



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
FIRENZE

DOTTORATO DI RICERCA IN  
Scienze Biomediche  
(Morfologia e Morfogenesi Umana)

CICLO XXXIV

COORDINATORE Prof. Fabrizio Chiti

*Effetti biologici dell'esposizione cronica al cadmio  
sulla barriera emato-encefalica*

Settore Scientifico Disciplinare BIO/16

**Dottorando**

Dott. Carrino Donatello

*Donatello Carrino*

---

**Tutore**

Prof.ssa Pacini Alessandra

*Alessandra Pacini*

---

**Coordinatore**

Prof. Chiti Fabrizio

*Fabrizio Chiti*

---

Anni 2018/2021

# INDICE

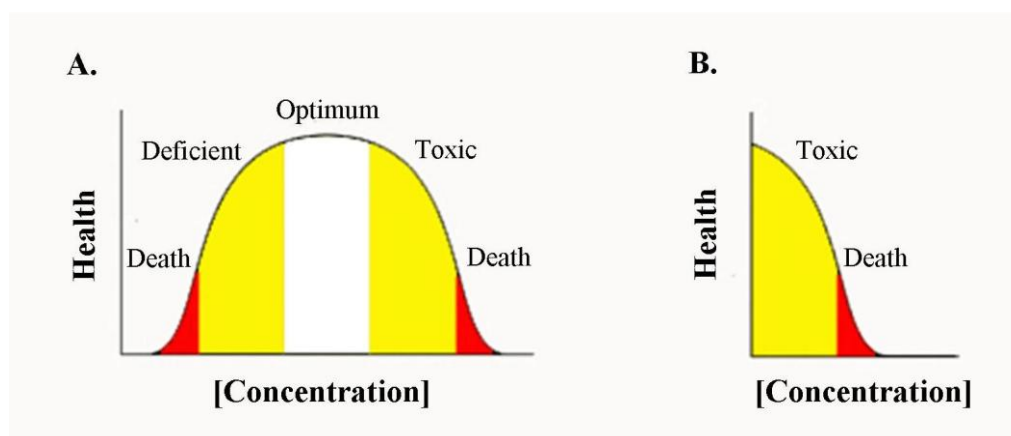
<b>INTRODUZIONE</b>	<i>pag. 4</i>
<b>CAPITOLO 1: CADMIO</b>	<i>pag. 6</i>
1.1 FORMA CHIMICA E PROPRIETÀ DEL CADMIO	<i>pag. 6</i>
1.2 FONTI E LIVELLI DI ESPOSIZIONE NELLA POPOLAZIONE	<i>pag. 8</i>
1.3 METABOLISMO DEL CADMIO	<i>pag. 12</i>
1.4 ESPOSIZIONE E TOSSICITÀ	<i>pag. 13</i>
<b>CAPITOLO 2: NEUROTOSSICITÀ DA CADMIO</b>	<i>pag. 16</i>
2.1 MECCANISMI MOLECOLARI NELLA NEUROTOSSICITÀ DA CADMIO	<i>pag. 17</i>
2.1.1 INDUZIONE DELLO STRESS OSSIDATIVO	<i>pag. 17</i>
2.1.2 INTERFERENZA CON ALTRI METALLI	<i>pag. 18</i>
2.1.3 ALTERAZIONI NELLA NEUROTRASMISSIONE	<i>pag. 20</i>
2.1.4 EFFETTO ESTROGENICO	<i>pag. 21</i>
2.1.5 NEUROGENESI ALTERATA E INCREMENTO DELL' APOPTOSI NEURONALE	<i>pag. 21</i>
2.1.6 EFFETTI SUL DNA ED ESPRESSIONE GENICA ALTERATA	<i>pag. 22</i>
2.1.7 METALLI PESANTI E AGGREGAZIONE DELLE PROTEINE	<i>pag. 23</i>
2.2 RESISTENZA CELLULARE ALLA NEUROTOSSICITÀ DA CADMIO	<i>pag. 24</i>
<b>CAPITOLO 3: LA BARRIERA EMATO-ENCEFALICA</b>	<i>pag. 26</i>
3.1 EVOLUZIONE DELLA BARRIERA EMATO-ENCEFALICA	<i>pag. 28</i>
3.2 STRUTTURA MULTICELLULARE E FUNZIONE DELLA NVU	<i>pag. 29</i>
3.2.1 CELLULE ENDOTELIALI	<i>pag. 29</i>
3.2.2 PERICITI	<i>pag. 31</i>
3.2.3 ASTROCITI	<i>pag. 32</i>
3.2.4 MEMBRANA BASALE	<i>pag. 34</i>
3.2.5 NEURONI	<i>pag. 36</i>
3.2.6 MICROGLIA	<i>pag. 37</i>
3.3 GIUNZIONI ENDOTELIALI	<i>pag. 39</i>
3.4 COMPONENTI TRANSMEMBRANA DELLE GIUNZIONI OCCLUDENTI	<i>pag. 41</i>
3.4.1 OCCLUDINA	<i>pag. 41</i>
3.4.2 CLAUDINE	<i>pag. 42</i>
3.4.3 MOLECOLE DI ADESIONE GIUNZIONALE	<i>pag. 43</i>

3.4.4 LE PROTEINE <i>ZONULA OCCLUDENS</i> (ZO)	<i>pag. 44</i>
<b>CAPITOLO 4: OMEOSTASI DELLO ZINCO NEL SNC</b>	<i>pag. 45</i>
<b>CAPITOLO 5: OBIETTIVO DELLA TESI</b>	<i>pag. 49</i>
<b>CAPITOLO 6: MATERIALI E METODI</b>	<i>pag. 50</i>
6.1 COLTURE CELLULARI	<i>pag. 50</i>
6.2 IMPLEMENTAZIONE DI UN MODELLO <i>IN VITRO</i> DI BBB	<i>pag. 50</i>
6.3 TRATTAMENTI CHIMICI	<i>pag. 52</i>
6.4 VALUTAZIONE DELLA VITALITÀ CELLULARE MEDIANTE TEST MTT	<i>pag. 53</i>
6.5 ANALISI DELLE PROTEINE MEDIANTE WESTERN BLOTTING	<i>pag. 54</i>
6.6 DETERMINAZIONE DELLE PROTEINE CARBONILATE	<i>pag. 55</i>
6.7 VALUTAZIONE DELLA MORFOLOGIA CELLULARE MEDIANTE MICROSCOPIA A CONTRASTO DI FASE	<i>pag. 56</i>
6.8 IMMUNOFLUORESCENZA	<i>pag. 56</i>
6.9 ANALISI STATISTICA	<i>pag. 57</i>
<b>CAPITOLO 7: RISULTATI</b>	<i>pag. 58</i>
7.1 VALUTAZIONE DELLA VITALITÀ CELLULARE	<i>pag. 58</i>
7.2 ANALISI DELLO STRESS DEL RETICOLO ENDOPLASMATICO	<i>pag. 59</i>
7.3 ANALISI DELLA CASCATA APOPTOTICA	<i>pag. 60</i>
7.4 EFFETTI SUL CITOSCHELETRO E SU ZO-1	<i>pag. 62</i>
7.5 VALUTAZIONE DELLA RISPOSTA CELLULARE ANTIOSSIDANTE	<i>pag. 64</i>
7.6 ANALISI DELL'EFFETTO DEL CADMIO IN CO-COLTURA	<i>pag. 66</i>
<b>CAPITOLO 8: DISCUSSIONE</b>	<i>pag. 71</i>
<b>CONCLUSIONI</b>	<i>pag. 83</i>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<i>pag. 84</i>

## INTRODUZIONE

Gli esseri umani hanno da tempo riconosciuto le proprietà uniche dei metalli. I metalli costituiscono la maggior parte degli elementi della tavola periodica e sono quindi abbondanti in natura. Grazie all'unicità delle loro caratteristiche chimiche come riflettività, malleabilità, duttilità e conduttività, i metalli sono usati per numerosi scopi: gioielli, monete, mezzi di trasporto, cavi, batterie, microchip, pigmenti sono solo alcuni esempi della loro utilità nella nostra vita quotidiana ma, il lato opposto della medaglia, rivela la natura altamente tossica di questi elementi.

I metalli sono classificati come essenziali o non essenziali a seconda del loro ruolo fisiologico nei viventi, come cofattori enzimatici o per incorporazione in metalloproteine (Tabella 1). A differenza dei metalli non essenziali che non hanno funzioni biologiche conosciute, i metalli essenziali mostrano una risposta ormetica, dove un apporto eccessivo o carente è deleterio (Figura 1). Ciò significa che l'intervallo di concentrazione fisiologica ottimale è relativamente piccolo e deve essere strettamente controllato. Dall'altro lato, piccole quantità di metalli non essenziali promuovono una grave tossicità poiché interrompono l'attività fisiologica dei metalli essenziali.



**Figura 1. Curva dose-risposta degli elementi essenziali (A) e non essenziali (B).** A livello atomico solo quattro dei 118 elementi chimici attualmente conosciuti (cioè ossigeno, carbonio, idrogeno e azoto) costituiscono il 96% della massa corporea nell'uomo. Il 3,5% è composto da sette elementi chimici ovvero calcio, fosforo, zolfo, potassio, sodio, cloro e magnesio. I restanti costituenti sono oligoelementi tra cui ferro, zinco, manganese, rame, iodio, cromo, molibdeno, selenio, e cobalto sono considerati elementi nutrizionali essenziali per l'uomo.

Il cadmio (Cd) è un metallo pesante tossico appartenente al gruppo dei principali inquinanti chimici ambientali e professionali nei paesi industrializzati [1-3]. Il progresso tecnologico e l'industrializzazione del XX secolo hanno portato al crescente utilizzo di questo elemento con la conseguente immissione diffusa a livelli tali da minacciare la salute degli esseri umani e degli animali.

A causa della sua persistenza nell'ambiente, nonostante la continua implementazione delle misure volte a ridurre le emissioni, le previsioni indicano che l'esposizione della popolazione generale a questo metallo tossico crescerà nei prossimi decenni mettendo in pericolo la salute pubblica, per cui si rende necessario individuare strumenti utili a combattere la sua tossicità [4, 5].

**Tabella 1. Metalli essenziali e non essenziali**

<b>Metalli Essenziali</b>	<b>Metalli Non Essenziali</b>	
	non radioattivi	Radioattivi
Potassio	Alluminio*	Nettunio
Calcio	Arsenico*	Polonio
Cobalto*	Cadmio*	Plutonio
Rame*	Cromo*	Tallio*
Ferro*	Piombo*	Torio
Magnesio	Mercurio*	Uranio*
Manganese*	Nichel*	
Molibdeno	Stagno*	
Selenio*	Titanio*	
Sodio		
Zinco*		

\*metallo caratterizzato come neurotossico

# CAPITOLO 1: CADMIO

## 1.1 FORMA CHIMICA E PROPRIETÀ DEL CADMIO

Scoperto dal chimico tedesco Friedrich Strohmeyer nel 1817, il cadmio (Cd) appartiene al gruppo XII della tavola periodica degli elementi chimici. Questo metallo malleabile, tenero, duttile e dall'aspetto bianco-argenteo è chimicamente simile allo zinco e al mercurio nelle sue proprietà fisiche e chimiche (Tabella 2). Il suo peso atomico risulta da una miscela di otto isotopi stabili. Inoltre, come per lo zinco, il Cd predilige lo stato di ossidazione +2 nella maggior parte dei suoi composti. Il Cd puro è resistente alla corrosione, insolubile in acqua e non infiammabile [6].

Nell'atmosfera il Cd è rapidamente ossidato per formare ossido di cadmio. Tuttavia, quando sono presenti gas o vapori reattivi come anidride carbonica, vapore acqueo, anidride solforosa, triossido di zolfo o acido cloridrico, il Cd reagisce per produrre carbonato, idrossido, solfito, solfato o cloruro di Cd, rispettivamente. Diversi composti inorganici del Cd sono abbastanza solubili in acqua ad es. acetato, cloruro e solfato di Cd; mentre ossido, carbonato e solfuro di Cd sono quasi insolubili [7].

**Tabella 2. Proprietà fisiche e chimiche del cadmio.**

Numero atomico	48
Peso atomico	112,41 u
Raggio atomico	155 pm
Configurazione elettronica	[Kr] 4d <sup>10</sup> 5s <sup>2</sup>
Punto di fusione	321,07 °C
Punto di ebollizione	767,3 °C
Densità a 20 °C	8,65 g/cm <sup>3</sup>
Calore di fusione	6,21 kJ/mol
Entalpia di vaporizzazione	99,6 kJ/mol
Elettronegatività (scala di Pauling)	1,69
Energia di prima ionizzazione	867,8 kJ/mol
Energia di seconda ionizzazione	1631,4 kJ/mol

Il Cd è un elemento piuttosto raro in natura, principalmente associato ai minerali di zinco, piombo e rame. L'attività vulcanica, il graduale processo di erosione e abrasione delle rocce e del suolo, gli incendi boschivi sono tra le principali, ma trascurabili, fonti naturali di Cd nell'ambiente.

Le fonti antropiche, che rappresentano la quasi totalità dell'aumento delle concentrazioni di Cd immesso nell'ambiente, derivano dalla fusione e raffinazione del nichel e del rame, combustione di combustibili fossili, uso di fertilizzanti fosfatici e fanghi di depurazione. Il Cd è presente come inquinante nelle fonderie di metalli non ferrosi per la produzione delle leghe e nel riciclaggio dei rifiuti elettronici. Anche le miniere di zinco, piombo e rame contribuiscono al rilascio di questo metallo nell'atmosfera, con conseguente contaminazione del suolo [8].

Nelle aree contaminate, la polvere domestica e gli ambienti indoor poco ventilati rappresentano una potenziale via di esposizione [9].

Viene utilizzato anche come stabilizzante nei prodotti in polivinilcloruro (PVC), nella cadmiatura di oggetti metallici per proteggerli dalla corrosione [10], nella produzione di batterie Ni-Cd, nelle barre di moderazione dei reattori nucleari al fine di controllare la reazione di fissione nucleare tramite la cattura dei neutroni [7, 11, 12].

Nonostante le limitazioni a causa della sua tossicità, come nel caso delle batterie Ni-Cd sostituite con batterie al nichel-metallo idruro e agli ioni di litio, uno dei suoi nuovi usi è come semiconduttore al tellururo di cadmio nei pannelli solari [13].

I pigmenti a base di Cd sono comunemente usati nei gialli (solfuro di cadmio), aranci e nei rossi (sulfoseleniuro di cadmio). Claude Monet e Vincent Van Gogh furono i primi ad utilizzare il giallo, l'arancione e il rosso cadmio nelle loro opere per brillantezza, buona persistenza nel tempo ed ottima capacità di tinteggiatura. Il loro più ampio impiego è nella colorazione industriale della plastica in grado di resistere a temperature

di lavorazione elevate. Oggigiorno, i coloranti di cadmio sono stati parzialmente sostituiti da coloranti azoici [14].

Anche se non ha alcuna funzione biologica nota negli organismi superiori, una anidra carbonica Cd-dipendente (CDCA1) è stata scoperta nelle diatomee appartenenti alla specie *Thalassiosira weissflogii*. Queste microalghe unicellulari vivono in condizioni ambientali di limitazione dello zinco che viene sostituito dal Cd nel sito attivo dell'enzima come ione metallico catalitico [15].

## **1.2 FONTI E LIVELLI DI ESPOSIZIONE NELLA POPOLAZIONE**

Il Cd è un inquinante introdotto nell'ambiente come risultato del rapido sviluppo industriale e delle moderne tecnologie [16].

L'esposizione ambientale al Cd e le conseguenti ricadute sulla salute umana sono state per la prima volta riscontrate a partire dal 1912, nella prefettura di Toyama (Giappone).

Il Cd, rilasciato ad opera delle attività di estrazione mineraria, era trasportato dal fiume Jinzū in pianura, dove l'acqua contaminata veniva utilizzata per l'irrigazione delle risaie.

Pertanto, il consumo di riso è stata la via principale di esposizione per la popolazione [17, 18]. Si verificò un avvelenamento di massa che fu causa della sindrome Itai-Itai (letteralmente "sindrome ahi-ahi"), caratterizzata da un'ampia gamma di sintomi ovvero basso grado di mineralizzazione ossea, associata a grave decalcificazione, alto tasso di fratture e distorsione delle ossa lunghe, osteomalacia, osteoporosi e dolore osseo intenso (da qui il nome della sindrome). Altre complicazioni includevano anemia, insufficienza renale e disfunzioni gastrointestinali [19, 20]. Elevati livelli di Cd furono riscontrati nelle urine dei soggetti affetti e nel 1968 la malattia venne dichiarata dal governo giapponese come malattia correlata all'inquinamento ambientale [19].

A causa della sua diffusa presenza, il Cd viene assorbito da parte di colture e ortaggi destinati al consumo umano in quantità elevate in seguito a contaminazione di acqua,



suolo e aria [7]. Tra gli alimenti che presentano alte concentrazioni di Cd sono compresi crostacei, molluschi bivalvi, ostriche, cefalopodi e granchi, frattaglie come fegato e rene, semi oleosi, cacao, fagioli e alcuni funghi selvatici [21]. Gli alimenti vegetali, a seconda del livello di contaminazione del suolo, contengono generalmente concentrazioni più elevate rispetto a carne, uova, latte e latticini. Tra questi, riso e grano, verdure a foglia verde, patate, carote e sedano possono contenere concentrazioni più elevate del metallo rispetto ad altri alimenti di origine vegetale e fornire circa il 40-50% del metallo ingerito [22-24]. Pertanto, i soggetti che prediligono una dieta ricca in questi alimenti possono essere esposti ad una maggiore assunzione di Cd [25]. A seconda della composizione della dieta, così come la qualità dei pasti consumati, la quantità totale di questo metallo tossico ingerito nei paesi industrializzati varia da 10 µg a oltre 200 µg al giorno [23, 26-29] di cui in media il 3-8% e, in caso di carenze nutrizionali nei microelementi anche fino al 30%, viene assorbito nell'intestino [22, 30-34].

Nell'Unione Europea, l'assunzione settimanale di Cd attraverso l'alimentazione varia da 1 a 5,4 µg/kg di peso corporeo [1, 22, 23, 26]. Pertanto, l'esposizione cronica al Cd nella porzione dei non fumatori della popolazione è principalmente causata dal consumo di cibo contaminato con questo xenobiotico, mentre il fumo da tabacco rappresenta una significativa fonte aggiuntiva di intossicazione a questo elemento. Una sigaretta contiene da 0,5 a 2 µg di Cd e circa il 10-20% dell'elemento inalato attraverso il fumo viene assorbito nei polmoni [27, 35]. È stato stimato che consumare 20 sigarette al giorno equivale all'inalazione di circa 0,2-4 µg di Cd [35, 36].

Secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) e l'Organizzazione delle Nazioni Unite per l'alimentazione e l'agricoltura (FAO), la dose settimanale tollerabile di Cd, definita come la quantità di questo metallo che può essere consumata settimanalmente nell'arco della vita senza rischi considerevoli per la salute umana, inizialmente ammontava a 7 µg/kg di peso corporeo (cioè 70 µg/giorno per una persona

del peso di 70 kg) [37]. Tuttavia, studi epidemiologici hanno indicato che possono verificarsi effetti nocivi sulla salute in seguito all'esposizione a questo xenobiotico al di sotto del valore stabilito dall'OMS/FAO [38-43]. A causa del fatto che il limite stabilito per la dose settimanale tollerabile di Cd non ha fornito un margine di sicurezza sufficiente a contrastarne la tossicità, nel 2009, l'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA) ha stabilito che l'assunzione settimanale tollerabile di Cd non deve superare il valore di 2,5 µg/kg di peso corporeo, che corrisponde ad un'assunzione giornaliera di 25 µg di questo elemento per una persona che pesa 70 kg [1]. Nel 2010, FAO/OMS ristabilirono la soglia mensile pari a 25 µg/kg di peso corporeo, ovvero 56-62 µg/giorno per una persona dal peso di 70 kg [44].

L'assunzione giornaliera di Cd tramite l'alimentazione varia tra i diversi Paesi a seconda del grado di inquinamento. La maggiore assunzione di questo metallo, che raggiunge i 188–224 µg al giorno, è stata rilevata in Thailandia [27]; mentre le più basse, pari a 10 µg al giorno, sono state registrate in Svezia [23]. Tra i Paesi europei, la Polonia si attesta il primato con livelli di assunzione che variano da 11 µg fino a 120 µg al giorno [28, 29]. Le concentrazioni di Cd determinate nel sangue e nelle urine, indicatori principali di esposizione a questo metallo, confermano che l'esposizione dei cittadini polacchi a questo elemento è maggiore rispetto ai residenti degli altri paesi [45].

L'esposizione professionale costituisce un'ulteriore fonte, aggiuntiva a quella alimentare, per quei lavoratori impiegati nella produzione e nell'uso industriale del cadmio (vedi sezione 1.1). Professioni ad alto rischio di esposizione includono saldatori, minatori, fonditori, fabbri e altre professioni coinvolte nella produzione di batterie, munizioni, microchip e circuiti stampati, motori a reazione e smalti [46].

La via di esposizione è dunque un determinante fondamentale della tossicità: le polveri e i vapori di Cd vengono assorbiti soprattutto per inalazione, ingestione e in minima parte

per via transdermica e attraverso le mucose. Anche se sono state le meno studiate, la via transdermica e quella oculare rappresentano due significative modalità di esposizione: polveri e vapori, attraverso il contatto con le ferite o gli occhi, possono permettere l'ingresso del metallo direttamente nel flusso sanguigno [47-50].

L'assorbimento gastrointestinale dopo ingestione di Cd è relativamente scarso, con stime di biodisponibilità che si attestano al 10%, mentre quello attraverso l'inalazione è molto più efficiente, con una biodisponibilità fino al 25%. Tuttavia, la dose totale assorbita attraverso i polmoni dipende anche dalla dimensione delle particelle inalate. È più probabile che particelle piccole ( $< 0,1\mu\text{m}$ ) penetrino negli alveoli, dove si verifica l'assorbimento [46].

Il Cd è caratterizzato da forti proprietà cumulative negli organismi viventi [27, 51]. Fattori fisiologici e nutrizionali possono modificarlo: è stato stabilito che il carico corporeo di Cd nelle donne è maggiore rispetto agli uomini [34, 52]. Infatti, a causa del maggiore fabbisogno di ferro, ad esempio in caso di gravidanza, le riserve corporee di ferro possono ridursi con conseguente induzione del sistema di assorbimento del metallo a livello duodenale. La competizione con il Cd per gli stessi trasportatori, associata ad una dieta carente in ferro risulta nel maggiore assorbimento intestinale e accumulo nell'organismo di Cd [31, 33]. Età, sesso, dieta e condizione di salute della persona esposta sono tra i principali fattori che determinano l'assorbimento e l'accumulo del Cd ingerito [22, 51]. La capacità di assorbimento gastrointestinale di questo xenobiotico è determinata in modo significativo dal contenuto alimentare di alcuni elementi essenziali (zinco, magnesio, selenio, calcio e ferro), vitamine e altre sostanze attive biologicamente presenti nella dieta, compresi i polifenoli. La carenza di alcuni bioelementi può aumentare l'assorbimento gastrointestinale e l'accumulo di Cd nell'organismo [31, 32,

34, 53, 54], mentre una migliore assunzione può limitarne l'assorbimento e la tossicità [32, 55-61].

### **1.3 METABOLISMO DEL CADMIO**

Indipendentemente dalla via di ingresso, i metalli vengono trasportati e distribuiti, attraverso la circolazione sistemica, ai vari organi e tessuti. Si tratta di un processo fisiologico di distribuzione dei metalli essenziali verso le aree di fabbisogno che viene dirottato dai metalli tossici non essenziali. I tessuti che accumulano metalli sono coinvolti nella loro disintossicazione ed eliminazione (fegato e reni), nel loro deposito (tessuto osseo) oppure possiedono una naturale elevata domanda di tali elementi (sistema nervoso centrale e cuore).

Il Cd, una volta assorbito dall'organismo, si lega alle proteine delle membrane eritrocitarie e plasmatiche ed è trasportato in questa forma principalmente nel fegato. In questo organo ioni  $Cd^{2+}$  vengono rilasciati dalle proteine trasportatrici e inducono la sintesi delle metallotioneine (MT), proteine a basso peso molecolare (6-7 kDa) ricche di gruppi sulfidrilici (gruppi -SH) dando luogo alla formazione di complessi Cd-MT. Se da un lato le MT giocano un ruolo importante nella disintossicazione da Cd, dall'altro, l'accumulo dei complessi all'interno degli epatociti [55, 62-64] costituisce il meccanismo attraverso il quale lo xenobiotico viene ritenuto all'interno dei tessuti [65]. Infatti, se la maggior parte del Cd legato alle MT viene immagazzinato nel fegato, piccole quantità di questi complessi vengono anche rilasciati nella circolazione sistemica attraverso la quale raggiungono il rene. In quest'organo, a causa del loro basso peso molecolare, i complessi vengono filtrati dai glomeruli renali passando nel fluido tubulare [62-64]. All'interno di tali cellule, i complessi Cd-MT, ad opera di enzimi lisosomiali, subiscono una scissione con il conseguente rilascio di ioni  $Cd^{2+}$ . A loro volta, gli ioni  $Cd^{2+}$  inducono la sintesi di MT da parte dei reni, accumulandosi anche all'interno di tali

organi. Tuttavia, i complessi Cd-MT hanno emivita breve poiché, a loro volta, si decompongono rilasciando nuovamente ioni  $\text{Cd}^{2+}$  [62]. Inoltre, la capacità del fegato e dei reni di sintetizzare le MT è limitata, e nel caso in cui gli ioni  $\text{Cd}^{2+}$  non possono essere ulteriormente complessati mediante il loro legame con queste proteine, vengono trattenuti sotto forma di ioni  $\text{Cd}^{2+}$  liberi [62, 63].

La lunga emivita (1-3 decenni) del Cd è dunque promotrice della sua azione tossica nell'uomo [1, 5, 51].

#### **1.4 ESPOSIZIONE E TOSSICITÀ**

Durata dell'esposizione, dose e forma chimica, dieta [22], età, sesso [34, 66], stato di salute delle persone esposte sono tra i principali fattori che concorrono a determinare gli effetti patofisiologici dell'esposizione al metallo [27, 33].

La tossicità acuta al metallo è spesso causata dall'improvvisa esposizione ad una dose elevata del metallo. Questo tipo di esposizione di solito deriva da incidenti industriali, contaminazioni accidentali di approvvigionamenti alimentari e avvelenamenti. I sintomi da esposizioni acute sono generalmente gravi e ad insorgenza rapida. L'ingestione di dosi superiori a 3 mg induce rapidamente vomito spesso sanguinolento associato a dolore addominale intenso, diarrea e mialgia, con conseguente alterazione dell'equilibrio idroelettrolitico e ipovolemia. I disturbi emodinamici sono responsabili dell'insufficienza renale acuta, associata alla tossicità renale diretta del Cd. In caso di avvelenamento, il paziente muore entro poche ore in un quadro di collasso cardiovascolare, acidosi metabolica e coagulopatia [67, 68]. L'inalazione di fumi di ossido di cadmio può causare febbre, nota come "febbre del saldatore" e polmonite chimica [69, 70]. I sintomi iniziali compaiono da 4 a 8 ore dopo l'esposizione e includono una sindrome simil-influenzale associata a febbre transitoria solitamente tra 39 e 40 °C, una sensazione di malessere generale con brividi, mal di testa, mialgia,

nausea e vomito con sensazione di gusto metallico in bocca. I sintomi respiratori sono generalmente moderati con segni di irritazione delle vie aeree superiori e dispnea. Nel caso di polmonite chimica acuta, chiamata in questo caso polmonite cadmica, sono presenti segni di irritazione delle vie respiratorie tra cui tosse secca e dispnea, accompagnate da dolore retrosternale, febbre, cefalea, mialgia e leucocitosi [71-75]. La polmonite cadmica peggiora rapidamente e può portare a broncoalveolite emorragica, con la morte del paziente nel 10-25% dei casi. Raramente sono associate insufficienza epatica e renale [76].

La tossicità cronica è causata dall'esposizione a lungo termine che, nella maggior parte dei casi, si può realizzare sia in ambito professionale che residenziale per prossimità con centri industriali e con ambienti inquinati dal metallo. Di solito le esposizioni croniche si verificano a dosi inferiori rispetto alle esposizioni acute, e quindi la tossicità da esposizione cronica risulta dalla distribuzione e dall'accumulo nel tempo di Cd nei tessuti. Per definizione, la tossicità cronica è tardiva e ci sono casi in cui un individuo inizia a sviluppare in modo evidente segni di tossicità anni dopo aver lasciato l'ambiente professionale. La sintomatologia risulta essere spesso subdola, invisibile e non direttamente correlabile all'esposizione al metallo, complicandone la diagnosi. Il rene è l'organo bersaglio dell'avvelenamento cronico da Cd. Le manifestazioni precoci sono caratterizzate da nefropatia tubulare prossimale con escrezione di proteine a basso peso molecolare (ad es. proteina legante il retinolo,  $\alpha$ 1-microglobulina,  $\beta$ 2-microglobulina). Si associano enzimuria (ad es. N-acetilglucosaminidasuria), amminoaciduria, glicosuria, ipercalciuria e iperfosfaturia, con conseguente insorgenza di urolitiasi. In una fase più avanzata, il Cd può compromettere la funzione glomerulare fino all'instaurarsi di insufficienza renale [77]. Il fegato, oltre ai reni, è il principale sito di accumulo di Cd nel corpo e, sebbene sottovalutata in passato, indagini recenti hanno dimostrato una connessione tra esposizione cronica a questo elemento ed insufficienza epatica [42, 78].

L'avvelenamento cronico da Cd può causare osteomalacia e talvolta osteoporosi diffusa [46]. Si ritiene che la tossicità ossea del Cd sia il risultato, da un lato, dell'escrezione renale di fosfati e calcio e, dall'altro, dell'alterazione del metabolismo di alcuni ormoni calciotropi nonché dell'effetto osteotossico diretto del Cd [79]. Il dente giallo cadmico, una pigmentazione gialla dello smalto che inizia a livello del collo del dente e si estende verso il bordo libero, è un segno della caratteristica impregnazione cronica di cadmio [80]. L'inalazione a lungo termine di bassi livelli di Cd può portare a rinite cronica, iposmia e persino anosmia [81]. Nei casi più gravi ricorrono malattie polmonari ostruttive croniche ed enfisema polmonare [82]. Insieme a forti effetti teratogeni e mutagenici, il Cd mostra effetti avversi sia sul sistema riproduttivo maschile che femminile, sulla loro fertilità [83] e sull'esito della gravidanza, causando perturbazione dello sviluppo placentare e fetale [84]. Il Cd induce alterazione della steroidogenesi ed è considerato un interferente endocrino capace di legarsi, regolandone attività ed espressione, ai recettori degli estrogeni [85]. Recentemente, è stato inoltre proposto un potenziale coinvolgimento del Cd nella patologia vascolare [86-89] e del rischio di emorragia subaracnoidea [90].

L'Agenzia internazionale per la ricerca sul cancro (AIRC) ha classificato il Cd e i suoi composti come cancerogeni per l'uomo (Gruppo 1) [12, 91]. Esistono prove sufficienti del fatto che l'esposizione professionale a lungo termine (ad esempio attraverso i fumi di cadmio) contribuisce allo sviluppo di neoplasie polmonari [92]. Recenti dati epidemiologici indicano anche che l'esposizione a questo metallo tossico è correlabile con tumori della prostata [40], della mammella [93, 94], del rinofaringe [95], della vescica urinaria [96], del pancreas [97] e dei reni [98].

## **CAPITOLO 2: NEUROTOSSICITÀ DA CADMIO**

Il sistema nervoso centrale (SNC) è particolarmente vulnerabile all'esposizione al Cd. In animali da esperimento il Cd induce disturbi comportamentali, cambiamenti neurochimici e lesioni cerebrali, mentre nell'uomo l'avvelenamento acuto da Cd produce sintomi di parkinsonismo [99].

In soggetti affetti da malattia del motoneurone, la concentrazione di Cd nel sangue è risultata essere più elevata rispetto ai controlli [100, 101].

L'esposizione al Cd può generare disturbi neurocomportamentali nell'adulto. I lavoratori anziani possono essere più suscettibili all'aumento del carico corporeo di Cd e possono sviluppare una polineuropatia periferica (PNP) nel tempo [102]; inoltre attenzione, velocità psicomotoria, memoria [103], funzionalità visuo-motoria [104] erano significativamente ridotte.

Studi epidemiologici hanno associato un'esposizione cronica ai metalli con un rischio maggiore di sviluppare diverse patologie neurodegenerative e progressive, come morbo di Alzheimer [105], malattia di Parkinson [99], sclerosi laterale amiotrofica [106], malattia di Huntington e atassie [107].

Il Cd è implicato nei difetti dello sviluppo umano e nelle disfunzioni cognitive [108, 109]. L'esposizione al Cd durante la gestazione (il metallo è in grado di attraversare la placenta e raggiungere il feto [110]) e/o l'allattamento è stata correlata alla compromissione delle abilità verbali e basso rendimento scolastico nei bambini [109], scarse funzioni percettive e motorie nonché disturbi comportamentali come iperattività e deficit dell'attenzione [111, 112].



## **2.1 MECCANISMI MOLECOLARI NELLA NEUROTOSSICITÀ DA CADMIO**

### **2.1.1 INDUZIONE DELLO STRESS OSSIDATIVO**

Lo stress ossidativo colpisce numerose componenti cellulari come DNA, lipidi e proteine, attraverso reazioni di ossidazione. Queste alterazioni strutturali producono cambiamenti significativi nella funzione e possono essere l'origine di svariate patologie. Studi recenti hanno dimostrato che metalli come ferro, rame, cadmio, cromo, piombo, mercurio, nichel e vanadio producono specie reattive dell'ossigeno, con conseguente aumento della perossidazione lipidica (LPO), deplezione di sulfidrilici, omeostasi alterata del calcio e infine danno al DNA [113-117].

Le specie reattive dell'ossigeno (Reactive Oxygen Species, ROS) vengono prodotte continuamente nei tessuti, tra le altre fonti, dall'azione del sistema di trasporto degli elettroni e della nicotinammide adenin dinucleotide fosfato (NADPH) ossidasi. Per antagonizzare il danno ossidativo, la cellula dispone di diversi sistemi di difesa antiossidante tra i quali è compresa l'azione di alcuni enzimi, questi includono: la catalasi coinvolta nella detossificazione da perossido di idrogeno, la superossido dismutasi (SOD) per contrastare l'anione superossido e la glutazione perossidasi (GPX) che neutralizza sia il perossido di idrogeno che i perossidi lipidici; inoltre, altre molecole come glutazione, ceruloplasmina e transferrina, indirettamente coinvolte nell'azione antiossidante, prevengono i danni ai tessuti indotti dai radicali liberi [118, 119].

La sovrapproduzione di radicali liberi può derivare da interazioni indirette del Cd in siti cellulari critici o come conseguenza dell'inibizione dei meccanismi protettivi.

L'interazione del Cd con i siti mitocondriali induce la formazione di ROS, dissipazione del potenziale di membrana mitocondriale e riduzione dei livelli di glutazione intracellulare. Lo stress ossidativo risultante porta all'attivazione del sistema di difesa antiossidante della cellula [117]. La perossidazione lipidica produce una progressiva

perdita della fluidità della membrana, riducendo così il potenziale di membrana e aumentando la sua permeabilità a ioni come  $\text{Ca}^{2+}$  [120]. Inoltre, l'alterazione indotta all'integrità strutturale dei lipidi colpisce secondariamente gli enzimi di membrana come  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasi [121, 122].

Inoltre, l'esposizione di animali da esperimento al Cd causa alterazioni in specifiche regioni dell'encefalo [114]. Nei ratti adulti co-esposti a etanolo e Cd, c'è un aumento della LPO indotto dal Cd nel corpo striato e nella corteccia cerebrale [123]. Il Cd induce anche un significativo aumento della produzione di radicali liberi e conseguente LPO nell'encefalo dei ratti in via di sviluppo [124].

### 2.1.2 INTERFERENZA CON ALTRI METALLI

Il Cd interferisce con biometalli essenziali come zinco, magnesio, selenio, calcio e ferro, alterando la loro omeostasi e perturbando anche le loro funzioni biologiche [58, 60, 125]. Nello specifico, i cambiamenti nell'omeostasi della concentrazione citosolica di  $\text{Ca}^{2+}$  possono influenzare la regolazione di molte funzioni neuronali [126]. L'eccitazione neuronale provoca un aumento transitorio del  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulare, che a sua volta media una risposta neuronale. L'aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulare è mediato dall'apertura dei canali voltaggio-dipendenti e dal suo rilascio dai suoi depositi intracellulari. Il  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulare torna ai livelli basali mediante pompe del  $\text{Ca}^{2+}$  ATP-dipendenti, scambiatori  $\text{Na}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ , proteine di legame del  $\text{Ca}^{2+}$  e sequestro nel reticolo endoplasmatico (ER) e nei mitocondri [127, 128].

Il Cd inibisce tutte le vie note dell'afflusso cellulare del  $\text{Ca}^{2+}$ , agisce come ione competitivo per i canali del  $\text{Ca}^{2+}$  voltaggio-dipendenti ed è un potente bloccante del rilascio  $\text{Ca}^{2+}$ -dipendente di neurotrasmettitori [129-131]. Inoltre, l'effetto bloccante indotto da Cd sui canali del  $\text{Ca}^{2+}$  influisce sulle attività bioelettriche [104, 132].

Di straordinaria importanza per le sue funzioni, il ferro (Fe) è coinvolto nel trasporto dell'ossigeno, nella sintesi del DNA, nella respirazione mitocondriale, nella sintesi della mielina, nella sintesi e nel catabolismo dei neurotrasmettitori [133-135]. L'assorbimento di Fe da parte del SNC richiede passaggi multipli e avviene con meccanismi simili a quelli attivati nell'intestino tenue. Il sistema transferrina/recettore della transferrina (Tf/TfR) è il principale meccanismo coinvolto nel trasporto del Fe attraverso la BBB. Nel SNC, gli astrociti regolano l'omeostasi del Fe mediante i trasportatori DMT1 (divalent metal transporter 1) e ferroportina [136, 137]. Il Fe agisce come cofattore della triptofano idrossilasi, della tirosina idrossilasi e della fenilalanina idrossilasi, responsabili della sintesi di serotonina e di dopamina, con azione sulle funzioni emotive, cognitive e motorie [138]. Inoltre, il Fe media anche il catabolismo di questi neurotrasmettitori, fungendo da cofattore per le monoamino ossidasi (MAO) [139]. Gli oligodendrociti presentano il maggiore fabbisogno di Fe [138, 140, 141] necessario per la produzione di mielina [138, 141].

Il manganese (Mn) svolge un ruolo importante nella difesa antiossidante, nel metabolismo energetico, nella risposta immunitaria e nella regolazione delle attività neuronali [142-144]. Ad oggi non è possibile assegnare un trasporto esclusivo del Mn ad uno specifico trasportatore per cui il suo flusso è mediato da trasportatori comuni ad altri ioni tra cui il trasportatore DMT1 [145], il sistema Tf/TfR [146-149] e la ferroportina [150]. Similmente al Fe, anche il Mn agisce come cofattore per molti enzimi come arginasi, piruvato carbossilasi, acetilcolinesterasi, glutammina sintetasi e superossido dismutasi Mn-dipendente (Mn-SOD) [148, 151], essenziali per la normale funzione cerebrale.

Il Cd interferisce con la biosintesi del gruppo eme [152] e con le proteine IRP (Iron Regulatory Protein) che fungono da sensore delle variazioni della concentrazione citoplasmatica di Fe. Inoltre, il legame con la transferrina [153] nonché la mancanza di

selettività del trasportatore DMT1 [154, 155], rappresentano due aspetti importanti nella tossicità da Cd sia per quanto riguarda il Fe che per il Mn. All'interno della cellula, il Mn viene veicolato nell'apparato di Golgi necessario nelle attività transferasiche di glicosilazione e di solfatazione delle proteine. Il suo trasporto è mediato da pompe del  $\text{Ca}^{2+}$  ATP-dipendenti [156] che possono al contempo veicolare il Cd interferendo sia sull'omeostasi del Mn che inibendo alcune di queste attività transferasiche.

