



**UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE  
DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE**

**Corso di Laurea Magistrale in Biologia Molecolare e Applicata**

**Piattaforme bioinformatiche basate sui Big Data per diagnostica  
pathways significativi nell' Alzheimer: modulazione via interventi  
nutrizionali e composti bioattivi di origine alimentare.**

**Bioinformatics Platforms based on Big Data for the diagnostics of  
significant pathways in Alzheimer's: modulation via nutritional  
intervention and food-borne bioactive compounds.**

Supporto scientifico-tecnologico e didattico offerto da ENEA.

**Tesi di Laurea Magistrale  
di: Dr.ssa Chiara Coccia**

**Relatore:  
Chiar.ma Prof.ssa  
Fabiola Olivieri**

**Correlatori:  
Dr.ssa Alessandra Pasquo  
Dr.ssa Ilaria Petrignani**

**Sessione Estiva  
Anno Accademico 2020/2021**

# INDICE

## ABSTRACT

INTRODUZIONE.....pag. 1

OBIETTIVI.....pag. 4

## CAPITOLO I- MALATTIA DI ALZHEIMER

1.1 Epidemiologia.....pag. 6

1.2 Patogenesi.....pag. 7

1.2.1. Ipotesi amiloide

1.2.2. Ipotesi tau

1.2.3. Ipotesi colinergica

1.2.4. Ipotesi mitocondriale

1.2.5. Omeostasi del calcio

1.2.6. Ipotesi neurovascolare

1.2.7. Ipotesi infiammatoria

1.2.8. Altre ipotesi

1.3 Decorso e sintomi.....pag. 25

1.4 Alzheimer's Continuum .....pag. 27

1.5 Segni patologici.....pag. 30

1.6 Diagnosi.....pag. 33

1.7 Forme cliniche.....pag. 35

1.8 Alzheimer e genetica.....pag. 37

1.9 Fattori di rischio.....pag. 49

1.9.1 Fattori di rischio non modificabili

1.9.2 Fattori di rischio modificabili

## **CAPITOLO II- EPIGENETICA**

- 2.1 Definizione.....pag. 56
- 2.2 Meccanismi di regolazione.....pag. 57
  - 2.2.1 Metilazione del DNA
  - 2.2.2 Modifiche istoniche
  - 2.2.3 Non coding RNA

## **CAPITOLO III- MICRORNA**

- 3.1 Biogenesi, meccanismi d'azione e funzioni.....pag. 67
- 3.2 MicroRNA nella malattia di Alzheimer.....pag. 70
  - 3.2.1 MicroRNA come biomarkers
  - 3.2.2 MicroRNA come target terapeutici

## **CAPITOLO IV- COMPOSTI BIOATTIVI**

- 4.1 Definizione e funzione.....pag. 78
- 4.2 Composti bioattivi in AD.....pag. 81

## **CAPITOLO V- TOOLS BIOINFORMATICI**

- 5.1 La bioinformatica.....pag. 85
- 5.2 Mienturnet.....pag. 87
- 5.3 Reactome.....pag. 93

## **CAPITOLO VI-MATERIALI E METODI.....pag. 98**

## **CAPITOLO VII-RISULTATI.....pag. 102**

## **DISCUSSIONE.....pag. 138**

## **CONCLUSIONI.....pag. 149**

**BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA.....pag. 152**

## ABSTRACT

La malattia di Alzheimer è una malattia neurodegenerativa progressiva, irreversibile e fatale che comporta il danneggiamento e la morte delle cellule nervose con lenta perdita di memoria, declino cognitivo, disabilità e decesso. Globalmente circa 50 milioni di persone sono affette da demenza e la malattia di Alzheimer è responsabile dei due terzi dei casi totali.

La presenza di depositi extracellulari di peptide  $\beta$ -amiloide sottoforma di placche senili e l'accumulo intracellulare di proteina tau iperfosforilata sottoforma di aggregati neurofibrillari rimangono i principali criteri neuropatologici per la diagnosi di AD.

La quasi totalità dei clinical trials, che hanno come target i corrispondenti pathways patologici di questi segni caratteristici della malattia, non hanno portato all'identificazione di metodi efficaci per il trattamento: ad oggi le cause alla base della malattia di Alzheimer sono ignote.

Gli scienziati ritengono che per la maggior parte dei soggetti affetti, l'Alzheimer sia causata da una combinazione di fattori genetici, biologici, ambientali ed epigenetici che interagiscono tra di loro.

Le modificazioni epigenetiche possono essere determinate da fattori esterni e sono reversibili: un gran numero di evidenze suggerisce che i cambiamenti epigenetici innescati dagli alimenti hanno un importante ruolo nel

mantenimento dello stato di salute e nella prevenzione di alcune malattie tra cui le patologie neurodegenerative.

I meccanismi epigenetici e come l'alimentazione possa influenzare l'esordio e progressione della malattia di Alzheimer rappresentano, ad oggi, un focus di ricerca allettante per fare luce sui molteplici aspetti sconosciuti di questa complessa patologia.

Diverse modificazioni epigenetiche sono state identificate negli affetti da Alzheimer. Tra queste, l'alterazione dei microRNA, piccoli RNA di circa 20-22 nucleotidi non codificanti proteina che legano mRNA target regolandone l'espressione, è stata e rimane tutt'ora, la più estensivamente studiata.

L'alterazione della funzione dei microRNA è strettamente correlata alla patogenesi di AD e l'espressione di alcuni microRNA differisce significativamente tra soggetti sani e pazienti affetti da AD: queste caratteristiche danno ai microRNA un valore potenziale diagnostico e terapeutico per il trattamento di questa malattia debilitante.

In linea con le evidenze recenti, in questo studio ci siamo proposti di identificare i microRNA deregolati nella malattia di Alzheimer e, tramite un approccio in silico, di identificare quei pathways (correlati ai miRNA deregolati in AD) alterati nella patologia al fine di proporre un intervento,

curativo o preventivo, basato su composti bioattivi, presenti in piante medicinali e alimenti, e sulle abitudini alimentari.

Specifici composti bioattivi di origine naturale e più in generale le abitudini alimentari, sembrano infatti avere un potenziale effetto benefico nell'Alzheimer andando a ripristinare alterazioni che, a diversi livelli, si manifestano nella malattia.

- 1) **AD**: Alzheimer's disease
- 2) **PD**: morbo di Parkinson
- 3) **HD**: malattia di Huntington
- 4) **SLA**: sclerosi laterale amiotrofica
- 5) **A $\beta$** : peptide  $\beta$ -amiloide
- 6) **APP**: amyloid precursor protein
- 7) **PHFs**: paired-helical-filament
- 8) **NFTs**: neurofibrillary tangles- aggregati neurofibrillari
- 9) **SAD**: sporadic Alzheimer's disease
- 10) **ROS**: reactive oxygen species- specie reattive dell' ossigeno
- 11) **FDA**: Food and Drug Administration
- 12) **RE**: reticolo endoplasmatico
- 13) **BEE**: barriera emato-encefalica
- 14) **SNC**: sistema nervoso centrale
- 15) **NO**: ossido nitrico
- 16) **MCI**: mild cognitive impairment- lieve deterioramento cognitivo
- 17) **TC**: tomografia computerizzata
- 18) **RMN**: risonanza magnetica nucleare
- 19) **PET**: tomografia ad emissione di positroni
- 20) **ApoE**: apolipoproteina E
- 21) **EOAD**: early-onset Alzheimer's disease
- 22) **LOAD**: late-onset Alzheimer's disease
- 23) **FAD**: familial Alzheimer's disease- Alzheimer a trasmissione familiare
- 24) **PSEN1**: presenilina 1
- 25) **PSEN2**: presenilina 2
- 26) **AICD**: APP intra cellular domain
- 27) **EOFAD**: early-onset familial Alzheimer's disease
- 28) **SNPs**: single nucleotide polymorphisms- polimorfismi a singolo nucleotide
- 29) **GWAS**: genome-wide association study
- 30) **HATs**: histone acetyltransferases
- 31) **HDACs**: histone deacetylases
- 32) **ncRNA**: non coding RNA
- 33) **sncRNA**: short non-coding RNA
- 34) **lncRNA**: long non-coding RNA
- 35) **miRNA**: microRNA
- 36) **siRNA**: short interfering RNA
- 37) **AGO**: proteine Argonaute
- 38) **CSF**: cerebrospinal fluid
- 39) **EPA**: acido eicosapentaenoico
- 40) **DHA**: acido docosaesaenoico
- 41) **NAD**: nicotinammide adenina dinucleotide
- 42) **SIRT1**: sirtuina 1
- 43) **NF- $\kappa$ B**: nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
- 44) **Mienturnet**: MicroRNA ENrichment TURned NETwork
- 45) **ID**: identification
- 46) **FDR**: false discovery rate
- 47) **hsa**: homo sapiens

- 48) **mmu**: mus musculus
- 49) **Wnt**: wingless-int
- 50) **PCP**: planar cell polarity
- 51) **Fz**: frizzled
- 52) **p-GSK3 $\beta$** : phospho glycogen synthase kinase 3 beta
- 53) **LRP**: low-density lipoprotein receptor-related protein
- 54) **DCC**: deleted in colorectal cancer
- 55) **UNC5**: uncoordinated-5
- 56) **MeDi**: Mediterranean diet

## INTRODUZIONE

Le malattie neurodegenerative sono un gruppo eterogeno di disordini caratterizzati dalla progressiva degenerazione della struttura e della funzione del sistema nervoso centrale o del sistema nervoso periferico.

Rappresentano una grave minaccia per la salute dell'uomo: legate all'età, principale fattore di rischio, stanno diventando prevalenti in parte perché è aumentata la speranza di vita.

Nel secolo passato, nei Paesi industrializzati c'è stato un aumento vertiginoso della popolazione con età maggiore di 65 anni; questo ci porta ad ipotizzare che nelle prossime generazioni la proporzione della popolazione anziana duplicherà determinando un aumento cospicuo delle persone affette da malattie neurodegenerative (1).

Quando parliamo di neurodegenerazione ci riferiamo a qualsiasi condizione patologica che va a danneggiare i neuroni (escludendo però patologie in cui la morte dei neuroni è causata da ipossia, avvelenamento, difetti metabolici e infezioni). Vengono considerate malattie neurodegenerative: malattia d'Alzheimer (AD), morbo di Parkinson (PD), malattia di Huntington (HD), sclerosi laterale amiotrofica (SLA), demenza frontotemporale e atassia spino cerebellare. Queste patologie hanno una diversa patogenesi, alcune causano

alterazioni della memoria e delle funzioni cognitive ed altre alterano la capacità di mobilità, di parola e di respirazione autonoma.

In pratica, le malattie neurodegenerative rappresentano un largo gruppo di disordini neurologici che hanno un'espressione clinica e patologica eterogenea interessando specifici sottogruppi di neuroni, si sviluppano per ragioni attualmente non totalmente comprese e progrediscono inesorabilmente.

Le cause delle malattie neurodegenerative sono sconosciute e i meccanismi patogenetici attualmente identificati non hanno portato allo sviluppo di terapie efficaci al loro trattamento.

Uno dei principali dibattiti sulla loro eziologia riguarda il ruolo della genetica e/o dei fattori ambientali (1).

Alcune patologie hanno una maggiore incidenza familiare e base genetica: alcune vengono ereditate con tratto autosomico dominante come Huntington, altre- in minor frequenza- hanno una trasmissione autosomico recessiva, X-linked o trasmissione per via materna.

Le altre sono per lo più forme sporadiche ma c'è un piccolo numero di pazienti in cui la malattia è ereditaria: questo vale per PD, AD e SLA in cui il 10% dei casi è familiare. Questi casi familiari pur essendo rari, rappresentano

una risorsa importante per chiarire i meccanismi molecolari coinvolti ipoteticamente anche nelle forme sporadiche della malattia.

Nei pazienti in cui la malattia è sporadica ovvero la maggior parte, il contributo genetico al processo neurodegenerativo è minimale: queste scoperte portano a pensare che i casi sporadici non siano imputabili esclusivamente a fattori genetici o esclusivamente a fattori ambientali ma probabilmente ad una combinazione dei due (1).

## OBIETTIVI

Negli ultimi anni il ruolo dell'epigenetica ha attirato grande interesse nel tentativo di comprendere i meccanismi alla base di malattie complesse, come AD, che non possono essere spiegate esclusivamente attraverso fattori genetici o ambientali: numerosi studi hanno rivelato il ruolo chiave dell'epigenetica nello sviluppo e progressione della malattia di Alzheimer ampliando il campo di indagine per la ricerca di biomarkers diagnostici e lo sviluppo di potenziali trattamenti terapeutici efficaci.

Partendo da queste evidenze l'obiettivo del nostro studio è stato quello di identificare modificazioni epigenetiche, in particolare microRNA deregolati, che potessero essere correlate all'insorgenza e progressione della malattia di Alzheimer e successivamente 'agenti' come i composti bioattivi che fossero in grado di intervenire in meccanismi patogenetici coinvolti nella malattia di Alzheimer e offrire nuove possibilità di intervento per la prevenzione o cura della malattia.

Per il nostro scopo sono stati utilizzati database di letteratura scientifica e tools bioinformatici che ci hanno permesso di identificare:

1. microRNA che risultano deregolati nella malattia di Alzheimer;
2. geni regolati dai microRNA raccolti;
3. i pathways più significativi nei quali i geni sono coinvolti;

4. nutrienti e composti bioattivi in grado di intervenire sui pathways selezionati.

Il fine ultimo è stato quello di valutare la possibilità di intervento attraverso nutrienti e composti bioattivi fornendo così una nuova opportunità ai fini della prevenzione, rallentamento della progressione e potenziale cura della malattia di Alzheimer.

## Capitolo I

### MALATTIA DI ALZHEIMER

#### *1.1 Epidemiologia*

La malattia di Alzheimer (Alzheimer's disease o AD) forma più comune di demenza, è una sindrome a decorso cronico e progressivo che colpisce circa il 5% della popolazione al di sopra dei 65 anni, con il rischio per 1 donna su 5 e 1 uomo su 10 di svilupparla nel corso della loro vita (2).

Nel mondo si stimano circa 46 milioni di persone colpite da demenza, il 50-60% delle quali soffrono di Alzheimer.

In Italia, ottava tra i paesi con il maggior numero di persone affette da demenza, si stimano 1,4 milioni di malati, oltre 600.000 dei quali colpiti da AD.

A causa dell'invecchiamento della popolazione si prevede che nel corso dei prossimi 30 anni i casi triplicheranno ed entro il 2050 ne sarà affetta 1 persona su 85 a livello mondiale, coinvolgendo 130 milioni di individui (3).

Il fenomeno ha assunto proporzioni tanto vaste da essere definito “una priorità di sanità pubblica” dall'Organizzazione Mondiale della Sanità.

## *1.2 Patogenesi*

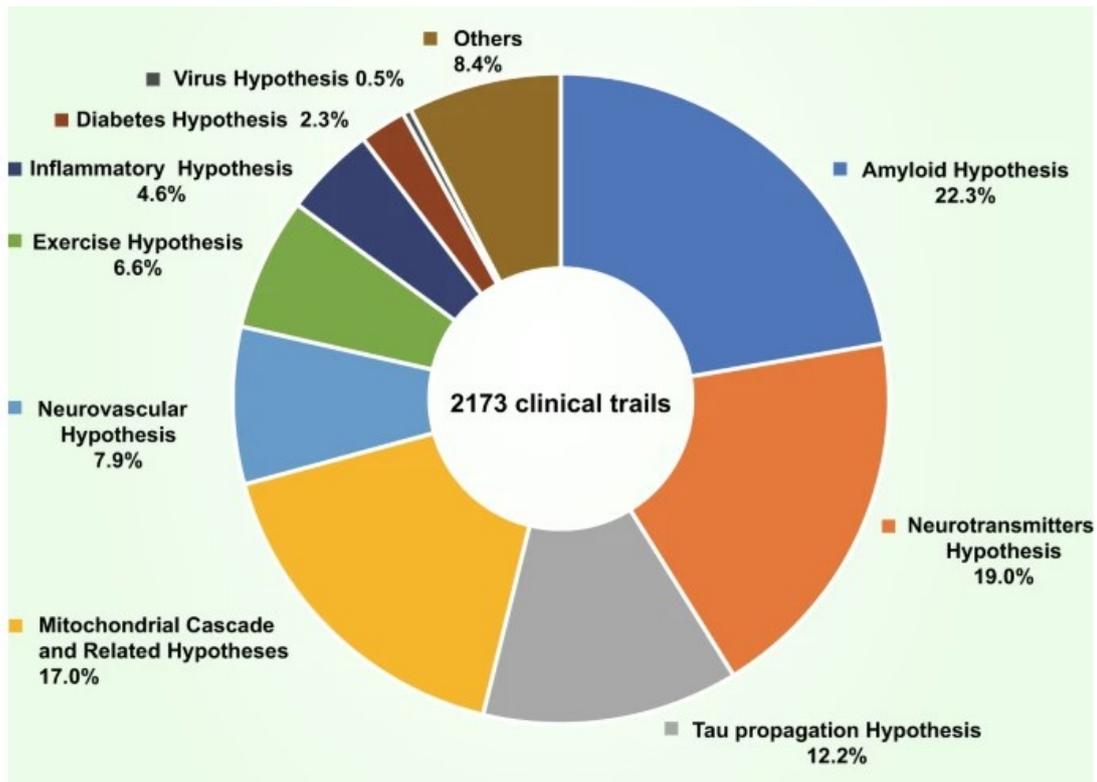
L' Alzheimer ha un'eziopatogenesi di carattere multifattoriale, in cui concorrono sia fattori genetici e sia fattori provenienti dall'ambiente circostante, che possono indurre delle modificazioni epigenetiche nel nostro organismo, aumentando il rischio quindi di sviluppare la malattia.

Diverse ipotesi patogeniche sono state avanzate nel corso dei decenni (Figura 1).

Tra queste troviamo (4):

- Amiloide
- Tau
- Colinergica
- Mitocondriale
- Omeostasi del calcio
- Neurovascolare
- Infiammatoria

Tuttavia, la causa di AD oggi è ignota.



*Figura 1- Percentuale dei trials clinici nei quali le varie ipotesi patogenetiche per AD sono state testate fino al 2019 (4).*

### ***1.2.1 Ipotesi Amiloide***

La cosiddetta ipotesi amiloide, ovvero che l'accumulo e la deposizione del peptide  $\beta$ -amiloide sia la causa scatenante di AD è stato il fulcro della ricerca negli ultimi venti anni. Tuttavia, tutti i tentativi di sviluppare farmaci che vadano ad agire sulla proteina  $A\beta$  per trattare AD, sono falliti.

L'ipotesi amiloide è stata infatti proposta per la prima volta nel 1991 da John Hardy e David Allsop (5): evidenziarono che le placche senili presenti nel tessuto cerebrale di soggetti con AD erano costituite principalmente da un

peptide denominato  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ), un derivato della proteina APP (Amyloid Precursor Protein).

Secondo tale ipotesi l'evento patogenetico chiave responsabile della degenerazione dei neuroni e delle modificazioni morfologiche, funzionali e cognitive tipiche dell'Alzheimer è, di fatto, l'eccessiva formazione o accumulo di peptidi amiloidogenici (6).

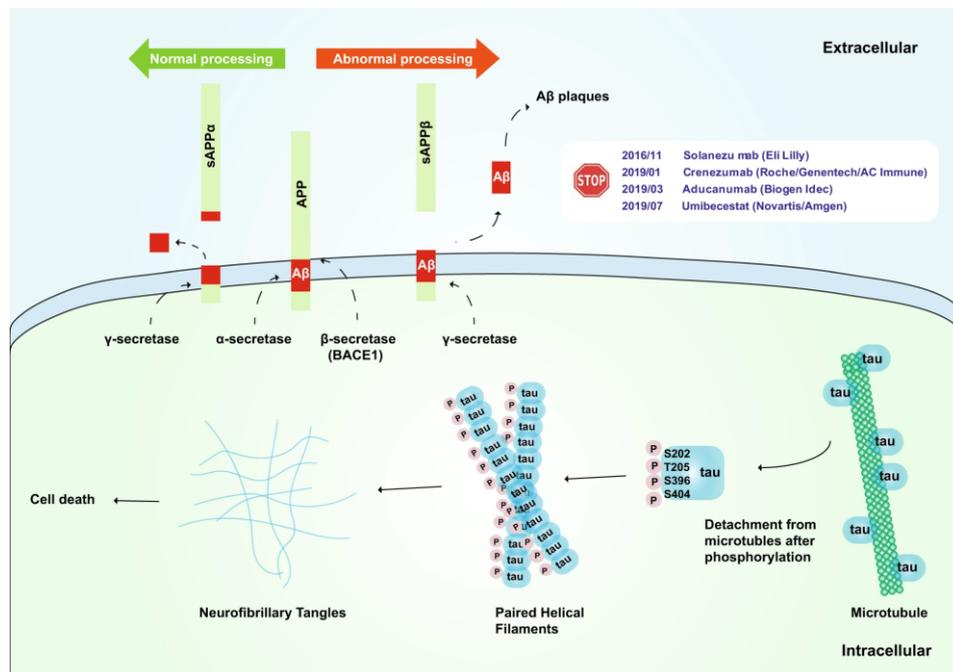
Sono sostanzialmente due i meccanismi attraverso i quali la  $\beta$ -amiloide produce danni neuronali e funzionali (4):

- Un meccanismo diretto, nel quale  $A\beta$  interagisce con componenti della membrana cellulare e danneggia direttamente i neuroni e/o aumenta la suscettibilità dei neuroni ad una varietà di fattori di danno
- Un meccanismo indiretto, nel quale  $A\beta$  danneggia i neuroni tramite l'attivazione della microglia e degli astrociti a produrre mediatori tossici ed infiammatori, come ad esempio l'ossido nitrico, le citochine e gli intermedi reattivi dell'ossigeno che causano la morte dei neuroni per apoptosi o per necrosi.

$A\beta$  fu isolato per la prima volta da Glenner e Wong nel 1984 (7).

È un peptide di 39-43 residui prodotto da tagli proteolitici di APP, proteina di 695 amminoacidi e recettore glicosilato localizzato sulla superficie della

membrana cellulare: il taglio può avvenire attraverso l' $\alpha$ - pathway o  $\beta$ - pathway (figura 2).



**Figura 2- Rappresentazione dell'ipotesi amiloide e dell'ipotesi Tau (4).** Nella parte superiore le due vie di processamento della proteina APP. A sinistra, il normale processamento di APP idrolizzata dall'  $\alpha$ -secretasi e successivamente dalla  $\gamma$ -secretasi che non produce  $A\beta$  insolubile; a destra, il processamento anormale, APP viene processata da  $\beta$ -secretasi e successivamente da  $\gamma$ -secretasi con produzione di  $A\beta$  insolubile. Sotto, la proteina tau che può essere iperfosforilata a livello dei residui Ser202, Thr205, Ser396 e Ser202 (responsabile del legame alla tubulina) con conseguente distacco della proteina dai microtubuli e loro destabilizzazione. I monomeri di tau iperfosforilata si aggregano a formate complessi di oligomeri ed aggregati neurofibrillari che portano alla morte cellulare.

Nel primo caso l'APP è idrolizzata prima dall'  $\alpha$ -secretasi e poi dalla  $\gamma$ -secretasi: questo processo non produce  $A\beta$  insolubile (figura 2: normal processing).

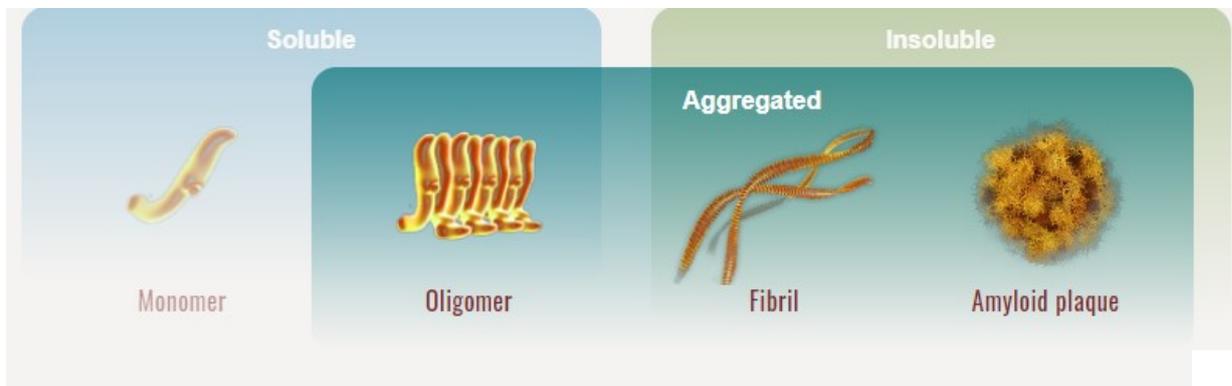
Nel secondo caso, l'APP viene tagliata dalla  $\beta$ -secretasi (BACE1) e successivamente dalla  $\gamma$ -secretasi che produce  $A\beta$  insolubile (figura 2: abnormal processing).

In condizioni normali il taglio di APP avviene prevalentemente attraverso l' $\alpha$ -pathway. Una piccola quantità viene idrolizzata attraverso il  $\beta$ - pathway e l' $A\beta$  prodotto viene eliminato dal sistema immunitario. Tuttavia, quando intervengono mutazioni nel gene APP, ad esempio mutazioni vicine al sito di taglio di  $\beta$ -secretasi o  $\gamma$ -secretasi, APP viene idrolizzata attraverso il  $\beta$ - pathway portando all' accumulo di  $A\beta$  insolubile (4).

$A\beta_{40}$  ed  $A\beta_{42}$  (più idrofobico rispetto a  $A\beta_{40}$ ) sono i principali responsabili della formazione degli aggregati  $A\beta$  e contengono rispettivamente 40 e 42 residui. Un aumento del livello di  $A\beta_{42}$  o un aumento della ratio  $A\beta_{42}/A\beta_{40}$  induce la formazione di fibrille  $A\beta$  amiloidi (8).

Dai monomeri di  $\beta$ -amiloide inizialmente si formano piccoli aggregati, gli oligomeri, che poi si combinano a formare fibrille insolubili, con una struttura terziaria ricca di foglietti  $\beta$  poi infine placche che contengono ammassi di fibrille e altre sostanze (Figura 3). Non è chiaro se tutte o solo alcune di queste forme di  $A\beta$  siano tossiche per il cervello ma ci sono evidenze che sostengono che le forme aggregate, oligomeri e placche siano responsabili della morte delle cellule neuronali (9).

Le placche amiloidi microscopiche sono considerate un segno distintivo di un cervello affetto da AD.



**Figura 3- Forme multiple del peptide amiloide e formazione di aggregati nel cervello (10).** I monomeri di  $\beta$ - amiloide si associano a formare oligomeri solubili che possono diffondersi nel cervello; gli oligomeri possono unirsi tra loro a formare fibrille insolubili che a loro volta si aggregano a formare placche.

Negli ultimi anni si sono accumulate prove con modelli animali (11) che mettono in dubbio la validità dell'ipotesi dell'  $A\beta$  nella sua enunciazione primitiva, cioè che i deficit cognitivi dell'Alzheimer siano dovuti all'effetto citotossico che si verifica a livello delle placche da parte della  $A\beta$  in forma fibrillare; il deposito di  $A\beta$  nel cervello non è stato dimostrato essere neurotossico in vivo; sembra altresì non essere direttamente correlato con la gravità della demenza ed in molti pazienti non affetti da demenza sono state riscontrate le medesime placche senili dell'AD (12).

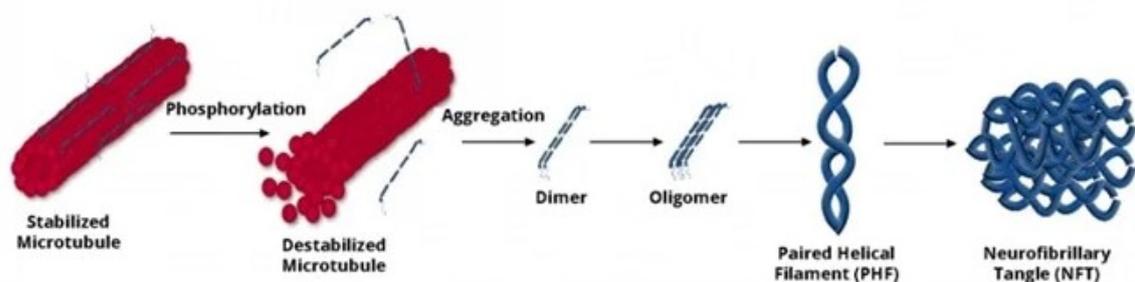
Le attuali strategie per il trattamento di AD basate sull' ipotesi  $A\beta$  sono:

- inibitori delle  $\beta$ - e  $\gamma$ -secretasi, utilizzati per inibire la produzione di  $A\beta$ ;

- farmaci che inibiscono l'aggregazione A $\beta$ ;
- farmaci che agiscono sulle proteasi per degradare le A $\beta$ ;
- immunoterapia basata per lo più su anticorpi monoclonali contro A $\beta$ .

Per quanto riguarda l'immunoterapia diversi trials sono stati sospesi perché non hanno mostrato l'effetto curativo sperato e questo suggerisce che A $\beta$  sia più da considerare come un carattere patologico piuttosto che la causa principale di AD: proprio il fallimento di studi di fase III con anticorpi anti-A $\beta$  ha messo maggiormente in discussione questa ipotesi storica.

### 1.2.2 Ipotesi Tau



**Figura 4- Modificazione della proteina tau (13).** La proteina tau che generalmente stabilizza i microtubuli può subire modificazioni post-traduzionali tra cui la fosforilazione. L'iperfosforilazione di tau porta alla sua dissociazione dai microtubuli ed alla formazione di aggregati: dapprima si formano oligomeri, poi filamenti a doppia elica (PHFs) ed infine aggregati neurofibrillari (NFTs).

Tau è la principale proteina associata ai microtubuli MAP presente nei neuroni in condizioni normali. Le altre due MAP neuronali sono MAP1 e MAP2.

Tau è presente in sei isoforme nel cervello umano codificate da singolo gene sul cromosoma 17 e generate attraverso lo splicing alternativo del pre-mRNA.

Ad oggi l'unica funzione fisiologica della tau indentificata con certezza è la promozione dell'assemblamento della tubulina in microtubuli e la stabilizzazione della loro struttura, funzione di particolare importanza per i neuroni che utilizzano i microtubuli per trasportare il segnale nei dendriti e negli assoni.

Come MAP1 e MAP2, tau è una fosfoproteina e la sua attività biologica è regolata dal suo livello di fosforilazione. Normalmente nel cervello tau contiene 2 o 3 moli di fosfato per mole di proteina che appare un livello ottimale per la sua interazione con la tubulina e la sua attività di promozione di assemblaggio dei microtubuli. Oltre alla fosforilazione, anche lo splicing alternativo può influire sulla sua attività biologica (14).

Nella 'ipotesi tau' si pensa che l'eccessiva o l'anormale fosforilazione di tau risulti nella dissociazione di tau dai microtubuli e nell'aumento della capacità di aggregazione portando alla trasformazione della fisiologica proteina tau in PHF- tau (paired-helical-filament) e NFTs (Neurofibrillary tangles-aggregati neurofibrillari). Queste strutture insolubili che si accumulano all'interno dei neuroni vanno a danneggiare le funzioni citoplasmatiche e interferiscono con il trasporto assonale comportando la morte cellulare neuronale e inoltre

l'iperfosforilazione riduce la capacità della proteina tau di promuovere l'assemblaggio dei microtubuli causando neurodegenerazione attraverso l'alterazione della funzionalità sinaptica (15).

Comprendere come la proteina tau si diffonde nel cervello nell'ambito della malattia di Alzheimer è cruciale per chiarire i meccanismi patofisiologici alla base del disturbo e, di conseguenza, sviluppare modelli terapeutici efficaci.

L' 'ipotesi di propagazione della proteina tau' è stata avanzata nel 2009 (16).

L' alterazione della proteina tau solitamente appare in ristrette e specifiche aree e successivamente si estende in più regioni del cervello. Aggregati di proteina tau, fibrillare o mal ripiegata, si propagano probabilmente all' interno delle cellule attraverso un meccanismo prion-like inducendo cioè in corrispondenti proteine endogene correttamente ripiegate un mal ripiegamento, similmente a quanto avviene nelle malattie prioniche (4).

Per molto tempo l'ipotesi prevalente è stata che cambiamenti in A $\beta$  siano il primum movens di AD, in grado cioè di innescare accumulo di proteina tau e neurodegenerazione mediata da tau; alcuni invece hanno ipotizzato mancanza di specifica interazione tra A $\beta$  e tau nell'indurre la patologia.

Tuttavia, un numero crescente di evidenze suggerisce ad oggi che entrambe agendo sinergicamente intervengano nella patogenesi anche se con meccanismi a noi ignoti (17).

### ***1.2.3 Colinergica***

È stata proposta da Peter Davies e A. J. F. Maloney nel 1976: l'attività della colina acetiltransferasi, enzima chiave nella sintesi dell'acetilcolina, è fortemente ridotta nell'amigdala, ippocampo, corteccia del cervello di pazienti AD dove quindi la concentrazione di acetilcolina è ridotta a livello della sinapsi (18).

