

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DELL'INSUBRIA**



**Corso di Dottorato di ricerca in**

## **Farmacologia Clinica e sperimentale**

**Coordinatore: Prof.ssa Franca Marino**

### **Ruolo del genere e possibili meccanismi molecolari implicati in un modello murino di Malattia di Parkinson**

**Tesi di dottorato della Dr.ssa: Francesca Siani**

**Matricola:720629**

**Docente guida: Dr Fabio Blandini**

**Anno accademico 2015 - 2016**

*Alla mia famiglia*

# INDICE

INTRODUZIONE.....	5
1.1 Cenni storici sulla malattia di Parkinson.....	5
1.2 Gangli della base.....	6
1.2.1 Anatomia dei gangli della base.....	6
1.2.2 Organizzazione funzionale.....	7
1.3 Epidemiologia.....	8
1.4 Sintomatologia.....	9
1.5 Diagnosi.....	10
1.6 Terapia.....	10
1.6.1 Terapia farmacologica.....	10
1.6.2 Terapia chirurgica.....	12
1.7 Eziopatogenesi.....	12
1.7.1 Fattori genetici.....	13
1.7.2 Sistemi proteolitici.....	15
1.7.2.1 Sistema ubiquitina-proteasoma.....	15
1.7.2.2 Autofagia.....	16
1.7.3 Difetti mitocondriali.....	16
1.7.4 Stress ossidativo.....	17
1.7.5 Apoptosi.....	18
1.7.6 Neuroinfiammazione.....	19
1.7.6.1 Microglia.....	19
1.7.6.2 Astrociti.....	22
1.8 Modelli sperimentali di MP.....	23
1.8.1 Modelli transgenici.....	23
1.8.2 Modelli tossici.....	25
GENERE ED ESTROGENI NELLA MALATTIA DI PARKINSON.....	28
2.1 Ruolo del genere nella malattia di Parkinson.....	28
2.2 Estrogeni.....	28
2.3 Estrogeni e malattia di Parkinson.....	29
2.3.1 Studi clinici.....	29
2.3.2 Studi su modelli animali.....	30
2.4 Meccanismi d'azione degli estrogeni.....	32
SCOPO DEL PROGETTO.....	35
MATERIALI E METODI.....	36
4.1 Gruppi e disegno sperimentale.....	36
4.1.1 Trattamento ormonale.....	37
4.2 Chirurgia.....	37
4.3 Valutazione del ciclo estrale.....	38
4.4 Sacrificio, taglio dell'encefalo e conservazione dei tessuti.....	39
4.5 Immunoistochimica in fluorescenza.....	40
4.5.1 Valutazione dell'espressione della tirosina idrossilasi, dell'attivazione e della polarizzazione microgliale.....	40
4.5.2 Valutazione dell'espressione della tirosina idrossilasi e degli astrociti.....	42
4.6 Analisi dell'immagine.....	43
4.7 Analisi statistica.....	44
RISULTATI.....	45
5.1 Valutazione del ciclo estrale.....	45
5.2 Valutazione del danno nigrostriatale.....	46
5.3 Valutazione dell'attivazione e della polarizzazione microgliale.....	53

5.3.1 Valutazione dell'attivazione microgliale.....	53
5.3.2 Valutazione della polarizzazione microgliale.....	55
5.4 Valutazione dell'attivazione degli astrociti.....	57
DISCUSSIONE.....	59
CONCLUSIONI.....	65
BIBLIOGRAFIA .....	66
RINGRAZIAMENTI.....	90

# Introduzione

## 1.1 Cenni storici sulla malattia di Parkinson

La malattia di Parkinson (MP) è una malattia neurodegenerativa ad andamento progressivo con sintomi caratteristici prevalentemente motori. Deve il suo nome al medico inglese James Parkinson che nel 1817 scrisse un trattato sulla paralisi agitante, secondo il quale la MP è caratterizzata da: *“tremori involontari in parti non in movimento, con tendenza a piegare il tronco in avanti e a passare dal camminare al correre, mentre la sensibilità e l'intelligenza sembrano intatte”*.

Da circa un secolo non ci si riferisce più alla patologia come “paralisi agitante” ma si preferisce il termine MP, denominazione proposta da Jean-Martin Charcot nel 1887, in onore del suo scopritore. Nella sua descrizione originale, Parkinson esclude la compromissione delle capacità cognitive, affermando l'assenza di alterazioni dello stato mentale (*“the senses and the intellect remain uninjured”-1817*). In realtà egli stesso si era già reso conto che, anche se non dementi, i suoi malati potevano essere affetti da numerosi sintomi riguardanti la sfera cognitiva ed affettiva. Per quanto riguarda la presenza di disturbi cognitivi, si attribuisce a Trousseau e a Charcot il merito di averli notati per primi, verso la metà del secolo scorso. A partire dalla fine degli anni '50, Arvid Carlsson dimostrò che circa l'80% della dopamina cerebrale si trova nei nuclei della base.

In seguito, Oleh Hornykiewicz osservò che i cervelli dei soggetti che avevano sofferto di MP presentavano bassi livelli di dopamina, norepinefrina e serotonina, ma che la dopamina era quella ridotta in modo più significativo (Hornykiewicz O, 1966).

La MP è caratterizzata da una lenta e progressiva degenerazione dei neuroni dopaminergici della substantia nigra pars compacta (SNc), un nucleo inserito nei circuiti dei gangli della base, e comporta riduzione dei livelli cerebrali di dopamina nelle aree associate. Per questo motivo, la MP è divenuta il primo esempio di patologia neurologica associata alla deplezione di un particolare neurotrasmettitore. La perdita di cellule è continua ma i sintomi compaiono solamente dopo una perdita neuronale estesa.

## 1.2 Gangli della base

### 1.2.1 Anatomia dei gangli della base

I gangli della base sono un piccolo gruppo di nuclei situati alla base del telencefalo importanti nella regolazione e nella modulazione di funzioni corticali legate al movimento volontario; sono anatomicamente e funzionalmente organizzati in circuiti paralleli che processano differenti tipi di informazioni (Armentero et al., 2011). Questi nuclei possono essere classificati, in base alle loro connessioni, come:

- nuclei afferenti: ricevono proiezioni da strutture che non fanno parte dei gangli della base e proiettano ai nuclei efferenti e/o intrinseci;
- nuclei efferenti: ricevono proiezioni dai nuclei afferenti e/o dai nuclei intrinseci e proiettano a strutture del diencefalo e del tronco cerebrale che non fanno parte dei gangli della base;
- nuclei intrinseci: ricevono e proiettano informazioni solo all'interno del circuito di cui fanno parte.

I gangli della base comprendono cinque nuclei essenziali (Hikosaka & Wurtz, 1989):

- Corpo striato: è un nucleo afferente formato dal caudato e dal putamen. È composto per il 95% da neuroni di medie dimensioni spinosi (medium spiny neurons) GABAergici e per il restante 5% da interneuroni aspinosi, principalmente colinergici;
- Globo pallido: è suddiviso nel nucleo efferente globo pallido mediale (GPM) e nel nucleo intrinseco globo pallido laterale (GPI). È composto quasi esclusivamente da neuroni GABAergici;
- Substantia nigra: è suddivisa in substantia nigra pars reticulata (SNr) e SNc. La SNr è un nucleo efferente ed è formata da neuroni GABAergici. La SNc è, invece, un nucleo intrinseco contenente il pigmento neuromelanina, che conferisce al nucleo una caratteristica pigmentazione scura, ed è formata da neuroni dopaminergici;
- Nucleo subtalamico (STN): è l'unico nucleo eccitatorio del circuito dei gangli della base (Simola et al., 2008). È formato da neuroni glutammatergici e, per circa il 7.5%, da interneuroni GABAergici (Levesque & Parent, 2005).

In aggiunta a questi, altri nuclei sono strettamente connessi con il sistema dei gangli della base come il nucleo tegmentale peduncolo pontino, i nuclei intralaminari caudali e i nuclei cerebellari profondi, anch'essi coinvolti nell'organizzazione delle funzioni motorie (Armentero et al., 2011).

## 1.2.2 Organizzazione funzionale

I neuroni GABAergici striatali ricevono due tipi di afferenze: proiezioni dopaminergiche dalla SNC e glutammatergiche dalla corteccia, dal talamo e dal sistema limbico (Orru et al., 2011). Dagli stessi neuroni striatali si dipartono due tipi di efferenze che danno origine a due vie note come via diretta e indiretta (Smith et al., 1998) (Fig. 1):

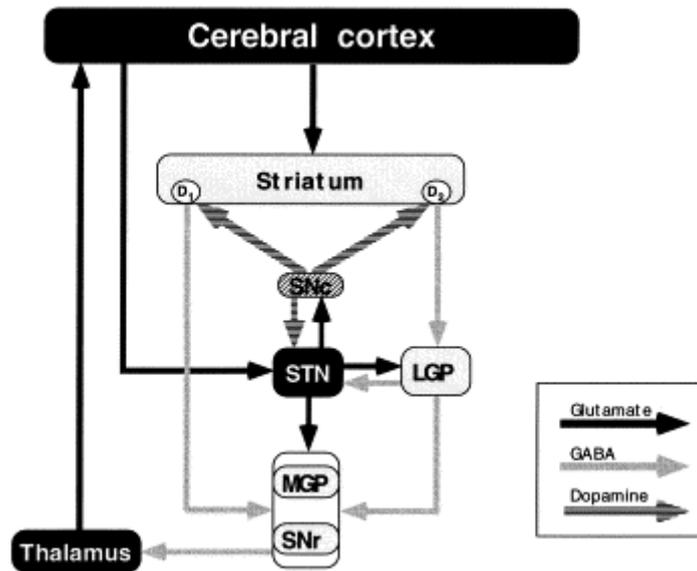


Figura 1: via diretta dei nuclei della base (D1); via indiretta dei nuclei della base (D2) [GPi= globo pallido interno (mediale); GPe= globo pallido esterno (laterale)] (Blandini et al., 2000).

1. Via diretta o via striato-nigrale monosinaptica: origina dai neuroni GABAergici che sintetizzano anche il neuropeptide dinorfina e la sostanza P ed esprimono recettori dopaminergici D1 (D<sub>1</sub>R). Questi neuroni inviano direttamente proiezioni inibitorie ai nuclei efferenti del circuito: la SNr e il GPe. Globalmente questa via esercita una modulazione positiva sull'attività del talamo motorio e della corteccia motoria.
2. Via indiretta o striato-pallidale polisinfaptica: origina dai neuroni GABAergici che sintetizzano anche il neuropeptide encefalina ed esprimono recettori dopaminergici D2 (D<sub>2</sub>R). Questi neuroni inviano proiezioni inibitorie al GPi che a sua volta, mediante efferenze GABAergiche, è connesso con il STN. L'attivazione di questa via determina la disinibizione del STN e quindi la stimolazione glutammatergica della SNr e del GPe; i nuclei efferenti proiettano, infine, ai nuclei ventro-laterale e ventro-anteriore del talamo e da qui alla corteccia. Globalmente questa via esercita una modulazione negativa sull'attività del circuito, inibendo la trasmissione del comando motorio.

La SNc, attraverso le sue efferenze dopaminergiche sui neuroni GABAergici striatali, è responsabile del mantenimento di un equilibrio tra l'attivazione della via diretta e quella della via indiretta.

Nella MP la degenerazione dei neuroni dopaminergici nigrali, e il conseguente deficit di dopamina a livello striatale, determina un'alterazione nelle connessioni tra i diversi nuclei coinvolti nel circuito dei gangli della base che si traduce in una ridotta stimolazione della via diretta e in un aumento della stimolazione della via indiretta. La ridotta inibizione della via diretta comporta una sovra-inibizione del GPI, disinibendo ulteriormente il STN e aumentando l'eccitazione della SNr e del GPM. La ridotta eccitazione della via diretta causa, invece, una riduzione del controllo motorio sulla SNr e sul GPM. Nel complesso, quindi, da un punto di vista funzionale, questi eventi determinano un'eccessiva attivazione dei neuroni GABAergici in uscita e quindi un'eccessiva inibizione dei sistemi talamo-corticali responsabili del controllo del movimento volontario (Obeso et al., 2000; Obeso et al., 2008).

### **1.3 Epidemiologia**

La MP è una malattia neurodegenerativa che si manifesta principalmente come forma sporadica, ma è presente anche in forme familiari (5-10% dei casi). Nei casi sporadici, il fattore di rischio principale è l'invecchiamento. Infatti, la MP colpisce circa l'1% della popolazione sopra i 65 anni, fino a raggiungere il 4-5% dei soggetti al di sopra di 80 anni (de Lau LM e Breteler MM, 2006). Pertanto, in una società come la nostra, in cui l'aspettativa di vita tende costantemente ad aumentare, cresce anche l'incidenza della malattia (Blandini et al., 2013). In termini di distribuzione geografica, l'incidenza della malattia è più alta in Europa (circa 500 casi all'anno su 100000 soggetti con età superiore a 65 anni) e in Nord America (224 casi all'anno su 100000 soggetti di età superiore ai 65 anni) rispetto ai paesi asiatici (32 casi all'anno su 100000 con età superiore a 50 anni) e tende ad essere più frequente nelle aree rurali che nei centri urbani (Wirdefeldt et al. 2011). Tra i fattori coinvolti nell'incidenza della MP vi è anche il genere. La MP tende a manifestarsi più frequentemente (circa una volta e mezza) negli uomini rispetto alle donne.

## 1.4 Sintomatologia

La MP è considerata il prototipo dei disordini del movimento, pur manifestandosi con sintomi sia motori che non motori.

I sintomi motori esordiscono ad uno stato avanzato del processo degenerativo, quando circa il 70% della dopamina striatale e il 50% dei neuroni dopaminergici sono stati persi (Jaber et al., 1996).

Il quadro clinico della malattia è riassumibile nella tipica triade tremore, bradicinesia e rigidità:

- Tremore, tipicamente a riposo: coinvolge la porzione più distale dell'arto ed è inizialmente unilaterale per poi estendersi bilateralmente; scompare durante i movimenti volontari, in genere peggiora nelle situazioni di stress emozionale ed è assente durante il sonno;
- Rigidità: è la resistenza al movimento passivo degli arti, colpisce tutti i distretti muscolari ed è causata da un'eccessiva e continua contrazione dei muscoli;
- Bradicinesia: lentezza dei movimenti che coinvolge sia la pianificazione che la completa esecuzione degli stessi. Comporta: deambulazione a piccoli passi, micrografia, facies ipomimica e ipofonia progressiva.

La perdita selettiva dei neuroni dopaminergici della via nigrostriatale, caratteristica della MP, determina una sindrome extrapiramidale caratterizzata da una ridotta attività dei circuiti cortico-basali responsabili del controllo dei movimenti volontari. Da ciò derivano le manifestazioni tipiche dei pazienti parkinsoniani come l'instabilità posturale, la difficoltà nel camminare, nel parlare o nel completare altri compiti semplici, l'andatura impacciata e i disturbi dell'equilibrio (Hoehn & Yahr, 1967).

Oltre a quelli appena descritti, sintomi a carico di organi periferici e del sistema nervoso autonomo compaiono prima o contemporaneamente al deficit motorio e peggiorano col progredire della malattia.

I sintomi non motori precedono o si presentano parallelamente ai sintomi motori e peggiorano con il progredire della patologia (Pfeiffer, 2003). I più comuni sono disfunzioni olfattive, alterazioni del sonno e disturbi gastrointestinali, come il rallentato svuotamento gastrico e costipazione, che oltre ad avere un impatto negativo sulla vita dei pazienti, influenza negativamente l'assorbimento dei farmaci anti-parkinsoniani. In fasi più progredite della malattia possono manifestarsi anche apatia, ansia, attacchi di panico, fobie sociali e sindromi depressive, disturbi psichiatrici e deficit cognitivi (Ferrer et al., 2012).

I sintomi non motori sono dovuti al coinvolgimento di sistemi non dopaminergici, quali il sistema noradrenergico nel Locus Coeruleus e quello colinergico nel nucleo basale di Meynert che sono alterati parallelamente alla degenerazione della via dopaminergica (Levy et al., 2009).

## 1.5 Diagnosi

La diagnosi di MP è essenzialmente clinica ed è basata fondamentalmente sulla comparsa dei sintomi motori; poiché questi si manifestano tardivamente rispetto alla degenerazione neuronale, non è possibile diagnosticare precocemente la malattia (Jaber et al., 1996).

La diagnosi definitiva di MP è autoptica e può essere ottenuta solo attraverso l'analisi post-mortem di campioni istologici del cervello di pazienti “presunti” parkinsoniani. Elemento patognomonico caratteristico della MP, oltre all'evidente degenerazione neuronale nella SNc, è la presenza dei Corpi/Neuriti di Lewy: aggregati proteici presenti rispettivamente all'interno del citoplasma e nei processi cellulari dei neuroni (Pollanen et al., 1993). Questi aggregati sono formati principalmente da proteine normali e/o aberranti tra cui heat shock proteins, proteine fosforilate e ubiquitina (Braak et al., 2003). La proteina principale è l'*α-sinucleina fosforilata*, ossidata e nitrata in modo anomalo che tende a formare aggregati e fibrille insolubili (Ferrer et al., 2011). Inizialmente era stato ipotizzato che questi Corpi di Lewy, il cui diametro è compreso tra 8-30 μm, fossero presenti solo all'interno dei neuroni dopaminergici della SNc, ma sono stati ritrovati anche nei neuroni colinergici del nucleo basale di Meynert, nei neuroni serotoninergici del nucleo dorsale del Raphe, in quelli noradrenergici del Locus Coeruleus (Olanow & Obeso, 2012) ed in altre aree del sistema nervoso come il sistema limbico, la corteccia e l'ipotalamo (Von Bohlen & Halbach, 2004).

Il ruolo che rivestono i Corpi di Lewy nella patogenesi della MP è ancora molto dibattuto nella comunità scientifica (Hartmann, 2004).

## 1.6 Terapia

Il trattamento della MP è prettamente sintomatico e non è ancora disponibile una terapia che interrompa la degenerazione neuronale. Ad oggi il trattamento può essere basato su una terapia di tipo farmacologico o chirurgico come descritto di seguito.

### 1.5.1 Terapia farmacologica

I farmaci utilizzati nella terapia della MP mirano al trattamento dei sintomi motori. Il loro scopo è di mantenere elevato il tono dopaminergico in modo da aumentare la disponibilità di dopamina a livello cerebrale (Youdim, 2010).

Si interviene con:

- farmaci sostitutivi: 3,4-diidrossi-l-fenilalanina o levodopa (L-dopa) e dopamino-agonisti;

- farmaci inibitori delle vie cataboliche della dopamina.

La L-dopa è il farmaco di elezione per il trattamento della MP da più di 50 anni. La L-dopa viene tipicamente somministrata per via orale in combinazione con un inibitore periferico dell'enzima dopamina decarbossilasi (carbidopa o benserazide), allo scopo di bloccare il catabolismo periferico del farmaco e massimizzarne la distribuzione al cervello; questo consente di limitare gli effetti collaterali del farmaco a livello periferico e ridurre il dosaggio. Una volta nel cervello la L-dopa viene convertita in dopamina ed utilizzata dai neuroni dopaminergici superstiti.

Pur essendo la L-dopa considerata il farmaco d'elezione per il trattamento della MP, il suo utilizzo può provocare alcuni effetti avversi, tra cui: ipotensione, aritmia, disturbi gastrointestinali, perdita di capelli, confusione e disturbi emozionali e del comportamento (Shaw et al., 1980; Olanow et al., 2008). Inoltre più del 50% dei pazienti trattati cronicamente con L-dopa presenta complicanze motorie chiamate discinesie o LIDs (*L-dopa induced dyskinesias*), pressoché sconosciute prima dell'utilizzo di questo farmaco nella pratica clinica. Le discinesie comprendono sia movimenti distonici (lenti) sia coreici (veloci) che colpiscono vari muscoli del corpo, da quelli del viso, del collo, della lingua e della mascella, a quelli degli arti e delle mani, fino ad arrivare, occasionalmente, a quelli del torace e dell'addome.

Oltre a queste discinesie vanno citate altre complicanze motorie:

- l'effetto “*wearing off*”, ovvero una diminuzione dell'efficacia del farmaco;
- le oscillazioni “*on/off*” dell'attività della L-dopa. Queste oscillazioni sono caratterizzate dal passaggio da periodi on, in cui si possono riscontrare nel paziente normali attività motorie, a periodi off, in cui l'attività motoria è ridotta ed accompagnata da debolezza (Schwartz & Sabetay, 2012).

Il trattamento della MP può prevedere anche l'utilizzo di farmaci dopamino-agonisti: sono meno potenti della L-dopa, ma sono capaci di garantire una stimolazione dopaminergica più continua. Vengono solitamente utilizzati in fase avanzata come terapia aggiuntiva; inoltre possono essere impiegati anche in monoterapia nella malattia in fase iniziale, come strategia di prevenzione per l'insorgenza di complicazioni motorie e per ridurre il dosaggio di L-dopa assunta dal paziente.

Al trattamento con L-dopa e dopamino-agonisti si possono eventualmente associare farmaci inibitori delle vie cataboliche della dopamina:

- *inibitori della monoaminossidasi B (MAO-B)*, enzima responsabile della degradazione della dopamina a livello centrale. Di questi fanno parte due molecole: la selegilina e la rasagilina;
- *inibitori delle catecol-O- metiltransferasi (COMT)*, enzimi responsabili della catabolizzazione sia periferica sia centrale. Sono farmaci come l'entacapone e il tolcapone che aumentano l'emivita della L-dopa senza aumentare il picco di assorbimento.

## **1.6.2 Terapia chirurgica**

I trattamenti chirurgici per la MP sono stati introdotti come terapia prima dell'utilizzo della L-dopa e sono riemersi negli ultimi decenni grazie agli sviluppi e ai miglioramenti delle tecnologie.

Nel 2002 è stata approvata dalla US Food and Drug Administration la Stimolazione Cerebrale Profonda (*Deep Brain Stimulation-DBS*) per la terapia chirurgica della MP. La DBS è la tecnica maggiormente utilizzata ed è eseguita attraverso l'impianto stereotassico di un elettrodo in grado di generare una stimolazione continua ad alta frequenza, connesso ad una batteria impiantata nella regione sottoclaveare del paziente. Il più comune target per la stimolazione è il nucleo subtalamico che gioca un ruolo centrale nel circuito dei gangli della base (Krack et al., 2003) e risulta essere iperattivo nella MP (Fasano et al., 2012). Le prime osservazioni sono state fatte su scimmie trattate con la tossina l-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidrossipiridina (MPTP): le loro prestazioni motorie sono migliorate in seguito alla stimolazione. Nell'uomo è possibile praticare la DBS solo a quei pazienti che rientrano in determinati parametri, quali l'assenza di deficit cognitivi o disturbi psichiatrici, un'età inferiore ai 75 anni e un trattamento farmacologico la cui risposta sia insoddisfacente o i cui effetti collaterali poco gestibili (Bronstein et al., 2011).

La DBS migliora i sintomi principali della patologia (Limousin et al., 1998) e consente di diminuire il dosaggio giornaliero di L-dopa (Caudle & Zhang, 2009); tuttavia ha dei limiti: può agire solo sui neuroni superstiti, e quindi non determina un recupero delle funzionalità perse durante la progressione della malattia, e il suo effetto è reversibile nel senso che se si spegne lo stimolatore, i sintomi ricompaiono (Olanow et al., 2009).

## **1.7 Eziopatogenesi**

La MP può essere considerata come una malattia multifattoriale in cui i fattori ambientali (lavoro agricolo, esposizione a pesticidi, ambiente rurale, etc..) e genetici giocano un ruolo importante (Lai et al., 2002) (Fig. 2); la sua eziopatogenesi è tutt'ora sconosciuta.

Nel corso degli ultimi decenni la caratterizzazione dei geni implicati nella MP ha fornito indicazioni riguardo alle vie molecolari che sottendono la neurodegenerazione dopaminergica (Lim et al., 2012; Horowitz & Greenamyre, 2010).

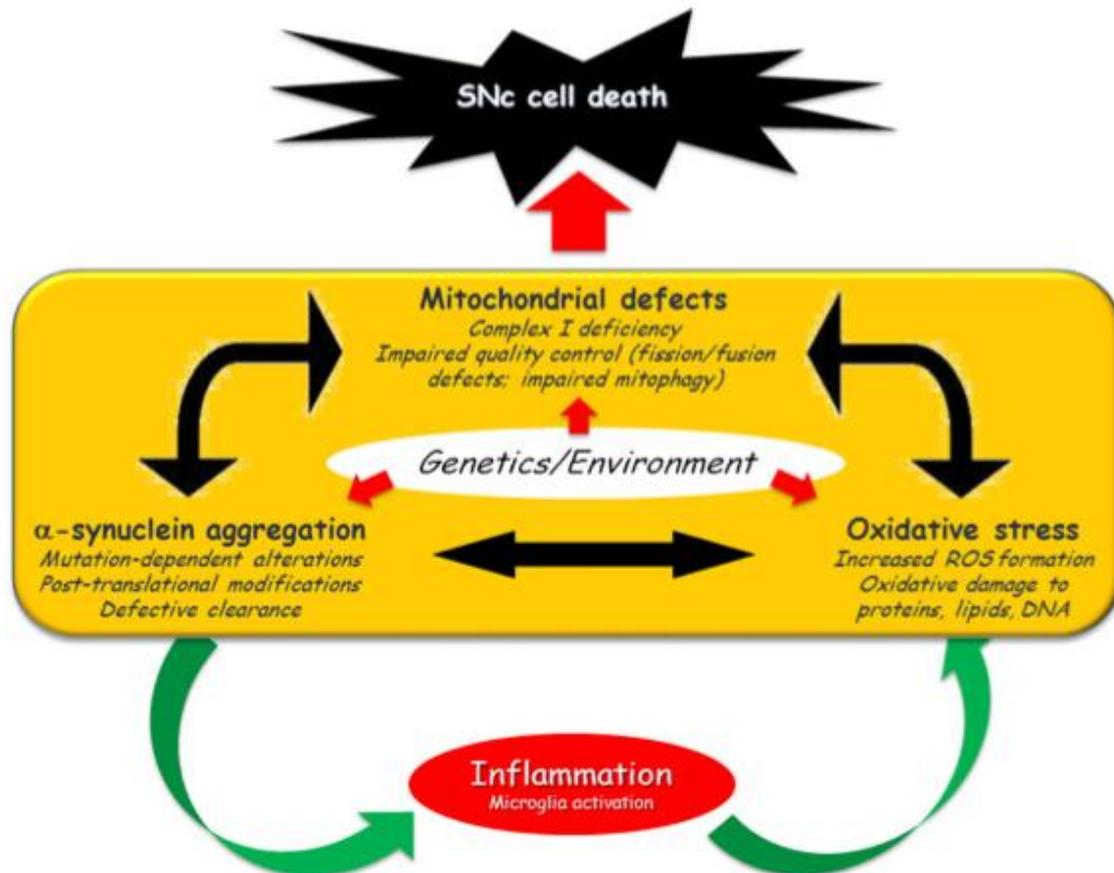


Figura 2: principali meccanismi patogenetici implicati nella MP (Blandini, 2013).

### 1.7.1 Fattori genetici

Come già accennato, la MP non si presenta solo in forma sporadica (85-90% dei casi), ma il 5-10% dei casi si presenta in forma familiare (Blandini & Armentero, 2012). I loci genici finora associati a forme familiari di MP sono stati rinominati con la sigla PARK seguita da una numerazione. Ad oggi sono conosciuti undici geni differenti che, a seguito di mutazioni, possono determinare la comparsa della MP (Saiki et al., 2012); quelli più frequentemente riscontrati e tipicamente caratterizzati a scopo diagnostico sono riportati di seguito (Xiromerisiou et al., 2010).