### 2.1.3 ALTERAZIONI NELLA NEUROTRASMISSIONE

Anche le alterazioni nei meccanismi di rilascio dei neurotrasmettitori sono implicate nella neurotossicità da Cd. Il Cd può bloccare l'afflusso di  $\text{Ca}^{2+}$  attraverso i canali di membrana con conseguente disfunzione nel rilascio dei neurotrasmettitori [157]. Diversi studi hanno dimostrato che il Cd inibisce il trasporto della colina nei sinaptosomi [158]. La valutazione dei livelli di neurotrasmettitori eccitatori (glutammato e aspartato) e inibitori (glicina e GABA) ha evidenziato una loro alterazione nell'amigdala degli animali esposti al Cd, suggerendo che il Cd influisce sull'equilibrio eccitazione/inibizione della neurotrasmissione sinaptica [159].

Il sistema serotoninergico sembra essere particolarmente sensibile all'esposizione al Cd: sia le concentrazioni di 5-idrossitriptamina (5-HT) che di acido 5-idrossi-indolacetico (5-HIAA) sono state trovate aumentate in diverse regioni cerebrali di ratti adulti esposti al metallo; al contrario, il contenuto cerebrale di 5-HT e 5-HIAA nelle stesse regioni è risultato diminuito nei ratti in via di sviluppo [160, 161]. La diminuzione del contenuto di 5-HIAA suggerisce che il Cd impedisca l'uptake di 5-HT [162].

Anche il rilascio di dopamina è influenzato dal Cd. I ratti in fase di sviluppo esposti al Cd mostrano un aumento del rilascio di dopamina dallo striato e una ridotta attività della tirosina idrossilasi [124].

#### 2.1.4 EFFETTO ESTROGENICO

Lo studio dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonade (HPG) in animali esposti al metallo risulta di grande interesse poiché i livelli di Cd in aria, acqua, suolo e alimenti sono notevolmente aumentati a causa delle emissioni delle attività industriali.

Il Cd influenza il rilascio circadiano di noradrenalina, un regolatore della secrezione ormonale dell'ipotalamo, portando a cambiamenti nei livelli giornalieri di testosterone e di ormone luteinizzante (LH) [163]. Negli animali trattati, l'accumulo di Cd risultava aumentato nell'ipotalamo e nei testicoli, mentre è stato trovato nell'ipofisi nei soli ratti post-puberali. Inoltre, i livelli plasmatici degli ormoni ipofisari (ad esempio LH, ormone follicolo-stimolante FSH, prolattina, ormone adrenocorticotropo ACTH) erano alterati in seguito all'esposizione [164].

Questi dati suggeriscono che il Cd esercita effetti dipendenti legati all'età e che agisce sui tre livelli dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonade (HPG), alterandone i meccanismi di regolazione [165].

#### 2.1.5 NEUROGENESI ALTERATA E INCREMENTO DELL' APOPTOSI NEURONALE

Alla base della neurotossicità Cd-dipendente potrebbe esservi un'alterazione della neurogenesi che, a sua volta, indurrebbe una riduzione sia della differenziazione neuronale che della crescita dell'assone, portando alla morte delle cellule neuronali [166]. Anche se la loro identificazione risulta essere particolarmente difficoltosa, le complesse vie molecolari alla base della neurogenesi forniscono una serie di possibili target che potrebbero essere influenzati dall'esposizione al Cd. In uno studio condotto su zebrafish (*Danio rerio*), un modello utilizzato per lo studio dello sviluppo del SNC grazie alle omologie strutturali e funzionali condivise con quelle dei mammiferi, gli embrioni trattati con Cd mostravano bassi livelli trascrizionali dei geni neurogenici *ngn1* e *neuroD* con conseguente alterazione del neurosviluppo [167].

Diversi studi hanno dimostrato che il Cd induce l'apoptosi in molti tessuti e cellule sia *in vivo* [168] che *in vitro* [169-171], probabilmente attraverso la via mitocondriale [117]. L'apoptosi neuronale indotta da Cd è associata alla produzione massiccia di ROS, aumento della LPO e del Ca<sup>2+</sup> intracellulare [127, 172], dissipazione del potenziale di membrana mitocondriale ( $\Delta\Psi_m$ ), rilascio di citocromo C [173, 174], attivazione della Caspasi-9 e avvio della cascata proteolitica [174-177].

#### 2.1.6 EFFETTI SUL DNA ED ESPRESSIONE GENICA ALTERATA

Il Cd induce danno sistemico al DNA [178] ed interferisce con i meccanismi deputati alla sua riparazione [179]. Ad alte concentrazioni, il metallo induce rotture del DNA e alterazioni cromosomiche [180], mentre a concentrazioni più basse, la sua azione è quella di inibire i meccanismi di riparazione del DNA, principalmente quelli che si attuano per escissione di basi [181, 182].

La dimostrazione che il Cd si lega al DNA in modo debole, indica che le alterazioni genetiche causate dal metallo non sono da ricercarsi in una sua azione diretta sul DNA, quanto piuttosto in meccanismi di tipo epigenetico, ovvero in quei cambiamenti dell'espressione genica che si verificano in assenza di alterazioni della sequenza del nucleotide ma che sono comunque ereditabili [183]. Tali alterazioni possono avere influenze profonde nell'economia cellulare anche se, a differenza di quelle che si verificano in conseguenza di mutazioni, sono reversibili e sensibili alle variazioni ambientali.

Tra tutti i processi epigenetici che regolano il comportamento genico inducendone il silenziamento, troviamo la metilazione del DNA. Quest'ultima consiste nell'aggiunta di un gruppo metile nella posizione 5' dell'anello della citosina nelle isole CpG per formare 5-metilcitosina (5-MeC) [184]. Se da un lato, svariati studi hanno dimostrato che la metilazione del DNA è facilitata dall'esposizione a lungo termine al Cd [185, 186],

dall'altro, altri studi indicano che il danno ossidativo al DNA può interferire con l'attività delle metiltransferasi, inducendo ipometilazione dei siti CpG [187, 188]. Dunque il Cd potrebbe innescare una cascata di eventi che esita sia nell'ipo- che nell'iper-metilazione di geni specifici [189], con conseguente espressione genica aberrante. Studi evidenziano come i fenomeni epigenetici possono essere alla base degli effetti osservati nell'esposizione fetale o nella prima infanzia e l'insorgenza tardiva della malattia. Alcuni studi hanno evidenziato che figli di donne esposte al Cd durante la gravidanza mostrano ridotte capacità motorie e percettive. Un'elevata presenza di Cd nell'organismo dei bambini è correlata a compromessa intelligenza e basso rendimento scolastico. Inoltre, un'alterata metilazione del DNA a livello del SNC è correlata a sindromi cliniche quali il ritardo mentale e comportamenti di tipo autistico [190]. Sebbene i risultati di questi cambiamenti epigenetici siano rimasti inesplorati, data la chiara importanza della metilazione del DNA nei processi del neurosviluppo, la perturbazione indotta dal metallo sulla metilazione del DNA merita chiaramente ulteriori studi.

L'esposizione al Cd durante lo sviluppo prenatale può determinare cambiamenti duraturi o irreversibili nel SNC a causa di una espressione genica alterata [191, 192]. I livelli di espressione di alcune proteine specifiche del SNC, quali la neurogranina e la proteina basica della mielina, sono regolati dai valori sierici di ormoni tiroidei (THs). Poiché la presenza del Cd influisce proprio su questi ultimi, si capisce come l'esposizione al Cd possa alterare i livelli di espressione di tali geni [193].

### 2.1.7 METALLI PESANTI E AGGREGAZIONE DELLE PROTEINE

Alcune malattie neurodegenerative sono associate a un errato ripiegamento di alcune proteine che, a sua volta, ne induce anche un'aggregazione. Alcuni studi evidenziano infatti che l'alterata omeostasi di alcuni metalli condiziona il meccanismo di

ripiegamento di particolari proteine [194-197], facilitando la formazione di aggregati neurotossici [198]. È stato infatti dimostrato come l'alterazione delle concentrazioni di alcuni metalli di transizione quali  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{2+}$  e  $\text{Pb}^{2+}$  causi l'aggregazione dei peptidi  $\text{A}\beta$  e la formazione delle placche amiloidi caratteristiche della malattia di Alzheimer [199]. È stato inoltre dimostrato che il trattamento con  $\text{Pb}^{2+}$  aumenta i livelli di  $\text{A}\beta$  nel liquido cerebrospinale e nei tessuti cerebrali in topi APP-transgenici (amyloid precursor protein) [200]. L'esposizione post-natale al  $\text{Pb}^{2+}$  in ratti [201] e scimmie [202] aumenta il numero di placche amiloidi nella corteccia frontale nell'adulto.

I modelli *in vitro* e *in vivo* hanno dimostrato che il mercurio riproduce tutti i cambiamenti patologici osservati nella malattia di Alzheimer (come iperfosforilazione della proteina tau ed aumento della formazione di proteina  $\text{A}\beta$ ) [203]. Infatti, analogamente al peptide  $\text{A}\beta$ , la proteina tau può legare ioni metallici multivalenti ed avere un effetto pro-aggregante. L'aggiunta di sali di alluminio favorisce la formazione di aggregati di proteina tau amorfi, sia *in vitro* che in colture cellulari [204, 205].

Il ruolo dei metalli pesanti nell'eziologia della malattia di Parkinson è almeno in parte dovuto alla loro capacità di modulare l'aggregazione di  $\alpha$ -sinucleina [206].

Stesso discorso per altre malattie neurodegenerative autosomiche dominanti come atassie [207, 208] e malattia di Huntington [209], dove l'effetto dell'alterata omeostasi degli ioni metallici si esplica attraverso l'aumento dell'esposizione delle sequenze idrofobiche, condensazione e conseguente precipitazione degli aggregati.

## **2.2 RESISTENZA CELLULARE ALLA NEUROTOSSICITÀ DA CADMIO**

La scoperta nel 1957 di una proteina legante il Cd, ricca di cisteine ha segnato la nascita della superfamiglia di polipeptidi a basso peso molecolare delle metallotioneine (MT). Le MT costituiscono una famiglia di proteine caratterizzate da un alto contenuto in ioni metallici e da un'insolita abbondanza di cisteine, con un peso molecolare di circa 6,5



kDa. I gruppi –SH di queste proteine possono complessare sette cationi bivalenti o dodici ioni metallici monovalenti [210], distribuiti in due cluster, determinandone la struttura terziaria della proteina. Il legame di affinità delle MT per gli ioni metallici è Cd > Pb > Cu > Hg > Zn > Ag > Ni > Co.

Le funzioni fisiologiche più importanti delle MT sono legate all'omeostasi degli ioni metallici essenziali Zn e Cu, alla regolazione metabolica tramite donazione/sequestro di Zn, alla protezione contro la citotossicità del Cd e di altri metalli tossici, alla rimozione dei radicali liberi prodotti nello stress ossidativo [62, 211-215].

Nei mammiferi vengono espresse quattro differenti isoforme. Nel sistema nervoso, le isoforme I e II sono prevalentemente espresse da astrociti (specialmente quelli reattivi), cellule endoteliali dei vasi che irrorano il SNC, cellule ependimali; mentre l'isoforma III è espressa principalmente da neuroni e astrociti [212, 213, 216, 217]. Costituita da 68 aminoacidi, a differenza delle altre isoforme, MT III non è indotta dalla presenza di elevate concentrazioni di metalli e possiede un'attività inibitoria della crescita neuronale [218, 219].

L'espressione delle MT è altamente inducibile in risposta a differenti stimoli quali ormoni, citochine e metalli con conseguente azione su proliferazione e differenziazione cellulare così come sui meccanismi di difesa cellulare [213, 220-222]. Le MT contribuiscono alla neuroprotezione e alla rigenerazione neuronale, ad esempio legando lo zinco (particolarmente abbondante nel SNC) garantendone l'omeostasi e contrastando i radicali liberi al fine di limitare la zona lesa, aumentando la probabilità di sopravvivenza e di rigenerazione neuronale [223].

### CAPITOLO 3: LA BARRIERA EMATO-ENCEFALICA

È passato più di un secolo dagli esperimenti pionieristici di Edwin Goldmann e Paul Ehrlich che identificarono una chiara compartimentazione tra sangue e SNC (Figura 2) [224].



**Figura 2. Ratto adulto dopo iniezione sistemica di trypan blue.**

La barriera emato-encefalica (blood-brain barrier, BBB), l'interfaccia che separa la circolazione sanguigna dal SNC, è composta da complesse strutture multicellulari con caratteristiche uniche che selettivamente consentono o limitano il passaggio di sostanze tra questi compartimenti. Considerando il complesso sistema della microvascolarizzazione cerebrale, che occupa fino al 30% del volume dell'encefalo, con una lunghezza totale dei capillari di 650 km [225] e una superficie variabile tra 150 e 200 cm<sup>2</sup>/g di tessuto, fornendo un'area totale di scambio compresa tra 12 e 18 m<sup>2</sup> in un uomo adulto, alla BBB deve essere assegnato un ruolo che va ben oltre la funzione di una semplice barriera. Essa agisce come una "barriera fisica" poiché complesse giunzioni tra cellule endoteliali adiacenti forzano la maggior parte del traffico molecolare nel prendere un percorso transcellulare, piuttosto che muovendosi per via paracellulare, come nella maggior parte degli endoteli [226, 227]. Piccole molecole gassose come O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> possono diffondere liberamente attraverso le membrane lipidiche, e questa è anche una via di ingresso per piccoli agenti lipofili, compresi farmaci (come ad esempio i barbiturici) e l'etanolo. La presenza di specifici sistemi di trasporto sulla membrana

luminale e abluminale regolano il traffico transcellulare di piccole molecole idrofiliche, costituendo una “barriera di trasporto” selettiva che consente o facilita l’ingresso delle sostanze nutritive richieste mentre esclude o espelle i composti potenzialmente nocivi [228]. Infine, una combinazione di enzimi intracellulari ed extracellulari costituiscono una “barriera metabolica”: ectoenzimi come le peptidasi e le nucleotidasi sono in grado di metabolizzare, rispettivamente, i peptidi e l’ATP, mentre gli enzimi intracellulari come la monoamino ossidasi e il citocromo P450 (1A e 2B) possono inattivare molti composti neuroattivi e tossici [229]. Grandi molecole idrofiliche come i peptidi e le proteine sono generalmente esclusi, a meno che non siano trasferiti mediante transcitosi mediata da recettori specifici [230].

Si capisce quindi che le funzioni della BBB sono molteplici [228, 231, 232]: (1) fornisce al SNC nutrienti essenziali e media l’efflusso di molti prodotti di scarto; (2) limita lo scambio di ioni e di fluidi tra il sangue e il SNC, permettendo a trasportatori e canali ionici specifici di regolarne il traffico al fine di produrre un fluido interstiziale simile al plasma sanguigno ma con un contenuto proteico molto più basso, con concentrazioni inferiori di  $K^+$  e  $Ca^{2+}$  ma livelli maggiori di  $Mg^{2+}$ , ione fondamentale per la funzione neuronale [233]; (3) protegge il SNC da eccessive fluttuazioni nella composizione ionica (come normalmente si verifica in seguito ad un pasto o ad un esercizio fisico) che altererebbero la segnalazione sinaptica e assonale [234]; (4) aiuta a mantenere separati i pool di neurotrasmettitori e di agenti neuroattivi che agiscono a livello centrale (nel SNC) e periferico (nei tessuti periferici e nel sangue), in modo che agenti simili possano essere utilizzati indipendentemente dai due sistemi; (5) grazie alla sua ampia superficie e alla breve distanza di diffusione tra neuroni e capillari, l’endotelio ha un ruolo fondamentale nella regolazione del microambiente cerebrale.

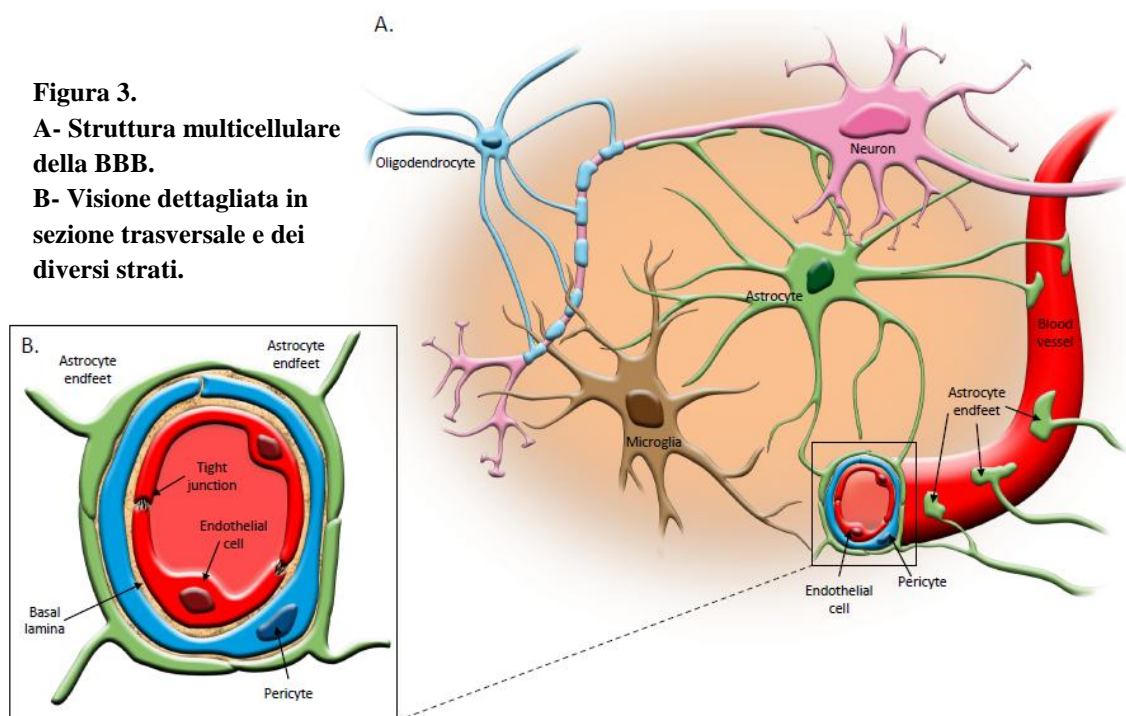
### **3.1 EVOLUZIONE DELLA BARRIERA EMATO-ENCEFALICA**

Mentre tutti i vertebrati esistenti possiedono una BBB ben sviluppata e compatta, gli invertebrati mostrano abbozzi di strutture di barriera tra sangue e tessuto neurale con un'elevata variabilità della rigidità e della funzione. Nel corso della filogenesi si assiste infatti a importanti modificazioni strutturali: se gli invertebrati presentano una BBB di natura prevalentemente gliale, i vertebrati mostrano una BBB a prevalente componente endoteliale [234, 235], mentre vestigia della primitiva BBB gliale restano nel SNC dei mammiferi in quelle regioni prive di una barriera vascolare, quali l'epitelio pigmentato retinico, i plessi coroidei, i taniciti degli organi circumventricolari e i pituiciti del sistema ipotalamo-ipofisario [236].

Perché è vantaggioso avere una barriera dalla struttura elaborata all'interfaccia sangue-SNC e quali forze regolano i suoi fini meccanismi? Probabilmente la pressione evolutiva ha favorito lo sviluppo di una rete neuronale più complessa consentendo lo sviluppo di sofisticate abilità (controllo motorio fine e veloce, visione migliorata, udito e olfatto, apprendimento/memoria e comportamento sociale) controllate dal SNC [232], che richiedono un preciso e calibrato ambiente ionico perisinaptico e che consenta di eseguire accuratamente la propria funzione nella neurotrasmissione. Perturbazioni, dovute ad un'incontrollata diffusione ionica dal plasma, influenzano l'eccitabilità neuronale, inducendo sia un'iperattività che può provocare convulsioni, che un'ipoattività, a sua volta causa di perdita di coscienza. Possedere una BBB più complessa, capace di sigillare il parenchima cerebrale dal flusso ionico dirompente, rifornendolo contemporaneamente di nutrienti e substrati energetici ben selezionati, ha permesso l'evoluzione di un SNC più sofisticato e vantaggioso in termini darwiniani.

### 3.2 STRUTTURA MULTICELLULARE E FUNZIONE DELLA NVU

Cellule endoteliali microvascolari, periciti, astrociti e membrana basale sono gli elementi centrali della BBB. Il termine unità neurovascolare (neurovascular unit, NVU) sottolinea il cross-talk dinamico tra la periferia e il sistema nervoso centrale attraverso la BBB. Nell'ambito della NVU sono compresi anche altri tipi cellulari che partecipano all'omeostasi del SNC, tipicamente microglia, neuroni e oligodendrociti (Figura 3).



#### 3.2.1 CELLULE ENDOTELIALI

Le cellule endoteliali sono considerate la base anatomica della BBB poiché formano e sigillano saldamente le pareti di tutti i vasi cerebrali, costruendo così una barriera fisica tra il sangue e il parenchima cerebrale.

Le giunzioni endoteliali intercellulari sono fondamentali in questo contesto. Esistono due diversi tipi di giunzioni interendoteliali: giunzioni aderenti e occludenti. Le giunzioni aderenti comprendono caderina endoteliale vascolare (VE-) e caderina neurale (N-), entrambe agiscono tramite interazioni omofile. Mentre la VE-caderina è importante per sigillare cellule endoteliali adiacenti [237], l'N-caderina media la loro

associazione con i periciti [238]. Le giunzioni occludenti contengono le proteine transmembrana claudine, occludine, molecole di adesione giunzionale e le proteine citoplasmatiche *zonula occludens*, che agiscono di concerto per sigillare l'interconnessione tra le cellule endoteliali [239]. In tal modo, la diffusione paracellulare di sostanze idrofiliche e ioni è limitata; questa è una caratteristica unica dell'endotelio della BBB ma, in tal modo, rappresenta anche un grande ostacolo alla somministrazione di farmaci diretti al SNC per il trattamento di malattie neurologiche [240].

Altrettanto unico è l'insieme dei trasportatori e degli enzimi metabolici espressi da queste cellule endoteliali. Dato che gli scambi attraverso l'endotelio sono enormemente limitati e la transitosi è estremamente bassa in queste cellule, sono necessari meccanismi specifici di trasporto. Al fine di regolare la direzione dello scambio, molecole trasportatrici sono espresse e funzionano in modo polarizzato [241]. Trasportatori di soluti (come GLUT-1), recettori (come il recettore della transferrina) e pompe ioniche mediano il trasferimento dei substrati dal sangue al SNC; pompe di efflusso ATP-dipendenti e trasportatori ABC, come la glicoproteina P, rimuovono substrati dal parenchima cerebrale.

Un'altra caratteristica delle cellule endoteliali neurovascolari, rispetto alle cellule endoteliali periferiche, è la bassa espressione di molecole di adesione leucocitarie. A differenza di altri tessuti, le cellule immunitarie non attraversano mai una BBB intatta e non stimolata al fine di pattugliare il SNC [242]. Infatti, fenomeni di neuroinfiammazione si innescano sempre a livello periferico o nello spazio subaracnoideo, e si estendono al parenchima solo quando le cellule immunitarie riescono a violare due barriere distinte, e cioè la parete vascolare (la quale, in conseguenza dello stimolo infiammatorio, aumenta i livelli di espressione delle molecole di adesione leucocitaria sul versante luminale del vaso) e la *glia limitans* (la sottile barriera formata dai processi astrocitari perivascolari), aprendo la strada verso il tessuto neurale [243].

Le cellule endoteliali di barriera acquisiscono le loro uniche proprietà nel corso dello sviluppo embrionale. Durante l'angiogenesi, le cellule progenitrici endoteliali mostrano bassi livelli di espressione sia delle proteine costituenti le giunzioni occludenti sia di trasportatori. Solo in seguito all'associazione e al cross-talk con le altre componenti cellulari della NVU si ha la maturazione e la completa formazione della barriera. Secondo le conoscenze acquisite di recente, i periciti sono essenziali per l'induzione delle proprietà della barriera, mentre gli astrociti giocano un ruolo importante nella loro maturazione e nel loro mantenimento [244]. Tali proprietà includono regolazione delle giunzioni interendoteliali, riduzione dell'attività transcrittiva e dell'espressione delle molecole di adesione dei leucociti [245-251].

### 3.2.2 PERICITI

I periciti devono il proprio nome sulla base dell'osservazione di una complessa rete di processi che avvolge la parete esterna dei vasi cerebrali [252]. Il numero di periciti che rivestono i capillari varia tra i differenti organi, raggiungendo il massimale a livello del tessuto nervoso. Questa osservazione sottolinea che le cellule endoteliali della BBB hanno una richiesta straordinariamente alta di periciti. I periciti sono completamente incorporati nella membrana basale e sono quindi fisicamente separati dalle cellule endoteliali (Figura 3), sebbene interazioni intercellulari dirette siano presenti in discrete aree [253]. Una delle funzioni principali dei periciti è il controllo del diametro dei vasi e del flusso sanguigno cerebrale in risposta all'attività neuronale, implementato dall'elevata abbondanza, in questo particolare tipo di cellule, di  $\alpha$ -actina, una proteina tipica del muscolo liscio [254, 255].

La conoscenza del ruolo dei periciti nella regolazione della BBB è emersa solo negli ultimi anni e, ad oggi, i periciti sono riconosciuti come attori chiave nella barrierogenesi e stabilizzazione dei vasi [255]. Durante lo sviluppo embrionale i periciti che esprimono

il recettore del fattore di crescita- $\beta$  derivato dalle piastrine (PDGFR- $\beta$ ) sono reclutati dalle cellule endoteliali angiogeniche PDGF- $\beta$ -secernenti [256, 257]. L'associazione fisica tra periciti e cellule endoteliali è favorita da interazioni omofile di N-caderina [258]. Il cross-talk pericita-endotelio promuove la proliferazione e la sopravvivenza dei periciti [259] e avvia la secrezione dei componenti della membrana basale e di rimodellamento della matrice [260, 261]. La deposizione di particolari proteoglicani ed elastina da parte dei periciti media la cessazione dell'angiogenesi [262], sottolineando l'importanza dei periciti durante le varie fasi della barrierogenesi. I periciti influenzano la formazione delle giunzioni endoteliali occludenti, la riduzione dell'attività transcitotica endoteliale, il potenziamento dell'attività di efflusso mediato dalla glicoproteina P e l'inibizione dell'espressione di molecole di adesione leucocitarie durante la neurovascolarizzazione [246, 247, 259].

Oltre alla sua formazione, i periciti sono necessari al mantenimento della barriera: la permeabilità vascolare aumenta con la riduzione del mantello pericitico [247, 251, 263]. I periciti mediano anche gli stretti rapporti che si stabiliscono tra la parete vascolare e i prolungamenti astrocitari [247]. Inoltre, contribuiscono alla produzione della membrana basale, stimolano l'attivazione delle cellule immunitarie in condizioni infiammatorie e supportano le funzioni neuronali. L'insieme di tutte queste funzioni fanno sì che i periciti assumano un ruolo centrale all'interno della NVU [244].

### 3.2.3 ASTROCITI

Gli astrociti sono il tipo cellulare più abbondante nel SNC e svolgono svariate funzioni. Oltre alla regolazione della BBB, partecipano alla formazione delle sinapsi, all'assorbimento e al riciclaggio di neurotrasmettitori e ioni, alla regolazione dei livelli di potassio extracellulare, al nutrimento dei neuroni e al controllo delle risposte infiammatorie attivate nel SNC [264]. La loro partecipazione alla costituzione della BBB



avviene attraverso dei prolungamenti che sono muniti di pedicelli (endfeet) con i quali gli astrociti vanno ad avvolgere il vaso. Si stima che gli endfeet coprono circa il 99% dell'albero neurovascolare [265].

Gli endfeet sono ancorati sul lato abluminale della membrana basale dall'interazione dell'agrina, componente della matrice extracellulare (extracellular matrix, ECM), con il complesso transmembrana distrofina-distroglicano, particolarmente abbondante in questi terminali astrocitari specializzati [266]. La natura polarizzata degli endfeet è ulteriormente determinata dalla presenza di aggregati sovramolecolari denominati orthogonal arrays of intramembranous particles (OAP) [267] costituiti da acquaporina-4, canale adibito al trasporto dell'acqua principalmente espresso nel tessuto nervoso e in particolare negli endfeet astrocitari [268, 269]. Insieme all'alta densità dei canali del potassio Kir4.1, lo scambio di acqua e  $K^+$  a livello degli endfeet è importante per modulare rapidamente la concentrazione ionica in risposta ai cambiamenti nell'attività neuronale [270].

Per quanto riguarda il cross-talk con l'endotelio, la presenza della membrana basale che lo separa fisicamente dagli endfeet, fa sì che gli scambi si realizzino solo attraverso fattori solubili rilasciati dagli astrociti. *In vitro*, sia in co-coltura di cellule endoteliali con astrociti o utilizzando terreni di coltura condizionati dagli astrociti su monoculture di cellule endoteliali si osserva un aumento dei livelli di espressione delle giunzioni occludenti, di trasportatori ed di enzimi tali da potenziare complessivamente il fenotipo della BBB [271-276]. Tuttavia, durante le fasi iniziali di sviluppo della BBB, un coinvolgimento da parte di questi fattori nell'induzione delle proprietà di barriera è improbabile poiché gli astrociti intervengono solo successivamente ai periciti nel rivestimento della parete endoteliale e le proprietà della barriera si instaurano prima del differenziamento degli astrociti [259]. A partire da fasi tardive dello sviluppo embrionale, la maturazione della BBB prosegue con la secrezione da parte degli astrociti

di angiopoietina-1, apolipoproteina E, angiotensina II e sonic hedgehog le cui vie di segnalazione assicurano il mantenimento dell'integrità della BBB in quanto inducono l'espressione delle giunzioni occludenti [277, 278]. È interessante notare che gli astrociti sembrano assumere un ruolo di supporto per le cellule endoteliali della BBB anche in condizioni infiammatorie. La proteina sonic hedgehog secreta dagli astrociti attiva, nelle cellule endoteliali, una via di segnalazione con proprietà antinfiammatorie [248]. Inoltre, l'acido retinoico e il fattore stimolante le colonie di granulociti e macrofagi (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF), secreti dagli astrociti, contrastano la risposta infiammatoria delle cellule endoteliali della BBB [279, 280]. È da notare che i capillari piali mancano di una stretta associazione con gli endfeet astrocitari ma comunque mostrano alcune caratteristiche della BBB [281]. Questo dato, da un lato, enfatizza le proprietà intrinseche delle cellule endoteliali della BBB, dall'altro, evidenzia il ruolo essenziale di fattori solubili prodotti dalla *glia limitans* nel potenziare il fenotipo di barriera delle cellule endoteliali.

### 3.2.4 MEMBRANA BASALE

Spesso sottovalutata, la componente acellulare della NVU, la membrana basale, è un costituente altamente dinamico della BBB, caratterizzata da una complessa ECM. Le molecole dell'ECM sono prodotte da cellule endoteliali, astrociti e periciti. I principali componenti della membrana basale sono: collagene di tipo IV, laminina, entactina e perlecano, integrato da fibronectina, agrina, osteonectina e glicosaminoglicani [260]. Costituiscono tutti dei ligandi per dei corrispondenti recettori transmembrana espressi dalle cellule della NVU [282].

Da un punto di vista strutturale, la membrana basale ha la duplice funzione di ancorare le cellule nella posizione corretta e di indurre e sostenere la polarizzazione delle componenti della NVU. Inoltre, essa è coinvolta nella regolazione della comunicazione

intercellulare attraverso la diffusione e/o la ritenzione delle molecole di segnalazione [283, 284].

Per quanto riguarda le cellule endoteliali, la membrana basale media la redistribuzione delle proteine giunzionali e l'espressione polarizzata dei trasportatori in modo che la direzione dello scambio possa essere adeguatamente controllata. È stato infatti dimostrato che la delezione dell'integrina  $\beta 1$  endoteliale, impedendo la sua interazione con l'ECM, induce un'alterazione della dislocazione dei costituenti interendoteliali VE-caderina, CD31 e CD99 [285]. Gli astrociti dipendono dall'agrina per creare i complessi OAP ai loro terminali, garantendo l'omeostasi di acqua e  $K^+$  [266, 268, 269]. I periciti sono completamente incorporati nella membrana basale nella NVU matura, e sono quindi costantemente esposti a componenti della ECM che possono essere responsabili della loro capacità di differenziarsi [286]. Un recente studio ha infatti dimostrato che la perdita di laminina prodotta dagli astrociti nella membrana basale è un fattore scatenante il differenziamento dei periciti (appartengono allo stesso lignaggio delle cellule muscolari lisce vascolari) da fenotipo quiescente a fenotipo contrattile tipico del muscolo liscio, con conseguente aumento della permeabilità della BBB [287].

A livello delle venule postcapillari, la membrana basale ha un ruolo importante nella trasmigrazione delle cellule immunitarie. In queste aree dell'albero cerebrovascolare, esiste uno spazio perivascolare delimitato da due membrane basali separate: la membrana basale endoteliale che contiene laminina  $\alpha 4$  e  $\alpha 5$ , e la membrana basale parenchimale, contenente laminina  $\alpha 1$  e  $\alpha 2$  [260]. La distribuzione differenziale delle laminine influisce direttamente sulla funzione della membrana basale. In corso di infiammazione, la laminina  $\alpha 4$  della membrana basale endoteliale è permissiva nei confronti dell'infiltrazione da parte di cellule T, mentre la laminina  $\alpha 5$  è restrittiva [288]. Una volta stravasate, le cellule T sono intrappolate nello spazio perivascolare e, prima di consentire una loro ulteriore migrazione all'interno del parenchima cerebrale, è

necessaria una riattivazione che viene operata dai macrofagi locali. In questo contesto, un ruolo importante viene giocato dalle metalloproteinasi della matrice (MMP), che sono in grado di digerire i substrati della ECM e, di conseguenza, ridurre l'integrità della BBB, permettendo l'ingresso dei linfociti T [286].

### 3.2.5 NEURONI

La missione principale della BBB è fornire un ambiente di lavoro ideale per i neuroni. Per questo motivo i neuroni devono essere considerati parte integrante della NVU, poiché la funzione e la disfunzione della barriera hanno un impatto immediato sulla rete neuronale. L'importanza di un cross-talk neurovascolare è enfatizzato dal fatto che nell'encefalo umano gruppi di neuroni sono irrorati dallo stesso capillare [289]. Di conseguenza, l'ostruzione di un capillare provoca il danneggiamento dei neuroni da esso irrorati.

I neuroni devono essere in grado di segnalare ai vasi cerebrali quando le loro richieste di energia cambiano. Meccanismi di feedback negativo e positivo regolano il flusso sanguigno cerebrale al quale si accompagnano modificazioni del trasporto di substrati attraverso la BBB, secondo un meccanismo noto come accoppiamento neurovascolare [290]. Al fine di realizzare l'accoppiamento neurovascolare, un ruolo rilevante è svolto dall'innervazione dei processi astrocitari e dell'endotelio che si realizza a carico di neuroni serotoninergici, noradrenergici, colinergici e GABAergici [291-294]. È stato osservato che la stimolazione elettrica di neuroni adrenergici induce un aumento del trasporto di soluti attraverso la BBB, dimostrando al contempo la stretta relazione che sussiste tra neuroni e cellule endoteliali della BBB [295]. Altri esperimenti hanno inoltre evidenziato come anche i neuroni, una volta attivati, possono agire direttamente sugli astrociti inducendone la secrezione di istamina e ATP. Questo, a sua volta, porta all'incremento dell'attività di GLUT-1 con aumento della quantità di glucosio assorbito

attraverso l'endotelio [290]. Allo stesso modo, il rilascio di glutammato da parte di neuroni attivati determina il rilassamento dei periciti e contribuisce a regolare il flusso sanguigno cerebrale in base alle nuove esigenze [296].

### 3.2.6 MICROGLIA

La microglia è costituita da cellule effettrici immunitarie innate del SNC e rappresenta l'unica popolazione cellulare mieloide la cui origine e funzione deve essere chiaramente distinta dagli altri fagociti [297]. Difatti, mentre i macrofagi perivascolari e i monociti infiltranti derivano dal midollo osseo, la microglia ha origine dal sacco vitellino e popola il SNC nelle fasi precoci dell'embriogenesi, prima che si verifichi la sua vascolarizzazione [298]. Una volta avviata la neurovascolarizzazione mediata dal fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF), la microglia aiuta nella formazione dei complessi vascolari promuovendo la fusione delle cellule endoteliali [299]. Uno dei compiti della microglia è monitorare il SNC da qualsiasi cambiamento a carattere patologico. Le cellule microgliali pattugliano costantemente l'ambiente circostante intervenendo in casi di sbilanciamento ionico, presenza di cellule danneggiate o di agenti infettivi. La morfologia della microglia sorvegliante è caratterizzata da piccoli corpi cellulari e da numerosi, lunghi e sottili processi che si allungano e si ritraggono continuamente al fine di "pattugliare" l'ambiente circostante [300, 301]. In condizioni patologiche, la morfologia della microglia cambia rapidamente: il corpo cellulare diventa più voluminoso mentre i processi divengono più corti e più tozzi [302]. La microglia attivata è spesso designata come M1 e M2, sebbene siano stati descritti fenotipi eterogenei di attivazione [303, 304]. Il fenotipo M1 è pro-infiammatorio, mentre la microglia di tipo M2 è coinvolta nell'immunoregolazione, nel controllo dei meccanismi infiammatori e nella risoluzione del danno [305]. Entrambi i fenotipi

possiedono capacità fagocitarie, contribuendo alla rimozione dei detriti cellulari e alla riparazione neurale [306].

Gli studi sperimentali suggeriscono come la microglia contribuisce anche al funzionamento della BBB: cellule endoteliali bEND3 in co-coltura con microglia a riposo mostrano una maggiore espressione di proteine costituenti le giunzioni serrate quali occludina e ZO-1 [307]. Inoltre, sembra esserci una precisa correlazione spazio-temporale tra attivazione vascolare, alterazione della BBB e transizione della microglia verso lo stato attivato M1, in seguito all'esposizione a fattori di stress patologici [308, 309].

La microglia M1 è coinvolta nella produzione e secrezione di citochine (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12) e chemochine pro-infiammatorie (CCL2 e CXCL10) [305, 310], capaci di indurre significative disfunzioni a carico della NVU [308, 311, 312]. Nello specifico, TNF- $\alpha$  determina l'aumento dell'espressione di metalloproteinasi della matrice (MMP) - 2, -3 e -9 con conseguente alterazione delle giunzioni serrate ed aumento della permeabilità della barriera [313, 314]. Un meccanismo d'azione simile è stato anche riportato in seguito all'esposizione a IL-1 $\beta$  [315], IL-6 e IL-12 [316]. Le citochine pro-infiammatorie possono anche modulare l'espressione di trasportatori della BBB come dimostrato sia in studi *in vitro* che *ex vivo* [317]. Questi risultati suggeriscono come le citochine pro-infiammatorie possono modulare le cinetiche di trasporto attraverso la BBB, alterare la permeabilità ai soluti presenti nella circolazione sanguigna, rendendo il SNC accessibile a potenziali sostanze tossiche. Inoltre, la microglia M1 secerne chemochine (CCL2, CXCL10) che promuovono la migrazione di monociti e macrofagi attraverso la BBB, con ripercussioni sia sulla NVU che sul parenchima cerebrale [318–320].

A causa della natura redox-sensibile delle giunzioni serrate [321], l'apertura della BBB può anche essere innescata dalla produzione di ROS con conseguente stress ossidativo.

Nella microglia con fenotipo M1, la generazione di ROS è correlata ad una maggiore espressione ed attività dell'ossido nitrico sintasi inducibile (iNOS) [322]. L'aumento dell'attività di iNOS nel SNC si traduce in un aumento della produzione di ossido nitrico (NO) che coniugandosi con l'anione superossido ( $O_2^-$ ) forma il perossinitrito ( $ONOO^-$ ), una potente molecola citotossica capace di provocare ingenti danni ai neuroni e ai microvasi cerebrali attraverso la perossidazione lipidica, il consumo di antiossidanti endogeni (es. glutazione), la nitrosilazione delle proteine, la frammentazione del DNA e il danno mitocondriale [323]. La scomposizione del perossinitrito in biossido di azoto e radicali idrossilici contribuisce ulteriormente al danno cellulare [324].