Gli inibitori dell'acetilcolinesterasi (principale enzima responsabile dell'idrolisi del neurotrasmettitore ACh) possono alleviare i sintomi dei disturbi cognitivi dei pazienti AD inibendo la degradazione dell'acetilcolina, neurotrasmettitore importante nel favorire la comunicazione tra i neuroni, che sembra avere un ruolo nell'apprendimento e nella memoria. Questi farmaci sono stati quindi utilizzati negli ultimi 20 anni per migliorare la qualità di vita delle persone affette ma non hanno bloccato la progressione della malattia (19): aumentando i livelli dell'acetilcolina nelle sinapsi mitigano parzialmente i sintomi cognitivi anche se per un breve periodo di tempo (1-3 anni)(20).

### ***1.2.4 Ipotesi Mitocondriale***

Una delle principali ipotesi circa l'esordio di AD sostiene che la disfunzione mitocondriale e lo stress ossidativo siano l'evento iniziale responsabile dell'insorgenza della patologia (21).

Nel 2004 Swerdlow e Khan hanno per primi introdotto l'ipotesi della cascata mitocondriale ed avanzato l'idea che la funzionalità mitocondriale avrebbe potuto influenzare l'espressione ed il processamento di APP e l'accumulo di A $\beta$  nella SAD (22).

I mitocondri sono organelli cellulari ereditati per via materna, richiesti per i processi bioenergetici e sono anche coinvolti nel metabolismo degli amminoacidi, lipidi steroidei, omeostasi del calcio, produzione di ROS e nell'apoptosi. Nel cervello dove è richiesta e consumata una grandissima quantità di energia, il numero dei mitocondri è elevato e la loro alterazione può essere un serio rischio per la sopravvivenza dei neuroni (21).

Infatti, i neuroni sono strettamente dipendenti dalla presenza dei mitocondri, in particolare, a livello delle sinapsi, dove questi organelli producono ATP e regolano il metabolismo del calcio, funzioni fondamentali per la neurotrasmissione e per la formazione del potenziale di membrana lungo gli assoni. Questo giustifica l'elevata concentrazione di mitocondri nell'area sinaptica, più alta rispetto ad ogni altra parte dei neuroni.

In accordo con ciò il corretto ed efficiente trasporto dei mitocondri a livello delle sinapsi è fondamentale per il loro corretto funzionamento. Sia i mitocondri sinaptici sia quelli non sinaptici, infatti, vengono sintetizzati a

livello del soma neuronale e successivamente trasportati nelle altre regioni del neurone nelle quali sono necessari (23).

Numerose ricerche hanno mostrato la diffusa alterazione mitocondriale nel cervello di pazienti AD.

In linea con l'osservazione che l'alterazione del metabolismo energetico preceda l'esordio clinico di AD, la disfunzione mitocondriale è considerata come una caratteristica della patologia precoce e prominente, suggerendo un ruolo critico nella patogenesi di AD (24).

Ad oggi il collegamento tra la disfunzione mitocondriale e AD deve essere chiarito ma molte evidenze indicano che il progressivo accumulo di A $\beta$  nei mitocondri potrebbe rappresentare la causa dell'alterazione delle loro funzioni fisiologiche (25).

Al momento non è possibile quindi stabilire se la disfunzione mitocondriale giochi un ruolo primario o secondario nell'AD: l'alterazione del metabolismo energetico mitocondriale, l'aumento dello stress ossidativo e alterazioni del genoma mitocondriale sono tuttavia peculiarità delle alterazioni mitocondriali in AD che interagiscono tra di loro per innescare un meccanismo dannoso, senza ritorno, che porta alla patologia neurodegenerativa (25).

### ***1.2.5 Omeostasi del calcio***

L'ipotesi che l'alterazione dell'omeostasi degli ioni calcio porti alla neurodegenerazione è stata proposta per la prima volta dal Dr. Khachaturian (26) nella metà degli anni Ottanta.

Gli ioni calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) sono importanti secondi messaggeri che intervengono nelle funzioni e nella struttura delle cellule del sistema nervoso come crescita neuronale, esocitosi, funzioni sinaptiche e cognitive.

L'omeostasi del calcio cellulare gioca un ruolo fondamentale nella regolazione della fisiologia neuronale come crescita, differenziamento, generazione del potenziale d'azione, plasticità sinaptica, apprendimento e memoria. Dunque, l'alterazione dell'omeostasi del calcio può andare ad inficiare la normale funzione delle cellule nervose e la loro struttura (27).

Un crescente numero di evidenze suggerisce che l'alterazione dell'omeostasi del calcio intracellulare, in particolare l'anormale ed eccessivo rilascio del calcio dal RE, giochi un ruolo importante nell'orchestrare le dinamiche della neuropatologia di AD e le conseguenti perdita di memoria e disfunzione cognitiva (28).

La deregolazione del calcio non è stata osservata solamente come conseguenza dell'accumulo degli oligomeri di  $\text{A}\beta$  ma anche prima delle altre alterazioni patologiche di AD (alterazione del processamento di APP,

iperfosforilazione di tau, produzione di ROS, alterazione della plasticità sinaptica) (27).

Appurato che la deregolazione del calcio è coinvolta nella patogenesi di AD, è plausibile che agenti chimici o piccole molecole che permettano di correggere questa alterazione potrebbero rappresentare un potenziale approccio terapeutico per la prevenzione o trattamento di AD.

Numerosi farmaci che hanno come target i canali del calcio plasmatici hanno mostrato una buona efficienza in vitro ed in vivo in modelli AD. Alcuni di questi sono stati già approvati dalla FDA per il trattamento di AD (Memantine) o per studi clinici (Nimodipine) (29). Tuttavia, tutti questi farmaci prendono di mira i canali della membrana plasmatica piuttosto che le vie di segnalazione intracellulari del  $\text{Ca}^{2+}$  maggiormente alterate come quelle del RE e lisosomi.

Ulteriori ricerche sono dunque necessarie per chiarire il meccanismo molecolare che connette l'alterazione dell'omeostasi del calcio intracellulare con la patogenesi di AD in modo tale da poter sviluppare farmaci più specifici che abbiano come target i canali presenti nelle membrane degli organelli intracellulari come RE, mitocondri e lisosomi e che potrebbero rappresentare una nuova speranza per la prevenzione/trattamento dell'AD (27).

### ***1.2.6 Ipotesi neurovascolare***

L'ipotesi neurovascolare sostiene che la riduzione della clearance della A $\beta$  sia causata da un'alterazione a carico di LRP-1, il principale trasportatore dal cervello di A $\beta$  attraverso la barriera ematoencefalica. La BEE è costituita da cellule endoteliali unite tra loro da giunzioni serrate che impediscono il passaggio non regolato di sostanze tra cervello e il sangue svolgendo una funzione di barriera: in accordo con l'ipotesi neurovascolare la riduzione del trasporto cervello/sangue di A $\beta$  attraverso queste cellule endoteliali porterebbe ad un aumento di A $\beta$  nel cervello contribuendo alla patogenesi di AD (30).

### ***1.2.7 Ipotesi Infiammatoria***

L'infiammazione acuta nel SNC è un meccanismo di difesa contro infezioni, tossine e traumi ma quando c'è un disequilibrio tra i segnali pro-infiammatori e antiinfiammatori come è stato visto in AD il risultato è un'infiammazione cronica (neuroinfiammazione).

La neuroinfiammazione è attribuita alle cellule della microglia attivate, agli astrociti e al rilascio di citochine pro-infiammatorie. Quindi l'infiammazione a livello del SNC appare avere una duplice funzione, giocando un ruolo

neuroprotettivo in fase acuta, ma negativo quando viene attivata cronicamente.

La microglia e gli astrociti attivati cronicamente infatti rilasciano una grande varietà di prodotti pro-infiammatori e tossici come ROS, NO, citochine.

La neuroinfiammazione in AD è considerata “un’arma a doppio taglio” poiché le cellule immunitarie del SNC svolgono sia un ruolo positivo degradando gli aggregati di A $\beta$  ma anche negativo poiché producono sostanze citotossiche che aumentano la deposizione dell’A $\beta$  portando alla disfunzione neuronale.

Un’ elevata espressione di mediatori infiammatori è stata rilevata attorno alle placche A $\beta$  ed agli aggregati neurofibrillari (31).

Le cellule della microglia sono cellule immunitarie localizzate in tutto il cervello, midollo spinale, retina, nervi ottici ma soprattutto nell’ ippocampo e nella substantia nigra. Quando sono inattive partecipano alla neurogenesi, alla neuroprotezione ed all’ eliminazione delle sinapsi, sono in grado di rispondere a vari stimoli (31).

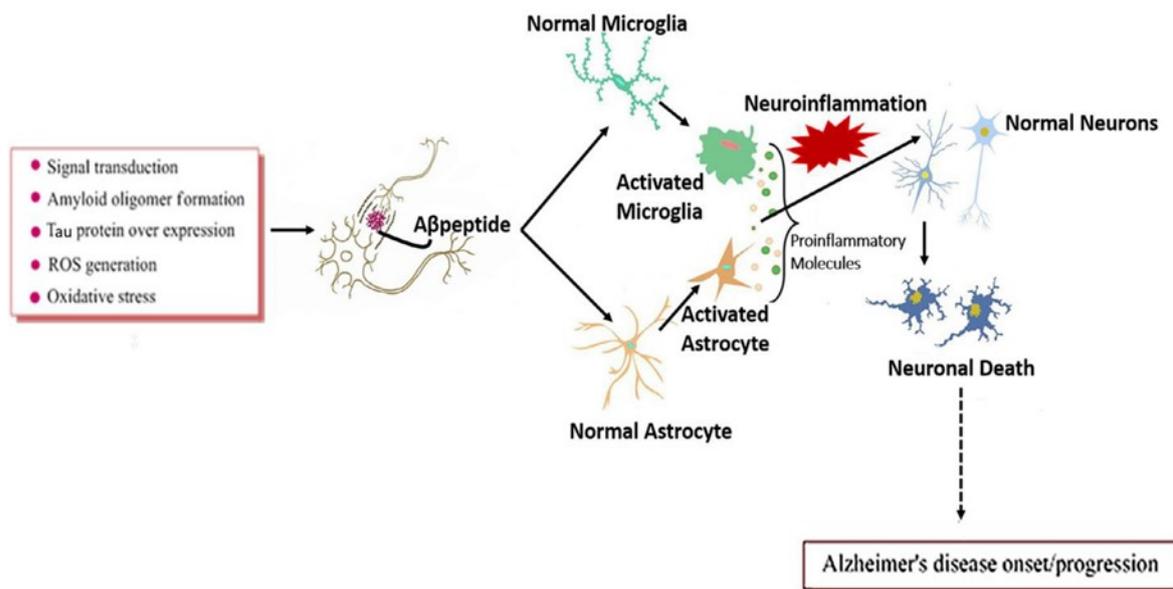
L’ attivazione delle cellule della microglia è uno dei primi eventi che si verificano nella patologia dell’AD, porta all’ aumento dell’effetto proinfiammatorio e rappresenta la causa della neurotossicità. La microglia attivata risponde migrando a livello delle placche amiloidi e fagocitando A $\beta$ ,

almeno all'inizio, tuttavia nel tempo non è più in grado di processarla e la sua prolungata attivazione risulta in un'esacerbazione della patogenesi di AD, con accumulo di A $\beta$ , produzione di citochine proinfiammatorie e danneggiamento a carico dei neuroni (32) (figura 5).

Gli astrociti localizzati nel SNC fungono da supporto per le cellule endoteliali della barriera emato-encefalica, svolgono un ruolo nel mantenimento del bilancio ionico e provvedono al trasporto dei nutrienti ai neuroni (31).

Nel cervello AD ci sono chiari segni di astrogliosi (aumento del numero degli astrociti) attorno ai depositi A $\beta$ . Come le cellule della microglia, gli astrociti rilasciano citochine, interleuchine, ossido nitrico ed altre molecole potenzialmente citotossiche dopo l'esposizione a stimoli tra cui A $\beta$  e ciò potrebbe inasprire la risposta neuroinfiammatoria in AD.

La funzione di queste cellule nel SNC è complessa poiché esse mostrano sia un effetto neuroprotettivo che un effetto neurotossico: è proprio l'equilibrio tra effetto neurotossico e neuroprotettivo e tra pro-infiammatorio e antinfiammatorio a determinare il ruolo delle cellule della microglia e degli astrociti nell'esordio/progressione dell'AD (32).



**Figura 5- Attivazione della microglia in AD (32).** Possibile ruolo della microglia e degli astrociti nell' esordio/progressione della malattia di Alzheimer attraverso induzione di neuroinfiammazione mediata da citochine.

Nonostante numerose evidenze abbiano mostrato che l'infiammazione svolge un ruolo chiave nella patogenesi di AD, il meccanismo d' azione delle molecole infiammatorie nella malattia non è stato ancora ben chiarito e nuovi studi sono necessari per poter sfruttare i marker infiammatori nella diagnosi, monitoraggio o trattamento dell'AD (32).

### 1.2.8 Altre ipotesi

Oltre le ipotesi suddette ci sono anche altri fattori (alterazione dell'omeostasi di ioni metallici, alterazione del sistema linfatico meningeo, microrganismi etc.) che sembrano influenzare l'incidenza della patologia di Alzheimer (4).

Tuttavia, ad oggi l'eziologia di AD rimane non del tutto chiarita.

Nonostante la malattia di Alzheimer sia stata descritta più di un secolo fa, una chiara comprensione dei meccanismi patologici non esiste.

### ***1.3 Decorso e sintomi di AD***

Il cervello umano sano contiene 100 miliardi di neuroni ed ancora più cellule della glia. Ciascun neurone può entrare in contatto con migliaia e decine di migliaia di altri neuroni: mandano messaggi da una parte all'altra del cervello e dal cervello agli organi del corpo (33).

La malattia d'Alzheimer distrugge questo network tra i neuroni portando alla perdita di funzione ed alla successiva morte cellulare.

Un numero sempre maggiore di evidenze mostra che il meccanismo neuropatologico che porta all'esordio di AD ha inizio circa più di 20 anni prima della manifestazione dei sintomi, con graduali cambiamenti nel cervello che passano inosservati prima della manifestazione del declino cognitivo lieve (MCI). Essendo una patologia progressiva AD interferisce con le connessioni neuronali nelle regioni del cervello coinvolte nella memoria, tra cui la corteccia entorinale e l'ippocampo, successivamente, va a colpire la corteccia cerebrale responsabile del linguaggio, comportamento e ragionamento.

Nel tempo una persona affetta da Alzheimer perde gradualmente la capacità di vivere autonomamente poiché altre aree del cervello vengono danneggiate (34).

L'inizio della malattia è generalmente insidioso e graduale, il decorso lento e la durata media è di 8-10 anni dalla comparsa dei sintomi.

Rappresenta una delle maggiori cause di disabilità nella popolazione generale.

Il rischio di contrarre la malattia aumenta con l'età: si stima che circa il 20% della popolazione ultra-ottantacinquenne ne sia affetta.

Esistono tuttavia rari casi in cui la malattia esordisce in età precoce, ovvero prima dei 65 anni.

La malattia di Alzheimer si manifesta attraverso sintomi *cognitivi* (difficoltà di memoria e di linguaggio, di riconoscimento di oggetti, disorientamento), *funzionali* (difficoltà nello svolgere le attività della vita quotidiana) e *comportamentali* (agitazione, ansia, depressione) che con il tempo peggiorano (35).

Anche se la velocità di progressione può variare, oggi l'aspettativa media di vita dopo la diagnosi è dai 3 ai 9 anni (3).

La morte di solito è causata da polmonite, malnutrizione o inanizione.

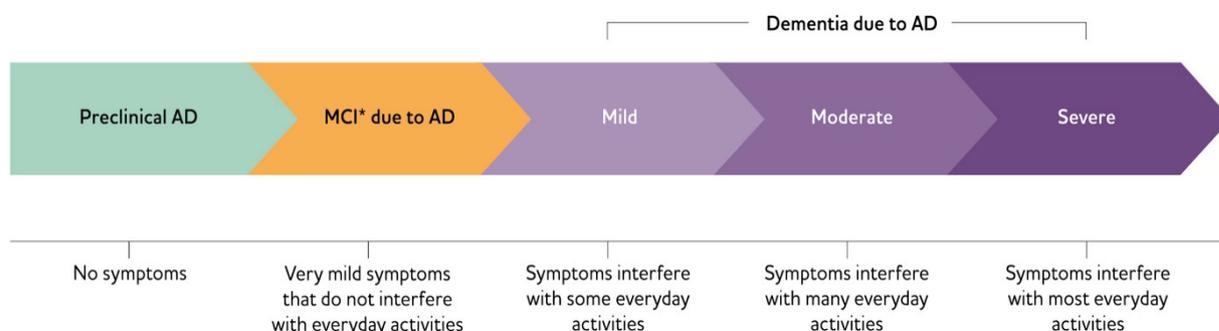
### 1.4 Alzheimer's disease continuum

La progressione della malattia d'Alzheimer da cambiamenti cerebrali impercettibili a cambiamenti che nella persona affetta causano problemi di memoria ed eventualmente disabilità fisiche è chiamata "Alzheimer's disease continuum" (figura 6).

Questo 'continuum' è costituito da tre fasi: preclinica, lieve deterioramento cognitivo (MCI) dovuto all'Alzheimer e demenza dovuta all' AD.

La fase di demenza dell'Alzheimer è ulteriormente suddivisa nelle fasi di lieve, moderata e grave che riflettono il grado in cui i sintomi interferiscono con la capacità di svolgere le attività quotidiane (34).

Sebbene si sappia che il 'continuum' ha inizio con la fase preclinica e termina con la grave demenza, il tempo impiegato da ciascun individuo in ciascuna fase varia: la durata di ciascuna fase è influenzata da età, genetica, sesso ed altri fattori (36).



**Figura 6- Alzheimer's disease continuum (34).** Fasi: preclinica; lieve deterioramento cognitivo (MCI); demenza.

- Fase preclinica- La fase preclinica della malattia di Alzheimer è poco evidente e non ci sono - quasi per definizione - sintomi e segni affidabili e validi che consentirebbero una diagnosi molto precoce prima della manifestazione di deficit irreversibili.

In questa fase, gli individui possono avere cambiamenti cerebrali che rappresentano i primi segni della malattia di Alzheimer e vengono considerati biomarkers (per esempio aumento dei livelli di A $\beta$  come mostrato dalla Tomografia a emissione di positroni-PET) ma non sviluppano sintomi come la perdita di memoria.

- MCI (Mild Cognitive Impairment - lieve deterioramento cognitivo)

I pazienti con lieve deterioramento cognitivo presentano alterazioni della memoria e disturbi cognitivi che tuttavia non sono così gravi da influenzare l'abilità lavorativa o le relazioni.

Pazienti con MCI possono avere perdita di memoria relativa ad informazioni che si ricordano facilmente come conversazioni, eventi recenti o appuntamenti. Hanno inoltre difficoltà nella gestione del tempo necessario o nell'organizzazione degli step per portare a termine un compito. Circa il 45% dei pazienti con MCI sviluppa demenza tra i 2 e i 5 anni (37).

- Demenza dovuta ad Alzheimer

Caratterizzata da alterazioni a carico della memoria, apprendimento e comportamentali che vanno ad impattare sulle attività quotidiane della persona.

Nel corso della progressione della AD i pazienti presentano una pletera di sintomi che cambia con il tempo, collegabile con il grado di danneggiamento dei neuroni in differenti parti del cervello; la velocità di progressione della patologia inoltre cambia da persona a persona.

Questa fase è a sua volta distinta in:

*Lieve-* la malattia è spesso diagnosticata in questa fase quando la persona presenta evidenti problemi di memoria e alterazioni cognitive che influiscono negativamente sulle attività quotidiane: possono però ancora guidare, lavorare e praticare attività nel tempo libero.

*Moderata-* Le persone mostrano maggiore alterazione della memoria e confusione mentale tanto che necessitano di un più intenso aiuto nelle attività quotidiane e per la loro cura personale: a volte sono incontinenti e presentano inoltre cambiamenti dell'umore.

*Severa-* C'è un ulteriore declino della funzione cognitiva e la patologia affligge inoltre il movimento e le capacità fisiche. I pazienti necessitano di aiuto nello svolgimento delle attività quotidiane e assistenza 24 ore

al giorno. Solitamente sono soggetti allettati, con disfagia a solidi e/o liquidi (34).

### ***1.5 Segni patologici***

I segni patologici caratteristici della malattia di Alzheimer, descritta per la prima volta nel 1907 dal Dr. Alois Alzheimer (38), noti quindi da più di cento anni e la cui presenza è richiesta per la diagnosi di malattia sono (figura 7):

- placche amiloidi extracellulari
- grovigli neurofibrillari intracellulari;

accompagnate da depositi amiloidi vascolari, perdita neuronale e sinaptica, neuroinfiammazione e astrogliosi reattiva (39).

Queste caratteristiche neuropatologiche si presentano dai 15 ai 20 anni prima dell'esordio dei sintomi cognitivi di AD.

Le *placche amiloidi* sono costituite principalmente dall'accumulo extracellulare non vascolare di A $\beta$ 40 e A $\beta$ 42 risultato del processamento anomalo di APP da parte delle  $\beta$ - and  $\gamma$ -secretasi e dall'alterazione dell'equilibrio tra produzione e clearance. Le placche amiloidi sono state inizialmente ritenute responsabili dell'alterazione della trasmissione neuronale, della plasticità sinaptica e dei conseguenti deficit cognitivi

osservati nelle prime fasi della malattia di AD (40) tuttavia ci sono studi contrastanti riguardo la correlazione tra placche amiloidi, severità della perdita neuronale e altri sintomi di AD (41).

A $\beta$ 42 componente principale delle placche in AD è il peptide più fibrillogenico: tende a formare oligomeri che progressivamente si assemblano in protofibrille successivamente convertite in fibrille mature.

Esperimenti recenti ed evidenze cliniche hanno mostrato che gli oligomeri solubili, piuttosto che le fibrille mature, sono la forma di A $\beta$ 42 con maggiore neurotossicità e responsabili dell'alterazione della plasticità sinaptica (42).

I *grovigli neurofibrillari* (NFTs) vennero descritti come neurofibrille che formano spessi gomitoli vicini la superficie cellulare dei neuroni (38).

Questi aggregati intraneuronali sono costituiti prevalentemente dalla proteina tau iperfosforilata e sono considerati caratteristici non solo della malattia di AD ma anche della classe delle taupatie neurodegenerative (43).

L'accumulo dei grovigli neurofibrillari è associato con l'alterazione del network microtubulare e del trasporto assoplasmatico (o flusso assonico), essendo tau una proteina che favorisce l'assemblaggio e stabilizza i microtubuli e (44).

All'interno dei neuroni, i grovigli di proteina tau iperfosforilata, inoltre, bloccano il trasporto di nutrienti ed altre molecole essenziali per la loro

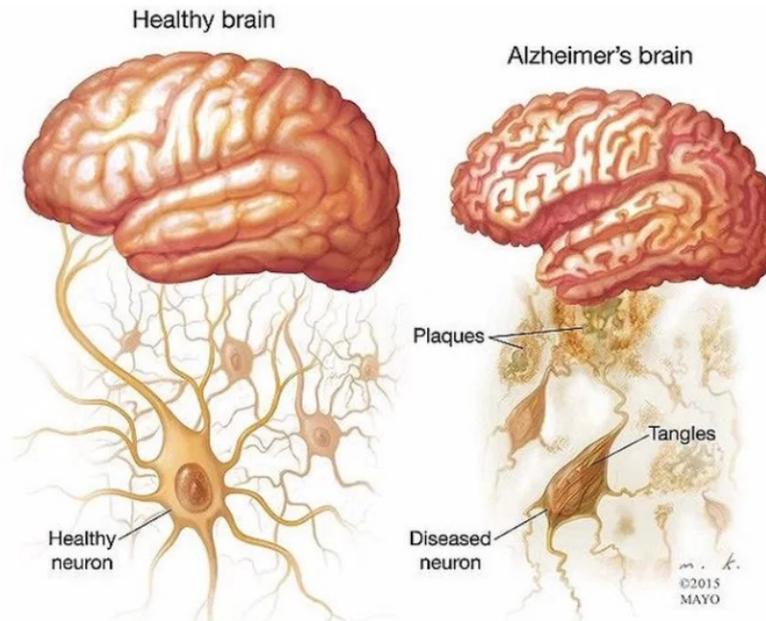
sopravvivenza determinandone la morte. Per questi motivi la presenza dei NFTs in AD sembra essere strettamente correlata con il declino cognitivo, l'alterazione sinaptica e la perdita neuronale (34).

Ci sono evidenze che suggeriscono che aggregati neurofibrillari correlino meglio con l'alterazione delle capacità cognitive rispetto alle placche amiloidi (8).

Nei pazienti alcuni cambiamenti possono essere accertati anche tramite un esame macroscopico, questi però non sono specifici ma solamente fortemente suggestivi di AD: il cervello di pazienti affetti da AD è infatti spesso caratterizzato da atrofia corticale moderata che è più marcata a livello delle strutture del lobo limbico e della corteccia frontale, temporale e posteriore.

Il risultato di questa atrofia è l'ingrandimento dei corni frontali e temporali dei ventricoli laterali e la riduzione del peso del cervello (39).

Il gold-standard per la diagnosi di AD è rappresentato dalla valutazione neuropatologica post- mortem, quando l'esame microscopico può rivelare la presenza delle placche e dei grovigli.



**Figura 7- Confronto tra cervello di soggetto sano e soggetto affetto da malattia di Alzheimer (45).** Nel cervello affetto da malattia di Alzheimer (a destra) sono presenti segni caratteristici della malattia quali placche amiloidi ed aggregati neurofibrillari che determinano danneggiamento dei neuroni.

## **1.6 Diagnosi**

Non esiste alcun test specifico che ci permetta di diagnosticare la malattia di Alzheimer, è una diagnosi di esclusione ed è il risultato di: un attento esame clinico (46) della persona, effettuato attraverso una dettagliata raccolta delle informazioni anamnestiche, un esame neurologico, la somministrazione di test cognitivi (come Mini-Mental State Examination -MMSE), alcuni esami di laboratorio per escludere cause di demenza reversibile, l'effettuazione di specifici esami di neuroimmagine ( TC, RMN, PET etc.) (47).

Anche se sono stati identificati geni che aumentano il rischio di sviluppare AD, dato che il contributo genetico è complesso, test genetici non sono al momento raccomandati di routine.

In particolare, sebbene esistano test del sangue per ApoE4, il loro utilizzo pone un problema etico infatti tale mutazione è associata ad un maggiore rischio di sviluppare AD ma non determina con certezza lo sviluppo della patologia (48).

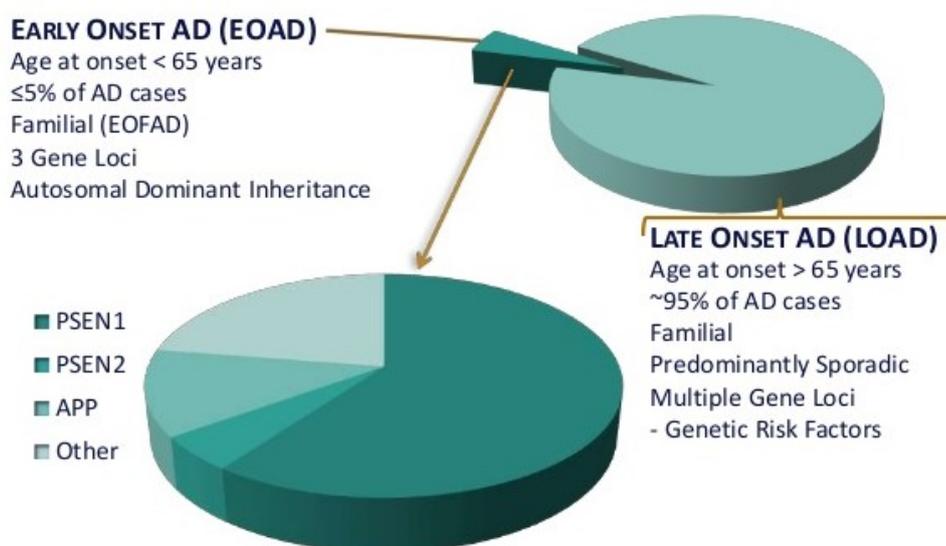
Ad oggi dunque, la diagnosi di malattia si basa essenzialmente su sintomi che gli individui o i familiari descrivono al medico, misurazioni tramite test cognitivi ed altri test che permettano di escludere altre patologie. Tuttavia, poiché i sintomi nelle prime fasi di malattia sono poco evidenti o potrebbero essere attribuiti al normale invecchiamento, una diagnosi precoce accurata può essere difficile e infatti possono volerci anni per averne una.

Il lavoro degli ultimi anni si sta concentrando sullo sviluppo di nuovi sistemi per la diagnosi precoce quando i sintomi sono molto lievi o prima che i sintomi compaiano in modo tale da modificare il corso della malattia attraverso il cambiamento dello stile di vita o trattamenti profilattici: l'identificazione di nuovi biomarcatori oltre quelli già utilizzati nella pratica clinica (A $\beta$ 42 nel liquido cerebrospinale, quantificazione della tau totale e tau

fosforilata) e il loro cambiamento nell' Alzheimer's continuum rappresentano importanti vie di ricerca per il futuro (49).

### 1.7 Forme cliniche di AD

La malattia viene distinta in sottotipi (figura 8) in base: all'età di insorgenza in *early-onset* (EOAD) e *late-onset* (LOAD) ed in base all' eziologia in *familiare* causata da mutazioni genetiche accertate e *sporadica* dovuta ad un insieme di fattori genetici e ambientali il cui contributo, attualmente, non è stato ancora ben definito (50).



**Figura 8- Forme della malattia di Alzheimer (51).** Early onset AD con esordio precoce, prima dei 65 anni; dovuta principalmente a mutazioni geniche a trasmissione autosomica dominante. Late onset AD rappresenta la maggior parte dei casi di AD, si manifesta dopo i 65 anni e generalmente è sporadica.

Early-onset AD (EOAD) con età di insorgenza varia tra i 30 ed i 60-65 anni.

La forma familiare rappresenta l'1-6% di tutti i casi e ha generalmente un'insorgenza precoce.

La late-onset AD (LOAD) la forma più comune, è definita come malattia con insorgenza dopo i 60/ 65 anni (50).

Più del 90% dei malati di AD presentano forma sporadica e con insorgenza tardiva.

Entrambe, EOAD e LOAD possono verificarsi in persone con storia familiare positiva per AD.

Circa il 60% dei casi di EOAD ha molteplici casi di AD all' interno della famiglia e di questi casi 'familiari' di EOAD il 13% ha trasmissione autosomica dominante infatti ci sono casi in almeno 3 generazioni successive.

Fatta eccezione per i pochi casi di trasmissione familiare autosomica dominante (FAD), con mutazione a carico di un singolo gene (APP; PSEN1; PSEN2) la maggior parte dei casi di AD rappresenta una malattia complessa dovuta presumibilmente alla combinazione di geni di suscettibilità e fattori ambientali.

Per la LOAD sebbene i parenti di primo grado dei pazienti abbiano un rischio doppio di sviluppare la malattia nel corso della loro vita, il modello di trasmissione è raramente coerente con l'eredità mendeliana.

Sebbene vi siano studi che supportano l'esistenza di una componente genetica nella LOAD, uno specifico gene causale non è ancora stato identificato: l'unico gene fortemente correlato con la forma sporadica di LOAD, è il gene dell'apolipoproteina E. Tuttavia, molti portatori dell'allele di rischio ApoE ( $\epsilon 4$ ) vivono fino ai 90 anni, il che suggerisce l'esistenza di altri fattori di rischio genetici e / o ambientali per la LOAD che devono ancora essere identificati (2).

### ***1.8 Alzheimer e Genetica***

Uno dei principali obiettivi della ricerca nel campo dell'Alzheimer, è stato quello di comprendere l'eziologia genetica alla base di tale patologia e la sua correlazione con la neuropatologia di AD.

AD Loci	Gene Symbol	Gene Name	Chromosome	Inheritance
AD1	<i>APP</i>	Amyloid precursor protein	21q21	Autosomal Dominant
AD2	<i>APOE</i>	Apolipoprotein E	19q13.32	Sporadic
AD3	<i>PSEN1</i>	Presenilin 1	14q24.2	Autosomal Dominant
AD4	<i>PSEN2</i>	Presenilin 2	1q42.13	Autosomal Dominant

***Figura 9- Geni correlati alle diverse forme di malattia d' Alzheimer (2). Le mutazioni di APP- PSEN1-PSEN2 sono correlate alla forma familiare di AD, a trasmissione autosomica dominante; il gene APOE è associato alla forma sporadica della malattia.***

Nel 50% dei pazienti FAD (Familial Alzheimer's disease) sono state identificate, al momento, mutazioni a carico di 3 geni (APP; PSEN1; PSEN2):

### **1) Amyloid precursor protein (APP)**

APP è una glicoproteina transmembrana di tipo 1 ubiquitaria: è composta da un largo dominio ammino-terminale extracellulare (ectodominio) e una corta coda citoplasmatica. Partecipa a multiple funzioni cellulari come adesione cellulare, crescita assonale, migrazione neuronale, trasporto proteico, segnalazione cellulare e sinaptogenesi.