- ***PARK1/PARK4***: il gene codifica per l' $\alpha$ -sinucleina (SNCA). Mutazioni a carico di questo gene sono state le prime ad essere descritte, nel 1996, come responsabili di una forma di MP a eredità di tipo dominante. L' $\alpha$ -sinucleina è uno dei principali costituenti dei corpi di Lewy e la sua tendenza all'aggregazione è un fondamentale oggetto di studio nell'ambito della patogenesi della MP. La funzione di questa proteina non è del tutto chiara: sembra che sia coinvolta nella regolazione di enzimi responsabili della sintesi di dopamina e che abbia un ruolo nello smistamento del trasportatore della dopamina (DAT) sulla superficie cellulare. È stato, però, dimostrato che l'eccessivo aumento dei livelli di  $\alpha$ -sinucleina a causa di

duplicazioni o triplicazioni del gene (PARK4) o l'espressione di  $\alpha$ -sinucleina mutata (PARK1) determina una diminuzione nel rilascio di dopamina dai terminali presinaptici e aumenta la propensione della stessa proteina a formare intermedi tossici ed, infine, ad aggregare. Il fenotipo dei pazienti portatori del gene mutato per l' $\alpha$ -sinucleina mostra un'età di esordio relativamente giovane, una rapida progressione patologica, demenza e disturbi del sistema nervoso autonomo (Xiromerisiou et al., 2010).

- PARK2: il gene codifica per Parkina. Mutazioni a carico di questo gene e la conseguente perdita di funzione della proteina determinano la forma più frequente di MP a trasmissione autosomica recessiva. Parkina è una proteina ubiquitina ligasi che regola il processo di degradazione proteica mediato dal proteasoma; inoltre, dopo fosforilazione mediata da PINK1, può traslocare dal citosol ai mitocondri dove controlla, insieme a PINK1, il fenomeno della mitofagia, ossia della degradazione autofagica dei mitocondri. La maggior parte dei pazienti con mutazioni del gene della Parkina manifesta la MP prima dei 40 anni, mostra una progressione lenta della patologia e una maggiore predisposizione allo sviluppo di discinesie indotte da L-dopa (Xiromerisiou et al., 2010).
- PARK5: il gene codifica per la proteina UCHL1 (ubiquitin carboxy-terminal hydrosilase L1), coinvolta nel sistema proteasomico. La forma familiare legata a questo gene è di per sé molto rara e una sua mutazione tende a ridurne l'attività enzimatica.
- PARK6: il gene codifica per la proteina PINK1 (PTEN-induced putative kinase 1), una serina-treonina chinasi mitocondriale localizzata sia nel citoplasma sia nei mitocondri e che normalmente esercita un effetto protettivo cellulare (Xiromerisiou et al., 2010); è implicata nei processi di mitofagia e di fissione mitocondriale. Mutazioni a carico del gene determinano difetti nel turnover e nella regolazione della morfologia mitocondriale. Il paziente con questa mutazione mostra, tipicamente, una lenta progressione della patologia e una buona risposta al trattamento con L-dopa, nonostante le frequenti discinesie (Le & Appel, 2004).
- PARK7: il gene codifica per la proteina DJ-1 che riveste un ruolo protettivo in condizioni di stress ossidativo (Canet-Avilés et al., 2004). Mutazioni a carico di questo gene determinano una perdita di funzione della proteina e un aumento dello stress ossidativo cellulare. Pazienti portatori della mutazione in PARK7 mostrano una migliore risposta alla L-dopa e una lenta progressione della malattia (Le & Appel, 2004).
- PARK8: il gene codifica per LRRK2 (Leucine-rich repeat kinase 2), una proteina coinvolta in diverse vie di signaling intracellulare. Questa mutazione è quella maggiormente presente la forma più comune di MP a trasmissione autosomica dominante e il fenotipo clinico ad

essa associata è il più simile alla MP sporadica. La proteina codificata è una chinasi e, sebbene la sua funzione precisa sia ancora ignota, mutazioni a carico di questo gene portano a destabilizzazione dei microtubuli, dell'integrità mitocondriale e del traffico vescicolare (Rideout & Stefanis, 2013).

Sono inoltre state scoperte delle mutazioni che correlano con un aumento del rischio di sviluppare la MP. Mutazioni in eterozigosi del gene GBA, che codifica per la proteina glucocerebrosidasi, sono presenti nel 7-10% dei pazienti con MP sporadica e sono considerati fattori di suscettibilità critici per lo sviluppo della malattia.

## **1.7.2 Sistemi proteolitici**

### **1.7.2.1 Sistema ubiquitina-proteasoma**

Il sistema ubiquitina-proteasoma (UPS) è il principale sistema non lisosomiale di degradazione e clearance di proteine anomali, danneggiate e mutate che altrimenti si accumulerebbero all'interno del citoplasma.

Il meccanismo di azione del UPS si basa sulla poliubiquitinazione, da parte di ligasi e idrolasi specifiche, di proteine bersaglio identificate e degradate dal proteasoma 26S. Il proteasoma 26S è un complesso stabile formato da una subunità 20S, dotata di attività proteolitica, e due subunità 19S dotate di funzione regolatoria (Lilienbaum, 2013). Alterazioni di questo sistema determinano la formazione di aggregati proteici intracellulari, up-regulation di proteine pro-apoptiche e alterazione del trasporto assonale; questi eventi portano alla morte cellulare (Glickman & Ciechanover, 2002).

Uno degli indizi che suggeriscono il probabile coinvolgimento del UPS nella patogenesi della MP è la presenza di proteine poliubiquitate e subunità del UPS all'interno dei Corpi di Lewy (Betarbet et al., 2005). In aggiunta, il deficit del UPS gioca un ruolo chiave nel favorire l'aggregazione dell' $\alpha$ -sinucleina (Harrower et al., 2005). Alterazioni del sistema proteasomico sono state riscontrate, oltre che nei neuroni dopaminergici della SNc, anche nei linfociti di pazienti parkinsoniani, in cui è risultata ridotta l'attività catalitica della subunità 20S (Blandini et al., 2006). Inoltre, alcuni dei geni implicati nell'eziologia della MP codificano per ligasi e idrolasi facenti parte del UPS: una delle ligasi è la parkina codificata dal gene PARK2; una delle idrolasi è UCHL1 codificata dal gene PARK5 (Ferrer et al., 2012).

### **1.7.2.2 Autofagia**

L'autofagia è il sistema di degradazione intracellulare attraverso il quale organuli e proteine citoplasmatiche sono indirizzate ai lisosomi per la degradazione; i lisosomi sono organuli citoplasmatici dotati di pH acido e contenenti enzimi proteolitici.

L'autofagia si suddivide principalmente in tre categorie: macroautofagia, microautofagia e autofagia mediata dalle proteine chaperon (CMA) (Mizushima & Komatsu, 2011). È stato dimostrato che un deficit dell'autofagia contribuisce alla patogenesi di molte malattie infiammatorie e neurodegenerative (Wong & Cuervo, 2010); in particolare, nella MP è stato studiato il ruolo della macroautofagia e della CMA. La macroautofagia è quel processo per cui proteine e organuli, destinati alla degradazione, sono selezionati e inglobati in vescicole che infine si fondono con i lisosomi. Diversamente, la CMA prevede il riconoscimento, la selezione e il trasporto dei substrati destinati alla degradazione lisosomiale da parte di proteine chaperon citosoliche (Xilouri & Stefanis, 2011). Nella MP la CMA è il principale sistema di degradazione dell' $\alpha$ -sinucleina. L'accumulo di varianti patologiche di  $\alpha$ -sinucleina può interferire con le normali funzioni del complesso di traslocazione della CMA con conseguente accumulo di substrati nel citosol e compromissione delle funzioni neuronali (Wong & Cuervo, 2010). L'autofagia è importante nella MP anche perché è responsabile della degradazione dei mitocondri danneggiati; questo processo è noto come mitofagia, una forma particolare di macroautofagia in cui sono coinvolte le già citate proteine parkina e PINK1.

### **1.7.3 Difetti mitocondriali**

I mitocondri sono il centro di produzione dell'energia cellulare grazie al processo noto come fosforilazione ossidativa. Questa, attraverso i quattro complessi della catena di trasporto elettronico mitocondriale e attraverso il complesso V o ATP sintasi, è in grado di produrre energia cellulare sottoforma di ATP.

L'evidenza a sostegno di una compromissione dell'attività mitocondriale è basata principalmente sul fatto che alcuni geni implicati in forme familiari di MP codificano per proteine, come parkina e PINK1, implicate nel controllo dell'integrità e della funzionalità mitocondriale. Studi autoptici condotti su pazienti parkinsoniani hanno dimostrato la presenza di un difetto del complesso I mitocondriale che potrebbe contribuire alla degenerazione dei neuroni dopaminergici (Ferrer et al., 2011; Ferrer et al., 2012) attraverso la diminuzione della produzione di ATP e l'aumento dello stress ossidativo (Von Bohlen & Halbach, 2004). Tale evidenza è confermata anche dal fatto che tossine come MPTP e rotenone, che agiscono in modo specifico bloccando il complesso I, sono in grado di indurre la sintomatologia e la degenerazione neuronale tipici della MP. Queste neurotossine, infatti,

sono attualmente utilizzate per la realizzazione di modelli animali di MP (Blandini & Armentero, 2012). Le anomalie mitocondriali identificate nella MP non si limitano solo alla SNc, ma sono state osservate anche a livello striatale, nelle piastrine ed in altri tessuti periferici (Dauer & Przedborski, 2003).

#### **1.7.4 Stress ossidativo**

Lo stress ossidativo rappresenta lo squilibrio tra la produzione e la detossificazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) ed è strettamente correlato con le disfunzioni mitocondriali. Infatti, sono i mitocondri stessi, attraverso la respirazione cellulare, ad essere la fonte principale di ROS: metaboliti dotati di un elettrone spaiato che li rende altamente instabili e reattivi. La produzione di ROS è un fenomeno che avviene normalmente in condizioni fisiologiche ed è contrastato da sistemi antiossidanti endogeni come le catalasi, le dismutasi, le perossidasi e la vitamina C. Livelli eccessivi di queste molecole reattive possono causare alterazione dei mitocondri e provocare l'ossidazione irreversibile di macromolecole come i lipidi, le proteine e gli acidi nucleici, compromettendone l'integrità e la funzione (Von Bohlen & Halbach, 2004).

Una prima evidenza a sostegno di un aumento dello stress ossidativo nella patogenesi della MP è data dal fatto che il gene PARK7, implicato in una forma familiare della patologia, codifica per la proteina DJ-1, una proteina che ha di per sé un potenziale antiossidante e contribuisce all'attivazione delle difese antiossidanti endogene (Levy et al., 2009). Una mutazione a carico del gene PARK7 porta alla perdita di funzione di DJ-1 che, quindi, contribuisce ad aumentare lo stress ossidativo con conseguenze critiche per la sopravvivenza dei neuroni dopaminergici. Analisi post-mortem di cervelli parkinsoniani hanno dimostrato la presenza di stress ossidativo a livello cerebrale (Foley & Riederer, 2000; Lim et al., 2012); in particolare, nella SNc sono state identificate diverse fonti di accumulo di ROS:

- la presenza di alti livelli di ferro e calcio intracellulare;
- l'aumento del glutatione ossidato;
- la ridotta attività di sistemi antiossidanti come la glutatione perossidasi (Obeso et al., 2010);
- una riduzione della vitamina C e della vitamina E (Hirsch, 2009);
- la presenza di perossidazione lipidica con danno alle membrane cellulari (Hirsch, 2009);
- l'aumento dell'attività dell'enzima MAO-B, responsabile dell'ossidazione della dopamina (Hermida-Ameijeiras et al., 2004; Youdim & Bakhle, 2006);
- l'incremento dell'autossidazione della melanina e della dopamina stessa (Coyle & Puttfarcken, 1993).

Alcune di queste alterazioni possono essere riscontrate in analisi compiute sui pazienti, facilitando così la diagnosi di MP.

In aggiunta, le principali neurotossine utilizzate per riprodurre la malattia negli animali (MPTP, rotenone, 6-OHDA) sono potenti agenti pro-ossidanti, un'altra dimostrazione a sostegno del coinvolgimento dello stress ossidativo nella patogenesi della MP; anche nei suddetti modelli animali è stata evidenziata una riduzione delle difese endogene, in particolare una deplezione del glutathione ridotto (Nikam et al., 2009).

### **1.7.5 Apoptosi**

L'apoptosi è un meccanismo fisiologico di morte cellulare programmata fondamentale per tutti gli organismi pluricellulari: è importante per il loro sviluppo, per la morfogenesi degli organi, per l'omeostasi dei tessuti e per la difesa contro le cellule infette o danneggiate. L'apoptosi può aver luogo sia in seguito a stimoli esterni, come agenti chimici, fisici, ormoni, citochine, farmaci, sia in seguito a stimoli endogeni, come il turnover cellulare, il differenziamento terminale e il rimodellamento durante lo sviluppo. In età adulta l'attivazione eccessiva di fenomeni apoptotici può determinare l'insorgenza di malattie neurodegenerative a causa di una degenerazione cellulare incontrollata (Tatton & Kish, 1997). Aggregati di proteine con anomalie strutturali possono innescare apoptosi nella malattia di Alzheimer, nella MP e nella malattia di Huntington (Tatton & Kish, 1997).

A dimostrazione del coinvolgimento di eccessivi eventi apoptotici nella patogenesi della MP, sono state rilevate, sia in modelli murini sia in preparati autoptici di pazienti parkinsoniani, alte concentrazioni di molecole pro-apoptotiche come Bax (Perier et al., 2012). In particolare, le vie apoptotiche principalmente coinvolte nella MP sono (Levy et al., 2009):

- la via di trasduzione del segnale mediata da JNK (c-Jun N-terminal Kinase), appartenente alla famiglia delle protein chinasi attivate dai mitogeni (MAPK), che attiva il fattore di trascrizione c-Jun che regola positivamente l'espressione di geni pro-apoptotici;
- la via di trasduzione del segnale mediata dalla proteina p53 che induce la trascrizione di Bax.

## 1.7.6 Neuroinfiammazione

La neuroinfiammazione è un processo infiammatorio che può essere provocato da un danno tissutale sistemico o, più spesso, può essere associato ad un danno diretto a carico del sistema nervoso centrale (SNC). La persistenza nel SNC di processi infiammatori può causare gravi danni al complesso neuronale fino a comprometterne l'integrità funzionale. La neuroinfiammazione può avere diverse origini: biologiche, come l'ischemia o le infezioni batteriche, o traumatiche, come il trauma cranico (Kraft & Harry, 2011).

È ampiamente riportato che l'infiammazione cronica può contribuire alla degenerazione dei neuroni dopaminergici e alla progressione della MP (Gao & Hong, 2008; Hirsch & Hunot, 2009). Il danno nigrostriatale causato dalle principali neurotossine usate nei modelli sperimentali di MP, quali MPTP e 6-OHDA, si associa ad un'intensa risposta infiammatoria accompagnata da attivazione microgliale, astrogliale, infiltrazione linfocitaria e dal rilascio di numerose citochine pro-infiammatorie (Czlonkowska et al., 1996; Cicchetti et al., 2002; Sherer et al., 2003; Hald & Lotharius, 2005).

È quindi probabile che la risposta immunitaria/infiammatoria giochi un ruolo chiave nella cascata di eventi che porta alla degenerazione nigrostriatale, anche se il reale ruolo che esercitano questi eventi nella patogenesi e/o progressione della MP sia ancora da chiarire. Gli studi fino ad ora effettuati non aiutano a capire se queste modifiche siano coinvolte nel processo patologico o se siano semplicemente una conseguenza della degenerazione neuronale (Hirsch et al., 2009).

*È importante sottolineare che la maggior parte degli studi, condotti su modelli animali di MP, hanno dimostrato che le strategie neuroprotettive che riducono efficacemente la degenerazione nigrostriatale sono costantemente associati ad una riduzione dei processi neuroinfiammatori, e viceversa* (Armentero et al., 2011). Ad ulteriore sostegno di questa ipotesi, evidenze epidemiologiche hanno dimostrato come l'uso abituale di farmaci anti-infiammatori si correli in modo inverso con il rischio di sviluppare la MP (Chen et al., 2003).

### 1.7.6.1 Microglia

Le cellule microgliali, assimilabili alle cellule macrofagiche circolanti sia per la funzione che esse rivestono che per l'origine monocitaria, sono considerate le principali cellule immunitarie del SNC. In condizioni fisiologiche assumono un fenotipo definito “a riposo” caratterizzato da un piccolo corpo cellulare e da numerose ramificazioni ed hanno fondamentalmente un ruolo di immunosorveglianza (Hanisch & Kettenmann, 2007). Le cellule microgliali agiscono mantenendo il soma immobile, mentre le ramificazioni tendono a muoversi per monitorare l'ambiente circostante e

percepire, per esempio, modificazioni dell'omeostasi, come la tossicità da glutammato, o la presenza di lipopolisaccaride (LPS) (Pasqualetti et al., 2015).

In seguito a modificazioni patologiche la microglia si attiva e cambia gradualmente la propria morfologia assumendo una forma di tipo ameboide. La microglia attivata è in grado di fagocitare cellule morte, batteri, virus e diversi studi hanno rivelato come esprima diversi recettori sulla propria superficie cellulare, tra cui il Complesso Maggiore di Istocompatibilità (MHC) ed i recettori del complemento, che promuovono l'infiammazione cronica del cervello (Chung et al., 2010). L'attivazione della microglia è generalmente considerata dannosa per le cellule in quanto comporta il rilascio di molecole citotossiche quali radicali liberi, ossido nitrico (NO), proteasi e numerose citochine pro-infiammatorie che richiamano altre cellule microgliali e attivano gli astrociti. Il rilascio di questi fattori pro-infiammatori non fa altro che sostenere ed amplificare il processo infiammatorio e di conseguenza danneggiare ulteriormente il tessuto neuronale (Whitton, 2007).

Il cambiamento della microglia verso un fenotipo ameboide è associato, oltre che con la risposta patologica, anche con l'età (Conde & Streit, 2006; von Bernhardi et al., 2010); ciò porta a pensare che con l'invecchiamento i profili di espressione genica delle cellule microgliali possano essere alterati e possano riflettere la plasticità morfologica e funzionale che esprimono quando assumono una forma attivata (Crain et al., 2013).

Nel 1988 McGeer e collaboratori hanno riportato, in studi autopsici su pazienti parkinsoniani, la presenza nella SNc di cellule microgliali attivate in associazione con alti livelli di citochine pro-infiammatorie come TNF $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor), interleuchina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-2 e IL-6 ed enzimi associati all'infiammazione, quali iNOS (Ossido Nitrico Sintasi inducibile) e COX-2 (Ciclo-Ossigenasi 2) (Long-Smith et al., 2009). Tali cellule microgliali sono state identificate per la loro immunoreattività all'antigene leucocitario umano (HLA-DR), un recettore di superficie cellulare appartenente al MHC di classe II. In aggiunta, in tutti modelli sperimentali di MP è stata riscontrata un'attivazione microgliale, a supporto del fatto che il meccanismo neuroinfiammatorio associato all'attivazione microgliale è direttamente connesso al processo patologico (Heneka et al., 2010).

Tuttavia la microglia può esercitare anche una funzione neuroprotettiva, infatti è stato osservato che queste cellule rilasciano fattori di crescita come GDNF, BDNF e NGF (Coull et al., 2005); inoltre sono stati rilevati elevati livelli di citochine anti-infiammatorie, come IL-10 e TGF $\beta$  (Transforming growth factor), nel siero e nel liquido cerebro spinale di pazienti parkinsoniani. Il bilanciamento tra questi due fenotipi microgliali (cito-protettivo e cito-tossico) è molto complesso e modulato da numerosi fattori, quali l'interazione della microglia con le cellule del sistema immunitario e la rete neuronale (Harry & Kraft, 2008).

Alcuni studi hanno dimostrato l'esistenza di stimoli specifici che possono “polarizzare” la microglia verso due differenti fenotipi con caratteristiche citotossiche (M1) o citoprotettive (M2) (Perego et al., 2011).

Infatti è noto che, nelle fasi iniziali della MP, l'aggregazione di  $\alpha$ -sinucleina stimola la polarizzazione della microglia verso un fenotipo anti-infiammatorio M2; tuttavia, con il progredire della patologia, la persistenza di questi aggregati proteici sembra spingere la microglia verso un fenotipo pro-infiammatorio M1 (Blandini, 2013) (Fig. 3).

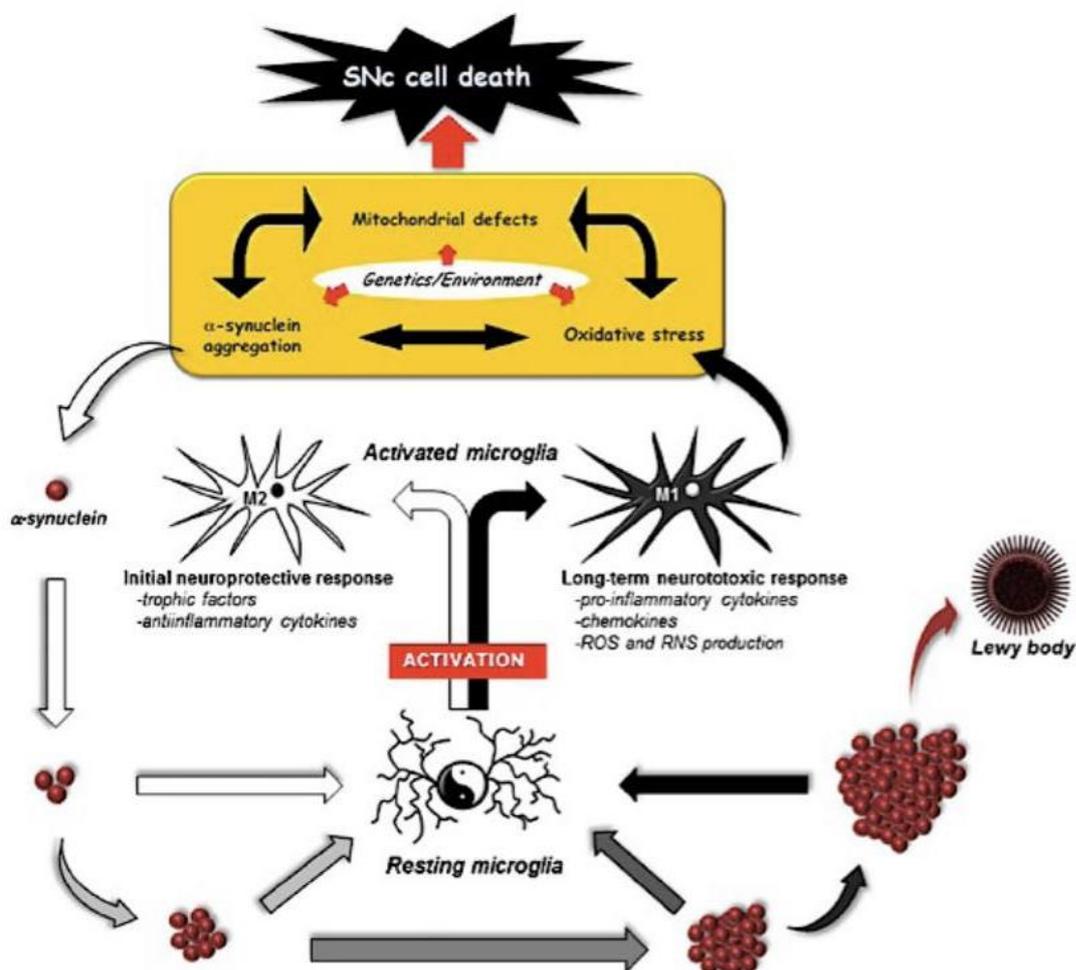


Figura 3: rappresentazione schematica che evidenzia il coinvolgimento, l'attivazione e la polarizzazione verso il fenotipo M1 (citotossico) e M2 (citoprotettivo) della microglia nell'ambito della MP (Blandini, 2013).

È stato inoltre dimostrato che la microglia esprime diversi profili d'espressione genica età-dipendenti; in particolare, in un modello murino di 12 mesi sembra essere polarizzata verso un fenotipo pro-infiammatorio M1 (Crain et al., 2013).

L'effettivo ruolo dell'attivazione microgliale nella MP è ancora da chiarire, ma certamente rappresenta un potenziale target farmacologico importante, per il trattamento di molte malattie neurodegenerative (McGeer & McGeer, 2007; Gonsette, 2008).

### 1.7.6.2 Astrociti

Le cellule astrocitarie sono i principali componenti gliali del SNC e costituiscono fino al 20-50% del volume del cervello (Chung et al., 2010). Si conoscono diversi tipi di astrociti:

- fibrosi, localizzati soprattutto nella sostanza bianca e caratterizzati da processi lunghi e sottili;
- protoplasmatici, localizzati soprattutto nella sostanza grigia e caratterizzati da processi brevi e ramificati;
- radiali, disposti perpendicolarmente all'asse dei ventricoli.

In condizioni fisiologiche gli astrociti assolvono diverse funzioni:

- contribuiscono alla formazione della barriera ematoencefalica (BEE): avvolgono con i loro processi i capillari cerebrali, partecipando agli scambi tra il circolo sanguigno e il parenchima cerebrale;
- contribuiscono al mantenimento dell'omeostasi cellulare tramite meccanismi quali il rilascio neuronale del glutammato e del potassio nello spazio extracellulare;
- favoriscono l'interazione tra neuroni adiacenti rivestendo le terminazioni sinaptiche e assicurando la ricaptazione dei neurotrasmettitori (Nagele et al., 2004).

In condizioni patologiche le cellule astrocitarie vengono attivate dalle citochine prodotte dalla microglia in un fenomeno definito astrogliosi; tale fenomeno comporta un'overespressione della proteina GFAP (Glial Fibrillary Acid Protein) (Liu & Hong, 2003). L'attivazione astrocitaria favorisce, nell'ordine, depolarizzazione cellulare, un eccessivo influsso di calcio, danno neuronale ed eccitotossicità.

Nella MP, come in altre malattie neurodegenerative, gli astrociti esercitano un ruolo attivo e critico nella mediazione della sopravvivenza neuronale, garantito principalmente attraverso il rilascio di fattori neurotrofici come il GDNF (Glial cell-Derived Neurotrophic Factor). Un aumento del 30% di cellule astrogliali è stato rilevato in encefali post-mortem di pazienti parkinsoniani (Hirsch et al., 2012).

Tuttavia, la funzione di queste cellule astrocitarie nel processo neuroinfiammatorio non è ancora del tutto chiara. Recenti studi dimostrano che gli astrociti, possono esercitare una funzione protettiva, in quanto sono capaci di rimuovere l' $\alpha$ -sinucleina extracellulare rilasciata dai neuroni (Rappold & Tieu, 2010). Sebbene la degradazione di  $\alpha$ -sinucleina da parte degli astrociti possa fornire

un'iniziale protezione, quando l'accumulo proteico supera le capacità di degradazione di queste cellule gliali, cominciano a formarsi aggregati di  $\alpha$ -sinucleina. In tale condizione patologica, sono stati rilevati alti livelli di molecole infiammatorie come IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  (Rappold & Tieu, 2010).

## 1.8 Modelli sperimentali di MP

I modelli sperimentali di MP hanno come obiettivo quello di riprodurre, in roditori o primati non umani, le alterazioni patologiche e comportamentali che si riscontrano nei pazienti parkinsoniani. Ai modelli classici, basati sulla somministrazione di specifiche neurotossine, si aggiungono i modelli transgenici, che hanno preso piede nell'ultimo decennio. Entrambe le classi di modelli animali hanno le proprie specificità e i propri limiti, per cui l'utilizzo dell'uno o dell'altro dipende dagli scopi specifici che vengono perseguiti nei determinati progetti. D'altro canto, però, data la prevalenza di forme sporadiche rispetto a quelle familiari, è tramite i modelli tossici che si sta cercando di trovare le risposte alla cura della MP.