A differenza della precedente, la microglia di tipo M2 partecipa alla protezione della BBB e alla riparazione neurale mediante la produzione di citochine anti-infiammatorie (IL-10 e TGF- $\beta$ 1), proteine della matrice extracellulare, glucocorticoidi e altre sostanze [305]. La transizione da uno stato quiescente ad un fenotipo protettivo M2 è mediata dall'attivazione dei recettori per IL-4, FC $\gamma$  o IL-10 [305, 325]. In un modello murino di encefalomielite autoimmune sperimentale (EAE) trattato con tetrametilpirazina, un farmaco capace di promuovere la polarizzazione microgliale di tipo M2, è stato dimostrato come le cellule microgliali con fenotipo anti-infiammatorio sono in grado di preservare l'integrità funzionale della barriera emato-midollare [326].

### **3.3 GIUNZIONI ENDOTELIALI**

Le giunzioni aderenti (Adherens Junction, AJ) e le giunzioni occludenti (Tight Junction, TJ), i due principali complessi giunzionali presenti a livello della BBB, forniscono importanti contatti adesivi tra cellule endoteliali adiacenti. Sebbene queste giunzioni siano costituite da proteine diverse, esiste una certa comunità di ruoli tra proteine transmembrana specializzate nella formazione dei contatti extracellulari e di quelli che si

stabiliscono con il citoscheletro, e proteine implicate nella regolazione delle vie di segnalazione [327].

Le AJ sono composte principalmente da proteine della superfamiglia delle caderine che attraversano lo spazio intercellulare e forniscono stabilità legandosi al citoscheletro mediante le proteine  $\alpha/\beta/\gamma$  catenina. Esse giocano un ruolo chiave nel mantenimento della polarità cellulare, fornendo stabilità, promuovendo la sopravvivenza delle cellule endoteliali e rispondendo agli stimoli. Studi sperimentali suggeriscono che le AJ sono anche essenziali per la formazione delle TJ [226]. A differenza delle AJ che sono presenti in tutti i vasi dell'organismo, le TJ sono particolarmente abbondanti nell'endotelio dei microvasi del SNC. Esse appaiono come reti intramembranose continue di filamenti tra cellule endoteliali adiacenti, così chiamati "kissing points" per sigillare lo spazio paracellulare [328]. Questa fusione operata dalle TJ impedisce il flusso di soluti e ioni dal sangue al SNC e viceversa, creando a sua volta una barriera dinamica e altamente regolabile.

Le TJ ricoprono due funzioni esclusive: una funzione di barriera alla diffusione delle proteine di membrana fra i domini apicale e basolaterale della membrana plasmatica e una funzione "cancello" che controlla il passaggio paracellulare di ioni e soluti tra le cellule. Le TJ contengono due tipi di proteine transmembrana, occludine e claudine, che conferiscono questa duplice funzione, e che associate alle proteine che costituiscono l'impalcatura citoplasmatica, si legano al citoscheletro di actina e alle AJ [329-331]. Nei punti di contatto che si stabiliscono tra tre cellule adiacenti, la tricellulina è stata identificata come potenziale regolatore della permeabilità paracellulare [332]. Altre proteine costituenti il sistema delle TJ sono le molecole di adesione giunzionale (Junctional Adhesion Molecules, JAM) di cui sono state scoperte diverse isoforme.



### **3.4 COMPONENTI TRANSMEMBRANA DELLE GIUNZIONI OCCLUDENTI**

#### **3.4.1 OCCLUDINA**

L'occludina è stata identificata come la prima proteina integrale di membrana di ~65 kDa del complesso delle TJ delle cellule endoteliali [333]. È una componente funzionale delle TJ e, come per la famiglia delle claudine, ha quattro domini transmembrana e due anse extracellulari [329]. Sono state individuate due isoforme derivanti dallo splicing alternativo dell'mRNA, che hanno distribuzioni tissutali simili [334]. La sua funzione è stata studiata mediante espressione ectopica dell'occludina di pollo in cellule di insetto Sf9, dove ha indotto la formazione di strutture del tipo TJ [335]. Inoltre, l'introduzione di una forma di occludina troncata in cellule renali MDCK (Madin-Darby Canine Kidney cells) ha determinato un'aumentata fuoriuscita paracellulare di traccianti a basso peso molecolare, suggerendo un suo ruolo nel mantenimento dell'integrità delle TJ [336]. Malgrado la formazione delle TJ sembri prescindere dalla presenza di occludine in cellule staminali embrionali [337], topi knockout per occludina mostrano un fenotipo complesso, a causa delle anomalie istologiche riscontrate in diversi tessuti, caratterizzato da ritardo della crescita, presenza di calcificazioni cerebrali, infiammazione cronica, iperplasia dell'epitelio gastrico, atrofia testicolare, assottigliamento del tessuto osseo compatto. La complessa serie di anomalie osservate indicano un potenziale ruolo fisiologico dell'occludina secondario alla formazione delle TJ [338]. Diversi studi dimostrano infatti che essa subisce profonde modificazioni sia post-trascrizionali che post-traduzionali, con effetti sulla regolazione delle TJ e sull'omeostasi endoteliale [339].

La localizzazione dell'occludina a livello delle TJ è regolata mediante fosforilazione [340]. L'analisi in Western blot dell'occludina rivela la presenza di siti multipli di fosforilazione identificati su residui di tirosina [341], serina e treonina [340].

L'occludina non fosforilata è localizzata sia a livello della membrana basolaterale che nelle vescicole citoplasmatiche, mentre l'occludina fosforilata è localizzata a livello delle giunzioni strette [340]. Il diverso grado di fosforilazione, regolato dall'azione concertata di chinasi e fosfatasi, è responsabile sia della localizzazione che della funzione della proteina all'interno delle TJ.

In un modello sperimentale di encefalomyelite autoimmune sperimentale (experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE), si osserva defosforilazione dell'occludina suggerendone un possibile coinvolgimento nei pathway scatenanti la malattia [342]. È noto anche che l'occludina gioca un ruolo chiave nella regolazione redox delle TJ: condizioni di normossia promuovono l'oligomerizzazione dell'occludina e l'assemblaggio delle TJ mentre lo stress ossidativo associato all'infiammazione ne promuove la distruzione [343].

### 3.4.2 CLAUDINE

Sono stati identificati 27 membri della famiglia delle claudine (18-27 kDa) [344] che mostrano lo stesso modello strutturale: sono proteine integrali di membrana con quattro domini transmembrana, due anse extracellulari e due terminali citoplasmatici, uno N-terminale a catena corta e uno C-terminale a catena più lunga [345]. L'estremità C-terminale contiene un dominio PDZ (acronimo ottenuto dalle iniziali delle prime tre proteine scoperte nel condividere questo stesso dominio: Postsynaptic density protein 95, Drosophila disc large tumor suppressor, Zonula occludens-1), un piccolo dominio di interazione proteina-proteina a struttura globulare attraverso il quale le claudine stabiliscono un collegamento con altre proteine, quali ZO-1, ZO-2, ZO-3, MAGI-1, PatJ, PALS1 e MUPP1 [346], ancorando le TJ al citoscheletro [347].

Le claudine modulano la via paracellulare comportandosi al pari di canali ionici tradizionali [348].

A livello della BBB, la claudina-5 è di gran lunga la componente dominante delle TJ, ma sono anche presenti la claudina-3 e la claudina-12 [259]. La nostra comprensione delle claudine è migliorata attraverso l'utilizzo di modelli genetici knock-in e knock-out e modelli *in vitro* della BBB. La trasfezione di claudina-5 in cellule MDCK consentiva la formazione di reti TJ stabili con selettiva riduzione della permeabilità agli ioni [346, 349]. Topi knock-down per la claudina-5 presentavano una BBB con permeabilità alterata. È interessante notare che, nonostante l'aumento della permeabilità, la barriera continua a trattenere molecole con peso molecolare superiore a 1 kDa indicando che altre componenti possono essere coinvolte nella regolazione della sua integrità [350]. È evidente, tuttavia, che le claudine hanno un ruolo intrinseco nella regolazione della permeabilità della BBB [351].

### 3.4.3 MOLECOLE DI ADESIONE GIUNZIONALE

Le molecole di adesione giunzionale (JAM) sono proteine integrali di membrana appartenenti alla superfamiglia delle immunoglobuline. Sono costituite da un unico dominio transmembrana, un dominio extracellulare N-terminale e un corto dominio C-terminale citoplasmatico [352]. Il dominio C-terminale citoplasmatico contiene un motivo PDZ che interagisce con altre proteine tra cui ZO-1, AF-6, ASIP/Par3 e cingulina [353, 354]. Le JAM possono sia interagire con JAM omotipiche presenti su cellule adiacenti, sia con JAM eterotipiche, così come con altre molecole di adesione [355]. Legandosi a Par3, le JAM promuovono una polarizzazione della cellula tale da indurre una localizzazione di ZO-1 e occludina nei punti di contatto tra le cellule [356]. Evidenze sempre maggiori indicano un ruolo dei membri della famiglia JAM nella transmigrazione dei leucociti attraverso l'endotelio [357, 358].

#### 3.4.4 LE PROTEINE *ZONULA OCCLUDENS* (ZO)

ZO-1 (220 kDa), ZO-2 (160 kDa) e ZO-3 (130 kDa) sono membri della famiglia MAGUK (guanilato chinasi membrana-associati) con domini multipli di legame alle proteine delle AJ, delle TJ e all'actina citoscheletrica. La famiglia MAGUK è caratterizzata da domini PDZ, domini SH3 e domini omologhi della guanilato chinasi [359]. ZO-1 è stato isolato come omodimero ma può dimerizzare con ZO-2 o con ZO-3; mentre ZO-2 e ZO-3 non possono formare un complesso binario [360, 361]. ZO-1 [362-364] e ZO-2 [365] hanno entrambi dimostrato di legare  $\alpha$ -catenina, mentre il dominio C-terminale di ZO-3 è sufficiente per legare p120-catenina *in vitro* [366]. Inoltre, è stato dimostrato *in vitro* che ZO-1 [330, 367] e ZO-2 [365] legano direttamente l'occludina. I domini C-terminale, ricchi di prolina, di ZO-1 [330] e ZO-3 [368] legano la F-actina in test di co-immunoprecipitazione mentre ZO-2 non si lega all'actina [330, 361]. ZO-2, tuttavia, si lega alla proteina associata all'actina 4.1R [369].

In sintesi, il complesso multiproteico delle TJ, fino ad ora descritto, è legato al citoscheletro di actina attraverso le proteine ZO che si legano alle proteine integrali di membrana con il dominio N-terminale e al citoscheletro di actina con il dominio C-terminale. La proteina che gioca il ruolo centrale è ZO-1 che, direttamente e indirettamente, collega le proteine integrali di membrana (occludine e claudine) alle altre proteine citoplasmatiche delle TJ e al citoscheletro di actina, con il potenziale compito di organizzare le componenti strutturali e di modulare la via paracellulare [330].

## CAPITOLO 4: OMEOSTASI DELLO ZINCO NEL SNC

Lo zinco (Zn) è il secondo metallo più abbondante e funge da oligoelemento essenziale nell'uomo. La maggior parte dello Zn nel corpo umano è contenuto nelle proteine. Uno studio bioinformatico ha riportato che oltre 2.800 proteine con ruoli catalitici, strutturali e segnalatori, ovvero circa il 10% del proteoma umano, possiedono la capacità (reale o potenziale) di legare lo Zn [370]. La maggior parte delle proteine leganti il metallo possiedono motivi zinc-finger, in cui uno ione  $Zn^{2+}$  lega quattro residui di cisteina e/o istidina (Cys2/His2 sono i tipi più comuni) per formare una struttura stabile [370-372], capace di regolare interazioni proteina-DNA, proteina-RNA e proteina-proteina [373-378]. Più del 95% dello zinco si trova in testicoli, muscoli, fegato e tessuto cerebrale [379]. Lo Zn libero nel plasma viene mantenuto a concentrazioni di 12-15  $\mu M$ . La maggior parte degli ioni zinco plasmatici sono legati all'albumina ( $12,4 \pm 2,2 \mu M$ ) e alla  $\alpha 2$ -macroglobulina ( $2,4 \pm 0,6 \mu M$ ), costituendo un pool di riserva circolante [380, 381]. È stato infatti dimostrato che in condizioni fisiologiche, lo Zn plasmatico mostra un turnover medio di 5,3 volte all'ora [382]. La restante parte dello zinco plasmatico (meno dello 0,01%) è eliminato per via renale e complessato con aminoacidi, principalmente cisteina e istidina [379, 383, 384].

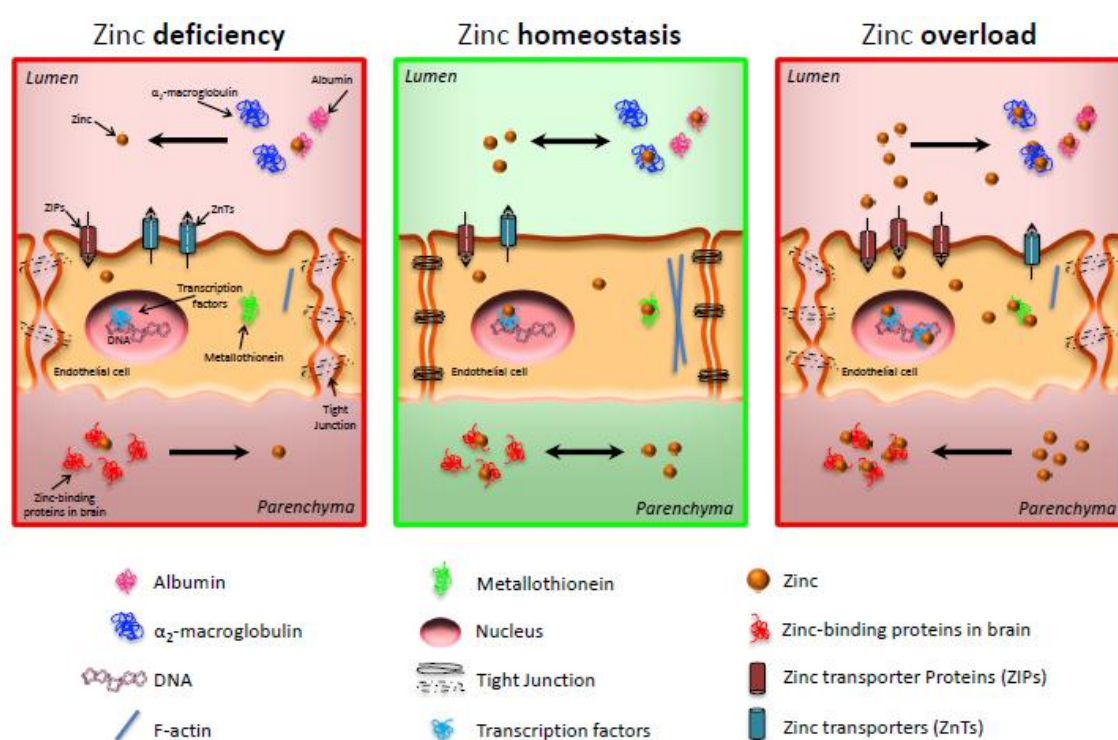
Studi recenti suggeriscono che lo Zn libero svolge un ruolo cruciale nella modulazione neuronale, nella plasticità sinaptica, nell'apprendimento e nella memorizzazione [385-388]. Una grande quantità di Zn è immagazzinata nei neuroni, specialmente nelle vescicole sinaptiche [370, 389]. Negli ultimi decenni, è stato scoperto che esso svolge ruoli importanti nel SNC, specialmente nelle attività neuronali e sinaptiche, poiché viene rilasciato nello spazio sinaptico durante la neurotrasmissione modulando i recettori post-sinaptici sia ionotropici che metabotropici [390, 391]. La carenza di Zn è correlata a ritardo mentale, epilessia e malattie neurodegenerative [392-396]. Utilizzando la

colorazione di Timm-Danscher, specifica per lo Zn, e la colorazione Nissl, specifica per i neuroni, su sezioni istologiche di encefalo di ratto è stato dimostrato che il metallo è altamente concentrato in aree particolarmente addensate di neuroni come ippocampo, amigdala, corteccia cerebrale e corteccia olfattiva [389].

Uno studio condotto sugli ovini ha riportato che la BBB regola l'equilibrio dello Zn nel tessuto cerebrale in condizioni fisiologiche. Gli autori hanno infuso la soluzione di acetato di zinco (1 mg/ml) per via endovenosa a una velocità di 1,0 ml/min per 30 min e poi continuamente a 0,125 ml/min per 7 h. L'infusione ha aumentato la concentrazione plasmatica di Zn ( $Zn_p$ ) di circa 10 volte senza alterarne la concentrazione nel liquido cerebrospinale ( $Zn_{CSF}$ ), suggerendo il possibile coinvolgimento della BBB [397]. Un altro studio sui ratti ha rivelato che il tasso di sostituzione di  $^{65}Zn$  rispetto allo Zn tissutale era del 40% nel plasma, del 16-20% in fegato, reni, sangue e prostata, mentre i rapporti di sostituzione nei testicoli e nel SNC erano molto bassi (2-3%); i risultati hanno dunque suggerito che l'assorbimento di Zn nei testicoli e nel SNC viene regolato, rispettivamente, dalla barriera emato-testicolare e dalla BBB [398]. L'apertura temporanea della BBB, mediante shock osmotico (4M NaCl) o elettroconvulsivo (140V, 2s), ha aumentato la concentrazione di  $Zn_{CSF}$  fino al livello di  $Zn_p$ , tornato poi ai livelli basali in condizioni normali [397], dimostrando che l'apertura della BBB aumenta la traslocazione dello Zn dal sangue al SNC. Complessivamente, questi studi indicano che la BBB separa lo Zn plasmatico da quello cerebrale in condizioni fisiologiche.

Seguendo la stessa linea di ricerca, un interessante studio ha misurato l'assorbimento plasmatico di Zn da parte del SNC e la sua permeabilità attraverso la BBB [399]. Nei ratti è stato iniettato per via endovenosa  $^{65}ZnCl_2$ ; mentre  $^{125}I$ -albumina è stata somministrata come marker vascolare. Nei primi 30 minuti è stato osservato uno scambio bidirezionale di  $^{65}Zn$  tra sangue e SNC fino a raggiungere uno stato stazionario. Dopo 30 minuti, l'assorbimento di  $^{65}Zn$  è diventato unidirezionale dal sangue al SNC,

con un valore K di  $5 \times 10^{-4}$  ml/min/g. Successivamente è stata valutata la capacità di assorbimento di  $^{65}\text{Zn}$  in diverse regioni: cervelletto > mesencefalo > corteccia > ippocampo > midollo > ipotalamo [399]. Vale la pena notare che dopo 5 ore di infusione è stato riscontrato solo un leggero cambiamento della concentrazione di Zn nel liquido cerebrospinale per cui è stato ipotizzato che le cellule endoteliali potessero essere il compartimento potenziale di deposito, confermato anche dalla presenza di specifici trasportatori (Figura 4).



**Figura 4. Schema esemplificativo sul ruolo dello zinco nella normale funzione della barriera emato-encefalica.** In condizioni fisiologiche la BBB separa il pool di Zn plasmatico da quello cerebrale. Le famiglie di trasportatori ZIP e ZnTs sono state identificate come regolatori dell'omeostasi dello Zn nelle cellule endoteliali. I trasportatori ZIP aumentano lo zinco citoplasmatico per assorbimento dal pool plasmatico. I trasportatori ZnTs ne riducono la concentrazione citoplasmatica per esportazione o immagazzinamento negli organuli intracellulari. Gli insulti patologici a carico della BBB, come nell'ischemia cerebrale, alterano l'omeostasi dello Zn.

Sono state identificate diverse famiglie di proteine trasportatrici dello Zn che contribuiscono a regolarne la concentrazione e mantenerne l'omeostasi. La famiglia delle proteine ZIP aumenta lo Zn citoplasmatico aumentandone l'assorbimento plasmatico o favorendone il rilascio dalle vescicole cellulari. Al contrario, la famiglia dei

trasportatori dello zinco (ZnT) riduce lo Zn citoplasmatico esportandolo nel plasma o intrappolandolo all'interno degli organelli intracellulari [379]. Un aumento della concentrazione di Zn, induce l'espressione di metallotioneina, una proteina inducibile a basso peso molecolare, che mostra un'elevata affinità per i metalli e porta alla formazione di un complesso zinco-MT che contribuisce a garantire l'omeostasi del metallo stesso [400, 401]. Inoltre, è stato dimostrato che la chelazione dello Zn mediante N,N,N',N'-Tetrakis(2-piridilmetil)etilendiammina (TPEN) riduce la resistenza elettrica transendoteliale (TransEndothelial Electrical Resistance, TEER) nelle cellule endoteliali non cerebrovascolari, mentre, al contrario, la funzione di barriera non risulta compromessa nelle cellule endoteliali dei microvasi cerebrali, suggerendo la presenza in quest'ultime di meccanismi specifici atti a contrastare la carenza di Zn [402].



## **CAPITOLO 5: OBIETTIVO DELLA TESI**

Lo scopo della ricerca proposta è stato, in primo luogo, quello di caratterizzare le cellule RBE4 come semplice modello *in vitro* di barriera emato-encefalica, al fine di delineare alcune delle vie di segnalazione attivate dalla presenza del Cd, simulando una situazione *in vivo* in cui l'intossicazione subcronica da Cd danneggia la BBB. Di conseguenza, una maggiore permeabilità della BBB rende il SNC più vulnerabile all'azione delle sostanze tossiche costituendo uno dei precoci meccanismi alla base dello sviluppo di molte malattie neurodegenerative [403, 404].

In secondo luogo, quello di comprendere come meglio contrastare la tossicità del metallo pesante dato che ad oggi non esiste una terapia specifica [56], valutando l'efficacia del trattamento con Zn e il comportamento delle RBE4 quando tale linea cellulare è in co-coltura con astrociti DI TNC1 e periciti RBVP, tra i principali costituenti cellulari della BBB *in vivo*.

## CAPITOLO 6: MATERIALI E METODI

### 6.1 COLTURE CELLULARI

Le cellule endoteliali cerebrali di ratto (RBE4), sono state regolarmente coltivate in terreno di coltura completo composto da  $\alpha$ MEM/Ham's F12 in rapporto 1:1, 10% di siero fetale bovino (FBS) (Euroclone, Milano, Italia), 1 ng/ml di fattore di crescita basico dei fibroblasti (bFGF), 1% penicillina/streptomicina (Thermo Fisher Scientific, Milano, Italia).

La linea cellulare DI TNC1, astrociti di ratto, è stata regolarmente coltivata in terreno di coltura completo composto da DMEM (Euroclone, Milano, Italia), 10% di FBS, 2 mM di L-Glutamina (Euroclone, Milano, Italia), 1% penicillina/streptomicina.

Le cellule RBVP, periciti cerebrovascolari di ratto, sono state regolarmente coltivate in terreno di coltura completo composto da PM, 1% di fattori di crescita dei periciti (Pericyte Growth Supplement, PGS; ScienCell Research Laboratories, CliniSciences, Roma, Italia), 10% di FBS, 1% penicillina/streptomicina.

Tutte le linee cellulari sono state mantenute in incubatore alla temperatura di 37 °C, 5% di CO<sub>2</sub> e in condizioni di atmosfera umidificata. Il terreno di crescita è stato rinnovato abitualmente 2-3 volte a settimana. Al raggiungimento della confluenza, le cellule sono state staccate con soluzione di Tripsina/EDTA 1X (Euroclone, Milano, Italia) e ripiastrate in fiasche per coltura (T-75 cm<sup>2</sup>) o in piastre Petri ( $\varnothing = 100$  mm).

### 6.2 IMPLEMENTAZIONE DI UN MODELLO *IN VITRO* DI BBB

Per gli esperimenti in co-coltura, dopo opportune prove e saggi di vitalità preliminari, le cellule sono state mantenute in terreno di coltura completo composto da DMEM/Ham's F12 in rapporto 1:1, 10% FBS, 1 ng/ml bFGF, 1% PGS, 1% penicillina/streptomicina.

Le linee cellulari sono state adattate su appositi supporti transwell secondo il seguente schema:

Giorno 1 - Utilizzando una pinzetta sterile, gli inserti sono stati posizionati nelle apposite piastre multipozzetto da 6 o da 24, quest'ultime per il test MTT in co-coltura. Dopo aver capovolto la piastra multipozzetto e rimosso la parte inferiore, sono stati aggiunti 200  $\mu$ l di poli-L-lisina (Euroclone, Italia) e distribuiti uniformemente su tutta la superficie al fine di facilitare l'adesione delle cellule sul lato inferiore della transwell. Le multiwell sono state così poste in incubatore a 37 °C overnight per permetterne l'asciugatura.

Giorno 2 - I periciti RBVP in coltura sono stati staccati dalla piastra e accuratamente risospesi in terreno completo. Segue centrifugazione a 1.000 rpm per 5 minuti. Dopo aver eliminato il sovrnatante, il pellet è stato risospeso in un appropriato volume di terreno completo al fine di ottenere la densità cellulare desiderata ( $5 \times 10^4$ /ml). Per le transwell di dimensione 6-wells sono stati piastrati 400  $\mu$ l di sospensione cellulare, mentre per quelle di dimensione 24-wells sono stati piastrati 100  $\mu$ l. Pertanto, sono state recuperate le piastre capovolte del giorno 1 e la sospensione è stata distribuita uniformemente sulla membrana in modo da consentirne l'intrappolamento tra il fondo del pozzetto e la membrana stessa.

Dopo incubazione a 37 °C, da un minimo di 2 ore fino a 6 ore per permettere l'adesione delle cellule al supporto, il sistema è stato di nuovo capovolto nella sua posizione normale e nel pozzetto inferiore sono stati aggiunti 2 ml (multipozzetto da 6) o 800  $\mu$ l (multipozzetto da 24) di terreno completo.

Le cellule RBE4 in coltura sono state staccate dalla piastra e risospese in terreno completo. Dopo conteggio mediante camera emocitometrica, il volume della sospensione è stato adeguato per raggiungere la densità desiderata ( $10 \times 10^4$ /ml). Per

ciascun inserto, a seconda delle dimensioni, sono stati aggiunti 1 ml o 350  $\mu$ l della sospensione cellulare, nella camera superiore. Il sistema è stato così incubato a 37 °C.

Per gli astrociti DI TNC1 in coltura è stato eseguito lo stesso procedimento attuato per le RBE4. La densità della sospensione cellulare è stata adeguata alla densità di  $2 \times 10^4$ /ml. Successivamente, 1 ml o 800  $\mu$ l di sospensione cellulare è stata trasferita in nuove piastre multipozzetto, rispettivamente da 6 o da 24. Segue incubazione.

Giorno 3 - È stato montato il sistema di co-coltura. Dopo aver aspirato il terreno di coltura, gli inserti sono stati trasferiti nelle multiwell contenenti gli astrociti. È stato aggiunto del nuovo terreno di coltura in tutte le camere. Il sistema di co-coltura è stato così completato: alla base del pozzetto, nella camera abluminale, erano presenti gli astrociti; mentre adese alla membrana dell'inserto erano presenti le cellule endoteliali RBE4, sul lato luminale, e i periciti RBVP, sul lato abluminale.

Tale sistema è stato mantenuto dai 3 ai 5 giorni in incubatore alla temperatura di 37 °C, 5% di CO<sub>2</sub> e in condizioni di atmosfera umidificata, fino all'ottenimento del monolayer delle cellule RBE4 sul lato luminale, cambiando quotidianamente il terreno di coltura.

### 6.3 TRATTAMENTI CHIMICI

Al fine di simulare un'intossicazione cronica da Cd, gli effetti citotossici sono stati valutati alla concentrazione di 10  $\mu$ M di cloruro di cadmio (CdCl<sub>2</sub>) per 8 o 24 ore, sulla base della curva dose-risposta e di esperimenti effettuati in precedenza [405].

Gli effetti protettivi dello Zn sono stati valutati alla concentrazione di 50  $\mu$ M di cloruro di zinco (ZnCl<sub>2</sub>) per 24 ore in pre-trattamento, ovvero 24 ore prima dell'esposizione con Cd.

Tutti i trattamenti sono stati eseguiti in terreno di starvazione, cioè completo di tutti gli elementi ad eccezione di FBS e bFGF, al fine di evitare la competizione con altri ioni

sierici [406] e la limitazione nella biodisponibilità dello stimolo per mezzo del legame con le proteine sieriche [407].

#### 6.4 VALUTAZIONE DELLA VITALITÀ CELLULARE MEDIANTE TEST MTT

La vitalità cellulare è stata valutata mediante la riduzione del 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro (MTT) (Sigma-Aldrich, Milano, Italia), catalizzata dalle deidrogenasi mitocondriali. Nello specifico, le cellule RBE4 sono state piastrate alla densità di  $2,5 \times 10^4$  cellule/pozzetto in piastre multipozzetto da 96 per 24 ore. Il giorno seguente, il terreno di crescita completo è stato sostituito con terreno di starvazione contenente gli appropriati stimoli. Dopo il trattamento, il terreno è stato sostituito con 1 mg/ml di MTT e la piastra è stata posta in incubatore a 37 °C per 30 minuti, fino alla formazione dei cristalli di formazano. Successivamente, sono stati aggiunti 100 µl di DMSO per dissolvere i cristalli di formazano.

Per quanto riguarda le co-culture, al termine di ogni trattamento, i sistemi sono stati processati come segue: gli inserti contenenti le cellule RBE4 sono stati rimossi dal sistema di co-cultura e trasferiti in una nuova piastra da 24 pozzetti. Dopo rimozione dello stimolo, sono stati aggiunti 200 µl di MTT (1 mg/ml) e la piastra è stata incubata a 37 °C per 30 minuti. Successivamente i cristalli di formazano sono stati solubilizzati in DMSO (200 µl/transwell). 50 µl del DMSO colorato sono stati trasferiti in una nuova piastra multipozzetto da 96, in triplicato, per ciascun inserto.

Per la valutazione della vitalità cellulare, è stata misurata la densità ottica a 570 nm mediante spettrofotometro per micropiastre (MultiskanFC™ microplate reader, Thermo Fisher Scientific, Milano, Italia). Ogni punto sperimentale è stato eseguito in quintuplicato e ciascun esperimento in triplicato.

## 6.5 ANALISI DELLE PROTEINE MEDIANTE WESTERN BLOTTING

Le cellule RBE4 sono state piastrate in terreno completo alla densità di  $4 \times 10^6$  in piastre Petri ( $\varnothing = 100$  mm), per 24 ore. Il giorno seguente, il terreno di coltura è stato sostituito con terreno di starvazione contenente gli appropriati stimoli. Con riferimento alle co-culture, il sistema utilizzato è quello descritto in precedenza.

Dopo ogni trattamento, le cellule sono state raccolte e centrifugate a 1.000 rpm per 10 minuti a temperatura ambiente. Dopo tre lavaggi in tampone fosfato salino (PBS), il pellet cellulare è stato risospeso con tampone di lisi (Ripa buffer; Euroclone, Milano, Italia), a cui è stato aggiunto un cocktail di inibitori delle proteasi e delle fosfatasi (Sigma-Aldrich, Milano, Italia), per 30 minuti a 4 °C per l'estrazione delle proteine cellulari. Infine, l'omogenato è stato centrifugato a 12.000 rpm per 10 minuti a 4°C e il sovrantante è stato raccolto. Le proteine sono state quantificate mediante saggio di Bradford al fine di determinare la concentrazione proteica per ciascun campione.

Quantità uguali di proteine (30  $\mu$ g) sono state caricate su gel di poliacrilammide al 12% (soluzione al 30% di acrilammide/bisacrilammide; Euroclone, Milano, Italia) e la corsa elettroforetica è stata effettuata a 130V per 1 ora e 30 minuti. Al termine, le proteine sono state trasferite su membrane di nitrocellulosa (Porablot NCL; Macherey-Nagel, Thermo Fisher Scientific, Milano, Italia) applicando una corrente elettrica di 100V per 1 ora.

La saturazione della membrana di nitrocellulosa, al fine di bloccare eventuali siti aspecifici aumentando, in tal modo, la specificità del legame antigene-anticorpo, è stata effettuata in 10% FBS diluito in TBS-Tween (Tris-Buffered Saline contenente 0,1% di Tween-20) per 1 ora. Successivamente la membrana è stata incubata overnight a 4 °C con gli specifici anticorpi primari (Tabella 3).

**Tabella 3. Anticorpi primari e relative diluizioni**

<b>anticorpo anti-</b>	<b>diluizione</b>	
$\beta$ -actina	1:10.000	Santa Cruz Biotechnology, DBA Italia, Italia
SOD1	1:1.000	GeneTex, Prodotti Gianni, Italia
GRP78	1:500	Thermo Fisher Scientific, Italia
Caspasi-3	1:500	Cell Signaling, Prodotti Gianni, Italia
proCaspasi-3	1:500	Santa Cruz Biotechnology, DBA Italia, Italia
Bax	1:200	Cell Signaling, Prodotti Gianni, Italia

Il giorno seguente, dopo 3 lavaggi sequenziali in TBS-Tween, ciascuno di 5 minuti, le membrane sono state incubate, per 1 ora a temperatura ambiente, con gli appropriati anticorpi secondari coniugati con il complesso enzimatico della perossidasi HRP (diluizione 1:5.000; Santa Cruz Biotechnology, DBA Italia, Milano, Italia). Infine, le bande proteiche sono state rilevate mediante reazione con il substrato chemiluminescente (ECL Plus Western Blotting Detection Reagent; GE Healthcare, Life Technologies, Milano, Italia). La luce emessa è stata acquisita mediante impressione di lastre autoradiografiche (Amersham Hyperfilm ECL; GE Healthcare, Life Technologies, Milano, Italia), successivamente sviluppate.

L'analisi densitometrica delle bande è stata compiuta mediante il software ImageJ (ImageJ; National Institutes of Health, USA; <https://imagej.nih.gov/ij/>). La proteina housekeeping  $\beta$ -actina è stata utilizzata come controllo interno per normalizzare l'espressione delle proteine di interesse.

Ogni punto sperimentale è stato eseguito in triplicato e ciascun esperimento in duplicato.

## 6.6 DETERMINAZIONE DELLE PROTEINE CARBONILATE

Per ciascun campione sono state utilizzate 5  $\mu$ g di proteine, precedentemente quantificate con metodo di Bradford. È stato aggiunto per ciascun campione TRIS 50 mM per raggiungere un volume finale di 8  $\mu$ l. Dopo aver ottenuto una soluzione di SDS al 26% e solubilizzato la 2,4-dinitrofenilidrazina (DNPH; Sigma-Aldrich, Italia) per

ottenere una soluzione 11 mM, è stata realizzata una terza soluzione mescolando in rapporto 1:1 le due precedenti. Successivamente, 7  $\mu$ l di quest'ultima sono stati aggiunti a ciascun campione (volume complessivo: 15  $\mu$ l) e lasciati riposare a temperatura ambiente per 15 minuti. Infine, sono stati aggiunti 5  $\mu$ l di neutralization buffer (TRIS 2 mM in Glicerolo al 30%) e 5  $\mu$ l di loading buffer (Invitrogen, USA). Infine, i campioni sono stati caricati su gel di poliacrilammide al 12%. Segue elettroforesi e Western blotting come descritto in precedenza.

La membrana è stata incubata overnight a 4 °C, con un anticorpo diretto contro DNPH (diluizione 1:5.000; Sigma-Aldrich, Milano, Italia). Segue incubazione con lo specifico anticorpo secondario coniugato con il complesso HRP e rivelazione della luminescenza, come descritto in precedenza. La membrana colorata con Rosso Ponceau è stata utilizzata per la normalizzazione.

## 6.7 VALUTAZIONE DELLA MORFOLOGIA CELLULARE MEDIANTE MICROSCOPIA A CONTRASTO DI FASE

Le cellule RBE4 in monocultura o in co-cultura sono state osservate in microscopia a contrasto di fase in seguito al trattamento con CdCl<sub>2</sub> al fine di ottenere una migliore comprensione degli effetti sull'aderenza cellulare, sulla morfologia cellulare e sulla crescita in coltura. Le cellule sono state esaminate al microscopio invertito Optika XDS-2 (OptikaMicroscopes, Bergamo, Italia), combinato con una fotocamera digitale True Chrome HD II (TiEsseLab S.r.l., Milano, Italia).

## 6.8 IMMUNOFLUORESCENZA

Le cellule RBE4 sono state piastrate alla densità di  $5 \times 10^4$  su vetrini coprioggetto sterilizzati, alloggiati in piastre multipozzetto da 6, in terreno di crescita completo fino alla formazione del monostrato (48 ore). Diversamente, per le co-culture, è stato utilizzato il sistema descritto in precedenza. Successivamente, il terreno di crescita è



stato sostituito con terreno di starvazione a cui sono stati aggiunti gli appropriati stimoli. Dopo i trattamenti, le cellule sono state fissate in metanolo freddo per 20 minuti a 4 °C per la rilevazione delle proteine TJ oppure con paraformaldeide al 4% per la rilevazione delle proteine del citoscheletro. Dopo permeabilizzazione con 0,3% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) in PBS per 10 minuti e blocco in 1% BSA (Prodotti Gianni, Milano, Italia) per 30 minuti, le cellule sono state incubate con gli anticorpi diretti contro ZO-1 (diluizione 1:200), claudina-5 (diluizione 1:200), occludina (diluizione 1:200), falloidina (diluizione 1:200; Thermo Fisher Scientific, Milano, Italia) e vimentina (diluizione 1:200; Sigma-Aldrich, Milano, Italia) overnight a 4 °C. L'incubazione con gli appropriati anticorpi secondari Alexa Fluor IgG (diluizione 1:500; Thermo Fisher Scientific, Milano, Italia) è stata eseguita per 1 ora a temperatura ambiente. La controcolorazione dei nuclei è stata effettuata con DAPI (4',6-diamidin-2-fenilindolo; diluizione 1:2.000; Thermo Fisher Scientific, Milano, Italia). Infine, i vetrini coprioggetto sono stati montati utilizzando il montante acquoso Fluoromount (Thermo Fisher Scientific, Milano, Italia). La fluorescenza è stata rilevata con un ingrandimento totale di 400× mediante microscopio Leica DM6000B dotato di fotocamera DFC350FX. Per ogni punto sperimentale, eseguito in triplicato, sono stati scelti cinque campi microscopici.

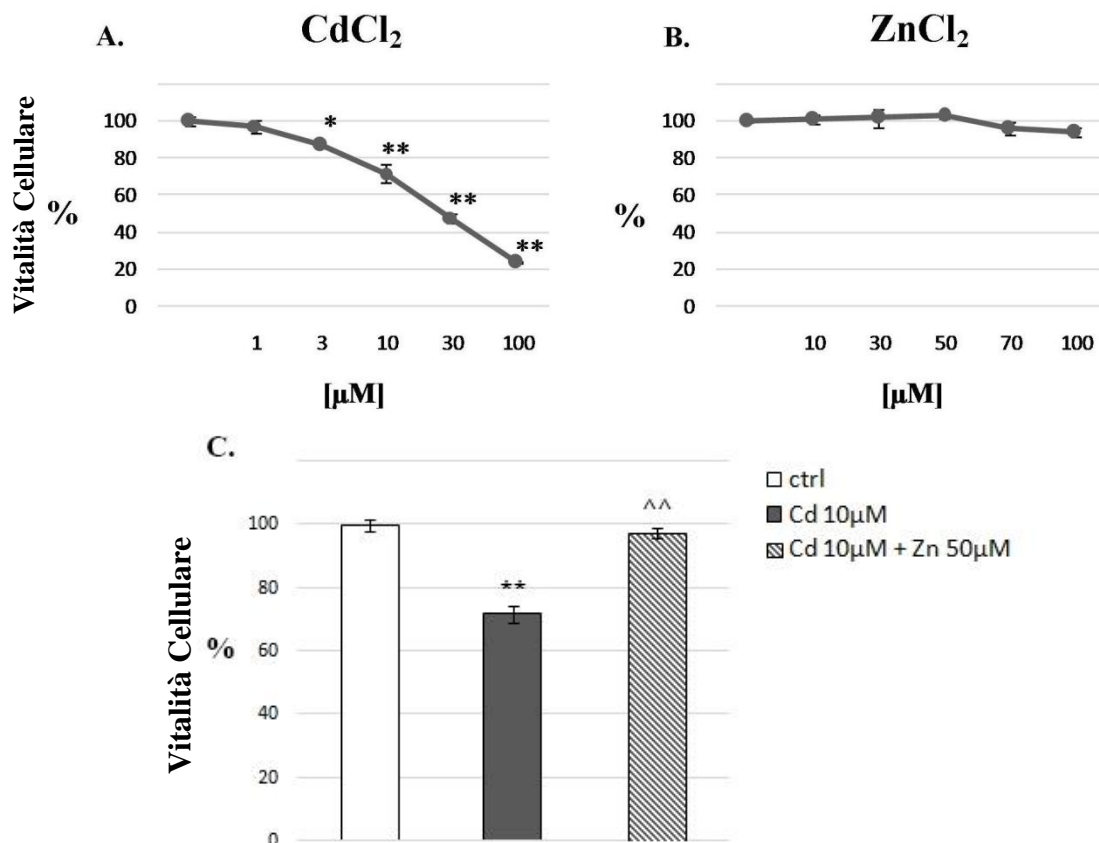
## 6.9 ANALISI STATISTICA

Tutti i risultati sperimentali sono espressi come  $media \pm S.E.M.$  (Standard Error of the Mean – errore standard della media). Per determinare differenze statisticamente significative tra i risultati ottenuti, il  $t$  di Student è stato applicato in tutte le valutazioni sperimentali. Sono stati considerati significativi valori di  $p < 0,05$ .