Il gene APP, localizzato sul cromosoma 21, va incontro ad eventi di splicing alternativo portando al rilascio di prodotti che differiscono nel numero di amminoacidi (per esempio APP695, APP714, APP751, APP770, APP563) e sono differenzialmente espressi nei vari tessuti.

Le tre isoforme maggiormente rilevanti in AD sono espresse esclusivamente nel sistema nervoso centrale (APP695) o nel sistema nervoso periferico e nel centrale (APP751 e APP770) (2).

L' APP è sintetizzata nel reticolo endoplasmatico e trasportata attraverso il Golgi dove va incontro a modificazioni post-traduzionali come glicosilazione e fosforilazione. Viene trasportata sulla superficie delle cellule attraverso vescicole secretorie: a livello della membrana cellulare APP può essere quindi

tagliata dall'  $\alpha$ -secretasi per produrre sAPP $\alpha$  o internalizzata nuovamente in vescicole ricoperte di clatrina dirette agli endosomi.

L'APP contenuta negli endosomi può essere riciclata e trasportata verso la superficie cellulare oppure direzionata ai lisosomi che rappresentano l'ambiente ideale per l'attività della  $\beta$  secretasi (52).

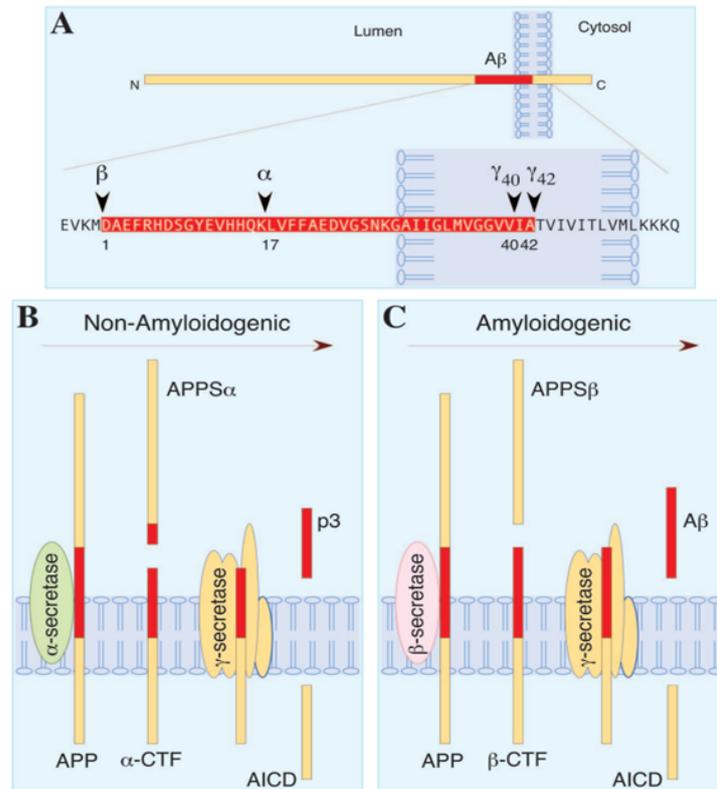
Due sono quindi i pathways attraverso cui APP può essere metabolizzata: amiloidogenico e non amiloidogenico (figura 10).

Il *processo amiloidogenico* comporta il taglio iniziale dell'APP da parte della  $\beta$ -secretasi a livello dell'ectodominio portando al rilascio nello spazio extracellulare di un frammento solubile di APP chiamato sAPP $\beta$ . Il rimanente frammento APP  $\beta$ -carbossiterminale ( $\beta$ -CTF) ancorato alla membrana viene quindi tagliato dal complesso della  $\gamma$ -secretasi nel doppio strato fosfolipidico portando alla produzione di un peptide A $\beta$  (in vitro ha la tendenza ad aggregarsi e in vivo porta alla formazione delle placche senili) e al dominio intracellulare APP (AICD).

La maggior parte dei peptidi A $\beta$  prodotti è costituita da 40 residui amminoacidici (A $\beta$  1–40), mentre una piccola percentuale ne contiene 42 (A $\beta$  1–42). A $\beta$  1–42 è considerata la forma con maggiore potenziale neurotossico poiché la presenza di due amminoacidi extra facilita il ripiegamento scorretto

del peptide e determina una maggiore tendenza all' aggregazione: elevati livelli plasmatici di A $\beta$  1–42 sono stati infatti correlati con AD (52, 53).

Il *processo non amiloidogenico* comporta il taglio di APP da parte dell' $\alpha$ -secretasi all'interno del dominio A $\beta$  (precisamente tra i residui Lisina 16 e Leucina 17) evitando la formazione di un frammento A $\beta$  integro e portando al rilascio nello spazio extracellulare o luminale di un frammento di APP solubile chiamato sAPP $\alpha$ . Il rimanente frammento ancorato alla membrana chiamato APP  $\alpha$ -CTF, può essere ulteriormente processato dalla  $\gamma$ -secretasi al fine di generare AICD ed un peptide p3 che viene rapidamente degradato (53).



**Figura 10- Processamento proteolitico della proteina APP (Amyloid Precursor Protein) (53).** (A) Struttura schematica della proteina APP: il dominio A $\beta$  evidenziato in rosso ed ingrandito con indicati i siti di taglio di  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ -secretasi. (B) Pathway di processamento non amiloidogenico di APP da parte di  $\alpha$ - e  $\gamma$ -secretasi. (C) Pathway di processamento amiloidogenico di APP dovuto al taglio sequenziale di  $\beta$ - e  $\gamma$ -secretasi.

Più di 30 mutazioni di APP sono state identificate in 85 famiglie con casi di AD. Mutazioni di APP sono correlate al 10-15% dei casi di early-onset AD familiare (EOFAD). La maggior parte delle mutazioni di APP è localizzata nei siti di taglio della secretasi o nel dominio transmembrana tra gli esoni 16 e 17 ed alterano il processo di taglio proteolitico di APP portando all'alterazione della ratio A $\beta$ 42/ A $\beta$ 40 attraverso aumento della produzione del peptide A $\beta$ 42 neurotossico o riduzione di A $\beta$ 40 (54).

## **2) Preseniline**

Le preseniline sono proteine transmembrana che fanno parte del core catalitico della  $\gamma$ -secretasi (GSC) e si ritiene che abbiano un ruolo chiave nella regolazione della proteolisi di APP.

Mutazioni in PSEN1 e PSEN2 sono state identificate nei casi di EOFAD.

Circa il 70% di tutte le mutazioni dei geni PSEN1 e 2 sono state rilevate in singoli pazienti o famiglie e non in altri pazienti appartenenti a differenti famiglie; questo rende difficile lo screening delle mutazioni nei nuovi pazienti.

Presenilina 1 e Presenilina 2 sono per il 67% identiche e sono ubiquitariamente espresse nel cervello e in altri tessuti: la funzione fisiologica è ad oggi ignota (55).

- **Presenilina 1 (PSEN1)**

PSEN1, gene della presenilina 1 localizzato sul cromosoma 14, codifica per una proteina di membrana che forma il core catalitico del complesso della  $\gamma$ -secretasi.

PSEN1, nicastrin (Nct), anterior pharynx defective 1 (Aph-1) e presenilin enhancer 2 (PSENEN) sono necessari per la stabilità ed il funzionamento del complesso  $\gamma$ -secretasi, proteasi integrale di membrana che taglia numerosi tipi di proteina transmembrana di tipo 1 tra cui APP e Notch.

Sono state riportate più di 176 mutazioni di PSEN1 in 390 famiglie e la maggior parte di esse è rappresentata da mutazioni missenso che determinano la sostituzione di amminoacidi nella presenilina 1. Mutazioni in PSEN1 sono la causa più comune di EOFAD con mutazioni missenso di PSEN1 riscontrate nel 18%- 50% dei casi di EOFAD autosomica dominante; sono responsabili delle forme più severe di AD, con penetranza completa ed esordio precoce attorno ai 30 anni. Tuttavia, vi è un'ampia variabilità nell'età di esordio poiché altri casi di AD associati a PSEN1 hanno un'età media di esordio superiore a 58 anni

Le mutazioni determinano la produzione di una presenilina difettiva che interferisce con il funzionamento della  $\gamma$ -secretasi con conseguente alterazione del processamento di APP ed over-produzione di un peptide A $\beta$  amiloide più lungo e tossico (A $\beta$ 42) (2).

- **Presenilina 2 (PSEN2)**

PSEN2 gene della presenilina 2 localizzato sul cromosoma 1, così come PSEN1, codifica per una proteina di membrana che forma il core catalitico del complesso della  $\gamma$ -secretasi.

Le mutazioni associate a PSEN2 sono state correlate all'aumento della ratio A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 nei topi e nell' uomo ma diversamente da quanto accade con mutazioni in PSEN1, rappresentano una causa rara di EOFAD.

Le caratteristiche cliniche delle famiglie affette da PSEN2 sembrano differire dalle caratteristiche cliniche delle famiglie affette da PSEN1 in quanto l'età di insorgenza in questi soggetti è generalmente più avanzata (45-88 anni) rispetto ad alcuni membri della famiglia con mutazioni PSEN1 (25- 65 anni).

Le mutazioni missenso nel gene PSEN2 probabilmente presentano una minore penetranza rispetto a quelle del gene PSEN1 e dunque PSEN2 sembra essere soggetto all' azione modificante di altri geni o influenze ambientali.

La funzione e l'importanza biologica delle diverse varianti di presenilina sono ancora poco conosciute ma la diversa espressione delle differenti isoforme della proteina determinano cambiamento nella regolazione del processo proteolitico di APP (2).

Tra i geni associati al rischio di sviluppo della forma sporadica di AD vi è l'ApoE.

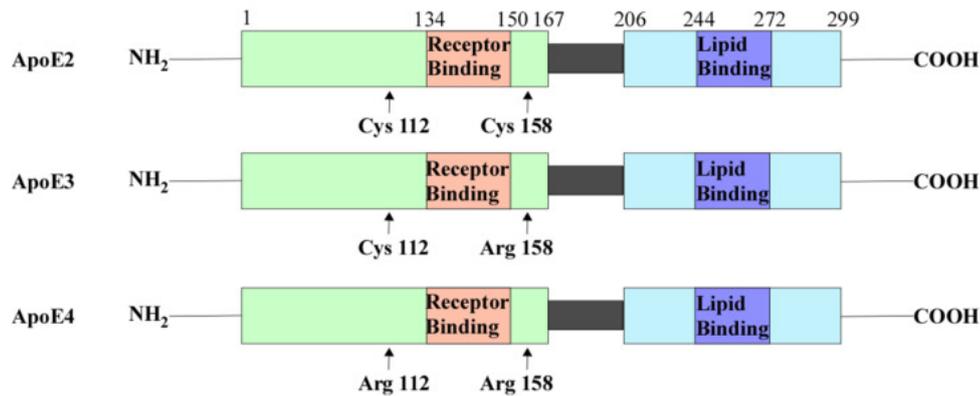
L' ApoE localizzato sul cromosoma 19 è un gene polimorfo con tre differenti alleli -  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  e  $\epsilon 4$ - in un singolo locus genico. I tre alleli di ApoE sono distinti in base a polimorfismi a singolo nucleotide, rs429358 e rs7412, nell'esone 4 del gene che determinano transizione C/T in due posizioni dell'esone 4 di apoE e sostituzione cisteina/arginina nei residui 112 e 158 della proteina ApoE matura.

Tre sono le isoforme proteiche risultanti dai SNPs (Figura 11):  $\epsilon 3$ , principale isoforma di ApoE, contiene cisteina ed arginina in posizione 112 e 158;  $\epsilon 2$  contiene solo residui di cisteina nelle due posizioni e  $\epsilon 4$  solo residui di arginina (2).

L'apolipoproteina E svolge un ruolo chiave nel trasporto e metabolismo dei trigliceridi e colesterolo in diversi distretti corporei.

Nel SNC la ApoE è secreta dagli astrociti e cellule della microglia e trasporta lipidi essenziali ai neuroni, attraverso recettori specifici che legano l'apolipoproteina (56).

Nel cervello, il colesterolo e i lipidi sono necessari per mantenere la plasticità neuronale che richiede riparazione e rimodellamento delle membrane, biogenesi degli organelli e sinaptogenesi. ApoE svolge quindi un ruolo essenziale attraverso la formazione di particelle lipoproteiche in questo distretto e regola più in generale il metabolismo lipidico all'interno del SNC; è inoltre coinvolta nell'immunomodulazione, nella trasduzione del segnale, nella regolazione della proteostasi e nella plasticità sinaptica (57).



**Figura 11- Isoforme di ApoE (58).** L'apolipoproteina E (ApoE) presenta un dominio N-terminale contenente la regione di legame al recettore ed un dominio C-terminale contenente la regione di legame ai lipidi. Esistono tre isoforme di ApoE: ApoE2, ApoE3, ApoE4. ApoE2 contiene residui di cisteina (Cys) nelle posizioni 112 e 158; ApoE3 contiene cisteina (Cys) in posizione 112 e arginina (Arg) in posizione 158; ApoE4 contiene arginina (Arg) in entrambe le posizioni

Il genotipo ApoE  $\epsilon$ 4 è stato associato con un più elevato rischio di AD: allele ApoE  $\epsilon$ 4 (Arg112/Arg158) aumenta il rischio di sviluppare late-onset AD (LOAD) di 3,7 volte se presente in singola copia o di 12 volte se presente in doppia copia rispetto al genotipo  $\epsilon$ 3/ $\epsilon$ 3 (Cys112/Arg158) (59).

L'isoforma ApoE  $\epsilon$ 4 è più suscettibile alla degradazione intracellulare in astrociti e neuroni, è presente in minor quantità nel SNC e nel liquido cefalorachidiano e trasporta colesterolo e lipidi con minore efficienza.

I meccanismi alla base della patogenicità di ApoE  $\epsilon$ 4 non sono stati ancora ben compresi ma se ne ipotizzano vari: la tossicità propria dell'isoforma, aggregazione amiloide e iperfosforilazione di tau mediate da ApoE  $\epsilon$ 4 (60).

La maggior parte delle ricerche del ruolo di ApoE in AD si è focalizzata su come le varie isoforme vadano ad interagire con il pathway dell'amiloide: evidenze crescenti suggeriscono che l'effetto di ApoE  $\epsilon 4$  si espliciti attraverso l'inibizione della clearance dell'amiloide  $\beta$  e attraverso la promozione della sua aggregazione (61).

Numerosi studi hanno inoltre evidenziato che APOE- $\epsilon 4$  è implicato in altri processi patologici dell'AD e indipendenti dall'accumulo di A $\beta$ , tra cui neuroinfiammazione, neurodegenerazione e ipometabolismo della corteccia medio-temporale.

Uno studio recente ha indagato l'associazione tra questo fattore di rischio genetico e l'accumulo di proteina tau indipendentemente dall'accumulo di A $\beta$ .

La ricerca ha coinvolto circa 500 soggetti tra sani, con declino cognitivo lieve o AD provenienti da 2 coorti indipendenti, sottoposti a PET per tau e A $\beta$  e analisi del genotipo ApoE. I risultati hanno evidenziato che, in entrambe le coorti, i carrier (portatori dell'allele  $\epsilon 4$ ) presentano un aumento della concentrazione di proteina tau a livello dell'area medio-temporale rispetto ai non-carrier, indipendentemente da A $\beta$ , età, sesso e status clinico.

Secondo gli autori, questi dati suggeriscono che l'aumento del rischio di sviluppare AD nei carriers potrebbe essere associato a meccanismi legati sia alla proteina A $\beta$  che a tau ma indipendenti tra loro (62).

Negli ultimi anni gli sforzi si sono concentrati sulla conduzione di studi di associazione a livello di genoma (genome-wide association study, o GWAS) per identificare nuovi geni di rischio per LOAD.

Rapporti meta-analitici a più stadi, di diversi gruppi, hanno documentato l'associazione tra AD e polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs) in dieci geni.

I geni identificati come potenzialmente coinvolti nella patogenesi di AD sono ABCA7, BIN1, TREM2, CD33, CLU, CR1, EPHA1, MS4A, CD2AP e PICALM e vengono classificati in base al coinvolgimento in diversi pathways cellulari:

- 1- Risposta immunitaria ed infiammazione: CR1, MS4 famiglia A, EPHA1, CD33, TREM;
- 2- Metabolismo lipidico CLU e ABCA7;
- 3- Endocitosi e funzionalità sinaptica PICALM, BIN1, CD2AP e EPHA19.

È stato ipotizzato che i SNPs identificati mediante GWAS nei geni sopracitati siano in grado di influenzare i pathways cellulari nei quali i geni sono

coinvolti ed essere causa di AD, tuttavia, l'esatto meccanismo di azione non è ancora stato chiarito: è possibile che non tutti i pathways siano alterati in ciascun caso di LOAD ed inoltre i collegamenti tra i diversi pathways devono essere ancora identificati (63).

## **1.9 Fattori di rischio**

L' Alzheimer è considerata una malattia multifattoriale associata a numerosi fattori di rischio (figura 12).

I fattori di rischio associati alla malattia di Alzheimer possono essere divisi in due categorie: fattori di rischio *non modificabili* e fattori di rischio *modificabili*.

Mentre sui primi non è possibile agire, sui secondi è possibile intervenire ottenendo dei significativi risultati sul piano clinico (64).

### **1.9.1 Fattori di rischio non modificabili**

- Età: considerata il principale fattore di rischio per il declino cognitivo, tuttavia la demenza non è una naturale o inevitabile conseguenza dell'invecchiamento (65);

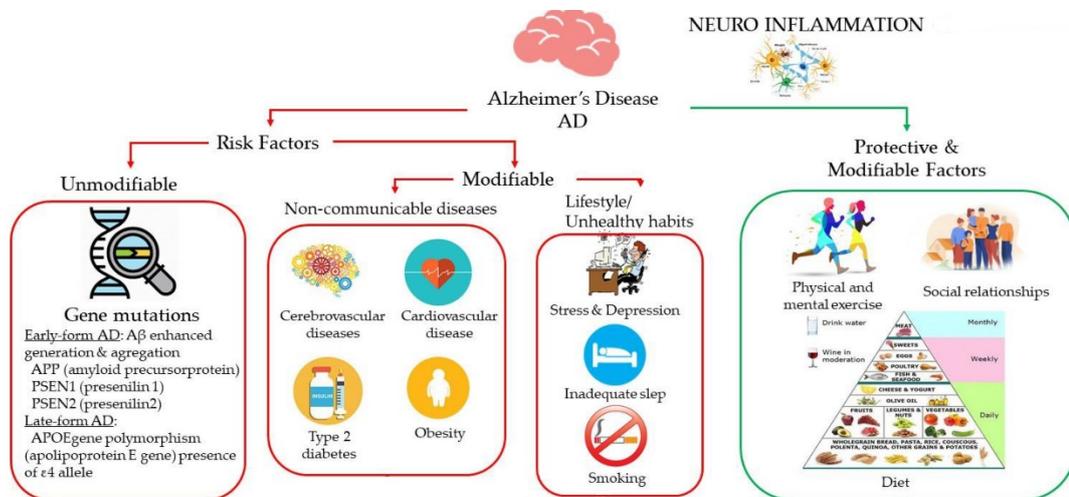
- **Familiarità:** la familiarità, ovvero la presenza di una o più persone affette in una famiglia, aumenta la probabilità di contrarre la malattia anche negli altri familiari. La presenza di questo fattore di rischio non sta a significare che il familiare di un soggetto malato svilupperà sicuramente la malattia, ma che la sua probabilità di svilupparla sarà leggermente superiore rispetto al resto della popolazione;
- **Genetica:** svolge un ruolo cruciale nella malattia, tuttavia, le mutazioni a carico di geni che regolano la produzione di A $\beta$  permettono di spiegare solamente una piccola percentuale dei casi di early-onset AD; le mutazioni del gene ApoE identificato come principale fattore di rischio per la LOAD, che rappresenta il 95% dei casi di AD, non permettono di spiegarne interamente la patogenesi e gli altri locus genici identificati, singolarmente, non rappresentano fattori di rischio per la malattia (66).
- **Genere:** maggior rischio associato al sesso femminile (64).

### *1.9.2 Fattori di rischio modificabili*

- **Condizioni cliniche:** obesità, diabete di tipo 2, ipertensione, dislipidemia, depressione, malattie cerebrovascolari (infarto

emorragico, ictus ischemico, vasculopatie, alterazioni nella sostanza bianca cerebrale), traumi cerebrali, malattia coronarica etc. (67,68);

- Fattori ambientali: esposizione a metalli pesanti, inquinamento, agenti chimici etc. (69);
- Stile di vita: attività fisica, alimentazione, qualità del sonno, stress, consumo di alcool, fumo, isolamento sociale, bassa scolarità etc. (67,68).



**Figura 12- Rappresentazione dei fattori di rischio, modificabili e non modificabili, associati alla malattia di Alzheimer (33).**

Negli ultimi anni un crescente numero di studi epidemiologici ha documentato il ruolo cruciale dell'alimentazione e dei cambiamenti metabolici ad essa connessi nelle alterazioni cerebrali: sebbene non ci siano

studi clinici che abbiano ancora identificato ciascun singolo componente alimentare come causa o terapia, le abitudini alimentari, in una complessa sinergia, sembrano essere in grado di influenzare il rischio, l'esordio e la progressione di AD (70).

L'alimentazione, infatti, sembra svolgere un ruolo chiave nella modulazione dello stress ossidativo, dell'infiammazione, della plasticità sinaptica, dell'amiloidogenesi e della neurogenesi, tutti processi fondamentali nella patogenesi dell'Alzheimer (71).

La dieta occidentale, per esempio, caratterizzata da un elevato contenuto di zuccheri semplici a discapito di carboidrati complessi, elevato contenuto di sale, acidi grassi saturi, acidi grassi trans e colesterolo, basso contenuto di fibra, basso contenuto di acidi grassi mono- e poli-insaturi tra cui omega-3, -6 e -9 con effetto antinfiammatorio, vitamine e minerali sembra avere una forte correlazione con lo sviluppo di AD infatti:

- 1) porta allo sviluppo della sindrome metabolica che include ipercolesterolemia, obesità, steatosi epatica non alcolica, infiammazione sistemica di basso grado;
- (2) induce processi neuro infiammatori attraverso iperattivazione delle cellule della glia;
- (3) stimola l'accumulo A $\beta$  nel cervello di pazienti AD.

Per questi motivi la dieta occidentale potrebbe essere considerata un importante fattore di rischio modificabile per lo sviluppo di AD mentre una dieta sana e bilanciata, il regolare controllo dello stato metabolico potrebbero rappresentare metodi efficienti per la prevenzione dell'AD e potrebbero supportare il trattamento di pazienti dopo la diagnosi di malattia (71).

In questo contesto, è stato mostrato che l'aderenza alla dieta mediterranea, un ridotto consumo di alcool, un alto consumo di acidi grassi polinsaturi e vitamine sono associati ad un minor rischio di sviluppare AD: sembra che i componenti alimentari esercitino un effetto neuroprotettivo attraverso attività antiossidante, riduzione della disfunzione mitocondriale, riduzione della deposizione amiloide, soppressione della neuroinfiammazione e regolazione dei pathways di segnalazione cellulare (72).

Sono tuttavia necessari ulteriori studi per trovare il corretto collegamento tra il consumo di nutrienti specifici, modelli dietetici ed un rischio ridotto di sviluppare AD.

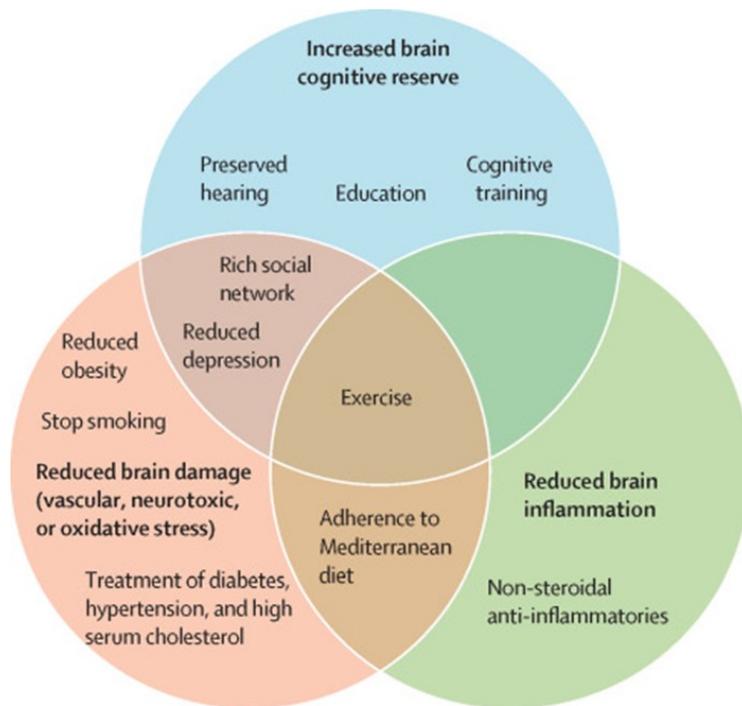
Diversamente dall'età e dai fattori di rischio genetici, non modificabili, i fattori di rischio modificabili, se controllati e/o gestiti, sembrano essere associati ad un minor rischio di declino cognitivo e demenza (73): studi recenti hanno stimato che l'intervento sui diversi fattori di rischio modificabili potrebbe prevenire fino al 35% dei casi di demenza (48).

La gestione della dieta, dell'esercizio fisico e del rischio vascolare nella popolazione anziana a rischio sembra, infatti, prevenire il declino cognitivo e la demenza. Tuttavia, i cambiamenti in queste abitudini dovrebbero essere fatti al più presto nella vita prima dell'esordio dei sintomi della malattia poiché, successivamente, la modifica dello stile di vita potrebbe non rallentare la conversione del MCI in demenza da AD sebbene possa migliorare il decorso della malattia (68).

Ulteriori studi clinici sono necessari prima di poter giungere a conclusioni definitive riguardo l'intervento sui potenziali fattori di rischio modificabili per ridurre il rischio dell'incidenza del declino cognitivo e della demenza (74).

Sebbene l'esistenza di potenziali fattori di rischio modificabili non significa che tutti i casi di demenza siano prevenibili o che li renda più facilmente gestibili dopo essere stati diagnosticati, è comunque fortemente raccomandato il cambiamento dello stile di vita ed il controllo delle comorbilità sia per la prevenzione sia per il miglioramento dei sintomi clinici di AD poiché la maggior parte di queste azioni andrà comunque a beneficiare lo stato di salute generale (48) (figura 13).

Prevenire è sempre meglio che curare: qualsiasi possibile farmaco che in futuro si spera andrà a modificare il decorso della patologia di AD non escluderà mai il bisogno di prevenire la malattia.



*Figura 13- Sommario dei potenziali meccanismi di prevenzione della malattia di Alzheimer (48).*

## **Capitolo II**

### **EPIGENETICA**

#### ***2.1 Definizione***

La maggior parte dei casi di AD si presenta in forma sporadica ed è il risultato della combinazione di fattori ambientali/ stile di vita e geni di suscettibilità attraverso meccanismi che ad oggi non sono stati interamente compresi.

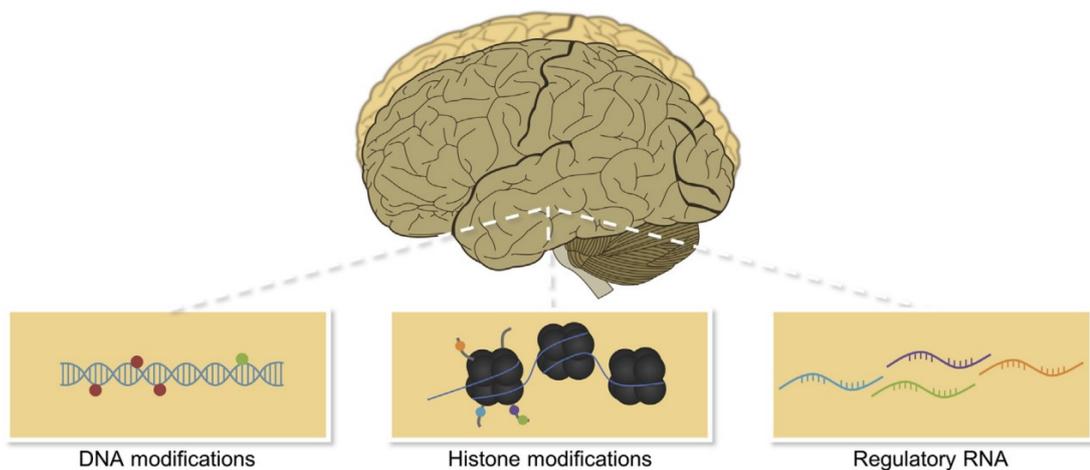
La non comprensione di come l'ambiente possa influenzare l'organismo e lo sviluppo della malattia rende difficile la scoperta delle terapie (75).

Studi recenti suggeriscono che fattori ambientali e stile di vita potrebbero contribuire alla neurodegenerazione attraverso l'induzione di modificazioni epigenetiche che potrebbero, a loro volta, determinare alterazione dell'espressione genica: 'l'anello mancante' tra i fattori di rischio modificabili e non modificabili nelle forme sporadiche di neurodegenerazione, potrebbe dunque essere l'epigenetica (76). Il termine Epigenetica venne coniato per la prima volta da Conrad Waddington nel 1942 e ad oggi è definita come lo studio di molecole e meccanismi biologici responsabili della regolazione alternativa dei geni senza modificare la sequenza del DNA (77).

## 2.2 Meccanismi di regolazione epigenetica

I meccanismi epigenetici sono in grado di regolare, in maniera dinamica e reversibile, la replicazione e la riparazione del DNA, la trascrizione dell'RNA e la conformazione della cromatina, processi che a loro volta influenzano la regolazione della trascrizione e della traduzione delle proteine e si ritiene che siano coinvolti nella patogenesi di AD (78).

Sebbene numerosi fenomeni siano stati inclusi tra i meccanismi epigenetici, una chiara definizione di epigenetica ancora non esiste. Solitamente si conviene che le principali modificazioni epigenetiche siano (Figura 14): la metilazione del DNA, le modificazioni degli istoni (acetilazione, metilazione, fosforilazione ed ubiquitinazione), i non-coding RNA (79).



**Figura 14- Meccanismi epigenetici potenzialmente coinvolti nell' Alzheimer (79):** modificazioni del DNA in particolare metilazione; modificazioni istoniche; non-coding RNA.

### ***2.2.1 Metilazione del DNA***

La metilazione del DNA è la modificazione epigenetica meglio caratterizzata e consiste nell'aggiunta di un gruppo metile al carbonio-5 di un residuo di citosina presente nella sequenza di DNA da parte di DNA- metiltransferasi.

Nei mammiferi, la metilazione del DNA avviene prevalentemente nei siti CpG, dove un nucleotide citosina è seguito da un nucleotide guanina.

I siti CpG possono essere presenti in concentrazioni di diverse centinaia di ripetizioni dinucleotidiche, chiamate isole CpG, che si trovano solitamente a livello dei promotori dei geni.

La metilazione sembra svolgere un ruolo nel regolare l'espressione genica: un maggiore livello di metilazione a carico dei promotori genici sembra correlarsi con un silenziamento o una riduzione dell'espressione genica. Tipicamente se la metilazione ha il ruolo di 'spegnere' i geni, la demetilazione ha il ruolo di attivarli.

La metilazione è nota svolgere un ruolo chiave nel normale sviluppo, nella proliferazione cellulare e nella stabilità genomica (78).

Numerosi studi epigenetici nell' AD sono stati condotti per valutare il livello globale di metilazione ottenendo risultati differenti: alcuni studi hanno identificato ipometilazione associata alla malattia, altri hanno riscontrato ipermetilazione, altri ancora non hanno trovato cambiamenti nei campioni

AD. Queste discrepanze sono dovute al fatto che studi differenti hanno valutato regioni cerebrali distinte e/o diverse forme di AD (79).

Inoltre, l'uso di topi transgenici come modello per lo studio della patogenesi di AD non è in grado di replicare quella della AD umana, ancor più non è in grado di rappresentare il profilo epigenetico possibile dell'AD umana (80).

Nonostante i risultati contrastanti, negli studi di associazione epigenome-wide è stato visto che le alterazioni della metilazione del DNA nel tessuto cerebrale di individui affetti da AD sono frequentemente localizzate al di fuori dei promotori genici (e quindi delle isole CpG): nei neuroni umani gran parte della metilazione avviene nei siti non CpG ma il ruolo di questa metilazione “non canonica” non è ancora stato ben chiarito (81).

Recentemente in uno studio internazionale è stato osservato per la prima volta in campioni umani, come l'alterazione del gene PSEN1 dipenda dalla metilazione ‘non-CpG’, una modificazione epigenetica in grado di lasciare una specifica ‘impronta’ e attivare una serie di meccanismi molecolari che inducono la sovraespressione del gene.

L'ipometilazione e la conseguente sovraespressione di PSEN1 oltre che nel tessuto cerebrale umano, è stata rilevata anche nei campioni di sangue periferico di soggetti affetti da AD portando ad ipotizzare che la metilazione non CpG (ipo) potrebbe offrire un nuovo modo di diagnosticare precocemente

e poco invasivamente AD ed essere anche un punto di partenza per lo sviluppo di nuove terapie (82).