### 1.8.1 Modelli transgenici

I modelli transgenici sono ottenuti tramite modificazioni di geni coinvolti nella patogenesi familiare della MP (Dawson et al., 2010); questi sono sotto il controllo di un promotore che ne regola l'espressione nel cervello. I promotori possono fornire un'espressione tessuto o cellulo-specifica.

Promoter	Transgene	Cell death	Motor deficits/ nigrostriatal dysfunction	Cellular abnormalities	References
PDGF- $\beta$	WT $\alpha$ -syn	No neurodegeneration	↓ Rotarod performance (12 mo)/ ↓ TH and fiber density (STR)	Inclusion bodies (Ub, Syn +)	Maslah et al. 2000
mThy-1	A30P $\alpha$ -syn	Sensorimotor neuronal loss (brainstem and SC)	Severe leading to paralysis (8~12 mo)/normal DA and metabolite levels	LB-like inclusion (fibril)	Neumann et al. 2002
mPrP	A53T $\alpha$ -syn	Non-dopaminergic neuronal loss (red nuclei, brainstem, and SC)	Severe (12 mo)/normal DA levels, normal TH morphology	LB-like inclusion (fibril), mitochondrial dysfunction	Giasson et al. 2002; Lee et al. 2002; Gispert et al. 2003
Rat TH (9 kb)	A30P/A53T $\alpha$ -syn	Progressive DA neuronal loss	↓ Locomotor activity (13~23 mo)/ ↓ DA and metabolites, TH axons beaded	No inclusion bodies, diffuse synuclein in DA neurons, ↑ presynaptic DAT	Richfield et al. 2002
CamKII-tTA (tet-off)	WT $\alpha$ -syn, A53T $\alpha$ -syn	Trend for TH <sup>+</sup> cell loss, degenerating cells in SN and hippocampus (WT), non-DA neuronal loss (A53T)	↓ Rotarod performance and motor learning (WT)/normal DA levels (STR)	Condensed mitochondria and lipid droplets	Nuber et al. 2008
BAC	LRRK2 R1441G	No	↓ Rearing (12 mo)/ ↓ DA transmission (STR), ↓ fiber density (SNr), neurite fragmentation (STR)	↑ Tau and phosphorylated tau	Li et al. 2009
CamKII-tTA (tet-off)	LRRK2-WT/GS/KD	No	Normal	Golgi structure fragmentation	Wang et al. 2008; Lin et al. 2009

*Tabella 1: principali caratteristiche dei modelli murini autosomici-dominanti della MP ottenuti tramite modificazione nell'espressione dei geni che codificano per le proteine  $\alpha$ -sinucleina e LRRK2.*

Con specifiche mutazioni si è in grado di spegnere (knock out; KO) o accendere (knock in; KI) determinati geni. Nella tabella 1 sono elencati alcuni dei modelli transgenici per l' $\alpha$ -sinucleina che differiscono tra di loro per il diverso promotore. Il promotore TH limita l'espressione del transgene ai neuroni catecolaminergici; il promotore mThy-1 regola la sovra-espressione di  $\alpha$ -sinucleina in tutte le regioni del cervello. La maggior parte di questi modelli mostra inclusioni *Lewy body-like*, ma non sviluppa un danno considerevole a livello della via nigrostriatale.

Altri modelli autosomici-dominanti sono quelli che riguardano l'over-espressione della proteina LRRK2. La maggior parte di questi non è in grado di riprodurre la morte neuronale dopaminergica legata all'età.

Ai modelli autosomici-dominanti si aggiungono i modelli autosomici-recessivi (Tabella 2); questi sono caratterizzati dalla perdita della funzionalità proteica e i transgeni sono KO per le proteine parkina, DJ-1 e PINK1.

PD gene	Motor deficit	Electrophysiological/ neurochemical dysfunction	Biochemical changes	References
Parkin	Declines in voluntary and amphetamine-induced activity, beam traversing, acoustic startle response	↑ DA (STR, limbic); ↓ NE (OB, SC), ↓ striatal neuron excitability	↓ DAT, VMAT2; ↑ reduced glutathione (STR); ↑ parkin substrates (STR, Vmb); ↓ mitochondrial and antioxidant proteins (Vmb)	Goldberg et al. 2003; Itier et al. 2003; Von Coelln et al. 2004
DJ-1	Age-dependent declines in locomotor activity, rearing, and tape removal test (11 mo)	↑ DA re-uptake, DA content, and ↑ stimulated DA release (STR)	Normal amounts of TH, DAT, VMAT2 (STR), and oxidized proteins; ↓ mitochondrial peroxidase activity	Chen et al. 2005; Goldberg et al. 2005; Kim et al. 2005; Andres-Mateos et al. 2007
PINK1	Age-dependent impairment of spontaneous activity	↓ Evoked DA release; ↓ DA content (STR)	↑ Large mitochondria, mitochondrial respiration, ATP generation; ↓ aconitase activity (STR)	Gautier et al. 2008; Gispert et al. 2009; Kitada et al. 2009

Tabella 2: principali caratteristiche dei modelli murini autosomici-recessivi della MP ottenuti tramite modificazione nell'espressione dei geni che codificano per le proteine parkina, DJ-1 e PINK1.

Questi modelli non mostrano degenerazione nigrostriatale ma mostrano alterazioni delle funzioni mitocondriali con aumento della sensibilità nei confronti della tossina parkinsonizzante.

Tutti questi tipi di modelli danno informazioni soprattutto sulla funzione delle singole proteine e sulle loro implicazioni nella MP.

## 1.8.2 Modelli tossici

I modelli tossici si basano sulla somministrazione, locale o sistemica, di neurotossine capaci di indurre la degenerazione selettiva del sistema nigrostriatale (Fig. 4); qui di seguito vengono riportate le neurotossine in uso e le loro principali caratteristiche.

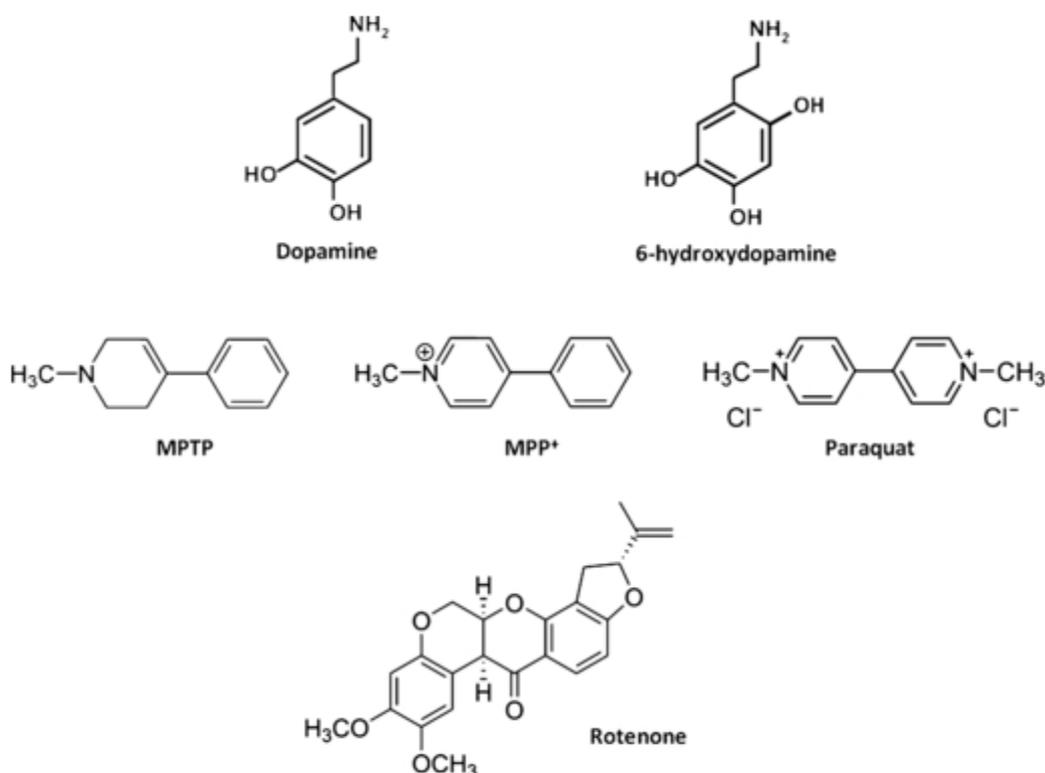


Figura 4: strutture chimiche della dopamina e delle neurotossine utilizzate nei modelli animali di MP (Blandini & Armentero, 2012).

- **1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidrossipiridina (MPTP)**

L'MPTP è un derivato della meperidina, una sostanza sintetica ad effetto analgesico-narcotico; è una neurotossina altamente liposolubile e che quindi attraversa agevolmente la barriera emato-encefalica. L' MPTP, una volta entrato nel cervello, viene convertito dalle cellule gliali nel suo metabolita attivo 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP<sup>+</sup>), attraverso l'azione dell'enzima MAO-B. Il metabolita attivo MPP<sup>+</sup> è tossico in quanto è in grado di entrare nei mitocondri attraverso il sistema di ricaptazione della dopamina (DAT), inibire il complesso I della catena di trasporto degli elettroni ed indurre stress ossidativo (Di Monte, 2003).

Il metabolita attivo dell' MPTP può essere anche iniettato direttamente a livello della SNc. L'infusione di MPP<sup>+</sup> nella SNc di ratti è altamente tossica e causa la formazione di inclusioni citoplasmatiche ubiquitina positive (Di Monte et al., 1986).

L'uso di questo modello ha permesso di individuare importanti alterazioni nel metabolismo cellulare correlate a stress ossidativo o a disfunzioni mitocondriali (Blandini & Armentero, 2012). L'MPTP si somministra per via sistemica in topi o in scimmie, i ratti, invece, sono relativamente insensibili a questa tossina (Langston & Ballard, 1983; Lang & Blair, 1984). Il modello animale ottenuto dalla sua somministrazione è fenotipicamente più simile alla patologia umana; nonostante questo, però, presenta alcuni limiti: la lesione della SNc non è accompagnata dalla formazione dei Corpi di Lewy e la sua realizzazione presenta rischi e costi particolarmente elevati, soprattutto nei primati.

- **Rotenone**

Il rotenone è un pesticida di origine vegetale ricavato da radici e steli di alcune piante e, grazie alla sua lipofilia, attraversa facilmente la BEE. È un inibitore specifico del complesso I della catena di trasporto degli elettroni mitocondriale e del UPS e si somministra nei ratti per via sistemica.

La sua somministrazione è in grado di provocare degenerazione selettiva dei neuroni della SNc, parallelamente alla comparsa di inclusioni simili ai Corpi di Lewy, contenenti  $\alpha$ -sinucleina (Betarbet et al., 2000), nonché di indurre sintomi parkinsoniani (Greenamyre et al., 2003) quali riduzione del movimento, postura flessa e, in alcuni casi, rigidità; inoltre, la complessità e i costi della procedura non sono elevati. D'altro canto, i punti deboli di questo modello sono l'alta variabilità inter-individuale (Cicchetti et al., 2009), che rende il modello non riproducibile in modo standard, e l'elevato tasso di mortalità dovuto alla tossicità sistemica del rotenone.

- **1-1'-dimetil-4-4'-bipiridinio dicloruro (Paraquat)**

Il paraquat è un erbicida in grado di entrare selettivamente nei neuroni dopaminergici nigrali sfruttando il trasportatore degli amminoacidi neutri (LAT-1). A differenza delle altre tossine ha bassa affinità per il complesso I mitocondriale; a livello cellulare provoca stress ossidativo innalzando i livelli di ROS ed inibendo le difese antiossidanti endogene, portando quindi alla morte neuronale (Di Monte, 2003). Il modello è ottenuto nei roditori per iniezione sistemica e ripetuta della neurotossina. Infatti, la perdita neuronale indotta dal paraquat è generalmente moderata (20-30%) e la lesione compare solo in seguito ad

iniezioni multiple. Gli animali trattati con questa tossina mostrano una ridotta attività motoria, una perdita dose-dipendente di fibre nervose dopaminergiche striatali e un aumento dell'aggregazione e del deposito intracellulare di  $\alpha$ -sinucleina (Cicchetti et al., 2009)

- **6-idrossidopamina (6-OHDA)**

La 6-OHDA fu sintetizzata nel 1959 come analogo idrossilato della dopamina ed è incapace di penetrare la BEE, per cui l'effetto a livello cerebrale lo si può ottenere solo con l'iniezione *in situ*. Questa tossina presenta un'elevata affinità per il trasportatore della dopamina (DAT) quindi, una volta iniettata intracerebralmente, viene captata selettivamente dai neuroni dopaminergici. All'interno del neurone si accumula sia nel citoplasma, dove subisce una rapida auto-ossidazione, promuovendo un'elevata formazione di ROS, sia nei mitocondri dove blocca l'attività del complesso I e la produzione di energia (Blandini & Armentero, 2012).

La degenerazione neuronale indotta dall'infusione di 6-OHDA può essere di due tipi:

1. anterograda, se l'iniezione avviene a livello della SNc o delle fibre dopaminergiche del proencefalo mediale che dalla SNc proietta allo striato. Con questa metodica si ha la perdita totale e praticamente immediata dei neuroni nigrali seguita da una rapida e massiva degenerazione dei terminali striatali (Blandini et al., 2007). La lesione ottenuta è riproducibile e si dimostra un ottimo modello per lo studio dello stadio avanzato della MP (Breit et al., 2008);
2. retrograda, se l'iniezione avviene a livello del corpo striato. In questo modo si ottiene una lesione parziale dei terminali striatali che si sviluppa in circa 7-10 giorni e una progressione del danno, ritardata e incompleta, ai neuroni dopaminergici nigrali che evolve in un periodo di 4-6 settimane. Questo tipo di lesione progressiva costituisce un buon modello per descrivere lo sviluppo graduale del processo neurodegenerativo che accompagna la MP nei pazienti.

I vantaggi di questo modello sono dovuti all'elevata riproducibilità e ai costi relativamente bassi (Blandini et al., 2008; Blandini & Armentero, 2012).

# Genere ed estrogeni nella malattia di Parkinson

## 2.1 Ruolo del genere nella malattia di Parkinson

Molti disordini del SNC, tra cui la MP, mostrano differenze legate al genere nell'incidenza, nella severità e nella progressione della malattia (Cahill, 2006). I soggetti di sesso maschile presentano una probabilità maggiore (circa una volta e mezzo) di sviluppare la MP rispetto ai soggetti di sesso femminile (Gillies & McArthur, 2010) soprattutto nella fascia di età compresa tra i 50 ed i 59 anni (Pringsheim et al., 2014).

Studi clinici ed epidemiologici suggeriscono che gli estrogeni possono avere un ruolo neuroprotettivo nelle donne (Shulman & Bhat, 2006; Dluzen & Horstink, 2003).

## 2.2 Estrogeni

Gli estrogeni sono i principali ormoni sessuali femminili e sono fondamentali per il mantenimento e lo sviluppo dei caratteri sessuali femminili secondari, per il controllo delle modificazioni dell'apparato genitale, per il controllo del ciclo mestruale e la gravidanza.

Si tratta di ormoni steroidei che prendono il loro nome dall'estro e sono presenti in entrambi i sessi, anche se nelle donne in età fertile raggiungono livelli sierici molto più alti. Gli estrogeni nelle donne sono: l'estradiolo, l'estriolo e l'estrone. Dal menarca alla menopausa il più importante estrogeno è il  $17\beta$ -estradiolo; mentre dopo la menopausa quello maggiormente prodotto è l'estrone che possiede attività inferiore a quella del  $17\beta$ -estradiolo. Questi ormoni sono prodotti a partire dagli androgeni grazie all'azione di enzimi aromatizzanti; in particolare l'estradiolo è prodotto dal testosterone mentre l'estrone dall'androstenedione. Gli estrogeni sono fondamentalmente prodotti dai follicoli ovarici e dalla placenta e, in piccole quantità, in altri organi e tessuti come le ghiandole surrenali; queste fonti secondarie di estrogeni sono le uniche fonti per l'uomo e per la donna in menopausa. La produzione degli estrogeni, durante l'ovulazione, è regolata dall'ormone follicolo-stimolante (FSH) e l'ormone luteinizzante (LH) che vengono prodotti dall'adenoipofisi.

A livello molecolare, gli estrogeni contribuiscono alla modulazione di diverse vie di trasduzione del segnale, attraverso il legame con specifici recettori per gli estrogeni (ER), questi possono essere di due tipi: ER $\alpha$  e ER $\beta$ . Entrambi i ER sono proteine che legano il DNA e quindi regolano

l'espressione genica attraverso la modulazione dell'attività trascrizionale. Gli ER sono espressi a livello degli organi bersaglio, ma anche a livello dei monociti circolanti nel torrente sanguigno; l'attivazione di questi recettori nelle cellule coinvolte nel processo infiammatorio gioca un ruolo importante nell'esplicare l'effetto citoprotettivo di questi ormoni (Soucy et al., 2005).

## **2.3 Estrogeni e malattia di Parkinson**

Gli ER sono alla base delle differenze genere-dipendenti nei neuroni (Bloch et al., 1992; Simerly et al., 1997; Shughrue et al., 2002; Flores et al., 2003) e favoriscono la riduzione dei processi infiammatori, della microglia e dei macrofagi (Vegeto et al., 2006; Smith et al., 2011; Arevalo et al., 2012). Inoltre gli estrogeni sono in grado di regolare sia le vie di trasduzione del segnale a livello dei neuroni dopaminergici agendo come fattori trofici sia l'attivazione della microglia residente agendo come anti-infiammatori. Questa serie di effetti di modulazione positiva contribuirebbe a rallentare il processo neurodegenerativo della MP (Soucy et al., 2005; Vegeto et al., 2003).

### **2.3.1 Studi clinici**

Evidenze epidemiologiche e studi clinici mostrano che l'incidenza della MP è maggiore nei maschi rispetto alle femmine e che tale differenza diminuisce progressivamente con l'avanzare dell'età (Taylor et al., 2007). Le donne affette dalla MP sembrano avere un fenotipo più benigno e a più lenta progressione rispetto agli uomini (Jankovic & Kapadia, 2001); questi per contro, hanno un'età di esordio della malattia leggermente più precoce. A tal proposito uno studio ha evidenziato che la captazione e il legame ai recettori dopaminergici del FP-CIT (isoflupane-radiotracciante diagnostico) è maggiore nelle donne rispetto agli uomini, dimostrando che a parità di durata della malattia, le donne perdono meno neuroni dopaminergici (Haaxma et al., 2007). È inoltre noto che l'incidenza e la prevalenza della MP è più alta nelle donne in menopausa rispetto a donne in premenopausa aventi la stessa età (Currie et al., 2004; Ragonese et al., 2006 a, b). Inoltre è stato osservato che i sintomi associati alla MP peggiorano con l'inizio della menopausa, quando i livelli di estrogeni endogeni sono drasticamente ridotti (Quinn & Marsden, 1986; Sandyk, 1989); infatti, le donne con una vita fertile più prolungata mostrano un esordio più tardivo della MP (Ragonese et al., 2004). Inoltre, in uno studio clinico è stato dimostrato che il rischio di sviluppare la MP è maggiore in donne sottoposte a ovariectomia unilaterale qualora l'intervento chirurgico sia stato effettuato

prima dei 42 anni, ossia in fase di pre-menopausa, mentre è superiore in donne sottoposte a ovariectomia bilaterale, indipendentemente dall'età (Rocca et al., 2008).

Altri studi mostrano che l'esposizione della via nigrostriatale agli estrogeni, che normalmente avviene durante il corso della vita, influenza la sua suscettibilità agli stimoli degenerativi che si presentano in età avanzata. Infatti, è stata riportata una correlazione negativa tra il grado di esposizione agli estrogeni e la gravità del quadro clinico osservato nei pazienti (Cereda et al., 2013). Al contrario, Simon e collaboratori non hanno trovato alcuna correlazione tra l'aumento del rischio di sviluppare la MP e l'esposizione agli estrogeni, siano essi endogeni o esogeni (Simon et al., 2009).

Non è quindi ancora del tutto chiaro in che misura l'esposizione agli estrogeni endogeni/esogeni possa influenzare il rischio di sviluppare la MP, né tantomeno si è a conoscenza dei meccanismi alla base del potenziale effetto neuroprotettivo mediato dagli ormoni sessuali femminili. Ampi studi osservazionali sono in corso allo scopo di monitorare in prospettiva la correlazione tra terapie ormonali e/o fluttuazioni delle concentrazioni di estrogeni e sviluppo della MP, ma per il momento il dibattito resta ampiamente aperto (de Lau & Breteler, 2006).

### **2.3.2 Studi su modelli animali**

Studi sperimentali condotti su modelli animali di MP hanno mostrato che gli animali di sesso maschile hanno, rispetto a quelli di sesso femminile, una maggiore suscettibilità agli stimoli neurotossici indotti da tossine specifiche per i neuroni dopaminergici (Miller et al., 1998).

Alcuni studi su modelli animali di MP hanno evidenziato che gli animali di sesso femminile possiedono un numero più elevato di neuroni dopaminergici nella SNc, rispetto a quelli di sesso maschile. Tale osservazione ha suggerito che probabilmente le donne, presentando un maggior numero di neuroni dopaminergici, sviluppano più tardivamente i sintomi tipici della malattia rispetto all'uomo, nel quale si manifestano quando la perdita neuronale ha raggiunto l'80% di estensione (Smith & Dahodwala, 2014).

Diversi studi hanno mostrato che ratti e primati sottoposti a ovariectomia presentano una perdita di neuroni dopaminergici e deplezione di dopamina accompagnate da una ridotta attività locomotoria spontanea, che possono essere revertite in seguito alla somministrazione di composti a base di estrogeni (Le Saux & Di Paolo, 2006). Inoltre, è stato dimostrato in un modello murino di MP che il trattamento con 17 $\beta$ -estradiolo dopo ovariectomia diminuisce la perdita di dopamina nello striato (Dluzen & Horstink, 2003). Questo recupero è tuttavia evidente solo quando la neurotossina è somministrata a basso dosaggio e produce una lesione parziale nello striato. (Murray et al., 2003).

Pertanto, è evidente che gli ormoni steroidei sono in grado di modulare la progressione della malattia, soprattutto nelle fasi precliniche (Schwartz & Huston, 1996). È stato osservato che l'entità della deplezione dopaminergica striatale è due volte maggiore nelle femmine ovariectomizzate, rispetto a quelle con le gonadi intatte, e la somministrazione di 17 $\beta$ -estradiolo durante il proestro annulla ampiamente l'effetto dell'ovariectomia (Murray et al., 2003). Inoltre, è stato dimostrato che la suscettibilità alla 6-OHDA varia a seconda del ciclo estrale, con una maggiore perdita dopaminergica striatale quando la lesione è indotta durante il diestro e i livelli di 17 $\beta$ -estradiolo circolante sono bassi, rispetto al proestro, dove si hanno i livelli plasmatici più elevati di 17 $\beta$ -estradiolo (Datla et al., 2003; Dluzen & Horstink, 2003; Yu & Liao, 2000). D'altra parte, animali di sesso maschile orchiettomizzati e trattati con estrogeni, presentano livelli di dopamina striatale aumentati rispetto a quelli non trattati, confermando l'effetto neuroprotettivo degli ormoni sessuali femminili nella MP (Dluzen et al., 1996). Inoltre, roditori femmine con lesione parziale della via nigrostriatale presentano un maggior numero di neuroni dopaminergici superstiti nella SNc rispetto ai maschi, suggerendo che la differenza di genere può modificare la suscettibilità alle neurotossine non solo a livello dei terminali striatali, ma anche a livello dei corpi cellulari (Moroz et al., 2003; Murray et al., 2003). A conferma di ciò, studi successivi hanno dimostrato che il trattamento con 17 $\beta$ -estradiolo di ratti ovariectomizzati riduce il danno, sia a livello del corpo striato sia a livello della SNc ( Quesada & Micevych, 2004; Rodriguez-Perez et al., 2010).

Il circuito dei gangli della base, i terminali striatali e i corpi cellulari nella SNc hanno una notevole capacità di compensazione; sebbene i meccanismi alla base siano complessi e non pienamente compresi, le proprietà adattative dei neuroni dopaminergici superstiti includono un'aumentata sintesi, metabolismo e rilascio di dopamina allo scopo di recuperare la funzionalità striatale (Rodriguez-Perez et al., 2010).

In questo senso il 17 $\beta$ -estradiolo circolante sembra promuovere l'attività dopaminergica e il recupero comportamentale, in seguito all'induzione del danno provocato dalla 6-OHDA in roditori (Becker, 1999; Dluzen, 2005; McDermott et al., 1994; Ohtani et al., 2001; Pasqualini et al., 1995; Serova et al., 2004; Tamás et al., 2005). Bourque e collaboratori hanno dimostrato che il trattamento con 17 $\beta$ -estradiolo, in ratti ovariectomizzati, provoca un miglioramento nella ricaptazione della dopamina grazie ad un aumento di densità del trasportatore della dopamina (DAT), i risultati mostrati sono paragonabili a ciò che è stato valutato nelle femmine intatte (Bourque et al., 2011). Inoltre topi trattati con 17 $\beta$ -estradiolo prima del trattamento con MPTP, mostrano livelli di dopamina striatali maggiori di quelli dei topi che non hanno ricevuto il trattamento estrogenico (Callier et al., 2000).

Inoltre l'effetto protettivo sulla lesione nigrostriatale è stato valutato attraverso la somministrazione di estrogeni a tempi diversi, prima durante e dopo la somministrazione di 6-OHDA, responsabile del danno nigrostriatale. I risultati ottenuti hanno dimostrato che l'effetto protettivo degli estrogeni è evidente solo se il trattamento precede lo stimolo neurotossico, mentre nessun effetto protettivo legato agli estrogeni è stato evidenziato se il trattamento è eseguito dopo l'insulto tossico (Disshon et al., 1998; Bourque et al., 2011).

## **2.4 Meccanismi d'azione degli estrogeni**

Gli estrogeni possono esplicare un'azione genomica e non genomica. L'azione genomica degli estrogeni coinvolge la trascrizione genica, che viene attivata attraverso il legame con i recettori nucleari ER $\alpha$  e ER $\beta$ . Tale risposta è ritardata nel tempo. L'azione mediata da un meccanismo di tipo non genomico prevede l'interazione degli estrogeni con i recettori di membrana ER $\alpha$  e ER $\beta$  accoppiati alle proteine G, le quali attivano in seguito all'interazione con il ligando, varie vie di trasduzione del segnale (Bourque et al., 2011). Tali vie possono modulare fattori implicati nella sopravvivenza neuronale (fattori pro-apoptotici, etc.), nel controllo dello stress ossidativo, nei processi proteolitici e nella modulazione dei fenomeni infiammatori (Bourque et al., 2011).

Studi su colture cellulari di neuroni dopaminergici, esposte all'azione di neurotossine come l'MPTP e la 6-OHDA, hanno evidenziato che gli estrogeni hanno un'azione neuroprotettiva mediata soprattutto da meccanismi anti-apoptotici e neurotrofici (Saunders-Pullman, 2003).

Gli estrogeni agiscono infatti, sulla via di trasmissione del segnale delle MAPK, in particolare di ERK, che è in grado di modulare fattori pro-apoptotici e GSK3 $\beta$  e promuovere un effetto neuroprotettivo contro l'eccitotossicità da glutammato (Fig.5).

