadmium on acetylcholinesterase and ectonucleotidase activities in zebrafish (*Danio rerio*) brain. *Toxicology in Vitro*; 20(6): 954–958.

Shahbazian M.D., Zoghbi H.Y., (2002) Rett syndrome and MeCP2: linking epigenetics and neuronal function. *American Journal of Human Genetics*; 71(6): 1259–1272.

Shukla A., Shukla G.S., Srimal R.C., (1996) Cadmium-induced alterations in blood-brain barrier permeability and its possible correlation with decreased microvessel antioxidant potential in rat. *Hum Exp Toxicol*; 15(5): 400-5.

Shukla G.S., Chandra S.V., (1987) Concurrent exposure to lead, manganese, and cadmium and their distribution to various brain regions, liver, kidney, and testis of growing rats. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*; 16(3): 303–310.

Sian J., Dexter D.T., Lee A.J., Daniel S., Agid Y., Javoy-Agid F., Jenner P., Marsden C.D., (1994) Alterations in glutathione level in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia, *Ann. Neurol*; 36: 348 – 355.

Siniscalco D., Sapone A., Giordano C., Cirillo A., de Magistris L., Rossi F., Fasano A., Bradstreet J.J., Maione S., Antonucci N., (2013) Cannabinoid receptor type 2, but not type 1, is up-regulated in peripheral blood mononuclear cells of children affected by autistic disorders. *J Autism Dev Disord*; 43(11): 2686-95.

Solomon A., Mangialasche F., Richard E., Andrieu S., Bennett D.A., Breteler M., Fratiglioni L., Hooshmand B., Khachaturian A.S., Schneider L.S., Skoog I., Kivipelto M., (2014) Advances in the prevention of Alzheimer's disease and dementia. *Journal of internal medicine*; 275: 229-50.

Spatz L., (1992) Introduction. Spatz L., Bloom A.D., *Biological Consequences of Oxidative Stress*. Oxford University Press, New York: 3–22.

Stadtman T.C., (1991) Biosynthesis and function of selenocysteine-containing enzymes. *Journal of Biological Chemistry*; 266(25): 16257–16260.

Staessen J.A., Roels H.A., Emelianov D., Kuznetsova T., Thijs L., Vangronsveld J., Fagard R., (1999) Environmental exposure to cadmium, forearm bone density, and risk of fractures: Prospective population study. *Public Health and Environmental Exposure to Cadmium (PheeCad) Study Group. Lancet*; 353: 1140-4.

Stanley C.P., Hind W.H., Tufarelli C., O'Sullivan S.E., (2015) Cannabidiol causes endothelium-dependent vasorelaxation of human mesenteric arteries via CB1 activation. *Cardiovasc Res*; 107(4): 568-78.

- Stansley B., Post J., Hensley K., (2012) A comparative review of cell culture systems for the study of microglial biology in Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation*; 9: 115.
- Stohs S.J., Baghi D., (1995) Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radical Biology and Medicine*; 18: 321–336.
- Stollg G., Jander S., (1999) The role of microglia and macrophages in the pathophysiology of the CNS. *Prog. Neurobiol*; 58: 233–247.
- Surh Y.J., Kundu J.K., Li M.H., Na H.K., Cha Y.N., (2009) Role of Nrf2-mediated heme oxygenase-1 upregulation in adaptive survival response to nitrosative stress. *Archives of Pharmacal Research*; 32(8): 1163–1176.
- Suzuki K., Sugihara G., Ouchi Y., Nakamura K., Futatsubashi M., Takebayashi K., Yoshihara Y., Omata K., Matsumoto K., Tsuchiya K.J., Iwata Y., Tsujii M., Sugiyama T., Mori N., (2013) Microglial activation in young adults with autism spectrum disorder. *JAMA Psychiatry*; 70: 49–58.
- Syme C.D., Viles J.H., (2006) Solution ¹H NMR investigation of Zn²⁺ and Cd²⁺ binding to amyloid-beta peptide (Aβ) of Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta*; 1764: 246–256.
- Talantova M., Sanz-Blasco S., Zhang X., Xia P., Akhtar M.W., Okamoto S., Dziewczapolski G., Nakamura T., Cao G., Pratt A.E., Kang Y.J., Tu S., Molokanova E., McKercher S.R., Hires S.A., Sason H., Stouffer D.G., Buczynski M.W., Solomon J.P., Michael S., Powers E.T., Kelly J.W., Roberts A., Tong G., Fang-Newmeyer T., Parker J., Holland E.A., Zhang D., Nakanishi N., Chen H.S., Wolosker H., Wang Y., Parsons L.H., Ambasadhan R., Masliah E., Heinemann S.F., Piña-Crespo J.C., Lipton S.A., (2013) Ab induces astrocytic glutamate release, extrasynaptic NMDA receptor activation, and synaptic loss. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.*; 110(27): 2518–27.