### ***2.2.2 Modificazioni istoniche***

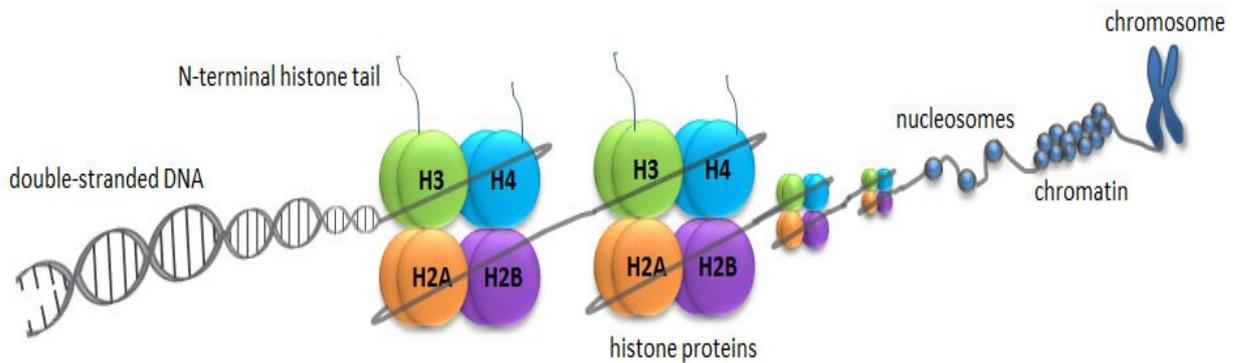
L'architettura della cromatina, il posizionamento dei nucleosomi e per ultimo l'accesso al DNA per la trascrizione genica sono controllati dalle proteine istoniche.

Gli istoni sono proteine che interagiscono con il DNA, formando i nucleosomi, e regolano il livello di impacchettamento della cromatina (Figura 15).

I nucleosomi rappresentano l'unità base della cromatina e sono formati da ottameri che contengono due copie di ciascuna delle quattro proteine istoniche: H2A, H2B, H3 e H4.

Le proteine istoniche possono subire, al livello della coda N-terminale, modifiche post-traduzionali tra cui: acetilazione, metilazione, fosforilazione, ubiquitinazione e citrullinazione.

La presenza o l'assenza di queste modificazioni influenzano la struttura e l'accessibilità della cromatina regolando trascrizione, replicazione, riparazione e ricombinazione del DNA (79).



**Figura 15: Rappresentazione schematica dell'organizzazione e dell'impacchettamento del materiale genetico (83).** I nucleosomi sono costituiti dal DNA (in grigio) avvolto attorno ad otto proteine istoniche H2A, H2B, H3 e H4. Le code N-terminali degli istoni sono riportate in blu.

Un gran numero di studi ha mostrato evidenze dell'importanza delle modificazioni istoniche nella plasticità neuronale, nell'apprendimento e nella memoria: ciò ha portato ad ipotizzare il loro coinvolgimento nella malattia di Alzheimer; tuttavia un ridotto numero di studi si è focalizzato sui cambiamenti delle modificazioni istoniche in AD mentre la maggior parte ha valutato semplicemente i cambiamenti globali (79).

- **Fosforilazione istonica**

La fosforilazione degli istoni avviene in maniera predominante, ma non esclusiva, all'N-terminale della coda istonica a livello dei residui di serina, treonina e tirosina. Il livello delle modificazioni è controllato da chinasi e fosfatasi che aggiungono o rimuovono rispettivamente il gruppo fosfato.

Le chinasi determinano quindi l'aggiunta di una carica negativa all'istone influenzando la struttura cromatinica (84).

La fosforilazione degli istoni riduce la loro carica positiva e di conseguenza la loro affinità per il DNA presumibilmente facilitando l'espressione genica.

Gli studi riguardo la fosforilazione istonica, finora, si sono concentrati sull'istone H3 ma non ci sono ancora evidenze univoche in merito al livello della sua fosforilazione in AD (79).

- **Metilazione istonica**

La metilazione istonica è definita come trasferimento di uno, due o tre gruppi metile dalla S-adenosil-L-metionina ai residui di lisina o arginina delle proteine istoniche da parte dell'istone metiltransferasi (HMTs). Nel nucleo cellulare, quando avviene la metilazione degli istoni, specifici geni posti all'interno del tratto di DNA complessato con gli istoni possono essere attivati o inattivati (85).

Anche per la valutazione del livello di metilazione istonica, gli studi si sono concentrati sui siti di modificazione post traduzionale dell'istone H3, tra cui le lisine 9 e 27 (H3K9 e H3K27) siti generalmente correlati all'inattivazione genica: aumentati livelli di lisina 9 dimetilata (H3K9me2) sono stati osservati in campioni postmortem di corteccia occipitale di pazienti AD rispetto ai controlli (86); aumentati livelli di lisina 9 trimetilata (H3K9me3) sono stati

osservati in studi nei quali sono stati confrontati campioni di corteccia cerebrale ed ippocampo di gemelli monozigoti con e senza AD (87).

- **Acetilazione istonica**

L'acetilazione istonica è una reazione nella quale un gruppo acetile viene generalmente aggiunto ai residui di lisina presenti all' N-terminale delle code istoniche. È regolata da due tipi di enzimi: istone acetiltransferasi (HATs) ed istone deacetilasi (HDACs).

Le HATs sono responsabili dell'acetilazione e determinano l'apertura della cromatina favorendo il reclutamento di fattori di trascrizione e co-attivatori necessari per l'attività trascrizionale.

Al contrario, le HDACs rimuovono l'acetile determinando impacchettamento della cromatina ed inattivazione trascrizionale.

Riguardo i cambiamenti dei livelli di acetilazione in AD, gli studi presenti in letteratura riportano risultati contrastanti ed è da aggiungere che le modificazioni post-traduzionali degli istoni si alterano rapidamente dopo la morte dell'individuo (88).

Alcuni studi recenti hanno mostrato che gli inibitori delle HDACs hanno un effetto neuroprotettivo in quanto ripristinano il deficit dell'apprendimento e della memoria nei modelli di topo AD; mentre l'incremento dell'acetilazione istonica sembra essere coinvolta nella patogenesi di AD (89).

Nonostante diversi studi abbiano mostrato che gli HDACs inibitori hanno proprietà neuroprotettive in topi modello di AD, tuttavia la specifica azione delle HDACs nelle malattie neurodegenerative è tutt'ora poco conosciuta e ad oggi solamente pochi pan-inibitori di HDACs sono stati utilizzati in studi preclinici.

Sarebbe necessario chiarire il ruolo di ciascuna HDACs in AD per poter sviluppare inibitori specifici da poter utilizzare nel trattamento della demenza: non c'è alcun dubbio che gli inibitori delle HDACs rappresentino una promessa per lo sviluppo di strategie terapeutiche per la malattia di Alzheimer e l'alterazione della memoria ed apprendimento associate.

Identificare il ruolo è fondamentale per lo sviluppo di inibitori specifici di HDACs volti alla cura di AD. L'aumento della specificità per le isoforme degli inibitori delle HDACs potrebbe aumentare l'efficienza nel ripristino del deficit cognitivo nei modelli AD (90).

Le altre modificazioni istoniche sono state meno studiate. Complessivamente ci sono crescenti evidenze che mostrano cambiamenti delle modificazioni istoniche nel cervello AD ed un gran numero di studi ha ipotizzato che utilizzare questi cambiamenti come target potrebbe rappresentare una promettente strategia terapeutica. Tuttavia, ancora manca una chiara

comprensione dei cambiamenti gene-specifici e sono necessari ulteriori studi (79).

### **2.2.3 *Non- coding RNA***

Nonostante si sia creduto in passato che il genoma umano fosse costituito prevalentemente da DNA ‘non funzionale’, in realtà si è scoperto che quasi l’intero genoma viene trascritto ma solo circa il 2% è tradotto in proteine. Gran parte di questi trascritti, non codificanti proteine, vengono processati con rilascio di piccoli o lunghi RNA (ncRNA) con funzione regolatoria: attraverso il riconoscimento di sequenze specifiche su molecole di RNA o DNA modulano struttura, splicing, stabilità, trascrizione e traduzione dell’RNA così come la struttura della cromatina (91).

I ncRNA, in base alla lunghezza, vengono classificati in short non-coding RNA (sncRNA) e long non-coding RNA (lncRNA).

Gli sncRNA, di lunghezza inferiore ai 200 nucleotidi (nt), possono essere ulteriormente divisi in tre classi: microRNA (miRNA) molecole singolo filamento di 20-22 nt; short interfering RNA (siRNA) molecole doppio filamento di circa 21-24 nt; piwi-interacting RNA, 24–31 nt, in grado di formare complessi con le proteine Piwi appartenenti alla famiglia delle Argonaute (AGO) (92).

I microRNA negli ultimi anni hanno acquisito grande interesse poiché un numero sempre maggiore di evidenze ha rilevato un loro importante ruolo nei processi cerebrali ed è stata avanzata l'ipotesi che potessero essere coinvolti nelle malattie neurodegenerative tra cui AD.

Anche per i lncRNA, generalmente definiti come trascritti di lunghezza maggiore di 200 nucleotidi che non vengono tradotti in proteine, è stato ipotizzato un ruolo fisiopatologico nell' AD ma un numero ridotto di studi è stato condotto per chiarirne il reale coinvolgimento (79).

## Capitolo III

### MICRORNA

#### *3.1 Biogenesi, meccanismo d'azione e funzioni*

I microRNA, scoperti nel 1990 (93), sono piccole molecole endogene di RNA non codificanti proteine.

Vengono trascritti da regioni sia intergeniche che intrageniche del genoma, generalmente dalla RNA polimerasi II (Pol II), sebbene una piccola parte sia trascritta dalla RNA polimerasi III (figura 16): il primo prodotto della trascrizione è un lungo trascritto primario con struttura ad *hairping* chiamato pri-miRNA.

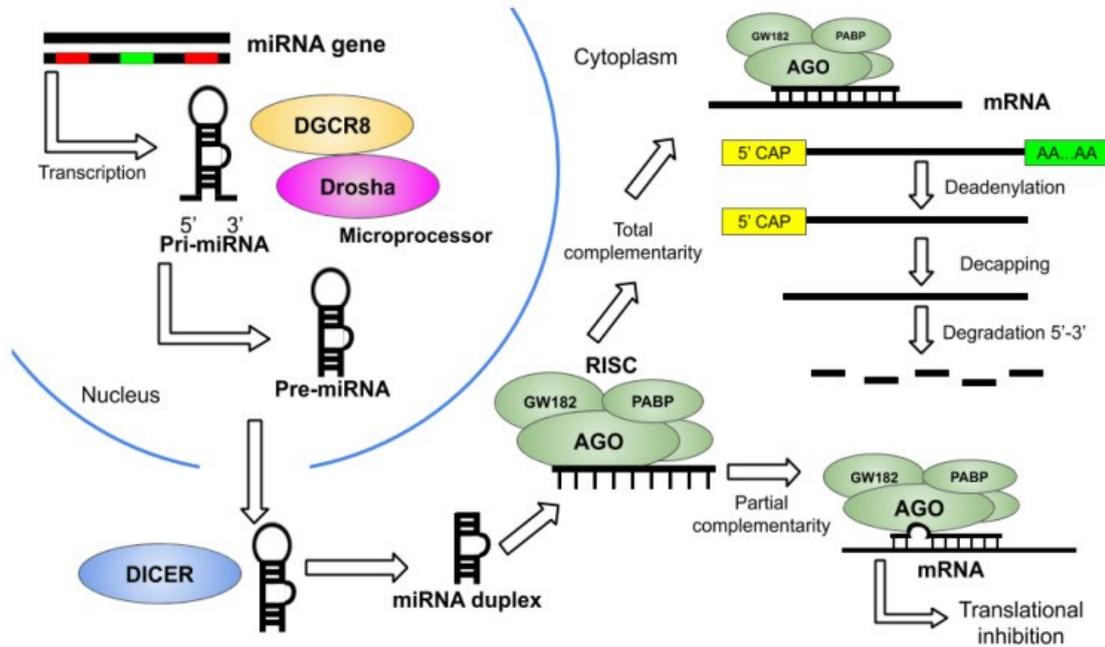
Il pri-miRNA viene processato nel nucleo da un complesso chiamato 'microprocessore' che comprende una RNAsi di tipo III, DROSHA, una double-stranded RNA-binding protein (RBP) DGCR8 (DiGeorge syndrome critical region 8 gene) ed altre proteine accessorie: il processamento nucleare porta alla produzione di un precursore stem-loop di ~70 nucleotidi (nt), chiamato pre-miRNA (94).

Il pre-miRNA viene esportato nel citoplasma in un processo (RAN-GTP dipendente) che coinvolge il trasportatore nucleo-citoplasmatico Exportina-5, il quale riconosce nucleotidi sporgenti al 3' lasciati dall'enzima Drosha (95). Nel citoplasma il pre-miRNA viene ulteriormente processato da un'altra RNA

polimerasi III, DICER, che associata a *dsRNA-binding proteins* rilascia un miRNA maturo di ~21-25 nt duplex.

Il microRNA duplex (dsRNA) viene legato ad una proteina Argonaute (AGO) a formare un complesso effettore, il RISC (*RNA-induced silencing complex*): all' interno del complesso uno dei due filamenti del duplex viene degradato (filamento passeggero) mentre l'altro costituisce il miRNA maturo (filamento guida) (96).

Una volta inserito nel RISC, il microRNA maturo che contiene una regione all' estremità 5' chiamata '*seed region*' (nucleotidi dal 2° all' 8°), è in grado di appaiarsi a sequenze complementari presenti nella regione 3'-UTR (*3' untranslated region*) degli mRNA target: l'appaiamento, generalmente parziale, determina regolazione negativa dell'espressione genica attraverso destabilizzazione/degradazione del trascritto o inibizione della traduzione. Generalmente, ogni miRNA può regolare centinaia di geni target e si ipotizza che più di un terzo di tutti i geni umani siano regolati dai miRNA (97).



**Figura 16- Biogenesi dei miRNA, Via canonica (98).** I pri-miRNA sono trascritti nel nucleo da specifici geni e trasformati in pre-miRNA da un complesso chiamato ‘microprocessore’ formato da DGCR8 e Drosha. I pre-miRNA vengono trasferiti nel citoplasma dove Dicer rimuove il loop presente nelle molecole formando miRNA doppio filamento che vanno a formare il complesso RISC legandosi alla proteina AGO. I miRNA nel complesso RISC andranno a svolgere la loro funzione appaiandosi a mRNA target: se la complementarietà è completa, l’ mRNA target viene deadenilato, privato del CAP e completamente degradato; se la complementarietà è parziale, viene ridotta o inibita la traduzione dell’ mRNA target e eventualmente indotta la sua degradazione.

Oltre questo pathway canonico di biogenesi dei miRNA che prevede due fasi di taglio dei precursori, una nucleare ed una citoplasmatica, sono possibili percorsi di sintesi alternativi che presuppongono un numero diverso di eventi di taglio ed altri enzimi chiave: il meccanismo attraverso il quale i precursori dei miRNA vengono indirizzati a pathways di biogenesi differenti non è chiaro ma probabilmente dipende dal sito di origine del miRNA, dalla sua sequenza e dalla termostabilità (99).

I miRNA sono risultati coinvolti in tutti i processi cellulari tra cui la proliferazione, differenziamento e morte cellulare, metabolismo cellulare, risposta immunitaria sia in condizioni fisiologiche che patologiche tanto che fin dalla loro scoperta sono stati studiati sia come potenziali biomarkers di una grande varietà di patologie sia come target di trattamenti farmacologici. I miRNA, infatti, sebbene siano instabili sono stati rilevati nei fluidi corporei (es. sangue, saliva, urina, liquido cerebrospinale etc.) ed hanno caratteristiche desiderabili per la messa a punto di farmaci: (1) un singolo miRNA down-regola centinaia di target attraverso il legame al 3'-UTR; (2) sono corte molecole di ~22 nucleotidi per le quali possono essere prodotti facilmente farmaci; (3) sono spesso conservati nelle diverse specie; (4) i farmaci per i miRNA possono essere facilmente trasportati in vivo attraverso numerosi sistemi di trasporto che sono stati già approvati per l'uso umano (97).

### ***3.2 MicroRNA nella malattia di Alzheimer***

Circa il 70% dei miRNA annotati in banche dati sono stati identificati nel cervello (100) dove hanno un ruolo essenziale in tutte le funzioni cerebrali come la neurogenesi, lo sviluppo neuronale e la plasticità sinaptica.

Sono anche implicati in disordini neurologici e neurodegenerativi (101), infatti l'alterazione della regolazione dei miRNA porta alla deregolazione dei pathways di segnalazione e dei meccanismi molecolari fisiologici: specificatamente numerosi studi hanno mostrato la loro deregolazione in soggetti affetti da AD e in modelli animali della malattia (102,103).

### ***3.2.1 MicroRNA come Biomarkers***

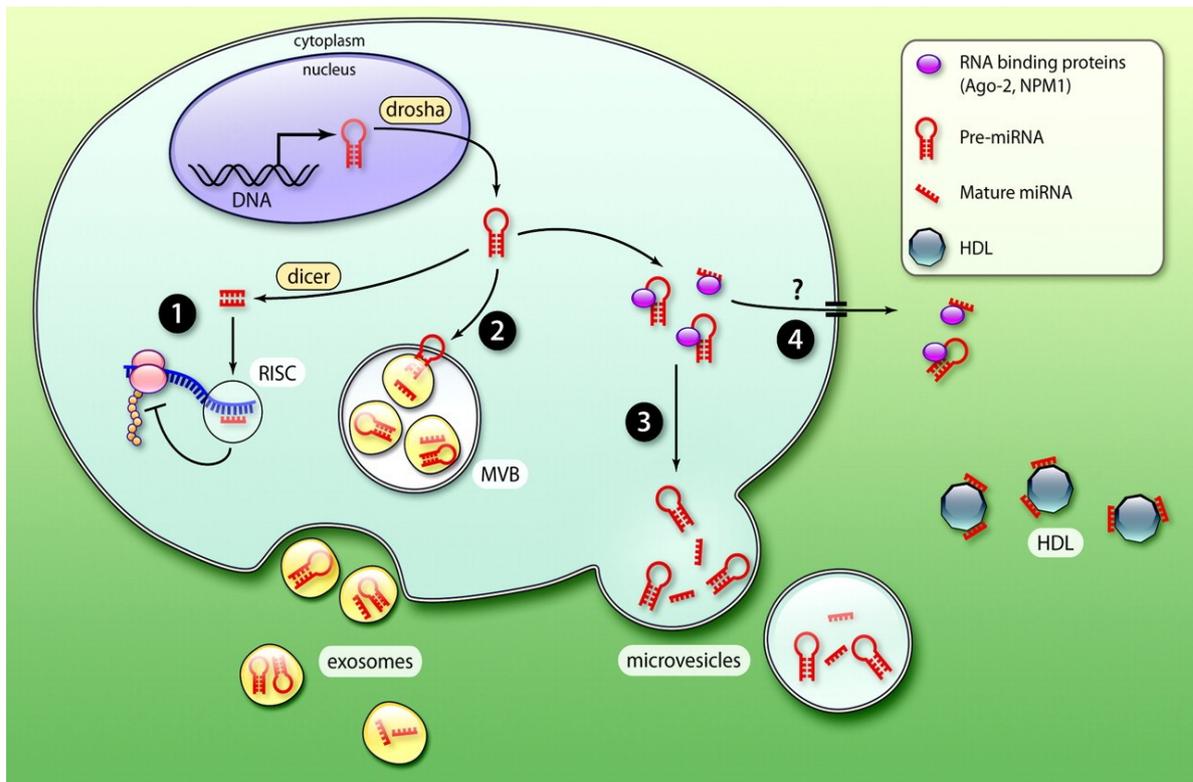
Studi sul ruolo dei miRNA nella patogenesi di AD ed il loro possibile utilizzo per la diagnosi ha portato all' identificazione e alla caratterizzazione funzionale di numerosi miRNA differentemente espressi in varie regioni del cervello di pazienti AD /controlli e alla scoperta di miRNA che potrebbero essere utilizzati come biomarkers, diagnostici e prognostici, nel CSF e nel sangue (104).

Sebbene la maggior parte dei miRNA è localizzata all' interno delle cellule nelle quali si trovano gli mRNA target, un numero crescente di evidenze ha mostrato che i miRNA vengono secreti dalle cellule (figura 17), incapsulati all' interno di vescicole o in forma libera legati a proteine, e si muovono nei liquidi biologici extracellulari in una delle cinque differenti forme 1)legati a *high-density lipoprotein* (HDL) in forma libera; 2) in complessi con proteine AGO2; 3) all' interno di esosomi; 4) all' interno di microvescicole;

5) accumulati in corpi apoptotici (105).

Questi ‘trasportatori’ proteggono i miRNA extracellulari circolanti dalla degradazione e permettono loro di svolgere il ruolo di regolatori epigenetici hormon-like (104). Associandosi infatti con le microvescicole o con proteine trasportatrici, i microRNA extracellulari possono essere attivamente secreti e trasferiti in cellule riceventi dove regolano i geni target.

I miRNA extracellulari sono coinvolti in vari processi fisiologici e patologici; infatti la loro anomala espressione è stata associata con diverse patologie portando a considerare i microRNA extracellulari promettenti nuovi e non invasivi markers diagnostici (106).



**Figura 17- Meccanismi di rilascio dei microRNA nell'ambiente extracellulare (107).**

In particolare, è sugli esosomi che si sono concentrati gli studi sui miRNA come potenziali molecole diagnostiche.

Gli esosomi sono nano-vescicole di circa 50–100 nm di diametro che si originano dagli endosomi di una grande varietà di cellule eucariote e contengono proteine, lipidi, mRNA e miRNA (105).

Trasportano le componenti delle cellule di origine e sono in grado di interagire con cellule adiacenti o distanti permettendo lo scambio intercellulare di informazioni sia in condizioni fisiologiche che patologiche (108).

Identificati nella maggior parte dei fluidi corporei tra cui sangue, CSF, urina, saliva e i mezzi di coltura cellulari, gli esosomi ed il loro contenuto possono rispecchiare lo stato delle cellule infatti: 1) gli esosomi negli stati patologici contengono generalmente miRNA deregolati o patologia-specifici; 2) hanno la capacità di superare la barriera ematoencefalica attraverso transcitosi dunque possono facilmente superare lo strato endoteliale ed immettersi nei fluidi corporei che sono importanti nelle malattie cerebrali e neurodegenerative. 3) nel sistema circolatorio di soggetti con malattie cerebrali o neurodegenerative, sono presenti in questa specifica forma che li protegge dall'attacco delle Rnasi (108).

Nei soggetti affetti da malattia di AD, la ricerca di biomarkers si è concentrata su liquido cerebrospinale e sangue periferico rispetto agli altri liquidi biologici (saliva, urina etc.).

Il prelievo del CSF richiede puntura lombare sotto anestesia generale ed è complicata, piuttosto frequentemente, da effetti collaterali (109).

Un altro approccio è la ricerca dei biomarkers nel sangue periferico: il sangue e le componenti del sangue (siero e plasma) rappresentano mezzi primari nei quali i microRNA vengono rilasciati sia associati a proteine che all'interno di vescicole.

L' esame del sangue periferico è molto meno invasivo della puntura lombare e di routine: sicuramente più applicabile per uno screening di massa e per il regolare monitoraggio della progressione della malattia (105).

Nonostante numerosi studi si siano concentrati sulla presenza nei liquidi biologici periferici di molecole che potrebbero essere utilizzate come biomarkers per la diagnosi di AD, miRNA specifici non sono ancora stati identificati.

I risultati riportati sono infatti contrastanti e ciò potrebbe essere dovuto alle numerose variabili presenti nei diversi studi come il liquido biologico utilizzato (siero/plasma vs. CSF), i metodi usati per l'isolamento degli esosomi, per la quantificazione dei miRNA (es. microarrays e RNA sequencing) e per l'analisi dei dati.

Ulteriori studi e standardizzazione dei parametri (criteri di reclutamento, inclusione ed esclusione; metodi di validazione ed analisi statistica dei dati) sono dunque necessari affinché i miRNA possano essere utilizzati come biomarkers e trovare applicazione nella clinica per diagnosi precoce, monitoraggio della progressione e della risposta ai trattamenti in AD e come target terapeutico (108).

### ***3.2.2 MicroRNA come target terapeutici***

L'osservazione che i microRNA modulano l'espressione di specifici geni in AD ha portato i ricercatori a concentrarsi sulla ricerca di trattamenti terapeutici basati sui miRNA, dato anche il fallimento delle terapie basate su A $\beta$ .

La modulazione terapeutica dei miRNA potrebbe essere effettuata in due modi: nel primo caso, la funzione del miRNA viene inibita attraverso un oligonucleotide antisenso singolo filamento complementare (ASO); nel secondo caso, l'espressione del miRNA viene aumentata o riportata a livelli fisiologici attraverso la somministrazione di composti che stimolano la sua produzione o un oligonucleotide doppio filamento sintetico che ha la stessa funzione di un miRNA endogeno (miRNA mimic) (110).

Studi molto recenti in animali modello di AD e colture cellulari hanno dimostrato che il ripristino dell'espressione di alcuni miRNA può avere effetti positivi tra cui neuroprotezione, ripristino delle funzioni cognitive e rigenerazione neuronale.

È stato inoltre mostrato che l'aumento dell'espressione di altri microRNA può impedire l'accumulo di A $\beta$  e tau in modelli animali e cellulari di AD andando ad agire su differenti pathways molecolari (111, 112).

Ad oggi, ci sono pochi esempi di utilizzo diretto dei miRNA come approccio terapeutico.

Per quanto riguarda i composti che sembrano andare a modulare i livelli di miRNA, è stato mostrato che i farmaci antiinfiammatori possono avere un effetto benefico prevenendo la progressione di AD attraverso la modulazione dell'espressione dei microRNA (113).

Inoltre, i composti naturali (*natural compounds*), come ostolo (114) e resveratrolo, noti per il loro potenziale come agenti neuro-protettivi in AD ed altre malattie cerebrali, sembra esercitino la loro funzione proprio modulando specifici miRNA e attivando processi come autofagia e rigenerazione neuronale (110).

## Capitolo IV

### COMPOSTI BIOATTIVI

#### *4.1 Definizione e funzione*

La nutrizione si configura come ‘fattore ambientale’ correlato all’AD attraverso pathways epigenetici: è importante conoscere e capire quali sono i nutrienti o composti bioattivi di origine alimentare che intervengono in questo campo, con le loro diverse funzioni o proprietà.

I composti con comprovata attività biologica che hanno origine da fonti biologiche prendono il nome di composti bioattivi: si tratta di sostanze chimiche in grado di influenzare attività fisiologiche e cellulari con conseguenti effetti benefici sulla salute (115).

Tali composti possono essere definiti come sostanze in grado di modulare attività biologiche e importanti funzioni fisiologiche espletando le loro attività quali: attività antiossidante, antiinfiammatoria, immunomodulatoria, attività antiproliferativa e proapoptotica tramite modulazione dei segnali intracellulari, prevenzione del danno al DNA e stimolazione dei meccanismi di riparazione, capacità di inibizione o attivazione di specifici enzimi, induzione o inibizione dell’espressione genica etc..

Proprio per questo, alcuni studi hanno portato ad ipotizzare che i composti bioattivi potessero rappresentare un promettente approccio per la prevenzione

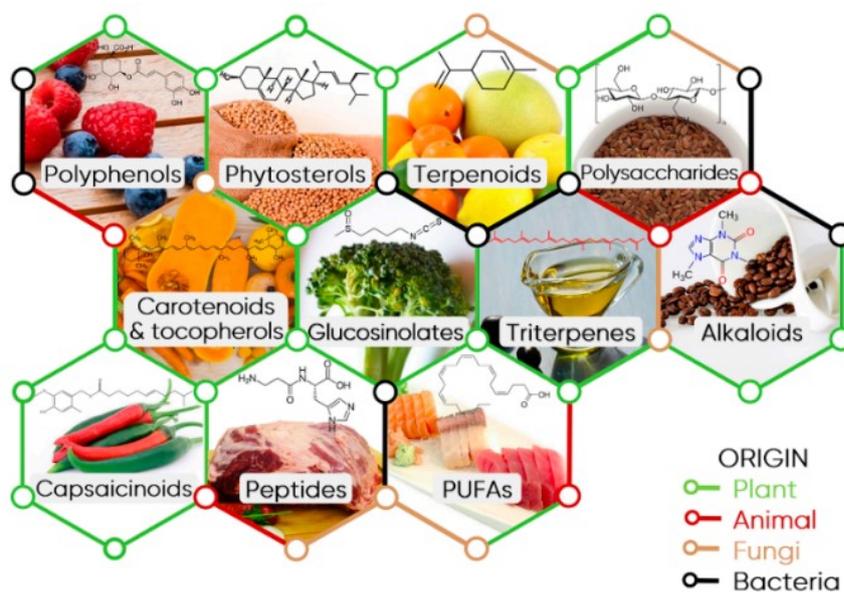
di malattie e la conseguente messa a punto di nuovi farmaci per il loro trattamento.

La maggior parte dei composti bioattivi deriva dal mondo vegetale -i fitochimici- ma vi sono anche alcune fonti animali (116): possono essere assunti sotto forma di estratti, ad esempio da piante medicinali, o in piccole quantità con gli alimenti (117).

I principali composti bioattivi presenti negli alimenti (*FBCs- food bioactive compounds*) (Figura 18) sono (118):

- Polifenoli (distinti in flavonoidi, acidi fenolici, stilbeni e lignani presenti in frutta, verdura, legumi, cereali, spezie etc.) (119);
- Triterpeni (es. squalene nell' olio d' oliva);
- Fitosteroli (es. lo stigmasterolo nella soia) (120);
- Terpenoidi (es. limonene negli agrumi);
- Polisaccaridi (es. cellulosa nei semi di lino o l'inulina presente in cicoria e tuberi) (121);
- Carotenoidi (es.  $\beta$ -carotene precursore vitamina A in frutta e verdura di colore rosso/arancione come carote e zucche) e Tocoferoli ( $\alpha$ - e  $\gamma$ -Tocoferolo precursori vitamina E in semi di grano e frutta oleosa);
- Glucosinolati (es. isotiocianati come il sulforafano soprattutto nella famiglia delle Crocifere ossia senape, crescione, rafano e cavoli) (122);

- Alcaloidi (es. caffeina in tè e caffè) (123);
- Capsaicinoidi (es. capsaicina nel peperoncino);
- Peptidi bioattivi (es. canosina, creatina, taurina presenti in diversi tipi di carni) (124);
- Acidi grassi polinsaturi (PUFA-EPA e DHA in semi oleosi, frutta secca e pesci grassi).



**Figura 18- Principali Composti bioattivi negli alimenti: classificazione e fonti (118).** Procedendo dall'alto a sinistra: Polifenoli in mirtillo e lamponi; fitosteroli nei fagioli di soia; terpenoidi negli agrumi; polisaccaridi nei semi di lino; carotenoidi e tocoferoli in carote e zucche; glucosinolati nei broccoli; triterpeni nell'olio di oliva; alcaloidi nel caffè; capsaicinoidi nel peperoncino; peptidi bioattivi nella carne; PUFA nel pesce.

## ***4.2 Composti bioattivi in AD***

Studi epidemiologici e clinici hanno mostrato come le abitudini alimentari, ad esempio la dieta mediterranea, portino benefici nei pazienti con demenza, AD e altri disordini neurodegenerativi: i composti bioattivi, presenti negli alimenti, proteggono i neuroni andando ad agire su stress ossidativo, disfunzione mitocondriale, deficit di fattori neurotrofici, apoptosi e accumulo di proteine alterate (125).

Ad oggi, i meccanismi molecolari alla base della loro attività sono poco chiari e necessitano di ulteriori studi, tuttavia, un numero crescente di evidenze indica che i loro effetti biologici potrebbero essere associati con il ruolo di regolatori dell'espressione genica, attraverso l'azione su meccanismi epigenetici (126).

Alcuni esempi possono essere i seguenti:

- La curcumina, polifenolo presente nella *Curcuma longa*- pianta erbacea perenne originaria dell'Asia sud-orientale, è impiegata largamente come spezia soprattutto nella cucina indiana, medio-orientale, thailandese.

Alcuni studi hanno messo in evidenza il ruolo della curcumina in AD, con effetto su molteplici pathways: ha proprietà anti-amiloidi, antiossidanti ed antiinfiammatorie (127).

Svolge molti ruoli come regolatore epigenetico: inibisce l'attività di DNMTs (DNA metil transferasi); regola il livello di specifici miRNA riducendo per esempio il livello di miR-155 coinvolto nel processo neurodegenerativo della microglia (128); interagisce con fattori di trascrizione ed è in grado di legare DNA (129).

- Il resveratrolo, polifenolo presente nell' uva rossa (e nel vino), nelle arachidi, nelle fave di cacao ed alcuni frutti di bosco, ha mostrato effetti neuroprotettivi in studi su modelli di topo AD e uomo: modulando l' espressione di alcuni miRNA, tra cui miR-134 (130) ed il miR-155 (131), che vengono downregolati in AD, ha proprietà antiossidanti ed antiinfiammatorie.