## CAPITOLO 7: RISULTATI

### 7.1 VALUTAZIONE DELLA VITALITÀ CELLULARE

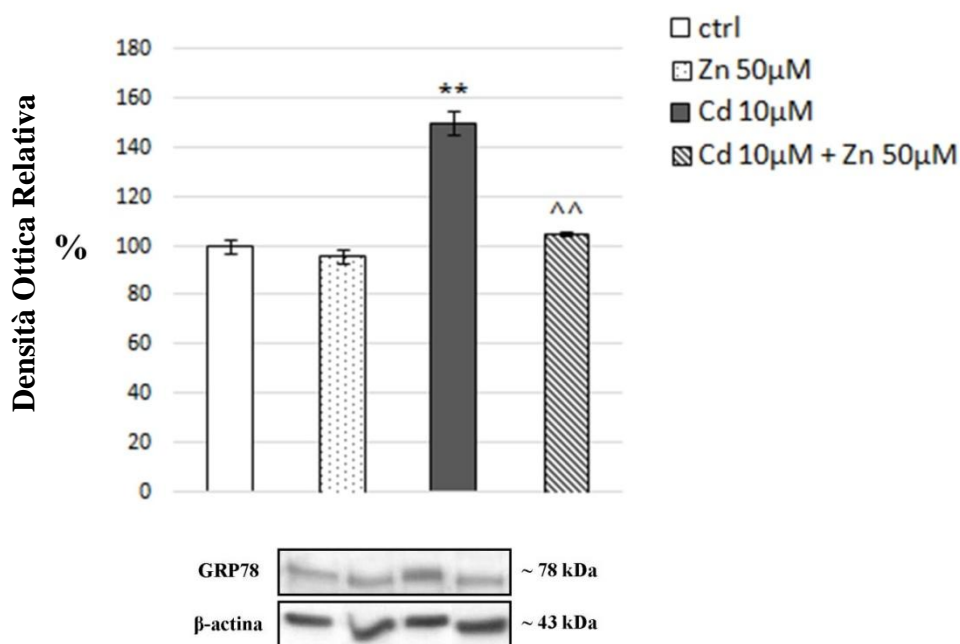
L'effetto dei microelementi sulla vitalità cellulare è stato valutato tramite saggio MTT. Cellule RBE4 sono state sottoposte a concentrazioni crescenti di CdCl<sub>2</sub> e di ZnCl<sub>2</sub>. Le analisi sono state condotte a 24 ore. Come mostrato in figura 5A, il trattamento con CdCl<sub>2</sub> ha determinato una riduzione dose-dipendente della vitalità cellulare rispetto al controllo. D'altra parte, lo ZnCl<sub>2</sub> ha mostrato i suoi effetti tossici solo a concentrazioni molto elevate (Figura 5B). Pertanto, sulla base dei presenti dati sperimentali, la concentrazione utilizzata al fine di mimare un danno sub-citotossico e cronico da Cd è stata di 10 μM; mentre, la concentrazione di Zn, non tossica, è stata stabilita a 50 μM. Il pre-trattamento con ZnCl<sub>2</sub>, 24 ore prima della stimolazione con CdCl<sub>2</sub>, conferma la sua efficacia nel mantenere la vitalità cellulare del nostro modello cellulare a valori paragonabili al controllo (Figura 5C).



**Figura 5. Valutazione della vitalità cellulare mediante saggio MTT.** A- Curva dose-risposta delle cellule RBE4 dopo esposizione a differenti concentrazioni di CdCl<sub>2</sub> per 24 ore. B- Curva dose-risposta delle cellule RBE4 dopo esposizione a differenti concentrazioni di ZnCl<sub>2</sub> per 24 ore. C- Analisi della vitalità cellulare in seguito a pre-trattamento con ZnCl<sub>2</sub> 50μM per 24 ore e trattamento con CdCl<sub>2</sub> 10μM per le successive 24 ore. I risultati sono espressi, in percentuale rispetto al controllo, come media ± SEM. \*p<0,05; \*\*p<0,01 vs Ctrl; ^^p<0,01 vs CdCl<sub>2</sub>.

## 7.2 ANALISI DELLO STRESS DEL RETICOLO ENDOPLASMATICO

Il reticolo endoplasmatico gioca un ruolo essenziale nell'omeostasi cellulare e l'induzione nell'espressione di GRP78 ne rappresenta un marcatore specifico di stress [408]. Come mostrato in figura 6, in seguito al trattamento con CdCl<sub>2</sub> 10 μM è stato osservato un aumento significativo dei livelli di espressione di GRP78. Tale effetto è stato neutralizzato dal pre-trattamento con ZnCl<sub>2</sub>.

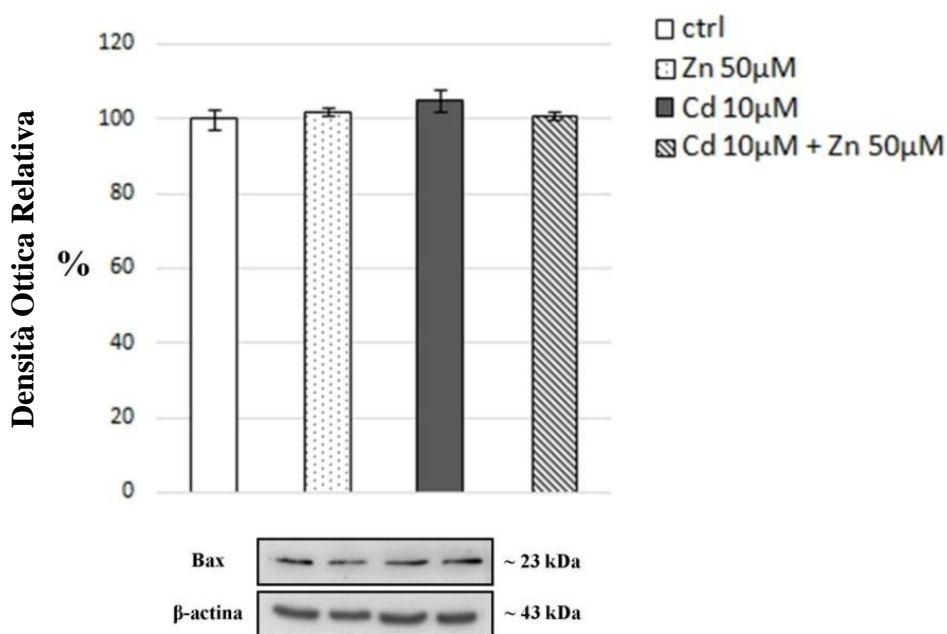


**Figura 6. Analisi dell'espressione di GRP78.** I risultati sono espressi, in percentuale rispetto al controllo, come media  $\pm$  SEM. \*\* $p < 0,01$  vs Ctrl; ^^ $p < 0,01$  vs CdCl<sub>2</sub>.

### 7.3 ANALISI DELLA CASCATA APOPTOTICA

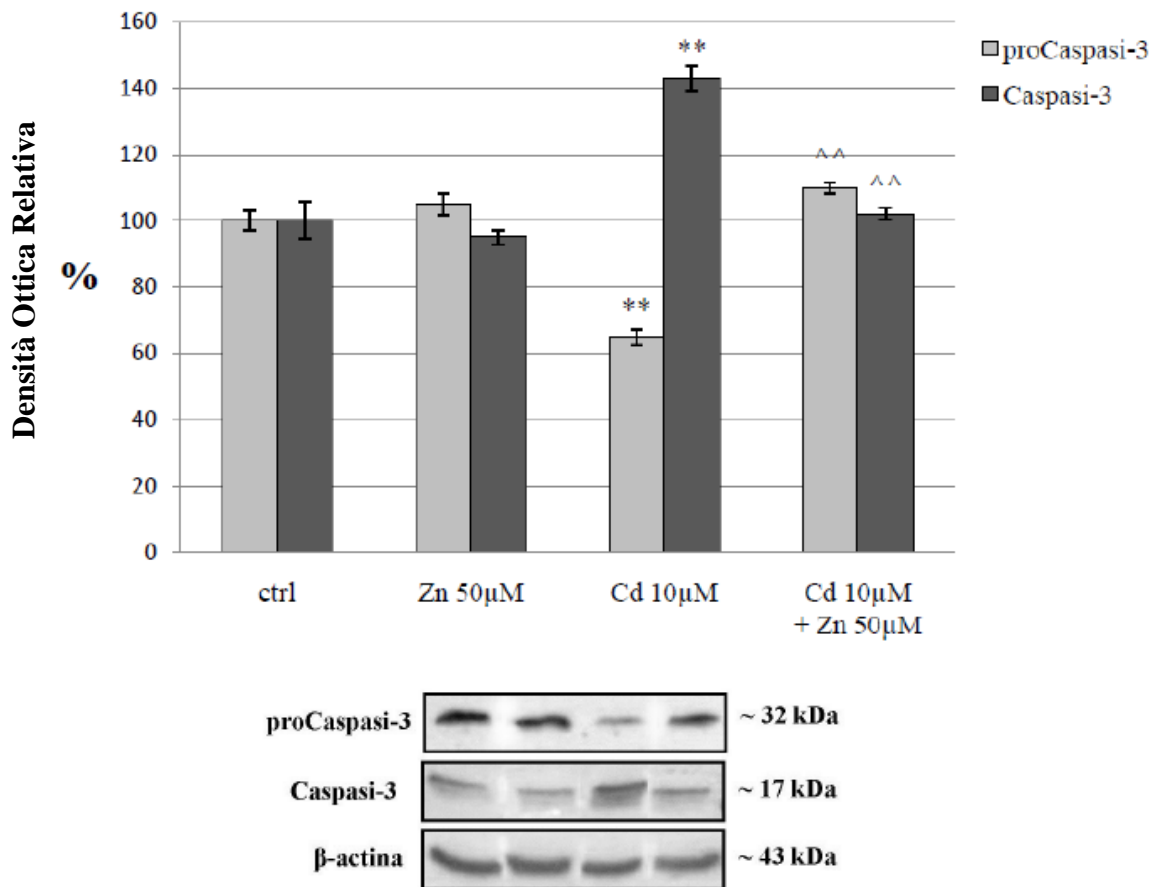
Considerando il reticolo endoplasmatico come nuovo punto focale nella regolazione dell'apoptosi [408], sono state valutate l'espressione di Bax, come mediatore pro-apoptotico coinvolto nel rilascio del citocromo c dai mitocondri, e l'attivazione della proCaspasi-3, una tra le caspasi effettrici responsabili, tra le altre funzioni, dell'induzione del programma di morte cellulare.

Il trattamento con CdCl<sub>2</sub> non determina un aumento significativo dei livelli di espressione di Bax (Figura 7), tuttavia, osserviamo la riduzione dei livelli della forma inattiva della Caspasi-3 e il conseguente aumento della sua forma clivata, attiva (Figura 8).



**Figura 7. Analisi dell'espressione della proteina pro-apoptotica Bax.** I risultati sono espressi, in percentuale rispetto al controllo, come media  $\pm$  SEM.

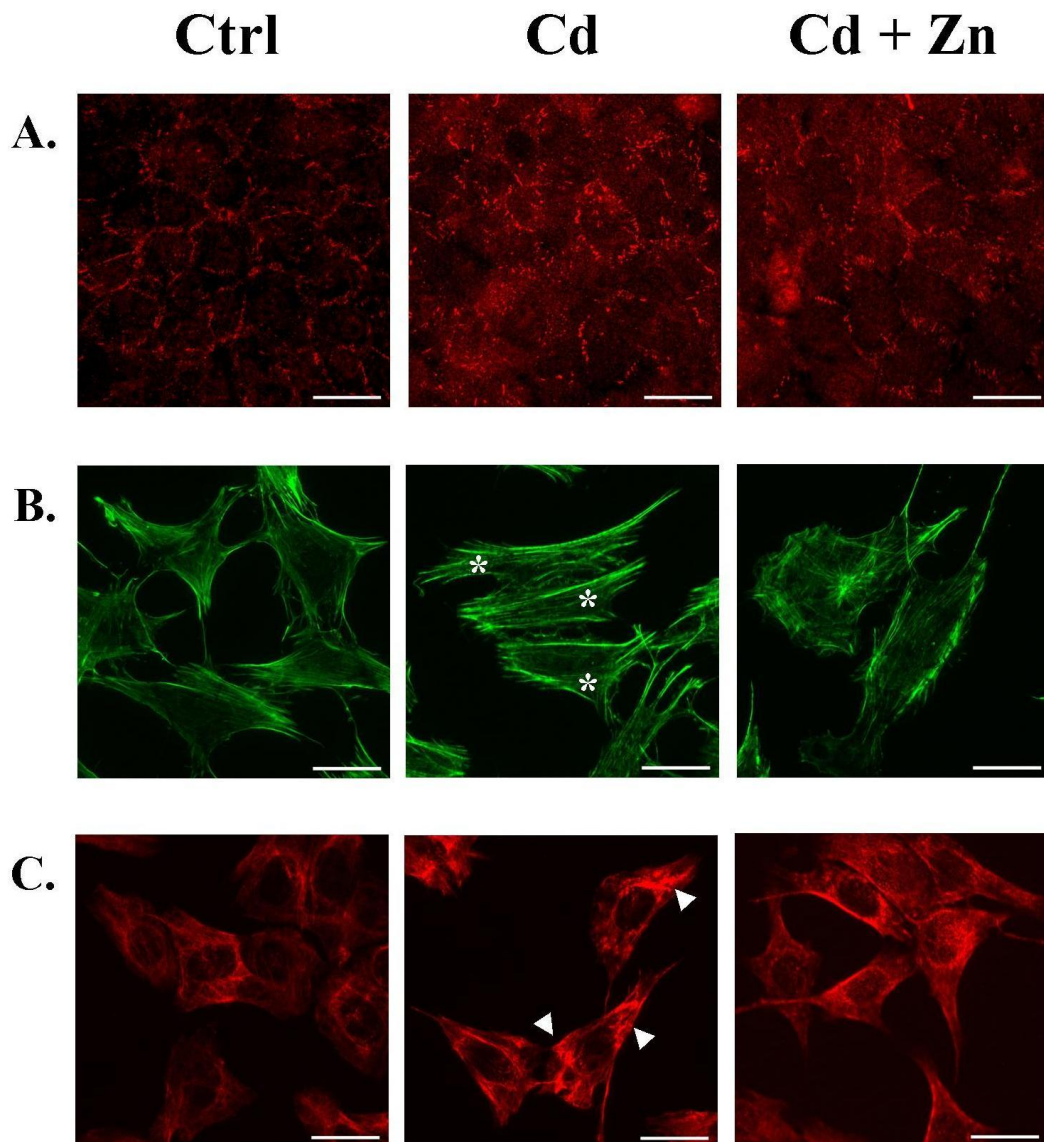
Sebbene i livelli di espressione di Bax continuino a rimanere inalterati, in presenza di ZnCl<sub>2</sub> predomina la forma inattiva della Caspasi-3 (Figura 8), confermando ulteriormente il suo ruolo protettivo contro l'induzione della cascata apoptotica.



**Figura 8.** Analisi dell'espressione della proCaspasi-3 e della proteina clivata Caspasi-3. I risultati sono espressi, in percentuale rispetto al controllo, come media  $\pm$  SEM. \*\* $p < 0,01$  vs Ctrl; ^^ $p < 0,01$  vs CdCl<sub>2</sub>.

#### 7.4 EFFETTI SUL CITOSCHELETRO E SU ZO-1

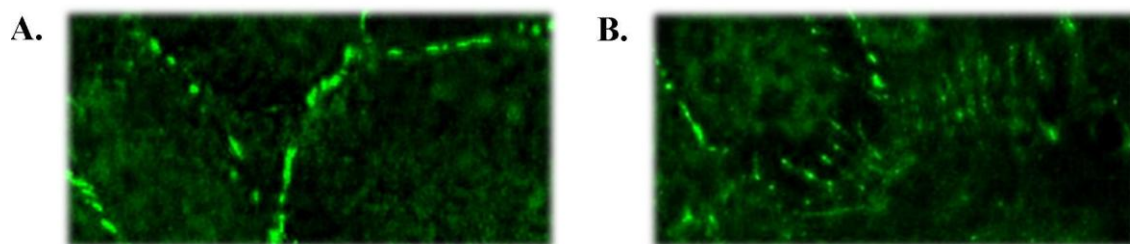
A livello morfologico, l'impatto complessivo del Cd su cellule RBE4 è stato determinato mediante immunofluorescenza per F-actina e vimentina, tra le componenti del citoscheletro, e per ZO-1, una delle principali proteine coinvolte nella formazione delle giunzioni occludenti (Figura 9).



**Figura 9. Valutazione delle alterazioni morfologiche in immunofluorescenza.** A- Localizzazione e distribuzione della proteina ZO-1. Alterazioni citoscheletriche della F-actina (B) e della vimentina (C). Ingrandimento totale 400 $\times$ . Scale bar: 25 $\mu$ m.

Nel gruppo di controllo, ZO-1 è localizzata ai margini cellulari formando un bordo continuo e puntiforme intorno alle singole cellule. In presenza del Cd, si osserva una

graduale transizione dell'immunocolorazione da strutture puntiformi (Figura 10A) a strutture a cerniera (Figura 10B), nonché un'alterata dislocazione della proteina.



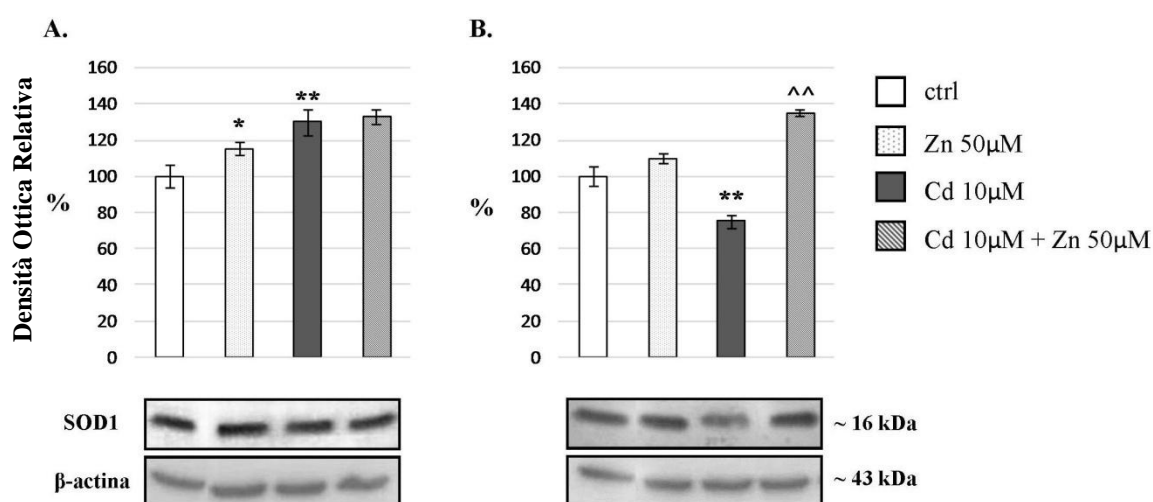
**Figura 10. Immagini rappresentative delle alterazioni a carico della proteina ZO-1.**

Inoltre, la formazione di aperture intercellulari nel monostrato cellulare ha fatto supporre un riarrangiamento citoscheletrico. La figura 9B mostra come la presenza di  $\text{CdCl}_2$  determini la formazione di fibre da stress della F-actina (contrassegnate con asterischi) che bandeggiano interamente la cellula anziché essere dislocate in periferia come nel controllo. Per quanto riguarda la vimentina (Figura 9C), mentre nel gruppo di controllo appare organizzata in sottili filamenti che dal nucleo si diramano lungo tutta la cellula, il  $\text{CdCl}_2$  ne determina la formazione di aggregati (contrassegnati con frecce).

Il pre-trattamento con  $\text{ZnCl}_2$  è in grado di proteggere parzialmente dalle alterazioni indotte dal  $\text{CdCl}_2$  sia a carico del citoscheletro che della localizzazione di ZO-1.

## 7.5 VALUTAZIONE DELLA RISPOSTA CELLULARE ANTIOSSIDANTE

Abbiamo successivamente ipotizzato che i danni precedentemente descritti potessero essere dovuti non solo ad un aumento delle specie reattive dell'ossigeno ma anche ad una riduzione delle difese antiossidanti cellulari. Al fine di testare tale ipotesi, sono stati valutati i livelli di espressione della superossido dismutasi 1 (SOD1) (Figura 11). Come evidenziato mediante Western blot, sebbene nelle prime 8 ore osserviamo un aumento dell'espressione di SOD1, il trattamento con CdCl<sub>2</sub> 10 μM nelle 24 ore ne determina una riduzione, facendo supporre che il peggioramento dell'omeostasi cellulare sia dovuto all'indebolimento delle difese antiossidanti della cellula. D'altronde, lo ZnCl<sub>2</sub> è capace di innalzarne i livelli confermandone l'effetto citoprotettivo.

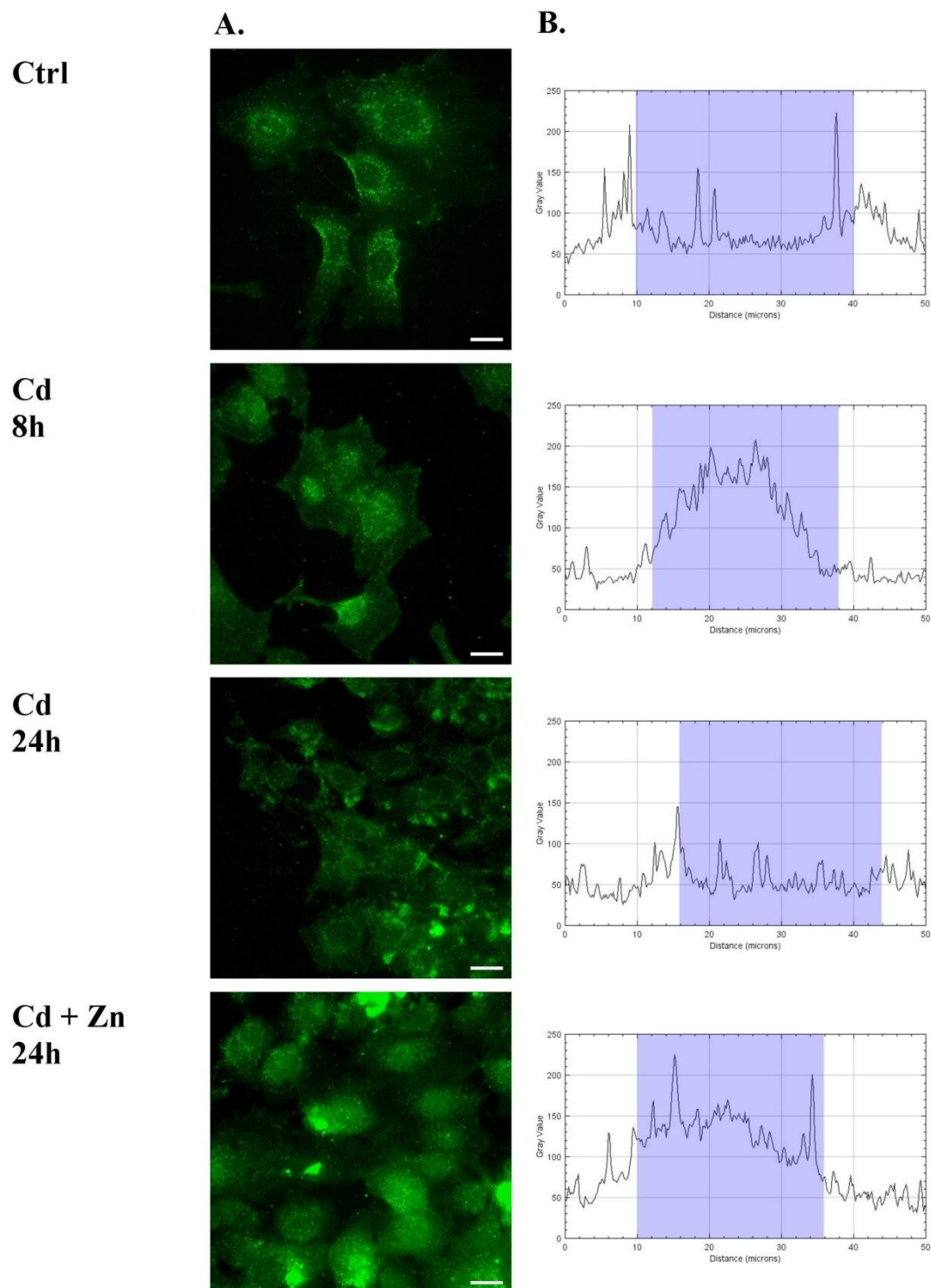


**Figura 11.** Analisi dell'espressione di SOD1 ad 8 ore (A) e 24 ore (B) di trattamento. I risultati sono espressi, in percentuale rispetto al controllo, come media ± SEM. \*p<0,05; \*\*p<0,01 vs Ctrl; ^^p<0,01 vs CdCl<sub>2</sub>.

Ad ulteriore conferma di tale dato, è stata valutata la dislocazione di Nrf2, un fattore di trascrizione che regola l'espressione genica di una varietà di enzimi citoprotettivi antiossidanti, tra cui la famiglia delle superossido dismutasi, posti sotto il controllo del promotore ARE (antioxidant response element, elemento di risposta antiossidante). Come mostrato in immunofluorescenza (Figura 12), mentre nel gruppo di controllo il segnale risulta essere perinucleare, in seguito al trattamento con CdCl<sub>2</sub> per 8 ore, si osserva la completa traslocazione della proteina nel nucleo, facendo ipotizzare per una



trascrizione attiva dei geni ARE. Dopo 24 ore di trattamento, Nrf2 torna ad essere prevalentemente citoplasmatico. Tale situazione viene ulteriormente ribaltata in presenza di ZnCl<sub>2</sub>, confermando il risultato ottenuto in precedenza.



**Figura 12. Localizzazione subcellulare di Nrf2 in seguito ai vari trattamenti.** A- Immagini rappresentative della localizzazione subcellulare di Nrf2 ottenute in immunofluorescenza. B- Rappresentazione grafica dell'intensità del segnale su singola cellula. L'area occupata dal nucleo è marcata in azzurro. Ingrandimento totale 400×. Scale bar: 25µm.

## 7.6 ANALISI DELL'EFFETTO DEL CADMIO IN CO-COLTURA

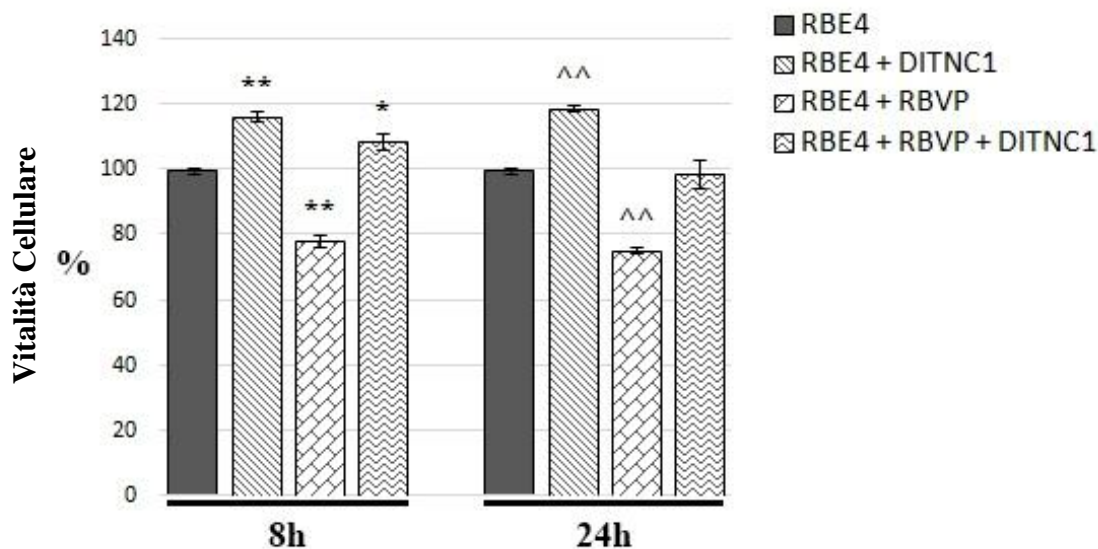
L'utilizzo della sola linea di cellule endoteliali cerebrali RBE4, come modello semplice di BBB, ci ha permesso di comprendere alcune delle vie intracellulari che vengono attivate in seguito all'esposizione a Cd. Al fine di poter confermare i pattern di attivazione in un modello di BBB più complesso che imiti al meglio le caratteristiche anatomiche della BBB, è stato messo a punto un sistema di co-culture con cellule endoteliali RBE4, astrociti DI TNC1 e periciti RBVP, così come precedentemente descritto nella sezione "Materiali e metodi".

È stato innanzitutto valutato se vi fossero differenze della vitalità cellulare quando cellule RBE4 fossero coltivate in presenza degli astrociti e/o dei periciti. Dall'analisi degli MTT effettuati abbiamo riscontrato una riduzione della vitalità probabilmente associata, come poi confermato negli esperimenti susseguenti, ad una maggiore resistenza da parte delle stesse cellule. In presenza dello stimolo tossico, siamo andati a valutare la vitalità delle cellule RBE4 in co-cultura (Figura 13). Sulla base dei risultati ottenuti dai saggi MTT, differenze nella vitalità sono state riscontrate sia riguardo alla durata di esposizione al CdCl<sub>2</sub> (8 e 24 ore) che alla presenza del tipo cellulare (RBE4 in co-cultura con DI TNC1 o in co-cultura con RBVP o in co-cultura con entrambi i tipi cellulari).

Nello specifico, in confronto alle mono-culture, le cellule RBE4 mostrano una maggiore protezione da CdCl<sub>2</sub> 10 µM quando sono in co-cultura con la linea cellulare astrocitaria DI TNC1. Tale dato è stato confermato sia a 8 ore, con un aumento della vitalità dal 78% al 90%, che a 24 ore di trattamento con CdCl<sub>2</sub>, con un aumento della vitalità dal 65% al 77%.

La situazione risulta completamente opposta quando le cellule endoteliali cerebrali sono in co-cultura con i periciti, mostrando una minore vitalità in seguito al trattamento con CdCl<sub>2</sub>.

Un risultato intermedio è stato osservato in tri-coltura, anche se il maggiore effetto protettivo si osserva ad 8 ore dal trattamento; mentre, a 24 ore i valori sono paragonabili a quelli delle RBE4 monocoltivate.



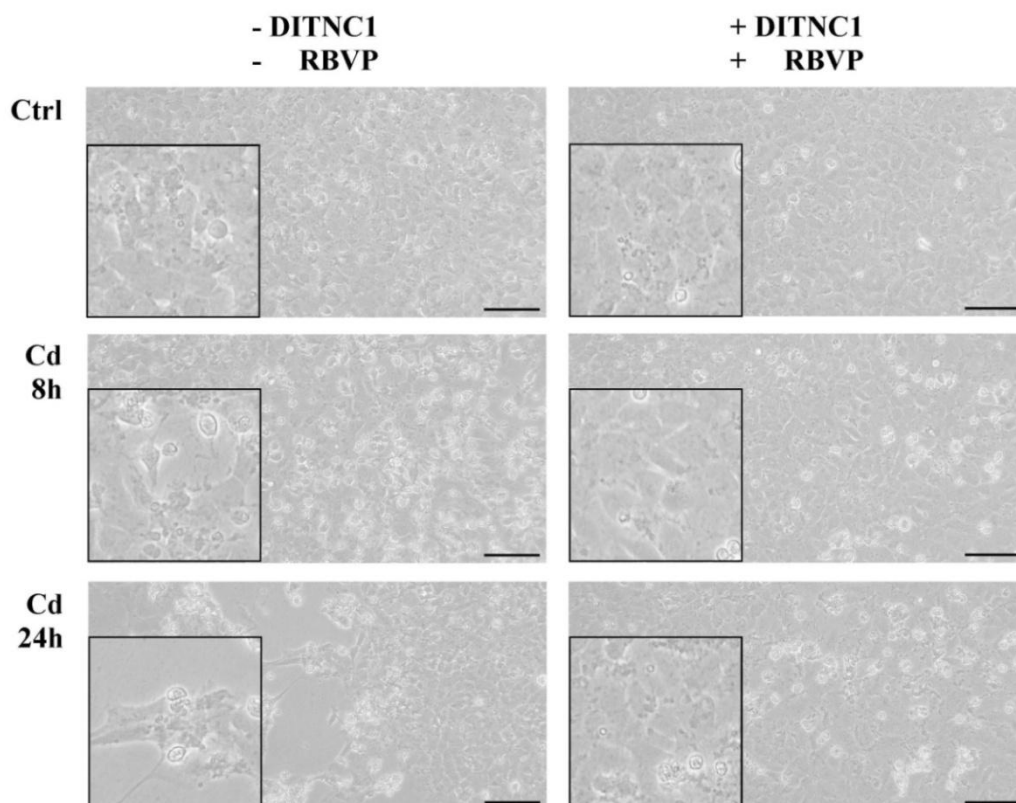
**Figura 13. Valutazione della vitalità cellulare mediante saggio MTT delle cellule RBE4 in co-coltura in seguito al trattamento con CdCl<sub>2</sub> 10μM per 8 e 24 ore.** I risultati sono espressi, in percentuale rispetto alle monoculture, come media ± SEM. \*p<0,05; \*\*p<0,01 vs RBE4\_8h; ^^p<0,01 vs RBE4\_24h.

In Figura 14, si può osservare come le cellule RBE4 in co-coltura tollerino maggiormente il Cd rispetto alle monoculture. Come valutato in microscopia a contrasto di fase, la morfologia delle cellule RBE4 in co-coltura era meno influenzata dal Cd, rispetto alle RBE4 monocoltivate dopo 8 e 24 ore.

Le cellule di controllo RBE4, sia in monocultura che in co-coltura, mostrano una forma poligonale necessaria alla formazione di un monostrato cellulare continuo.

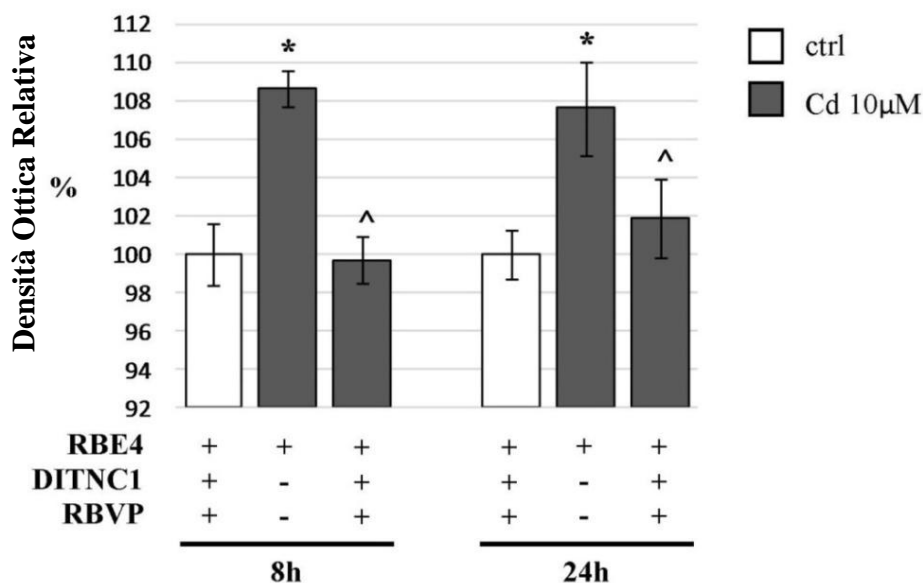
D'altra parte, le cellule RBE4 trattate con Cd in condizioni di monocultura si presentano con marcate alterazioni morfologiche: cellule di forma poligonale ma con prevalenza di una morfologia allungata, riduzione della densità cellulare, con cellule che crescono più diffuse nella piastra e con un maggior numero di cellule che si distaccano dal substrato.

Nelle cellule RBE4 in co-coltura osserviamo una lieve riduzione della densità cellulare con preservazione della continuità del monostrato cellulare, senza evidenti alterazioni morfologiche.



**Figura 14. Micrografie di cellule RBE4 in monocoltura e in co-coltura.** Ingrandimento totale 100×. Scale bar: 50µm.

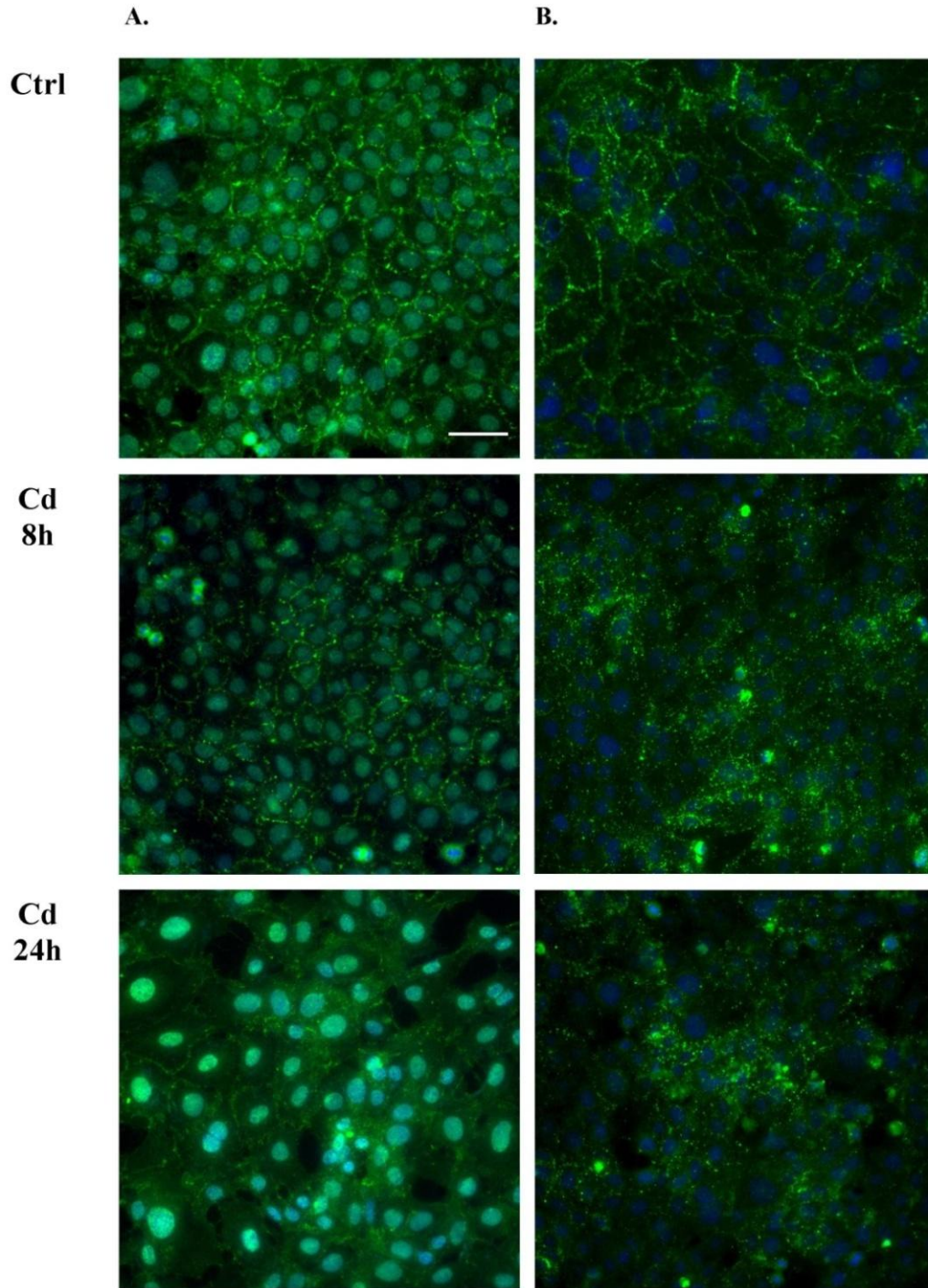
L'analisi delle proteine carbonilate, come misura dello stress ossidativo indotto dal Cd, conferma ulteriormente tale dato. Infatti, in figura 15 è mostrato come la frazione delle proteine ossidate aumenti di circa il 10% rispetto al controllo e come gli estratti proteici ottenuti dalle RBE4 in co-coltura presentino una bassa percentuale delle stesse.