Tang G., Gudsnuk K., Kuo S.H., Cotrina M.L., Rosoklija G., Sosunov A., Sonders M.S., Kanter E., Castagna C., Yamamoto A., Yue Z., Arancio O., Peterson B.S., Champagne F., Dwork A.J., Goldman J., Sulzer D., (2014) Loss of mTOR-dependent macroautophagy causes autistic-like synaptic pruning deficits. *Neuron*; 83: 1131–1143.

Thapa A., Vernon B.C., De la Peña K., Soliz G., Moreno H.A., López G.P., Chi E.Y., (2013) Membrane-mediated neuroprotection by curcumin from amyloid- β - peptide-induced toxicity. *Langmuir*; 29: 11713-11723.

Thatcher R.W., Lester M.L., McAlaster R., Horst R., (1982) Effects of low levels of cadmium and lead on cognitive functioning in children,” *Archives of Environmental Health*; 37(3): 59–166.

Theusen O.B., Wei Z., Jorgen C., Ole V., Erik H.P., (2010) Effect of paraquat and amyloid- β -peptide on the metabolism in primary astrocytes studied by ^1H - NMR. *Open Mag. Res. J*; 3: 1–13.

Tjalve H., Henriksson J., (1999) Uptake of metals in the brain via olfactory pathways,” *NeuroToxicology*; 20(2-3): 181– 195.

Tsai S.M., Wang T.N., Ko Y.C., (1999) Morality for certain diseases in areas with high levels of arsenic in drinking water. *Arch Environ Health*; 43: 186-93.

Tsuji S., Kobayashi H., Uchida Y., Ihara Y., Miyatake T., (1992) Molecular cloning of human growth inhibitory factor cDNA and its down-regulation in Alzheimer’s disease, *EMBO J*; 11: 4843–4850.

Uchida Y., Gomi F., Masumizu T., Miura Y., (2002) Growth inhibitory factor prevents neurite extension and the death of cortical neurons caused by high oxygen exposure through hydroxyl radical scavenging, *J. Biol. Chem*; 277: 32353–32359.

- Uchida Y., Takio K., Titani K., Ihara Y., Tomonaga M., (1991) The growth inhibitory factor that is deficient in the Alzheimer's disease brain is a 68 amino acid metallothionein-like protein. *Neuron*; 7(2): 337–347.
- US Agency for Toxic Substances and Disease Registry, (1999) Lead. Toxicological profiles. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention; PB/99/166704.
- Vallee B.L., Auld D.S., (1990) Zinc coordination, function, and structure of zinc enzymes and other proteins. *Biochemistry*; 29: 5647-5659.
- Voineagu I., Eapen V., (2013) Converging pathways in autism spectrum disorders: interplay between synaptic dysfunction and immune responses. *Front Hum Neurosci*; 7: 738.
- Waalkes M.P., (2000) Cadmium carcinogenesis in review. *Journal of Inorganic Biochemistry*; 79(1–4): 241–244.
- Wagner C.L., Taylor S.N., Hollis B.W., (2008) Does vitamin D make the world go 'round'? *Breastfeed Med*; 3(4): 239-250.
- Wake H., Moorhouse A.J., Jinno S., Kohsaka S., Nabekura J., (2009) Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals. *J. Neurosci*; 29: 3974–3980.
- Wang B., Du Y., (2013) Cadmium and its neurotoxic effects. *Oxid. Med. Cell. Longev*: 898034.
- Wanpen S., Govitrapong P., Shavali S., Sangchot P., Ebadi M., (2004) Salsolinol, a dopamine-derived tetrahydroisoquinoline, induces cell death by causing oxidative stress in dopaminergic SH-SY5Y cells, and the said effect is attenuated by metallothionein. *Brain Res*; 1005(1-2): 67-76.