Il meccanismo neuroprotettivo del resveratrolo in AD sembra inoltre essere associato alla capacità di attivazione della deacetilasi NAD-dipendente SIRT1, la cui riduzione è stata recentemente associata con aumento della produzione e deposizione di  $A\beta$  nei soggetti affetti da AD: SIRT1 partecipa alla regolazione dell'espressione genica attraverso deacetilazione istonica e sembra svolgere, nel cervello adulto, un ruolo importante nella protezione neuronale dai ROS, nella segnalazione mediata da  $NF-\kappa B$  nelle cellule della microglia attivate,

nel prevenire la tossicità di  $A\beta$  e nel contribuire al mantenimento delle funzioni cognitive (132).

- Gli acidi grassi polinsaturi (PUFA), in particolare gli omega-3 presenti principalmente nel pesce e semi oleosi, sono molecole che contribuiscono allo sviluppo e funzionamento del sistema nervoso centrale: svolgono un ruolo chiave nel mantenimento della fluidità delle membrane ed in differenti pathways di segnalazione sia direttamente che attraverso i loro prodotti metabolici (133).

Numerosi studi sperimentali sull'uomo e sui topi hanno mostrato che gli acidi grassi omega-3, in particolare DHA, sembrerebbero in grado di ridurre il rischio di declino cognitivo e demenza (134): esplicano il loro effetto attraverso numerosi meccanismi cellulari tra cui la modulazione di recettori di membrana, pompe ioniche e proteine-G, di fattori trascrizionali e dell'espressione genica.

Tra i meccanismi alla base del cambiamento dell'attività genica mediata dagli omega 3 sembra esservi la regolazione epigenetica: EPA e DHA sembrano in grado di influenzare la metilazione del DNA, inducendo ipometilazione nelle regioni promotrici di specifici geni andando ad influenzare il processo infiammatorio ed altri processi connessi allo sviluppo di AD (135).

Per la loro attività biologica e farmacologica, i composti bioattivi potrebbero acquisire un ruolo importante nella prevenzione e nel trattamento di AD. Tuttavia, ad oggi, sono ancora insufficienti i dati riguardo la dose ottimale, la biodisponibilità, le differenze tra le forme chimiche e le possibili interazioni con le altre componenti alimentari (127).

Ulteriori ricerche in questo campo sono necessarie ma l'assunzione di cibi ricchi di queste sostanze apporta comunque benefici indiscutibili: studi in modelli animali e ricerche cliniche ed epidemiologiche hanno mostrato che l'alimentazione, soprattutto quando la dieta contiene molteplici composti bioattivi, ha un effetto benefico sulla salute proteggendo l'organismo da stress ossidativo, infiammazione cronica e dunque dalle malattie cronico-degenerative.

La modifica dello stile di vita, in particolare l'introduzione di una dieta adeguata, potrebbe ritardare o prevenire l'esordio di AD (127). Tra i modelli dietetici più studiati e che sembrano prevenire il rischio della malattia di AD, vi è la dieta mediterranea: basata sul consumo di frutta e verdure, cereali, pesce e ridotta quantità di carne, frutta secca, olio d'oliva, spezie e piccole quantità vino rosso fornisce, infatti, una grande quantità di composti bioattivi (136,137, 138).

## Capitolo V

### TOOLS BIOINFORMATICI

#### *5.1 La bioinformatica*

Negli ultimi decenni, il progresso nelle tecniche analitiche di laboratorio (es tecnologia high-throughput) ha consentito la raccolta rapida di una quantità di dati, clinici e biologici, senza precedenti ed in continua crescita, proiettando le scienze della vita nell'universo dei cosiddetti 'big data', termine che genericamente descrive un patrimonio di dati esteso in termini di volume, velocità e varietà. L'aumento del volume e della complessità dei dati ha creato una pressante necessità di colmare il divario tra questo sviluppo tecnologico ad alto rendimento e la capacità di gestire, analizzare e integrare i big data biologici. Produciamo più informazioni di quelle che siamo in grado di gestire e questo ci pone di fronte a delle nuove sfide: da qui la necessità di far ricorso alla bioinformatica.

La bioinformatica è l'applicazione dell'informatica alla gestione e analisi dell'informazione biologica.

La bioinformatica combina informatica, statistica, matematica ed ingegneria (139); si occupa di sviluppare nuovi algoritmi, metodologie e software per l'analisi di dati biologici ed è indispensabile per ottenere una visione più chiara della biologia degli organismi.

La bioinformatica suggerisce quali domande un ricercatore dovrebbe porsi, come cercare le corrette risposte, cosa fare con la grossa quantità di dati prodotti dagli studi scientifici.

Le sue principali attività riguardano la costruzione e il mantenimento di una varietà di banche dati, lo sviluppo di algoritmi per l'allineamento di sequenze di DNA, RNA e proteine, l'identificazione dei geni e l'assemblaggio dei genomi, la predizione di strutture e interazioni di acidi nucleici e proteine, la ricostruzione e l'analisi di reti biologiche (biologia sistemica), l'analisi statistico/matematica con relativa costruzione di modelli (biologia computazionale).

Il ruolo fondamentale della bioinformatica è infatti quello di fornire le basi teoriche per i recenti sviluppi biologici nelle aree omics (genomics, proteomics, metabolomics), modellazione e analisi di sistemi, teorie predittive del comportamento dei sistemi e metodi prescrittivi della loro evoluzione.

Dal punto di vista dei contenuti, la bioinformatica comprende:

- definizione di tecniche statistiche e algoritmi necessari a studiare la grande mole di dati che si rende disponibile come risultato degli esperimenti;
- definizione di strumenti di scambio e memorizzazione di informazioni accessibili su larga scala;

- definizione di metodologie di rappresentazione e simulazione del comportamento di sistemi complessi come le reti geniche o metaboliche o i meccanismi di segnalazione intra e intercellulari.

Nel mondo della biologia negli ultimi anni è aumentato il ricorso a tecniche bioinformatiche in quanto sono economicamente più convenienti, riducono le tempistiche e migliorano continuamente nell'analisi; la maggior parte delle risorse bioinformatiche si trova nel web, è gratuita e di facile accesso per tutti. Nel lavoro di ricerca, al fine di stesura della tesi, sono stati usati due tools bioinformatici: Mienturnet e Reactome.

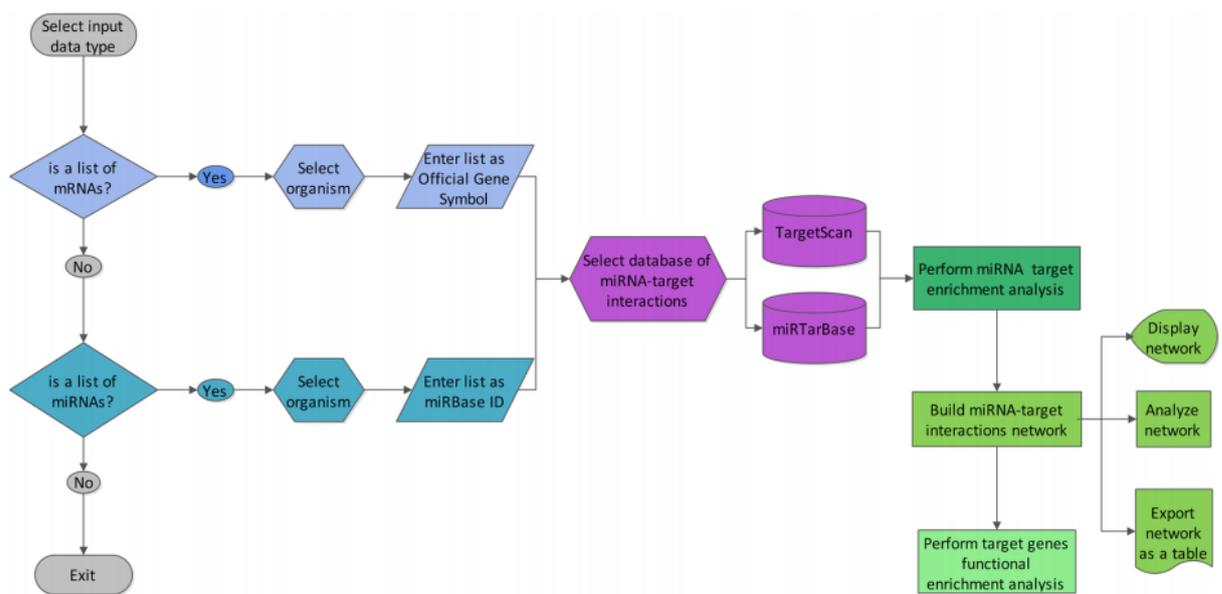
## ***5.2 Mienturnet***

*Mienturnet* (140) (*MicroRNA ENrichment TURned NETwork*) è un web tool ideato per (figura 19):

- 1) ricevere come input una lista di geni riportati secondo l'Official Gene Symbol (es. APP nell'homo sapiens, App in mus musculus), e dedurre possibili evidenze (computazionali o sperimentali) della regolazione dei miRNA basandosi sull'analisi statistica per l'over-rappresentazione delle interazioni miRNA-target;
- 2) ricevere come input una lista di microRNA maturi secondo l'ID presente in miRBase (e.g. hsa-miR-15a-5p) e dedurre possibili

evidenze (computazionali o sperimentali) della loro attività regolatoria su geni target basandosi sull' analisi statistica per l'overrappresentazione delle interazioni miRNA-target.

Le interazioni miRNA-target risultanti vengono visualizzate come network.



**Figura 19- Flowchart del web tool MIENTURNET (140).**

Mienturnet utilizza interazioni miRNA-target predette computazionalmente e sperimentalmente validate, scaricate rispettivamente dal sito TargetScan le prime e miRTarBase le seconde.

Attualmente Mienturnet permette la scelta di sei organismi: *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Danio rerio*.

È dotato di un'interfaccia web semplice e intuitiva e fornisce un insieme esauriente e ben documentato di informazioni di output.

Essendo interessati a trovare i target di specifici microRNA abbiamo sfruttato l'opzione due di Mienturnet, inserendo una lista input contenente l'ID di ciascun microRNA, ricavato da miRBase (database di sequenze ed annotazioni di microRNA).

Il programma elabora il file di input e fornisce immediatamente nel menù a tendina 'IDs found' il numero totale di miRNA riconosciuti dal database miRBase insieme a una tabella che include: il nome del microRNA, l'accession ID in miRBase del microRNA così come collegamenti ipertestuali a miRBase e la sequenza del microRNA maturo.

I microRNA non riconosciuti (se ci sono) possono essere trovati cliccando nel menù a tendina 'IDs not found'.

Cliccando sulla casella *miRNA-target Enrichment*, Mienturnet effettua un'analisi statistica per l'over-rappresentazione delle interazioni miRNA-target incluse nell'elenco dei microRNA di input. Nella pagina miRNA-target Enrichment è possibile selezionare il database cui si vuol far riferimento per

l'analisi di arricchimento delle interazioni microRNA-target (TargetScan e/o miRTarBase).

Selezionando la casella *TargetScan*, vengono considerate le interazioni microRNA-target predette computazionalmente.

TargetScan predice i target biologici dei microRNA attraverso la ricerca di siti conservati che permettono l'appaiamento con la 'seed region' (la regione compresa tra i nucleotidi 2-7 al 5' della sequenza di microRNA maturo) di ciascun microRNA.

Una famiglia di microRNA è composta da microRNA con la stessa sequenza seed: ciò implica che i membri della stessa famiglia di microRNA condividano tutti gli stessi bersagli e come conseguenza l'analisi di arricchimento viene eseguita considerando famiglie di microRNA anziché singoli microRNA. Per il nostro studio abbiamo sfruttato questo database.

Selezionando la casella *miRTarBase* vengono considerate le interazioni microRNA- target validate sperimentalmente tramite western blot, microarrays, next-generation sequencing.

In questo caso l'analisi di arricchimento viene eseguita considerando i microRNA anziché le famiglie di microRNA.

Mienturnet esegue l'analisi di arricchimento microRNA-target utilizzando il test ipergeometrico che ci fornisce la significatività (p-value < 0.005) per ciascun gene target.

$$p = 1 - \sum_{i=0}^{X-1} \frac{\binom{K}{i} \binom{M-K}{N-i}}{\binom{M}{N}}$$

**M** è la dimensione dell'universo, ovvero il numero di tutte le interazioni microRNA-target predette (validate) in TargetScan (miRTarBase);

**K** il numero delle interazioni microRNA-target predette (o validate) in TargetScan (o miRTarBase) per uno specifico gene o microRNA in base al tipo di input list;

**N** è il numero di famiglie di microRNA (o numero di microRNA) della lista input riconosciuta da TargetScan (o miRTarBase)

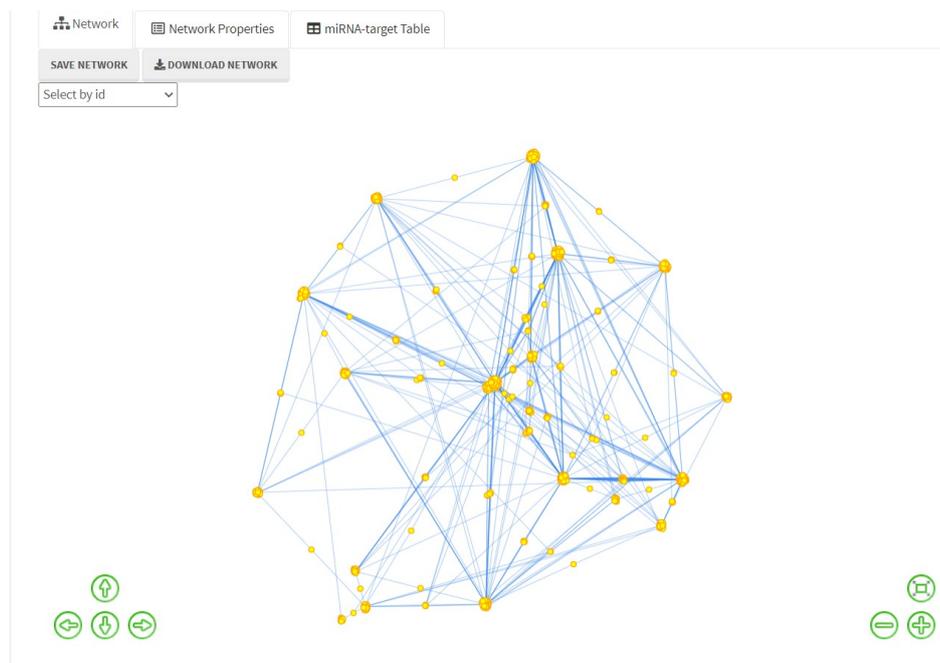
**X** è il numero delle interazioni microRNA- target predette (o validate) presenti nella lista input per un gene o microRNA selezionato.

I risultati dell'analisi di arricchimento vengono presentati come:

1) un grafico a barre dove l'asse delle Y riporta i primi dieci geni target risultanti dell'analisi di arricchimento, mentre l'asse X rappresenta il numero dei microRNA che hanno come target i geni riportati sull'Y. Il colore delle barre rappresenta l'FDR (False Discovery Rate) che aumenta dal rosso al blu;

2) una tabella interattiva: formato da noi utilizzato per poter raccogliere i dati di interesse.

Mienturnet permette inoltre di visualizzare i risultati ottenuti dall' analisi di arricchimento come 'rete di interazioni' microRNA-target semplicemente cliccando sulla casella *Network* presente nella pagina web e scegliendo il database di riferimento (TargetScan o miRTarBase). Anche in questo caso i risultati vengono riportati in diversi formati. Ad esempio, si può visualizzare la rete di interazione microRNA-target con una rappresentazione (*network tab*) costituita da pallini blu che rappresentano i microRNA e pallini gialli che rappresentano i loro geni target (Figure 20).



**Figura 20- Rappresentazione delle interazioni microRNA (sottoespressi nell' Alzheimer) - geni target (140).**

Inoltre, cliccando su *Functional Enrichment* è possibile effettuare un'analisi di arricchimento funzionale di geni target di specifici microRNA, selezionando il database di interesse (TargetScan o miRTarBase); per questa analisi la scelta è tra i seguenti database di annotazione: KEGG, REACTOME, WikiPathways, Disease Ontology (disponibile solo per Homo Sapiens).

La ricerca risulta però limitata perché è possibile l'inserimento di un numero limitato di microRNA (appartenenti alla stessa famiglia) e che vengono automaticamente riportati nella finestra della casella di inserimento.

### **5.3 Reactome**

Reactome (141) è un database gratuito, open source e peer-reviewed di pathways biologici che include tools bioinformatici per la visualizzazione, interpretazione ed analisi dei pathways già noti al fine di supportare la ricerca di base, l'analisi del genoma, il modelling, la biologia dei sistemi e la formazione scientifica.

Fondato nel 2003 il progetto Reactome è guidato da Lincoln Stein dell'Ontario Institute for Cancer Research (OICR), Peter D'Eustachio della New York University Langone Medical Center (NYULMC), Henning Hermjakob

dell' European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI) e Guanming Wu dell' Oregon Health & Science University (OHSU) .

La '*core unit*' di Reactome è il pathway: infatti rappresenta visivamente come gli acidi nucleici, proteine, complessi e altre piccole molecole sono coinvolte nei pathways biologici (apoptosi, metabolismo energetico, risposta immunitaria innata ed adattativa, la regolazione trascrizionale, patologie etc.).

I pathways riportati sono specie-specifici.

Il sito web di Reactome è progettato per fornire all' utente una mappa grafica dei processi e dei pathways biologici noti che è anche un' interfaccia su cui l'utente può 'cliccare' per informazioni dettagliate autorevoli sui componenti e le loro relazioni.

Reactome consente a scienziati, ricercatori, studenti, professori di trovare, organizzare e utilizzare informazioni biologiche per supportare la visualizzazione, integrazione e analisi dei dati.

I pathways presenti in Reactome, così come le pagine su reazioni e molecole, integrano le informazioni di più di cento diverse risorse bioinformatiche presenti online come NCBI Gene, i database Ensembl e UniProt, l'UCSC Genome Browser, ChEBI database di piccole molecole e PubMed database di letteratura scientifica.

Tutti i dati e i software sono liberamente disponibili per essere salvati su un dispositivo personale.

Per il nostro studio è stato utilizzato *Analysis Tools* strumento disponibile sull'interfaccia web di Reactome: selezionando questa funzione viene aperta una finestra dove è possibile selezionare il tipo di analisi che si vuole condurre, copiando o caricando un file contenente i dati di interesse o utilizzare un file esemplificativo.

Differenti analisi possono essere condotte in dipendenza del formato dei dati inseriti: i dati inseriti dovrebbero essere una singola colonna di 'identificatori' come ID di UniProt, ID di ChEBI o nomenclatura dei geni.

Per la nostra ricerca abbiamo utilizzato quest'ultima opzione inserendo lista di geni risultanti dall'analisi effettuata con Mienturnet: questi dati vengono mappati nei pathways presenti in Reactome e vengono condotte delle analisi di over-rappresentazione e topologiche dei pathways.

L'analisi di arricchimento (distribuzione ipergeometrica) è un test statistico che determina se determinati pathways di Reactome sono over-rappresentati nei dati inseriti.

L'analisi topologica dei pathways considera la connessione tra molecole, rappresentata dagli steps del pathway (chiamate reazioni). Questa analisi

raggruppa tutte le molecole rappresentate in ciascuna reazione come ‘unità’ del pathway.

Se alcune di queste molecole sono presenti nella lista di dati inserita, si considera una corrispondenza con quella reazione. Questo può dare una migliore indicazione della proporzione del pathway che corrisponde ai dati inseriti e potrebbe inoltre indicare che i dati inseriti corrispondono con l’inizio, la fine o un passaggio del processo del pathway.

I risultati dell’analisi sono mostrati nella *Analysis tab*: vengono mostrati tutti i pathways di Reactome, in blocchi di 20, ordinati secondo il p-value ottenuto dall’analisi di over-rappresentazione.

Se più pathways presentano lo stesso p-value, vengono classificati in base al numero di ‘ identificatori’ della lista che si riscontrano nel pathway.

Dopo essere stata condotta l’analisi, viene mostrata la *Pathway Overview*: tutti i pathways che contengono gli identificatori della lista inserita sono evidenziati utilizzando una scala a colori che corrisponde al FDR.

L’evidenziazione dei pathways nella Overview fornisce una rappresentazione immediata dei risultati dell’analisi di tutti i pathways.

Per visualizzare i dettagli di uno specifico pathway, è necessario cliccare sul nodo che rappresenta il pathway nell’overview o nella lista gerarchica dei pathways presente sulla sinistra

Il risultato dell' analisi dei pathways può essere poi scaricato in formato PDF (*Pathways Analysis Report*) che fornisce i 25 pathways statisticamente più significativi in relazione alla lista dei dati inizialmente inserita.

Tramite l' utilizzo di Reactome è stato dunque possibile identificare i pathways nei quali i geni di interesse, risultati dall' analisi con Mienturnet, sono principalmente coinvolti permettendo di ampliare il campo di indagine riguardo i meccanismi che intervengono nella malattia d' Alzheimer.

## Capitolo VI

### MATERIALI E METODI

Per il nostro lavoro di ricerca è stato utilizzato Pubmed, motore di ricerca sviluppato dal National Center for Biotechnology Information (NCBI), presso l' U.S. National Library of Medicine (NLM) del National Institutes of Health (NIH).

Il database di Pubmed contiene più di 32 milioni di citazioni ed abstract di letteratura biomedica ed è consultabile gratuitamente online dal 1996.

Sono stati raccolti lavori scientifici con evidenza sperimentale di modulazione dei microRNA nelle patologie neurodegenerative, eseguendo una selezione di microRNA up e down espressi in AD.

Per focalizzare la ricerca sugli argomenti di interesse abbiamo usato le parole chiave *'neurodegenerative disease AND microRNAs'* oppure *'Alzheimer's disease AND miRNAs'*.

Sono stati considerati studi, effettuati su uomo e topo (modello AD o transgenico) in vivo o su colture di cellule neuronali in vitro, condotti in un arco di tempo che va dal 2008 al 2021.

I microRNA raccolti, la cui espressione alterata è risultata potenzialmente correlata alla malattia di Alzheimer e modelli, sono stati raggruppati in base ai

livelli di espressione: *microRNA up-regolati e down-regolati* rispetto al livello di espressione nei controlli.

Data la grande quantità di dati raccolti e di informazioni attese, abbiamo deciso di circoscrivere la ricerca focalizzandoci su studi condotti sull'uomo (colture cellulari o tessuti) ed utilizzando esclusivamente i microRNA deregolati nell'uomo.

Tenendo conto del livello di espressione, si è tentato inizialmente di analizzare i microRna raccolti attraverso l'utilizzo della piattaforma online DIANA-miRPath v3 (142, 143) dedicata alla valutazione del ruolo regolatorio dei microRNA e all'identificazione dei pathways che dai microRNA vengono regolati. Tuttavia, il limite massimo di inserimento di microRNA, pari a 100, non ha permesso di effettuare un'analisi simultanea di tutti i microRNA (up o down) identificati e di valutarne eventuali interazioni.

Per questo motivo, l'analisi è stata poi condotta tramite l'utilizzo di Mienturnet strumento web interattivo per l'identificazione dei target di microRNA e l'analisi network-based: l'ID corrispondente a ciascun miRNA - a cui si è risaliti tramite l'utilizzo di miRBase- è stato inserito nella piattaforma online permettendo di identificare i geni target di uno o più microRNA alterati nella malattia di Alzheimer.

Tra i geni, risultanti dall' analisi con Mienturnet dei microRNA up- e down regolati, ne sono stati selezionati alcuni utilizzando come criterio di inclusione il valore di p-value.

Sulla base dei risultati raccolti, si è deciso di considerare:

- i geni risultanti dall' analisi dei microRNA down-regolati in AD con valore minimo di p-value pari a 0,001021278;
- i geni risultanti dall' analisi dei microRNA up-regolati in AD con valore minimo di p-value pari a 0,001061784.

I geni selezionati sono stati inseriti in *Reactome*, database di pathways gratuito, open- source, peer- reviewed.

Il database ha fornito una lista dei 25 pathways più significativi, ordinati in base al p-value, per ciascun gruppo di geni analizzati (geni dei microRNA down in AD e geni dei microRNA up in AD).

È stato preso in considerazione il primo pathway riportato in ciascuna delle due liste: Beta-catenin phosphorylation cascade (*Pathway Analysis Report - microRNA down regolati*); Netrin-1 signaling (*Pathway Analysis Report- microRNA up regolati*).

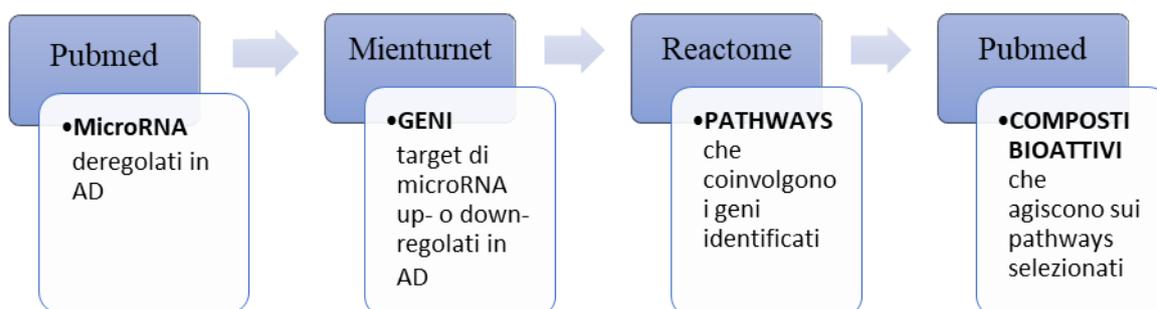
Di ciascun pathway è stato successivamente valutato il coinvolgimento nella malattia di Alzheimer, attraverso Pubmed con l' utilizzo delle parole chiave

*‘Netrin-1 AND Alzheimer’s disease’ e ‘Beta-catenin AND Alzheimer’s disease’.*

Infine, è stata valutata la possibilità di regolazione da parte di nutrienti e composti bioattivi direttamente dei pathways selezionati.

La ricerca è stata effettuata tramite PubMed con l’utilizzo delle parole chiave *‘Beta-catenin AND natural compounds’; ‘Beta-catenin AND natural compounds AND miRNAs’; ‘Beta-catenin AND bioactive compounds’; ‘Netrin- 1 AND natural compounds’; ‘Netrin- 1 AND bioactive compounds’; ‘Netrin- 1 AND natural compounds AND miRNAs’.*

#### FLOW CHART



## **Capitolo VII**

### **RISULTATI**

Il nostro studio ha preso avvio dalla ricerca e raccolta dati attraverso l'utilizzo del database Pubmed. Sono stati considerati studi sperimentali/clinici condotti sulla malattia d'Alzheimer nei quali veniva valutato, in vivo o in vitro, il livello di microRNA in:

1) campioni umani 2) topo modello 3) topo transgenico 4) modelli cellulari.

Tale ricerca ha permesso di raccogliere una serie di microRNA il cui livello sembra essere alterato (down o up espresso) nella malattia d'Alzheimer rispetto ai controlli.

I microRNA sono stati suddivisi in base all' origine del campione, umano o animale, utilizzato negli studi considerati ed inseriti nella tabella 1 -riportata di seguito- nella quale vengono indicati il tipo di modello (in vivo o in vitro), il tipo di campione ed il livello di espressione dei microRNA rispetto ai controlli.

**Tabella 1- microRNA deregolati in AD**

<b>Human Samples</b>	<b>Source</b>	<b>microRNAs</b>	<b>Regulation</b>	<b>Reference</b>
<b>In vivo/ bioptico</b>	Plasma	hsa-miR-590-3p	Down	(144)
	Brain	hsa-miR-137, hsa-miR-181c	Down	(145)
	Temporal cortex	hsa-miR-29b-1 hsa-miR-29a-1	Down	(146)
	Plasma	hsa-let-7d-5p, hsa-let-7g-5p, hsa-miR-15b-5p, hsa-miR-142-3p, hsa-miR-191-5p, hsa-miR-301a-3p, hsa-miR-545-3p	Down	(147)
	Plasma	hsa-miR-103a-3p, hsa-miR-107, hsa-miR-532-5p, hsa-miR-26b-5p, hsa-let-7f-5p	Down	(148)
	Serum	hsa-miR-98-5p, hsa-miR-885-5p, hsa-miR-483-3p, hsa-miR-342-3p, hsa-miR-191-5p, hsa-let-7d-5p	Down	(149)
	Cerebrospinal fluid/Plasma	hsa-miR-146a, hsa-miR-34a, hsa-miR-125b	Down	(150,151)
	Serum	hsa-miR-31, hsa-miR-93, hsa-miR-143	Down	(152)
	Plasma	hsa-let-7a-5p, hsa-let-7e-5p, hsa-miR-15a-5p, hsa-miR-17-3p, hsa-miR-29b-3p, hsa-miR-144-5p, hsa-miR-148a-3p, hsa-miR-502-3p, hsa-miR-660-5p, hsa-miR-1294, hsa-miR-3200-3p	Down	(153)

<b>In vivo/ bioptico</b>	Cerebrospinal fluid	hsa-miR-4449, hsa-miR-4674, hsa-miR-335, hsa-miR-375, hsa-miR-708, hsa-miR-219	Down	(154)
	Gray matter/white	hsa-miR-15a, hsa-miR-181b, hsa-miR-15, hsa-miR-29, hsa-miR-212, hsa-miR-27a-3p	Down	(155)
	Gray matter	hsa-miR-132-3p, hsa-miR-212-3p	Down	(156)
	Cerebrospinal fluid	hsa-miR-125b-5p	Down	(157)
	Peripheral blood mononuclear cell	hsa-miR-29c	Down	(158)
	Brain Grey matter	hsa-miR-132, hsa-miR-212	Down	(159)
	Brain	hsa-miR-23a, hsa-miR-23b	Down	(160)
	Plasma	hsa-miR-135b	Down	(161)
	Cerebrospinal fluid/ Hippocampus	hsa-miR-99a, hsa-miR-199a-1, hsa-miR-10a, hsa-miR-10b, hsa-miR-181c, hsa-miR-210, hsa-miR-212, hsa-miR-181a, hsa-miR-214, hsa-miR-221, hsa-miR-132, hsa-miR-142-5p, hsa-miR-143, hsa-miR-126, hsa-miR-127, hsa-miR-154, hsa-miR-194, hsa-miR-195, hsa-miR-338, hsa-miR-146b, hsa-miR-497, hsa-miR-455, hsa-miR-451,	Down	(162)

		hsa-miR-9	Down	(162)
	Brain	hsa-miR-23b, hsa-miR-107	Down	(163)
	Serum	hsa-miR-26a-5p, hsa-miR-181c-3p, hsa-miR-126-5p, hsa-miR-22-3p, hsa-miR-148b-5p	Down	(164)
	Hippocampus	hsa-miR-338-5p	Down	(165)
	Serum	hsa-miR-193b	Down	(166)
	Cortex	hsa-miR-361-3p	Down	(167)
<b>In vivo/ bioptico</b>	Plasma	hsa-miR-112, hsa-miR-161, hsa-let-7d-3p, hsa-miR-5010-3p, hsa-miR-26a-5p, hsa-miR-1285-5p, hsa-miR-151a	Up	(148)
	Cerebrospinal fluid	hsa-miR-29a, hsa-miR-29b	Up	(150)
	Plasma	hsa-miR-26b-3p, hsa-miR-28-3p, hsa-miR-30c-5p, hsa-miR-148b-5p, hsa-miR-186-5p, hsa-miR-425-5p, hsa-miR-550a-5p, hsa-miR-1468, hsa-miR-4781-3p, hsa-miR-5001-3p, hsa-miR-6513-3p	Up	(153)
	Cerebrospinal fluid	hsa-miR-505, hsa-miR-4467, hsa-miR-766, hsa-miR-3622b-3p, hsa-miR-296	Up	(154)
	Cerebrospinal fluid/ extracellular fluid/ Cortex	hsa-miR-125b, hsa-miR-9, hsa-miR-146a, hsa-miR-155, hsa-miR-21	Up	(168, 169,170)
	Gray matter	hsa-miR-424	Up	(155)

<b>In vivo/ bioptico</b>	Peripheral blood mononuclear cell /plasma	hsa-miR-34a, hsa-miR-34c	Up	(171)
	Cerebrospinal fluid	hsa-miR-29a-3p	Up	(157)
	Hippocampus	hsa-miR-603	Up	(172)
	Blood mononuclear cells	hsa-miR-200a, hsa-let-7f	Up	(173)
	Cerebrospinal fluid/ Hippocampus	hsa-let-7f, hsa-miR-92, hsa-miR-100, hsa-miR-105, hsa-miR-197, hsa-miR-30d, hsa-miR-34a, hsa-miR-204, hsa-miR-205, hsa-miR-216, hsa-miR-27b, hsa-miR-30b, hsa-miR-125b-1, hsa-miR-128-1, hsa-miR-135a-1, hsa-miR-141, hsa-miR-125a, hsa-miR-138-1, hsa-miR-186, hsa-miR-362, hsa-miR-302b, hsa-miR-374a, hsa-miR-380-3p, hsa-miR-381, hsa-miR-151, hsa-miR-345, hsa-miR-423, hsa-miR-494, hsa-miR-520a, hsa-miR-518f, hsa-miR-526a, hsa-miR-517a, hsa-miR-517b, hsa-miR-501, hsa-miR-125b, hsa-miR-371, hsa-miR-422a,	Up	(162)