**Figura 15. Analisi delle proteine carbonilate in cellule RBE4 in mono- e in co-coltura.** I risultati sono espressi, in percentuale rispetto al controllo, come media  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$  vs Ctrl; ^ $p < 0,05$  vs monoculture.

Insieme a ZO-1, claudina-5 e occludina rappresentano altre due importanti componenti nella formazione delle giunzioni occludenti. Difatti, come mostrato in figura 16, è stato possibile determinare in immunofluorescenza la presenza di claudina-5, correttamente localizzata ai margini cellulari, solo quando le cellule RBE4 erano in co-coltura. In contrasto, l'occludina risultava essere prevalentemente citoplasmatica anche se è stato possibile osservarne una debole localizzazione periferica in tri-coltura.

Complessivamente, i risultati hanno ampiamente confermato che gli effetti del Cd erano significativamente attenuati nel modello di co-coltura rispetto alle monoculture.



**Figura 16. Localizzazione e distribuzione delle proteine ZO-1 (A) e claudina-5 (B) in cellule RBE4 in co-coltura. Ingrandimento totale 400×. Scale bar: 50µm.**

## CAPITOLO 8: DISCUSSIONE

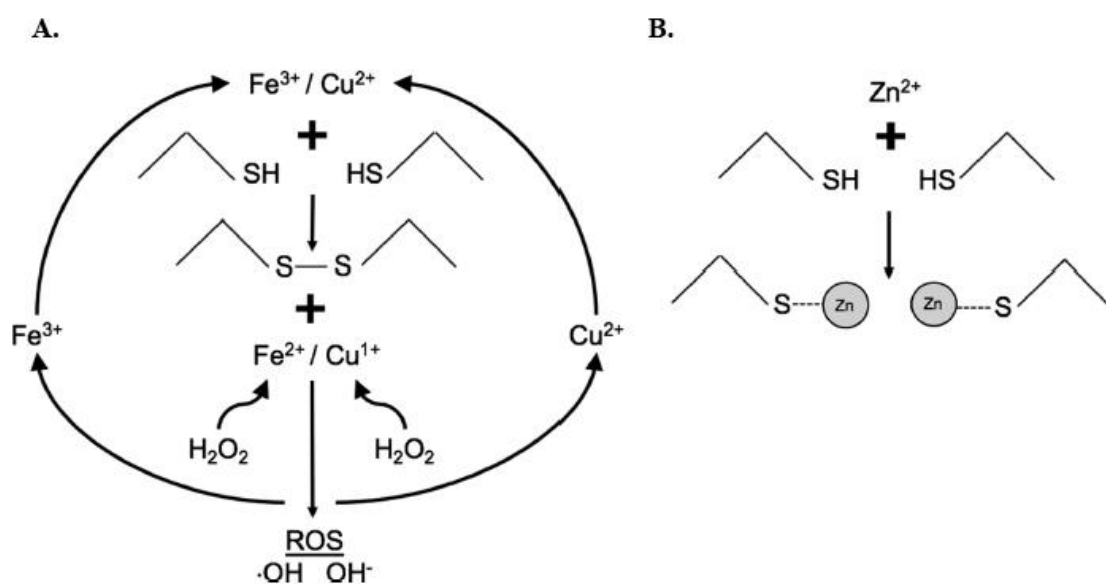
Il cadmio (Cd) è un metallo di transizione ampiamente utilizzato nella placcatura dei metalli come anticorrosivo e nella produzione di accumulatori, leghe, stabilizzanti e pigmenti. L'uomo e le specie animali entrano in contatto con il Cd attraverso acqua, aria e cibi contaminati, principalmente a causa delle emissioni industriali. In concerto con altri inquinanti ambientali, l'esposizione al Cd può provocare effetti estremamente dannosi per la salute tra cui nefrotossicità, epatotossicità [409], tossicità cardiovascolare [410], tossicità riproduttiva [411], immunotossicità [412] e neurotossicità [413, 414].

Il meccanismo di tossicità di questo xenobiotico è multidirezionale. Gli ioni  $Cd^{2+}$  sono caratterizzati da un'elevata affinità per le strutture biologiche contenenti gruppi sulfidrilici, amminici, carbossilici, imidazolici alterando la loro funzione [62, 409, 415]. Questo xenobiotico può anche interferire con bioelementi essenziali come zinco, magnesio, selenio, calcio e ferro, con conseguente alterazione della loro omeostasi e delle loro funzioni biologiche [51, 55, 57, 58, 60, 416, 417].

Uno dei principali meccanismi attraverso il quale il Cd esercita la sua azione tossica è lo stress ossidativo [64, 415, 417-419]. Sebbene questo metallo non possa indurre la produzione diretta delle specie reattive dell'ossigeno e di radicali liberi, è in grado di stimolarne indirettamente la loro produzione, indebolendo i meccanismi antiossidanti cellulari sia di tipo enzimatico che non enzimatico [409, 415, 419, 420].

L'accumulo di radicali idrossilici liberi è catalizzato da un ciclo redox, noto come chimica di Fenton, in cui sono coinvolti perossidi e metalli di transizione (ferro e rame) [421-423]. Altri ioni metallici redox-attivi sono cromo, cobalto, vanadio, manganese e nichel [424].

L'ossidazione di una molecola riducente, come la cisteina, da parte di ioni  $\text{Cu}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$  liberi causa la formazione di legami disolfuro provocando una perdita nello stato di ossidazione degli ioni (Figura 17). La successiva decomposizione del perossido di idrogeno da parte degli ioni  $\text{Cu}^{1+}/\text{Fe}^{2+}$  induce la formazione di radicali idrossilici liberi. Inoltre, lo stato di ossidazione rigenerato a  $\text{Cu}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$  consente agli ioni di partecipare continuamente al meccanismo di Fenton.



**Figura 17. Rappresentazione grafica dei meccanismi di Fenton.** A- I metalli di transizione redox-attivi catalizzano la formazione del legame disolfuro e successivamente inducono la formazione di ROS tramite la reazione di Fenton. B- Lo zinco stabilizza i residui sulfidrilici liberi, inibendo la formazione di ROS.

In tale contesto, il Cd può interferire con l'omeostasi dei metalli redox-attivi o spiazzarli dai loro siti di deposito, dando così origine a tale ciclo di reazioni. Di conseguenza, il risultante stress ossidativo provoca il danneggiamento di macromolecole chiave (proteine, DNA e lipidi), organelli intracellulari e membrane cellulari [64, 415, 425]. Anche a basse dosi, il SNC è più suscettibile allo stress ossidativo indotto da Cd rispetto a reni, fegato, milza e testicoli [426], a causa della sua elevata sensibilità alla perossidazione lipidica [427]. È stato inoltre dimostrato che l'esposizione orale



subcronica al Cd causa un aumento dei livelli di malondialdeide, correlato alla generazione eccessiva di radicali liberi e sottoprodotti della lipoperossidazione [428].

Pertanto, nonostante la presenza della BBB, il SNC è soggetto alla tossicità da Cd, inducendo disfunzioni neurologiche nell'uomo [429] e in modelli animali [430].

Il Cd tende ad accumularsi a livello dei plessi corioidei a concentrazioni molto maggiori di quelle trovate nel liquido cerebrospinale (CSF) e nei tessuti cerebrali. Uno studio *post mortem* sull'uomo ha rivelato che la concentrazione di Cd nei plessi corioidei era di circa 2-3 volte superiore a quella riscontrata nella corteccia cerebrale [125]. Il Cd può danneggiare direttamente l'ultrastruttura dei plessi corioidei aumentando la permeabilità della BBB nel ratto; inoltre, a causa della minore integrità della BBB, esso risulta essere più tossico per i ratti neonati e giovani rispetto ai ratti adulti [431]. Sebbene sia ampiamente riconosciuto l'effetto del Cd sul SNC, i meccanismi molecolari che soggiacciono all'aumentata permeabilità della BBB indotta dal Cd non sono stati ancora del tutto chiariti [403].

Conformemente a studi effettuati su altre linee cellulari [432-435], i nostri risultati hanno rivelato che 10  $\mu\text{M}$  di  $\text{CdCl}_2$  inducono un'alterazione del pattern di localizzazione della proteina ZO-1 così come delle proteine del citoscheletro F-actina e vimentina, in cellule endoteliali RBE4, indicando che le TJ e le proteine a loro associate sono annoverabili tra i bersagli primari del Cd.

Lo stress ossidativo è una componente importante nel processo lesivo indotto dal Cd [64]. Nello specifico, il Cd esercita un effetto opposto a seconda dell'esposizione acuta o cronica. L'esposizione cronica al Cd induce alti livelli di ROS e contribuisce all'acquisizione di tolleranza al metallo, come parte di un meccanismo di difesa per combattere i danni indotti dal Cd, tra cui resistenza all'apoptosi [436], maggiore capacità di invasione, de-differenziazione e proprietà di autorinnovamento [93]. La nostra

osservazione del mancato aumento dell'espressione della proteina effettrice pro-apoptotica Bax ha ulteriormente rafforzato questo risultato.

Mentre è ormai assodato che il ER svolge un ruolo essenziale nell'omeostasi cellulare, scoperte recenti indicano il ER come un sito di convergenza di molecole sia pro- che anti-apoptotiche, rappresentando un punto focale per la regolazione dell'apoptosi [437, 438]. Per sopravvivere in condizioni di stress del ER, viene attivata la risposta UPR (unfolded protein response) che spegne la traduzione generale delle proteine inducendo selettivamente l'espressione di proteine chaperone come GRP78, interferendo con l'attivazione delle caspasi [439, 440]. Quindi, l'induzione di GRP78 in condizioni patologiche può rappresentare un importante meccanismo di protezione cellulare per la sopravvivenza allo stress del ER [441]. Abbiamo osservato che in seguito all'esposizione a CdCl<sub>2</sub>, GRP78 era altamente sovraespresso, in accordo con il ruolo citoprotettivo di questo chaperone [442], supportando il ruolo dello stress del ER come tentativo di mantenere l'omeostasi cellulare [443].

Sebbene l'attivazione della Caspasi-3 sia considerata un evento specifico dell'apoptosi, esistono studi che suggeriscono il suo ruolo protettivo [444]. In accordo con questa visione, abbiamo osservato l'attivazione Cd-dipendente della Caspasi-3 nelle cellule RBE4 in assenza di un'attivazione parallela della cascata di segnalazione apoptotica, come aumento dei livelli di espressione della proteina Bax.

Diversi studi hanno indagato i possibili effetti neuroprotettivi di differenti sostanze naturali sul danno cerebrale ossidativo indotto dal Cd come melatonina [445], quercetina [446], acido ferulico [447], genisteina [414], proantocianidine [413], epigallocatechina gallato [448], disolfuro di diallile [449],  $\alpha$ -tocoferolo [450] e  $\beta$ -carotene [451].

Tra questi, lo Zn, oltre a competere con il Cd per gli stessi trasportatori, come ZIP7, ZIP8 e ZIP14 [452-454], ostacolandone l'ingresso nella cellula, funge anche da

antiossidante molto potente [455]. Essendo un importante cofattore per oltre 300 diversi enzimi e fattori di trascrizione, concentrazioni sufficienti di Zn sono necessarie per il corretto funzionamento del metabolismo cellulare [456].

Per quanto riguarda le sue proprietà antiossidanti, tra i diversi meccanismi proposti, lo Zn ha un'alta affinità per stabilizzare e proteggere i gruppi sulfidrilici delle cisteine dall'ossidazione e dalla successiva formazione di ROS [457], inibendo il meccanismo di Fenton [458, 459]. Dai nostri primi risultati, non è stato sorprendente osservare che lo Zn sia in grado di contrastare la riduzione della vitalità cellulare indotta dal Cd, confermato anche da uno stress del ER ridotto.

Sulla base dei dati precedenti, abbiamo spostato la nostra attenzione sull'attivazione della cascata apoptotica. Le sequenze apoptotiche possono avvenire tramite la via estrinseca o intrinseca. Entrambe le vie implicano l'attivazione della Caspasi-3 per avviare il percorso di morte cellulare programmata [460]. Nello specifico, sono stati valutati i livelli di espressione della Caspasi-3 nella sua forma inattiva (proCaspasi-3) ed attivata in seguito ai vari trattamenti. Osserviamo come in presenza di Cd è maggiormente espressa la forma clivata (quindi attiva) mentre in presenza di Zn predomina la forma inattiva, confermando il ruolo protettivo dello Zn contro l'attivazione della via apoptotica indotta dal Cd.

Questo risultato è supportato dal fatto che lo Zn è un noto regolatore dell'apoptosi nelle cellule dei mammiferi attraverso una serie di meccanismi e percorsi diversi. La disponibilità di Zn ha dimostrato di influenzare e inibire l'apoptosi in varie cellule tumorali [461]. Ad esempio, in timociti di topo, induzione/soppressione dell'apoptosi mediante solfato di zinco era dose-dipendente [462]: basse concentrazioni di Zn (7,5-15  $\mu\text{M}$ ) inducevano l'apoptosi, mentre una integrazione di Zn più significativa (75-600  $\mu\text{M}$ ) la sopprimeva. Inoltre, i meccanismi di apoptosi indotti dal Cd sono frequentemente

legati alla sovrapproduzione di ROS, con conseguente stress ossidativo cellulare, rilascio di citocromo c dai mitocondri [463-465] e attivazione della via intrinseca dell'apoptosi [466].

La fuoriuscita del citocromo c attraverso la membrana mitocondriale esterna è favorita dall'aumentata espressione della proteina Bax [467]. La successiva formazione dell'apoptosoma attiva la Caspasi-9 e avvia il percorso di morte cellulare [460]. Oltre al fatto che i livelli di espressione di Bax risultano essere più bassi in presenza di Zn rispetto al solo trattamento con Cd, come evidenziato nel nostro studio, lo Zn sembrerebbe regolare sia l'attività della Caspasi-9 [468] che della Caspasi-3 [469, 470]. Sebbene i meccanismi specifici rimangono poco chiari, è possibile che lo Zn protegga i gruppi tiolici delle caspasi dall'ossidazione prodotta tramite le reazioni di Fenton [459, 468].

D'altra parte, quando le cellule endoteliali sono pretrattate con  $\text{ZnCl}_2$  50  $\mu\text{M}$  per 24 ore, lo Zn è in grado di riattivare l'espressione di SOD1, contrastando l'azione di radicali liberi e perossidi prima che possano infliggere danni alle macromolecole. Difatti, deficit di espressione o della sua funzione sono correlati a disturbi neurologici [471].

Coerentemente con questo, il trattamento prolungato con Cd (24 ore), ma non quello ad 8 ore, ha dimostrato di sopprimere l'espressione di enzimi coinvolti nel metabolismo dei ROS, tra cui SOD1. Tale dato è supportato anche da esperimenti *in vivo* dove l'incremento di LPO nel tessuto cerebrale è una conseguenza di un indebolimento indiretto delle difese antiossidanti negli animali trattati con Cd [413, 446]; in seguito all'esposizione da Cd, è stata osservata una riduzione delle molecole antiossidanti cellulari non-enzimatiche, come il glutatione (GSH), ed enzimatiche, come le superossido dismutasi (SOD), la catalasi (CAT), la glutatione perossidasi (GPx) e la glutatione reduttasi (GR) [472, 473]. Pertanto, l'esaurimento della difesa antiossidante e

il successivo incremento della perossidazione lipidica può aggravare il danno ossidativo cerebrale.

Il fattore di trascrizione nucleare correlato al fattore eritroide 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2) è il principale dei sistemi citoprotettivi di risposta allo stress ossidativo [474]. Tale fattore di trascrizione riconosce l'elemento di risposta antiossidante (ARE) e regola l'espressione degli enzimi antiossidanti [475]. Il fattore di trascrizione Nrf2 è attivato quando trasloca nel nucleo, eterodimerizza con piccole proteine Maf e quindi si lega alla sequenza ARE [476], una via segnalatoria nota come meccanismo canonico di attivazione di Nrf2 [477].

Pertanto, mentre a 8 ore Nrf2 era prevalentemente nucleare facendo ipotizzare per una attiva trascrizione dei geni antiossidanti, confermato con l'aumentata espressione di SOD1, dopo 24 ore di esposizione al Cd, l'espressione di Nrf2 nel nucleo era ridotta, indicativo della sua inibizione, come confermato dalla ridotta espressione di SOD1. Tale dato è ulteriormente supportato dal fatto che l'intossicazione subcronica da Cd determina:

- l'espressione ridotta dell'mRNA di Nrf2, che a sua volta sottoregola i livelli trascrizionali del gene antiossidante SOD1 [478]. D'altronde, l'integrazione con Zn determina l'aumento dei livelli di mRNA di Nrf2 e, conseguentemente, dei geni antiossidanti da esso regolati [479];
- l'aumentata trascrizione genica di Keap1, un sensore dello stress ossidativo, che regola negativamente e sequestra Nrf2 nel citoplasma, rendendolo incapace di attivare il pathway ARE [480-482];
- la ridotta espressione di metallotioneine con conseguente aumento della frazione di Cd libera [428].

Ipotizziamo che alla base della via di segnalazione fin qui descritta possa essere coinvolto GSK-3. La serina/treonina chinasi GSK-3 è una molecola di segnalazione conservata con ruoli essenziali in diversi processi biologici. Nei mammiferi, GSK-3 è espresso in due forme: GSK-3 $\alpha$  e GSK-3 $\beta$ . L'esistenza di due isoenzimi sembra essere legata all'evoluzione dei vertebrati, probabilmente allo sviluppo di sistemi altamente ordinati come il SNC. Studi recenti hanno individuato alcune differenze fisiologiche tra i due isoenzimi nelle funzioni correlate allo sviluppo embrionale, alla struttura cerebrale e al comportamento; sebbene altri studi abbiano chiaramente dimostrato una funzione ridondante per i due isoenzimi [483-491].

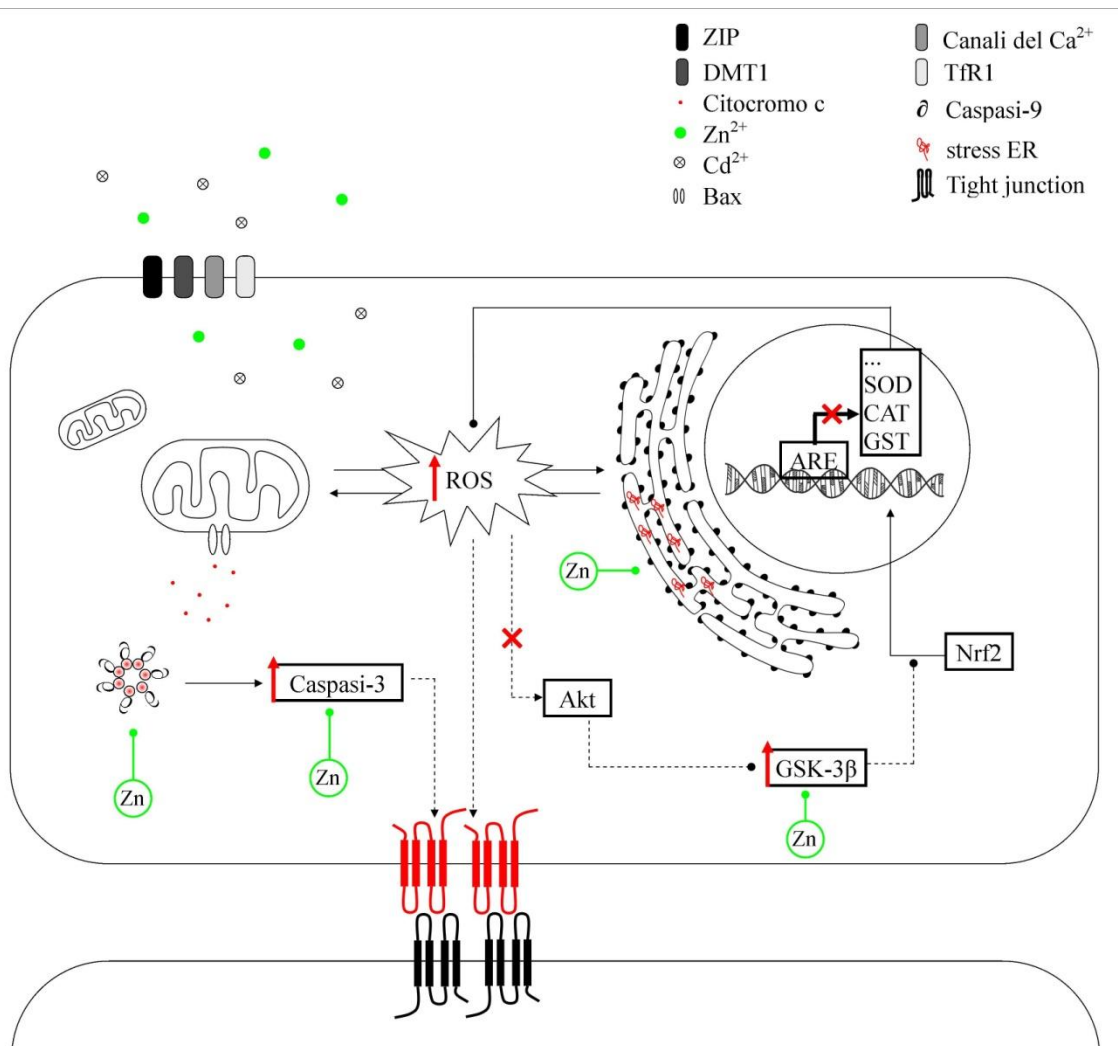
Nei neuroni, GSK-3 è intimamente coinvolto nel controllo dell'apoptosi, della plasticità sinaptica, della formazione degli assoni e della neurogenesi [492-498]. Gli studi *in vivo* indicano che l'eccessiva attività di GSK-3, a causa di un aumento della sua espressione o di uno sbilanciamento dello stato di fosforilazione verso uno stato enzimatico iperattivo, provoca effetti avversi. Animali transgenici che sovraesprimono GSK-3 mostrano alterazioni nelle dimensioni dell'encefalo, compromissione del potenziamento a lungo termine della trasmissione sinaptica e deficit nell'apprendimento e nella memoria [499-501]. Questi animali hanno anche caratteristiche tipiche della malattia di Alzheimer, come iperfosforilazione della proteina tau e produzione potenziata del peptide A $\beta$  [502-504]. Infine, è stata segnalata una regolazione anormale dell'attività di GSK-3 in pazienti con malattia di Alzheimer [505, 506], sclerosi laterale amiotrofica [507], depressione maggiore [508, 509], schizofrenia [510, 511] e disturbo bipolare [512].

Sebbene il catione litio sia stato il primo inibitore "naturale" di GSK-3 ad essere scoperto [513, 514], altri metalli come berillio, zinco, mercurio e rame sono inibitori di GSK-3 [515-517], più potenti rispetto al litio (IC<sub>50</sub> nell'intervallo di concentrazione micromolare vs IC<sub>50</sub> del litio che è nell'ordine di concentrazione millimolare).

Di particolare interesse è l'oligoelemento Zn, che a differenza del litio e altri ioni metallici, si trova naturalmente nei tessuti corporei. Degno di nota è il fatto che bassi livelli di Zn siano correlati a disturbo depressivo maggiore e compromissione delle funzioni mentali. In modelli animali, la carenza di Zn provoca un aumento dei comportamenti simil-depressivi e dell'ansia [518, 519], e il trattamento con lo Zn produce un'attività antidepressiva. L'ipozinchemia viene spesso rilevata in pazienti con depressione maggiore e l'integrazione alimentare di Zn migliora i sintomi della depressione [510, 521]. Quindi, l'attività terapeutica dello Zn sul comportamento e su altri sintomi cognitivi è mediata dalla sua capacità di inibire GSK-3.

Un ulteriore studio, a conferma di quanto esposto, analizza l'effetto dello stress ossidativo indotto da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in cellule di neuroblastoma, sulla regolazione di Akt e GSK-3 $\beta$  e sulla localizzazione subcellulare di Nrf2 [522]. Coerentemente con l'osservazione generalizzata che il pathway di sopravvivenza PI3K/Akt è attivato in risposta agli ossidanti esterni [523, 524], lo studio identifica un'attivazione a breve termine di Akt, inibizione di GSK-3 $\beta$  e la conseguente redistribuzione parallela di Nrf2 verso il nucleo. Tuttavia, l'effetto a lungo termine indotto da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> era di down-regolare Akt e attivare GSK-3 $\beta$  insieme alla rilocalizzazione di Nrf2 nel citosol, limitando la risposta cellulare antiossidante.

Pertanto, GSK-3 $\beta$  viene identificata come la principale proteina responsabile per mantenere Nrf2 nel citoplasma, fornendo un meccanismo utile a spiegare la perdita di tolleranza agli ossidanti che si verifica in condizioni di persistente esposizione agli ossidanti come osservato in diverse neuropatologie [525, 526].



**Figura 18. Rappresentazione schematica dei pathway molecolari attivati in seguito al trattamento con Cd e possibili meccanismi di interferenza dello Zn.**

La BBB ha un ruolo fondamentale nel mantenere l'omeostasi del SNC e della normale funzione cerebrale. Studi recenti hanno messo in evidenza che le disfunzioni a carico della BBB sono fortemente implicate in numerose malattie neurodegenerative come morbo di Parkinson [527] e di Alzheimer [528-531], demenza [530], epilessia [532], autismo, sclerosi multipla [533], in molti disordini neurologici associati tra cui ictus [534], trauma cranico [535], edema cerebrale [536], AIDS [537], tumori cerebrali [538], processi infettivi o infiammatori [539], dolore [540], glaucoma [541], anoressia [542], obesità [543], emicrania [544] e ipertensione [545], nonché in disturbi psichiatrici [546] come depressione [547], schizofrenia [548] e deficit cognitivi [549].



Strutturalmente, la BBB è composta da diversi tipi cellulari tra cui cellule endoteliali, periciti, astrociti, neuroni e microglia che ne costituiscono l'unità neurovascolare grazie alla cui complessa e integrata struttura ne assicura le sue funzioni [550, 551].

Pertanto, gli effetti neurotossici del Cd sulle RBE4 sono stati valutati anche in co-coltura per determinare se questi effetti potessero essere modulati o mitigati in presenza degli altri tipi cellulari, ovvero astrociti DI TNC1 e periciti RBVP.

I dati sono stati confrontati con quelli ottenuti da monoculture valutando la funzione mitocondriale e la morfologia cellulare. I risultati hanno mostrato chiaramente che il Cd influenza l'attività mitocondriale e la morfologia cellulare sia in condizioni di monocultura che in co-coltura. Tuttavia, gli effetti citotossici risultavano attenuati nelle co-culture con gli astrociti, ma non in presenza dei soli periciti.

Difatti, gli astrociti esercitano un ruolo protettivo attraverso il rilascio di molecole associate agli antiossidanti, attenuando il processo degenerativo [552]. Inoltre, la funzione di supporto degli astrociti mette in evidenza il loro ruolo di primo piano nel rafforzare strutturalmente il complesso delle giunzioni serrate mediante secrezione di fattori trofici [553].

Questa caratteristica è correlata all'espressione esclusiva di molecole di adesione come la claudina-5, situazione che è stata verificata solo quando le cellule RBE4 erano in co-coltura con gli astrociti, ma non è stata riscontrata per l'occludina. Alcuni studi dimostrano infatti come le giunzioni serrate risultino rafforzate mediante un'adeguata regolazione dell'occludina quando le cellule endoteliali sono in co-coltura con i neuroni [554, 555].

Sebbene i periciti rappresentino una componente cellulare chiave della BBB, partecipando all'omeostasi cerebrale attraverso la regolazione dello sviluppo [556] e dell'integrità vascolare [557] e mostrando diverse proprietà ricostituenti in seguito alla lesione della BBB [558-562], negli esperimenti in co-coltura sembrano costituirne

l'anello debole. Probabilmente, l'integrità della BBB potrebbe essere ridotta dai periciti in seguito alla secrezione di VEGF e metalloproteinasi della matrice [557, 562, 563], molecole che sono up-regolate in presenza di Cd [93, 564]. Tuttavia, quest'ultimo aspetto necessita un maggiore approfondimento poiché non ci sono dati in letteratura sui possibili effetti del Cd sui periciti neurovascolari.

## CONCLUSIONI

A causa del loro alto grado di tossicità, i metalli pesanti come cadmio, piombo e alluminio si collocano tra le priorità di importanza per la salute pubblica. Lo scorso 11 agosto, l'Unione Europea ha annunciato l'entrata in vigore, a partire da settembre 2021, delle nuove misure volte a ridurre ulteriormente la presenza di cadmio e piombo negli alimenti, fissando i nuovi livelli massimi.

Questi elementi metallici sono considerati tossici sistemici noti per indurre danni multiorgano, anche a livelli di esposizione inferiori. Infatti, non è escluso che gli stessi meccanismi fisiopatologici, come quelli discussi nel presente lavoro, possano essere attivati da metalli pesanti con caratteristiche chimico-fisiche simili dando origine ad un effetto cumulativo.

Un numero sempre crescente di studi suggerisce come l'esposizione a metalli non essenziali e la conseguente disregolazione nell'omeostasi dei metalli essenziali abbiano un impatto significativo sulla patogenesi delle malattie neurodegenerative.

Nel presente lavoro abbiamo delineato parte della via di segnalazione innescata dal Cd su un modello *in vitro* di BBB e come lo Zn sia in grado di interferire sulla sua azione neurotossica, confermando la sua integrazione come strategia efficace nell'ostacolare lo stress ossidativo cellulare e contribuendo a mantenere l'integrità della barriera.

Pertanto, al fine del prosieguo della ricerca e con uno sguardo proiettato alla ricerca traslazionale, la valutazione del profilo ematico dei metalli e della capacità antiossidante totale, necessaria per mantenere la BBB in uno stato funzionale, potrebbe aiutare nell'identificazione di potenziali bersagli per nuovi approcci terapeutici.

## BIBLIOGRAFIA

1. European Food Safety Authority (EFSA) (2009) Scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain on a request from the European Commission on cadmium in food. *EFSA J* 980:1–139
2. United Nations Environment Programme (UNEP) (2010) Final review of scientific information on cadmium. Chemicals Branch DTIE, December 2010.
3. World Health Organization (WHO). Preventing disease through health environments. Exposure to cadmium: a major public health concern. Geneva, Switzerland, 2010.
4. Nawrot TS, Staessen JA, Roels HA, Munters E, Cuypers A, Richart T, Ruttens A, Smeets K, Clijsters H, Vangronsveld J. Cadmium exposure in the population: from health risks to strategies of prevention. *Biometals*. 2010 Oct;23(5):769-82.
5. Satarug S, Garrett SH, Sens MA, Sens DA. Cadmium, environmental exposure, and health outcomes. *Environ Health Perspect*. 2010 Feb;118(2):182-90.
6. Sinicropi MS, Amantea D, Caruso A, Saturnino C. Chemical and biological properties of toxic metals and use of chelating agents for the pharmacological treatment of metal poisoning. *Arch Toxicol*. 2010 Jul;84(7):501-20.
7. World Health Organization (WHO). Environmental Health Criteria 134: Cadmium. World Health Organization: Geneva, Switzerland, 1992.
8. Casado, M; Anawar, HM; Garcia-Sanchez, A; Santa-Regina, I. Cadmium and zinc in polluted mining soils and uptake by plants (El Losar mine, Spain). *Int. Environ. Pollut*. 2008, 33, 146–159.
9. Hogervorst J, Plusquin M, Vangronsveld J, Nawrot T, Cuypers A, Van Hecke E, Roels HA, Carleer R, Staessen JA. House dust as possible route of environmental exposure to cadmium and lead in the adult general population. *Environ Res*. 2007 Jan;103(1):30-7.
10. Lokhande B, Patil PS, Uplane MD. Studies on cadmium oxide sprayed thin films deposited through non-aqueous medium. *Mater. Chem. Phys*. 2004, 84, 238–242.
11. Genchi G, Carocci A, Lauria G, Sinicropi MS, Catalano A. Nickel: Human Health and Environmental Toxicology. *Int J Environ Res Public Health*. 2020 Jan 21;17(3):679.
12. IARC (International Agency for Research on Cancer). Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risks to Humans Beryllium, Cadmium, Mercury and Exposures in the Glass Manufacturing Industry; IARC Scientific Publications: Lyon, France, 1993; pp. 119–238.
13. Karunakaran C, Dhanalakshmi R. Selectivity in photocatalysis by particulate semiconductors. *Cent. Eur. Chem*. 2009, 7, 134–137.
14. Hayat MT, Nauman M, Nazir N, Ali S, Bangash N. Environmental hazards of cadmium: Past, present, and future. In *Cadmium Toxicity and Tolerance in Plants*; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2019; pp. 163–183.
15. Alterio V, Langella E, De Simone G, Monti SM. Cadmium-containing carbonic anhydrase CDCA1 in marine diatom *Thalassiosira weissflogii*. *Mar Drugs*. 2015 Mar 25;13(4):1688-97.
16. Satarug S. Cadmium Sources and Toxicity. *Toxics*. 2019 May 6;7(2):25.
17. Bulmer FMR, Rothwel HE, Frankish ER. Industrial cadmium poisoning. *Can. Public Health* 1938, 29,19–26.
18. Hagino N, Yoshioka Y. A study of the etiology of Itai-Itai disease. *J. Jpn. Orthop. Assoc*. 1960, 35, 812–815.

19. Ishizaki A. So-called "Itai-itai disease". *Nihon Ishikai Zasshi*. 1969 Aug 1;62(3):242-8.
20. Murata I, Hirono T, Saeki Y, Nakagawa S. Cadmium enteropathy, renal osteomalacia ("Itai Itai" disease in Japan). *Bull Soc Int Chir*. 1970 Jan-Feb;29(1):34-42.
21. Satarug S. Dietary Cadmium Intake and Its Effects on Kidneys. *Toxics*. 2018 Mar 10;6(1):15.
22. European Food Safety Authority (EFSA) (2012) Cadmium dietary exposure in the European population. Scientific report of EFSA. *EFSA J* 10:2551
23. Sand S, Becker W. Assessment of dietary cadmium exposure in Sweden and population health concern including scenario analysis. *Food Chem Toxicol*. 2012 Mar;50(3-4):536-44.
24. Yuan X, Wang J, Shang Y, Sun B. Health risk assessment of cadmium via dietary intake by adults in China. *J Sci Food Agric*. 2014 Jan 30;94(2):373-80.
25. Sirot V, Samieri C, Volatier JL, Leblanc JC. Cadmium dietary intake and biomarker data in French high seafood consumers. *J Expo Sci Environ Epidemiol*. 2008 Jul;18(4):400-9.
26. Vromman V, Waegeneers N, Cornelis C, De Boosere I, Van Holderbeke M, Vinkx C, Smolders E, Huyghebaert A, Pussemier L. Dietary cadmium intake by the Belgian adult population. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*. 2010 Dec;27(12):1665-73.
27. Satarug S, Swaddiwudhipong W, Ruangyuttikarn W, Nishijo M, Ruiz P. Modeling cadmium exposures in low- and high-exposure areas in Thailand. *Environ Health Perspect*. 2013 May;121(5):531-6.
28. Koch W, Karim MR, Marzec Z, Miyataka H, Himeno S, Asakawa Y. Dietary intake of metals by the young adult population of Eastern Poland: Results from a market basket study. *J Trace Elem Med Biol*. 2016 May;35:36-42.
29. Pysz K, Leszczyńska T, Bieźanowska-Kopec R, Kopec A. Chemical assessment of lead, cadmium, nitrate, and nitrite intakes with daily diets of children and adolescents from orphanages in Krakow, Poland. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2016 Dec;23(24):25200-25209.
30. Flanagan PR, McLellan JS, Haist J, Cherian G, Chamberlain MJ, Valberg LS. Increased dietary cadmium absorption in mice and human subjects with iron deficiency. *Gastroenterology*. 1978 May;74(5 Pt 1):841-6.
31. Berglund M, Akesson A, Nermell B, Vahter M. Intestinal absorption of dietary cadmium in women depends on body iron stores and fiber intake. *Environ Health Perspect*. 1994 Dec;102(12):1058-66.
32. Brzóska MM, Moniuszko-Jakoniuk J. Interactions between cadmium and zinc in the organism. *Food Chem Toxicol*. 2001 Oct;39(10):967-80.
33. Satarug S, Moore MR. Adverse health effects of chronic exposure to low-level cadmium in food stuffs and cigarette smoke. *Environ Health Perspect*. 2004 Jul;112(10):1099-103.
34. Satarug S, Ujjin P, Vanavanitkun Y, Baker JR, Moore MR. Influence of body iron store status and cigarette smoking on cadmium body burden of healthy Thai women and men. *Toxicol Lett*. 2004 Mar 21;148(3):177-85.
35. Galazyn-Sidorczuk M, Brzóska MM, Moniuszko-Jakoniuk J. Estimation of Polish cigarettes contamination with cadmium and lead, and exposure to these metals via smoking. *Environ Monit Assess*. 2008 Feb;137(1-3):481-93.
36. Ashraf MW. Levels of heavy metals in popular cigarette brands and exposure to these metals via smoking. *ScientificWorldJournal*. 2012;2012:729430.

37. Food and Agriculture Organization/World Health Organization (FAO/WHO) (1993) Evaluation of certain food additives and contaminants. Forty-first Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO Technical Report Series No. 837. Geneva: WHO.
38. Ferraro PM, Costanzi S, Naticchia A, Sturniolo A, Gambaro G. Low level exposure to cadmium increases the risk of chronic kidney disease: analysis of the NHANES 1999-2006. *BMC Public Health*. 2010 Jun 3;10:304.
39. Suwazono Y, Sand S, Vahter M, Skerfving S, Lidfeldt J, Akesson A. Benchmark dose for cadmium-induced osteoporosis in women. *Toxicol Lett*. 2010 Aug 16;197(2):123-7.
40. Julin B, Wolk A, Johansson JE, Andersson SO, Andrén O, Akesson A. Dietary cadmium exposure and prostate cancer incidence: a population-based prospective cohort study. *Br J Cancer*. 2012 Aug 21;107(5):895-900.
41. Tellez-Plaza M, Navas-Acien A, Menke A, Crainiceanu CM, Pastor-Barriuso R, Guallar E. Cadmium exposure and all-cause and cardiovascular mortality in the U.S. general population. *Environ Health Perspect*. 2012 Jul;120(7):1017-22.
42. Hyder O, Chung M, Cosgrove D, Herman JM, Li Z, Firoozmand A, Gurakar A, Koteish A, Pawlik TM. Cadmium exposure and liver disease among US adults. *J Gastrointest Surg*. 2013 Jul;17(7):1265-73.
43. Lin YS, Caffrey JL, Lin JW, Bayliss D, Faramawi MF, Bateson TF, Sonawane B. Increased risk of cancer mortality associated with cadmium exposures in older Americans with low zinc intake. *J Toxicol Environ Health A*. 2013;76(1):1-15.
44. Food and Agriculture Organization/World Health Organization (FAO/WHO) (2010) Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Seventy-third meeting, Geneva, 8–17 June 2010.
45. Berglund M, Larsson K, Grandér M, Casteleyn L, Kolossa-Gehring M, Schwedler G, Castaño A, Esteban M, Angerer J, Koch HM, Schindler BK, Schoeters G, Smolders R, Exley K, Sepai O, Blumen L, Horvat M, Knudsen LE, Mørck TA, Joas A, Joas R, Biot P, Aerts D, De Cremer K, Van Overmeire I, Katsonouri A, Hadjipanayis A, Cerna M, Krskova A, Nielsen JK, Jensen JF, Rudnai P, Kozepesy S, Griffin C, Nesbitt I, Gutleb AC, Fischer ME, Ligocka D, Jakubowski M, Reis MF, Namorado S, Lupsa IR, Gurzau AE, Halzlova K, Jajcaj M, Mazej D, Tratnik JS, Lopez A, Cañas A, Lehmann A, Crettaz P, Den Hond E, Govarts E. Exposure determinants of cadmium in European mothers and their children. *Environ Res*. 2015 Aug;141:69-76.
46. Faroon O, Ashizawa A, Wright S, Tucker P, Jenkins K, Ingerman L, Rudisill C. Toxicological Profile for Cadmium. Atlanta (GA): Agency for Toxic Substances and Disease Registry (US); 2012 Sep.
47. Moody RP, Chu I. Dermal exposure to environmental contaminants in the Great Lakes. *Environ Health Perspect*. 1995 Dec;103 Suppl 9(Suppl 9):103-14.
48. Kerin EJ, Lin HK. Fugitive dust and human exposure to heavy metals around the Red Dog Mine. *Rev Environ Contam Toxicol*. 2010;206:49-63.
49. Forte G, Petrucci F, Bocca B. Metal allergens of growing significance: epidemiology, immunotoxicology, strategies for testing and prevention. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2008 Sep;7(3):145-62.
50. Kirshen C, Pratt M. Dental allergic contact dermatitis: an interesting case series and review of the literature. *Dermatitis*. 2012 Sep-Oct;23(5):222-6.
51. Satarug S, Baker JR, Reilly PE, Moore MR, Williams DJ. Changes in zinc and copper homeostasis in human livers and kidneys associated with exposure to environmental cadmium. *Hum Exp Toxicol*. 2001 Apr;20(4):205-13.