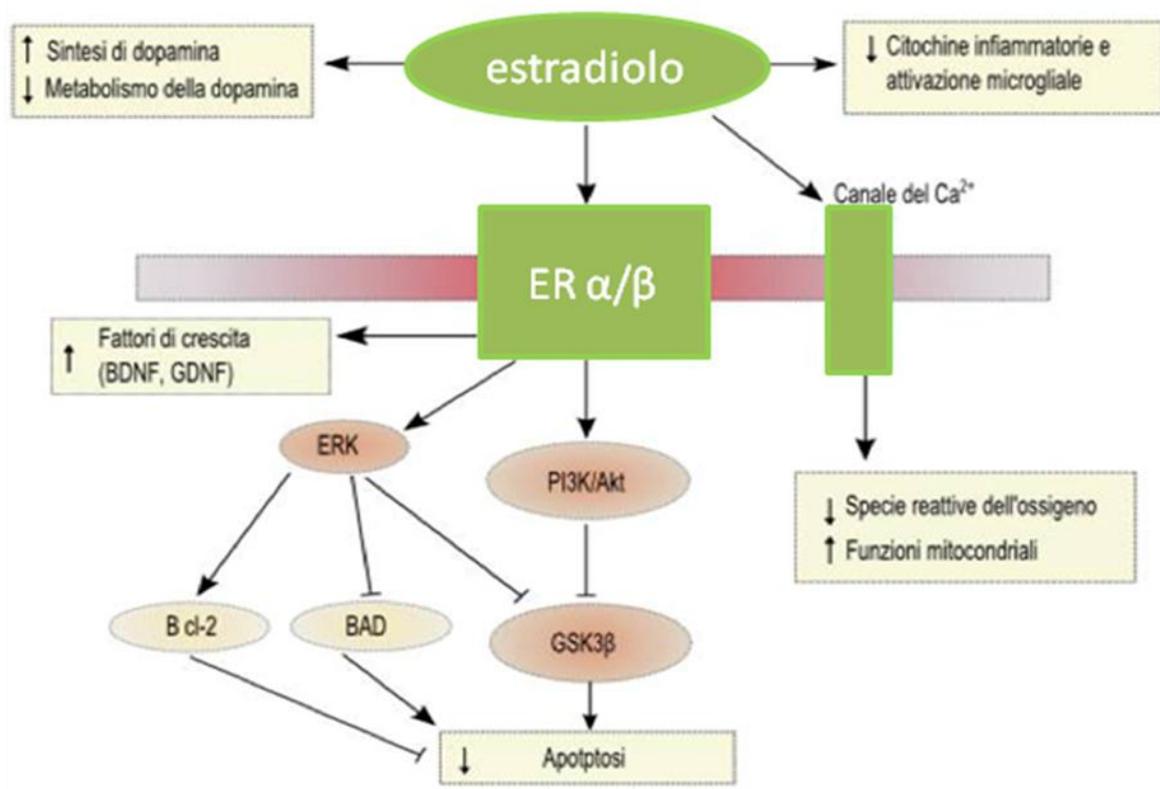


Figura 5: rappresentazione schematica degli effetti esercitati dall'estradiolo, il principale ormone della classe degli estrogeni sui processi infiammatori, sul metabolismo della dopamina e delle cascate molecolari e/o dei cambiamenti sulla fisiologia cellulare conseguenti alla stimolazione dei propri recettori (ER) e dei canali del calcio (fenomeni anti-apoptotici).

Studi condotti in modelli animali di MP hanno dimostrato che, nelle femmine, l'estradiolo è coinvolto in una *upregulation* dell'attività trascrizionale del gene codificante per l'enzima tirosina idrossilasi (TH) presente nei neuroni che sintetizzano catecolamine, come la dopamina; al contrario nei maschi l'estradiolo è coinvolto nella *downregulation* dell'attività trascrizionale del gene TH, in particolare nel Locus Coeruleus (Thanky et al., 2003).

Numakawa e collaboratori (2011) hanno dimostrato che trattando con rotenone colture primarie di neuroni mesencefalici derivati da topi maschi e femmine, mostravano un'augmentata vulnerabilità all'effetto pro-ossidante della neurotossina, successivamente, in seguito a trattamento con 17β-estradiolo hanno osservato un effetto citoprotettivo determinato dal trattamento estrogenico. Tale evidenza suggerisce che gli estrogeni modulano le risposte contro lo stress ossidativo (Tao et al., 2012). Infatti, tra i meccanismi antiossidanti mediati dagli estrogeni c'è la capacità di controllare l'eccesso di ROS, attraverso la modulazione dei flussi di calcio intracellulari e modulare le difese antiossidanti e delle vie di trasduzione del segnale (Numakawa et al., 2011).

Un altro meccanismo che media l'effetto protettivo degli estrogeni è l'interazione con la formazione/degradazione degli aggregati proteici della  $\alpha$ -sinucleina e pertanto della formazione di corpi di Lewy. In particolare, uno studio ha dimostrato il potere anti-aggregante degli estrogeni sugli accumuli di  $\alpha$ -sinucleina (Hirohata et al., 2009).

Infine, è stato dimostrato che gli ormoni sessuali femminili possono interferire con la neuroinfiammazione mediante la modulazione dei livelli di marcatori pro-infiammatori e dell'attivazione microgliale, sia *in vitro* che *in vivo* (Garcia-Ovejero et al., 2005). Inoltre, l'uso di agonisti del recettore ER $\beta$  previene l'aumento dell'espressione di TNF $\alpha$ , sia a livello dei monociti periferici isolati da sangue periferico, sia a livello cerebrale in animali parkinsonizzati (McFarland et al., 2013). E' stato osservato, in un modello sperimentale di encefalite autoimmune, che l'uso di un agonista selettivo per ER $\beta$  inattiva le cellule microgliali e le cellule T infiltrate attraverso l'inibizione del *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (NF- $\kappa$ B) e della iNOS (Wu et al., 2013). NF- $\kappa$ B è un importante fattore trascrizionale ubiquitario, che gioca un ruolo chiave nel controllo dell'espressione di geni coinvolti nell'immunità, nell'infiammazione, nella proliferazione cellulare e nell'apoptosi (Li & Verma, 2002; Karin & Greten, 2005), incluso iNOS (Baeuerle & Baltimore, 1996). Inoltre, gli estrogeni sono in grado di modulare l'attivazione dell'astroglia e della microglia a livello nigrostriatale, che si osserva negli animali parkinsonizzati, riducendo così l'infiammazione (Morale et al., 2006).

Inoltre, poichè il cervello possiede un locale sistema renina-angiotensina (RAS) (McKinley et al., 2003; Saavedra, 2005) che è implicato nella regolazione dell'omeostasi cardiovascolare e nel rilascio di dopamina (Brown et al., 1996), è stato suggerito che il 17 $\beta$ -estradiolo può modulare l'attività di RAS nella *substantia nigra*. Una maggiore attivazione di RAS, correlata all'assenza di 17 $\beta$ -estradiolo, sembra giocare un ruolo importante nell'aumentare il rischio di patologie cardiovascolari o disordini degenerativi nelle donne in menopausa. Una diminuzione del 17 $\beta$ -estradiolo dopo ovariectomia influenza l'attività di RAS nella *substantia nigra* (Rodriguez-Perez et al., 2010). Inoltre, una *downregulation* dell'attività cerebrale di RAS indotta dal 17 $\beta$ -estradiolo può ridurre la degenerazione dopaminergica attraverso la riduzione dell'infiammazione. L'attività estrogenica attraverso questi meccanismi può rappresentare un nuovo potenziale target terapeutico per la MP. Pertanto, lo sviluppo di molecole *estrogen-like* consentirebbe di sfruttare l'effetto neuroprotettivo degli ormoni in maniera selettiva a livello nigrostriatale, riducendo così gli effetti collaterali a carico di aree cerebrali e organi non interessate dalla malattia.

# Scopo del progetto

Le terapie farmacologiche attuali per la cura della MP sono puramente sintomatiche e mirano al ripristino dei livelli cerebrali di dopamina. L'identificazione di nuovi approcci terapeutici in grado di arrestare la degenerazione neuronale che caratterizza tale patologia e di contrastare il processo infiammatorio associato, rappresenta uno dei principali scopi della ricerca scientifica in questo campo. Lo scopo di questo progetto di dottorato è di fornire ulteriori informazioni sul ruolo della neuroinfiammazione nella progressione del danno neuronale della MP in relazione all'effetto modulatorio degli estrogeni. Pertanto, un modello murino di MP, basato sull'infusione intrastriatale della neurotossina 6-OHDA, è stato utilizzato per valutare la degenerazione progressiva dei terminali dopaminergici nello striato e dei corpi cellulari nella SNc, in topi di entrambi i sessi. Inoltre, per investigare il ruolo neuroprotettivo degli estrogeni, sono stati inclusi nello studio topi ovariectomizzati (OVX), e topi OVX trattati con *17 $\beta$ -estradiolo* (OVX+Estrogeni), 5 giorni prima di ricevere l'infusione della 6-OHDA, in relazione all'attivazione e alla polarizzazione microgliale e all'attivazione astrogliale.

# Materiali e metodi

## 4.1 Gruppi e disegno sperimentale

Lo studio ha previsto l'uso di un modello murino di MP, ottenuto dall'infusione unilaterale della neurotossina 6-OHDA nel corpo striato destro che provoca una degenerazione neuronale progressiva retrograda.

Per il presente progetto di dottorato sono stati utilizzati 4 gruppi sperimentali schematizzati nella tabella 3.

<b>Infusione</b>	<b>Animali</b>	<b>N° animali</b>
6-OHDA	Femmine	35
6-OHDA	Maschi	35
6-OHDA	OVX	28
6-OHDA	OVX+Estrogeni	28

Tabella 3: schema sintetico dei gruppi sperimentali realizzati.

Per la valutazione della degenerazione progressiva dei terminali striatali e dei corpi cellulari nella SNc, è stato eseguito un esperimento di *time course* del danno nigrostriatale. Sono stati utilizzati anche animali di controllo (sham), che hanno ricevuto un'infusione di salina con vitamina C (veicolo della 6-OHDA) al posto della tossina, e sono stati valutati agli stessi tempi degli altri gruppi sperimentali (vedi di seguito).

Gli animali sono stati sacrificati secondo la seguente tempistica:

- 1 giorno dopo l'infusione (femmine, n=7; maschi, n=7);
- 2 giorni dopo l'infusione (femmine, n=7; maschi, n=7);
- 3 giorni dopo l'infusione (femmine, n=7; maschi, n=7);
- 7 giorni dopo l'infusione (femmine, n=7; maschi, n=7);
- 14 giorni dopo l'infusione (femmina, n=7; maschi, n=7);
- 21 giorni dopo l'infusione (femmine, n=7; maschi, n=7).

Per quanto riguarda gli animali OVX e gli OVX+Estrogeni, sono state scelte due tempistiche relative alla fase precoce della progressione del danno (1 e 2 giorni) e due tempistiche tardive (7 e 14 giorni) dopo l'infusione della neurotossina, secondo lo schema seguente:

- 1 giorno dopo l'infusione (OVX, n=7; OVX+Estrogeni, n=7);
- 2 giorni dopo l'infusione (OVX, n=7; OVX+Estrogeni, n=7);
- 7 giorni dopo l'infusione (OVX, n=7; OVX+Estrogeni, n=7);
- 14 giorni dopo l'infusione (OVX, n=7; OVX+Estrogeni, n=7).

#### **4.1.1 Trattamento Ormonale**

Topi (C57BL/6N) sono stati ovariectomizzati (OVX) a 7 settimane presso la ditta produttrice (Charles River, Calco). Dopo 1 settimana dall'ovariectomia gli stessi topi sono stati anestetizzati con etere per consentire l'impianto, per ciascun animale, di un pellet sottocutaneo contenente il *17 $\beta$ -estradiolo* (0.01 mg, a rilascio graduale, Innovative Research). Dopo 5 giorni dall'impianto tutti gli animali sono stati sottoposti all'infusione di 6-OHDA o salina (Callier et al., 2000). Il trattamento estrogenico è stato mantenuto per tutto il periodo di vita dell'animale. Per tutto il tempo di stabulazione tutti gli animali sono stati nutriti con cibo privo di estrogeni naturali (Harlan).

#### **4.2 Chirurgia**

Gli esperimenti sono stati condotti su topi maschi, femmine, femmine ovariectomizzate (OVX) e OVX+Estrogeni C57 BL/6N (Charles River, Calco, LC, Italy) di 9-11 settimane.

Gli animali sono stati sottoposti ad un intervento di chirurgia stereotassica (Fig. 6) in condizioni di anestesia generale indotta da un'iniezione intraperitoneale di Equithesin (3mL/Kg); hanno quindi subito una microinfusione di 6-OHDA (2  $\mu$ g/ $\mu$ L salina e 0.02% acido ascorbico) o di salina (0.9% NaCl contenenti 0.02% acido ascorbico) nel corpo striato destro (Branchi et al. 2009). Le iniezioni sono state realizzate seguendo specifiche coordinate stereotassiche indicate dall'atlante Franklin & Paxinos (The mouse brain in stereotaxic coordinates):

- antero-posteriore (AP): +0.5 mm;
- medio-laterale (ML): -1.8 mm rispetto al bregma;
- dorso-ventrale (DV): -3.5 mm rispetto alla dura madre.



Figura 6: apparato stereotassico usato per la chirurgia sui topi.

L'infusione è stata effettuata con una siringa Hamilton ad una velocità di  $0.5 \mu\text{L}/\text{min}$ . Per evitare un reflusso esterno di sangue e consentire alla soluzione iniettata di diffondersi pienamente nel tessuto cerebrale, l'ago è stato rimosso 5 minuti dopo la fine dell'infusione.

### 4.3 Valutazione del ciclo estrale

I cicli estrali dei topi di sesso femminile (gruppi sperimentale A) sono stati monitorati per tutto il periodo antecedente la chirurgia stereotassica attraverso il test di Papanicolaou o Pap test. Tale test citologico indaga le alterazioni delle cellule del collo e della cervice dell'utero, con l'obiettivo di determinare la fase del ciclo estrale e di conseguenza il relativo livello di estrogeni.

Le fasi del ciclo estrale murino consistono in: proestro, estro, metestro e diestro. Le fasi sono state definite dalle fluttuazioni transitorie dei livelli circolanti di vari ormoni steroidei, come il  $17\beta$ -*estradiolo* e il progesterone a seconda delle 4 fasi riproduttive. I cambiamenti della tipologia delle cellule del canale vaginale riflettono i cambiamenti endocrini, pertanto la determinazione dei livelli di cellule nucleate epiteliali, epiteliali squamose e leucociti, presenti nella secrezione vaginale è stata utilizzata per identificare il ciclo estrale di ciascun topo. I topi del gruppo A sono stati operati tutti durante la fase di proestro.

Il Pap test è stato effettuato per tutti i topi di sesso femminile intatti utilizzando il protocollo descritto di seguito (McLean et al., 2012). Questo protocollo ha previsto il prelievo del liquido vaginale mediante l'inserimento nel canale vaginale di un puntale contenente  $100\mu\text{L}$  di acqua deionizzata e demineralizzata ( $\text{ddH}_2\text{O}$ ). Dopo di che, con l'aiuto della gradazione volumetrica

riportata sul puntale è stato spinto all'interno del canale vaginale un quarto del volume di ddH<sub>2</sub>O (circa 25-50 µL), con una leggera pressione sulla parte caudale del dorso il fluido fuoriesce dal canale vaginale, subito dopo è stato raccolto su un vetrino. Per essere sicuri di raccogliere un numero sufficiente di cellule l'operazione è stata ripetuta per 4-5 volte. Successivamente il vetrino è stato fatto asciugare a temperatura ambiente e solo successivamente è stato possibile procedere alla valutazione del ciclo estrale.

Il vetrino contenente le cellule è stato sciacquato con una soluzione ottenuta aggiungendo 0.1 g di Crystal Violet a 100 mL di ddH<sub>2</sub>O, dopo di che sono stati eseguiti lavaggi in ddH<sub>2</sub>O, infine il vetrino è stato montato con glicerolo e coperto con un copri-oggetto e alla fine è stato analizzato al microscopio.

#### **4.4 Sacrificio, taglio dell'encefalo e conservazione dei tessuti**

Gli animali sono stati sacrificati a tempi differenti (1, 2, 3, 7, 14 o 21 giorni dopo l'infusione della neurotossina). Dopo aver ricevuto una dose letale dell'anestetico tiopentale sodico sono stati sottoposti a perfusione intracardiaca con soluzione salina per eliminare il sangue e successivamente con paraformaldeide al 4% per fissare i tessuti. Il cervello fissato è stato quindi estratto *in toto* e posto in paraformaldeide per un giorno a 4°C, successivamente per un giorno in saccarosio al 20%, per un altro in saccarosio al 30% ed, infine, congelato a -80°C.

Gli encefali sono stati tagliati in sezioni coronali dello spessore di 20 µm, contenenti la SNc e il corpo striato, con un microtomo congelatore a slitta (SM 2000R, Leica) (Fig. 7). Le fettine ottenute sono state depositate in sequenza in 4 diversi pozzetti contenenti una soluzione crioprotettiva antifreeze (50% tampone sodio fosfato 0.05 M e pH 7.3, 30% etilene glicole, 20% glicerolo) in modo da avere 4 serie comparabili con fettine equidistanti 80 µm l'una dall'altra.



*Figura 7: microtomo congelatore a slitta Leica.*

#### **4.5 Immunoistochimica in fluorescenza**

L'immunoistochimica è una metodica che serve per evidenziare, in una sezione di tessuto, determinati antigeni tramite l'utilizzo di reazioni antigene-anticorpo.

In questo lavoro di dottorato è stata effettuata una reazione di immunofluorescenza per diversi marcatori (antigeni) che sono elencati di seguito:

- tirosina idrossilasi (TH, marcatore dei neuroni dopaminergici);
- Iba1 (marcatore delle cellule microgliali);
- CD206 (marcatore del fenotipo microgliale M2);
- TNF- $\alpha$  (marcatore del fenotipo microgliale M1);
- GFAP (marcatore degli astrociti)

##### **4.5.1 Valutazione dell'espressione della tirosina idrossilasi, della microglia e della polarizzazione microgliale**

Le sezioni coronali contenenti la SNc e il corpo striato sono state sottoposte ad una reazione di immunofluorescenza per valutare l'espressione della tirosina idrossilasi (TH), per la valutazione del danno nigrostriatale.

Dopo di che le sezioni coronali contenenti la SNc sono state sottoposte alle seguenti reazioni di immunofluorescenza a tripla marcatura, per la valutazione dell'attivazione microgliale e polarizzazione della microglia:

- Dapi, Iba 1 (marcatore microgliale) e TNF- $\alpha$ , un marcatore del fenotipo microgliale citotossico M1;
- Dapi, Iba1 e CD206, un marcatore del fenotipo microgliale citoprotettivo M2.

Nella tabella 4, 5 e 6 vengono mostrati gli anticorpi usati nei 3 diversi esperimenti.

### **Degenerazione nigrostratale**

Per quanto riguarda l'analisi dei neuroni e terminali dopaminergici sono stati utilizzati i seguenti anticorpi

<b><u>Anticorpo primario</u></b>	<b><u>Anticorpo secondario</u></b>
Mouse anti-Tyrosine Hydroxylase Monoclonal Antibody, Millipore MAB 318 (1:500)	Alexa Fluor 594 goat anti-mouse IgG, Life Technologies (1:300)

*Tabella 4: anticorpi (e relative diluizioni) utilizzati per la reazione di immunostochimica in fluorescenza per la rilevazione dell'attivazione microgliale.*

### **Microglia e polarizzazione della microglia**

Per quanto riguarda l'analisi dell'attivazione microgliale e la polarizzazione microgliale sono stati utilizzati i seguenti anticorpi

#### **Polarizzazione microgliale M1**

<b><u>Anticorpo primario</u></b>	<b><u>Anticorpo secondario</u></b>
Goat Iba1 polyclonal IgG, Santa Cruz Biotechnology (1:300)	Alexa Fluor 488 donkey anti-goat IgG, Life Technologies (1:300)
Rabbit anti-TNF- $\alpha$ , Novus Biologicals (1:300)	Alexa Fluor 594 donkey anti-rabbit IgG, Life Technologies (1:300)

*Tabella 5: anticorpi (e relative diluizioni) utilizzati per la reazione di immunostochimica in fluorescenza per l'identificazione del fenotipo microgliale M1 (citotossico), per montare i vetrini è stato utilizzato un montante contenente il Dapi (marcatore specifico per i nuclei cellulari).*

## Polarizzazione microgliale M2

<u>Anticorpo primario</u>	<u>Anticorpo secondario</u>
Goat Iba1 polyclonal IgG, Santa Cruz Biotechnology (1:300)	Alexa Fluor 488 donkey anti- goat IgG, Life Technologies (1:300)
Rabbit CD206 polyclonal IgG, Santa Cruz Biotechnology (1:300)	Alexa Fluor 594 donkey anti- rabbit IgG, Life Technologies (1:300)

Tabella 6: anticorpi (e relative diluizioni) utilizzati per la reazione di immunostochimica in fluorescenza per l'identificazione del fenotipo microgliale M2 (citoprotettivo), per montare i vetrini è stato utilizzato un montante contenente il Dapi (marcatore specifico per i nuclei cellulari).

### 4.5.2 Valutazione dell'espressione della tirosina idrossilasi e degli astrociti

Le sezioni coronali contenenti la SNC sono state sottoposte ad una reazione di immunofluorescenza per valutare l'attivazione astrogliale nel lato lesionato della SNC degli animali maschi, femmine intatte, OVX e OVX+Estrogeni. La reazione che è stata effettuata per questa valutazione è un immunofluorescenza a tripla marcatura, dove il dapi marca i nuclei cellulari, la TH marca i neuroni dopaminergici e la proteina acida fibrillare della glia (GFAP) marca gli astrociti. Per questa reazione sono stati utilizzati i seguenti anticorpi (tabella 7):

<u>Anticorpo primario</u>	<u>Anticorpo secondario</u>
Mouse anti-Tyrosine Hydroxylase Monoclonal Antibody, Millipore MAB 318 (1:500)	Alexa Fluor 594 goat anti- mouse IgG, Life Technologies (1:300)
Rabbit polyclonal anti GFAP, Dako (1:300)	Alexa Fluor 488 goat anti- rabbit IgG, Life Technologies (1:300)

Tabella 7: anticorpi (e relative diluizioni) utilizzati per la reazione di immunostochimica in fluorescenza per l'analisi degli astrociti e dei neuroni dopaminergici, per montare i vetrini è stato utilizzato un montante contenente il Dapi (marcatore specifico per i nuclei cellulari)

Il protocollo usato per le reazioni di immunofluorescenza, eccezion fatta per gli anticorpi, è il medesimo ed è descritto di seguito. Le fettine sezionate al microtomo sono state raccolte su vetrini polilisinati (Thermo Scientific) e lasciate asciugare il tempo necessario, dopo di che su ogni vetrino è stata delimitata l'area contenente le fettine con una penna idrofobica (Liquid blocker pap pen per immunostaining, Sigma) e sono state incubate overnight (ON) a 4°C in camera umida con phosphate-buffered saline (PBS). Successivamente sono stati eseguiti lavaggi con PBS, i vetrini sono stati poi incubati con una soluzione bloccante (0.3% Triton X-100 in PBS + 10% Normal Goat Serum NGS/NHS Normal Horse Serum), in seguito sono state incubate ON con l'anticorpo primario diluito nella seguente soluzione bloccante (0.3% Triton X-100 in PBS + 1% NGS/NHS). Il giorno successivo sono stati effettuati lavaggi in PBS e successivamente sono state incubate per un'ora con l'anticorpo secondario diluito nella seguente soluzione bloccante (0.3% Triton X-100 in PBS + 1% NGS/NHS). Sono stati effettuati altri lavaggi in PBS, infine i vetrini sono stati montati con una soluzione montante contenente Dapi (Prolong, Invitrogen).

## **4.6 Analisi dell'immagine**

### **Degenerazione nigrostriatale**

L'analisi dell'immagine è stata effettuata usando un microscopio AxioSkop2 collegato ad un sistema computerizzato d'immagine (AxioCam MR5) e dotato di un software dedicato (AxioVision Rel 4.2) (Zeiss, Oberkochen, Germany).

I neuroni TH positivi nella SNc sono stati contati in entrambi gli emisferi, in ogni sezione distanziata 80 µm dalla successiva, per tutta l'estensione del nucleo. I risultati sono espressi come percentuale di neuroni TH positivi nella SNc del lato lesionato rispetto al lato controlaterale, non lesionato. In mancanza di una conta stereologica, è stato scelto questo tipo di metodo per evitare distorsioni metodologiche dovute alle differenze inter-individuali, inoltre questa valutazione è stata precedentemente usata per determinare l'estensione della lesione indotta da 6-OHDA nella SNc in diversi lavori (Kirik et al., 2000; Blandini et al., 2004; Paul et al., 2004; Armentero et al., 2006b). La lesione a livello dei terminali striatali dopaminergici è stata valutata considerando il volume del corpo striato TH negativo rapportato all'intera area striatale dell'emisfero lesionato per tutta l'estensione rostro-caudale del corpo striato (Blandini et al., 2004; Armentero et al., 2006b). I volumi sono stati ottenuti sommando le aree e moltiplicandole per la distanza tra due successive sezioni (80µm); i risultati sono espressi come percentuale di volume striatale TH negativo rispetto al volume dell'intero corpo striato.

### **Attivazione microgliale e astrogliale**

La valutazione dell'attivazione microgliale e astrogliale è stata effettuata mediante un'analisi di tipo qualitativo, utilizzando la scala di Colburn (Colburn et al., 1997). Quest'analisi prevede 4 stadi di attivazione che differiscono tra di loro per la morfologia e per la densità cellulare siano essi cellule microgliali o astrociti.

### **4.7 Analisi statistica**

I dati inerenti alla valutazione del danno nigrostriatale sono stati espressi come media  $\pm$  SEM. Le differenze tra i gruppi sperimentali sono state analizzate mediante l'analisi della varianza ad una via (ANOVA), seguita dal Tukey test come post hoc test. I valori con  $P < 0.05$  sono stati considerati significativi.

# Risultati

## 5.1 Valutazione del ciclo estrale

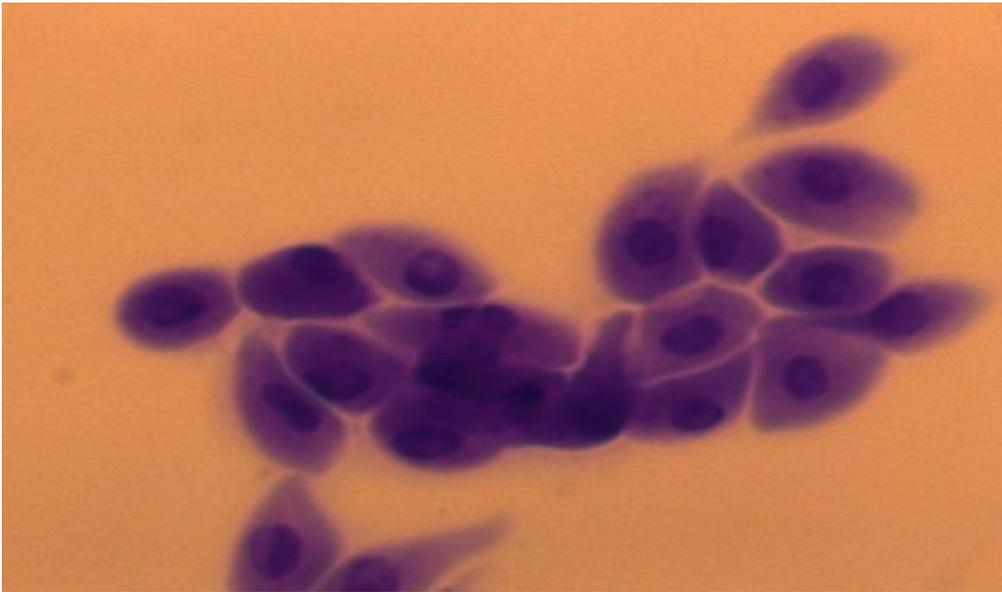
La valutazione del ciclo estrale è stata effettuata analizzando la citologia degli strisci vaginali. Nei campioni citologici è possibile individuare principalmente tre tipi cellulari diversi (McLean et al., 2012):

- Le cellule epiteliali nucleate hanno un citoplasma leggermente colorato, una membrana plasmatica più scura e un nucleo di forma tendenzialmente ovale;
- Le cellule epiteliali squamose hanno una colorazione del citoplasma più uniforme e una forma più poligonale rispetto alle cellule epiteliali nucleate e non hanno il nucleo;
- I leucociti sono più piccoli rispetto agli altri due tipi cellulari, presentano una forma irregolare e degli scuri nuclei polimorfici.