<b>In vivo/ bioptico</b>	Cerebrospinal fluid/ Hippocampus	hsa-miR-448, hsa-miR-429, hsa-miR-449, hsa-miR-451, hsa-miR-518b	Up	(162)
	Serum	hsa-miR-106b-3p	Up	(164)
	Hippocampus	hsa-miR -124	Up	(174)
	Brain	hsa-miR-140-5p	Up	(175)
	Serum	hsa-miR-135a, hsa-miR-384	Up	(166)
	Hippocampus	hsa-miR-142a-5p hsa-miR-155-5p, hsa-miR-455-5p hsa-miR-146a-5p	Up	(176)
	Peripheral blood cells	hsa-miR-1908	Up	(177)
	Cerebrospinal fluid	hsa-miR-let-7b	Up	(178,179)
	Serum	hsa-miR -28-3p	Up	(180)
	Brain	hsa-miR-455-3p	Up	(181)
	Serum	hsa-miR -128	Up	(182)
	Cerebrospinal fluid	hsa-let-7e	Up	(178)
<b>In vivo ed in vitro</b>	Temporal cortex/Serum	hsa-miR-181, hsa-miR-106 a-b	Down	(183,184)
	Serum	hsa-miR-200a-3p	Down	(185)
	Serum	hsa-miR-133b	Down	(186)
	Serum	hsa-miR-193a-3p	Down	(187)
	Serum, Primary mouse cortical neurons	hsa-miR-125b-5p hsa-miR-34a-5p	Down	(188)
	Serum/ Cerebrospinal fluid	hsa-miR -433	Down	(189)
	Cortex	hsa-miR-7	Up	(190)

Mice Samples	Source	miRNAs	Regulation	Reference
<b>In vivo/ bioptico</b>	Hippocampus/ Plasma Transgenic Mice	mmu-miR-204-3p	Down	(191)
	Hippocampus	mmu-miR-98	Down	(192)
	Cortex	mmu-miR-330	Down	(193)
	Hippocampus	mmu-miR-186	Down	(194)
	Hippocampus/ Cortex Transgenic mice	mmu-miR-101a- 3p	Down	(195)
	Hippocampus	mmu- miR-107	Down	(196)
	Hippocampus	mmu-miR-132	Down	(197)
	Hippocampus	mmu-miR-10a	Up	(198)
	Hippocampus/ Cortex Transgenic mice	mmu-miR-199a	Up	(199)
<b>In vivo ed in vitro</b>	Hippocampus/ Cortex Transgenic mice	mmu-miR-137	Down	(200)
	Cortex, Transgenic mice Primary murine neuronal cells	mmu-miR-1187	Down	(201)
	Cortex, Transgenic mice Primary murine neuronal cells	mmu-miR-141, mmu-miR-200a, mmu-miR -200b, mmu-miR -200c mmu-miR-96, mmu-miR-182 mmu-miR-183	Up	(201)
	Hippocampus Transgenic Mice, Hippocampal cultures	mmu-miR-181a	Up	(202)
	Cortex Transgenic Mice, Primary murine neuronal cells	mmu-miR-429	Up	(201, 203)
	Hippocampus Transgenic Mice	mmu-miR -138	Up	(204, 205)

Come mostrato in tabella 1, gli studi condotti su campioni *umani* hanno permesso di rilevare:

- 93 microRNA downregolati:

hsa-miR-590-3p, hsa-miR-137, hsa-miR-181c, hsa-miR-29b-1, hsa-miR-29a-1, hsa-let-7d-5p, hsa-let-7g-5p, hsa-miR-15b-5p, hsa-miR-142-3p, hsa-miR-191-5p, hsa-miR-301a-3p, hsa-miR-545-3p, hsa-miR-103a-3p, hsa-miR-107, hsa-miR-532-5p, hsa-miR-26b-5p, hsa-let-7f-5p, hsa-miR-98-5p, hsa-miR-885-5p, hsa-miR-483-3p, hsa-miR-342-3p, hsa-miR-146a, hsa-miR-34a, hsa-miR-125b, hsa-miR-31, hsa-miR-93, hsa-miR-143, hsa-let-7a-5p, hsa-let-7e-5p, hsa-miR-15a-5p, hsa-miR-17-3p, hsa-miR-29b-3p, hsa-miR-144-5p, hsa-miR-148a-3p, hsa-miR-502-3p, hsa-miR-660-5p, hsa-miR-1294, hsa-miR-3200-3p, hsa-miR-4449, hsa-miR-4674, hsa-miR-335, hsa-miR-375, hsa-miR-708, hsa-miR-219, hsa-miR-15a, hsa-miR-181b, hsa-miR-15, hsa-miR-29, hsa-miR-212, hsa-miR-27a-3p, hsa-miR-132-3p, hsa-miR-212-3p, hsa-miR-125b-5p, hsa-miR-29c, hsa-miR-132, hsa-miR-23a, hsa-miR-23b, hsa-miR-135b, hsa-miR-99a, hsa-miR-199a-1, hsa-miR-10a, hsa-miR-10b, hsa-miR-210, hsa-miR-181a, hsa-miR-214, hsa-miR-221, hsa-miR-142-5p, hsa-miR-126, hsa-miR-127, hsa-miR-154, hsa-miR-194, hsa-miR-195, hsa-miR-338, hsa-miR-146b, hsa-miR-497, hsa-miR-455, hsa-miR-451, hsa-miR-9, hsa-miR-26a-5p, hsa-miR-181c-3p, hsa-miR-126-5p, hsa-miR-22-3p, hsa-

miR-148b-5p, hsa-miR-338-5p, hsa-miR-193b, hsa-miR-361-3p, hsa-miR-181, hsa-miR-106 a-b, hsa-miR-200a-3p, hsa-miR-133b, hsa-miR-193a-3p, hsa-miR-433, hsa-miR-34a-5p;

- 92 microRNA upregolati:

hsa-miR-112, hsa-miR-161, hsa-let-7d-3p, hsa-miR-5010-3p, hsa-miR-26a-5p, hsa-miR-1285-5p, hsa-miR-151a, hsa-miR-29a, hsa-miR-29b, hsa-miR-26b-3p, hsa-miR-28-3p, hsa-miR-30c-5p, hsa-miR-148b-5p, hsa-miR-186-5p, hsa-miR-425-5p, hsa-miR-550a-5p, hsa-miR-1468, hsa-miR-4781-3p, hsa-miR-5001-3p, hsa-miR-6513-3p, hsa-miR-505, hsa-miR-4467, hsa-miR-766, hsa-miR-3622b-3p, hsa-miR-296, hsa-miR-125b, hsa-miR-9, hsa-miR-146a, hsa-miR-155, hsa-miR-21, hsa-miR-424, hsa-miR-34a, hsa-miR-34c, hsa-miR-29a-3p, hsa-miR-603, hsa-miR-200a, hsa-let-7f, hsa-miR-92, hsa-miR-100, hsa-miR-105, hsa-miR-197, hsa-miR-30d, hsa-miR-204, hsa-miR-205, hsa-miR-216, hsa-miR-27b, hsa-miR-30b, hsa-miR-125b-1, hsa-miR-128-1, hsa-miR-135a-1, hsa-miR-141, hsa-miR-125a, hsa-miR-138-1, hsa-miR-186, hsa-miR-362, hsa-miR-302b, hsa-miR-374a, hsa-miR-380-3p, hsa-miR-381, hsa-miR-151, hsa-miR-345, hsa-miR-423, hsa-miR-494, hsa-miR-520a, hsa-miR-518f, hsa-miR-526a, hsa-miR-517a, hsa-miR-517b, hsa-miR-501, hsa-miR-371, hsa-miR-422a, hsa-miR-448, hsa-miR-429, hsa-miR-449, hsa-miR-

451, hsa-miR-518b, hsa-miR-106b-3p, hsa-miR -124, hsa-miR-140-5p, hsa-miR-135a, hsa-miR-384, hsa-miR-142a-5p, hsa-miR-155-5p, hsa-miR-455-5p, hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-1908, hsa-miR-let-7b, hsa-miR-28-3p, hsa-miR-455-3p, hsa-miR-128, hsa-let-7e, hsa-miR-7.

Gli studi condotti su campioni *animali*:

- microRNA downregolati:

mmu-miR-204-3p, mmu-miR-98, mmu-miR-330, mmu-miR-186, mmu-miR-101a-3p, mmu- miR-107, mmu-miR-132, mmu-miR-137, mmu-miR-1187;

- microRNA upregolati:

mmu-miR-10a, mmu-miR-199a, mmu-miR-141, mmu-miR-200a, mmu-miR -200b, mmu-miR -200c, mmu-miR-96, mmu-miR-182, mmu-miR-183, mmu-miR-181a, mmu-miR-429, mmu-miR -138.

Data l'elevata quantità di dati raccolti, per proseguire nelle nostre ricerche abbiamo optato per considerare solamente quelli derivanti da campioni umani.

I miRNA selezionati (up- e down-regolati in AD) sono stati successivamente inseriti ed analizzati mediante l'utilizzo di Mienturnet.

Per condurre l'analisi è stata scelta la piattaforma TargetScan come database di riferimento delle interazioni microRNA-target.

Per quanto riguarda i microRNA downregolati, dei 140 miRNA inseriti, 77 sono stati riconosciuti dal programma ed analizzati. I restanti 66 microRNA, sebbene presenti in miRBase, non sono stati riconosciuti e vengono riportati nel pannello 'IDs not Found': questi microRNA non sono presenti nei database utilizzati da Mienturnet, TargetScan e MiRTarBase.

Per quanto riguarda i microRNA upregolati, di 155 microRNA inseriti solamente 3 non sono stati riconosciuti mentre 152 sono stati riconosciuti ed analizzati.

Le input list utilizzate per l'analisi in Mienturnet sono riportate nei fogli Excel 1 (*input list-microRNA down*) e 2 (*input list-microRNA up*) nella sezione Dati Supplementari.

I dati raccolti in seguito all'analisi effettuata con Mienturnet sono riportati nei Fogli Excel 3 (*microRNA DOWN-Mienturnet Enrichment results TargetScan*) e 4 (*microRNA UP- Mienturnet Enrichment results\_TargetScan*) nella sezione Dati Supplementari.

Nei file sono presenti i geni target di ciascun microRNA dell'input list e per ciascun gene vengono indicati il numero di interazioni ed i microRNA che con esso interagiscono.

Alcuni geni, tra quelli raccolti, sono stati selezionati in base alla significatività (valore minimo di p-value pari a 0,001021278 per i miRNA down-regolati e

0,001061784 per i miRNA up regolati) ed utilizzati per condurre un'ulteriore analisi mediante il tool presente in Reactome.

I geni utilizzati per l'analisi in Reactome sono riportati nelle tabelle 2 e 3 sottostati.

**Tabella 2- geni target di microRNA downregolati in AD**

<b>Geni microRNA-DOWN</b>	
<b>Gene Symbol</b>	<b>p-value</b>
FRAT2	1,96779E-05
TIGD5	1,96779E-05
ZBTB37	2,8865E-05
MTMR10	4,72848E-05
SMS	4,72848E-05
PDIK1L	9,28602E-05
PRR14L	9,8807E-05
ICOS	0,000108
DCUN1D4	0,000114165
SEC31B	0,000121977
ATP11C	0,000129872
PPP2R5E	0,000142776
ADAMTS18	0,000201986
PDK4	0,000201986
POM121C	0,000201986
STAG1	0,000201986
AMMECR1	0,000213971
CNNM2	0,000218532
SOX5	0,000265761
ZBTB16	0,000265761
DLG2	0,000286272
JARID2	0,000286272
RUNX1T1	0,000297646
CDK8	0,000301684
EXOC5	0,000313315
DAPK1	0,000345726

ZCCHC2	0,000349672
MMS19	0,000370252
SLC25A37	0,000370252
TNFAIP3	0,000370252
FOXP1	0,000383442
CHD9	0,000449206
ADAMTS5	0,000481161
STOX2	0,000482341
EPC1	0,000570743
EMX2	0,00059839
SLC2A14	0,00059839
PCGF3	0,000631735
SYT2	0,000631735
LRP4	0,000636128
TRIB2	0,000636128
OTUD4	0,000830089
AQP11	0,000843128
AZI2	0,000843128
GOLM1	0,000843128
SIPA1L2	0,000845295
TGFBR3	0,000847844
RAB30	0,000872844
CAMSAP2	0,000914051
LIN28B	0,000914051
SERBP1	0,000914051
TGFB2	0,000914051
PTEN	0,000974304
RNF38	0,001021278

**Tabella 3- geni target di microRNA upregolati in AD**

<b>Geni microRNA-UP</b>	
<b>Gene Symbol</b>	<b>p-value</b>
BAHD1	7,03152E-05
DHX40	0,00012793
NEO1	0,000204943
MMD	0,000299692
SSX2IP	0,000391314
ADAMTS9	0,000407773
LRRC8B	0,00047758
ARRDC4	0,000486026
GRHL1	0,000486026
C16orf52	0,000605904
A1CF	0,000993297
CDR2L	0,000993297
RNF144A	0,000993297
MIER3	0,001061784

Lo strumento, per ciascuna lista di geni inserita, permette di identificare i pathways nei quali i geni sono coinvolti e seleziona, in base al p-value, i 25 pathways più significativi.

Questi pathways, per ciascuna ricerca, vengono raccolti in un file scaricabile (*Pathway Analysis Report*) nel quale viene riportata anche una breve descrizione di ciascun pathway.

I due file ottenuti dall'analisi in Reactome, 5- *Report* Geni MicroRNA-Down e 6- *Report* Geni MicroRNA-Up, sono riportati nella sezione Dati Supplementari.

Tra i pathways più significativi, abbiamo scelto di proseguire la ricerca concentrando la nostra attenzione sul primo pathway dei 25 riportati in entrambi i Report.

Sono stati dunque selezionati:

1- *Beta-catenin phosphorylation cascade* (Pathway Analysis Report -Geni MicroRNA-Down),

2- *Netrin-1 signaling* (Pathway Analysis Report- Geni MicroRNA-Up).

Nel primo pathway sono coinvolti FRAT2 e PPP2R5E, geni target di microRNA down-regolati nella malattia di Alzheimer come risultato dall'analisi di arricchimento effettuata da Mienturnet.

FRAT2 è target di: hsa-miR-221-3p, hsa-miR-22-3p, hsa-miR-23a-3p/hsa-miR-23b-3p, hsa-miR-26a-5p/hsa-miR-26b-5p, hsa-miR-29b-3p;

PPP2R5E è target di: hsa-miR-132-3p/hsa-miR-212-3p, hsa-miR-133b, hsa-miR-148a-3p, hsa-miR-181c-5p, hsa-miR-200a-3p, hsa-miR-221-3p, hsa-miR-23a-3p/hsa-miR-23b-3p, hsa-miR-301a-3p, hsa-miR-342-3p, hsa-miR-502-3p.

Nel secondo pathway è coinvolto il gene NEO1 target di microRNA up-regolati nella malattia di Alzheimer come risultato dall'analisi di arricchimento effettuata da Mienturnet.

NEO1 è target di: hsa-miR-125a-5p/hsa-miR-125b-5p, hsa-miR-128-3p/hsa-miR-128-3p/hsa-miR-216a-3p/ hsa-miR-216a-5p, hsa-miR-216b-5p, hsa-miR-27b-3p, hsa-miR-374a-5p, hsa-miR-429, hsa-miR-92a-3p/hsa-miR-92b-3p, hsa-miR-9-5p.

Si è proceduto con una ricerca *Pubmed* per verificare il coinvolgimento dei due pathways selezionati nella malattia di Alzheimer.

- Pathway della  $\beta$ -catenina

La  $\beta$ -catenina è una proteina multifunzionale che svolge un ruolo cruciale come fattore trascrizionale del pathway di segnalazione Wingless–Int (Wnt).

Le WNT sono glicoproteine ricche in cisteina, secrete dalle cellule nella matrice extracellulare che attivano vie di segnalazione mediate

dall'attivazione di recettore nelle cellule nell' immediata prossimità. Il

ligando Wnt, legandosi al complesso recettore, induce un cambiamento

conformazionale del recettore e fosforilazione di proteine target dando inizio

alla segnalazione intracellulare. La famiglia delle proteine WNT è composta

da almeno 19 glicoproteine, altamente conservate tra le specie (dagli

invertebrati ai mammiferi) (206).

I pathways di segnalazione Wnt ad ora caratterizzati sono:

1. Via canonica Wnt: dipendente da  $\beta$ -catenina

2. Via non canonica, indipendente dalla  $\beta$ -catenina che si divide

ulteriormente in:

a) Via non canonica per la polarità delle cellule planari (PCP): il pathway PCP è coinvolto nel riarrangiamento del citoscheletro, nella motilità cellulare e nella coordinazione della polarità cellulare.

Nei vertebrati, la via PCP è necessaria per la morfologia e la migrazione delle cellule dorsali del mesoderma, organizzazione dei follicoli piliferi, orientamento delle stereociglia nell'epitelio sensoriale dell'orecchio interno (207).

b) via dipendente dal calcio che gioca un ruolo cruciale in diversi processi tra cui la formazione durante le fasi della gastrulazione, il destino delle cellule ventrali, la formazione dell'asse dorsale, la formazione di vari organi e l'omeostasi tissutale (207).

Il pathway maggiormente studiato è quello canonico, Wnt/ $\beta$ -catenina, che controlla l'espressione dei geni target stabilizzando la  $\beta$ -catenina citoplasmatica ed inducendo la riorganizzazione del citoscheletro cellulare: gioca quindi un ruolo cruciale in diversi processi cellulari come il differenziamento, migrazione cellulare e omeostasi tissutale (208).

La via canonica di segnalazione Wnt/ $\beta$ -catenina viene attivata attraverso il legame di proteine Wnt al dominio extracellulare ricco di cisteina dei recettori

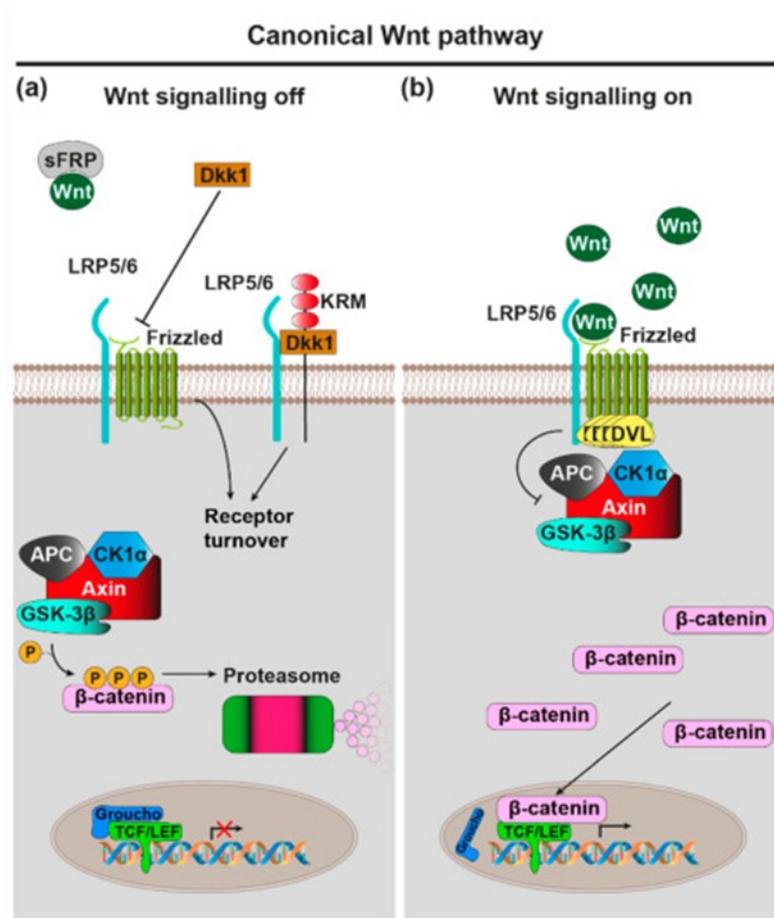
della famiglia Frizzled (Fzd) e ad un cofattore - Low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) o LRP6.

Il legame di Wnt a Fz-LRP5/6 porta, attraverso il reclutamento della proteina scaffold Disheveled (Dvl), all' inattivazione del complesso multiproteico formato da Axina (adaptor axis inhibition protein), CK1 (Casein chinasi 1), GSK3 $\beta$  (glycogen synthase kinase-3 $\beta$ ) ed APC (tumor suppressor adenomatous polyposis coli gene product) che generalmente fosforila la  $\beta$ -catenina indirizzandola alla degradazione proteasomica.

La  $\beta$ -catenina si accumula nel citoplasma e successivamente passa nel nucleo dove, associandosi a fattori trascrizionali appartenenti alla famiglia TCF/LEF (T-cell factor/lymphoid enhancer binding factor- repressori), attiva la trascrizione di geni target del pathway Wnt/  $\beta$ -catenina che sono noti avere un ruolo nella proliferazione, nel differenziamento durante lo sviluppo ma anche nell'omeostasi dei tessuti adulti (209) .

In assenza del ligando Wnt legato ai recettori di superficie Fz-LRP5/6, la  $\beta$ -catenina presente nel citoplasma forma un complesso con Axina/APC/CK1 $\alpha$ /GSK-3 $\beta$ , viene fosforilata ed indirizzata al proteasoma: il pathway di segnalazione Wnt/ $\beta$ -catenina è inattivo ed i geni target sono in tal modo repressi dalle proteine della famiglia TCF/LEF.

TCF reprime l'espressione genica interagendo con il repressore Groucho che promuove la deacetilazione istonica e la condensazione della cromatina (210).



**Figura 21- Pathway canonico di segnalazione Wnt (209).** *a) pathway Wnt/ $\beta$ -catenina 'off': in assenza del ligando Wnt legato al recettore eterodimerico di superficie (Fz)-LRP5/6, il complesso di distruzione Axina/APC/CK1 $\alpha$ /GSK-3 $\beta$  fosforila il fattore trascrizionale  $\beta$ -catenina marcandolo per la degradazione nel proteasoma. Antagonisti endogeni come sFRP e Dkk1 favoriscono lo stato inattivo del pathway;* *(b) pathway Wnt/ $\beta$ -catenina 'on': il legame tra Wnt e Fz-LRP5/6 determina il reclutamento della proteina scaffold DVL che a sua volta inibisce l'attività di GSK-3 $\beta$  nel complesso di distruzione. La  $\beta$ -catenina accumulata nel citoplasma, passa nel nucleo dove attiva l'espressione mediata dai fattori trascrizionali TCF/LEF dei geni target del pathway Wnt.*

La segnalazione Wnt può essere modulata da un certo numero di agonisti ed antagonisti endogeni.

Vi sono sette famiglie di antagonisti secreti tra cui la famiglia delle proteine Dickkopf (Dkks), sFRPs (secreted Frizzled-related proteins), WIF-1 (Wnt inhibitory factor 1), Wise/SOST, Cerberus IGFBP-4 (insulin-like growth factor binding protein 4), Notum e quattro famiglie di antagonisti transmembrana Shisa, Waif1/5T4 (Wnt-activated inhibitory factor 1), (APCDD1 adenomatosis polyposis coli down-regulated 1) e Tiki. Questi antagonisti esercitano la loro funzione sequestrando/inattivando le proteine Wnt secrete (es sFRP, Notum etc.) o bloccando/sequestrando gli elementi del complesso recettoriale (es. Dkk1, Wise/SOST, IGFBP-4).

Due sono invece le famiglie di proteine secrete che agiscono da agonisti del pathway Wnt: R-spondine (Rspo) e la norrina.

Le R-spondine stimolano il pathway canonico Wnt/ $\beta$ -catenin promuovendo l'internalizzazione del dominio transmembrana E3 dell'ubiquitina ligasi ZNRF3 che generalmente determina la degradazione di Fz e LRP6. La norrina sebbene non sia strutturalmente correlata alle Wnts, lega Fz4/LRP5 attivando il pathway Wnt/ $\beta$ -catenina (209).

Nel sistema nervoso centrale il pathway Wnt/ $\beta$ -catenina è essenziale nella trasduzione del segnale che regola numerosi processi cellulari tra cui la

sopravvivenza neuronale e la neurogenesi ma è anche importante per la regolazione della plasticità sinaptica, l'integrità e funzione della barriera ematoencefalica, la biologia della microglia (cellule immunitarie residenti nel SNC) (211).

Questi processi chiave sono significativamente influenzati nell'AD, aumentando la possibilità che la deregolazione della segnalazione di Wnt possa svolgere un ruolo importante in aspetti diversi di questa malattia complessa.

Tra le prime evidenze che l'alterazione del pathway di segnalazione Wnt potesse essere coinvolto nella malattia di Alzheimer vi è quella riportata da uno studio nel quale è stata dimostrata correlazione tra un polimorfismo nel promotore di GSK3 $\beta$  che ne determina aumento dell'attività e la maggiore suscettibilità allo sviluppo di LOAD: GSK3 $\beta$  aumentando la sua attività promuove la degradazione della  $\beta$ -catenina determinando riduzione del pathway canonico (212).

Evidenze aggiuntive che suggeriscono che la downregolazione della segnalazione Wnt contribuisca alla patogenesi di AD sono:

- L'upregolazione dei livelli di Dkk1, antagonista del pathway canonico Wnt, nel cervello dei pazienti con malattia di Alzheimer e nei modelli di topo AD: interagendo con i co-recettori LRP5/6, impedisce il legame

delle proteine Wnt sia con i recettori Frizzled che con i co-recettori LRP5/6. Ciò comporta aumento dell'attività di GSK3 $\beta$  e riduzione dei livelli di  $\beta$ -catenina citoplasmatica- caratteristiche osservate nel cervello di pazienti AD (208);

- I livelli dell' mRNA e della proteina LRP6 (co-recettore fondamentale del pathway Wnt/ $\beta$ -catenina) significativamente ridotti nel cervello di pazienti con malattia di Alzheimer rispetto ai controlli (213): esperimenti in vivo ed in vitro hanno dimostrato che la downregolazione di LRP6 è in grado di stimolare il processo amiloidogenico di APP contribuendo all' aumento della produzione di A $\beta$ <sub>40</sub> e A $\beta$ <sub>42</sub>, alla formazione di placche e conseguente compromissione della funzione e stabilità sinaptica (214).
- L' incremento dell'attività di GSK3 $\beta$  chinasi, osservata nel cervello AD, contribuisce all' iperfosforilazione di tau, segno patologico caratteristico della malattia. La sovraespressione di GSK3 $\beta$  nel cervello provoca neurodegenerazione e deficit dell'apprendimento (215).

Visto il coinvolgimento del pathway Wnt/ $\beta$ -catenina nella patogenesi della malattia di Alzheimer, la modulazione del pathway Wnt/ $\beta$ -catenina nel

cervello di pazienti affetti dalla patologia potrebbe rappresentare un'opportunità unica per nuovi approcci terapeutici.

Tuttavia, il pathway Wnt è altamente complesso poiché possiede numerosi punti di cross-talk con altri pathways di segnalazione e processi cellulari e ciò lo rende un target difficile da controllare senza causare effetti collaterali indesiderati.

Un modo per procedere potrebbe essere quello di identificare modalità per mirare specificatamente al pathway di segnalazione Wnt ad esempio

1) mirando a specifici componenti del pathway che risultano alterati nella malattia di Alzheimer o 2) mirando a componenti che sono selettivamente espressi in specifici tipi cellulari (209).

- Pathway della Netrina

La netrina-1, il membro meglio caratterizzato della famiglia delle netrine e membro della superfamiglia delle laminine, organizza la connettività del network neuronale in modo bifunzionale- promuovendo l'attrazione o la repulsione in base all'attivazione di differenti recettori o complessi recettoriali.

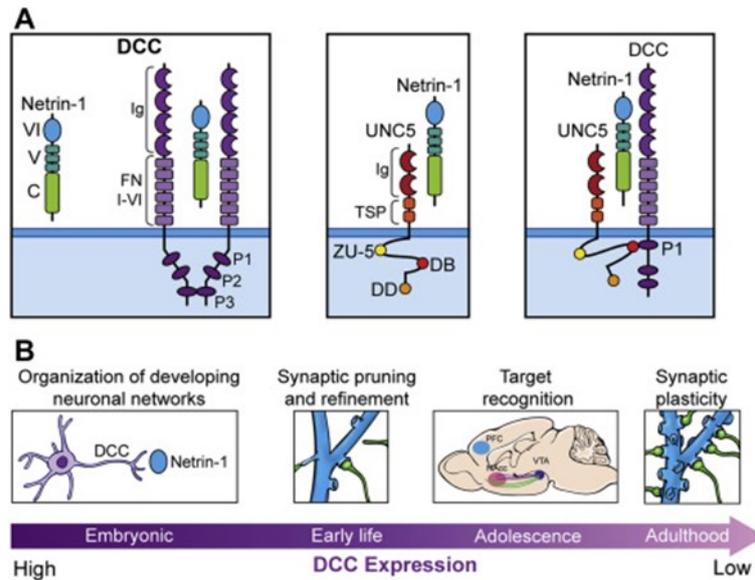
Ci sono due principali famiglie di recettori della Netrina-1: DCC (*deleted in colorectal cancer*) e UNC5 (*uncoordinated-5*) (Figura 22-A).

I recettori DCC mediano l'attrazione mentre i recettori UNC5 da soli o come complessi DCC/UNC5, mediano la repulsione.

La Netrina-1 influenza la crescita assonale segnalando se, quando e dove crescere ed inoltre svolge un ruolo chiave in eventi quali l'arborizzazione assonica, la crescita dendritica, la formazione delle sinapsi.

Queste funzioni sembrano essere specifiche in particolari fasi di sviluppo (figura 22-B) e stati di maturazione e potrebbero essere influenzate da fattori ambientali in senso positivo e negativo.

Diversi studi hanno mostrato il suo ruolo anche nell'angiogenesi, adesione, morfogenesi cellulare, infiammazione e tumorigenesi (216).



**Figura 22- Struttura e Funzione della Netrina-1 e dei suoi recettori (216).**

- A) La Netrina-1 è un membro della superfamiglia delle laminine e una proteina secreta associata con la matrice extracellulare. Il dominio terminale VI è globulare ed è seguito dal dominio V, che è composto da tre fattori di crescita epidermici. Il dominio carbossiterminale (C-domain) è ricco in amminoacidi basici e si lega all'eparina nella matrice extracellulare. I domini VI e V sono responsabili del legame ai recettori. Il recettore DCC è una proteina transmembrana "a singolo passaggio" con un frammento extracellulare composto da 4 domini IG-like che si ripiegano in una conformazione a ferro di cavallo e 6 domini FN (Fibronectin type) di tipo III dove la netrina si lega ai domini 4 e 5. La porzione citosolica di DCC contiene 3 domini- P1, P2, P3- responsabili della segnalazione. La netrina ha 3 siti di legame per DCC e due di questi siti possono legare anche altri recettori della netrina-1 tra cui UNC5. Quando la netrina-1 si lega simultaneamente a due molecole del recettore DCC, induce l'omodimerizzazione di DCC mediata dall'interazione dei loro domini citoplasmatici P3. Questo comporta il reclutamento di mediatori del segnale intracellulari. Il recettore UNC5 è una proteina transmembrana con due domini Ig-like, due domini TSP (Trombospondina) e una coda citoplasmatica composta da tre domini: dominio ZO-1/Unc5 (ZU-5); DB e un dominio MORTE (DD). Quando si legano a netrina-1, UNC5 e DCC formano un complesso recettoriale interagendo attraverso il dominio citosolico di DCC- P1 e i domini di UNC5, ZU-5 e DB.
- B) La segnalazione mediata dal legame netrina-1/DCC influenza la crescita, il targeting e l'arborizzazione degli assoni, la crescita dendritica e la formazione di sinapsi. L'espressione di netrina-1 e DCC decresce con l'avanzare dell'età, dall'infanzia alla vita adulta.

Crescenti evidenze supportano che la netrina-1 è coinvolta nella patogenesi di AD per esempio:

- La netrina-1, attraverso l'interazione con APP, è un regolatore negativo della produzione di A $\beta$  infatti la riduzione dell'espressione della Netrina-1 nel cervello di topi transgenici, modello della malattia di Alzheimer, è associata con l'aumento della concentrazione di A $\beta$  supportando l'ipotesi che la netrina-1 sia un regolatore chiave della produzione di A $\beta$  (217);
- La netrina-1 ha una funzione immunomodulatoria: i suoi livelli sembrano essere correlati al rapporto tra le cellule T helper 17 (Th17) e le cellule T regolatorie (Tregs).

Le Th17 sono cellule altamente proinfiammatorie mentre Tregs giocano un ruolo essenziale nel mantenimento dell'omeostasi immunologica e nella regolazione dell'autoimmunità.

Nel siero e nel liquido cerebrospinale di topi modello AD, il livello ridotto di netrina-1 sembra essere correlato con l'aumento di cellule Th17 e la riduzione delle cellule Tregs con conseguente innesco del processo infiammatorio, componente chiave della patogenesi di AD (218).

Infine, sempre attraverso l'utilizzo di PubMed, abbiamo ricercato composti naturali che fossero in grado di intervenire nella modulazione dei due pathways selezionati e favorirne il ripristino (figure 23 e 24).