52. Roszczenko A, Gałazyn-Sidorczuk M, Brzóska MM, Moniuszko-Jakoniuk J, Zwierz K. Select parameters of renal function in smokers in correlation with the exposure to cadmium. *Przegl Lek.* 2004;61(4):348-50.
53. Lin YS, Ho WC, Caffrey JL, Sonawane B. Low serum zinc is associated with elevated risk of cadmium nephrotoxicity. *Environ Res.* 2014 Oct;134:33-8.
54. Brzóska MM, Borowska S, Tomczyk M. Antioxidants as a Potential Preventive and Therapeutic Strategy for Cadmium. *Curr Drug Targets.* 2016;17(12):1350-84.
55. Rogalska J, Pilat-Marcinkiewicz B, Brzóska MM. Protective effect of zinc against cadmium hepatotoxicity depends on this bioelement intake and level of cadmium exposure: a study in a rat model. *Chem Biol Interact.* 2011 Sep 30;193(3):191-203.
56. McCarty MF. Zinc and multi-mineral supplementation should mitigate the pathogenic impact of cadmium exposure. *Med Hypotheses.* 2012 Nov;79(5):642-8.
57. Matović V, Buha A, Bulat Z, Đukić-Ćosić D, Miljković M, Ivanišević J, Kotur-Stevuljević J. Route-dependent effects of cadmium/cadmium and magnesium acute treatment on parameters of oxidative stress in rat liver. *Food Chem Toxicol.* 2012 Mar;50(3-4):552-7.
58. Jamakala O, Rani U. Mitigating role of zinc and iron against cadmium induced toxicity in liver and kidney of male albino rat: a study with reference to metallothionein quantification. *Internat J Pharm Sci* 2014 6:411–417.
59. Oleszkiewicz J, Modrzejewska R, Pietek M, Drozd M. Survey research on lead and cadmium contents and assessment of magnesium supplementation effects on a group of young females 9–20 years of age. *Nowa Ped* 2014 2:44–49.
60. El-Boshy ME, Risha EF, Abdelhamid FM, Mubarak MS, Hadda TB. Protective effects of selenium against cadmium induced hematological disturbances, immunosuppressive, oxidative stress and hepatorenal damage in rats. *J Trace Elem Med Biol.* 2015 Jan;29:104-10.
61. Chaudhary S, Iram S, Raisuddin S, Parvez S. Manganese pre-treatment attenuates cadmium induced hepatotoxicity in Swiss albino mice. *J Trace Elem Med Biol.* 2015 Jan;29:284-8.
62. Sabolić I, Breljak D, Skarica M, Herak-Kramberger CM. Role of metallothionein in cadmium traffic and toxicity in kidneys and other mammalian organs. *Biomaterials.* 2010 Oct;23(5):897-926.
63. Dai S, Yin Z, Yuan G, Lu H, Jia R, Xu J, Song X, Li L, Shu Y, Liang X, He C, Lv C, Zhang W. Quantification of metallothionein on the liver and kidney of rats by subchronic lead and cadmium in combination. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2013 Nov;36(3):1207-16.
64. Matović V, Buha A, Đukić-Ćosić D, Bulat Z. Insight into the oxidative stress induced by lead and/or cadmium in blood, liver and kidneys. *Food Chem Toxicol.* 2015 Apr;78:130-40.
65. Baba H, Tsuneyama K, Yazaki M, Nagata K, Minamisaka T, Tsuda T, Nomoto K, Hayashi S, Miwa S, Nakajima T, Nakanishi Y, Aoshima K, Imura J. The liver in itai-itai disease (chronic cadmium poisoning): pathological features and metallothionein expression. *Mod Pathol.* 2013 Sep;26(9):1228-34.
66. Nishijo M, Satarug S, Honda R, Tsuritani I, Aoshima K. The gender differences in health effects of environmental cadmium exposure and potential mechanisms. *Mol Cell Biochem.* 2004 Jan;255(1-2):87-92.
67. Buckler HM, Smith WD, Rees WD. Self poisoning with oral cadmium chloride. *Br Med J (Clin Res Ed).* 1986 Jun 14;292(6535):1559-60.
68. Wiśniewska-Knypl J, Jabłońska J, Myślak Z. Binding of cadmium on metallothionein in man: an analysis of a fatal poisoning by cadmium iodide. *Arch Toxicol.* 1971;28(1):46-55.

69. Gordon T, Fine JM. Metal fume fever. *Occup Med*. 1993 Jul-Sep;8(3):504-17.
70. El-Zein M, Malo JL, Infante-Rivard C, Gautrin D. Prevalence and association of welding related systemic and respiratory symptoms in welders. *Occup Environ Med*. 2003 Sep;60(9):655-61.
71. Barnhart S, Rosenstock L. Cadmium chemical pneumonitis. *Chest*. 1984 Nov;86(5):789-91.
72. Taylor A, Jackson MA, Patil D, Burston J, Lee HA. Poisoning with cadmium fumes after smelting lead. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1984 Apr 28;288(6426):1270-1.
73. Yates DH, Goldman KP. Acute cadmium poisoning in a foreman plater welder. *Br J Ind Med*. 1990 Jun;47(6):429-31.
74. Seidal K, Jørgensen N, Elinder CG, Sjögren B, Vahter M. Fatal cadmium-induced pneumonitis. *Scand J Work Environ Health*. 1993 Dec;19(6):429-31.
75. Fernández MA, Sanz P, Palomar M, Serra J, Gadea E. Fatal chemical pneumonitis due to cadmium fumes. *Occup Med (Lond)*. 1996 Oct;46(5):372-4.
76. Heully F, Lamy P, Pernot C, Couillault S. [Acute poisoning by cadmium vapors]. *Arch Mal Prof*. 1963 Jun;24:547-9.
77. Järup L, Persson B, Edling C, Elinder CG. Renal function impairment in workers previously exposed to cadmium. *Nephron*. 1993;64(1):75-81.
78. Kang MY, Cho SH, Lim YH, Seo JC, Hong YC. Effects of environmental cadmium exposure on liver function in adults. *Occup Environ Med*. 2013 Apr;70(4):268-73.
79. Schutte R, Nawrot TS, Richart T, Thijs L, Vanderschueren D, Kuznetsova T, Van Hecke E, Roels HA, Staessen JA. Bone resorption and environmental exposure to cadmium in women: a population study. *Environ Health Perspect*. 2008 Jun;116(6):777-83.
80. Meerkin M, Clarke R, Oliphant R. Chronic cadmium poisoning. *Med J Aust*. 1976 Jan 3-10;1(1-2):23-4.
81. Rose CS, Heywood PG, Costanzo RM. Olfactory impairment after chronic occupational cadmium exposure. *J Occup Med*. 1992 Jun;34(6):600-5.
82. Davison AG, Fayers PM, Taylor AJ, Venables KM, Darbyshire J, Pickering CA, Chettle DR, Franklin D, Guthrie CJ, Scott MC, et al. Cadmium fume inhalation and emphysema. *Lancet*. 1988 Mar 26;1(8587):663-7.
83. Kumar S, Sharma A. Cadmium toxicity: effects on human reproduction and fertility. *Rev Environ Health*. 2019 Dec 18;34(4):327-338.
84. Geng HX, Wang L. Cadmium: Toxic effects on placental and embryonic development. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2019 Apr;67:102-107.
85. Aquino NB, Seigny MB, Sabangan J, Louie MC. The role of cadmium and nickel in estrogen receptor signaling and breast cancer: metalloestrogens or not? *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev*. 2012;30(3):189-224.
86. Fatima G, Raza AM, Hadi N, Nigam N, Mahdi AA. Cadmium in Human Diseases: It's More than Just a Mere Metal. *Indian J Clin Biochem*. 2019 Oct;34(4):371-378.
87. Satarug S, Nishijo M, Lasker JM, Edwards RJ, Moore MR. Kidney dysfunction and hypertension: role for cadmium, p450 and heme oxygenases? *Tohoku J Exp Med*. 2006 Mar;208(3):179-202.
88. Schroeder HA, Vinton WH Jr. Hypertension induced in rats by small doses of cadmium. *Am J Physiol*. 1962 Mar;202:515-8.
89. Revis NW, Zinsmeister AR, Bull R. Atherosclerosis and hypertension induction by lead and cadmium ions: an effect prevented by calcium ion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981 Oct;78(10):6494-8.



90. Söderholm M, Borné Y, Hedblad B, Persson M, Barregard L, Engström G. Blood cadmium concentration and risk of subarachnoid haemorrhage. *Environ Res.* 2020 Jan;180:108826.
91. IARC. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans-Beryllium, Cadmium, Mercury, and Exposures in the Glass Manufacturing Industry. In Summary of Data Reported and Evaluation; International Agency for Cancer Research-World Health Organization: Geneva, Switzerland, 1997; Volume 58.
92. Nawrot TS, Martens DS, Hara A, Plusquin M, Vangronsveld J, Roels HA, Staessen JA. Association of total cancer and lung cancer with environmental exposure to cadmium: the meta-analytical evidence. *Cancer Causes Control.* 2015 Sep;26(9):1281-8.
93. Zimta AA, Schitcu V, Gurzau E, Stavaru C, Manda G, Szedlacsek S, Berindan-Neagoe I. Biological and molecular modifications induced by cadmium and arsenic during breast and prostate cancer development. *Environ Res.* 2019 Nov;178:108700.
94. Nagata C, Nagao Y, Nakamura K, Wada K, Tamai Y, Tsuji M, Yamamoto S, Kashiki Y. Cadmium exposure and the risk of breast cancer in Japanese women. *Breast Cancer Res Treat.* 2013 Feb;138(1):235-9.
95. Peng L, Wang X, Huo X, Xu X, Lin K, Zhang J, Huang Y, Wu K. Blood cadmium burden and the risk of nasopharyngeal carcinoma: a case-control study in Chinese Chaoshan population. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2015 Aug;22(16):12323-31.
96. Feki-Tounsi M, Hamza-Chaffai A. Cadmium as a possible cause of bladder cancer: a review of accumulated evidence. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2014 Sep;21(18):10561-73.
97. Chen C, Xun P, Nishijo M, Sekikawa A, He K. Cadmium exposure and risk of pancreatic cancer: a meta-analysis of prospective cohort studies and case-control studies among individuals without occupational exposure history. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2015 Nov;22(22):17465-74.
98. Song Jk, Luo H, Yin Xh, Huang Gl, Luo Sy, Lin du R, Yuan DB, Zhang W, Zhu Jg. Association between cadmium exposure and renal cancer risk: a meta-analysis of observational studies. *Sci Rep.* 2015 Dec 11;5:17976.
99. Okuda B, Iwamoto Y, Tachibana H, Sugita M. Parkinsonism after acute cadmium poisoning. *Clin Neurol Neurosurg.* 1997 Dec;99(4):263-5.
100. Vinceti M, Guidetti D, Bergomi M, Caselgrandi E, Vivoli R, Olmi M, Rinaldi L, Rovesti S, Solimè F. Lead, cadmium, and selenium in the blood of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Ital J Neurol Sci.* 1997 Apr;18(2):87-92. doi: 10.1007/BF01999568.
101. Pamphlett R, McQuilty R, Zarkos K. Blood levels of toxic and essential metals in motor neuron disease. *Neurotoxicology.* 2001 Jun;22(3):401-10.
102. Viaene MK, Roels HA, Leenders J, De Groof M, Swerts LJ, Lison D, Masschelein R. Cadmium: a possible etiological factor in peripheral polyneuropathy. *Neurotoxicology.* 1999 Feb;20(1):7-16.
103. Hart RP, Rose CS, Hamer RM. Neuropsychological effects of occupational exposure to cadmium. *J Clin Exp Neuropsychol.* 1989 Dec;11(6):933-43.
104. Viaene MK, Masschelein R, Leenders J, De Groof M, Swerts LJ, Roels HA. Neurobehavioural effects of occupational exposure to cadmium: a cross sectional epidemiological study. *Occup Environ Med.* 2000 Jan;57(1):19-27.
105. Jiang LF, Yao TM, Zhu ZL, Wang C, Ji LN. 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*. 2007 Nov;1774(11):1414-21.
106. Oggiano R, Pisano A, Sabalic A, Farace C, Fenu G, Lintas S, Forte G, Bocca B, Madeddu R. An overview on amyotrophic lateral sclerosis and cadmium. *Neurol Sci*. 2021 Feb;42(2):531-537.
  107. Breydo L, Uversky VN. Role of metal ions in aggregation of intrinsically disordered proteins in neurodegenerative diseases. *Metallomics*. 2011 Nov;3(11):1163-80.
  108. Chisolm JJ Jr. The susceptibility of the fetus and child to chemical pollutants. Heavy metal exposures: toxicity from metal-metal interactions, and behavioral effects. *Pediatrics*. 1974 May;53(5):841-3.
  109. Thatcher RW, Lester ML, McAlaster R, Horst R. Effects of low levels of cadmium and lead on cognitive functioning in children. *Arch Environ Health*. 1982 May-Jun;37(3):159-66.
  110. Korpela H, Loueniva R, Yrjänheikki E, Kauppila A. Lead and cadmium concentrations in maternal and umbilical cord blood, amniotic fluid, placenta, and amniotic membranes. *Am J Obstet Gynecol*. 1986 Nov;155(5):1086-9.
  111. Bonithon-Kopp C, Huel G, Moreau T, Wendling R. Prenatal exposure to lead and cadmium and psychomotor development of the child at 6 years. *Neurobehav Toxicol Teratol*. 1986 May-Jun;8(3):307-10.
  112. Bao QS, Lu CY, Song H, Wang M, Ling W, Chen WQ, Deng XQ, Hao YT, Rao S. Behavioural development of school-aged children who live around a multi-metal sulphide mine in Guangdong province, China: a cross-sectional study. *BMC Public Health*. 2009 Jul 3;9:217.
  113. Manca D, Ricard AC, Trottier B, Chevalier G. Studies on lipid peroxidation in rat tissues following administration of low and moderate doses of cadmium chloride. *Toxicology*. 1991 May;67(3):303-23.
  114. Kumar R, Agarwal AK, Seth PK. Oxidative stress-mediated neurotoxicity of cadmium. *Toxicol Lett*. 1996 Dec;89(1):65-9.
  115. El-Maraghy SA, Gad MZ, Fahim AT, Hamdy MA. Effect of cadmium and aluminum intake on the antioxidant status and lipid peroxidation in rat tissues. *J Biochem Mol Toxicol*. 2001;15(4):207-14.
  116. Méndez-Armenta M, Barroso-Moguel R, Villeda-Hernández J, Nava-Ruíz C, Ríos C. Histopathological alterations in the brain regions of rats after perinatal combined treatment with cadmium and dexamethasone. *Toxicology*. 2001 Mar 28;161(3):189-99.
  117. López E, Arce C, Oset-Gasque MJ, Cañadas S, González MP. Cadmium induces reactive oxygen species generation and lipid peroxidation in cortical neurons in culture. *Free Radic Biol Med*. 2006 Mar 15;40(6):940-51.
  118. Gutteridge JM, Halliwell B. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends Biochem Sci*. 1990 Apr;15(4):129-35.
  119. Brieger K, Schiavone S, Miller FJ Jr, Krause KH. Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss Med Wkly*. 2012 Aug 17;142:w13659.
  120. Singh A, Kukreti R, Saso L, Kukreti S. Oxidative Stress: A Key Modulator in Neurodegenerative Diseases. *Molecules*. 2019 Apr 22;24(8):1583.
  121. Acan NL, Tezcan EF. Inhibition kinetics of sheep brain glutathione reductase by cadmium ion. *Biochem Mol Med*. 1995 Feb;54(1):33-7.
  122. Shukla A, Shukla GS, Srimal RC. Cadmium-induced alterations in blood-brain barrier permeability and its possible correlation with decreased microvessel antioxidant potential in rat. *Hum Exp Toxicol*. 1996 May;15(5):400-5.

123. Pal R, Nath R, Gill KD. Influence of ethanol on cadmium accumulation and its impact on lipid peroxidation and membrane bound functional enzymes (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase and acetylcholinesterase) in various regions of adult rat brain. *Neurochem Int.* 1993 Nov;23(5):451-8.
124. Gutiérrez-Reyes EY, Albores A, Ríos C. Increase of striatal dopamine release by cadmium in nursing rats and its prevention by dexamethasone-induced metallothionein. *Toxicology.* 1998 Nov 16;131(2-3):145-54.
125. Wang B, Du Y. Cadmium and its neurotoxic effects. *Oxid Med Cell Longev.* 2013;2013:898034.
126. Alshuaib WB, Byerly L. Modulation of membrane currents by cyclic AMP in cleavage-arrested *Drosophila* neurons. *J Exp Biol.* 1996 Mar;199(Pt 3):537-48.
127. Alshuaib WB, Cherian SP, Hasan MY, Fahim MA. Drug effects on calcium homeostasis in mouse CA1 hippocampal neurons. *Int J Neurosci.* 2003 Oct;113(10):1317-32.
128. Woods NK, Padmanabhan J. Neuronal calcium signaling and Alzheimer's disease. *Adv Exp Med Biol.* 2012;740:1193-217.
129. Guan YY, Quastel DM, Saint DA. Single Ca<sup>2+</sup> entry and transmitter release systems at the neuromuscular synapse. *Synapse.* 1988;2(5):558-64.
130. Usai C, Barberis A, Moccagatta L, Marchetti C. Pathways of cadmium influx in mammalian neurons. *J Neurochem.* 1999 May;72(5):2154-61.
131. Viarengo A, Nicotera P. Possible role of Ca<sup>2+</sup> in heavy metal cytotoxicity. *Comp Biochem Physiol C Comp Pharmacol Toxicol.* 1991;100(1-2):81-4.
132. Papp A, Nagymajtényi L, Dési I. A study on electrophysiological effects of subchronic cadmium treatment in rats. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2003 Apr;13(3):181-6.
133. Chifman J, Laubenbacher R, Torti SV. A systems biology approach to iron metabolism. *Adv Exp Med Biol.* 2014;844:201-25.
134. Pantopoulos K, Porwal SK, Tartakoff A, Devireddy L. Mechanisms of mammalian iron homeostasis. *Biochemistry.* 2012 Jul 24;51(29):5705-24.
135. Andrews NC. Iron metabolism: iron deficiency and iron overload. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2000;1:75-98.
136. Mills E, Dong XP, Wang F, Xu H. Mechanisms of brain iron transport: insight into neurodegeneration and CNS disorders. *Future Med Chem.* 2010 Jan;2(1):51-64.
137. Ward RJ, Zucca FA, Duyn JH, Crichton RR, Zecca L. The role of iron in brain ageing and neurodegenerative disorders. *Lancet Neurol.* 2014 Oct;13(10):1045-60.
138. Hare D, Ayton S, Bush A, Lei P. A delicate balance: Iron metabolism and diseases of the brain. *Front Aging Neurosci.* 2013 Jul 18;5:34.
139. Beard JL. Iron biology in immune function, muscle metabolism and neuronal functioning. *J Nutr.* 2001 Feb;131(2S-2):568S-579S.
140. Piñero DJ, Connor J. Iron in the Brain: An Important Contributor in Normal and Diseased States. *The Neuroscientist.* 2000; 6(6):435–453.
141. Todorich B, Pasquini JM, Garcia CI, Paez PM, Connor JR. Oligodendrocytes and myelination: the role of iron. *Glia.* 2009 Apr 1;57(5):467-78.
142. Chen P, Bornhorst J, Aschner M. Manganese metabolism in humans. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2018 Mar 1;23:1655-1679.
143. Chen P, Miah MR, Aschner M. Metals and Neurodegeneration. *F1000Res.* 2016 Mar 17;5:F1000 Faculty Rev-366.
144. Chen P, Chakraborty S, Mukhopadhyay S, Lee E, Paoliello MM, Bowman AB, Aschner M. Manganese homeostasis in the nervous system. *J Neurochem.* 2015 Aug;134(4):601-10.

145. Au C, Benedetto A, Aschner M. Manganese transport in eukaryotes: the role of DMT1. *Neurotoxicology*. 2008 Jul;29(4):569-76.
146. Aschner M, Aschner JL. Manganese transport across the blood-brain barrier: relationship to iron homeostasis. *Brain Res Bull*. 1990 Jun;24(6):857-60.
147. Aschner M, Gannon M. Manganese (Mn) transport across the rat blood-brain barrier: saturable and transferrin-dependent transport mechanisms. *Brain Res Bull*. 1994;33(3):345-9.
148. Gunter TE, Gerstner B, Gunter KK, Malecki J, Gelein R, Valentine WM, Aschner M, Yule DI. Manganese transport via the transferrin mechanism. *Neurotoxicology*. 2013 Jan;34:118-27.
149. Sheftel AD, Zhang AS, Brown C, Shirihai OS, Ponka P. Direct interorganellar transfer of iron from endosome to mitochondrion. *Blood*. 2007 Jul 1;110(1):125-32.
150. Yin Z, Jiang H, Lee ES, Ni M, Erikson KM, Milatovic D, Bowman AB, Aschner M. Ferroportin is a manganese-responsive protein that decreases manganese cytotoxicity and accumulation. *J Neurochem*. 2010 Mar;112(5):1190-8.
151. Fernsebner K, Zorn J, Kanawati B, Walker A, Michalke B. Manganese leads to an increase in markers of oxidative stress as well as to a shift in the ratio of Fe(II)/(III) in rat brain tissue. *Metallomics*. 2014 Apr;6(4):921-31.
152. Fadigan A, Dailey HA. Inhibition of ferrochelatase during differentiation of murine erythroleukaemia cells. *Biochem J*. 1987 Apr 15;243(2):419-24.
153. Harris WR, Madsen LJ. Equilibrium studies on the binding of cadmium(II) to human serum transferrin. *Biochemistry*. 1988 Jan 12;27(1):284-8.
154. Mackenzie B, Takanaga H, Hubert N, Rolfs A, Hediger MA. Functional properties of multiple isoforms of human divalent metal-ion transporter 1 (DMT1). *Biochem J*. 2007 Apr 1;403(1):59-69.
155. Kim DW, Kim KY, Choi BS, Youn P, Ryu DY, Klaassen CD, Park JD. Regulation of metal transporters by dietary iron, and the relationship between body iron levels and cadmium uptake. *Arch Toxicol*. 2007 May;81(5):327-34.
156. Vangheluwe P, Sepúlveda MR, Missiaen L, Raeymaekers L, Wuytack F, Vanoevelen J. Intracellular Ca<sup>2+</sup>- and Mn<sup>2+</sup>-transport ATPases. *Chem Rev*. 2009 Oct;109(10):4733-59.
157. Antonio MT, Corpas I, Leret ML. Neurochemical changes in newborn rat's brain after gestational cadmium and lead exposure. *Toxicol Lett*. 1999 Jan 11;104(1-2):1-9.
158. Chandra SV, Murthy RC, Husain T, Bansal SK. Effect of interaction of heavy metals on (Na<sup>+</sup> -K<sup>+</sup>) ATPase and the uptake of 3H-DA and 3H-NA in rat brain synaptosomes. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)*. 1984 Mar;54(3):210-3.
159. Minami A, Takeda A, Nishibaba D, Takefuta S, Oku N. Cadmium toxicity in synaptic neurotransmission in the brain. *Brain Res*. 2001 Mar 16;894(2):336-9.
160. Gupta A, Gupta A, Murthy RC, Thakur SR, Dubey MP, Chandra SV. Comparative neurotoxicity of cadmium in growing and adult rats after repeated administration. *Biochem Int*. 1990;21(1):97-105.
161. Gupta A, Gupta A, Murthy RC, Chandra SV. Neurochemical changes in developing rat brain after pre- and postnatal cadmium exposure. *Bull Environ Contam Toxicol*. 1993 Jul;51(1):12-7.
162. Andersson H, Petersson-Grawé K, Lindqvist E, Luthman J, Oskarsson A, Olson L. Low-level cadmium exposure of lactating rats causes alterations in brain serotonin levels in the offspring. *Neurotoxicol Teratol*. 1997 Mar-Apr;19(2):105-15.
163. Lafuente A, González-Carracedo A, Romero A, Cano P, Esquifino AI. Cadmium exposure differentially modifies the circadian patterns of norepinephrine at the

- median eminence and plasma LH, FSH and testosterone levels. *Toxicol Lett.* 2004 Jan 15;146(2):175-82.
164. Lafuente A, Cano P, Esquifino A. Are cadmium effects on plasma gonadotropins, prolactin, ACTH, GH and TSH levels, dose-dependent? *Biometals.* 2003 Jun;16(2):243-50.
  165. Lafuente A, Márquez N, Pérez-Lorenzo M, Pazo D, Esquifino AI. Pubertal and postpubertal cadmium exposure differentially affects the hypothalamic-pituitary-testicular axis function in the rat. *Food Chem Toxicol.* 2000 Oct;38(10):913-23.
  166. Son J, Lee SE, Park BS, Jung J, Park HS, Bang JY, Kang GY, Cho K. Biomarker discovery and proteomic evaluation of cadmium toxicity on a collembolan species, *Paronychiurus kimi* (Lee). *Proteomics.* 2011 Jun;11(11):2294-307.
  167. Chow ES, Hui MN, Lin CC, Cheng SH. Cadmium inhibits neurogenesis in zebrafish embryonic brain development. *Aquat Toxicol.* 2008 May 1;87(3):157-69.
  168. Poliandri AH, Cabilla JP, Velardez MO, Bodo CC, Duvilanski BH. Cadmium induces apoptosis in anterior pituitary cells that can be reversed by treatment with antioxidants. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2003 Jul 1;190(1):17-24.
  169. Kondoh M, Araragi S, Sato K, Higashimoto M, Takiguchi M, Sato M. Cadmium induces apoptosis partly via caspase-9 activation in HL-60 cells. *Toxicology.* 2002 Jan 15;170(1-2):111-7.
  170. López E, Figueroa S, Oset-Gasque MJ, González MP. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced by cadmium in cortical neurons in culture. *Br J Pharmacol.* 2003 Mar;138(5):901-11.
  171. Wätjen W, Cox M, Biagioli M, Beyersmann D. Cadmium-induced apoptosis in C6 glioma cells: mediation by caspase 9-activation. *Biometals.* 2002 Mar;15(1):15-25.
  172. Annunziato L, Amoroso S, Pannaccione A, Cataldi M, Pignataro G, D'Alessio A, Sirabella R, Secondo A, Sibaud L, Di Renzo GF. Apoptosis induced in neuronal cells by oxidative stress: role played by caspases and intracellular calcium ions. *Toxicol Lett.* 2003 Apr 4;139(2-3):125-33.
  173. Jeong SY, Seol DW. The role of mitochondria in apoptosis. *BMB Rep.* 2008 Jan 31;41(1):11-22.
  174. Robertson JD, Orrenius S. Molecular mechanisms of apoptosis induced by cytotoxic chemicals. *Crit Rev Toxicol.* 2000 Sep;30(5):609-27.
  175. Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem.* 1999;68:383-424.
  176. Mehmet H. Caspases find a new place to hide. *Nature.* 2000 Jan 6;403(6765):29-30.
  177. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature.* 2000 Oct 12;407(6805):770-6.
  178. Valverde M, Fortoul TI, Díaz-Barriga F, Mejia J, del Castillo ER. Induction of genotoxicity by cadmium chloride inhalation in several organs of CD-1 mice. *Mutagenesis.* 2000 Mar;15(2):109-14.
  179. Hartwig A. Role of DNA repair inhibition in lead- and cadmium-induced genotoxicity: a review. *Environ Health Perspect.* 1994 Sep;102 Suppl 3(Suppl 3):45-50.
  180. Hartwig A. Carcinogenicity of metal compounds: possible role of DNA repair inhibition. *Toxicol Lett.* 1998 Dec 28;102-103:235-9.
  181. Hartwig A, Asmuss M, Ehleben I, Herzer U, Kostelac D, Pelzer A, Schwerdtle T, Bürkle A. Interference by toxic metal ions with DNA repair processes and cell

- cycle control: molecular mechanisms. *Environ Health Perspect.* 2002 Oct;110 Suppl 5(Suppl 5):797-9.
182. Beyersmann D, Hechtenberg S. Cadmium, gene regulation, and cellular signalling in mammalian cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1997 Jun;144(2):247-61.
  183. Waalkes MP. Cadmium carcinogenesis in review. *J Inorg Biochem.* 2000 Apr;79(1-4):241-4.
  184. Miller OJ, Schnedl W, Allen J, Erlanger BF. 5-Methylcytosine localised in mammalian constitutive heterochromatin. *Nature.* 1974 Oct 18;251(5476):636-7.
  185. Takiguchi M, Achanzar WE, Qu W, Li G, Waalkes MP. Effects of cadmium on DNA-(Cytosine-5) methyltransferase activity and DNA methylation status during cadmium-induced cellular transformation. *Exp Cell Res.* 2003 Jun 10;286(2):355-65.
  186. Benbrahim-Tallaa L, Waterland RA, Dill AL, Webber MM, Waalkes MP. Tumor suppressor gene inactivation during cadmium-induced malignant transformation of human prostate cells correlates with overexpression of de novo DNA methyltransferase. *Environ Health Perspect.* 2007 Oct;115(10):1454-9.
  187. Valinluck V, Tsai HH, Rogstad DK, Burdzy A, Bird A, Sowers LC. Oxidative damage to methyl-CpG sequences inhibits the binding of the methyl-CpG binding domain (MBD) of methyl-CpG binding protein 2 (MeCP2). *Nucleic Acids Res.* 2004 Aug 9;32(14):4100-8.
  188. Turk PW, Laayoun A, Smith SS, Weitzman SA. DNA adduct 8-hydroxyl-2'-deoxyguanosine (8-hydroxyguanine) affects function of human DNA methyltransferase. *Carcinogenesis.* 1995 May;16(5):1253-5.
  189. Wang B, Li Y, Tan Y, Miao X, Liu XD, Shao C, Yang XH, Turdi S, Ma LJ, Ren J, Cai L. Low-dose Cd induces hepatic gene hypermethylation, along with the persistent reduction of cell death and increase of cell proliferation in rats and mice. *PLoS One.* 2012;7(3):e33853.
  190. Shahbazian MD, Zoghbi HY. Rett syndrome and MeCP2: linking epigenetics and neuronal function. *Am J Hum Genet.* 2002 Dec;71(6):1259-72.
  191. Ishitobi H, Watanabe C. Effects of low-dose perinatal cadmium exposure on tissue zinc and copper concentrations in neonatal mice and on the reproductive development of female offspring. *Toxicol Lett.* 2005 Oct 15;159(1):38-46.
  192. Ishitobi H, Mori K, Yoshida K, Watanabe C. Effects of perinatal exposure to low-dose cadmium on thyroid hormone-related and sex hormone receptor gene expressions in brain of offspring. *Neurotoxicology.* 2007 Jul;28(4):790-7.
  193. Farsetti A, Mitsuhashi T, Desvergne B, Robbins J, Nikodem VM. Molecular basis of thyroid hormone regulation of myelin basic protein gene expression in rodent brain. *J Biol Chem.* 1991 Dec 5;266(34):23226-32.
  194. Sensi SL, Paoletti P, Bush AI, Sekler I. Zinc in the physiology and pathology of the CNS. *Nat Rev Neurosci.* 2009 Nov;10(11):780-91.
  195. Tõugu V, Tiiman A, Palumaa P. Interactions of Zn(II) and Cu(II) ions with Alzheimer's amyloid-beta peptide. Metal ion binding, contribution to fibrillization and toxicity. *Metallomics.* 2011 Mar;3(3):250-61.
  196. Bonda DJ, Lee HG, Blair JA, Zhu X, Perry G, Smith MA. Role of metal dyshomeostasis in Alzheimer's disease. *Metallomics.* 2011 Mar;3(3):267-70.
  197. Duce JA, Bush AI. Biological metals and Alzheimer's disease: implications for therapeutics and diagnostics. *Prog Neurobiol.* 2010 Sep;92(1):1-18.
  198. Glabe CG. Structural classification of toxic amyloid oligomers. *J Biol Chem.* 2008 Oct 31;283(44):29639-43.

199. Lovell MA, Robertson JD, Teesdale WJ, Campbell JL, Markesbery WR. Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques. *J Neurol Sci.* 1998 Jun 11;158(1):47-52.
200. Gu H, Wei X, Monnot AD, Fontanilla CV, Behl M, Farlow MR, Zheng W, Du Y. Lead exposure increases levels of beta-amyloid in the brain and CSF and inhibits LRP1 expression in APP transgenic mice. *Neurosci Lett.* 2011 Feb 18;490(1):16-20.
201. Basha MR, Wei W, Bakheet SA, Benitez N, Siddiqi HK, Ge YW, Lahiri DK, Zawia NH. The fetal basis of amyloidogenesis: exposure to lead and latent overexpression of amyloid precursor protein and beta-amyloid in the aging brain. *J Neurosci.* 2005 Jan 26;25(4):823-9.
202. Wu J, Basha MR, Brock B, Cox DP, Cardozo-Pelaez F, McPherson CA, Harry J, Rice DC, Maloney B, Chen D, Lahiri DK, Zawia NH. Alzheimer's disease (AD)-like pathology in aged monkeys after infantile exposure to environmental metal lead (Pb): evidence for a developmental origin and environmental link for AD. *J Neurosci.* 2008 Jan 2;28(1):3-9.
203. Mutter J, Curth A, Naumann J, Deth R, Walach H. Does inorganic mercury play a role in Alzheimer's disease? A systematic review and an integrated molecular mechanism. *J Alzheimers Dis.* 2010;22(2):357-74.
204. Mizoroki T, Meshitsuka S, Maeda S, Murayama M, Sahara N, Takashima A. Aluminum induces tau aggregation in vitro but not in vivo. *J Alzheimers Dis.* 2007 Jul;11(4):419-27.
205. Shin RW, Lee VM, Trojanowski JQ. Aluminum modifies the properties of Alzheimer's disease PHF tau proteins in vivo and in vitro. *J Neurosci.* 1994 Nov;14(11 Pt 2):7221-33.
206. Santner A, Uversky VN. Metalloproteomics and metal toxicology of alpha-synuclein. *Metallomics.* 2010 Jun;2(6):378-92.
207. Ricchelli F, Fusi P, Tortora P, Valtorta M, Riva M, Tognon G, Chiericato K, Bolognin S, Zatta P. Destabilization of non-pathological variants of ataxin-3 by metal ions results in aggregation/fibrillogenesis. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(5):966-77.
208. Stawoska I, Weselucha-Birczyńska A, Regonesi ME, Riva M, Tortora P, Stochel G. Interaction of selected divalent metal ions with human ataxin-3 Q36. *J Biol Inorg Chem.* 2009 Nov;14(8):1175-85.
209. Fox JH, Kama JA, Lieberman G, Chopra R, Dorsey K, Chopra V, Volitakis I, Cherny RA, Bush AI, Hersch S. Mechanisms of copper ion mediated Huntington's disease progression. *PLoS One.* 2007 Mar 28;2(3):e334.
210. Nielsen AE, Bohr A, Penkowa M. The Balance between Life and Death of Cells: Roles of Metallothioneins. *Biomark Insights.* 2007 Feb 7;1:99-111.
211. Hidalgo J, Carrasco J. Regulation of the synthesis of brain metallothioneins. *Neurotoxicology.* 1998 Aug-Oct;19(4-5):661-6.
212. Nishimura N, Nishimura H, Ghaffar A, Tohyama C. Localization of metallothionein in the brain of rat and mouse. *J Histochem Cytochem.* 1992 Feb;40(2):309-15.
213. Aschner M, Cherian MG, Klaassen CD, Palmiter RD, Erickson JC, Bush AI. Metallothioneins in brain--the role in physiology and pathology. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1997 Feb;142(2):229-42.
214. Sato M, Bremner I. Oxygen free radicals and metallothionein. *Free Radic Biol Med.* 1993 Mar;14(3):325-37.
215. Maret W, Vallee BL. Thiolate ligands in metallothionein confer redox activity on zinc clusters. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Mar 31;95(7):3478-82.

216. Hidalgo J, Aschner M, Zatta P, Vasák M. Roles of the metallothionein family of proteins in the central nervous system. *Brain Res Bull.* 2001 May 15;55(2):133-45.
217. Aschner M. The functional significance of brain metallothioneins. *FASEB J.* 1996 Aug;10(10):1129-36.
218. Bousleiman J, Pinsky A, Ki S, Su A, Morozova I, Kalachikov S, Wiqas A, Silver R, Sever M, Austin RN. Function of Metallothionein-3 in Neuronal Cells: Do Metal Ions Alter Expression Levels of MT3? *Int J Mol Sci.* 2017 May 25;18(6):1133.
219. Palmiter RD, Findley SD, Whitmore TE, Durnam DM. MT-III, a brain-specific member of the metallothionein gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Jul 15;89(14):6333-7.
220. Kille P, Hemmings A, Lunney EA. Memories of metallothionein. *Biochim Biophys Acta.* 1994 Apr 13;1205(2):151-61.
221. Gasull T, Giralt M, Hernandez J, Martinez P, Bremner I, Hidalgo J. Regulation of metallothionein concentrations in rat brain: effect of glucocorticoids, zinc, copper, and endotoxin. *Am J Physiol.* 1994 May;266(5 Pt 1):E760-7.
222. Vallee BL. The function of metallothionein. *Neurochem Int.* 1995 Jul;27(1):23-33.
223. West AK, Hidalgo J, Eddins D, Levin ED, Aschner M. Metallothionein in the central nervous system: Roles in protection, regeneration and cognition. *Neurotoxicology.* 2008 May;29(3):489-503.
224. Bentivoglio M, Kristensson K. Tryps and trips: cell trafficking across the 100-year-old blood-brain barrier. *Trends Neurosci.* 2014 Jun;37(6):325-33.
225. Zlokovic BV, Apuzzo ML. Strategies to circumvent vascular barriers of the central nervous system. *Neurosurgery.* 1998 Oct;43(4):877-8.
226. Wolburg H, Lippoldt A. Tight junctions of the blood-brain barrier: development, composition and regulation. *Vascul Pharmacol.* 2002 Jun;38(6):323-37.
227. Hawkins BT, Davis TP. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Rev.* 2005 Jun;57(2):173-85.
228. Begley DJ, Brightman MW. Structural and functional aspects of the blood-brain barrier. *Prog Drug Res.* 2003;61:39-78.
229. El-Bacha RS, Minn A. Drug metabolizing enzymes in cerebrovascular endothelial cells afford a metabolic protection to the brain. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 1999 Feb;45(1):15-23.
230. Pardridge WM. Blood-brain barrier drug targeting: the future of brain drug development. *Mol Interv.* 2003 Mar;3(2):90-105, 51.
231. Abbott NJ, Romero IA. Transporting therapeutics across the blood-brain barrier. *Mol Med Today.* 1996 Mar;2(3):106-13.
232. Abbott NJ. Dynamics of CNS barriers: evolution, differentiation, and modulation. *Cell Mol Neurobiol.* 2005 Feb;25(1):5-23.
233. Abbott NJ. Evidence for bulk flow of brain interstitial fluid: significance for physiology and pathology. *Neurochem Int.* 2004 Sep;45(4):545-52.
234. Cserr HF, Bundgaard M. Blood-brain interfaces in vertebrates: a comparative approach. *Am J Physiol.* 1984 Mar;246(3 Pt 2):R277-88.
235. Abbott NJ, Lane NJ, Bundgaard M. The blood-brain interface in invertebrates. *Ann N Y Acad Sci.* 1986;481:20-42.
236. Liebner S, Czupalla CJ, Wolburg H. Current concepts of blood-brain barrier development. *Int J Dev Biol.* 2011;55(4-5):467-76.
237. Dejana E, Giampietro C. Vascular endothelial-cadherin and vascular stability. *Curr Opin Hematol.* 2012 May;19(3):218-23.