La distribuzione relativa di questi tre tipi cellulari è usata per discriminare lo stadio del ciclo estrale del topo:

- il proestro è caratterizzato quasi esclusivamente da cellule epiteliali nucleate addensate a formare dei clusters;
- l'estro è caratterizzato in maniera preponderante da cellule epiteliali squamose addensate le une sulle altre;
- il metestro è principalmente caratterizzato dai leucociti ma è possibile individuare alcune cellule epiteliali squamose;
- il diestro presenta per lo più leucociti ma raramente si possono identificare cellule epiteliali nucleate e squamose.

La valutazione del ciclo estrale è stata effettuata, secondo lo specifico protocollo precedentemente descritto, per gli animali di sesso femminile (gruppo A). Tutti gli animali hanno ricevuto l'infusione di 6-OHDA durante la fase di proestro (Fig. 8), in cui si ha la massima produzione di  $17\beta$ -estradiolo. La valutazione del ciclo estrale è fondamentale per valutare la possibile correlazione tra il ruolo neuroprotettivo degli estrogeni e la progressione del danno nigrostriatale.



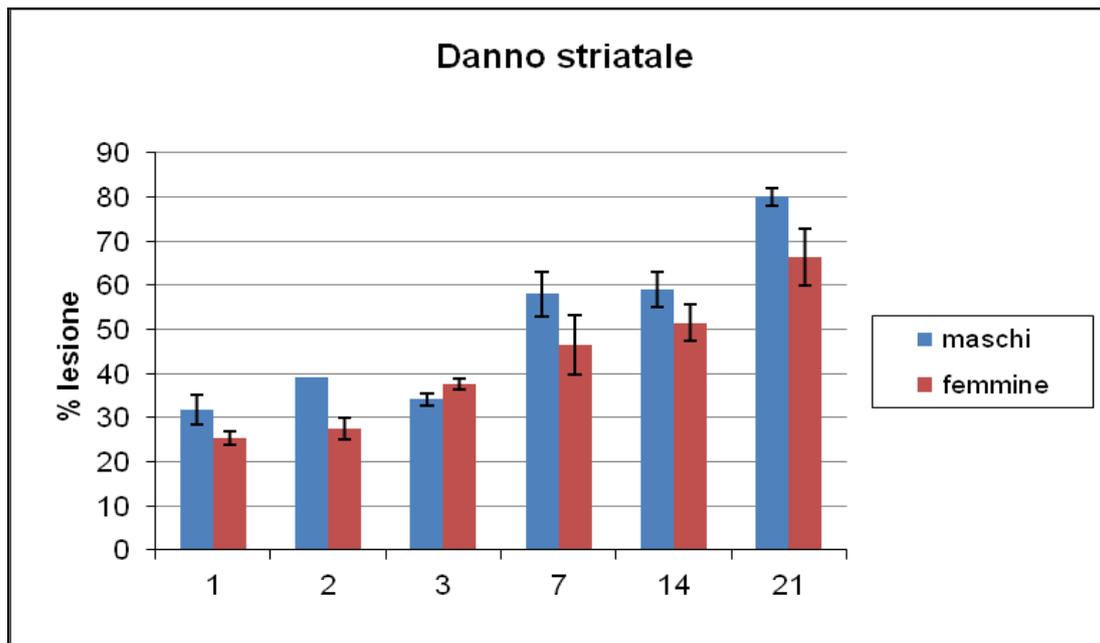
*Fig 8: rappresentazione fotografica di uno striscio vaginale nella fase di proestro, colorato con Crystal Violet*

## **5.2 Valutazione del danno nigrostriatale**

### **Danno striatale**

La progressione del danno striatale è stata valutata come rapporto tra il volume del corpo striato TH negativo (lesionato) ed il volume dell'intero striato, ed espresso come percentuale di lesione.

I risultati ottenuti sono rappresentati nella figura 9.



*Figura 9: il grafico mostra il confronto della perdita tempo-dipendente dei terminali dopaminergici striatali in seguito all'infusione di 6-OHDA in topi di sesso maschile e femminile. Gli istogrammi rappresentano la percentuale (%) di volume del corpo striato privo della marcatura con la TH confrontata con l'intero corpo striato, dell'emisfero lesionato. Gli istogrammi sono espressi come media  $\pm$ SEM. Per ogni gruppo sperimentale e per ogni tempistica n=7.*

L'analisi della progressione del danno striatale nel tempo (*time course*) ha evidenziato un danno striatale maggiore nei topi maschi rispetto alle femmine, in tutte le tempistiche valutate. Tuttavia tale differenza non ha raggiunto livelli statisticamente significativi.

Per quanto riguarda la valutazione del danno a livello striatale nei topi OVX non trattati e quelli trattati con estrogeni, i dati ottenuti hanno mostrato un danno maggiore nel gruppo OVX non trattato rispetto agli OVX trattati con estrogeni in quasi tutte le tempistiche valutate. Tuttavia, il danno striatale è stato significativamente ridotto nel gruppo OVX+Estrogeni solo 2 giorni dopo l'infusione della neurotossina, rispetto al gruppo OVX non trattato. Inoltre, nessuna differenza in termini di percentuale di lesione è stata osservata tra il gruppo OVX+Estrogeni, le femmine intatte e i maschi valutati alla medesima tempistica. I dati ed alcune immagini rappresentative dell'evoluzione del danno striatale sono rappresentati nelle figure 10 e 11 rispettivamente.

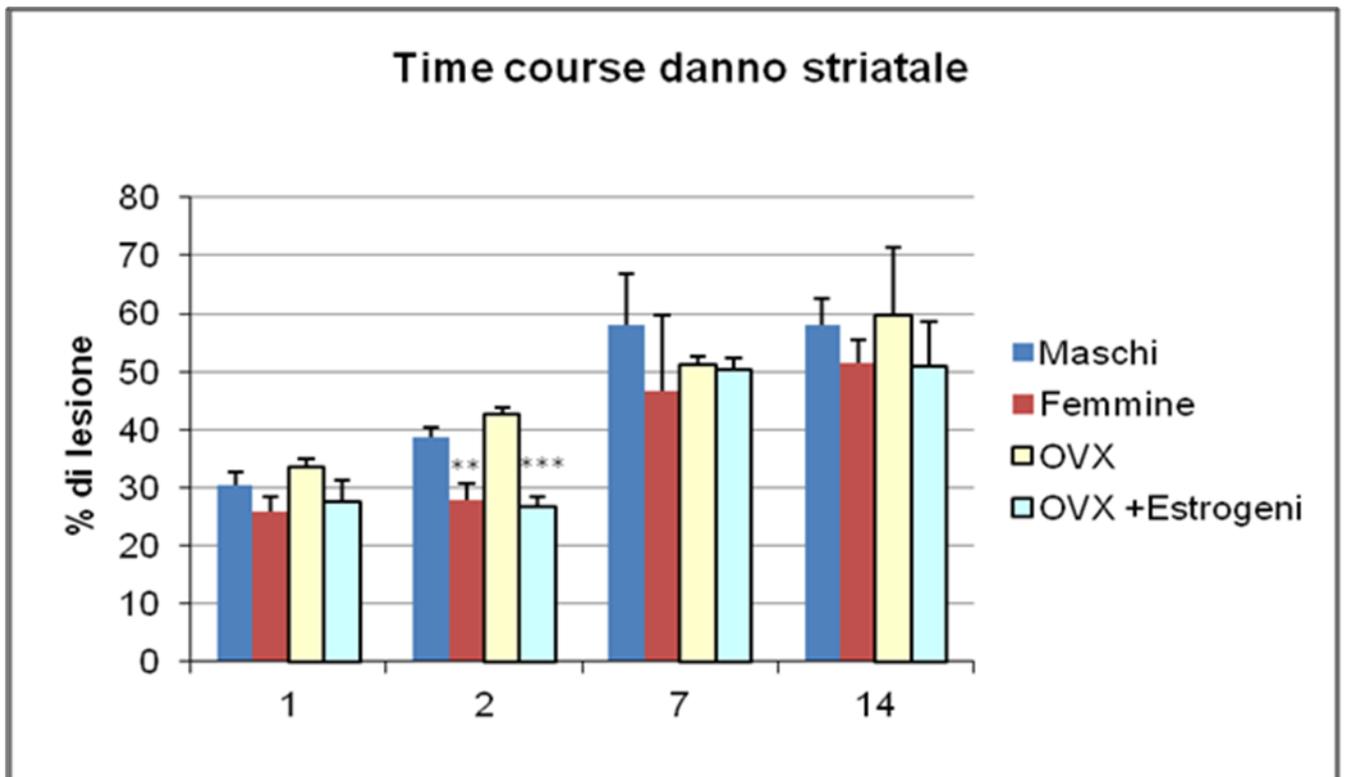
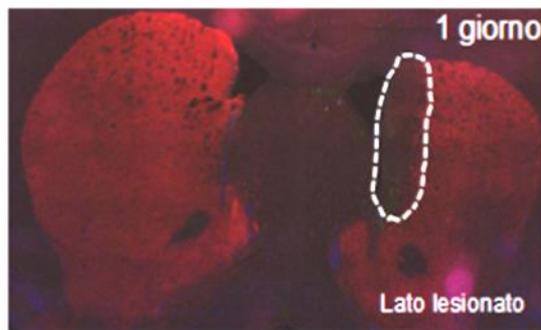


Figura 10: il grafico mostra il confronto della perdita tempo-dipendente dei terminali dopaminergici striatali in seguito all'infusione di 6-OHDA nei diversi gruppi sperimentali. Gli istogrammi rappresentano la percentuale (%) di volume del corpo striato privo della marcatura con la TH confrontata con l'intero corpo striato, dell'emisfero lesionato. Gli istogrammi sono espressi come media + SEM. \*\* p-value < 0,01; \*\*\*p-value < 0,001; vs OVX.



*Figura 11: immagine rappresentativa dell'evoluzione del danno al corpo striato 1, 7, 14 giorni dopo l'infusione di 6-OHDA. Le aree tratteggiate segnano l'area di lesione (immunofluorescenza per TH).*

### **Danno a livello della SNc**

La progressione del danno dei neuroni dopaminergici a livello della SNc è stata valutata attraverso la conta dei neuroni TH positivi presenti nella SNc dell'emisfero lesionato (destra) e di quello non lesionato (sinistra). Il rapporto tra il numero dei neuroni dopaminergici del lato destro e quello sinistro è stato espresso come percentuale di lesione.

I dati sono rappresentati in figura 12.

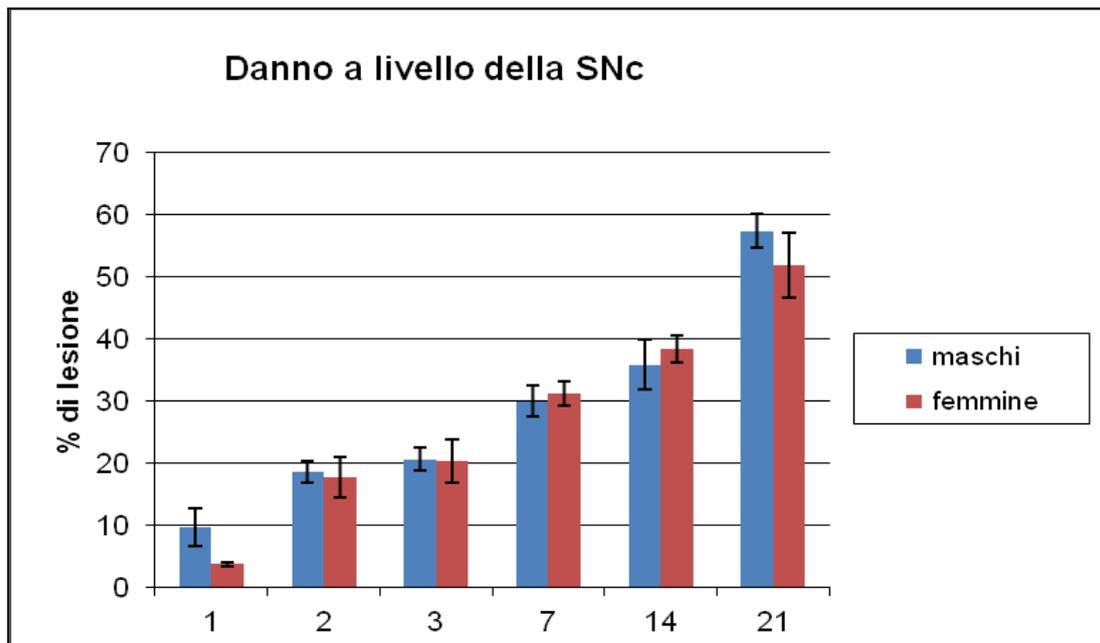


Figura 12: il grafico mostra il confronto della perdita tempo-dipendente dei neuroni dopaminergici della SNc in seguito all'infusione di 6-OHDA in topi di sesso maschile e femminile. Gli istogrammi rappresentano la percentuale (%) di riduzione del numero di neuroni TH positivi nella SNc dell'emisfero lesionato comparata con quella dell'emisfero non lesionato. Gli istogrammi sono espressi come media + SEM. Per ogni gruppo sperimentale e per ogni tempistica n=7.

I risultati ottenuti mostrano un aumento tempo-dipendente della perdita dei corpi cellulari della SNc in tutti i gruppi sperimentali.

Nessuna differenza significativa, in termini di percentuale di lesione a livello della SNc, è stata osservata tra i topi di sesso maschile e femminile. Un aumentato danno a livello dei neuroni dopaminergici è stato evidente nelle OVX non trattate con estrogeni a tutte le tempistiche valutate, in particolare a 7 e 14 giorni dopo l'infusione della neurotossina, rispetto alle OVX trattate con estrogeni. Tale differenza era marcata e statisticamente significativa anche rispetto ai topi di sesso maschile e di sesso femminile intatti, mentre nessuna differenza è stata evidenziata tra il gruppo OVX trattato con estrogeni e gli animali intatti (Figura 13). Nessuna lesione a livello della SNc è stata evidenziata nei gruppi controllo (sham) (dati non mostrati). Alcune immagini rappresentative della progressione del danno a livello della SNc dei gruppi OVX e OVX+Estrogeni sono riportate nella figura 14.

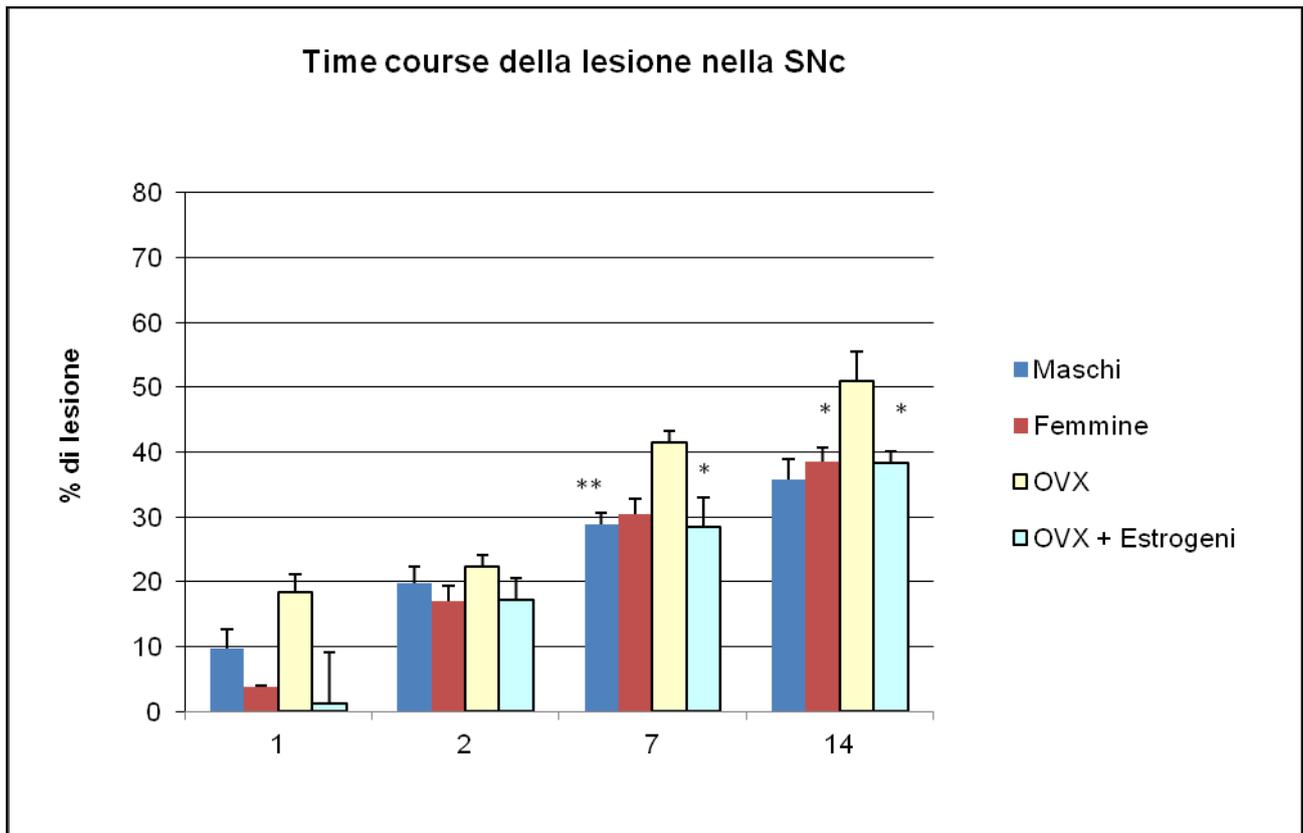
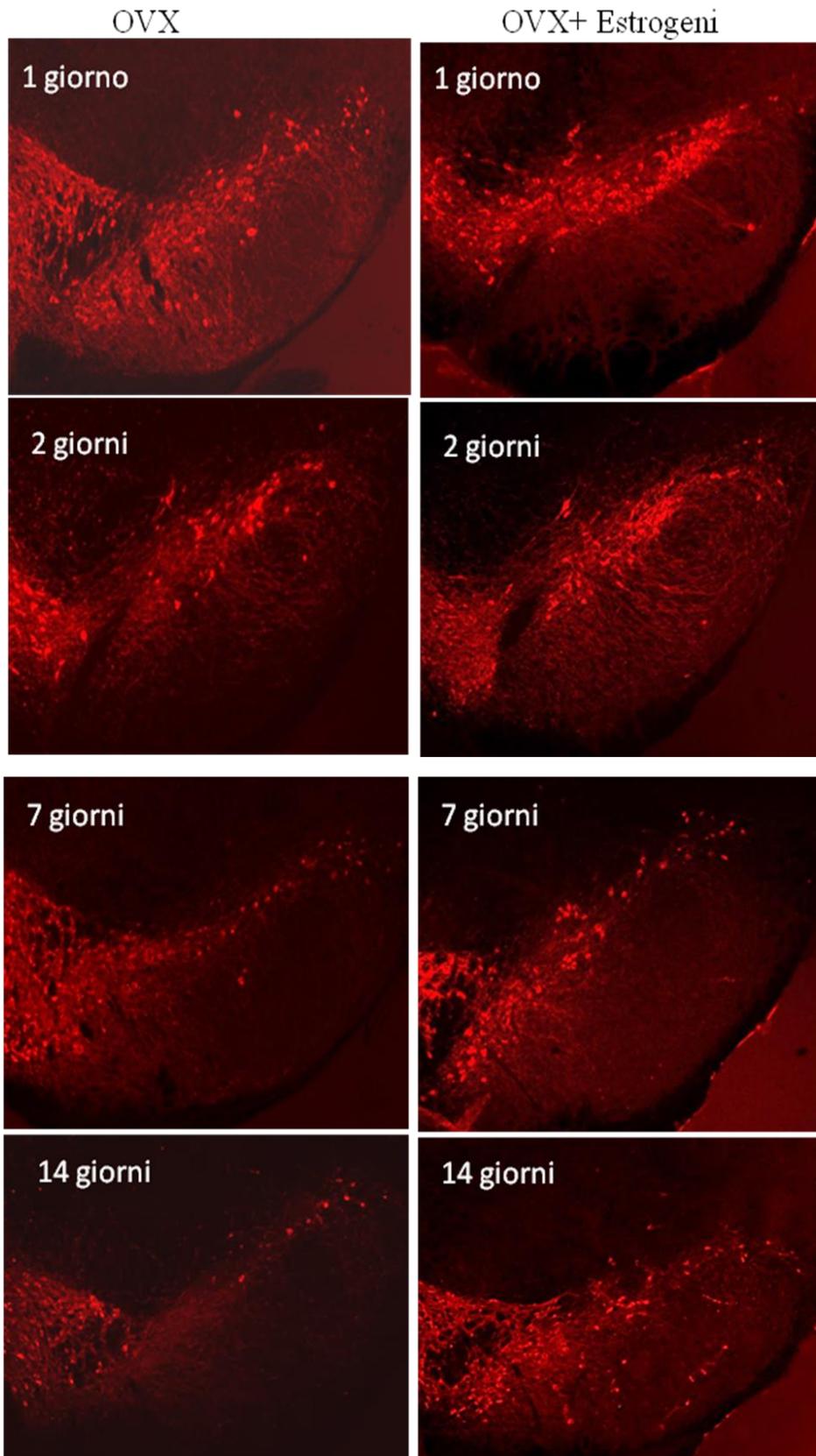


Figura 13: il grafico mostra il confronto della perdita tempo-dipendente dei neuroni dopaminergici della SNc in seguito all'infusione di 6-OHDA in tutti i gruppi sperimentali. Gli istogrammi rappresentano la percentuale (%) di riduzione del numero di neuroni TH positivi nella SNc dell'emisfero lesionato comparata con quella dell'emisfero non lesionato. Gli istogrammi sono espressi come media + SEM. \* p-value < 0,05; \*\*p-value < 0,01; vs OVX

Dai risultati ottenuti è possibile osservare come i valori della lesione ottenuti nel gruppo OVX+Estrogeni sono paragonabili a quelli ottenuti nei topi di sesso maschile e di sesso femminile, rispetto alle OVX ,dove il danno è più marcato a tutte le tempistiche valutate.



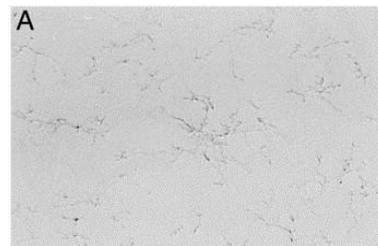
*Figura 14: immagine rappresentativa del danno a livello della SNc in topi OVX e OVX+ Estrogeni a 1, 2, 7 e 14 giorni dopo l'infusione della 6-OHDA. [immunofluorescenza TH]*

## 5.3 Valutazione dell'attivazione e della polarizzazione microgliale

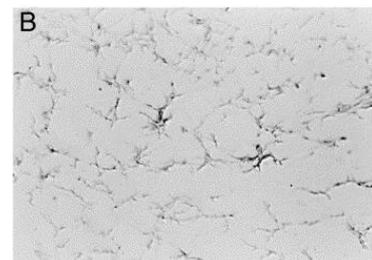
### 5.3.1 Valutazione dell'attivazione microgliale

Per valutare il possibile ruolo anti-infiammatorio degli estrogeni e come questo potesse influenzare la progressione del danno nigrostriatale indotto dalla 6-OHDA, è stata effettuata un'analisi dell'attivazione e della polarizzazione microgliale a livello della SNc. L'analisi dell'espressione di Iba1, usato come marcatore microgliale, è stata effettuata in topi di sesso maschile, di sesso femminile, OVX e OVX+Estrogeni, alle stesse tempistiche valutate per il danno nigrostriatale (1, 2, 7, 14 giorni dall'infusione di 6-OHDA). L'attivazione microgliale è stata valutata a livello della SNc, sia nell'emisfero lesionato sia in quello non lesionato usando la scala di Colburn, che prevede 4 diversi stadi progressivi di attivazione che differiscono tra di loro per la morfologia e per la densità cellulare (Colburn et al., 1997), secondo quanto mostrato nell'esempio di seguito:

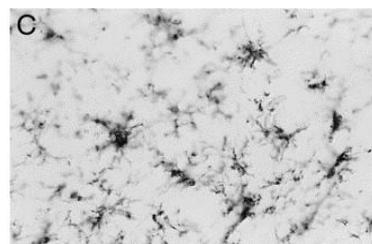
Stadio a riposo (0): le cellule si presentano ramificate, ben distanziate e con un piccolo corpo cellulare (Fig. 15A).



Stadio 1 (+): le cellule sono ramificate, ma diminuisce lo spazio intercellulare (Fig. 15B).



Stadio 2 (++): le cellule perdono le ramificazioni e aumenta la densità cellulare (Fig. 15 C).



Stadio 3 (+++): le cellule presentano prolungamenti corti e spessi (Fig. 15D)



Figura 15: immagini rappresentative dei 4 differenti stadi di attivazione microgliale [A: stadio 0; B: stadio 1; C: stadio2; D: stadio3].

L'espressione di Iba1, è risultata aumentata unicamente nel lato lesionato, mentre in quello non lesionato era completamente assente. Nessuna espressione di Iba1 è stata evidenziata nei gruppi controllo che hanno ricevuto salina al posto della 6-OHDA (dati non mostrati).

I topi di sesso maschile e femminile hanno mostrato un'attivazione microgliale paragonabile a quella dello stadio 1 della scala di Colburn, 1 e 2 giorni dopo l'infusione della neurotossina. Tale attivazione è scomparsa nelle tempistiche più tardive 7 e 14 giorni dopo l'infusione di 6-OHDA.

Al contrario, i topi OVX hanno mostrato un'attivazione microgliale differente nel tempo: più accentuata rispetto ai topi maschi e femmine già 1 giorno dopo l'infusione della neurotossina. L'attivazione si è ridotta al settimo giorno dopo la lesione, ma era presente nuovamente in modo marcato (stadio 2 della scala di Colburn) 14 giorni dopo l'infusione della neurotossina. Il gruppo OVX trattato con estrogeni (OVX+Estrogeni) ha mostrato una maggiore attivazione microgliale nella SNc, rispetto ai topi di sesso maschile, femminile e rispetto al gruppo OVX, 1 giorno dopo l'infusione della neurotossina, che si è ridotta ai tempi successivi (2, 7 e 14 giorni dopo l'infusione di 6-OHDA) mantenendo bassi livelli di attivazione, paragonabili a quelli osservati nei topi di sesso maschile e femminile. Al contrario i topi OVX senza trattamento estrogenico hanno mostrato un'elevata attivazione microgliale rispetto agli altri gruppi sperimentali, in tutte le tempistiche valutate. I dati ed alcune immagini rappresentative inerenti all'attivazione microgliale nei diversi gruppi sperimentali sono riportate in tabella 8 e figura 16 rispettivamente.