È emerso che diversi studi scientifici hanno messo in evidenza come alcuni composti naturali si siano dimostrati in grado di agire su intermedi del pathway di segnalazione Wnt/ $\beta$ -catenina, tra questi troviamo:

- Curcumina

È un polifenolo estratto dal rizoma della *Curcuma Longa*, una pianta floreale della famiglia delle Zingiberaceae; è una spezia alimentare di colore giallo/arancio frequentemente usata nella cucina indiana.

L'estratto di *Curcuma Longa* è largamente utilizzato nella medicina tradizionale come l'ayurvedica e la medicina tradizionale cinese.

La curcumina riduce significativamente l'espressione dell'mRNA e della proteina GSK3 $\beta$ , in maniera dose e tempo dipendente in vitro ed aumenta l'espressione di mRNA e proteina della  $\beta$ -catenina e il fattore trascrizionale ciclina D1 in maniera dose e tempo dipendente, attivando il pathway Wnt/ $\beta$ -catenina (219).

In vivo, la curcumina incapsulata in nanoparticelle che migliorano la biodisponibilità nel cervello stimola la traslocazione nucleare della  $\beta$ -

catenina, riduce i livelli di GSK3 $\beta$  ed aumenta l'attività del promotore TCF/LEF e ciclina D1.

Le nanoparticelle contenenti curcumina migliorano i problemi di apprendimento ed i disturbi della memoria inducendo la neurogenesi nel cervello adulto attraverso l'attivazione del pathway Wnt/ $\beta$ -catenina e potrebbero offrire un approccio terapeutico per il trattamento di malattie neurodegenerative come AD stimolando un meccanismo autoriparativo del cervello (220).

- Ostolo

L' Ostolo, derivato della cumarina presente in diverse piante erbacee come *Cnidium monnieri* e *Angelica pubescens* largamente usate nella medicina tradizionale cinese, inibisce l'espressione GSK3 $\beta$  e stimola l'espressione dell'mRNA della  $\beta$ -catenina.

Attraverso l'attivazione del pathway Wnt/ $\beta$ -catenina aumenta la proliferazione delle cellule staminali neuronali, il differenziamento neuronale e blocca l'apoptosi dei neuroni, assumendo un potenziale ruolo nella prevenzione e trattamento della malattia di Alzheimer (221).

- Puerarina

La puerarina è il principale composto bioattivo (isoflavone) isolato dalla radice della *Pueraria lobata Ohwi* (Kudzo) pianta selvatica rampicante della

famiglia delle Fabacee, originaria dell'Asia orientale. È ampiamente utilizzata nella medicina tradizionale cinese (222).

La puerarina ha dimostrato di attenuare l'iperfosforilazione di tau indotta da A $\beta$ 1-42 nelle cellule SH-SY5Y (linea cellulare di origine umana), attraverso l'inibizione dell'espressione di GSK-3 $\beta$ , l'induzione dell'espressione di  $\beta$ -catenina e ciclina D1 e conseguente attivazione del pathway Wnt/ $\beta$ -catenina.

Per questi effetti la puerarina potrebbe esercitare un effetto protettivo contro la malattia di Alzheimer (223).

- Xanthoceraside

Xanthoceraside, una saponina triterpenoide estratta dalla scorza dei frutti di *Xanthoceras sorbifolia*, è in grado di promuovere la proliferazione ed il differenziamento delle cellule staminali neuronali in neuroni attraverso l'up-regolazione del pathway Wnt/ $\beta$ -catenina permettendo di colmare la perdita neuronale e migliorando così l'apprendimento e la compromissione della memoria nei topi transgenici APP/PS1: determina infatti aumento considerevole dell'espressione di Wnt3a e p-GSK3 $\beta$ , riduzione dell'espressione di p- $\beta$ -catenina ed induzione della traslocazione nucleare della  $\beta$ -catenina (224).

- Sulforafano

Il sulforafano è un composto del gruppo degli isotiocianati appartenente alla famiglia dei composti solforati, presente in diverse specie vegetali come nelle piante della famiglia delle crucifere (broccoli, cavoli e cavolini di Bruxelles).

Determina l'up-regolazione di proteine del pathway Wnt tra cui  $\beta$ -catenina e Ciclina D ed è così in grado di promuovere la proliferazione ed il differenziamento delle cellule staminali neuronali in neuroni.

Ha attratto, negli ultimi anni, attenzione come possibile agente farmacoterapeutico in grado di migliorare la disfunzione cognitiva in AD (225).

- Acido Salvianolico A

Gli acidi salvianolici sono composti polifenolici estratti dalla *Salvia miltiorrhiza* (Danshen) ed ampiamente utilizzati nella medicina tradizionale cinese.

L'acido salvianolico A è in grado di promuovere la neurogenesi attraverso la soppressione dell'attività di GSK3 $\beta$  e l'upregolazione della  $\beta$ -catenina (226).

- Resveratrolo

Il resveratrolo è un polifenolo presente in un ampio range di alimenti come frutti di bosco, uva, arachidi e vino.

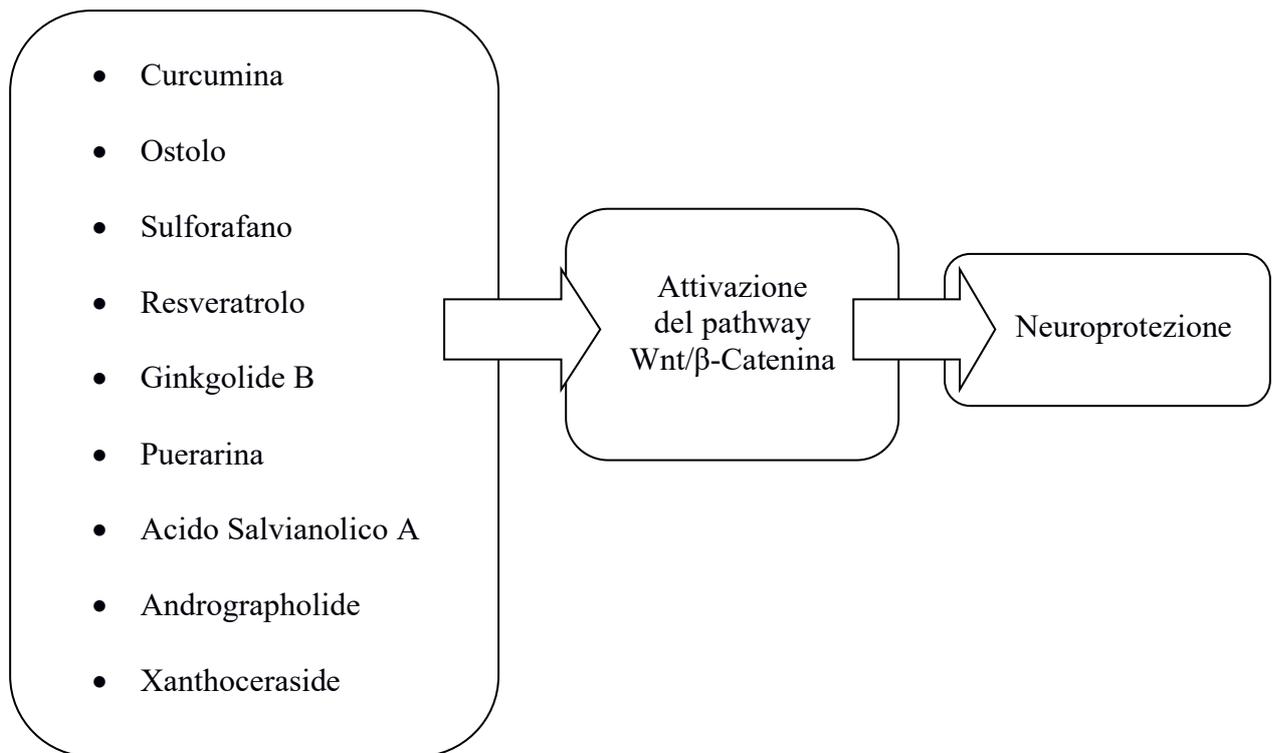
Il resveratrolo si è mostrato in grado di inibire l'attività di GSK3 $\beta$ , indurre cambiamenti nell'espressione di axina1 e Dvl3, incrementare i livelli di  $\beta$ -catenina ripristinando il pathway Wnt/ $\beta$ -catenina ed esercitando, quindi, un ruolo neuroprotettivo in topi modello (SAMP8- Senescence-accelerated prone mouse models) (227).

- Ginkgolide B

Ginkgolide B (GB) terpenoide estratto dal *Ginkgo biloba* (pianta gimnosperma) unica specie sopravvissuta della famiglia Ginkgoaceae – dalle origini antichissime ed originario dell'Asia – che viene utilizzato per scopi curativi (chiamato anche albicocco d'argento) è in grado di aumentare il livello di  $\beta$ -catenina nucleare, probabilmente attraverso l'inibizione di GSK3 $\beta$ , attivando il pathway Wnt/ $\beta$ -catenina e promuovendo il differenziamento delle cellule neuronali staminali (228).

- Andrographolide

L' Andrographolide è un diterpenoide labdano isolato da stelo e foglie di *Andrographis paniculata*, pianta erbacea annuale della famiglia Acanthaceae. Nell'ippocampo di topi transgenici modello di AD, attraverso l'inibizione di GSK3 $\beta$  e l'incremento dei livelli di  $\beta$ -catenina, è in grado indurre l'attivazione del pathway Wnt e la trascrizione di geni target di Wnt coinvolti nella neurogenesi (229).



***Figura 23- Rappresentazione schematica dei composti naturali in grado di ripristinare il pathway Wnt/β-Catenina***

- Colina

La colina, ammina spesso detta anche vitamina J simile alle vitamine del gruppo B, viene prodotta a livello endogeno dalle cellule del corpo umano ma in quantità non sufficienti a soddisfare il fabbisogno. E' presente anche in alimenti come nel latte materno, nel tuorlo d'uovo, nei semi di soia, nel germe di grano, nel fegato di vitello e tacchino e nel lievito di birra.

La colina è un nutriente essenziale che produce acetilcolina, neurotrasmettitore essenziale per il cervello e le funzioni del sistema nervoso centrale tra cui la memoria, il controllo muscolare e l'umore (230); rappresenta il substrato per la formazione della fosfatidilcolina e della

sfingomieline, principali componenti delle membrane di cellule nervose e non, necessarie per la trasduzione del segnale, lo sviluppo cerebrale e crescita fetale. È anche la principale fonte alimentare di gruppi metili che, attraverso modificazioni epigenetiche possono influenzare l'espressione genica (231).

In studi condotti sui topi è stato rilevato che la disponibilità di colina alimentare materna durante la gestazione è in grado di influenzare i livelli di netrina-1 e DCC partecipando così alla modulazione della neurogenesi, migrazione neuronale, sopravvivenza e differenziamento cellulare durante lo sviluppo fetale dell'ippocampo: un apporto materno inadeguato di colina al feto in via di sviluppo può causare difetti neuronali alla nascita e compromissione delle capacità cognitive postnatali (232).

La supplementazione di colina alimentare rappresenta un potenziale intervento per la prevenzione ed il trattamento della malattia di Alzheimer: in studi condotti su topi, la supplementazione di colina materna migliora la memoria spaziale della prole, le capacità attentive dei giovani adulti, riduce e previene il normale declino cognitivo correlato all'età (231); in topi modello di AD, un regime alimentare arricchito in colina durante il corso della vita ha determinato rallentamento del declino cognitivo (233).

- Metionina e vitamine

La metionina è un amminoacido essenziale presente in elevate quantità in noci, carne di manzo, agnello, tacchino, maiale, pesce, crostacei, formaggio, uova, latticini e fagioli.

Dal metabolismo della metionina viene prodotta l'omocisteina, amminoacido solforato essenziale (234).

La vitamina B6 è presente nelle carni, soprattutto bianche, nel pesce (tonno, salmone, crostacei), negli spinaci, nelle patate, nei legumi, nella frutta secca ed anche nella frutta fresca, eccetto gli agrumi (235).

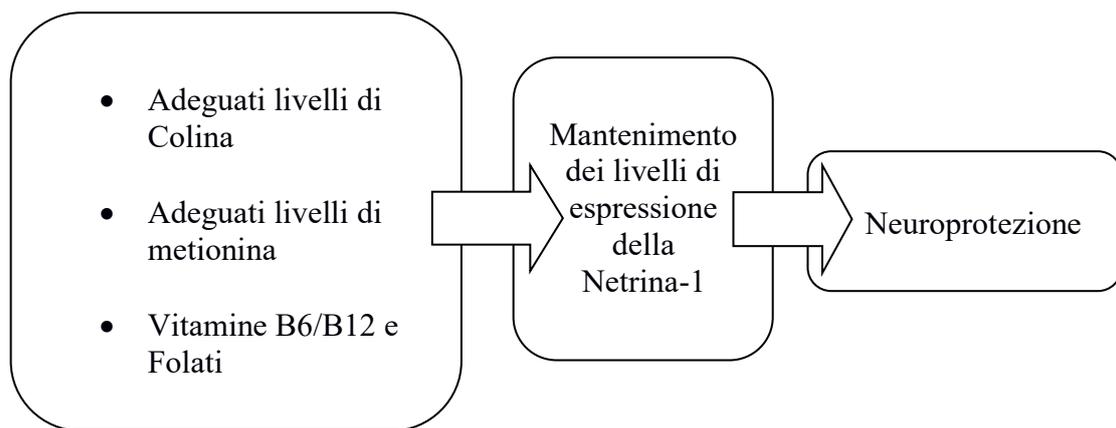
La vitamina B12, a differenza di buona parte delle altre vitamine, è presente solo nei prodotti di derivazione animale: la troviamo nella carne (specialmente nelle carni rosse e in larga misura in fegato e reni), nel pesce, nei molluschi ma anche nelle uova, nel latte e nei suoi derivati (236).

I folati sono presenti in alimenti di origine vegetale come le verdure a foglia verde (spinaci, broccoli, asparagi, lattuga), i legumi (fagioli, piselli), la frutta (kiwi, fragole e arance) e la frutta secca (come mandorle e noci); per quanto riguarda i cibi di origine animale, il fegato e altre frattaglie ne hanno contenuti piuttosto elevati, come pure alcuni formaggi e le uova (237).

I folati e le vitamine B6 e B12 sono essenziali per il metabolismo dell'omocisteina che avviene attraverso la rimetilazione a metionina o la transulfurazione a cisteina.

In esperimenti condotti su topi è stato rilevato che una dieta ad elevato contenuto di metionina e basso contenuto di vitamine B6/B12 e folati determina alterazioni dell'apprendimento e della memoria attraverso l'aumento del livello di metilazione globale del DNA e conseguente silenziamento del gene della netrina-1: in questi topi il promotore del gene della netrina risulta ipermetilato ed il livello della proteina ridotto con conseguente alterazione delle capacità cognitive (234).

Mantenendo con la dieta giornaliera un giusto introito di metionina (13mg/kg) e vitamine potrebbe essere possibile, attraverso la riduzione dell'ipermetilazione del promotore del gene della netrina-1, mantenere la normale espressione della Netrina-1 e prevenire lo sviluppo della patologia di Alzheimer (238).



*Figura 24: Rappresentazione schematica dei composti naturali in grado di influenzare il pathway della netrina-1*

## DISCUSSIONE

Diversi studi scientifici hanno documentato differenze significative nei profili di espressione dei miRNA in soggetti affetti da malattia di Alzheimer rispetto a controlli sani.

I microRNA deregolati sembrano essere correlati con i meccanismi patogenetici di AD e coinvolti sia nel suo esordio e sia nella sua progressione nonché con cambiamenti neuropatologici caratteristici tra cui la formazione di placche amiloidi, aggregati neurofibrillari, neuroinfiammazione ed espressione alterata di geni noti per essere coinvolti nella patologia di Alzheimer.

La ricerca scientifica nei confronti dei miRNA si è focalizzata su due aree di interesse: 1) miRNA come possibili biomarkers per la malattia 2) miRNA come possibili target terapeutici.

I microRNA oltre che nella cellula sono presenti, in forma stabile, nei liquidi corporei come CSF e sangue periferico: la loro analisi è non invasiva, relativamente semplice e meno costosa rispetto ai metodi attualmente utilizzati a supporto della diagnosi di AD, come RMN e PET.

Sebbene numerosi studi siano stati effettuati, l'utilizzo di miRNA come biomarkers per AD ha ancora tante sfide da superare tra cui la necessità di standardizzazione della metodologia di analisi nei liquidi corporei, la

mancanza di evidenze sufficienti per stabilire un cutoff, la necessità di stabilire criteri di inclusione di pazienti e controlli negli studi per garantire riproducibilità e validazione dei miRNA identificati.

Un biomarker specifico e sensibile per AD non è al momento disponibile, ma la ricerca sui miRNA è in corso: in un futuro prossimo si spera di giungere alla definizione di profili di espressione di miRNA, in particolare nel sangue periferico, specifici per la malattia di Alzheimer che ne permettano la diagnosi precoce, la stadiazione e la valutazione della progressione di malattia.

Gli studi condotti fin ora hanno messo in evidenza come alcuni miRNA siano in grado di modulare l'espressione di geni potenzialmente coinvolti nell'AD. Questo ha spinto i ricercatori a sviluppare delle strategie terapeutiche basate sugli stessi miRNA, dato che le terapie disponibili non hanno avuto successo nel trattamento o nel rallentamento della progressione di AD.

La modulazione a scopo terapeutico dei microRNA può essere effettuata in due modi (110):

1. inibendo la funzione dei miRNA attraverso un oligonucleotide antisense a singolo filamento (ASO) complementare;
2. aumentando o ripristinando i livelli fisiologici dei miRNA attraverso la somministrazione di composti che stimolano la loro produzione o

attraverso un miRNA sintetico a doppio filamento che ha la stessa funzione del miRNA endogeno (miRNA mimics).

La regolazione mediata dai microRNA è sequenza specifica e un singolo miRNA può agire su decine o centinaia di geni target, fornendo un'entusiasmante opportunità per regolare networks e pathways di questa complessa malattia.

Tuttavia, sebbene ci sia stato nel corso degli ultimi anni un numero considerevole di clinical trials su trattamenti terapeutici basati sui miRNA, nessuno ad oggi è entrato ancora in fase 3.

Tra i problemi da superare ci sono: la necessità di identificare miRNA target ottimali per ciascuna patologia e la necessità di ottimizzare i carrier rendendoli specifici e stabili allo scopo di ottenere bassa tossicità e ridotti effetti off target.

La definizione di interventi basati sui miRNA che permettano di ripristinare contemporaneamente diversi pathways alterati nella malattia, rappresenta ad oggi, una delle più interessanti prospettive future per il trattamento dell'Alzheimer.

Il numero sempre maggiore di evidenze che sottolineano l'importanza della deregolazione dei microRNA in AD ci ha portato ad indagare, nel nostro

studio, la funzione biologica dei microRNA al fine di individuare innanzitutto i pathways alterati ad essi correlati.

La ricerca in silico ci ha permesso di ottenere informazioni riguardo i microRNA di interesse.

A seguito della raccolta bibliografica su PubMed e inserendo i miRNA up o down-regolati in Mienturnet è stato possibile risalire ai loro geni target di cui però non è stato possibile rilevare i livelli di espressione.

I geni target più significativi trovati sono stati quindi inseriti in Reactome che ha fornito alcuni pathways nei quali questi geni sono potenzialmente coinvolti ma non informazioni specifiche sulla possibile deregolazione nella malattia di Alzheimer.

Tra i pathways più significativi risultati dalla ricerca con Reactome ne abbiamo quindi selezionati due, Beta-catenin phosphorylation cascade e Netrin-1 signaling, e ne abbiamo valutato il coinvolgimento in AD facendo una ricerca su Pubmed.

Il pathway di segnalazione di Wnt/ $\beta$ -catenin, essenziale per le funzioni cerebrali quali plasticità sinaptica, sopravvivenza neuronale, neurogenesi e integrità della barriera ematoencefalica, inibizione della neuroinfiammazione, inibizione della fosforilazione di tau, inibizione della produzione di  $A\beta$ , è risultato downregolato nei pazienti affetti da AD.

Il pathway di segnalazione della Netrina-1 influenza la crescita assonale (se, quando e dove crescere), svolge un ruolo chiave in eventi quali l'arborizzazione assonica, la crescita dendritica, la formazione delle sinapsi, ha funzione immunomodulatoria e antinfiammatoria e di regolatore negativo della produzione di A $\beta$ : nella malattia di AD è downregolato.

Visto il coinvolgimento dei due pathways menzionati nelle funzioni fisiologiche cerebrali e negli eventi patogenetici che portano ad AD quando deregolati, essi potrebbero rappresentare, in futuro, target terapeutici per la cura della malattia.

Dato che i prodotti naturali sono stati utilizzati per millenni dalla medicina tradizionale per il trattamento di svariate patologie e noto il ruolo dell'alimentazione nel mantenimento dello stato di salute, nel tentativo di proporre un approccio per la modulazione di questi pathways alterati (Wnt/ $\beta$ -catenin e netrina-1) in AD, abbiamo indagato se composti bioattivi e componenti alimentari fossero in grado di influenzarli.

Attraverso una ricerca su PubMed abbiamo riscontrato che nell'ultimo decennio molti composti bioattivi sono stati identificati come potenti modulatori del pathway di segnalazione Wnt/ $\beta$ -catenina, tra questi:

- Curcumina che in vitro riduce significativamente l'espressione dell'mRNA e della proteina GSK-3 $\beta$ , in maniera dose e tempo

dipendente ed aumenta l'espressione di mRNA e proteina della  $\beta$ -catenina (219); in vivo nanoparticelle contenenti curcumina riducono i livelli di GSK3 $\beta$ , aumentano la traslocazione nucleare di  $\beta$ -catenina inducendo la neurogenesi nel cervello adulto e favorendo il miglioramento di problemi di apprendimento e dei disturbi della memoria (220);

- Ostolo, inibisce l'espressione GSK3 $\beta$  e stimola l'espressione dell'mRNA della  $\beta$ -catenina aumentando la proliferazione delle cellule staminali neuronali, il differenziamento neuronale e bloccando l'apoptosi dei neuroni (221);
- Puerarina inibisce l'espressione di GSK3 $\beta$  ed induce l'espressione di  $\beta$ -catenina, attenuando l'iperfosforilazione di tau in colture cellulari umane (223);
- Xanthoceraside determina aumento considerevole dell'espressione di Wnt3a e p-GSK3 $\beta$ , riduzione dell'espressione di p- $\beta$ -catenina ed induzione della traslocazione nucleare della  $\beta$ -catenina promuovendo la proliferazione ed il differenziamento delle cellule staminali neuronali in neuroni, permettendo così di colmare la perdita neuronale e di favorire il miglioramento dell'apprendimento e del deficit di memoria nei topi transgenici APP/PS1 (224);

- Sulforafano determina l'up-regolazione di proteine del pathway Wnt tra cui  $\beta$ -catenina e Ciclina D ed è così in grado di promuovere la proliferazione ed il differenziamento delle cellule staminali neuronali in neuroni (225);
- Acido salvianolico A che attraverso la soppressione dell'attività di GSK3 $\beta$  e l'upregolazione della  $\beta$ -catenina promuove la neurogenesi (226);
- Resveratrolo inibisce l'attività di GSK3 $\beta$ , induce cambiamenti nell'espressione di axina1 e Dvl3, incrementa i livelli di  $\beta$ -catenina esercitando un ruolo neuroprotettivo in topi modello (227);
- Ginkgolide B aumenta il livello di  $\beta$ -catenina nucleare, probabilmente attraverso l'inibizione di GSK3 $\beta$ , promuovendo così il differenziamento delle cellule neuronali staminali (228);
- Andrographolide nell'ippocampo di topi transgenici modello di AD, inibisce GSK3 $\beta$  e promuove l'incremento dei livelli di  $\beta$ -catenina (229).

Tutti questi composti di origine naturale sono in grado di up-regolare il pathway Wnt/ $\beta$ -catenina downregolato in AD. Agiscono sulla chinasi GSK3 $\beta$  responsabile della fosforilazione della  $\beta$ -catenina e del suo indirizzamento alla degradazione proteasomale, favorendo così l'aumento della quantità di  $\beta$ -

catenina non fosforilata, attiva, indispensabile per il corretto funzionamento del pathway di segnalazione e svolgendo un ruolo neuroprotettivo.

Per questi motivi, tali composti potrebbero rappresentare possibili agenti farmacoterapeutici per il trattamento di AD, tuttavia, ad oggi ci sono limitazioni all'applicazione terapeutica dovute alla loro scarsa biodisponibilità.

Sono dunque necessari ulteriori studi che permettano di stabilirne quantità e metodi di somministrazione ottimali per permetterne l'uso clinico.

Per quanto riguarda il pathway della netrina-1 tra i componenti alimentari che ne permettono la modulazione, upregolandolo, abbiamo identificato:

- Colina, la cui disponibilità durante la gestazione è in grado di influenzare i livelli di netrina-1 e DCC partecipando così alla modulazione della neurogenesi, migrazione neuronale, sopravvivenza e differenziamento cellulare: un apporto materno inadeguato di colina al feto in via di sviluppo può causare difetti neuronali alla nascita e compromissione delle capacità cognitive postnatali (232).

Di contro un regime alimentare arricchito in colina determina, in topi modello AD, rallentamento del declino cognitivo (231);

- Metionina, vitamine B6/B12 e folati: in esperimenti condotti su topi è stato rilevato che una dieta ad elevato contenuto di metionina e basso

contenuto di vitamine B6/B12 e folati determina alterazioni dell'apprendimento e della memoria attraverso l'aumento del livello di metilazione globale del DNA e conseguente silenziamento del gene della netrina-1 (234).

Assumendo un corretto introito di metionina (13mg/kg) e vitamine con la dieta, si ottiene una riduzione dell'ipermetilazione del promotore del gene della netrina-1 mantenendone la normale espressione. Ciò dovrebbe prevenire lo sviluppo della patologia di Alzheimer (238).

Questi risultati mostrano come anche l'alimentazione quotidiana, con le sue componenti, possa svolgere un ruolo chiave nella modulazione di pathways alterati coinvolti nella patogenesi di AD e come potrebbe influenzare l'esordio e progressione della malattia.

Un modello dietetico specifico per la malattia di Alzheimer non è ancora stato definito ma numerosi studi hanno mostrato come la dieta mediterranea sia associata a minor rischio di sviluppare AD, proteggendo da declino cognitivo e demenza.

Non esiste una singola dieta mediterranea ma ci sono diversi adattamenti basati sulle differenze culturali delle singole regioni; tuttavia tutti i Paesi del Mediterraneo condividono le stesse caratteristiche dietetiche chiave.

La dieta mediterranea è caratterizzata da alto consumo di frutta fresca, vegetali, legumi, grano integrale, semi e frutta secca, moderato consumo di pesce e pollame, consumo ridotto o moderato di latticini (soprattutto yogurt o formaggio), ridotto consumo di carne rossa, grano raffinato, zuccheri raffinati, cibi pronti e l'uso di olio extravergine di oliva come principale fonte di grassi.

La potenzialità della MeDi di prevenire la neurodegenerazione è stata attribuita primariamente alla grande varietà di composti bioattivi come polifenoli, fitosteroli, carotenoidi, composti solforati presenti negli alimenti che la caratterizzano e che hanno effetti su diversi meccanismi patogenetici coinvolti nell' AD tra cui anche l'epigenetica.

La dieta è, però, più della somma degli effetti dei suoi componenti: l'interazione e gli effetti sinergici dei singoli componenti occorrono perché i cibi sono consumati nell'ambito di una dieta bilanciata.

Ai fini della prevenzione o cura della malattia di Alzheimer, la scelta dovrebbe orientarsi sul 'modello mediterraneo' inteso non come semplice schema dietetico ma come stile di vita dove il cibo rappresenta uno degli elementi rilevanti insieme con cultura, credenze, tradizioni e piaceri: alla dieta sana (ricca di frutta, verdura, legumi, grano integrale, pesce etc.) e bilanciata dovrebbero essere associati attività fisica e convivialità, aspetti che a loro

volta sono in grado di influenzare lo stato di benessere e salute e che ad oggi sembrano contribuire alla riduzione del rischio di AD.

## CONCLUSIONI

La malattia di Alzheimer è una priorità di sanità pubblica poiché dei 46 milioni di persone compite da demenza nel mondo, rappresenta il 50-60% dei casi.

La gestione della malattia risulta complessa poiché non sono disponibili biomarkers validati che possano essere utilizzati per la diagnosi accurata di malattia di Alzheimer o per la diagnosi differenziale da altre malattie neurodegenerative; inoltre i trattamenti disponibili permettono di mitigare i sintomi senza arrestarne la progressione o permetterne la cura.

La ricerca di biomarkers affidabili e potenziali approcci terapeutici efficaci ha portato i ricercatori a rivolgere la propria attenzione sulle modificazioni epigenetiche, tra cui in particolare il ruolo dei microRNA.

L'alterazione dei livelli dei microRNA sembra essere associata a diversi eventi patogenetici della malattia di Alzheimer e può essere valutata attraverso metodi non-invasivi. Per questo, i microRna potrebbero essere utilizzati come biomarkers per la diagnosi precoce o stadiazione della malattia, tuttavia ad oggi, i profili di espressione specifici per la malattia non sono ancora stati definiti ed ulteriori studi sono necessari.

I livelli dei microRNA inoltre possono essere modulati, essendo le modificazioni epigenetiche reversibili, perciò potrebbero essere utilizzati come target di nuovi trattamenti terapeutici per la cura di AD.

Anche in questo ambito ulteriori studi sono necessari soprattutto perché i microRNA hanno molteplici target e l'azione su uno specifico microRNA potrebbe determinare effetti non desiderati.

In questo ambito di ricerca un ruolo fondamentale è svolto dalla bioinformatica che permette di raccogliere informazioni provenienti da fonti diverse, identificare i potenziali target dei microRNA e valutarne il coinvolgimento nella patogenesi di AD permettendo di avanzare ipotesi sui meccanismi patogenetici della malattia e sulle strategie di intervento.

I tools bioinformatici offrono dunque la possibilità di ampliare il campo delle conoscenze nell'ambito dell'AD e di delineare possibili approcci per la diagnosi o trattamento, tuttavia anche i tools bioinformatici devono essere migliorati per permettere lo studio delle complesse interazioni tra microRNA, geni e pathways che intervengono nella patologia.

Non essendovi cura, l'approccio migliore per la malattia di Alzheimer, sembra essere l'intervento su fattori di rischio modificabili tra cui riveste grande importanza l'alimentazione.

Numerosi componenti alimentari hanno mostrato di essere in grado di determinare modificazioni epigenetiche e di svolgere un ruolo chiave nei meccanismi associati alla funzionalità cerebrale, inoltre, le abitudini alimentari sono strettamente correlate a condizioni cliniche come diabete, ipertensione ed obesità altri fattori di rischio per AD.

Per questi motivi la scelta di un'alimentazione sana ed equilibrata, che prevede il consumo di alimenti con elevato contenuto di composti bioattivi, come quella mediterranea, e che favorisca il mantenimento dello stato di salute generale, sembra rappresentare attualmente la strada più consona da intraprendere ai fini della prevenzione della malattia di AD.

## BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA

1. Przedborski S, Vila M, Jackson-Lewis V. Neurodegeneration: what is it and where are we?. *J Clin Invest.* 2003;111(1):3-10. doi:10.1172/JCI17522
2. Bekris LM, Yu CE, Bird TD, Tsuang DW. Genetics of Alzheimer disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol.* 2010;23(4):213-227. doi:10.1177/0891988710383571
3. <https://www.airalz.it/i-numeri/>
4. Liu PP, Xie Y, Meng XY, Kang JS. History and progress of hypotheses and clinical trials for Alzheimer's disease. *Sig Transduct Target Ther.* 2019 Aug 23; 4: 29. doi:10.1038/s41392-019-0063-8
5. Hardy J, Allsop D. Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci.* 1991 Oct;12(10):383-8. doi: 10.1016/0165-6147(91)90609-v.
6. Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science.* 2002 Jul 19;297(5580):353-6. doi: 10.1126/science.1072994.
7. Glenner GG, Wong CW. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 1984 May 16;120(3):885-90. doi: 10.1016/s0006-291x(84)80190-4
8. Kametani F, Hasegawa M. Reconsideration of Amyloid Hypothesis and Tau Hypothesis in Alzheimer's Disease. *Front Neurosci.* 2018 Jan; 12:25. doi:10.3389/fnins.2018.00025
9. Ferreira ST, Lourenco MV, Oliveira MM, De Felice FG. Soluble amyloid- $\beta$  oligomers as synaptotoxins leading to cognitive impairment in Alzheimer's disease. *Front Cell Neurosci.* 2015 May 26;9:191. doi: 10.3389/fncel.2015.00191.
10. Querfurth HW, LaFerla FM. Alzheimer's disease. *N Engl J Med.* 2010 Jan 28;362(4):329-44. doi: 10.1056/NEJMra0909142.
11. Kim J, Chakrabarty P, Hanna A, et al. Normal cognition in transgenic BRI2-A $\beta$  mice. *Mol Neurodegener.* 2013;8:15. Published 2013 May 12. doi:10.1186/1750-1326-8-15
12. Chételat G, La Joie R, Villain N, Perrotin A, de La Sayette V, Eustache F, Vandenberghe R. Amyloid imaging in cognitively normal individuals, at-risk populations and preclinical Alzheimer's disease. *Neuroimage Clin.* 2013 Mar 5; 2:356-65. doi: 10.1016/j.nicl.2013.02.006.