238. Li F, Lan Y, Wang Y, Wang J, Yang G, Meng F, Han H, Meng A, Wang Y, Yang X. Endothelial Smad4 maintains cerebrovascular integrity by activating N-cadherin through cooperation with Notch. *Dev Cell*. 2011 Mar 15;20(3):291-302.
239. Huber JD, Egleton RD, Davis TP. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions in the blood-brain barrier. *Trends Neurosci*. 2001 Dec;24(12):719-25.
240. Pardridge WM. Drug transport across the blood-brain barrier. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2012 Nov;32(11):1959-72.
241. Daneman R. The blood-brain barrier in health and disease. *Ann Neurol*. 2012 Nov;72(5):648-72.
242. Piccio L, Rossi B, Scarpini E, Laudanna C, Giagulli C, Issekutz AC, Vestweber D, Butcher EC, Constantin G. Molecular mechanisms involved in lymphocyte recruitment in inflamed brain microvessels: critical roles for P-selectin glycoprotein ligand-1 and heterotrimeric G(i)-linked receptors. *J Immunol*. 2002 Feb 15;168(4):1940-9.
243. Engelhardt B, Ransohoff RM. Capture, crawl, cross: the T cell code to breach the blood-brain barriers. *Trends Immunol*. 2012 Dec;33(12):579-89.
244. Obermeier B, Daneman R, Ransohoff RM. Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier. *Nat Med*. 2013 Dec;19(12):1584-96.
245. Lee SW, Kim WJ, Choi YK, Song HS, Son MJ, Gelman IH, Kim YJ, Kim KW. SSeCKS regulates angiogenesis and tight junction formation in blood-brain barrier. *Nat Med*. 2003 Jul;9(7):900-6.
246. Dohgu S, Takata F, Yamauchi A, Nakagawa S, Egawa T, Naito M, Tsuruo T, Sawada Y, Niwa M, Kataoka Y. Brain pericytes contribute to the induction and up-regulation of blood-brain barrier functions through transforming growth factor-beta production. *Brain Res*. 2005 Mar 21;1038(2):208-15.
247. Armulik A, Genové G, Mäe M, Nisancioglu MH, Wallgard E, Niaudet C, He L, Norlin J, Lindblom P, Strittmatter K, Johansson BR, Betsholtz C. Pericytes regulate the blood-brain barrier. *Nature*. 2010 Nov 25;468(7323):557-61.
248. Alvarez JI, Dodelet-Devillers A, Kebir H, Ifergan I, Fabre PJ, Terouz S, Sabbagh M, Wosik K, Bourbonnière L, Bernard M, van Horsen J, de Vries HE, Charron F, Prat A. The Hedgehog pathway promotes blood-brain barrier integrity and CNS immune quiescence. *Science*. 2011 Dec 23;334(6063):1727-31.
249. Osada T, Gu YH, Kanazawa M, Tsubota Y, Hawkins BT, Spatz M, Milner R, del Zoppo GJ. Interendothelial claudin-5 expression depends on cerebral endothelial cell-matrix adhesion by beta(1)-integrins. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2011 Oct;31(10):1972-85.
250. Bell RD, Winkler EA, Singh I, Sagare AP, Deane R, Wu Z, Holtzman DM, Betsholtz C, Armulik A, Sallstrom J, Berk BC, Zlokovic BV. Apolipoprotein E controls cerebrovascular integrity via cyclophilin A. *Nature*. 2012 May 16;485(7399):512-6.
251. Ben-Zvi A, Lacoste B, Kur E, Andreone BJ, Mayshar Y, Yan H, Gu C. Mfsd2a is critical for the formation and function of the blood-brain barrier. *Nature*. 2014 May 22;509(7501):507-11.
252. Winkler EA, Bell RD, Zlokovic BV. Central nervous system pericytes in health and disease. *Nat Neurosci*. 2011 Oct 26;14(11):1398-1405.
253. Armulik A, Genové G, Betsholtz C. Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises. *Dev Cell*. 2011 Aug 16;21(2):193-215.
254. Peppiatt CM, Howarth C, Mobbs P, Attwell D. Bidirectional control of CNS capillary diameter by pericytes. *Nature*. 2006 Oct 12;443(7112):700-4.

255. Hill J, Rom S, Ramirez SH, Persidsky Y. Emerging roles of pericytes in the regulation of the neurovascular unit in health and disease. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2014 Dec;9(5):591-605.
256. Hellström M, Kalén M, Lindahl P, Abramsson A, Betsholtz C. Role of PDGF-B and PDGFR-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse. *Development.* 1999 Jun;126(14):3047-55.
257. Lindahl P, Johansson BR, Leveén P, Betsholtz C. Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science.* 1997 Jul 11;277(5323):242-5.
258. Gaengel K, Genové G, Armulik A, Betsholtz C. Endothelial-mural cell signaling in vascular development and angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009 May;29(5):630-8.
259. Daneman R, Zhou L, Agalliu D, Cahoy JD, Kaushal A, Barres BA. The mouse blood-brain barrier transcriptome: a new resource for understanding the development and function of brain endothelial cells. *PLoS One.* 2010 Oct 29;5(10):e13741.
260. Hallmann R, Horn N, Selg M, Wendler O, Pausch F, Sorokin LM. Expression and function of laminins in the embryonic and mature vasculature. *Physiol Rev.* 2005 Jul;85(3):979-1000.
261. Stratman AN, Malotte KM, Mahan RD, Davis MJ, Davis GE. Pericyte recruitment during vasculogenic tube assembly stimulates endothelial basement membrane matrix formation. *Blood.* 2009 Dec 3;114(24):5091-101.
262. Dore-Duffy P. Pericytes: pluripotent cells of the blood brain barrier. *Curr Pharm Des.* 2008;14(16):1581-93.
263. Lindblom P, Gerhardt H, Liebner S, Abramsson A, Enge M, Hellstrom M, Backstrom G, Fredriksson S, Landegren U, Nystrom HC, Bergstrom G, Dejana E, Ostman A, Lindahl P, Betsholtz C. Endothelial PDGF-B retention is required for proper investment of pericytes in the microvessel wall. *Genes Dev.* 2003 Aug 1;17(15):1835-40.
264. Gee JR, Keller JN. Astrocytes: regulation of brain homeostasis via apolipoprotein E. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005 Jun;37(6):1145-50.
265. Mathiisen TM, Lehre KP, Danbolt NC, Ottersen OP. The perivascular astroglial sheath provides a complete covering of the brain microvessels: an electron microscopic 3D reconstruction. *Glia.* 2010 Jul;58(9):1094-103.
266. Talts JF, Andac Z, Göhring W, Brancaccio A, Timpl R. Binding of the G domains of laminin alpha1 and alpha2 chains and perlecan to heparin, sulfatides, alpha-dystroglycan and several extracellular matrix proteins. *EMBO J.* 1999 Feb 15;18(4):863-70.
267. Landis DM, Reese TS. Arrays of particles in freeze-fractured astrocytic membranes. *J Cell Biol.* 1974 Jan;60(1):316-20.
268. Warth A, Kröger S, Wolburg H. Redistribution of aquaporin-4 in human glioblastoma correlates with loss of agrin immunoreactivity from brain capillary basal laminae. *Acta Neuropathol.* 2004 Apr;107(4):311-8.
269. Noell S, Fallier-Becker P, Deutsch U, Mack AF, Wolburg H. Agrin defines polarized distribution of orthogonal arrays of particles in astrocytes. *Cell Tissue Res.* 2009 Aug;337(2):185-95.
270. Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci.* 2006 Jan;7(1):41-53.
271. Hayashi Y, Nomura M, Yamagishi S, Harada S, Yamashita J, Yamamoto H. Induction of various blood-brain barrier properties in non-neural endothelial cells by close apposition to co-cultured astrocytes. *Glia.* 1997 Jan;19(1):13-26.

272. Sun D, Lytle C, O'Donnell ME. IL-6 secreted by astroglial cells regulates Na-K-Cl cotransport in brain microvessel endothelial cells. *Am J Physiol.* 1997 Jun;272(6 Pt 1):C1829-35.
273. Igarashi Y, Utsumi H, Chiba H, Yamada-Sasamori Y, Tobioka H, Kamimura Y, Furuuchi K, Kokai Y, Nakagawa T, Mori M, Sawada N. Glial cell line-derived neurotrophic factor induces barrier function of endothelial cells forming the blood-brain barrier. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999 Jul 22;261(1):108-12.
274. Sobue K, Yamamoto N, Yoneda K, Hodgson ME, Yamashiro K, Tsuruoka N, Tsuda T, Katsuya H, Miura Y, Asai K, Kato T. Induction of blood-brain barrier properties in immortalized bovine brain endothelial cells by astrocytic factors. *Neurosci Res.* 1999 Nov;35(2):155-64.
275. McAllister MS, Krizanac-Bengez L, Macchia F, Naftalin RJ, Pedley KC, Mayberg MR, Marroni M, Leaman S, Stanness KA, Janigro D. Mechanisms of glucose transport at the blood-brain barrier: an in vitro study. *Brain Res.* 2001 Jun 15;904(1):20-30.
276. Colgan OC, Collins NT, Ferguson G, Murphy RP, Birney YA, Cahill PA, Cummins PM. Influence of basolateral condition on the regulation of brain microvascular endothelial tight junction properties and barrier function. *Brain Res.* 2008 Feb 8;1193:84-92.
277. Hafezi-Moghadam A, Thomas KL, Wagner DD. ApoE deficiency leads to a progressive age-dependent blood-brain barrier leakage. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007 Apr;292(4):C1256-62.
278. Wosik K, Cayrol R, Dodelet-Devillers A, Berthelet F, Bernard M, Moundjian R, Bouthillier A, Reudelhuber TL, Prat A. Angiotensin II controls occludin function and is required for blood brain barrier maintenance: relevance to multiple sclerosis. *J Neurosci.* 2007 Aug 22;27(34):9032-42.
279. Mizee MR, Nijland PG, van der Pol SM, Drexhage JA, van Het Hof B, Mebius R, van der Valk P, van Horssen J, Reijkerkerk A, de Vries HE. Astrocyte-derived retinoic acid: a novel regulator of blood-brain barrier function in multiple sclerosis. *Acta Neuropathol.* 2014 Nov;128(5):691-703.
280. Spampinato SF, Obermeier B, Cotleur A, Love A, Takeshita Y, Sano Y, Kanda T, Ransohoff RM. Sphingosine 1 Phosphate at the Blood Brain Barrier: Can the Modulation of S1P Receptor 1 Influence the Response of Endothelial Cells and Astrocytes to Inflammatory Stimuli? *PLoS One.* 2015 Jul 21;10(7):e0133392.
281. Allt G, Lawrenson JG. Is the pial microvessel a good model for blood-brain barrier studies? *Brain Res Brain Res Rev.* 1997 Jun;24(1):67-76.
282. Baeten KM, Akassoglou K. Extracellular matrix and matrix receptors in blood-brain barrier formation and stroke. *Dev Neurobiol.* 2011 Nov;71(11):1018-39.
283. Handel TM, Johnson Z, Crown SE, Lau EK, Proudfoot AE. Regulation of protein function by glycosaminoglycans--as exemplified by chemokines. *Annu Rev Biochem.* 2005;74:385-410.
284. Proudfoot AE. The biological relevance of chemokine-proteoglycan interactions. *Biochem Soc Trans.* 2006 Jun;34(Pt 3):422-6.
285. Zovein AC, Luque A, Turlo KA, Hofmann JJ, Yee KM, Becker MS, Fassler R, Mellman I, Lane TF, Iruela-Arispe ML. Beta1 integrin establishes endothelial cell polarity and arteriolar lumen formation via a Par3-dependent mechanism. *Dev Cell.* 2010 Jan 19;18(1):39-51.
286. Dore-Duffy P, Cleary K. Morphology and properties of pericytes. *Methods Mol Biol.* 2011;686:49-68.

287. Yao Y, Chen ZL, Norris EH, Strickland S. Astrocytic laminin regulates pericyte differentiation and maintains blood brain barrier integrity. *Nat Commun.* 2014 Mar 3;5:3413.
288. Sixt M, Engelhardt B, Pausch F, Hallmann R, Wendler O, Sorokin LM. Endothelial cell laminin isoforms, laminins 8 and 10, play decisive roles in T cell recruitment across the blood-brain barrier in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Cell Biol.* 2001 May 28;153(5):933-46.
289. Zlokovic BV. Neurovascular mechanisms of Alzheimer's neurodegeneration. *Trends Neurosci.* 2005 Apr;28(4):202-8.
290. Leybaert L. Neurobarrier coupling in the brain: a partner of neurovascular and neurometabolic coupling? *J Cereb Blood Flow Metab.* 2005 Jan;25(1):2-16.
291. Cohen Z, Bonvento G, Lacombe P, Hamel E. Serotonin in the regulation of brain microcirculation. *Prog Neurobiol.* 1996 Nov;50(4):335-62.
292. Cohen Z, Molinatti G, Hamel E. Astroglial and vascular interactions of noradrenaline terminals in the rat cerebral cortex. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1997 Aug;17(8):894-904.
293. Tong XK, Hamel E. Regional cholinergic denervation of cortical microvessels and nitric oxide synthase-containing neurons in Alzheimer's disease. *Neuroscience.* 1999;92(1):163-75.
294. Vaucher E, Tong XK, Cholet N, Lantin S, Hamel E. GABA neurons provide a rich input to microvessels but not nitric oxide neurons in the rat cerebral cortex: a means for direct regulation of local cerebral blood flow. *J Comp Neurol.* 2000 May 29;421(2):161-71.
295. Sarmiento A, Borges N, Lima D. Influence of electrical stimulation of locus coeruleus on the rat blood-brain barrier permeability to sodium fluorescein. *Acta Neurochir (Wien).* 1994;127(3-4):215-9.
296. Hall CN, Reynell C, Gesslein B, Hamilton NB, Mishra A, Sutherland BA, O'Farrell FM, Buchan AM, Lauritzen M, Attwell D. Capillary pericytes regulate cerebral blood flow in health and disease. *Nature.* 2014 Apr 3;508(7494):55-60.
297. Ransohoff RM, Cardona AE. The myeloid cells of the central nervous system parenchyma. *Nature.* 2010 Nov 11;468(7321):253-62.
298. Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, Nandi S, See P, Gokhan S, Mehler MF, Conway SJ, Ng LG, Stanley ER, Samokhvalov IM, Merad M. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science.* 2010 Nov 5;330(6005):841-5.
299. Fantin A, Vieira JM, Gestri G, Denti L, Schwarz Q, Prykhodzhiy S, Peri F, Wilson SW, Ruhrberg C. Tissue macrophages act as cellular chaperones for vascular anastomosis downstream of VEGF-mediated endothelial tip cell induction. *Blood.* 2010 Aug 5;116(5):829-40.
300. Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim JV, Zuo Y, Jung S, Littman DR, Dustin ML, Gan WB. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci.* 2005 Jun;8(6):752-8.
301. Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science.* 2005 May 27;308(5726):1314-8.
302. Aguzzi A, Barres BA, Bennett ML. Microglia: scapegoat, saboteur, or something else? *Science.* 2013 Jan 11;339(6116):156-61.
303. Bachiller S, Jiménez-Ferrer I, Paulus A, Yang Y, Swanberg M, Deierborg T, Boza-Serrano A. Microglia in Neurological Diseases: A Road Map to Brain-Disease Dependent-Inflammatory Response. *Front Cell Neurosci.* 2018 Dec 18;12:488.

304. Lee J, Hamanaka G, Lo EH, Arai K. Heterogeneity of microglia and their differential roles in white matter pathology. *CNS Neurosci Ther.* 2019 Dec;25(12):1290-1298.
305. Subramaniam SR, Federoff HJ. Targeting Microglial Activation States as a Therapeutic Avenue in Parkinson's Disease. *Front Aging Neurosci.* 2017 Jun 8;9:176.
306. Akhmetzyanova E, Kletenkov K, Mukhamedshina Y, Rizvanov A. Different Approaches to Modulation of Microglia Phenotypes After Spinal Cord Injury. *Front Syst Neurosci.* 2019 Aug 27;13:37.
307. Mehrabadi AR, Korolainen MA, Odero G, Miller DW, Kauppinen TM. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 regulates microglia mediated decrease of endothelial tight junction integrity. *Neurochem Int.* 2017 Sep;108:266-271.
308. Chen AQ, Fang Z, Chen XL, Yang S, Zhou YF, Mao L, Xia YP, Jin HJ, Li YN, You MF, Wang XX, Lei H, He QW, Hu B. Microglia-derived TNF-alpha mediates endothelial necroptosis aggravating blood brain-barrier disruption after ischemic stroke. *Cell Death Dis.* 2019 Jun 20;10(7):487.
309. Bowyer JF, Sarkar S, Tranter KM, Hanig JP, Miller DB, O'Callaghan JP. Vascular-directed responses of microglia produced by methamphetamine exposure: indirect evidence that microglia are involved in vascular repair? *J Neuroinflammation.* 2016 Mar 12;13(1):64.
310. Smith JA, Das A, Ray SK, Banik NL. Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in neurodegenerative diseases. *Brain Res Bull.* 2012 Jan 4;87(1):10-20.
311. Ritzel RM, Patel AR, Grenier JM, Crapser J, Verma R, Jellison ER, McCullough LD. Functional differences between microglia and monocytes after ischemic stroke. *J Neuroinflammation.* 2015 May 29;12:106.
312. Haddick PC, Larson JL, Rathore N, Bhangale TR, Phung QT, Srinivasan K, Hansen DV, Lill JR; Alzheimer's Disease Genetic Consortium (ADGC), Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (ADNI), Pericak-Vance MA, Haines J, Farrer LA, Kauwe JS, Schellenberg GD, Cruchaga C, Goate AM, Behrens TW, Watts RJ, Graham RR, Kaminker JS, van der Brug M. A Common Variant of IL-6R is Associated with Elevated IL-6 Pathway Activity in Alzheimer's Disease Brains. *J Alzheimers Dis.* 2017;56(3):1037-1054.
313. Na W, Shin JY, Lee JY, Jeong S, Kim WS, Yune TY, Ju BG. Dexamethasone suppresses JMJD3 gene activation via a putative negative glucocorticoid response element and maintains integrity of tight junctions in brain microvascular endothelial cells. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2017 Dec;37(12):3695-3708.
314. Bonetti NR, Diaz-Cañestro C, Liberale L, Crucet M, Akhmedov A, Merlini M, Reiner MF, Gobbato S, Stivala S, Kollias G, Ruschitzka F, Lüscher TF, Beer JH, Camici GG. Tumour Necrosis Factor-alpha Inhibition Improves Stroke Outcome in a Mouse Model of Rheumatoid Arthritis. *Sci Rep.* 2019 Feb 18;9(1):2173.
315. Edwards DN, Salmeron K, Lukins DE, Trout AL, Fraser JF, Bix GJ. Integrin alpha5beta1 inhibition by ATN-161 reduces neuroinflammation and is neuroprotective in ischemic stroke. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2020 Aug;40(8):1695-1708.
316. Raymond AD, Diaz P, Chevelon S, Agudelo M, Yndart-Arias A, Ding H, Kaushik A, Jayant RD, Nikkhah-Moshaie R, Roy U, Pilakka-Kanthikeel S, Nair MP. Microglia-derived HIV Nef+ exosome impairment of the blood-brain barrier is treatable by nanomedicine-based delivery of Nef peptides. *J Neurovirol.* 2016 Apr;22(2):129-39.

317. Poller B, Drewe J, Krähenbühl S, Huwyler J, Gutmann H. Regulation of BCRP (ABCG2) and P-glycoprotein (ABCB1) by cytokines in a model of the human blood-brain barrier. *Cell Mol Neurobiol.* 2010 Jan;30(1):63-70.
318. Inose Y, Kato Y, Kitagawa K, Uchiyama S, Shibata N. Activated microglia in ischemic stroke penumbra upregulate MCP-1 and CCR2 expression in response to lysophosphatidylcholine derived from adjacent neurons and astrocytes. *Neuropathology.* 2015 Jun;35(3):209-23.
319. Saresella M, Marventano I, Calabrese E, Piancone F, Rainone V, Gatti A, Alberoni M, Nemni R, Clerici M. A complex proinflammatory role for peripheral monocytes in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2014;38(2):403-13.
320. Abe N, Choudhury ME, Watanabe M, Kawasaki S, Nishihara T, Yano H, Matsumoto S, Kunieda T, Kumon Y, Yorozuya T, Tanaka J. Comparison of the detrimental features of microglia and infiltrated macrophages in traumatic brain injury: A study using a hypnotic bromovalerylurea. *Glia.* 2018 Oct;66(10):2158-2173.
321. Lochhead JJ, McCaffrey G, Sanchez-Covarrubias L, Finch JD, Demarco KM, Quigley CE, Davis TP, Ronaldson PT. Tempol modulates changes in xenobiotic permeability and occludin oligomeric assemblies at the blood-brain barrier during inflammatory pain. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2012 Feb 1;302(3):H582-93.
322. Jian YP, Dong SJ, Xu SS, Fan J, Liu WJ, Shao XW, Li T, Zhao SH, Wang YG. MicroRNA-34a suppresses neuronal apoptosis and alleviates microglia inflammation by negatively targeting the Notch pathway in spinal cord injury. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2020 Feb;24(3):1420-1427.
323. Thompson BJ, Ronaldson PT. Drug delivery to the ischemic brain. *Adv Pharmacol.* 2014;71:165-202.
324. Heo JH, Han SW, Lee SK. Free radicals as triggers of brain edema formation after stroke. *Free Radic Biol Med.* 2005 Jul 1;39(1):51-70.
325. Michell-Robinson MA, Touil H, Healy LM, Owen DR, Durafourt BA, Bar-Or A, Antel JP, Moore CS. Roles of microglia in brain development, tissue maintenance and repair. *Brain.* 2015 May;138(Pt 5):1138-59.
326. Zhang L, Lu X, Gong L, Cui L, Zhang H, Zhao W, Jiang P, Hou G, Hou Y. Tetramethylpyrazine Protects Blood-Spinal Cord Barrier Integrity by Modulating Microglia Polarization Through Activation of STAT3/SOCS3 and Inhibition of NF- $\kappa$ B Signaling Pathways in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Mice. *Cell Mol Neurobiol.* 2021 May;41(4):717-731.
327. Perez-Moreno M, Fuchs E. Catenins: keeping cells from getting their signals crossed. *Dev Cell.* 2006 Nov;11(5):601-12.
328. Tsukita S, Furuse M, Itoh M. Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001 Apr;2(4):285-93.
329. Hartsock A, Nelson WJ. Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochim Biophys Acta.* 2008 Mar;1778(3):660-9.
330. Fanning AS, Jameson BJ, Jesaitis LA, Anderson JM. The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem.* 1998 Nov 6;273(45):29745-53.
331. Fanning AS, Little BP, Rahner C, Utepbergenov D, Walther Z, Anderson JM. The unique-5 and -6 motifs of ZO-1 regulate tight junction strand localization and scaffolding properties. *Mol Biol Cell.* 2007 Mar;18(3):721-31.
332. Ikenouchi J, Furuse M, Furuse K, Sasaki H, Tsukita S, Tsukita S. Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. *J Cell Biol.* 2005 Dec 19;171(6):939-45.

333. Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S, Tsukita S. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol.* 1993 Dec;123(6 Pt 2):1777-88.
334. Muresan Z, Paul DL, Goodenough DA. Occludin 1B, a variant of the tight junction protein occludin. *Mol Biol Cell.* 2000 Feb;11(2):627-34.
335. Furuse M, Fujimoto K, Sato N, Hirase T, Tsukita S, Tsukita S. Overexpression of occludin, a tight junction-associated integral membrane protein, induces the formation of intracellular multilamellar bodies bearing tight junction-like structures. *J Cell Sci.* 1996 Feb;109 ( Pt 2):429-35.
336. Balda MS, Whitney JA, Flores C, González S, Cereijido M, Matter K. Functional dissociation of paracellular permeability and transepithelial electrical resistance and disruption of the apical-basolateral intramembrane diffusion barrier by expression of a mutant tight junction membrane protein. *J Cell Biol.* 1996 Aug;134(4):1031-49.
337. Saitou M, Fujimoto K, Doi Y, Itoh M, Fujimoto T, Furuse M, Takano H, Noda T, Tsukita S. Occludin-deficient embryonic stem cells can differentiate into polarized epithelial cells bearing tight junctions. *J Cell Biol.* 1998 Apr 20;141(2):397-408.
338. Saitou M, Furuse M, Sasaki H, Schulzke JD, Fromm M, Takano H, Noda T, Tsukita S. Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Mol Biol Cell.* 2000 Dec;11(12):4131-42.
339. Cummins PM. Occludin: one protein, many forms. *Mol Cell Biol.* 2012 Jan;32(2):242-50.
340. Sakakibara A, Furuse M, Saitou M, Ando-Akatsuka Y, Tsukita S. Possible involvement of phosphorylation of occludin in tight junction formation. *J Cell Biol.* 1997 Jun 16;137(6):1393-401.
341. Chen Yh, Lu Q, Schneeberger EE, Goodenough DA. Restoration of tight junction structure and barrier function by down-regulation of the mitogen-activated protein kinase pathway in ras-transformed Madin-Darby canine kidney cells. *Mol Biol Cell.* 2000 Mar;11(3):849-62.
342. Morgan L, Shah B, Rivers LE, Barden L, Groom AJ, Chung R, Higazi D, Desmond H, Smith T, Staddon JM. Inflammation and dephosphorylation of the tight junction protein occludin in an experimental model of multiple sclerosis. *Neuroscience.* 2007 Jul 13;147(3):664-73.
343. Blasig IE, Bellmann C, Cording J, Del Vecchio G, Zwanziger D, Huber O, Haseloff RF. Occludin protein family: oxidative stress and reducing conditions. *Antioxid Redox Signal.* 2011 Sep 1;15(5):1195-219.
344. Mineta K, Yamamoto Y, Yamazaki Y, Tanaka H, Tada Y, Saito K, Tamura A, Igarashi M, Endo T, Takeuchi K, Tsukita S. Predicted expansion of the claudin multigene family. *FEBS Lett.* 2011 Feb 18;585(4):606-12.
345. Morita K, Furuse M, Fujimoto K, Tsukita S. Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Jan 19;96(2):511-6.
346. Krause G, Winkler L, Piehl C, Blasig I, Piontek J, Müller SL. Structure and function of extracellular claudin domains. *Ann N Y Acad Sci.* 2009 May;1165:34-43.
347. Krause G, Winkler L, Mueller SL, Haseloff RF, Piontek J, Blasig IE. Structure and function of claudins. *Biochim Biophys Acta.* 2008 Mar;1778(3):631-45.
348. Tang VW, Goodenough DA. Paracellular ion channel at the tight junction. *Biophys J.* 2003 Mar;84(3):1660-73.

349. Wen H, Watry DD, Marcondes MC, Fox HS. Selective decrease in paracellular conductance of tight junctions: role of the first extracellular domain of claudin-5. *Mol Cell Biol*. 2004 Oct;24(19):8408-17.
350. Nitta T, Hata M, Gotoh S, Seo Y, Sasaki H, Hashimoto N, Furuse M, Tsukita S. Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *J Cell Biol*. 2003 May 12;161(3):653-60.
351. Günzel D, Yu AS. Claudins and the modulation of tight junction permeability. *Physiol Rev*. 2013 Apr;93(2):525-69.
352. Martìn-Padura I, Lostaglio S, Schneemann M, Williams L, Romano M, Fruscella P, Panzeri C, Stoppacciaro A, Ruco L, Villa A, Simmons D, Dejana E. Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J Cell Biol*. 1998 Jul 13;142(1):117-27.
353. Ebnet K, Schulz CU, Meyer Zu Brickwedde MK, Pendl GG, Vestweber D. Junctional adhesion molecule interacts with the PDZ domain-containing proteins AF-6 and ZO-1. *J Biol Chem*. 2000 Sep 8;275(36):27979-88.
354. Bazzoni G, Martinez-Estrada OM, Orsenigo F, Cordenonsi M, Citi S, Dejana E. Interaction of junctional adhesion molecule with the tight junction components ZO-1, cingulin, and occludin. *J Biol Chem*. 2000 Jul 7;275(27):20520-6.
355. Weber C, Fraemohs L, Dejana E. The role of junctional adhesion molecules in vascular inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2007 Jun;7(6):467-77.
356. Itoh M, Sasaki H, Furuse M, Ozaki H, Kita T, Tsukita S. Junctional adhesion molecule (JAM) binds to PAR-3: a possible mechanism for the recruitment of PAR-3 to tight junctions. *J Cell Biol*. 2001 Aug 6;154(3):491-7.
357. Aurrand-Lions M, Lamagna C, Dangerfield JP, Wang S, Herrera P, Nourshargh S, Imhof BA. Junctional adhesion molecule-C regulates the early influx of leukocytes into tissues during inflammation. *J Immunol*. 2005 May 15;174(10):6406-15.
358. Bradfield PF, Nourshargh S, Aurrand-Lions M, Imhof BA. JAM family and related proteins in leukocyte migration (Vestweber series). *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007 Oct;27(10):2104-12.
359. Funke L, Dakoji S, Brecht DS. Membrane-associated guanylate kinases regulate adhesion and plasticity at cell junctions. *Annu Rev Biochem*. 2005;74:219-45.
360. Utepbergenov DI, Fanning AS, Anderson JM. Dimerization of the scaffolding protein ZO-1 through the second PDZ domain. *J Biol Chem*. 2006 Aug 25;281(34):24671-7.
361. Wittchen ES, Haskins J, Stevenson BR. Protein interactions at the tight junction. Actin has multiple binding partners, and ZO-1 forms independent complexes with ZO-2 and ZO-3. *J Biol Chem*. 1999 Dec 3;274(49):35179-85.
362. Itoh M, Nagafuchi A, Moroi S, Tsukita S. Involvement of ZO-1 in cadherin-based cell adhesion through its direct binding to alpha catenin and actin filaments. *J Cell Biol*. 1997 Jul 14;138(1):181-92.
363. Müller SL, Portwich M, Schmidt A, Utepbergenov DI, Huber O, Blasig IE, Krause G. The tight junction protein occludin and the adherens junction protein alpha-catenin share a common interaction mechanism with ZO-1. *J Biol Chem*. 2005 Feb 4;280(5):3747-56.
364. Rajasekaran AK, Hojo M, Huima T, Rodriguez-Boulan E. Catenins and zonula occludens-1 form a complex during early stages in the assembly of tight junctions. *J Cell Biol*. 1996 Feb;132(3):451-63.
365. Itoh M, Morita K, Tsukita S. Characterization of ZO-2 as a MAGUK family member associated with tight as well as adherens junctions with a binding affinity to occludin and alpha catenin. *J Biol Chem*. 1999 Feb 26;274(9):5981-6.



366. Wittchen ES, Haskins J, Stevenson BR. NZO-3 expression causes global changes to actin cytoskeleton in Madin-Darby canine kidney cells: linking a tight junction protein to Rho GTPases. *Mol Biol Cell*. 2003 May;14(5):1757-68.
367. Furuse M, Itoh M, Hirase T, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S, Tsukita S. Direct association of occludin with ZO-1 and its possible involvement in the localization of occluding at tight junctions. *J Cell Biol*. 1994 Dec;127(6 Pt 1):1617-26.
368. Wittchen ES, Haskins J, Stevenson BR. Exogenous expression of the amino-terminal half of the tight junction protein ZO-3 perturbs junctional complex assembly. *J Cell Biol*. 2000 Nov 13;151(4):825-36.
369. Mattagajasingh SN, Huang SC, Hartenstein JS, Benz EJ Jr. Characterization of the interaction between protein 4.1R and ZO-2. A possible link between the tight junction and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem*. 2000 Sep 29;275(39):30573-85.
370. Andreini C, Banci L, Bertini I, Rosato A. Counting the zinc-proteins encoded in the human genome. *J Proteome Res*. 2006 Jan;5(1):196-201.
371. Zhou X, Sun X, Cooper KL, Wang F, Liu KJ, Hudson LG. Arsenite interacts selectively with zinc finger proteins containing C3H1 or C4 motifs. *J Biol Chem*. 2011 Jul 1;286(26):22855-63.
372. Zhou X, Cooper KL, Sun X, Liu KJ, Hudson LG. Selective Sensitization of Zinc Finger Protein Oxidation by Reactive Oxygen Species through Arsenic Binding. *J Biol Chem*. 2015 Jul 24;290(30):18361-9.
373. Blackshear PJ, Perera L. Phylogenetic distribution and evolution of the linked RNA-binding and NOT1-binding domains in the tristetraprolin family of tandem CCCH zinc finger proteins. *J Interferon Cytokine Res*. 2014 Apr;34(4):297-306.
374. Ding X, Zhou X, Cooper KL, Huestis J, Hudson LG, Liu KJ. Differential sensitivities of cellular XPA and PARP-1 to arsenite inhibition and zinc rescue. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2017 Sep 15;331:108-115.
375. Huestis J, Zhou X, Chen L, Feng C, Hudson LG, Liu KJ. Kinetics and thermodynamics of zinc(II) and arsenic(III) binding to XPA and PARP-1 zinc finger peptides. *J Inorg Biochem*. 2016 Oct;163:45-52.
376. Khmeleva SA, Mezentsev YV, Kozin SA, Tsvetkov PO, Ivanov AS, Bodoev NV, Makarov AA, Radko SP. Zinc-induced interaction of the metal-binding domain of amyloid-beta peptide with DNA. *J Alzheimers Dis*. 2013;36(4):633-6.
377. Nyborg JK, Peersen OB. That zinging feeling: the effects of EDTA on the behaviour of zinc-binding transcriptional regulators. *Biochem J*. 2004 Aug 1;381(Pt 3):e3-4.
378. Zhou X, Cooper KL, Huestis J, Xu H, Burchiel SW, Hudson LG, Liu KJ. S-nitrosation on zinc finger motif of PARP-1 as a mechanism of DNA repair inhibition by arsenite. *Oncotarget*. 2016 Dec 6;7(49):80482-80492.
379. Hess SY, Peerson JM, King JC, Brown KH. Use of serum zinc concentration as an indicator of population zinc status. *Food Nutr Bull*. 2007 Sep;28(3 Suppl):S403-29.
380. Blindauer CA, Harvey I, Bunyan KE, Stewart AJ, Sleep D, Harrison DJ, Berezenko S, Sadler PJ. Structure, properties, and engineering of the major zinc binding site on human albumin. *J Biol Chem*. 2009 Aug 21;284(34):23116-24. doi: 10.1074/jbc.M109.003459.
381. Foote JW, Delves HT. Albumin bound and alpha 2-macroglobulin bound zinc concentrations in the sera of healthy adults. *J Clin Pathol*. 1984 Sep;37(9):1050-4.
382. Pinna K, Woodhouse LR, Sutherland B, Shames DM, King JC. Exchangeable zinc pool masses and turnover are maintained in healthy men with low zinc intakes. *J Nutr*. 2001 Sep;131(9):2288-94.

383. Hernell O, Lönnerdal B. Nutritional evaluation of protein hydrolysate formulas in healthy term infants: plasma amino acids, hematology, and trace elements. *Am J Clin Nutr.* 2003 Aug;78(2):296-301.
384. Samman S, Crossett B, Somers M, Bell KJ, Lai NT, Sullivan DR, Petocz P. Metabolic profiling of plasma amino acids shows that histidine increases following the consumption of pork. *Diabetes Metab Syndr Obes.* 2014 Jun 19;7:203-10.
385. Blakemore LJ, Trombly PQ. Zinc as a Neuromodulator in the Central Nervous System with a Focus on the Olfactory Bulb. *Front Cell Neurosci.* 2017 Sep 21;11:297.
386. Corceiro VN, Bastos FC, Matias CM, Dionísio JC, Santos RM, Rosario LM, Quinta-Ferreira RM, Quinta-Ferreira MEC. Sulfamethoxazole induces zinc changes at hippocampal mossy fiber synapses from pregnant rats. *Gen Physiol Biophys.* 2018 Mar;37(2):213-221.
387. Kennedy RH, Wiqas A, Curley JP. Evidence for mast cell-mediated zinc homeostasis: Increased labile zinc in the hippocampus of mast-cell deficient mice. *Neurosci Lett.* 2017 May 22;650:139-145.
388. Nam SM, Kim JW, Kwon HJ, Yoo DY, Jung HY, Kim DW, Hwang IK, Seong JK, Yoon YS. Differential Effects of Low- and High-dose Zinc Supplementation on Synaptic Plasticity and Neurogenesis in the Hippocampus of Control and High-fat Diet-fed Mice. *Neurochem Res.* 2017 Nov;42(11):3149-3159.
389. Frederickson CJ, Suh SW, Silva D, Frederickson CJ, Thompson RB. Importance of zinc in the central nervous system: the zinc-containing neuron. *J Nutr.* 2000 May;130(5S Suppl):1471S-83S.
390. Marger L, Schubert CR, Bertrand D. Zinc: an underappreciated modulatory factor of brain function. *Biochem Pharmacol.* 2014 Oct 15;91(4):426-35.
391. Szewczyk B. Zinc homeostasis and neurodegenerative disorders. *Front Aging Neurosci.* 2013 Jul 19;5:33.
392. Berger ML, O'Leary JL. Zinc distribution in mouse brain subsequent to hippocampal lesions. *Arch Neurol.* 1975 May;32(5):295-7.
393. Khan MZ. A possible significant role of zinc and GPR39 zinc sensing receptor in Alzheimer disease and epilepsy. *Biomed Pharmacother.* 2016 Apr;79:263-72.
394. Morris DR, Levenson CW. Ion channels and zinc: mechanisms of neurotoxicity and neurodegeneration. *J Toxicol.* 2012;2012:785647.
395. Ordak M, Bulska E, Jablonka-Salach K, Luciuk A, Maj-Żurawska M, Matsumoto H, Nasierowski T, Wojnar M, Matras J, Muszynska E, Bujalska-Zadrozny M. Effect of Disturbances of Zinc and Copper on the Physical and Mental Health Status of Patients with Alcohol Dependence. *Biol Trace Elem Res.* 2018 May;183(1):9-15.
396. Pochwat B, Nowak G, Szewczyk B. Relationship between Zinc (Zn (2+) ) and Glutamate Receptors in the Processes Underlying Neurodegeneration. *Neural Plast.* 2015;2015:591563.
397. Blair-West JR, Denton DA, Gibson AP, McKinley MJ. Opening the blood-brain barrier to zinc. *Brain Res.* 1990 Jan 15;507(1):6-10.
398. Furuta S, Suzuki M, Toyama S, Miwa M, Sano H. Tissue distribution of polaprezinc in rats determined by the double tracer method. *J Pharm Biomed Anal.* 1999 Mar;19(3-4):453-61.
399. Pullen RG, Franklin PA, Hall GH. <sup>65</sup>Zn uptake from blood into brain in the rat. *J Neurochem.* 1991 Feb;56(2):485-9.
400. Colvin RA, Davis N, Nipper RW, Carter PA. Zinc transport in the brain: routes of zinc influx and efflux in neurons. *J Nutr.* 2000 May;130(5S Suppl):1484S-7S.