Gruppi sperimentali	1 giorno	2 giorni	7 giorni	14 giorni
Maschi	+	+	0	0
Femmine	+	+	0	0
OVX	+ / +++	++	+	++
OVX+Estrogeni	+ / +++	+	0 / +	0 / +

Tabella 8: stato di attivazione microgliale riscontrato a livello della SNc in topi maschi, femmine, OVX+Estrogeni e OVX. Gli stadi di attivazione microgliali sono stati valutati secondo la scala di Colburn. [0= stadio a riposo; 0/+ = le cellule microgliali sono ramificate ma non aumenta la densità cellulare; += le cellule microgliali sono ramificate e diminuisce lo spazio intercellulare; + / +++ = stato intermedio di attivazione tra lo stadio 1 (+) e 2 (++); +++ = le cellule microgliali perdono le ramificazioni ed aumenta la densità cellulare].

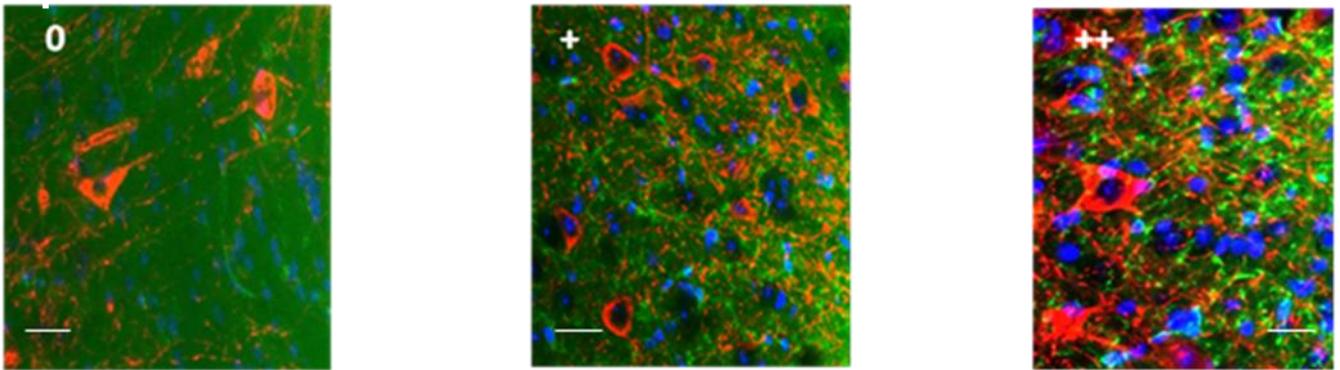


Figura 16: immagini rappresentative ottenute dalle reazioni di immunofluorescenza; in rosso la TH ed in verde Iba1 e in blu il Dapi (nuclei cellulari): attivazione microgliale 0 (paragonabile allo stadio a riposo della scala di Colburn B) attivazione microgliale + (paragonabile allo stadio 1 della scala di Colburn C) attivazione microgliale ++ (paragonabile allo stadio 2 della scala di Colburn; (scale bar 20 $\mu$ m).

### 5.3.2 Valutazione della polarizzazione microgliale

L'espressione dei marcatori TNF- $\alpha$  e CD206 nella SNc è stata utilizzata come indice del fenotipo microgliale M1 (citotossico) e M2 (citoprotettivo), rispettivamente. La tabella 9 mostra la valutazione della polarizzazione della microglia.

I risultati hanno dimostrato che in tutti i gruppi sperimentali alla tempistica più precoce, la microglia è polarizzata verso il fenotipo M2. Una differenza nella polarizzazione è stata evidente a partire dal secondo giorno dopo l'infusione della neurotossina nei diversi gruppi sperimentali. In particolare, nei topi di sesso maschile e negli OVX la microglia era polarizzata verso il fenotipo M1, mentre nei topi di sesso femminile e nei topi OVX+Estrogeni verso il fenotipo M2, 2 giorni dopo l'infusione della neurotossina. Nelle tempistiche più avanzate (7 e 14 giorni) nei topi di sesso maschile e femminile, non è stata evidenziata alcuna polarizzazione.

I risultati hanno dimostrato che in assenza di estrogeni (OVX) persiste un fenotipo microgliale citotossico (M1), in tutte le tempistiche valutate, tranne il giorno dopo l'infusione di 6-OHDA, dove probabilmente la microglia tende a contrastare il danno indotto dalla neurotossina. Dopo trattamento con estrogeni (OVX+Estrogeni) il fenotipo microgliale tende invece a modificarsi nel fenotipo citoprotettivo (M2), legato probabilmente all'effetto anti-infiammatorio del *17 $\beta$ -estradiolo*. Nelle tempistiche più avanzate (7 e 14 giorni) è stata osservata invece una polarizzazione M1 nei topi OVX e M2 nei topi OVX+Estrogeni. Pertanto, il trattamento estrogenico favorisce la polarizzazione della microglia in senso citoprotettivo. Alcune immagini rappresentative della polarizzazione microgliale, rispettivamente M1 (Fig. 17) ed M2 (Fig. 18) sono riportate di seguito.

Gruppi sperimentali	1 giorno	2 giorni	7 giorni	14 giorni
Maschi	CD206 (M2)	TNF $\alpha$ (M1)	0	0
Femmine	CD206 (M2)	CD206 (M2)	0	0
OVX	CD206 (M2)	TNF $\alpha$ (M1)	TNF $\alpha$ (M1)	TNF $\alpha$ (M1)
OVX+Estrogeni	CD206 (M2)	CD206 (M2)	CD206 (M2)	CD206 (M2)

Tabella 9: rappresenta il fenotipo microgliale assunto 1, 2, 7 e 14 giorni dopo l'infusione di 6-OHDA in topi maschi, femmine, OVX+Estrogeni.e OVX

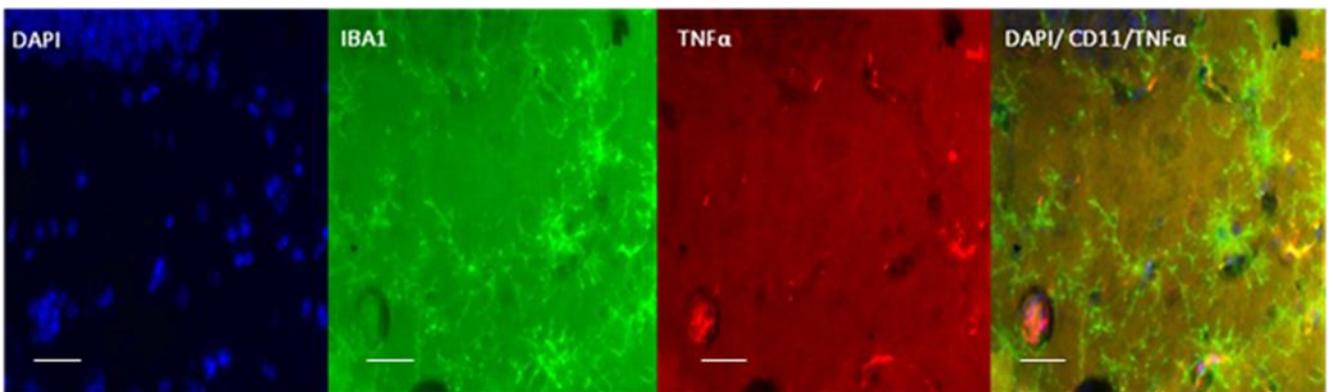


Figura 17: immagini rappresentative di una tripla reazione di immunofluorescenza a livello della SNc. Appare chiara la co-localizzazione dei tre antigeni [in blu il DAPI (marcatore nucleare); in verde Iba1 e in rosso TNF- $\alpha$ ] (scale bar 20 $\mu$ m).

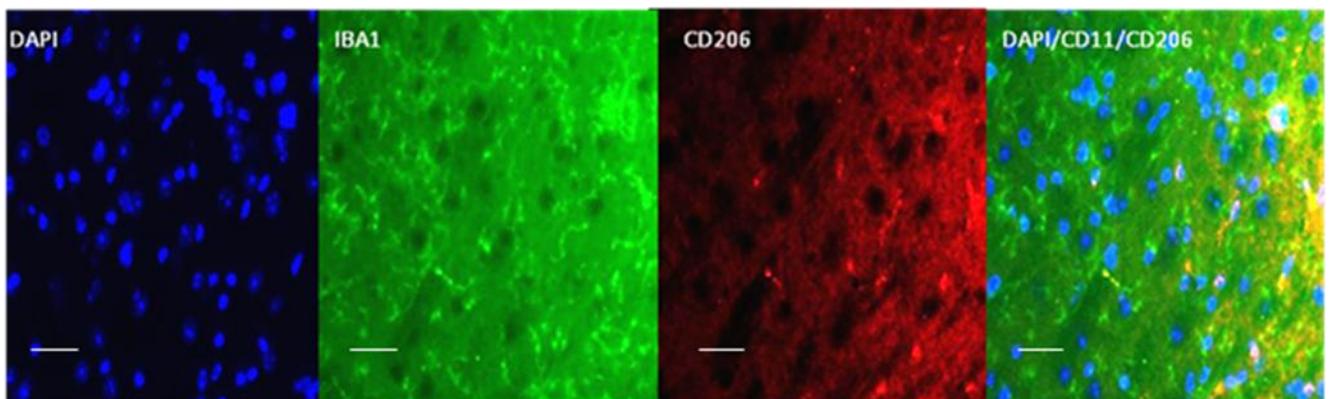


Figura 18: immagini rappresentative di una tripla reazione di immunofluorescenza a livello della SNc. Appare chiara la co-localizzazione dei tre antigeni [in blu il DAPI (marcatore nucleare); in verde Iba1 e in rosso CD206] (scale bar 20 $\mu$ m).

#### 5.4 Valutazione dell'attivazione degli astrociti

L'analisi dell'espressione di GFAP, noto marcatore astrogliale, è stata effettuata in topi di sesso maschile, femminile, OVX e OVX+Estrogeni, alle tempistiche valutate per il danno nigrostriatale (1, 2, 7, 14 giorni dall'infusione della neurotossina). L'attivazione degli astrociti è stata valutata esclusivamente a livello della SNc, nell'emisfero lesionato usando la scala di Colburn, analogamente a quanto fatto per la microglia.

L'espressione di GFAP, è risultata aumentata nel lato lesionato, mentre nessun aumento di espressione di GFAP è stato evidenziato nei gruppi controllo che hanno ricevuto salina al posto della 6-OHDA (dati non mostrati).

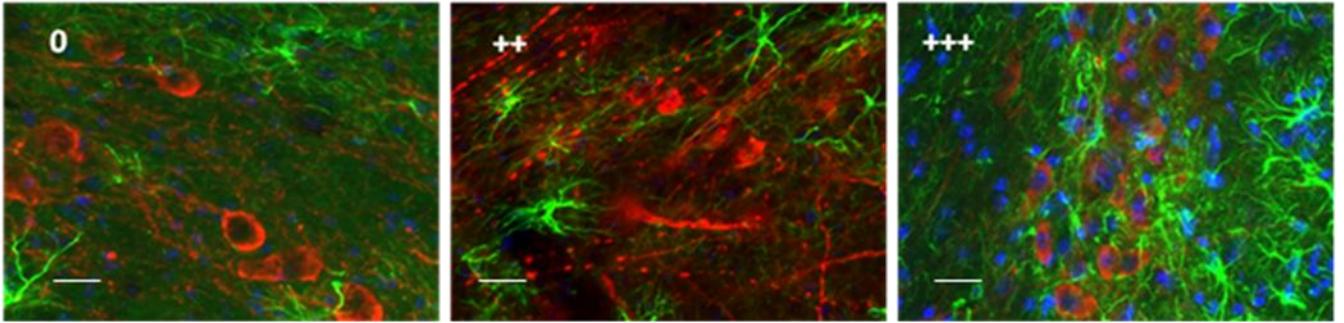
I risultati ottenuti riguardanti l'attivazione degli astrociti hanno mostrato che i topi di sesso maschile e femminile presentavano una leggera attivazione nelle fasi precoci del danno nigrostriatale, mentre tale attivazione, tende ad aumentare nelle tempistiche più tardive arrivando ad avere livelli di attivazione astrogliale paragonabili al terzo stadio della scala di Colburn (++).

Al contrario, i topi OVX presentavano un'attivazione astrogliale più marcata a partire dal secondo giorno dopo l'infusione della neurotossina ed è stata mantenuta con un grado di attivazione maggiore anche alle tempistiche più tardive. Il gruppo OVX+Estrogeni ha mostrato un'attivazione astrogliale paragonabile a quella dello stadio 1 della scala di Colburn, a 1 e a 2 giorni dopo l'infusione della neurotossina. Tale attivazione tende ad aumentare alle tempistiche più tardive, mantenendo complessivamente un livello di attivazione astrogliale inferiore rispetto al gruppo OVX senza trattamento estrogenico. Inoltre il grado di attivazione che è stato analizzato nel gruppo OVX+Estrogeni risulta essere paragonabile a quello valutato nei topi di sesso maschie e femminile intatti. I dati sono mostrati in tabella 10.

Gruppi sperimentali	1 giorno	2 giorni	7 giorni	14 giorni
Maschi	0/+	+	+ /+++	++
Femmine	0/+	+	++	++
OVX	+	++	++ /+++	++ /+++
OVX+Estrogeni	+	+	++	++

Tabella 10: stato di attivazione astrogliale riscontrato a livello della SNc in topi OVX+Estrogeni e OVX. Gli stadi di attivazione astrogliale sono stati valutati secondo la scala di Colburn. [0= stadio a riposo; 0/+ = le cellule astrogliali sono ramificate ma non aumenta la densità cellulare; + = le cellule astrogliali sono ramificate e diminuisce lo spazio intercellulare; + /+++ = stato intermedio di attivazione tra lo stadio 1 (+) e 2 (++); ++ = le cellule astrogliali perdono le ramificazioni ed aumenta la densità cellulare].

Di seguito sono riportate delle immagini rappresentative degli stati di attivazione astrogliale ottenute dalle reazioni di immunofluorescenza in topi OVX e OVX+Estrogeni (Fig. 19).



*Figura 19: immagini rappresentative ottenute dalle reazioni di immunofluorescenza; in rosso la TH ed in verde Iba1 e in blu il Dapi: A) attivazione astrogliale 0 (paragonabile allo stadio a riposo della scala di Colburn E) attivazione astrogliale + (paragonabile allo stadio 2 della scala di Colburn G) attivazione astrogliale +++ (paragonabile allo stadio 3 della scala di Colburn (scale bar 20µm).*

# Discussione

Il ruolo del genere, in particolare l'effetto degli estrogeni, nello sviluppo e nella progressione della MP è un argomento tuttora molto dibattuto nella comunità scientifica. La MP, come molte altre malattie neurodegenerative, mostra un dimorfismo sessuale, per cui il rischio di sviluppare la malattia è maggiore negli uomini rispetto alle donne (Wooten et al., 2004). Poiché è noto che gli estrogeni hanno effetti modulatori sulla sintesi e sulla funzionalità della dopamina, gli studi clinici si sono focalizzati sulla correlazione tra l'esposizione agli estrogeni nel corso della vita e il rischio di sviluppare la MP (Smith & Dahodwala, 2014). E' stato infatti riportato che l'incidenza e la prevalenza della MP sono più alte nelle donne in menopausa rispetto a donne in pre-menopausa di pari età (Currie et al., 2004; Ragonese et al., 2006 a, b), mentre le donne con una vita fertile più prolungata mostrano un esordio più tardivo della MP (Ragonese et al., 2004). Altri studi mostrano che una ridotta esposizione della via nigrostriatale agli estrogeni durante il corso della vita è associata ad una maggiore severità della sintomatologia parkinsoniana (Cereda et al., 2013).

Lavori sperimentali, condotti in diversi modelli animali, suggeriscono inoltre un effetto positivo degli estrogeni sulle malattie neurodegenerative, probabilmente legato alla loro azione anti-infiammatoria, anti-apoptotica e di conseguenza neuroprotettiva (Habib & Beyer, 2014).

In questo lavoro è stata valutata l'evoluzione temporale del danno nigrostriatale indotto dalla 6-OHDA, neurotossina specifica per i neuroni dopaminergici, in topi di sesso maschile e femminile intatti e topi ovariectomizzati (OVX) non trattati e trattati con estrogeni (OVX+ Estrogeni), per investigare l'effettivo ruolo degli estrogeni nella progressione della MP.

## **Valutazione del danno nigrostriatale**

I risultati ottenuti non hanno mostrato nessuna differenza significativa tra il danno nigrostriatale osservato nei topi di sesso maschile rispetto a quelli di sesso femminile, sebbene il danno indotto dalla 6-OHDA a livello striatale, sia risultato tendenzialmente più marcato nei maschi. Al contrario, i topi OVX, a cui sono state asportate le ovaie alla settima settimana di vita, presentavano una lesione nigrostriatale maggiore rispetto a quella degli altri gruppi sperimentali, in quasi tutte le tempistiche valutate, raggiungendo una significatività statistica nella SNc 7 e 14 giorni dopo l'infusione della neurotossina. Tale dato suggerisce che l'esposizione costante agli estrogeni influisce sull'evoluzione del danno indotto dalla 6-OHDA. Analogamente, i topi OVX trattati con estrogeni a rilascio graduale hanno riportato una riduzione statisticamente significativa del danno a livello della SNc, 7 e 14 giorni dopo l'infusione della neurotossina, rispetto agli animali OVX non trattati con estrogeni. E' quindi ipotizzabile che la differenza dei livelli estrogenici tra topi di sesso

maschile e femminile, seppur rilevante, non sia sufficiente a determinare una maggiore suscettibilità dei neuroni della via nigrostriatale dei maschi agli effetti neurotossici della 6-OHDA, che si manifesta invece in totale assenza di stimolazione estrogenica, come accade nei topi OVX.

La produzione degli estrogeni nelle femmine deriva infatti principalmente dai follicoli ovarici, mentre nei maschi – che ne sono sprovvisti – una quota ridotta, ma biologicamente attiva, viene sintetizzata da altri organi, quali i testicoli e le ghiandole surrenali. *Pertanto, è possibile che nei topi OVX non trattati con estrogeni, la limitata esposizione alla stimolazione estrogenica durante la vita fertile abbia causato una maggiore suscettibilità della via nigrostriatale alla neurotossina, annullata dal trattamento sostitutivo con estrogeni a rilascio graduale.* Questo dato è in linea con studi precedenti che hanno dimostrato come una maggior esposizione agli estrogeni durante la vita fertile diminuisca il rischio di sviluppare la MP (Ragonese et al., 2006). Rodriguez-Perez e collaboratori hanno osservato una diminuzione del 50% dei livelli di ER $\alpha$  nella SNc di ratti ovariectomizzati, che si correggeva in seguito a trattamento estrogenico. Pertanto, è possibile che la neuroprotezione osservata nei topi OVX+Estrogeni possa essere mediata dall'interazione con i recettori ER $\alpha$  che risultano essere sovraespressi in seguito a trattamento estrogenico a livello delle cellule dopaminergiche superstiti. Tali recettori sono stati localizzati nella SNc e nelle cellule astrocitarie, mentre nelle cellule microgliali è stata osservata una maggiore espressione di ER $\beta$  (Rodriguez-Perez et al., 2015).

Tuttavia, ad oggi non è completamente chiaro quale dei due sottotipi di recettori medi gli effetti neuroprotettivi degli estrogeni. Alcuni studi hanno dimostrato che le cellule microgliali esprimono ER $\beta$  ma non ER $\alpha$  e che solo ER $\beta$  mediano l'effetto anti-infiammatorio degli estrogeni (Baker et al., 2004; Wu et al., 2013). Al contrario, Vegeto e collaboratori hanno riportato la presenza di ER $\alpha$  sulle cellule microgliali, suggerendo un ruolo neuroprotettivo (Vegeto et al., 2006). Infine, Rodriguez-Perez e collaboratori, hanno dimostrato la presenza di ER $\alpha$  e ER $\beta$  in astrociti e neuroni sia *in vitro* che *in vivo*, mentre *in vitro* hanno riportato la presenza di ER $\alpha$  nelle cellule microgliali. La spiegazione di queste discrepanze probabilmente risiede nel fatto che ER $\beta$  sono costitutivamente espressi sulle cellule microgliali, mentre ER $\alpha$  sono recettori soggetti ad *upregulation* in seguito ad attivazione di queste cellule, e potrebbero quindi svolgere un'azione anti-infiammatoria e di conseguenza protettiva (Rodriguez-Perez et al., 2015). Lavori precedenti hanno infatti mostrato un aumento di espressione di ER $\alpha$  nelle cellule microgliali in seguito a trattamento con la tossina LPS, che attiva la microglia (Tapia-Gonzalez et al., 2008). Inoltre, la presenza dei recettori per gli estrogeni accoppiati alle proteine G 1 (GPER1), suggerisce un loro possibile coinvolgimento nell'effetto neuroprotettivo degli estrogeni in modelli animali di MP (Borque et al., 2013, 2014),

attraverso un'interazione con la via di trasduzione del segnale di ER $\alpha$  e ER $\beta$  (Al Sweidi et al., 2012; Prossnitz and Maggiolini, 2009).

### **Attivazione e polarizzazione della microglia**

Diversi studi confermano gli effetti modulatori degli estrogeni nei fenomeni neuroinfiammatori tipici di alcune patologie neurodegenerative, attraverso la loro azione sulla microglia (Johann & Beyer et al., 2012; Perego et al., 2011) e sull'astroglia (Cerciat et al., 2010; De Marinis et al., 2013). Gli estrogeni riducono infatti i livelli di citochine e di altri modulatori della neuroinfiammazione agendo direttamente sulle cellule microgliali, riducendone quindi la loro attivazione (Pozzi et al., 2006; Chakrabarti et al., 2014). La neuroinfiammazione che accompagna la degenerazione nigrostriatale è quindi caratterizzata dall'attivazione microgliale. Le cellule della microglia possono assumere un fenotipo M1 citotossico, che si associa al rilascio di numerosi agenti citotossici come IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , proteasi e ROS (Block et al., 2007; Hanisch, 2002). Ma possono anche assumere un fenotipo M2, citoprotettivo, che favorisce la ricaptazione del glutammato (Nakajima et al., 2008), la rimozione dei detriti cellulari (Stoll & Jander, 1999) e la produzione di fattori neurotrofici come l'IGF-1 (Thored et al., 2009), il GDNF (Lu et al., 2005) e il BDNF (Batchelor et al., 1999; David & Kroner, 2011).

Il duplice ruolo della microglia nella neuroinfiammazione è stato ampiamente studiato in modelli animali di ischemia cerebrale. In particolare, Perego e collaboratori (2011) hanno mostrato un picco di espressione di CD11 (marker microgliale) 6-12 ore dopo danno ischemico. Dopo 24 ore dall'insulto ischemico, la microglia ramificata permane intorno alla lesione, agendo probabilmente come barriera per contenerne l'espansione, mentre la microglia con forma ameboide ha la funzione di risolvere l'infiammazione e promuovere il recupero del danno. Tuttavia, alla tempistica più tardiva (7 giorni dopo l'induzione dell'ischemia), quando il danno neuronale diventa irrecuperabile, la microglia assume un comportamento fagocitico. In altri modelli murini di MP basati sull'infusione di 6-OHDA nella via nigrostriatale, è stato dimostrato che l'attivazione microgliale nella SNc precede il picco della lesione neuronale (Armentero et al., 2006a; Virgone-Carlotta et al., 2013). Analogamente, nel presente studio è stato dimostrato, che la microglia è maggiormente attivata nella fase precoce (1 e 2 giorni dopo l'infusione di 6-OHDA) nella SNc di topi di entrambi i sessi e che tale attivazione è ridotta 7 giorni dopo l'infusione della neurotossina, per poi scomparire alla tempistica più tardiva (vedi tabella 1).

Il profilo di attivazione temporale microgliale osservato nei topi OVX è sorprendentemente diverso da quello dei topi di sesso maschile e di sesso femminile intatti. In particolare, la risposta microgliale precoce (1 giorno dall'infusione di 6-OHDA) nei topi OVX, con e senza trattamento

estrogenico, risulta essere più marcata rispetto a quella osservata negli altri gruppi sperimentali. Tale risposta risulta essere aumentata anche alle tempistiche più tardive, ossia 14 giorni dopo l'infusione della neurotossina, solo negli animali OVX senza trattamento estrogenico.

*E' interessante osservare che il gruppo dei topi OVX trattati con estrogeni presenta, alle tempistiche più tardive, una ridotta attivazione della microglia rispetto ai topi OVX non trattati con estrogeni.* Tale osservazione conferma quindi l'effetto anti-infiammatorio degli estrogeni attraverso un'interazione con la microglia.

Inoltre, i cambiamenti relativi all'attivazione microgliale sono accompagnati da significative differenze nel pattern di polarizzazione nei diversi gruppi sperimentali. I risultati dimostrano che dopo un giorno dall'infusione di 6-OHDA, tutti i gruppi sperimentali mostrano un fenotipo di attivazione microgliale citoprotettivo M2, caratterizzato dall'espressione dell'antigene CD206, suggerendo che nella fase iniziale la microglia tende a proteggere i neuroni dallo stimolo tossico esplicando quindi una funzione protettiva. Tuttavia, due giorni dopo l'infusione della neurotossina, la microglia rimane polarizzata verso il fenotipo M2 nei topi di sesso femminile e nei topi OVX+Estrogeni, mentre nei topi di sesso maschile e nei topi OVX tende a polarizzarsi verso il fenotipo citotossico M1. Nel gruppo sperimentale dei topi OVX, a differenza di quanto osservato negli altri gruppi, la microglia appare notevolmente attivata e con un fenotipo M1, 14 giorni dopo l'infusione della neurotossina.

*Tale risultato sembra essere associato al marcato danno neuronale presente nei topi OVX non trattati con estrogeni, infatti in presenza di trattamento estrogenico nei topi OVX, la microglia presenta uno stadio di attivazione minore rispetto alle OVX senza trattamento estrogenico e risulta essere polarizzata verso il fenotipo citoprotettivo M2. Tale fenomeno è accompagnato da una riduzione significativa del danno a livello SNC.*

### **Attivazione dell'astroglia**

La neuroinfiammazione che accompagna la degenerazione nigrostriatale, è caratterizzata oltre che dall'attivazione microgliale, anche da quella astrogliale. Studi condotti in modelli di ischemia cerebrale mostrano che la presenza dell'attivazione degli astrociti si accompagna costantemente a quella microgliale (Habib et al., 2014). Nel presente studio abbiamo riportato un aumento dell'attivazione astrogliale alle tempistiche più tardive in tutti i gruppi sperimentali. In particolare, i topi di sesso maschile e quelli di sesso femminile hanno riportato un'attivazione astrogliale più bassa nelle fasi precoci dall'induzione del danno e una attivazione più elevata, nelle fasi più tardive; l'attivazione astrogliale nel gruppo OVX non trattato con estrogeni mantiene lo stesso pattern, ma risulta più marcata in quasi tutte le tempistiche valutate, rispetto agli altri gruppi

sperimentali. Dopo trattamento estrogenico i topi OVX hanno invece mostrato una ridotta attivazione degli astrociti con i livelli simili a quelli valutati negli animali intatti. Tali risultati sono in accordo con i dati presenti in letteratura, che descrivono una lieve attivazione astrogliale 1, 3, 6 giorni dopo l'infusione della 6-OHDA, mentre a partire dal nono giorno post 6-OHDA l'attivazione risulta essere notevolmente marcata (Simon RW et al., 2013).