- Webster S.D., Galvan M. D., Ferran E., Garzon-Rodriguez W., Glabe C.G., Tenner A.J., (2001) Antibody-mediated phagocytosis of the amyloid beta-peptide in microglia is differentially modulated by C1q. *J. Immunol*; 166: 7496 –7503.
- Williams M.H., van Alstyne E.L., Galbraith R.M., (1988) Evidence of a novel association of unsaturated fatty acids with Gc (vitamin D-binding protein). *Biochem. Biophys. Res. Commun*; 153, 1019–1024.
- Wimo A., Jönsson L., Bond J., Prince M., Winblad B., (2013) The worldwide economic impact of dementia 2010. *Alzheimer's & dementia: the journal of the Alzheimer's Association*; 9: 1-11.e3.
- Wirdefeldt K., Adami H. O., Cole P., Trichopoulos D., Mandel J., (2011) Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence. *Eur. J. Epidemiol*; 26(Suppl. 1): S1–S58.
- Wong C.C., Meaburn E.L., Ronald A., Price T.S., Jeffries A.R., Schalkwyk L.C., Plomin R., Mill J., (2013) Methylomic analysis of monozygotic twins discordant for autism spectrum disorder and related behavioral traits. *Mol. Psychiatry*; 19(4): 495-503.
- Wong W.T. (2013). Microglial aging in the healthy CNS: phenotypes, drivers and rejuvenation. *Front. Cell. Neurosci*; 7: 22.
- World Health Organization (WHO), (2012) *Dementia: a public health priority* Geneva: World Health Organization—Alzheimer's Disease International.
- Wyss-Coray T., Rogers J., (2012) Inflammation in Alzheimer disease—a brief review of the basic science and clinical literature. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*; 2: a006346.
- Xie H.R., Hu L.S., Li G.Y., (2010) SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: In vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Chinese Med. J*; 123: 1086-1092.

Xu B., Chen S., Luo Y., Chen Z., Liu L., Zhou H., Chen W., Shen T., Han X., Chen L., Huang S., (2011) Calcium signaling is involved in cadmium-induced neuronal apoptosis via induction of reactive oxygen species and activation of MAPK/mTOR network. *PLoS One*; 6(4): e19052.

Yamamoto N., Homma S., Millman I., (1991) Identification of the serum factor required for in vitro activation of macrophages. Role of vitamin D3-binding protein (group specific component, Gc) in lysophospholipid activation of mouse peritoneal macrophages. *J Immunol*; 147(1): 273-80.

Yano K., Hirose N., Sakamoto Y., Katayama H., Moriguchi T., (2003) Aggregations of amyloid beta-proteins in the presence of metal ions. *Toxicol Lett*; 144: s134.

Yasuda H., Tsutsui T., (2013) Assessment of Infantile Mineral Imbalances in Autism Spectrum Disorders (ASDs). *Int. J. Environ. Res; Public Health*.

Ye J., Wang S., Barger M., Castranova V., Shi X., (2000) Activation of androgen response element by cadmium: a potential mechanism for a carcinogenic effect of cadmium in the prostate. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*; 19: 275-80.

Yeh J.Y., Gu Q.P., Beilstein M.A., Forsberg N.E., Whanger P.D., (1997a) Selenium influences tissue levels of selenoprotein W in sheep. *J. Nutr*; 127: 394–402.

Yeh J.Y., Vendeland S.C., Gu Q., Butler J.A., Ou B.R., Whanger P.D., (1997b) Dietary selenium increases selenoprotein W levels in rat tissues. *J. Nutr*; 127: 2165–2172.

Yoshida S., (2001) Re-evaluation of acute neurotoxic effects of Cd²⁺ on mesencephalic trigeminal neurons of the adult rat. *Brain Research*; 892(1): 102–110.

Yu K.K., Cheung C., Chua S.E., McAlonan G.M., (2011) Can Asperger syndrome be distinguished from autism? An anatomic likelihood meta-analysis of MRI studies. *J Psychiatry Neurosci*; 36(6): 412-21.

Yu X., Hong S., Faustman E.M., (2008) Cadmium-induced activation of stress signaling pathways, disruption of ubiquitin-dependent protein degradation and apoptosis in primary rat Sertoli cell-gonocyte cocultures. *Toxicol Sci*; 104(2): 385-96.

Yuan Y., Jiang C.Y., Xu H., Sun Y., Hu F.F., Bian J.C., Liu X.Z., Gu J.H., Liu Z.P., (2013) Cadmium-induced apoptosis in primary rat cerebral cortical neurons culture is mediated by a calcium signaling pathway, *PLoS One*; 8(5): e64330.

Zhou Y.J., Zhang S.P., Liu C.W., Cai Y.Q., (2009) The protection of selenium on ROS mediated-apoptosis by mitochondria dysfunction in cadmium-induced LLC-PK(1) cells. *Toxicol In Vitro*; 23(2): 288-94.

<http://dati.istat.it/>

http://ec.europa.eu/health/major_chronic_diseases/diseases/brain_neurological/index_en.htm

http://www.atsdr.cdc.gov/spl/resources/ATSDR_2013_SPL_Detailed_Data_Table.pdf

<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp5.pdf>

<http://www.farmaceuticomilitare.it/attivita.aspx?lnrid=8>

http://www.salute.gov.it/portale/salute/p1_5.jsp?lingua=italiano&id=167&area=Malattie_dell_sistema_nervoso