401. Colvin RA, Fontaine CP, Laskowski M, Thomas D. Zn<sup>2+</sup> transporters and Zn<sup>2+</sup> homeostasis in neurons. *Eur J Pharmacol*. 2003 Oct 31;479(1-3):171-85.
402. Di Cello F, Siddharthan V, Paul-Satyaseela M, Kim KS. Divergent effects of zinc depletion in brain vs non-brain endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 Sep 23;335(2):373-6.
403. Branca JJV, Morucci G, Pacini A. Cadmium-induced neurotoxicity: still much ado. *Neural Regen Res*. 2018 Nov;13(11):1879-1882.
404. Branca JJV, Fiorillo C, Carrino D, Paternostro F, Taddei N, Gulisano M, Pacini A, Becatti M. Cadmium-Induced Oxidative Stress: Focus on the Central Nervous System. *Antioxidants (Basel)*. 2020 Jun 5;9(6):492.
405. Branca JJV, Maresca M, Morucci G, Mello T, Becatti M, Pazzagli L, Colzi I, Gonnelli C, Carrino D, Paternostro F, Nicoletti C, Ghelardini C, Gulisano M, Di Cesare Mannelli L, Pacini A. Effects of Cadmium on ZO-1 Tight Junction Integrity of the Blood Brain Barrier. *Int J Mol Sci*. 2019 Nov 29;20(23):6010.
406. Arigony AL, de Oliveira IM, Machado M, Bordin DL, Bergter L, Prá D, Henriques JA. The influence of micronutrients in cell culture: a reflection on viability and genomic stability. *Biomed Res Int*. 2013;2013:597282.
407. Barrouillet MP, Ohayon-Courtès C, Dubus I, L'Azou B, Nguyen Ba C. Influence of cadmium speciation for the evaluation of in vitro cadmium toxicity on LLC-PK(1) cells. *Toxicol In Vitro*. 2001 Aug-Oct;15(4-5):525-9.
408. Lee AS. The ER chaperone and signaling regulator GRP78/BiP as a monitor of endoplasmic reticulum stress. *Methods*. 2005 Apr;35(4):373-81.
409. Dkhil MA, Al-Quraishy S, Diab MM, Othman MS, Aref AM, Abdel Moneim AE. The potential protective role of *Physalis peruviana* L. fruit in cadmium-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity. *Food Chem Toxicol*. 2014 Dec;74:98-106.
410. Obeng-Gyasi E. Chronic cadmium exposure and cardiovascular disease in adults. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng*. 2020;55(6):726-729.
411. Mouro VGS, Siman VA, da Silva J, Dias FCR, Damasceno EM, Cupertino MDC, de Melo FCSA, da Matta SLP. Cadmium-Induced Testicular Toxicity in Mice: Subacute and Subchronic Route-Dependent Effects. *Biol Trace Elem Res*. 2020 Feb;193(2):466-482.
412. Kim YO, Ahn YK, Kim JH. Influence of melatonin on immunotoxicity of cadmium. *Int J Immunopharmacol*. 2000 Apr;22(4):275-84.
413. Dong C. Protective Effect of Proanthocyanidins in Cadmium Induced Neurotoxicity in Mice. *Drug Res (Stuttg)*. 2015 Oct;65(10):555-60.
414. Gong DK, Liu BH, Tan XH. Genistein prevents cadmium-induced neurotoxic effects through its antioxidant mechanisms. *Drug Res (Stuttg)*. 2015 Feb;65(2):65-9.
415. Pari L, Shagirtha K. Hesperetin protects against oxidative stress related hepatic dysfunction by cadmium in rats. *Exp Toxicol Pathol*. 2012 Jul;64(5):513-20.
416. Galażyn-Sidorczuk M, Brzóška MM, Rogalska J, Roszczenko A, Jurczuk M. Effect of zinc supplementation on glutathione peroxidase activity and selenium concentration in the serum, liver and kidney of rats chronically exposed to cadmium. *J Trace Elem Med Biol*. 2012 Jan;26(1):46-52.
417. Wang J, Zhu H, Liu X, Liu Z. Oxidative stress and Ca<sup>(2+)</sup> signals involved on cadmium-induced apoptosis in rat hepatocyte. *Biol Trace Elem Res*. 2014 Nov;161(2):180-9.
418. Xu S, Pi H, Chen Y, Zhang N, Guo P, Lu Y, He M, Xie J, Zhong M, Zhang Y, Yu Z, Zhou Z. Cadmium induced Drp1-dependent mitochondrial fragmentation by disturbing calcium homeostasis in its hepatotoxicity. *Cell Death Dis*. 2013 Mar 14;4(3):e540.

419. Amamou F, Nemmiche S, Meziane RK, Didi A, Yazit SM, Chabane-Sari D. Protective effect of olive oil and colocynth oil against cadmium-induced oxidative stress in the liver of Wistar rats. *Food Chem Toxicol.* 2015 Apr;78:177-84.
420. Brzóska MM, Rogalska J, Roszczenko A, Galazyn-Sidorczuk M, Tomczyk M. The Mechanism of the Osteoprotective Action of a Polyphenol-Rich *Aronia melanocarpa* Extract during Chronic Exposure to Cadmium is Mediated by the Oxidative Defense System. *Planta Med.* 2016 May;82(7):621-31.
421. Jomova K, Valko M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology.* 2011 May 10;283(2-3):65-87.
422. Park S, Imlay JA. High levels of intracellular cysteine promote oxidative DNA damage by driving the fenton reaction. *J Bacteriol.* 2003 Mar;185(6):1942-50.
423. Winterbourn CC. Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction. *Toxicol Lett.* 1995 Dec;82-83:969-74.
424. Strlič M, Kolar J, Šelih V, Kočar D, Pihlara B. A comparative study of several transition metals in Fenton-like reaction systems at circum-neutral pH. *Acta Chim. Slov.* 2003, 50, 619–632.
425. Messner B, Türkcan A, Ploner C, Laufer G, Bernhard D. Cadmium overkill: autophagy, apoptosis and necrosis signalling in endothelial cells exposed to cadmium. *Cell Mol Life Sci.* 2016 Apr;73(8):1699-713.
426. Agnihotri SK, Agrawal U, Ghosh I. Brain most susceptible to cadmium induced oxidative stress in mice. *J Trace Elem Med Biol.* 2015 Apr;30:184-93.
427. Shila S, Kokilavani V, Subathra M, Panneerselvam C. Brain regional responses in antioxidant system to alpha-lipoic acid in arsenic intoxicated rat. *Toxicology.* 2005 May 15;210(1):25-36.
428. Saleh HM, El-Sayed YS, Naser SM, Eltahawy AS, Onoda A, Umezawa M. Efficacy of alpha-lipoic acid against cadmium toxicity on metal ion and oxidative imbalance, and expression of metallothionein and antioxidant genes in rabbit brain. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2017 Nov;24(31):24593-24601.
429. Cao Y, Chen A, Radcliffe J, Dietrich KN, Jones RL, Caldwell K, Rogan WJ. Postnatal cadmium exposure, neurodevelopment, and blood pressure in children at 2, 5, and 7 years of age. *Environ Health Perspect.* 2009 Oct;117(10):1580-6.
430. Czarnecki LA, Moberly AH, Turkel DJ, Rubinstein T, Pottackal J, Rosenthal MC, McCandlish EF, Buckley B, McGann JP. Functional rehabilitation of cadmium-induced neurotoxicity despite persistent peripheral pathophysiology in the olfactory system. *Toxicol Sci.* 2012 Apr;126(2):534-44.
431. Leret ML, Millán JA, Antonio MT. Perinatal exposure to lead and cadmium affects anxiety-like behaviour. *Toxicology.* 2003 Apr 15;186(1-2):125-30.
432. Boucherie S, Decaens C, Verbavatz JM, Grosse B, Erard M, Merola F, Cassio D, Combettes L. Cadmium disorganises the scaffolding of gap and tight junction proteins in the hepatic cell line WIF B9. *Biol Cell.* 2013 Dec;105(12):561-75.
433. Cao X, Lin H, Muskhelishvili L, Latendresse J, Richter P, Heflich RH. Tight junction disruption by cadmium in an in vitro human airway tissue model. *Respir Res.* 2015 Feb 21;16(1):30.
434. Hew KW, Heath GL, Jiwa AH, Welsh MJ. Cadmium in vivo causes disruption of tight junction-associated microfilaments in rat Sertoli cells. *Biol Reprod.* 1993 Oct;49(4):840-9.
435. Rusanov AL, Smirnova AV, Poromov AA, Fomicheva KA, Luzgina NG, Majouga AG. Effects of cadmium chloride on the functional state of human intestinal cells. *Toxicol In Vitro.* 2015 Aug;29(5):1006-11.
436. Hartwig A. Cadmium and cancer. *Met Ions Life Sci.* 2013;11:491-507.

437. Breckenridge DG, Germain M, Mathai JP, Nguyen M, Shore GC. Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways. *Oncogene*. 2003 Nov 24;22(53):8608-18.
438. Scorrano L, Oakes SA, Opferman JT, Cheng EH, Sorcinelli MD, Pozzan T, Korsmeyer SJ. BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>: a control point for apoptosis. *Science*. 2003 Apr 4;300(5616):135-9.
439. Rao RV, Peel A, Logvinova A, del Rio G, Hermel E, Yokota T, Goldsmith PC, Ellerby LM, Ellerby HM, Bredesen DE. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program: role of the ER chaperone GRP78. *FEBS Lett*. 2002 Mar 13;514(2-3):122-8.
440. Reddy RK, Dubeau L, Kleiner H, Parr T, Nichols P, Ko B, Dong D, Ko H, Mao C, DiGiovanni J, Lee AS. Cancer-inducible transgene expression by the Grp94 promoter: spontaneous activation in tumors of various origins and cancer-associated macrophages. *Cancer Res*. 2002 Dec 15;62(24):7207-12.
441. Lee AS. The glucose-regulated proteins: stress induction and clinical applications. *Trends Biochem Sci*. 2001 Aug;26(8):504-10.
442. Rutkowski DT, Hegde RS. Regulation of basal cellular physiology by the homeostatic unfolded protein response. *J Cell Biol*. 2010 May 31;189(5):783-94.
443. Hetz C. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012 Jan 18;13(2):89-102.
444. McLaughlin B, Hartnett KA, Erhardt JA, Legos JJ, White RF, Barone FC, Aizenman E. Caspase 3 activation is essential for neuroprotection in preconditioning. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Jan 21;100(2):715-20.
445. Shagirtha K, Muthumani M, Prabu SM. Melatonin abrogates cadmium induced oxidative stress related neurotoxicity in rats. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2011 Sep;15(9):1039-50.
446. Kanter M, Unsal C, Aktas C, Erboga M. Neuroprotective effect of quercetin against oxidative damage and neuronal apoptosis caused by cadmium in hippocampus. *Toxicol Ind Health*. 2016 Mar;32(3):541-50.
447. Adefegha SA, Omojokun OS, Oboh G, Fasakin O, Ogunsuyi O. Modulatory effects of ferulic acid on cadmium-induced brain damage. *J Evid Based Complementary Altern Med*. 2016 Oct;21(4):NP56-61.
448. Abib RT, Peres KC, Barbosa AM, Peres TV, Bernardes A, Zimmermann LM, Quincozes-Santos A, Fiedler HD, Leal RB, Farina M, Gottfried C. Epigallocatechin-3-gallate protects rat brain mitochondria against cadmium-induced damage. *Food Chem Toxicol*. 2011 Oct;49(10):2618-23.
449. Pari L, Murugavel P. Diallyl tetrasulfide improves cadmium induced alterations of acetylcholinesterase, ATPases and oxidative stress in brain of rats. *Toxicology*. 2007 May 5;234(1-2):44-50.
450. Nemmiche S, Chabane-Sari D, Guiraud P. Role of alpha-tocopherol in cadmium-induced oxidative stress in Wistar rat's blood, liver and brain. *Chem Biol Interact*. 2007 Dec 15;170(3):221-30.
451. El-Missiry MA, Shalaby F. Role of beta-carotene in ameliorating the cadmium-induced oxidative stress in rat brain and testis. *J Biochem Mol Toxicol*. 2000;14(5):238-43.
452. Eide DJ. The SLC39 family of metal ion transporters. *Pflugers Arch*. 2004 Feb;447(5):796-800.
453. He L, Wang B, Hay EB, Nebert DW. Discovery of ZIP transporters that participate in cadmium damage to testis and kidney. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2009 Aug 1;238(3):250-7.

454. Himeno S, Yanagiya T, Fujishiro H. The role of zinc transporters in cadmium and manganese transport in mammalian cells. *Biochimie*. 2009 Oct;91(10):1218-22.
455. Powell SR. The antioxidant properties of zinc. *J Nutr*. 2000 May;130(5S Suppl):1447S-54S.
456. Marreiro DD, Cruz KJ, Morais JB, Beserra JB, Severo JS, de Oliveira AR. Zinc and Oxidative Stress: Current Mechanisms. *Antioxidants (Basel)*. 2017 Mar 29;6(2):24.
457. Eide DJ. The oxidative stress of zinc deficiency. *Metallomics*. 2011 Nov;3(11):1124-9.
458. Pace NJ, Weerapana E. Zinc-binding cysteines: diverse functions and structural motifs. *Biomolecules*. 2014 Apr 17;4(2):419-34.
459. Truong-Tran AQ, Carter J, Ruffin R, Zalewski PD. New insights into the role of zinc in the respiratory epithelium. *Immunol Cell Biol*. 2001 Apr;79(2):170-7.
460. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007 Jun;35(4):495-516.
461. Franklin RB, Costello LC. The important role of the apoptotic effects of zinc in the development of cancers. *J Cell Biochem*. 2009 Apr 1;106(5):750-7.
462. Provinciali M, Di Stefano G, Fabris N. Dose-dependent opposite effect of zinc on apoptosis in mouse thymocytes. *Int J Immunopharmacol*. 1995 Sep;17(9):735-44.
463. Anathy V, Roberson EC, Guala AS, Godburn KE, Budd RC, Janssen-Heininger YM. Redox-based regulation of apoptosis: S-glutathionylation as a regulatory mechanism to control cell death. *Antioxid Redox Signal*. 2012 Mar 15;16(6):496-505.
464. Kannan K, Jain SK. Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiology*. 2000 Sep;7(3):153-163.
465. Zuo Y, Xiang B, Yang J, Sun X, Wang Y, Cang H, Yi J. Oxidative modification of caspase-9 facilitates its activation via disulfide-mediated interaction with Apaf-1. *Cell Res*. 2009 Apr;19(4):449-57.
466. Cao X, Fu M, Bi R, Zheng X, Fu B, Tian S, Liu C, Li Q, Liu J. Cadmium induced BEAS-2B cells apoptosis and mitochondria damage via MAPK signaling pathway. *Chemosphere*. 2021 Jan;263:128346.
467. Heimlich G, McKinnon AD, Bernardo K, Brdiczka D, Reed JC, Kain R, Krönke M, Jürgensmeier JM. Bax-induced cytochrome c release from mitochondria depends on alpha-helices-5 and -6. *Biochem J*. 2004 Feb 15;378(Pt 1):247-55.
468. Huber KL, Hardy JA. Mechanism of zinc-mediated inhibition of caspase-9. *Protein Sci*. 2012 Jul;21(7):1056-65.
469. Eron SJ, MacPherson DJ, Dagbay KB, Hardy JA. Multiple Mechanisms of Zinc-Mediated Inhibition for the Apoptotic Caspases-3, -6, -7, and -8. *ACS Chem Biol*. 2018 May 18;13(5):1279-1290.
470. Perry DK, Smyth MJ, Stennicke HR, Salvesen GS, Duriez P, Poirier GG, Hannun YA. Zinc is a potent inhibitor of the apoptotic protease, caspase-3. A novel target for zinc in the inhibition of apoptosis. *J Biol Chem*. 1997 Jul 25;272(30):18530-3.
471. Milani P, Ambrosi G, Gammoh O, Blandini F, Cereda C. SOD1 and DJ-1 converge at Nrf2 pathway: a clue for antioxidant therapeutic potential in neurodegeneration. *Oxid Med Cell Longev*. 2013;2013:836760.
472. Abdel Moneim AE, Bauomy AA, Diab MM, Shata MT, Al-Olayan EM, El-Khadragy MF. The protective effect of *Physalis peruviana* L. against cadmium-induced neurotoxicity in rats. *Biol Trace Elem Res*. 2014 Sep;160(3):392-9.
473. Eybl V, Kotyzová D, Bludovská M. The effect of curcumin on cadmium-induced oxidative damage and trace elements level in the liver of rats and mice. *Toxicol Lett*. 2004 Jun 15;151(1):79-85.

474. Zhang Y, Hou Y, Liu C, Li Y, Guo W, Wu JL, Xu D, You X, Pan Y, Chen Y. Identification of an adaptor protein that facilitates Nrf2-Keap1 complex formation and modulates antioxidant response. *Free Radic Biol Med*. 2016 Aug;97:38-49.
475. Ohta T, Iijima K, Miyamoto M, Nakahara I, Tanaka H, Ohtsuji M, Suzuki T, Kobayashi A, Yokota J, Sakiyama T, Shibata T, Yamamoto M, Hirohashi S. Loss of Keap1 function activates Nrf2 and provides advantages for lung cancer cell growth. *Cancer Res*. 2008 Mar 1;68(5):1303-9.
476. Li W, Yu S, Liu T, Kim JH, Blank V, Li H, Kong AN. Heterodimerization with small Maf proteins enhances nuclear retention of Nrf2 via masking the NESzip motif. *Biochim Biophys Acta*. 2008 Oct;1783(10):1847-56.
477. Silva-Islas CA, Maldonado PD. Canonical and non-canonical mechanisms of Nrf2 activation. *Pharmacol Res*. 2018 Aug;134:92-99.
478. Liu C, Zhu Y, Lu Z, Guo W, Tumen B, He Y, Chen C, Hu S, Xu K, Wang Y, Li L, Li S. Cadmium Induces Acute Liver Injury by Inhibiting Nrf2 and the Role of NF-kappaB, NLRP3, and MAPKs Signaling Pathway. *Int J Environ Res Public Health*. 2019 Dec 24;17(1):138.
479. Cortese MM, Suschek CV, Wetzel W, Kröncke KD, Kolb-Bachofen V. Zinc protects endothelial cells from hydrogen peroxide via Nrf2-dependent stimulation of glutathione biosynthesis. *Free Radic Biol Med*. 2008 Jun 15;44(12):2002-12.
480. El-Sayed YS, Samak DH, Abou-Ghanema IY, Soliman MK. Physiological and oxidative stress biomarkers in the freshwater monosex Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L., exposed to pendimethalin-based herbicide. *Environ Toxicol*. 2015 Apr;30(4):430-8.
481. Mohamed OI, El-Nahas AF, El-Sayed YS, Ashry KM. Ginger extract modulates Pb-induced hepatic oxidative stress and expression of antioxidant gene transcripts in rat liver. *Pharm Biol*. 2016 Jul;54(7):1164-72.
482. Taguchi K, Motohashi H, Yamamoto M. Molecular mechanisms of the Keap1-Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. *Genes Cells*. 2011 Feb;16(2):123-40.
483. Hoeflich KP, Luo J, Rubie EA, Tsao MS, Jin O, Woodgett JR. Requirement for glycogen synthase kinase-3beta in cell survival and NF-kappaB activation. *Nature*. 2000 Jul 6;406(6791):86-90.
484. Hernández F, Borrell J, Guaza C, Avila J, Lucas JJ. Spatial learning deficit in transgenic mice that conditionally over-express GSK-3beta in the brain but do not form tau filaments. *J Neurochem*. 2002 Dec;83(6):1529-33.
485. Prickaerts J, Moechars D, Cryns K, Lenaerts I, van Craenendonck H, Goris I, Daneels G, Bouwknecht JA, Steckler T. Transgenic mice overexpressing glycogen synthase kinase 3beta: a putative model of hyperactivity and mania. *J Neurosci*. 2006 Aug 30;26(35):9022-9.
486. Terwel D, Muyllaert D, Dewachter I, Borghgraef P, Croes S, Devijver H, Van Leuven F. Amyloid activates GSK-3beta to aggravate neuronal tauopathy in bigenic mice. *Am J Pathol*. 2008 Mar;172(3):786-98.
487. Kaidanovich-Beilin O, Lipina TV, Takao K, van Eede M, Hattori S, Laliberté C, Khan M, Okamoto K, Chambers JW, Fletcher PJ, MacAulay K, Doble BW, Henkelman M, Miyakawa T, Roder J, Woodgett JR. Abnormalities in brain structure and behavior in GSK-3alpha mutant mice. *Mol Brain*. 2009 Nov 19;2:35.
488. Kim WY, Wang X, Wu Y, Doble BW, Patel S, Woodgett JR, Snider WD. GSK-3 is a master regulator of neural progenitor homeostasis. *Nat Neurosci*. 2009 Nov;12(11):1390-7.

489. Mines MA, Yuskaitis CJ, King MK, Beurel E, Jope RS. GSK3 influences social preference and anxiety-related behaviors during social interaction in a mouse model of fragile X syndrome and autism. *PLoS One*. 2010 Mar 16;5(3):e9706.
490. Alon LT, Pietrokovski S, Barkan S, Avrahami L, Kaidanovich-Beilin O, Woodgett JR, Barnea A, Eldar-Finkelman H. Selective loss of glycogen synthase kinase-3alpha in birds reveals distinct roles for GSK-3 isozymes in tau phosphorylation. *FEBS Lett*. 2011 Apr 20;585(8):1158-62.
491. Soutar MP, Kim WY, Williamson R, Pegg M, Hastie CJ, McLauchlan H, Snider WD, Gordon-Weeks PR, Sutherland C. Evidence that glycogen synthase kinase-3 isoforms have distinct substrate preference in the brain. *J Neurochem*. 2010 Nov;115(4):974-83.
492. Crowder RJ, Freeman RS. Glycogen synthase kinase-3 beta activity is critical for neuronal death caused by inhibiting phosphatidylinositol 3-kinase or Akt but not for death caused by nerve growth factor withdrawal. *J Biol Chem*. 2000 Nov 3;275(44):34266-71.
493. Jiang H, Guo W, Liang X, Rao Y. Both the establishment and the maintenance of neuronal polarity require active mechanisms: critical roles of GSK-3beta and its upstream regulators. *Cell*. 2005 Jan 14;120(1):123-35.
494. Yoshimura T, Kawano Y, Arimura N, Kawabata S, Kikuchi A, Kaibuchi K. GSK-3beta regulates phosphorylation of CRMP-2 and neuronal polarity. *Cell*. 2005 Jan 14;120(1):137-49.
495. Kim WY, Zhou FQ, Zhou J, Yokota Y, Wang YM, Yoshimura T, Kaibuchi K, Woodgett JR, Anton ES, Snider WD. Essential roles for GSK-3s and GSK-3-primed substrates in neurotrophin-induced and hippocampal axon growth. *Neuron*. 2006 Dec 21;52(6):981-96.
496. Zhao Y, Altman BJ, Coloff JL, Herman CE, Jacobs SR, Wieman HL, Wofford JA, Dimascio LN, Ilkayeva O, Kelekar A, Reya T, Rathmell JC. Glycogen synthase kinase 3alpha and 3beta mediate a glucose-sensitive antiapoptotic signaling pathway to stabilize Mcl-1. *Mol Cell Biol*. 2007 Jun;27(12):4328-39.
497. Muyliaert D, Kremer A, Jaworski T, Borghgraef P, Devijver H, Croes S, Dewachter I, Van Leuven F. Glycogen synthase kinase-3beta, or a link between amyloid and tau pathology? *Genes Brain Behav*. 2008 Feb;7 Suppl 1:57-66.
498. Hur EM, Zhou FQ. GSK3 signalling in neural development. *Nat Rev Neurosci*. 2010 Aug;11(8):539-51.
499. Lucas JJ, Hernández F, Gómez-Ramos P, Morán MA, Hen R, Avila J. Decreased nuclear beta-catenin, tau hyperphosphorylation and neurodegeneration in GSK-3beta conditional transgenic mice. *EMBO J*. 2001 Jan 15;20(1-2):27-39.
500. Spittaels K, Van den Haute C, Van Dorpe J, Terwel D, Vandezande K, Lasrado R, Bruynseels K, Irizarry M, Verhoye M, Van Lint J, Vandenheede JR, Ashton D, Mercken M, Loos R, Hyman B, Van der Linden A, Geerts H, Van Leuven F. Neonatal neuronal overexpression of glycogen synthase kinase-3 beta reduces brain size in transgenic mice. *Neuroscience*. 2002;113(4):797-808.
501. Hooper C, Killick R, Lovestone S. The GSK3 hypothesis of Alzheimer's disease. *J Neurochem*. 2008 Mar;104(6):1433-9.
502. Phiel CJ, Wilson CA, Lee VM, Klein PS. GSK-3alpha regulates production of Alzheimer's disease amyloid-beta peptides. *Nature*. 2003 May 22;423(6938):435-9.
503. Engel T, Hernández F, Avila J, Lucas JJ. Full reversal of Alzheimer's disease-like phenotype in a mouse model with conditional overexpression of glycogen synthase kinase-3. *J Neurosci*. 2006 May 10;26(19):5083-90.



504. Rockenstein E, Torrance M, Adame A, Mante M, Bar-on P, Rose JB, Crews L, Masliah E. Neuroprotective effects of regulators of the glycogen synthase kinase-3beta signaling pathway in a transgenic model of Alzheimer's disease are associated with reduced amyloid precursor protein phosphorylation. *J Neurosci*. 2007 Feb 21;27(8):1981-91.
505. Hye A, Kerr F, Archer N, Foy C, Poppe M, Brown R, Hamilton G, Powell J, Anderton B, Lovestone S. Glycogen synthase kinase-3 is increased in white cells early in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*. 2005 Jan 3;373(1):1-4.
506. Forlenza OV, Torres CA, Talib LL, de Paula VJ, Joaquim HP, Diniz BS, Gattaz WF. Increased platelet GSK3B activity in patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *J Psychiatr Res*. 2011 Feb;45(2):220-4.
507. Hu JH, Zhang H, Wagey R, Krieger C, Pelech SL. Protein kinase and protein phosphatase expression in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord. *J Neurochem*. 2003 Apr;85(2):432-42.
508. Karege F, Perroud N, Burkhardt S, Schwald M, Ballmann E, La Harpe R, Malafosse A. Alteration in kinase activity but not in protein levels of protein kinase B and glycogen synthase kinase-3beta in ventral prefrontal cortex of depressed suicide victims. *Biol Psychiatry*. 2007 Jan 15;61(2):240-5.
509. Saus E, Soria V, Escaramís G, Crespo JM, Valero J, Gutiérrez-Zotes A, Martorell L, Vilella E, Menchón JM, Estivill X, Gratacòs M, Urretavizcaya M. A haplotype of glycogen synthase kinase 3beta is associated with early onset of unipolar major depression. *Genes Brain Behav*. 2010 Oct;9(7):799-807.
510. Kozlovsky N, Belmaker RH, Agam G. GSK-3 and the neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2002 Feb;12(1):13-25.
511. Lovestone S, Killick R, Di Forti M, Murray R. Schizophrenia as a GSK-3 dysregulation disorder. *Trends Neurosci*. 2007 Apr;30(4):142-9.
512. Pandey GN, Ren X, Rizavi HS, Dwivedi Y. Glycogen synthase kinase-3beta in the platelets of patients with mood disorders: effect of treatment. *J Psychiatr Res*. 2010 Feb;44(3):143-8.
513. Klein PS, Melton DA. A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Aug 6;93(16):8455-9.
514. Stambolic V, Ruel L, Woodgett JR. Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 activity and mimics wingless signalling in intact cells. *Curr Biol*. 1996 Dec 1;6(12):1664-8.
515. Ilouz R, Kaidanovich O, Gurwitz D, Eldar-Finkelman H. Inhibition of glycogen synthase kinase-3beta by bivalent zinc ions: insight into the insulin-mimetic action of zinc. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002 Jul 5;295(1):102-6.
516. Ryves WJ, Dajani R, Pearl L, Harwood AJ. Glycogen synthase kinase-3 inhibition by lithium and beryllium suggests the presence of two magnesium binding sites. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002 Jan 25;290(3):967-72.
517. Mudireddy SR, Abdul AR, Gorjala P, Gary RK. Beryllium is an inhibitor of cellular GSK-3beta that is 1,000-fold more potent than lithium. *Biometals*. 2014 Dec;27(6):1203-16.
518. Krocza B, Branski P, Palucha A, Pilc A, Nowak G. Antidepressant-like properties of zinc in rodent forced swim test. *Brain Res Bull*. 2001 May 15;55(2):297-300.
519. Tassabehji NM, Corniola RS, Alshingiti A, Levenson CW. Zinc deficiency induces depression-like symptoms in adult rats. *Physiol Behav*. 2008 Oct 20;95(3):365-9.

520. Bodnar LM, Wisner KL. Nutrition and depression: implications for improving mental health among childbearing-aged women. *Biol Psychiatry*. 2005 Nov 1;58(9):679-85.
521. Nowak G, Szewczyk B, Pilc A. Zinc and depression. An update. *Pharmacol Rep*. 2005 Nov-Dec;57(6):713-8.
522. Rojo AI, Sagarra MR, Cuadrado A. GSK-3 $\beta$  down-regulates the transcription factor Nrf2 after oxidant damage: relevance to exposure of neuronal cells to oxidative stress. *J Neurochem*. 2008 Apr;105(1):192-202.
523. Shaw M, Cohen P, Alessi DR. The activation of protein kinase B by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or heat shock is mediated by phosphoinositide 3-kinase and not by mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase-2. *Biochem J*. 1998 Nov 15;336 ( Pt 1)(Pt 1):241-6.
524. Martin D, Salinas M, Fujita N, Tsuruo T, Cuadrado A. Ceramide and reactive oxygen species generated by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induce caspase-3-independent degradation of Akt/protein kinase B. *J Biol Chem*. 2002 Nov 8;277(45):42943-52.
525. Klein JA, Ackerman SL. Oxidative stress, cell cycle, and neurodegeneration. *J Clin Invest*. 2003 Mar;111(6):785-93.
526. Emerit J, Edeas M, Bricaire F. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Biomed Pharmacother*. 2004 Jan;58(1):39-46.
527. Kortekaas R, Leenders KL, van Oostrom JC, Vaalburg W, Bart J, Willemsen AT, Hendrikse NH. Blood-brain barrier dysfunction in parkinsonian midbrain in vivo. *Ann Neurol*. 2005 Feb;57(2):176-9.
528. Bell RD, Zlokovic BV. Neurovascular mechanisms and blood-brain barrier disorder in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*. 2009 Jul;118(1):103-13.
529. Berzin TM, Zipser BD, Rafii MS, Kuo-Leblanc V, Yancopoulos GD, Glass DJ, Fallon JR, Stopa EG. Agrin and microvascular damage in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2000 Mar-Apr;21(2):349-55.
530. Nelson AR, Sweeney MD, Sagare AP, Zlokovic BV. Neurovascular dysfunction and neurodegeneration in dementia and Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta*. 2016 May;1862(5):887-900.
531. Yamazaki Y, Kanekiyo T. Blood-Brain Barrier Dysfunction and the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci*. 2017 Sep 13;18(9).
532. Marroni M, Marchi N, Cucullo L, Abbott NJ, Signorelli K, Janigro D. Vascular and Parenchymal Mechanisms in Multiple Drug Resistance: a Lesson from Human Epilepsy. *Curr Drug Targets*. 2003 May;4(4):297-304.
533. Uchida Y, Sumiya T, Tachikawa M, Yamakawa T, Murata S, Yagi Y, Sato K, Stephan A, Ito K, Ohtsuki S, Couraud PO, Suzuki T, Terasaki T. Involvement of Claudin-11 in Disruption of Blood-Brain, -Spinal Cord, and -Arachnoid Barriers in Multiple Sclerosis. *Mol Neurobiol*. 2019 Mar;56(3):2039-2056.
534. Malik R, Dichgans M. Challenges and opportunities in stroke genetics. *Cardiovasc Res*. 2018 Jul 15;114(9):1226-1240.
535. Alluri H, Wiggins-Dohlvik K, Davis ML, Huang JH, Tharakan B. Blood-brain barrier dysfunction following traumatic brain injury. *Metab Brain Dis*. 2015 Oct;30(5):1093-104.
536. Tomás-Camardiel M, Venero JL, Herrera AJ, De Pablos RM, Pintor-Toro JA, Machado A, Cano J. Blood-brain barrier disruption highly induces aquaporin-4 mRNA and protein in perivascular and parenchymal astrocytes: Protective effect by estradiol treatment in ovariectomized animals. *J Neurosci Res*. 2005 Apr 15;80(2):235-46.
537. Berger JR, Avison M. The blood brain barrier in HIV infection. *Front Biosci*. 2004 Sep 1;9:2680-5.

538. Papadopoulos MC, Saadoun S, Davies DC, Bell BA. Emerging molecular mechanisms of brain tumour oedema. *Br J Neurosurg.* 2001 Apr;15(2):101-8.
539. Veldhuis WB, Floris S, van der Meide PH, Vos IM, de Vries HE, Dijkstra CD, Bär PR, Nicolay K. Interferon-Beta Prevents Cytokine-Induced Neutrophil Infiltration and Attenuates Blood–Brain Barrier Disruption. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2003 Sep;23(9):1060-9.
540. Huber JD, Witt KA, Hom S, Egleton RD, Mark KS, Davis TP. Inflammatory pain alters blood-brain barrier permeability and tight junctional protein expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001 Mar;280(3):H1241-8.
541. Grieshaber MC, Flammer J. Does the Blood-brain Barrier Play a Role in Glaucoma? *Surv Ophthalmol.* 2007 Nov;52 Suppl 2:S115-21.
542. Elinav E, Niv-Spector L, Katz M, Price TO, Ali M, Yacobovitz M, Solomon G, Reicher S, Lynch JL, Halpern Z, Banks WA, Gertler A. Pegylated Leptin Antagonist Is a Potent Orexigenic Agent: Preparation and Mechanism of Activity. *Endocrinology.* 2009 Jul;150(7):3083-91.
543. Banks WA, Burney BO, Robinson SM. Effects of triglycerides, obesity, and starvation on ghrelin transport across the blood–brain barrier. *Peptides.* 2008 Nov;29(11):2061-5.
544. Gonçalves FM, Martins-Oliveira A, Lacchini R, Belo VA, Speciali JG, Dach F, Tanus-Santos JE. Matrix metalloproteinase (MMP)-2 gene polymorphisms affect circulating MMP-2 levels in patients with migraine with aura. *Gene.* 2013 Jan 1;512(1):35-40.
545. Setiadi A, Korim WS, Elsaafien K, Yao ST. The role of the blood-brain barrier in hypertension. *Exp Physiol.* 2018 Mar 1;103(3):337-342.
546. Kealy J, Greene C, Campbell M. Blood-brain barrier regulation in psychiatric disorders. *Neurosci Lett.* 2020 May 1;726:133664.
547. Najjar S, Pearlman DM, Devinsky O, Najjar A, Zagzag D. Neurovascular unit dysfunction with blood-brain barrier hyperpermeability contributes to major depressive disorder: a review of clinical and experimental evidence. *J Neuroinflammation.* 2013 Dec 1;10:142.
548. Najjar S, Pahlajani S, De Sanctis V, Stern JNH, Najjar A, Chong D. Neurovascular Unit Dysfunction and Blood-Brain Barrier Hyperpermeability Contribute to Schizophrenia Neurobiology: A Theoretical Integration of Clinical and Experimental Evidence. *Front Psychiatry.* 2017 May 23;8:83.
549. Fiorentino M, Sapone A, Senger S, Camhi SS, Kadzielski SM, Buie TM, Kelly DL, Cascella N, Fasano A. Blood-brain barrier and intestinal epithelial barrier alterations in autism spectrum disorders. *Mol Autism.* 2016 Nov 29;7:49.
550. Johnsen KB, Burkhart A, Melander F, Kempen PJ, Vejlebo JB, Siupka P, Nielsen MS, Andresen TL, Moos T. Targeting transferrin receptors at the blood-brain barrier improves the uptake of immunoliposomes and subsequent cargo transport into the brain parenchyma. *Sci Rep.* 2017 Sep 4;7(1):10396.
551. Kulczar C, Lubin KE, Lefebvre S, Miller DW, Knipp GT. Development of a direct contact astrocyte-human cerebral microvessel endothelial cells blood-brain barrier coculture model. *J Pharm Pharmacol.* 2017 Dec;69(12):1684-1696.
552. Seo SB, Choe ES, Kim KS, Shim SM. The effect of tobacco smoke exposure on the generation of reactive oxygen species and cellular membrane damage using co-culture model of blood brain barrier with astrocytes. *Toxicol Ind Health.* 2017 Jun;33(6):530-536.
553. Wang Y, Jin S, Sonobe Y, Cheng Y, Horiuchi H, Parajuli B, Kawanokuchi J, Mizuno T, Takeuchi H, Suzumura A. Interleukin-1beta induces blood-brain barrier

- disruption by downregulating Sonic hedgehog in astrocytes. *PLoS One*. 2014 Oct 14;9(10):e110024.
554. Canfield SG, Stebbins MJ, Morales BS, Asai SW, Vatine GD, Svendsen CN, Palecek SP, Shusta EV. An isogenic blood-brain barrier model comprising brain endothelial cells, astrocytes, and neurons derived from human induced pluripotent stem cells. *J Neurochem*. 2017 Mar;140(6):874-888.
  555. Lippmann ES, Weidenfeller C, Svendsen CN, Shusta EV. Blood-brain barrier modeling with co-cultured neural progenitor cell-derived astrocytes and neurons. *J Neurochem*. 2011 Nov;119(3):507-20.
  556. Vandenhoute E, Dehouck L, Boucau MC, Sevin E, Uzbekov R, Tardivel M, Gosselet F, Fenart L, Cecchelli R, Dehouck MP. Modelling the neurovascular unit and the blood-brain barrier with the unique function of pericytes. *Curr Neurovasc Res*. 2011 Nov;8(4):258-69.
  557. Thanabalasundaram G, Schneidewind J, Pieper C, Galla HJ. The impact of pericytes on the blood-brain barrier integrity depends critically on the pericyte differentiation stage. *Int J Biochem Cell Biol*. 2011 Sep;43(9):1284-93.
  558. Nishioku T, Dohgu S, Takata F, Eto T, Ishikawa N, Kodama KB, Nakagawa S, Yamauchi A, Kataoka Y. Detachment of brain pericytes from the basal lamina is involved in disruption of the blood-brain barrier caused by lipopolysaccharide-induced sepsis in mice. *Cell Mol Neurobiol*. 2009 May;29(3):309-16.
  559. Coatti GC, Frangini M, Valadares MC, Gomes JP, Lima NO, Cavaçana N, Assoni AF, Pelatti MV, Birbrair A, de Lima ACP, Singer JM, Rocha FMM, Da Silva GL, Mantovani MS, Macedo-Souza LI, Ferrari MFR, Zatz M. Pericytes Extend Survival of ALS SOD1 Mice and Induce the Expression of Antioxidant Enzymes in the Murine Model and in iPSCs Derived Neuronal Cells from an ALS Patient. *Stem Cell Rev Rep*. 2017 Oct;13(5):686-698.
  560. Sagare AP, Bell RD, Zhao Z, Ma Q, Winkler EA, Ramanathan A, Zlokovic BV. Pericyte loss influences Alzheimer-like neurodegeneration in mice. *Nat Commun*. 2013;4:2932.
  561. Montagne A, Nikolakopoulou AM, Zhao Z, Sagare AP, Si G, Lazic D, Barnes SR, Daianu M, Ramanathan A, Go A, Lawson EJ, Wang Y, Mack WJ, Thompson PM, Schneider JA, Varkey J, Langen R, Mullins E, Jacobs RE, Zlokovic BV. Pericyte degeneration causes white matter dysfunction in the mouse central nervous system. *Nat Med*. 2018 Mar;24(3):326-337.
  562. Thanabalasundaram G, Pieper C, Lischper M, Galla HJ. Regulation of the blood-brain barrier integrity by pericytes via matrix metalloproteinases mediated activation of vascular endothelial growth factor in vitro. *Brain Res*. 2010 Aug 6;1347:1-10.
  563. Pieper C, Pieloch P, Galla HJ. Pericytes support neutrophil transmigration via interleukin-8 across a porcine co-culture model of the blood-brain barrier. *Brain Res*. 2013 Aug 2;1524:1-11.
  564. Jing Y, Liu LZ, Jiang Y, Zhu Y, Guo NL, Barnett J, Rojanasakul Y, Agani F, Jiang BH. Cadmium increases HIF-1 and VEGF expression through ROS, ERK, and AKT signaling pathways and induces malignant transformation of human bronchial epithelial cells. *Toxicol Sci*. 2012 Jan;125(1):10-9.