*Nel presente studio è stato dimostrato un minor grado di attivazione degli astrociti dei topi OVX trattati con estrogeni rispetto ai topi OVX che non hanno ricevuto il trattamento estrogenico in risposta alla 6-OHDA.* Gli astrociti possono avere quindi un duplice ruolo ossia neuroprotettivo o neurodegenerativo, il passaggio da un ruolo all'altro dipende in gran parte dalle molecole rilasciate nello spazio extracellulare e di conseguenza dal microambiente che condividono con i neuroni. Pertanto è plausibile che, dopo l'ovarioctomia, il loro microambiente possa essere alterato, mentre dopo trattamento estrogenico venga riportato a condizioni paragonabili a quella dei topi intatti. Infatti è stato ben documentato che gli astrociti sottoposti a uno stato di gliosi in risposta ad uno stimolo dannoso, sono in grado di rilasciare citochine e chemochine che favoriscono la degenerazione neuronale. Inoltre gli astrociti possono essere attivati direttamente da citochine come TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  rilasciate dalla microglia, portando alla produzione di radicali liberi incrementando il danno neuronale (Johann S. & Beyer C. 2013).

In letteratura è stato osservato che colture di astrociti possono aumentare a loro volta la risposta infiammatoria della microglia attraverso l'attivazione di NF-kB, incrementando la tossicità a livello dei neuroni dopaminergici (Saijo et al., 2009). Tuttavia le stesse cellule possono rilasciare fattori neurotrofici, substrati metabolici come lattato e glutatione che favoriscono sia la sopravvivenza sia il corretto funzionamento dei neuroni. E' anche possibile che l'interazione degli estrogeni con altre molecole che regolano la sopravvivenza cellulare come il GDNF o il BDNF, influisca positivamente sul microambiente, riducendo lo stato di attivazione degli astrociti (Acáz-Fonseca E. et al., 2014). Altri studi hanno dimostrato che gli estrogeni sono in grado di regolare differenti parametri funzionali astrocitari, come i livelli di calcio intracellulare, il quale può influenzare la comunicazione degli astrociti con le cellule neurali e le altre cellule gliali (Perea e Arque, 2010). Tuttavia, esperimenti condotti in modelli animali hanno dimostrato che la riduzione dell'attivazione degli astrociti può essere anche un effetto secondario legato alla riduzione del danno neurale, relativo ad un minor rilascio di fattori che favoriscono l'astrogliosi (Acáz-Fonseca E. et al., 2014). Tale effetto potrebbe essere mediato, ancora una volta, dall'interazione con i recettori gli estrogeni ER $\alpha$  e ER $\beta$ , localizzati a livello intracellulare, i quali potrebbero subire un potenziamento in seguito all'infusione di 6-OHDA (Dang J. Et al., 2011). Inoltre è stato ipotizzato che dopo l'induzione del danno, gli astrociti sono in grado di sintetizzare nuovi steroidi capaci di modulare la propria

attività e i *network* delle cellule circostanti, tra cui i neuroni, attraverso un'azione sia autocrina sia paracrina (Garcia –Segura LM. Et al., 1999; Gatson J.W. et al., 2011).

# Conclusione

L'identificazione di approcci terapeutici in grado di arrestare la degenerazione neuronale che caratterizza la MP e di contrastare il processo infiammatorio associato rappresentano uno dei principali scopi della ricerca scientifica in questo campo. Con il progressivo invecchiamento della popolazione, l'incidenza della MP è destinata infatti a crescere ed il carico assistenziale che andrà a gravare a livello socio-economico e familiare sarà sempre più oneroso.

I risultati ottenuti in questo studio hanno contribuito a comprendere il ruolo del genere e, in particolare, gli effetti degli ormoni femminili sullo sviluppo e sulla progressione della MP, temi che risultano essere di estremo interesse. La novità del presente lavoro di dottorato è la dimostrazione che i topi OVX presentano un danno nigrostriatale da 6-OHDA maggiore rispetto ai topi di sesso maschile e femminile, associato ad una risposta microgliale orientata verso un pattern di polarizzazione citotossico, prolungato nel tempo. Tale risposta risulta essere associata ad un'attivazione degli astrociti più marcata nelle fasi più tardive. Al contrario, il trattamento estrogenico di topi OVX determina una riduzione del danno a livello della SNc in tutte le tempistiche valutate, con un profilo di attivazione gliale inferiore ai topi OVX non trattati, confermando il ruolo neuroprotettivo degli estrogeni

Sebbene il ruolo dell'attivazione microgliale e astrogliale nella patogenesi della MP sia molto dibattuto, appare chiaro dal presente studio che la modulazione di tale attivazione in senso neuroprotettivo – piuttosto che un blocco indiscriminato – potrebbe avere effetti positivi sulla progressione del fenomeno neurodegenerativo. Pertanto, l'identificazione dei meccanismi alla base di tale effetto potrebbe essere utile per lo sviluppo di composti “*estrogen-like*” in grado di massimizzare l'effetto neuroprotettivo e nello stesso tempo ridurre gli effetti indesiderati associati alla terapia farmacologica attualmente in uso.

# Bibliografia

- Acaz-Fonseca E, Sanchez-Gonzalez R, Azcoitia I, Arevalo MA, Garcia-Segura LM. Role of astrocytes in the neuroprotective actions of 17 $\beta$ -estradiol and selective estrogen receptor modulators. *Mol Cell Endocrinol.* 2014 May 25;389(1-2):48-57. Epub 2014 Jan 18.
- Al-Sweidi S., Morissette M., Bourque M., Di Paolo T.; Estrogen receptors and gonadal steroids in vulnerability and protection of dopamine neurons in a mouse model of Parkinson's disease; *Neuropharmacology*; Sep:61(4):583-91.
- Arevalo MA., Diz-Chaves Y., Santos-Galindo M., Bellini MJ., Garcia-Segura LM.; Selective oestrogen receptor modulators decrease the inflammatory response of glial cells; *J Neuroendocrinol.*; Jan:24(1):183-90; 2012.
- Armentero MT., Fancellu R., Nappi G., Bramanti P., Blandini F.; Prolonged blockade of NMDA or mGluR5 glutamate receptors reduces nigrostriatal degeneration while inducing selective metabolic changes in the basal ganglia circuitry in a rodent model of Parkinson's disease; *Neurobiol Dis.*; Apr:22(1):1-9; 2006a.
- Armentero MT., Levandis G., Nappi G., Bazzini E., Blandini F.; Peripheral inflammation and neuroprotection: systemic pretreatment with complete Freund's adjuvant reduces 6-hydroxydopamine toxicity in a rodent model of Parkinson's disease; *Neurobiol Dis.*; Dec:24(3):492-505; 2006b.
- Armentero MT., Pinna A., Ferré S., Lanciego JL., Müller CE., Franco R.; Past, present and future of A(2A) adenosine receptor antagonists in the therapy of Parkinson's disease; *Pharmacol Ther.*; Dec:132(3):280-99; 2011.
- Baeuerle PA., Baltimore D.; NF-kappa B: ten years after; *Cell.*; Oct 4:87(1):13-20; 1996.
- Baker AE, Brautigam VM, Watters JJ. Estrogen modulates microglial inflammatory mediator production via interactions with estrogenreceptor beta. *Endocrinology.* 2004 Nov;145(11):5021-32. Epub 2004 Jul 15.

- Baraka AM., Korish AA., Soliman GA., Kamal H.; The possible role of estrogen and selective estrogen receptor modulators in a rat model of Parkinson's disease; *Life Sci.*; May 9:88(19-20):879-85; 2011.
- Batchelor PE., Liberatore GT., Wong JY., Porritt MJ., Frerichs F., Donnan GA., Howells DW.; Activated macrophages and microglia induce dopaminergic sprouting in the injured striatum and express brain-derived neurotrophic factor and glial cell line-derived neurotrophic factor; *J Neurosci.*; Mar 1:19(5):1708-16; 1999.
- Becker JB.; Gender differences in dopaminergic function in striatum and nucleus accumbens; *Pharmacol Biochem Behav.*; Dec:64(4):803-12; 1999.
- Betarbet R., Sherer TB., MacKenzie G., Garcia-Osuna M., Panov AV., Greenamyre JT.; Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease; *Nat Neurosci.*; Dec:3(12):1301-6; 2000.
- Betarbet R., Sherer TB., Greenamyre JT.; Ubiquitin-proteasome system and Parkinson's diseases; *Exp Neurol.*; Feb:191 Suppl 1:S17-27; 2005.
- Blandini F, Nappi G, Tassorelli C, Martignoni E. Functional changes of the basal ganglia circuitry in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol.* 2000 Sep;62(1):63-88. Review.
- Blandini F., Cosentino M., Mangiagalli A., Marino F., Samuele A., Rasini E., Fancellu R., Tassorelli C., Pacchetti C., Martignoni E., Riboldazzi G., Calandrella D., Lecchini S., Frigo G., Nappi G.; Modifications of apoptosis-related protein levels in lymphocytes of patients with Parkinson's disease. The effect of dopaminergic treatment; *J Neural Transm.*; Aug:111(8):1017-30; 2004.
- Blandini F., Sinfioriani E., Pacchetti C., Samuele A., Bazzini E., Zangaglia R., Nappi G., Martignoni E.; Peripheral proteasome and caspase activity in Parkinson disease and Alzheimer disease; *Neurology*; Feb 28:66(4):529-34; 2006.
- Blandini F., Levandis G., Bazzini E., Nappi G., Armentero MT.; Time-course of nigrostriatal damage, basal ganglia metabolic changes and behavioural alterations following

- intrastratial injection of 6-hydroxydopamine in the rat: new clues from an old model; *Eur J Neurosci.*; Jan:25(2):397-405; 2007.
- Blandini F., Armentero MT., Martignoni E.; The 6-hydroxydopamine model: news from the past; *Parkinsonism Relat Disord.*; 14 Suppl 2:S124-9; 2008.
  - Blandini F., Armentero MT.; Animal models of Parkinson's disease; *FEBS J.*; Apr:279(7):1156-66; 2012.
  - Blandini F.; Neural and immune mechanisms in the pathogenesis of Parkinson's disease; *J Neuroimmune Pharmacol.*; Mar:8(1):189-201; 2013.
  - Blandini F., Armentero MT.; Dopamine receptor agonists for Parkinson's disease; *Expert Opin Investig Drugs*; Mar: 23(3):387-410; 2013.
  - Bloch G., Kurth SM., Akesson TR., Micevych PE.; Estrogen-concentrating cells within cell groups of the medial preoptic area: sex differences and co-localization with galanin-immunoreactive cells; *Brain Res.*; Nov 13:595(2):301-8; 1992.
  - Block ML., Zecca L., Hong JS.; Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms; *Nat Rev Neurosci.*; Jan:8(1):57-69; 2007.
  - Bourque M., Dluzen DE., Di Paolo T.; Neuroprotective actions of sex steroids in Parkinson's disease; *Front Neuroendocrinol.*; Jul:30(2):142-57; 2009.
  - Bourque M, Morissette M, Côté M, Soulet D, Di Paolo T. *Neurobiol. Implication of GPER1 in neuroprotection in a mouse model of Parkinson's disease. Aging.* 2013 Mar;34(3):887-901. Epub 2012 Jun 28.
  - Bourque M, Morissette M, Di Paolo T. Raloxifene activates G protein-coupled estrogen receptor 1/Akt signaling to protect dopamine neurons in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mice. *Neurobiol Aging.* 2014 Oct;35(10):2347-56. Epub 2014 Mar 20.

- Braak H., Del Tredici K., Rüb U., de Vos RA., Jansen Steur EN., Braak E.; Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease; *Neurobiol Aging*; Mar-Apr:24(2):197-211; 2003.
  - Branchi I, D'Andrea I, Armida M, Carnevale D, Ajmone-Cat MA, Pèzzola A, Potenza RL, Morgese MG, Cassano T, Minghetti L, Popoli P, Alleva E. Striatal 6-OHDA lesion in mice: Investigating early neurochemical changes underlying Parkinson's disease. *Behav Brain Res.* 2010 Mar 17;208(1):137-43. Epub 2009 Nov 13.
  - Breit S., Martin A., Lessmann L., Cerkez D., Gasser T., Schulz JB.; Bilateral changes in neuronal activity of the basal ganglia in the unilateral 6-hydroxydopamine rat model; *J Neurosci Res.*; May 1:86(6):1388-96; 2008.
  - Bronstein JM., Tagliati M., Alterman RL., Lozano AM., Volkmann J., Stefani A., Horak FB., Okun MS., Foote KD., Krack P., Pahwa R., Henderson JM., Hariz MI., Bakay RA., Rezai A., Marks WJ Jr., Moro E., Vitek JL., Weaver FM., Gross RE., DeLong MR.; Deep brain stimulation for Parkinson disease: an expert consensus and review of key issues; *Arch Neurol.*; Feb:68(2):165; 2011.
  - Brown DC., Steward LJ., Ge J., Barnes NM.; Ability of angiotensin II to modulate striatal dopamine release via the AT1 receptor in vitro and in vivo; *Br J Pharmacol.*; May:118(2):414-20; 1996.
  - Cahill L.; Why sex matters for neuroscience; *Nat Rev Neurosci.*; Jun:7(6):477-84; 2006.
- 
- Callier S, Morissette M, Grandbois M, Di Paolo T. Stereospecific prevention by 17beta-estradiol of MPTP-induced dopamine depletion in mice. *Synapse.* 2000 Sep 15;37(4):245-51.
  - Campos FL., Cristovão AC., Rocha SM., Fonseca CP., Baltazar G.; GDNF contributes to oestrogen-mediated protection of midbrain dopaminergic neurones; *J Neuroendocrinol.*; Nov:24(11):1386-97; 2012.

- Canet-Avilés RM., Wilson MA., Miller DW., Ahmad R., McLendon C., Bandyopadhyay S., Baptista MJ., Ringe D., Petsko GA., Cookson MR.; The Parkinson's disease protein DJ-1 is neuroprotective due to cysteine-sulfinic acid-driven mitochondrial localization; *Proc Natl Acad Sci U S A*; Jun 15:101(24):9103-8; 2004.
- Cantuti-Castelvetri I., Keller-McGandy C., Bouzou B., Asteris G., Clark TW., Frosch MP., Standaert DG.; Effects of gender on nigral gene expression and parkinson disease; *Neurobiol Dis.*; Jun:26(3):606-14; 2007.
- Caudle WM., Zhang J.; Glutamate, excitotoxicity, and programmed cell death in Parkinson disease; *Exp Neurol.*; Dec:220(2); 2009.
- Cereda E., Barichella M., Cassani E., Caccialanza R., Pezzoli G.; Reproductive factors and clinical features of Parkinson's disease; *Parkinsonism Relat Disord.*; Dec:19(12):1094-9; 2013.
- Chen H., Zhang SM., Hernán MA., Schwarzschild MA., Willett WC., Colditz GA., Speizer FE., Ascherio A.; Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the risk of Parkinson disease; *Arch Neurol.*; Aug:60(8):1059-64; 2003.
- Chung ES., Chung YC., Bok E., Baik HH., Park ES., Park JY., Yoon SH., Jin BK.; Fluoxetine prevents LPS-induced degeneration of nigral dopaminergic neurons by inhibiting microglia-mediated oxidative stress; *Brain Res.*; Dec 2:1363:143-50; 2010.
- Cicchetti F., Brownell AL., Williams K., Chen YI., Livni E., Isacson O.; Neuroinflammation of the nigrostriatal pathway during progressive 6-OHDA dopamine degeneration in rats monitored by immunohistochemistry and PET imaging; *Eur J Neurosci.*; Mar:15(6):991-8; 2002.
- Cicchetti F., Drouin-Ouellet J., Gross RE.; Environmental toxins and Parkinson's disease: what have we learned from pesticide-induced animal models?; *Trends Pharmacol Sci.*;

Sep:30(9):475-83; 2009.

- Colburn RW., DeLeo JA., Rickman AJ., Yeager MP., Kwon P., Hickey WF.; Dissociation of microglial activation and neuropathic pain behaviors following peripheral nerve injury in the rat; *J Neuroimmunol.*; Nov:79(2):163-75; 1997.
- Conde JR., Streit WJ.; Microglia in the aging brain; *J Neuropathol Exp Neurol*; Mar:65(3):199-203; 2006.
- Coull JA., Beggs S., Boudreau D., Boivin D., Tsuda M., Inoue K., Gravel C., Salter MW., De Koninck Y.; BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain; *Nature*; Dec 15:438(7070):1017-21; 2005.
- Coyle JT., Puttfarcken P.; Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders; *Science*; Oct 29:262(5134):689-95; 1993.
- Crain JM., Nikodemova M., Watters JJ.; Microglia express distinct M1 and M2 phenotypic markers in the postnatal and adult central nervous system in male and female mice; *J Neurosci Res.*; Sep:91(9); 2013.
- Currie LJ., Harrison MB., Truqman JM., Bennett JP., Wooten GF.; Postmenopausal estrogen use affects risk for Parkinson disease; *Arch Neurol.*; Jun:61(6):886-8; 2004.
- Czlonkowska A., Kohutnicka M., Kurkowska-Jastrzebska I., Czlonkowski A.; Microglial reaction in MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) induced Parkinson's disease mice model; *Neurodegeneration*; Jun:5(2):137-43; 1996.
- Dang J, Mitkari B, Kipp M, Beyer C. Gonadal steroids prevent cell damage and stimulate behavioral recovery after transient middle cerebral artery occlusion in male and female rats. *Brain Behav Immun.* 2011 May;25(4):715-26. doi: 10.1016/j.bbi.2011.01.013. Epub 2011 Jan 28.
- Datla KP., Murray HE., Pillai AV., Gillies GE., Dexter DT.; Differences in dopaminergic

- neuroprotective effects of estrogen during estrous cycle; *Neuroreport*; Jan 20:14(1):47-50; 2003.
- Dauer W., Przedborski S.; Parkinson's disease: mechanisms and models; *Neuron.*; Sep 11:39(6):889-909; 2003.
  - Davalos DB, Kisley MA, Freedman R. Behavioral and electrophysiological indices of temporal processing dysfunction in schizophrenia. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.* 2005 Fall;17(4):517-25.
  - David S., Kroner A.; Repertoire of microglial and macrophage responses after spinal cord injury; *Nat Rev Neurosci.*; Jun 15:12(7); 2011.
  - Dawson TM., Ko HS., Dawson VL.; Genetic animal models of Parkinson's disease; *Neuron.*; Jun 10:66(5):646-61; 2010.
  - DeGiorgio LA., Attardi B., Shimizu Y., Ogata M., Volpe BT.; 17 beta-estradiol treatment retards excitotoxic delayed degeneration in substantia nigra reticulata neurons; *Brain Res.*; May 17:936(1-2):15-20; 2002.
  - Dewing P., Shi T., Horvath S., Vilain E.; Sexually dimorphic gene expression in mouse brain precedes gonadal differentiation; *Brain Res Mol Brain Res.*; Oct 21:118(1-2):82-90; 2003.
  - Di Monte D., Sandy MS., Ekström G., Smith MT.; Comparative studies on the mechanisms of paraquat and 1-methyl-4-phenylpyridine (MPP+) cytotoxicity; *Biochem Biophys Res Commun.*; May 29:137(1):303-9; 1986.
  - Di Monte DA.; The environment and Parkinson's disease: is the nigrostriatal system preferentially targeted by neurotoxins?; *Lancet Neurol.*; Sep:2(9):531-8; 2003.
  - Disshon KA., Boja JW., Dluzen DE.; Inhibition of striatal dopamine transporter activity by 17beta-estradiol; *Eur J Pharmacol.*; Mar 19:345(2):207-11; 1998.

- Dluzen DE., McDermott JL., Liu B.; Estrogen as a neuroprotectant against MPTP-induced neurotoxicity in C57/B1 mice; *Neurotoxicol Teratol.*; Sep-Oct:18(5):603-6; 1996.
- Dluzen DE.; Unconventional effects of estrogen uncovered; *Trends Pharmacol Sci.*; Oct:26(10):485-7; 2005.
- Dluzen D., Horstink M.; Estrogen as neuroprotectant of nigrostriatal dopaminergic system: laboratory and clinical studies; *Endocrine.*; Jun:21(1):67-75; 2003.
- Fasano A., Daniele A., Albanese A.; Treatment of motor and non-motor features of Parkinson's disease with deep brain stimulation; *Lancet Neurol.*; May:11(5):429-42; 2012.
- Fearnley JM., Lees AJ.; Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity; *Brain*; Oct,114 ( Pt 5):2283-301; 1991.
- Ferraz AC., Xavier LL., Hernandez S., Sulzbach M., Viola GG., Anselmo-Franci JA., Achaval M., Da Cunha C.; Failure of estrogen to protect the substantia nigra pars compacta of female rats from lesion induced by 6-hydroxydopamine; *Brain Res.*; Oct 3:986(1-2):200-5; 2003.
- Ferraz AC., Matheussi F., Szawka RE., Rizelio V., Delattre AM., Rigon P., Hermel Edo E., Xavier LL., Achaval M., Anselmo-Franci JA.; Evaluation of estrogen neuroprotective effect on nigrostriatal dopaminergic neurons following 6-hydroxydopamine injection into the substantia nigra pars compacta or the medial forebrain bundle; *Neurochem Res.*; Jul:33(7):1238-46; 2008.
- Ferrer I.; Neuropathology and neurochemistry of non motor symptoms in Parkinson's disease; *Parkinsons Dis.*; Feb 17; 2011.
- Ferrer I., Martinez A., Blanco R., Dalfó E., Carmona M.; Neuropathology of sporadic Parkinson disease before the appearance of parkinsonism: preclinical Parkinson disease; *J Neural Transm.*; May:118(5); 2011.
- Ferrer I., López-Gonzalez I., Carmona M., Dalfó E., Pujol A., Martínez A.; Neurochemistry

and the non-motor aspects of PD; *Neurobiol Dis.*; Jun:46(3):508-26; 2012.

- Flores CA., Shughrue P., Petersen SL., Mokha SS.; Sex-related differences in the distribution of opioid receptor-like 1 receptor mRNA and colocalization with estrogen receptor mRNA in neurons of the spinal trigeminal nucleus caudalis in the rat; *Neuroscience*; 118(3):769-78; 2003.
- Foley P., Riederer P.; Influence of neurotoxins and oxidative stress on the onset and progression of Parkinson's disease; *J Neurol.*; Apr:247 Suppl 2:II82-94; 2000.
- Gao HM., Hong JS.; Why neurodegenerative diseases are progressive: uncontrolled inflammation drives disease progression; *Trends Immunol.*; Aug:29(8):357-65; 2008.
- Garcia-Ovejero D., Azcoitia I., DonCarlos LL., Melcangi RC., Garcia-Segura LM.; Glia-neuron crosstalk in the neuroprotective mechanisms of sex steroid hormones; *Brain Res Rev.*; Apr:48(2):273-86; 2005.
- Garcia-Segura LM, Wozniak A, Azcoitia I, Rodriguez JR, Hutchison RE, Hutchison JB. Aromatase expression by astrocytes after brain injury: implications for local estrogen formation in brain repair. *Neuroscience*. 1999 Mar;89(2):567-78.
- Gatson JW, Simpkins JW, Yi KD, Idris AH, Minei JP, Wigginton JG. Aromatase is increased in astrocytes in the presence of elevated pressure. *Endocrinology*. 2011 Jan;152(1):207-13. Epub 2010 Nov 3
- Gillies GE., McArthur S.; Independent influences of sex steroids of systemic and central origin in a rat model of Parkinson's disease: A contribution to sex-specific neuroprotection by estrogens; *Horm Behav.*; Jan:57(1):23-34; 2010.
- Glickman MH., Ciechanover A.; The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction; *Physiol Rev.*; Apr:82(2):373-428; 2002.
- Gonsette RE.; Neurodegeneration in multiple sclerosis: the role of oxidative stress and excitotoxicity; *J Neurol Sci.*; Nov 15:274(1-2):48-53. doi: 10.1016/j.jns.2008.06.029; 2008.

- Greenamyre JT., Betarbet R., Sherer TB.; The rotenone model of Parkinson's disease: genes, environment and mitochondria; *Parkinsonism Relat Disord.*; Aug:9 Suppl 2:S59-64; 2003.
- Haaxma CA., Bloem BR., Borm GF., Oyen WJ., Leenders KL., Eshius S., Booij J., Dluzen DE., Horstink MW.; Gender differences in Parkinson's disease; *J Neurol Neurosurg Psychiatry*; Aug:78(8):819-24; 2007.
- Habib P., Beyer C.; Regulation of brain microglia by female gonadal steroids; *J Steroid Biochem Mol Biol.*; Feb:146:3-14; 2014.
- Hald A., Lotharius J.; Oxidative stress and inflammation in Parkinson's disease: is there a causal link?; *Exp Neurol.*; Jun:193(2):279-90; 2005.
- Hanisch UK.; Microglia as a source and target of cytokines; *Glia*; Nov:40(2):140-55; 2002.
- Hanisch UK., Kettenmann H.; Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain; *Nat Neurosci.*; Nov:10(11):1387-94; 2007.
- Harrower TP., Michell AW., Barker RA.; Lewy bodies in Parkinson's disease: protectors or perpetrators?; *Exp Neurol.*; Sep:195(1):1-6; 2005.
- Harry GJ., Kraft AD.; Neuroinflammation and microglia: considerations and approaches for neurotoxicity assessment; *Expert Opin Drug Metab Toxicol.*; Oct:4(10):1265-77; 2008.
- Hartmann A.; Postmortem studies in Parkinson's disease; *Dialogues Clin Neurosci.*; Sep:6(3):281-93; 2004.
- Heneka MT., Rodríguez JJ., Verkhratsky A.; Neuroglia in neurodegeneration; *Brain Res Rev.*; May:63(1-2):189-211; 2010.
- Hermida-Ameijeiras A., Méndez-Alvarez E., Sánchez-Iglesias S., Sanmartín-Suárez C., Soto-Otero R.; Autoxidation and MAO-mediated metabolism of dopamine as a potential cause of oxidative stress: role of ferrous and ferric ions; *Neurochem Int.*; Jul:45(1):103-16;

2004.

- Hikosaka O., Wurtz RH.; The basal ganglia; *Rev Oculomot Res.*; 3:257-81; 1989.
- Hirohata M., Ono K., Morinaga A., Ikeda T., Yamada M.; Anti-aggregation and fibril-destabilizing effects of sex hormones on alpha-synuclein fibrils in vitro; *Exp Neurol.*; Jun:217(2):434-9; 2009.
- Hirsch EC.; Iron transport in Parkinson's disease; *Parkinsonism Relat Disord.*; Dec:15 Suppl 3:S209-11; 2009.
- Hirsch EC., Hunot S.; Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection?; *Lancet Neurol.*; Apr:8(4):382-97; 2009.
- Hirsch EC., Vyas S., Hunot S.; Neuroinflammation in Parkinson's disease; *Parkinsonism Relat Disord.*; Jan:18 Suppl 1:S210-2; 2012.
- Hoehn MM., Yahr MD.; Parkinsonism: onset, progression and mortality; *Neurology*; May:17(5):427-42; 1967.
- Hornykiewicz O. Dopamine (3-hydroxytyramine) and brain function. *Pharmacol Rev.* 1966; 18(2): 925-64.
- Horowitz MP., Greenamyre JT.; Gene-environment interactions in Parkinson's disease: the importance of animal modeling; *Clin Pharmacol Ther.*; Oct:88(4):467-74; 2010.
- Jaber M., Robinson SW., Missale C., Caron MG.; Dopamine receptors and brain function; *Neuropharmacology*; 35(11):1503-19; 1996.
- Jankovic J., Kapadia AS.; Functional decline in Parkinson disease; *Arch Neurol.*; Oct:58(10):1611-5; 2001.
- Johann S, Beyer C. Neuroprotection by gonadal steroid hormones in acute brain damage requires cooperation with astroglia and microglia.

J Steroid Biochem Mol Biol. 2013 Sep;137:71-81. Epub 2012 Nov 26. Review.

- Johnson KA., Conn PJ., Niswender CM.; Glutamate receptors as therapeutic targets for Parkinson's disease; CNS Neural Disord Drug Targets; Dec:8(6):475-91; 2009.
- Karin M., Greten FR.; NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression; Nat Rev Immunol.; Oct:5(10):749-59; 2005.
- Khalil R.; History of Parkinson's disease; Hist Sci Med.; 30(2):215-20; 1996.
- Kirik D., Rosenblad C., Björklund A.; Preservation of a functional nigrostriatal dopamine pathway by GDNF in the intrastriatal 6-OHDA lesion model depends on the site of administration of the trophic factor; Eur J Neurosci.; Nov:12(11):3871-82; 2000.
- Krack P., Batir A., Van Blercom N., Chabardes S., Fraix V., Ardouin C., Koudsie A., Limousin PD., Benazzouz A., LeBas JF., Benabid AL., Pollak P.; Five-year follow-up of bilateral stimulation of the subthalamic nucleus in advanced Parkinson's disease; N Engl J Med.; Nov 13:349(20):1925-34; 2003.
- Kraft AD., Harry GJ.; Features of microglia and neuroinflammation relevant to environmental exposure and neurotoxicity; Int J Environ Res Public Health; Jul:8(7):2980-3018; 2011.
- Küppers E., Beyer C.; Expression of estrogen receptor-alpha and beta mRNA in the developing and adult mouse striatum; Neurosci Lett.; Dec 3:276(2):95-8; 1999.
- Kuran W.; History of discoveries and advances in the studies of parkinsonism; Neurol Neurochir Pol.; Jul-Aug,26(4):529-37; 1992.
- Kurkowska-Jastrzebska I., Wronska A., Kohutnicka M., Czlonkowski A., Czlonkowska A.; The inflammatory reaction following 1-methyl-4-phenyl-1,2,3, 6-tetrahydropyridine intoxication in mouse; Exp Neurol.; Mar:156(1):50-61; 1999.

- Lai BC., Marion SA., Teschke K., Tsui JK.; Occupational and environmental risk factors for Parkinson's disease; *Parkinsonism Relat Disord.*; Jun:8(5):297-309; 2002.
- Lang AE., Blair RD.; Parkinson's disease in 1984: an update; *Can Med Assoc J.*; Nov 1:131(9):1031-7; 1984.
- Langston JW., Ballard PA Jr.; Parkinson's disease in a chemist working with 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine; *N Engl J Med.*; Aug 4:309(5):310; 1983.
- de Lau LM., Breteler MM.; Epidemiology of Parkinson's disease; *Lancet Neurol.*; Jun:5(6):525-35; 2006.
- Le Couteur DG., McLean AJ., Taylor MC., Woodham BL., Board PG.; Pesticides and Parkinson's disease; *Biomed Pharmacother.*; Apr,53(3):122-30; 1999.
- Le Saux M., Di Paolo T.; Influence of oestrogenic compounds on monoamine transporters in rat striatum; *J Neuroendocrinol.*; Jan:18(1):25-32; 2006.
- Le W., Appel SH.; Mutant genes responsible for Parkinson's disease; *Curr Opin Pharmacol.*; Feb:4(1):79-84; 2004.
- Lee Y., Dawson VL., Dawson TM.; Animal models of Parkinson's disease: vertebrate genetics; *Cold Spring Harb Perspect Med.*; Oct 1:2(10).
- Lévesque JC., Parent A.; GABAergic interneurons in human subthalamic nucleus; *Mov Disord.*; May:20(5):574-84; 2005.
- Levy OA., Malagelada C., Greene LA.; Cell death pathways in Parkinson's disease: proximal triggers, distal effectors, and final steps; *Apoptosis*; Apr:14(4):478-500
- Li Q., Verma IM.; NF-kappaB regulation in the immune system; *Nat Rev Immunol.*; Oct:2(10):725-34; 2002.
- Liberatore GT., Jackson-Lewis V., Vukosavic S., Mandir AS., Vila M., McAuliffe WG.,

- Dawson VL., Dawson TM., Przedborski S.; Inducible nitric oxide synthase stimulates dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson disease; *Nat Med.*; Dec:5(12):1403-9; 1999.
- Lilienbaum A.; Relationship between the proteasomal system and autophagy; *Int J Biochem Mol Biol.*; Mar 31:4(1):1-26; 2013.
  - Lim KL., Ng XH., Grace LG., Yao TP.; Mitochondrial dynamics and Parkinson's disease: focus on parkin; *Antioxid Redox Signal.*; May 1:16(9):935-49; 2012.
  - Limousin P., Krack P., Pollak P., Benazzouz A., Ardouin C., Hoffmann D., Benabid AL.; Electrical stimulation of the subthalamic nucleus in advanced Parkinson's disease; *N Engl J Med.*; Oct 15:339(16):1105-11; 1998.
  - Liu B., Hong JS.; Role of microglia in inflammation-mediated neurodegenerative diseases: mechanisms and strategies for therapeutic intervention; *J Pharmacol Exp Ther.*; Jan:304(1):1-7; 2003.
  - Long-Smith CM., Sullivan AM., Nolan YM.; The influence of microglia on the pathogenesis of Parkinson's disease; *Prog Neurobiol.*; Nov:89(3):277-87; 2009.
  - Lu YZ., Lin CH., Cheng FC., Hsueh CM.; Molecular mechanisms responsible for microglia-derived protection of Sprague-Dawley rat brain cells during in vitro ischemia; *Neurosci Lett.*; Jan 10:373(2):159-64; 2005.
  - McArthur S., Murray HE., Dhankot A., Dexter DT., Gillies GE.; Striatal susceptibility to a dopaminergic neurotoxin is independent of sex hormone effects on cell survival and DAT expression but is exacerbated by central aromatase inhibition; *J Neurochem.*; Feb:100(3):678-92; 2007a.
  - McArthur S., McHale E., Gillies GE.; The size and distribution of midbrain dopaminergic populations are permanently altered by perinatal glucocorticoid exposure in a sex- region- and time-specific manner; *Neuropsychopharmacology*; Jul:32(7):1462-76; 2007b.

- McDermott JL., Liu B., Dluzen DE.; Sex differences and effects of estrogen on dopamine and DOPAC release from the striatum of male and female CD-1 mice; *Exp Neurol.*; Feb:125(2):306-11; 1994.
- McFarland K., Price DL., Davis CN., Ma JN., Bonhaus DW., Burstein ES., Olsson R.; AC-186, a selective nonsteroidal estrogen receptor  $\beta$  agonist, shows gender specific neuroprotection in a Parkinson's disease rat model; *ACS Chem Neurosci.*; Sep 18:4(9):1249-55; 2013.
- McGeer EG., McGeer PL.; The role of anti-inflammatory agents in Parkinson's disease; *CNS Drugs*; 21(10):789-97; 2007.
- McKinley MJ., Albiston AL., Allen AM., Mathai ML., May CN., McAllen RM., Oldfield BJ., Mendelsohn FA., Chai SY.; The brain renin-angiotensin system: location and physiological roles; *Int J Biochem Cell Biol.*; Jun:35(6):901-18; 2003.
- McLean AC., Valenzuela N., Fai S., Bennett SA.; Performing vaginal lavage, crystal violet staining, and vaginal cytological evaluation for mouse estrous cycle staging identification; *J Vis Exp.*; Sep 15:(67); 2012.
- Miller DB., Ali SF., O'Callaghan JP., Laws SC.; The impact of gender and estrogen on striatal dopaminergic neurotoxicity; *Ann N Y Acad Sci.*; May 30:844:153-65; 1998.
- Mizushima N., Komatsu M.; Autophagy: renovation of cells and tissues; *Cell.*; Nov 11:147(4):728-41; 2011.
- Morale MC., Serra PA., L'episcopo F., Tirolo C., Caniglia S., Testa N., Gennuso F., Giaquinta G., Rocchitta G., Desole MS., Miele E., Marchetti B.; Estrogen, neuroinflammation and neuroprotection in Parkinson's disease: glia dictates resistance versus vulnerability to neurodegeneration; *Neuroscience*; 138(3):869-78; 2006.
- Moroz IA., Rajabi H., Rodaros D., Stewart J.; Effects of sex and hormonal status on astrocytic basic fibroblast growth factor-2 and tyrosine hydroxylase immunoreactivity after medial forebrain bundle 6-hydroxydopamine lesions of the midbrain dopamine neurons;

Neuroscience; 118(2):463-76; 2003.

- Murray HE., Pillai AV., McArthur SR., Razvi N., Datla KP., Dexter DT., Gillies GE.; Dose- and sex-dependent effects of the neurotoxin 6-hydroxydopamine on the nigrostriatal dopaminergic pathway of adult rats: differential actions of estrogen in males and females; Neuroscience; 116(1):213-22; 2003.
- Nagele RG., Wegiel J., Venkataraman V., Imaki H., Wang KC.; Contribution of glial cells to the development of amyloid plaques in Alzheimer's disease; Neurobiol Aging; May-Jun:25(5):663-74; 2004.
- Nakajima K., Yamamoto S., Kohsaka S., Kurihara T.; Neuronal stimulation leading to upregulation of glutamate transporter-1 (GLT-1) in rat microglia in vitro; Neurosci Lett.; May 16:436(3):331-4; 2008.
- Nikam S., Nikam P., Ahaley SK., Sontakke AV.; Oxidative stress in Parkinson's disease; Indian J Clin Biochem.; Jan:24(1):98-101; 2009.
- Numakawa T., Matsumoto T., Numakawa Y., Richards M., Yamawaki S., Kunugi H.; Protective Action of Neurotrophic Factors and Estrogen against Oxidative Stress-Mediated Neurodegeneration; J Toxicol.; 2011:405194; 2011.
- Obeso JA., Rodríguez-Oroz MC., Rodríguez M., Lanciego JL., Artieda J., Gonzalo N., Olanow CW.; Pathophysiology of the basal ganglia in Parkinson's disease; Trends Neurosci.; Oct:23(10 Suppl):S8-19; 2000.
- Obeso JA., Marin C., Rodríguez-Oroz MC., Blesa J., Benitez-Temiño B., Mena-Segovia J., Rodríguez M., Olanow CW.; The basal ganglia in Parkinson's disease: current concepts and unexplained observations; Ann Neurol.; Dec:64 Suppl 2:S30-46; 2008.
- Obeso JA., Rodriguez-Oroz MC., Goetz CG., Marin C., Kordower JH., Rodriguez M., Hirsch EC., Farrer M., Schapira AH., Halliday G.; Missing pieces in the Parkinson's disease puzzle; Nat Med.; Jun:16(6):653-61; 2010.

- Ohtani H., Nomoto M., Douchi T.; Chronic estrogen treatment replaces striatal dopaminergic function in ovariectomized rats; *Brain Res.*; May 11:900(2):163-8; 2001.
- Olanow CW., Lees A., Obeso J.; Levodopa therapy for Parkinson's disease: challenges and future prospects; *Mov Disord.*; 23 Suppl 3:S495-6; 2008.
- Olanow CW., Stern MB., Sethi K.; The scientific and clinical basis for the treatment of Parkinson disease (2009); *Neurology*; May 26:72(21 Suppl 4):S1-136; 2009.
- Olanow CW., Obeso JA.; The significance of defining preclinical or prodromal Parkinson's disease; *Mov Disord.*; Apr 15:27(5):666-9; 2012.
- Orru M., Bakešová J., Brugarolas M., Quiroz C., Beaumont V., Goldberg SR., Lluís C., Cortés A., Franco R., Casadó V., Canela EI., Ferré S.; Striatal pre- and postsynaptic profile of adenosine A(2A) receptor antagonists; *PloS One*; Jan 11:6(1):e16088; 2011.
- Pasqualetti G., Brooks DJ., Edison P.; The role of neuroinflammation in dementias; *Curr Neurol Neurosci Rep.*; Apr:15(4):531; 2015.
- Pasqualini C., Olivier V., Guibert B., Frain O., Leviel V.; Acute stimulatory effect of estradiol on striatal dopamine synthesis; *J Neurochem.*; Oct:65(4):1651-7; 1995.
- Paul G., Meissner W., Rein S., Harnack D., Winter C., Hosmann K., Morgenstern R., Kupsch A.; Ablation of the subthalamic nucleus protects dopaminergic phenotype but not cell survival in a rat model of Parkinson's disease; *Exp Neurol.*; Feb:185(2):272-80; 2004.
- Perea G<sup>1</sup>, Araque A. GLIA modulates synaptic transmission. *Brain Res Rev.* 2010 May;63(1-2):93-102. Epub 2009 Nov 6.
- Perego C., Fumagalli S., De Simoni MG.; Temporal pattern of expression and colocalization of microglia/macrophage phenotype markers following brain ischemic injury in mice; *J Neuroinflammation*; Dec 10:8:174; 2011.

- Perier C., Bové J., Vila M.; Mitochondria and programmed cell death in Parkinson's disease: apoptosis and beyond; *Antioxid Redox Signal.*; May 1:16(9):883-95; 2012.
- Pfeiffer RF.; Gastrointestinal dysfunction in Parkinson's disease; *Lancet Neurol.*; Feb:2(2):107-16; 2003.
- Pollanen MS., Dickson DW., Bergeron C.; Pathology and biology of the Lewy body; *J Neuropathol Exp Neurol.*; May:52(3):183-91; 1993.
- Porta C., Rimoldi M., Raes G., Brys L., Ghezzi P., Di Liberto D., Dieli F., Ghisletti S., Natoli G., De Baetselier P., Mantovani A., Sica A.; Tolerance and M2 (alternative) macrophage polarization are related processes orchestrated by p50 nuclear factor kappaB; *Proc Natl Acad Sci U S A.*; Sep 1:106(35):14978-83; 2009.
- Pozzi S., Benedusi V., Maggi A., Vegeto E.; Estrogen action in neuroprotection and brain inflammation; *Ann N Y Acad Sci.*; Nov:1089:302-23; 2006.
- Pringsheim T., Jette N., Frolkis A., Steeves TD.; The prevalence of Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis; *Mov Disord.*; Nov:29(13):1583-90; 2014.
- Prossnitz ER, Maggiolini M. Mechanisms of estrogen signaling and gene expression via GPR30.  
*Mol Cell Endocrinol.* 2009 Sep 24;308(1-2):32-8. Epub 2009 Apr 15. Review.
- Quesada A., Micevych PE.; Estrogen interacts with the IGF-1 system to protect nigrostriatal dopamine and maintain motoric behavior after 6-hydroxydopamine lesions; *J Neurosci Res.*; Jan 1:75(1):107-16; 2004.
- Quinn NP., Marsden CD.; Menstrual-related fluctuations in Parkinson's disease; *Mov Disord.*; 1(1):85-7; 1986.
- Raab H., Pilgrim C., Reisert I.; Effects of sex and estrogen on tyrosine hydroxylase mRNA in cultured embryonic rat mesencephalon; *Brain Res Mol Brain Res.*; Oct:33(1):157-64; 1995.

- Ragonese P., D'Amelio M., Salemi G., Aridon P., Gammino M., Epifanio A., Morgante L., Savettieri G.; Risk of Parkinson disease in women: effect of reproductive characteristics; *Neurology*; Jun 8:62(11):2010-4; 2004.
- Ragonese P., D'Amelio M., Callari G., Salemi G., Morgante L., Savettieri G.; Age at menopause predicts age at onset of Parkinson's disease; *Mov Disord.*; Dec:21(12):2211-4; 2006a.
- Ragonese P., D'Amelio M., Savettieri G.; Implications for estrogens in Parkinson's disease: an epidemiological approach; *Ann N Y Acad Sci.*; Nov:1089:373-82; 2006b.
- Rappold PM., Tieu K.; Astrocytes and therapeutics for Parkinson's disease; *Neurotherapeutics*; Oct:7(4):413-23; 2010.
- Reisert I., Pilgrim C.; Sexual differentiation of monoaminergic neurons--genetic or epigenetic?; *Trends Neurosci.*; Oct:14(10):468-73; 1991.
- Rideout HJ., Stefanis L.; The neurobiology of LRRK2 and its role in the pathogenesis of Parkinson's disease; *Neurochem Res.*; 39(3):576-92; 2013.
- Rocca WA., Bower JH., Maraganore DM., Ahlskog JE., Grossardt BR., de Andrade M., Melton LJ 3<sup>rd</sup>.; Increased risk of parkinsonism in women who underwent oophorectomy before menopause; *Neurology*; Jan 15:70(3):200-9; 2008.
- Rodríguez-Navarro JA., Solano RM., Casarejos MJ., Gomez A., Perucho J., de Yébenes JG., Mena MA.; Gender differences and estrogen effects in parkin null mice; *J Neurochem.*; Sep:106(5):2143-57; 2008.
- Rodriguez-Perez AI., Valenzuela R., Villar-Cheda B., Guerra MJ., Lanciego JL., Labandeira-Garcia JL.; Estrogen and angiotensin interaction in the substantia nigra. Relevance to postmenopausal Parkinson's disease; *Exp Neurol.*; Aug:224(2):517-26; 2010.

- Rodriguez-Perez AI, Borrajo A, Valenzuela R, Lanciego JL, Labandeira-Garcia JL. Critical period for dopaminergic neuroprotection by hormonal replacement in menopausal rats. *Neurobiol Aging*. 2015 Feb;36(2):1194-208. Epub 2014 Nov 1.
- Saavedra JM.; Brain angiotensin II: new developments, unanswered questions and therapeutic opportunities; *Cell Mol Neurobiol.*; Jun:25(3-4):485-512; 2005.
- Saijo K, Winner B, Carson CT, et al. A Nurr1/CoREST pathway in microglia and astrocytes protects dopaminergic neurons from inflammation-induced death. *Cell*. 2009;137:47–59.
- Saiki S., Sato S., Hattori N.; Molecular pathogenesis of Parkinson's disease: update; *J Neurol Neurosurg Psychiatry*; Apr:83(4):430-6.; 2012.
- Sandyk R.; Estrogens and the pathophysiology of Parkinson's disease; *Int J Neurosci.*; Mar:45(1-2):119-22; 1989.
- Saunders-Pullman R; Estrogens and Parkinson disease: neuroprotective, symptomatic, neither, or both?; *Endocrine*; Jun:21(1):81-7; 2003.
- Schoenberg BS.; Environmental risk factors for Parkinson's disease: the epidemiologic evidence; *Can J Neurol Sci.*; Aug,14(3 Suppl):407-13; 1987.
- Schwarting RK., Huston JP.; The unilateral 6-hydroxydopamine lesion model in behavioral brain research. Analysis of functional deficits, recovery and treatments; *Prog Neurobiol.*; Oct:50(2-3):275-331; 1996.
- Serova LI., Maharjan S., Huang A., Sun D., Kaley G., Sabban EL.; Response of tyrosine hydroxylase and GTP cyclohydrolase I gene expression to estrogen in brain catecholaminergic regions varies with mode of administration; *Brain Res.*; Jul 23:1015(1-2):1-8; 2004.
- Shaw KM., Lees AJ., Stem GM.; The impact of treatment with levodopa on Parkinson's disease; *Q J Med.*; 49(195):283-93; 1980.

- Sherer TB., Betarbet R., Kim JH., Greenamyre JT.; Selective microglial activation in the rat rotenone model of Parkinson's disease; *Neurosci Lett.*; May 1:341(2):87-90; 2003.
- Shughrue PJ., Askew GR., Dellovade TL., Merchenthaler I.; Estrogen-binding sites and their functional capacity in estrogen receptor double knockout mouse brain; *Endocrinology*; May:143(5):1643-50; 2002.
- Shulman LM., Bhat V.; Gender disparities in Parkinson's disease; *Expert Rev Neurother.*; Mar:6(3):407-16; 2006.
- Simerly RB., Zee MC., Pendleton JW., Lubahn DB., Korach KS.; Estrogen receptor-dependent sexual differentiation of dopaminergic neurons in the preoptic region of the mouse; *Proc Natl Acad Sci U S A.*; Dec 9:94(25):14077-82; 1997.
- Simola N., Morelli M., Seeman P.; Increase of dopamine D2(High) receptors in the striatum of rats sensitized to caffeine motor effects; *Synapse*; May:62(5):394-7; 2008.
- Simon KC., Chen H., Gao X., Schwarzschild MA., Ascherio A.; Reproductive factors, exogenous estrogen use, and risk of Parkinson's disease; *Mov Disord.*; Jul 15:24(9):1359-65; 2009.
- Smith Y., Bevan MD., Shink E., Bolam JP.; Microcircuitry of the direct and indirect pathways of the basal ganglia; *Neuroscience*; Sep:86(2):353-87; 1998.
- Smith JA., Das A., Butler JT., Ray SK., Banik NL.; Estrogen or estrogen receptor agonist inhibits lipopolysaccharide induced microglial activation and death; *Neurochem Res.*; Sep:36(9):1587-93; 2011.
- Smith KM., Dahodwala N.; Sex differences in Parkinson's disease and other movement disorders; *Exp Neurol.*; Sep:259:44-56; 2014.
- Soucy G., Boivin G., Labrie F., Rivest S.; Estradiol is required for a proper immune response to bacterial and viral pathogens in the female brain; *J Immunol.*; May 15:174(10):6391-8; 2005.

- Stoll G., Jander S.; The role of microglia and macrophages in the pathophysiology of the CNS; *Prog Neurobiol.*; Jun:58(3):233-47; 1999.
- Tamás A., Lubics A., Szalontay L., Lengvári I., Reglodi D.; Age and gender differences in behavioral and morphological outcome after 6-hydroxydopamine-induced lesion of the substantia nigra in rats; *Behav Brain Res.*; Mar 30:158(2):221-9; 2005.
- Tanner CM.; Epidemiology of Parkinson's disease; *Neurol Clin.*; May,10(2):317-29; 1992.
- Tao Q., Fan X., Li T., Tang Y., Yang D., Le W.; Gender segregation in gene expression and vulnerability to oxidative stress induced injury in ventral mesencephalic cultures of dopamine neurons; *J Neurosci Res.*; Jan:90(1):167-78; 2012.
- Tapia-Gonzalez S, Carrero P, Pernia O, Garcia-Segura LM, Diz-Chaves Y. Selective oestrogen receptor (ER) modulators reduce microglia reactivity in vivo after peripheral inflammation: potential role of microglial ERs. *J Endocrinol.* 2008 Jul;198(1):219-30. Epub 2008 May 6.
- Tatton NA., Kish SJ.; In situ detection of apoptotic nuclei in the substantia nigra compacta of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated mice using terminal deoxynucleotidyl transferase labelling and acridine orange staining; *Neuroscience*; Apr:77(4):1037-48; 1997.
- Taylor KS., Cook JA., Counsell CE.; Heterogeneity in male to female risk for Parkinson's disease; *J Neurol Neurosurg Psychiatry*; Aug:78(8):905-6; 2007.
- Thanky NR., Slater R., Herbison AE.; Sex differences in estrogen-dependent transcription of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) gene revealed in GnRH transgenic mice; *Endocrinology*; Aug:144(8):3351-8; 2003.
- Thored P., Heldmann U., Gomes-Leal W., Gisler R., Darsalia V., Taneera J., Nygren JM., Jacobsen SE., Ekdahl CT., Kokaia Z., Lindvall O.; Long-term accumulation of microglia with proneurogenic phenotype concomitant with persistent neurogenesis in adult

subventricular zone after stroke; *Glia*; Jun:57(8):835-49; 2009.

- Tripanichkul W., Sripanichkulchai K., Finkelstein DI.; Estrogen down-regulates glial activation in male mice following 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine intoxication; *Brain Res.*; Apr 21:1084(1):28-37; 2006.
- Vegeto E., Belcredito S., Eteri S., Ghisletti S., Brusadelli A., Meda C., Krust A., Dupont S., Ciana P., Chambon P., Maggi A.; Estrogen receptor-alpha mediates the brain antiinflammatory activity of estradiol; *Proc Natl Acad Sci U S A*; Aug 5:100(16):9614-9; 2003.
- Vegeto E., Belcredito S., Ghisletti S., Meda C., Eteri S., Maggi A.; The endogenous estrogen status regulates microglia reactivity in animal models of neuroinflammation; *Endocrinology*; May:147(5):2263-72; 2006.
- Virgone-Carlotta A., Uhrich J., Akram MN., Ressenkoff D., Chrétien F., Domeneget C., Gherardi R., Despars G., Jurdic P., Honnorat J., Nataf S., Touret M.; Mapping and kinetics of microglia/neuron cell-to-cell contacts in the 6-OHDA murine model of Parkinson's disease; *Glia*; Oct:61(10):1645-58; 2013.
- Von Bernhard R., Tichauer JE., Eugén J.; Aging-dependent changes of microglial cells and their relevance for neurodegenerative disorders; *J Neurochem.*; Mar:112(5):1099-114; 2010.
- Von Bohlen, Halbach O.; Synucleins and their relationship to Parkinson's disease; *Cell Tissue Res.*; Oct:318(1):163-74; 2004.
- Wang J., Green PS., Simpkins JW.; Estradiol protects against ATP depletion, mitochondrial membrane potential decline and the generation of reactive oxygen species induced by 3-nitropropionic acid in SK-N-SH human neuroblastoma cells; *J Neurochem.*; May:77(3):804-11; 2001.
- Whitton PS.; Inflammation as a causative factor in the aetiology of Parkinson's disease; *Br J Pharmacol.*; Apr:150(8):963-76; 2007.

- Wirdefeldt K., Adami HO., Cole P., Trichopoulos D., Mandel J.; Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence; *Eur J Epidemiol.*; Jun,26 (1 Suppl):S1-58; 2011.
- Wong E., Cuervo AM.; Autophagy gone awry in neurodegenerative diseases; *Nat Neurosci.*; Jul:13(7):805-11; 2010.
- Wooten GF., Currie LJ., Bovbjerg VE., Lee JK., Patrie J.; Are men at greater risk for Parkinson's disease than women?; *J Neurol Neurosurg Psychiatry*; Apr:75(4):637-9; 2004.
- Wu WF., Tan XJ., Dai YB., Krishnan V., Warner M., Gustafsson JA.; Targeting estrogen receptor  $\beta$  in microglia and T cells to treat experimental autoimmune encephalomyelitis; *Proc Natl Acad Sci U S A.*; Feb 26:110(9):3543-8; 2013.
- Xilouri M., Stefanis L.; Autophagic pathways in Parkinson disease and related disorders; *Expert Rev Mol Med.*; Mar 21:13:e8; 2011.
- Xiromerisiou G., Dardiotis E., Tsimourtou V., Kountra PM., Paterakis KN., Kapsalaki EZ., Fountas KN., Hadjigeorgiou GM.; Genetic basis of Parkinson disease; *Neurosurg Focus.*; Jan,28(1):E7; 2010.
- Youdim MB., Bakhle YS.; Monoamine oxidase: isoforms and inhibitors in Parkinson's disease and depressive illness; *Br J Pharmacol.*; Jan:147 Suppl 1:S287-96; 2006.
- Youdim MB.; Rasagiline in Parkinson's disease; *N Engl J Med.*; Feb 18:362(7):657-8; author reply 658-9; 2010.
- Yu L., Liao PC.; Sexual differences and estrous cycle in methamphetamine-induced dopamine and serotonin depletions in the striatum of mice; *J Neural Transm.*; 107(4):419-27; 2000.

# Ringraziamenti

Desidero ringraziare tutti coloro che mi hanno aiutato nella realizzazione della mia tesi.

Vorrei ringraziare il mio relatore il Professor Fabio Blandini per avermi dato la possibilità di svolgere il mio lavoro di dottorato presso l'IRCCS C. Mondino. Vorrei ringraziare il Professor Cosentino e la Professoressa Farnca Marino per aver contribuito alla mia formazione presso l'università Insubria di Varese. Infine ringrazio Rosaria Greco, Giovanna Levandis, Cristina Ghezzi, Chiara Demartini, Stefania Mangione, Silvia Cerri, Giulia Ambrosi, Marie Armentero, per aver contribuito, ognuno a suo modo, alla mia formazione ed alla mia crescita personale e professionale.