13. StressMarq Biosciences Inc. "A Comparison Between the Tau Hypothesis and the Amyloid Hypothesis". News-Medical. <https://www.news-medical.net/whitepaper/20200127/A-Comparison-Between-the-Tau-Hypothesis-and-the-Amyloid-Hypothesis.aspx>. (accessed May 20, 2021).
14. Iqbal K, Liu F, Gong CX, Grundke-Iqbal I. Tau in Alzheimer disease and related tauopathies. *Curr Alzheimer Res.* 2010; 7(8):656-664. doi:10.2174/156720510793611592
15. Mohandas E, Rajmohan V, Raghunath B. Neurobiology of Alzheimer's disease. *Indian J Psychiatry.* 2009;51(1):55-61. doi:10.4103/0019-5545.44908
16. Frost B, Jacks RL, Diamond MI. Propagation of tau misfolding from the outside to the inside of a cell. *J Biol Chem.* 2009;284(19):12845-12852. doi:10.1074/jbc.M808759200
17. Busche MA, Hyman BT. Synergy between amyloid- $\beta$  and tau in Alzheimer's disease. *Nat Neurosci.* 2020 Oct;23(10):1183-1193. doi: 10.1038/s41593-020-0687-6.
18. Davies P, Maloney AJ. Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet.* 1976 Dec 25;2(8000):1403. doi: 10.1016/s0140-6736(76)91936-x. PMID: 63862.
19. Deardorff WJ, Feen E, Grossberg GT. The Use of Cholinesterase Inhibitors Across All Stages of Alzheimer's Disease. *Drugs Aging.* 2015 Jul;32(7):537-47. doi: 10.1007/s40266-015-0273-x. PMID: 26033268.
20. Ferreira-Vieira TH, Guimaraes IM, Silva FR, Ribeiro FM. Alzheimer's disease: Targeting the Cholinergic System. *Curr Neuropharmacol.* 2016;14(1):101-115. doi:10.2174/1570159x13666150716165726
21. Picone P, Nuzzo D, Caruana L, Scafidi V, Di Carlo M. Mitochondrial dysfunction: different routes to Alzheimer's disease therapy. *Oxid Med Cell Longev.* 2014; 2014:780179. doi: 10.1155/2014/780179.
22. Swerdlow RH, Khan SM. A "mitochondrial cascade hypothesis" for sporadic Alzheimer's disease. *Med Hypotheses.* 2004;63(1):8-20. doi: 10.1016/j.mehy.2003.12.045.
23. Cenini G, Voos W. Mitochondria as Potential Targets in Alzheimer Disease Therapy: An Update. *Front Pharmacol.* 2019 Aug 23;10:902. doi: 10.3389/fphar.2019.00902.
24. Swerdlow RH. Mitochondria and Mitochondrial Cascades in Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis.* 2018;62(3):1403-1416. doi: 10.3233/JAD-170585.

25. Wang W, Zhao F, Ma X, Perry G, Zhu X. Mitochondria dysfunction in the pathogenesis of Alzheimer's disease: recent advances. *Mol Neurodegener.* 2020 May 29;15(1):30. doi: 10.1186/s13024-020-00376-6.
26. Khachaturian ZS. Calcium, membranes, aging, and Alzheimer's disease. Introduction and overview. *Ann N Y Acad Sci.* 1989; 568:1-4. doi: 10.1111/j.1749-6632.1989.tb12485.x.
27. Tong BC, Wu AJ, Li M, Cheung KH. Calcium signaling in Alzheimer's disease & therapies. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2018 Nov; 1865(11 Pt B):1745-1760. doi: 10.1016/j.bbamcr.2018.07.018.
28. Wang Y, Shi Y, Wei H. Calcium Dysregulation in Alzheimer's Disease: A Target for New Drug Development. *J Alzheimers Dis Parkinsonism.* 2017;7(5):374. doi: 10.4172/2161-0460.1000374
29. Zhang Y, Wang Y, Zhang C, Wang Y, Li H, Li J, Luo Y, Liu D, Bai H. Pharmacological study of nimodipine plus donepezil in treating senile dementia *Int. J. Clin. Exp. Med.*, 2016; 9 (2): 4497-4502
30. Jaeger LB, Dohgu S, Hwang MC, et al. Testing the neurovascular hypothesis of Alzheimer's disease: LRP-1 antisense reduces blood-brain barrier clearance, increases brain levels of amyloid-beta protein, and impairs cognition. *J Alzheimers Dis.* 2009;17(3):553-570. doi:10.3233/JAD-2009-1074
31. Morales I, Guzmán-Martínez L, Cerda-Troncoso C, Farías GA, Maccioni RB. Neuroinflammation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. A rational framework for the search of novel therapeutic approaches. *Front Cell Neurosci.* 2014 Apr 22; 8:112. doi: 10.3389/fncel.2014.00112
32. Ahmad MH, Fatima M, Mondal AC. Influence of microglia and astrocyte activation in the neuroinflammatory pathogenesis of Alzheimer's disease: Rational insights for the therapeutic approaches. *J Clin Neurosci.* 2019 Jan;59:6-11. doi: 10.1016/j.jocn.2018.10.034.
33. Moreno-Arribas MV, Bartolomé B, Peñalvo JL, Pérez-Matute P, Motilva MJ. Relationship between Wine Consumption, Diet and Microbiome Modulation in Alzheimer's Disease. *Nutrients.* 2020 Oct 10;12(10):3082. doi:10.3390/nu12103082
34. Alzheimer's Association. 2021 Alzheimer's Disease Facts and Figures. *Alzheimers Dement* 2021;17(3)
35. <https://www.centroalzheimer.org/>

36. Vermunt L, Sikkes SAM, van den Hout A, Handels R, Bos I, van der Flier WM, Kern S, Ousset PJ, Maruff P, Skoog I, Verhey FRJ, Freund-Levi Y, Tsolaki M, Wallin ÅK, Olde Rikkert M, Soininen H, Spuru L, Zetterberg H, Blennow K, Scheltens P, Muniz-Terrera G, Visser PJ; Alzheimer Disease Neuroimaging Initiative; AIBL Research Group; ICTUS/DSA study groups. Duration of preclinical, prodromal, and dementia stages of Alzheimer's disease in relation to age, sex, and APOE genotype. *Alzheimers Dement*. 2019 Jul;15(7):888-898. doi: 10.1016/j.jalz.2019.04.001
37. Ward A, Tardiff S, Dye C, Arrighi HM. Rate of conversion from prodromal Alzheimer's disease to Alzheimer's dementia: a systematic review of the literature. *Dement Geriatr Cogn Dis Extra*. 2013 Sep 28;3(1):320-32. doi: 10.1159/000354370.
38. Alzheimer A, Stelzmann RA, Schnitzlein HN, Murtagh FR. An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde". *Clin Anat*. 1995;8(6):429-31. doi: 10.1002/ca.980080612.
39. DeTure MA, Dickson DW. The neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener*. 2019 Aug 2;14(1):32. doi: 10.1186/s13024-019-0333-5. PMID: 31375134;
40. Stéphan A, Laroche S, Davis S. Generation of aggregated beta-amyloid in the rat hippocampus impairs synaptic transmission and plasticity and causes memory deficits. *J Neurosci*. 2001 Aug 1;21(15):5703-14. doi: 10.1523/JNEUROSCI.21-15-05703.2001.
41. Wei X, Kwan H K, Robert V, and Swati S. The Amyloid Aggregation Accelerator Diacetyl Prevents Cognitive Decline in Alzheimer's Mouse Models *Chemical Research in Toxicology*. 2021 April 15; 34 (5), 1355-1366. Doi: 10.1021/acs.chemrestox.1c00089
42. Verma M, Vats A, Taneja V. Toxic species in amyloid disorders: Oligomers or mature fibrils. *Ann Indian Acad Neurol*. 2015;18(2):138-145. doi:10.4103/0972-2327.144284
43. Spires-Jones TL, Stoothoff WH, de Calignon A, Jones PB, Hyman BT. Tau pathophysiology in neurodegeneration: a tangled issue. *Trends Neurosci*. 2009 Mar;32(3):150-9. doi: 10.1016/j.tins.2008.11.007
44. Pourhamzeh M, Joghataei MT, Mehrabi S, Ahadi R, Hojjati SMM, Fazli N, Nabavi SM, Pakdaman H, Shahpasand K. The Interplay of Tau Protein and  $\beta$ -Amyloid: While Tauopathy Spreads More Profoundly Than Amyloidopathy, Both Processes Are Almost Equally Pathogenic. *Cell Mol Neurobiol*. 2020 Jul 22. doi: 10.1007/s10571-020-00906-2.

45. <https://www.scisnack.com/wp-content/uploads/2019/11/a-medical-illustration-of-a-healthy-brain-and-one-with-Alzheimers-disease-original.jpg>
46. Jack CR Jr, Bennett DA, Blennow K, Carrillo MC, Dunn B, Haeberlein SB, Holtzman DM, Jagust W, Jessen F, Karlawish J, Liu E, Molinuevo JL, Montine T, Phelps C, Rankin KP, Rowe CC, Scheltens P, Siemers E, Snyder HM, Sperling R; Contributors. NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2018 Apr;14(4):535-562. doi: 10.1016/j.jalz.2018.02.018.
47. <https://www.nia.nih.gov/health/biomarkers-dementia-detection-and-research>
48. Livingston G, Sommerlad A, Orgeta V, Costafreda SG, Huntley J, Ames D, Ballard C, Banerjee S, Burns A, Cohen-Mansfield J, Cooper C, Fox N, Gitlin LN, Howard R, Kales HC, Larson EB, Ritchie K, Rockwood K, Sampson EL, Samus Q, Schneider LS, Selbæk G, Teri L, Mukadam N. Dementia prevention, intervention, and care. *Lancet*. 2017 Dec 16;390(10113):2673-2734. doi: 10.1016/S0140-6736(17)31363-6.
49. Davda N, Corkill R. Biomarkers in the diagnosis and prognosis of Alzheimer's disease. *J Neurol*. 2020 Aug;267(8):2475-2477. doi: 10.1007/s00415-020-10037-9.
50. <https://www.nia.nih.gov/health/alzheimers-disease-genetics-fact-sheet>
51. <https://www.nia.nih.gov/>
52. Jiang S, Li Y, Zhang X, Bu G, Xu H, Zhang YW. Trafficking regulation of proteins in Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener*. 2014 Jan 11; 9:6. doi: 10.1186/1750-1326-9-6.
53. Vetrivel KS, Thinakaran G. Amyloidogenic processing of beta-amyloid precursor protein in intracellular compartments. *Neurology*. 2006 Jan 24; 66 (2 Suppl 1): S69-73. doi: 10.1212/01.wnl.0000192107.17175.39.
54. Tcw J, Goate AM. Genetics of  $\beta$ -Amyloid Precursor Protein in Alzheimer's Disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2017 Jun 1;7(6): a024539. doi:10.1101/cshperspect.a024539.
55. Stephens GS, You J, Fu C-H, Chin J. Molecular Mechanisms of Synaptic Plasticity and Memory and Their Dysfunction in Alzheimer's Disease. *Learning and Memory: A Comprehensive Reference*. Learning and Memory: A Comprehensive Reference (Second Edition). 2017 Jan; 4: 65–135. doi:10.1016/b978-0-12-809324-5.21126-7
56. Mahley RW. Central Nervous System Lipoproteins: ApoE and Regulation of Cholesterol Metabolism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2016 Jul; 36(7):1305-15. doi: 10.1161/ATVBAHA.116.307023.

57. Williams T, Borchelt DR, Chakrabarty P. Therapeutic approaches targeting Apolipoprotein E function in Alzheimer's disease. *Mol Neurodegeneration*. 2020 Jan; **15** : 8. doi: 10.1186/s13024-020-0358-9
58. Vidal C, Zhang L. An Analysis of the Neurological and Molecular Alterations Underlying the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Cells*. 2021 Mar 4;10(3):546. doi: 10.3390/cells10030546.
59. Litvinchuk A, Huynh TV, Shi Y, Jackson RJ, Finn MB, Manis M, Francis CM, Tran AC, Sullivan PM, Ulrich JD, Hyman BT, Cole T, Holtzman DM. Apolipoprotein E4 Reduction with Antisense Oligonucleotides Decreases Neurodegeneration in a Tauopathy Model. *Ann Neurol*. 2021 May;89(5):952-966. doi: 10.1002/ana.26043.
60. Yamazaki Y, Zhao N, Caulfield TR, Liu CC, Bu G. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: pathobiology and targeting strategies. *Nat Rev Neurol*. 2019 Sep;15(9):501-518. doi: 10.1038/s41582-019-0228-7.
61. Martínez-Martínez AB, Torres-Perez E, Devanney N, Del Moral R, Johnson LA, Arbones-Mainar JM. Beyond the CNS: The many peripheral roles of APOE. *Neurobiol Dis*. 2020 May;138:104809. doi: 10.1016/j.nbd.2020.104809.
62. Therriault J, Benedet AL, Pascoal TA, Mathotaarachchi S, Chamoun M, Savard M, Thomas E, Kang MS, Lussier F, Tissot C, Parsons M, Qureshi MNI, Vitali P, Massarweh G, Soucy JP, Rej S, Saha-Chaudhuri P, Gauthier S, Rosa-Neto P. Association of Apolipoprotein E  $\epsilon$ 4 With Medial Temporal Tau Independent of Amyloid- $\beta$ . *JAMA Neurol*. 2020 Apr 1;77(4):470-479. doi: 10.1001/jamaneurol.2019.4421.
63. Misra A, Chakrabarti SS, Gambhir IS. New genetic players in late-onset Alzheimer's disease: Findings of genome-wide association studies. *Indian J Med Res*. 2018 Aug;148(2):135-144. doi: 10.4103/ijmr.IJMR\_473\_17.
64. Breijyeh Z, Karaman R. Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment. *Molecules*. 2020 Dec 8;25(24):5789. doi: 10.3390/molecules25245789.
65. [https://www.who.int/mental\\_health/neurology/dementia/risk\\_reduction\\_gdg\\_meeting/en/](https://www.who.int/mental_health/neurology/dementia/risk_reduction_gdg_meeting/en/)
66. Sharma VK, Mehta V, Singh TG. Alzheimer's Disorder: Epigenetic Connection and Associated Risk Factors. *Curr Neuropharmacol*. 2020;18(8):740-753. doi: 10.2174/1570159X18666200128125641.

67. Silva MVF, Loures CMG, Alves LCV, de Souza LC, Borges KBG, Carvalho MDG. Alzheimer's disease: risk factors and potentially protective measures. *J Biomed Sci.* 2019 May 9;26(1):33. doi: 10.1186/s12929-019-0524-y.
68. Edwards III GA, Gamez N, Escobedo G Jr, Calderon O, Moreno-Gonzalez I. Modifiable Risk Factors for Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci.* 2019 Jun 24; 11:146. doi: 10.3389/fnagi.2019.00146.
69. Huat TJ, Camats-Perna J, Newcombe EA, Valmas N, Kitazawa M, Medeiros R. Metal Toxicity Links to Alzheimer's Disease and Neuroinflammation. *J Mol Biol.* 2019 Apr 19;431(9):1843-1868. doi: 10.1016/j.jmb.2019.01.018.
70. Liyanage SI, Vilekar P, Weaver DF. Nutrients in Alzheimer's Disease: The Interaction of Diet, Drugs and Disease. *Can J Neurol Sci.* 2019 Jan;46(1):23-34. doi: 10.1017/cjn.2018.353.
71. Więckowska-Gacek A, Mietelska-Porowska A, Chutorański D, Wydrych M, Długosz J, Wojda U. Western Diet Induces Impairment of Liver-Brain Axis Accelerating Neuroinflammation and Amyloid Pathology in Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci.* 2021 Apr 1;13:654509. doi: 10.3389/fnagi.2021.654509.
72. Ravi SK, Narasingappa RB, Vincent B. Neuro-nutrients as anti-alzheimer's disease agents: A critical review. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2019;59(18):2999-3018. doi: 10.1080/10408398.2018.1481012.
73. Baumgart M, Snyder HM, Carrillo MC, Fazio S, Kim H, Johns H. Summary of the evidence on modifiable risk factors for cognitive decline and dementia: A population-based perspective. *Alzheimers Dement.* 2015 Jun;11(6):718-26. doi: 10.1016/j.jalz.2015.05.016.
74. Zhao C, Noble JM, Marder K, Hartman JS, Gu Y, Scarmeas N. Dietary Patterns, Physical Activity, Sleep, and Risk for Dementia and Cognitive Decline. *Curr Nutr Rep.* 2018 Dec;7(4):335-345. doi: 10.1007/s13668-018-0247-9.
75. Marques SC, Oliveira CR, Pereira CM, Outeiro TF. Epigenetics in neurodegeneration: a new layer of complexity. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2011 Mar 30;35(2):348-55. doi: 10.1016/j.pnpbp.2010.08.008.
76. Nicolia V, Lucarelli M, Fusco A. Environment, epigenetics and neurodegeneration: Focus on nutrition in Alzheimer's disease. *Exp Gerontol.* 2015 Aug; 68:8-12. doi: 10.1016/j.exger.2014.10.006.
77. Tronick E, Hunter RG. Waddington, Dynamic Systems, and Epigenetics. *Front Behav Neurosci.* 2016 Jun 10;10:107. doi: 10.3389/fnbeh.2016.00107.

78. Fenoglio C, Scarpini E, Serpente M, Galimberti D. Role of Genetics and Epigenetics in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease and Frontotemporal Dementia. *J Alzheimers Dis.* 2018;62(3):913-932. doi: 10.3233/JAD-170702.
79. Castanho I, Lunnon K. Chapter 8: Epigenetic processes in Alzheimer's disease. *Chromatin Signaling and Neurological Disorders.* 2019. 12:153–180. doi:10.1016/b978-0-12-813796-3.00008-0.
80. Poon CH, Tse LSR, Lim LW. DNA methylation in the pathology of Alzheimer's disease: from gene to cognition. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2020 June; 1475: 15-33. doi: 10.1111/nyas.14373
81. Li P, Marshall L, Oh G, Jakubowski JL, Groot D, He Y, Wang T, Petronis A, Labrie V. Epigenetic dysregulation of enhancers in neurons is associated with Alzheimer's disease pathology and cognitive symptoms. *Nat Commun.* 2019 May 21;10(1):2246. doi: 10.1038/s41467-019-10101-7.
82. Monti N, Cavallaro RA, Stoccoro A, Nicolia V, Scarpa S, Kovacs GG, Fiorenza MT, Lucarelli M, Aronica E, Ferrer I, Coppedè F, Troen AM, Fusco A. CpG and non-CpG Presenilin1 methylation pattern in course of neurodevelopment and neurodegeneration is associated with gene expression in human and murine brain. *Epigenetics.* 2020 Aug; 15(8):781-799. doi: 10.1080/15592294.2020.1722917.
83. <https://www.whatisepigenetics.com/histone-modifications/>
84. Bannister AJ, Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.* 2011 Mar;21(3):381-95. doi: 10.1038/cr.2011.22.
85. Greer EL, Shi Y. Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inheritance. *Nat Rev Genet.* 2012 Apr 3;13(5):343-57. doi: 10.1038/nrg3173.
86. Lithner CU, Lacor PN, Zhao WQ, Mustafiz T, Klein WL, Sweatt JD, Hernandez CM. Disruption of neocortical histone H3 homeostasis by soluble A $\beta$ : implications for Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2013 Sep;34(9):2081-90. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.
87. Ryu H, Barrup M, Kowall NW and McKee AC P3-260: Epigenetic modification in a monozygotic twin with Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia.* 2008 July 1; 4: T598-T598. doi:10.1016/j.jalz.2008.05.1828.
88. Schueller E, Paiva I, Blanc F, Wang XL, Cassel JC, Boutillier AL, Bousiges O. Dysregulation of histone acetylation pathways in hippocampus and frontal cortex of Alzheimer's disease patients. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2020 Apr;33:101-116. doi: 10.1016/j.euroneuro.2020.01.015.

89. Lu X, Wang L, Yu C, Yu D, Yu G. Histone Acetylation Modifiers in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Front Cell Neurosci.* 2015 Jun 16; 9:226. doi: 10.3389/fncel.2015.00226.
90. Yang SS, Zhang R, Wang G, Zhang YF. The development prospect of HDAC inhibitors as a potential therapeutic direction in Alzheimer's disease. *Transl Neurodegener.* 2017 Jul 10; 6:19. doi: 10.1186/s40035-017-0089-1.
91. Mehler MF, Mattick JS. Noncoding RNAs and RNA editing in brain development, functional diversification, and neurological disease. *Physiol Rev.* 2007 Jul; 87(3):799-823. doi: 10.1152/physrev.00036.2006.
92. Gomes AQ, Nolasco S, Soares H. Non-coding RNAs: multi-tasking molecules in the cell. *Int J Mol Sci.* 2013 Jul 31;14(8):16010-39. doi: 10.3390/ijms140816010.
93. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell.* 1993 Dec 3;75(5):843-54. doi: 10.1016/0092-8674(93)90529-y.
94. Michlewski G, Cáceres JF. Post-transcriptional control of miRNA biogenesis. *RNA.* 2019 Jan;25(1):1-16. doi: 10.1261/rna.068692.118.
95. Shen Z, Silva RM. MicroRNAs: emerging players in apical periodontitis. *J Appl Oral Sci.* 2021 Apr 14; 29:e20201058. doi: 10.1590/1678-7757-2020-1058.
96. Kim VN, Han J, Siomi MC. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009 Feb; 10(2):126-39. doi: 10.1038/nrm2632.
97. Sun P, Liu DZ, Jickling GC, Sharp FR, Yin KJ. MicroRNA-based therapeutics in central nervous system injuries. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2018 Jul; 38(7):1125-1148. doi: 10.1177/0271678X18773871.
98. Paul S, Bravo Vázquez LA, Pérez Uribe S, Roxana Reyes-Pérez P, Sharma A. Current Status of microRNA-Based Therapeutic Approaches in Neurodegenerative Disorders. *Cells.* 2020 Jul 15; 9(7):1698. doi: 10.3390/cells9071698
99. Takeuchi T, Kawasaki H, Luce A, Cossu AM, Misso G, Scrima M, Bocchetti M, Ricciardiello F, Caraglia M, Zappavigna S. Insight toward the MicroRNA Profiling of Laryngeal Cancers: Biological Role and Clinical Impact. *Int J Mol Sci.* 2020 May 24;21(10):3693. doi: 10.3390/ijms21103693
100. De Pietri Tonelli D, Clovis YM, Huttner WB. Detection and monitoring of microRNA expression in developing mouse brain and fixed brain cryosections. *Methods Mol Biol.* 2014; 1092:31-42. doi: 10.1007/978-1-60327-292-6\_3.
101. Saugstad JA. MicroRNAs as effectors of brain function. *Stroke.* 2013 Jun;44(6 Suppl 1):S17-9. doi: 10.1161/STROKEAHA.113.000985.

- 102.** Gizak A, Duda P, Pielka E, McCubrey JA, Rakus D. GSK3 and miRNA in neural tissue: From brain development to neurodegenerative diseases. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2020 Jul;1867(7):118696. doi: 10.1016/j.bbamcr.2020.118696
- 103.** Samadian M, Gholipour M, Hajiesmaeili M, Taheri M, Ghafouri-Fard S. The Eminent Role of microRNAs in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci.* 2021 Mar 15; 13:641080. doi: 10.3389/fnagi.2021.641080.
- 104.** Nagaraj S, Zoltowska KM, Laskowska-Kaszub K, Wojda U. microRNA diagnostic panel for Alzheimer's disease and epigenetic trade-off between neurodegeneration and cancer. *Ageing Res Rev.* 2019 Jan; 49:125-143. doi: 10.1016/j.arr.2018.10.008.
- 105.** Kumar S, Reddy PH. Are circulating microRNAs peripheral biomarkers for Alzheimer's disease?. *Biochim Biophys Acta.* 2016 Sep;1862(9):1617-27. doi: 10.1016/j.bbadis.2016.06.001.
- 106.** Zhao C, Sun X, Li L. Biogenesis and function of extracellular miRNAs. *ExRNA* 2019 April; **1**:38. doi:10.1186/s41544-019-0039-4
- 107.** Creemers EE, Tijssen AJ, Pinto YM. Circulating microRNAs: novel biomarkers and extracellular communicators in cardiovascular disease? *Circ Res.* 2012 Feb 3;110(3):483-95. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.247452.
- 108.** Manna I, De Benedittis S, Quattrone A, Maisano D, Iaccino E, Quattrone A. Exosomal miRNAs as Potential Diagnostic Biomarkers in Alzheimer's Disease. *Pharmaceuticals (Basel).* 2020 Sep 12;13(9):243. doi: 10.3390/ph13090243.
- 109.** Swarbrick S., Wragg N., Ghosh S. *et al.* Systematic Review of miRNA as Biomarkers in Alzheimer's Disease. *Mol Neurobiol.* 2019 Feb; **56**:6156–6167. doi: 10.1007/s12035-019-1500-y
- 110.** Angelucci F, Cechova K, Valis M, Kuca K, Zhang B, Hort J. MicroRNAs in Alzheimer's Disease: Diagnostic Markers or Therapeutic Agents? *Front Pharmacol.* 2019 Jun 18; 10:665. doi: 10.3389/fphar.2019.00665.
- 111.** An F, Gong G, Wang Y, Bian M, Yu L, Wei C. MiR-124 acts as a target for Alzheimer's disease by regulating BACE1. *Oncotarget.* 2017 Dec 9;8(69):114065-114071. doi: 10.18632/oncotarget.23119.
- 112.** Santa-Maria I, Alaniz ME, Renwick N, Cela C, Fulga TA, Van Vactor D, Tuschl T, Clark LN, Shelanski ML, McCabe BD, Crary JF. Dysregulation of microRNA-219 promotes neurodegeneration through post-transcriptional regulation of tau. *J Clin Invest.* 2015 Feb;125(2):681-6. doi: 10.1172/JCI78421.

113. Huang W, Li Z, Zhao L, Zhao W. Simvastatin ameliorate memory deficits and inflammation in clinical and mouse model of Alzheimer's disease via modulating the expression of miR-106b. *Biomed Pharmacother.* 2017 Aug;92:46-57. doi: 10.1016/j.biopha.2017.05.060.
114. Li SH, Gao P, Wang LT, Yan YH, Xia Y, Song J, Li HY, Yang JX. Osteostatin Stimulated Neural Stem Cells Differentiation into Neurons in an Alzheimer's Disease Cell Model via Upregulation of MicroRNA-9 and Rescued the Functional Impairment of Hippocampal Neurons in APP/PS1 Transgenic Mice. *Front Neurosci.* 2017 Jun 13; 11:340. doi: 10.3389/fnins.2017.00340.
115. [https://www.crea.gov.it/documents/59764/0/Dossier+LG+2017\\_Cap\\_3.pdf/b4f2b2d2-ab4c-baf9-ca34-e66250e5cbd3?t=1575966810718](https://www.crea.gov.it/documents/59764/0/Dossier+LG+2017_Cap_3.pdf/b4f2b2d2-ab4c-baf9-ca34-e66250e5cbd3?t=1575966810718)
116. Rein MJ, Renouf M, Cruz-Hernandez C, Actis-Goretta L, Thakkar SK, da Silva Pinto M. Bioavailability of bioactive food compounds: a challenging journey to bioefficacy. *Br J Clin Pharmacol.* 2013 Mar;75(3):588-602. doi: 10.1111/j.1365-2125.2012.04425.x.
117. Bui TT, Nguyen TH. Natural product for the treatment of Alzheimer's disease. *J Basic Clin Physiol Pharmacol.* 2017 Sep 26;28(5):413-423. doi: 10.1515/jbcpp-2016-0147.
118. Câmara JS, Albuquerque BR, Aguiar J, Corrêa RCG, Gonçalves JL, Granato D, Pereira JAM, Barros L, Ferreira ICFR. Food Bioactive Compounds and Emerging Techniques for Their Extraction: Polyphenols as a Case Study. *Foods.* 2020 Dec 24;10(1):37. doi: 10.3390/foods10010037.
119. De Araújo FF, de Paulo Farias D, Neri-Numa IA, Pastore GM. Polyphenols and their applications: An approach in food chemistry and innovation potential. *Food Chem.* 2020 Feb 15; 338, 127535. Doi: 10.1016/j.foodchem.2020.127535
120. Moreau RA, Nyström L, Whitaker BD, Winkler-Moser JK, Baer DJ, Gebauer SK, Hicks KB. Phytosterols and their derivatives: Structural diversity, distribution, metabolism, analysis, and health-promoting uses. *Prog Lipid Res.* 2018 Apr;70:35-61. doi: 10.1016/j.plipres.2018.04.001
121. Porter NT, Martens EC. The Critical Roles of Polysaccharides in Gut Microbial Ecology and Physiology. *Annu Rev Microbiol.* 2017 Sep 8; 71:349-369. doi: 10.1146/annurev-micro-102215-095316.
122. Prieto MA, López CJ, Simal-Gandara J. Glucosinolates: Molecular structure, breakdown, genetic, bioavailability, properties and healthy and adverse effects. *Adv Food Nutr Res.* 2019; 90:305-350. doi: 10.1016/bs.afnr.2019.02.008.

- 123.** Londzin P, Zamora M, Kałol B, Taborek A, Folwarczna J. Potential of Caffeine in Alzheimer's Disease-A Review of Experimental Studies. *Nutrients*. 2021 Feb 6;13(2):537. doi: 10.3390/nu13020537.
- 124.** Stadnik J, Kęska P. Meat and fermented meat products as a source of bioactive peptides. *Acta Sci Pol Technol Aliment*. 2015 Jul-Sep;14(3):181-190. doi: 10.17306/J.AFS.2015.3.19.
- 125.** Katayama S. and Nakamura S. Emerging roles of bioactive peptides on brain health promotion. *Int J Food Sci Technol*. 2019 Dec 13; 54: 1949-1955. doi: 10.1111/ijfs.14076.
- 126.** Surguchov A, Bernal L, Surguchev AA. Phytochemicals as Regulators of Genes Involved in Synucleinopathies. *Biomolecules*. 2021 Apr 22;11(5):624. doi: 10.3390/biom11050624.
- 127.** Grodzicki W, Dziendzikowska K. The Role of Selected Bioactive Compounds in the Prevention of Alzheimer's Disease. *Antioxidants (Basel)*. 2020 Mar 11;9(3):229. doi: 10.3390/antiox9030229.
- 128.** Teter B, Morihara T, Lim GP, Chu T, Jones MR, Zuo X, Paul RM, Frautschy SA, Cole GM. Curcumin restores innate immune Alzheimer's disease risk gene expression to ameliorate Alzheimer pathogenesis. *Neurobiol Dis*. 2019 Jul;127:432-448. doi: 10.1016/j.nbd.2019.02.015.
- 129.** Hassan FU, Rehman MS, Khan MS, Ali MA, Javed A, Nawaz A, Yang C. Curcumin as an Alternative Epigenetic Modulator: Mechanism of Action and Potential Effects. *Front Genet*. 2019 Jun 4; 10:514. doi: 10.3389/fgene.2019.00514.
- 130.** Shen J, Xu L, Qu C, Sun H, Zhang J. Resveratrol prevents cognitive deficits induced by chronic unpredictable mild stress: Sirt1/miR-134 signalling pathway regulates CREB/BDNF expression in hippocampus in vivo and in vitro. *Behav Brain Res*. 2018 Sep 3; 349:1-7. doi: 10.1016/j.bbr.2018.04.050.
- 131.** Tili E, Michaille JJ, Adair B, Alder H, Limagne E, Taccioli C, Ferracin M, Delmas D, Latruffe N, Croce CM. Resveratrol decreases the levels of miR-155 by upregulating miR-663, a microRNA targeting JunB and JunD. *Carcinogenesis*. 2010 Sep;31(9):1561-6. doi: 10.1093/carcin/bgq143.
- 132.** Gomes BAQ, Silva JPB, Romeiro CFR, Dos Santos SM, Rodrigues CA, Gonçalves PR, Sakai JT, Mendes PFS, Varela ELP, Monteiro MC. Neuroprotective Mechanisms of Resveratrol in Alzheimer's Disease: Role of SIRT1. *Oxid Med Cell Longev*. 2018 Oct 30; 2018:8152373. doi: 10.1155/2018/8152373.

133. Morgese MG, Schiavone S, Bove M, Colia AL, Dimonte S, Tucci P, Trabace L. N-3 PUFA Prevent Oxidative Stress in a Rat Model of Beta-Amyloid-Induced Toxicity. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2021 Apr 8;14(4):339. doi: 10.3390/ph14040339.
134. Serini S, Calviello G. Reduction of Oxidative/Nitrosative Stress in Brain and its Involvement in the Neuroprotective Effect of n-3 PUFA in Alzheimer's Disease. *Curr Alzheimer Res*. 2016;13(2):123-34. doi: 10.2174/1567205012666150921101147.
135. Karimi M, Vedin I, Freund Levi Y, Basun H, Faxén Irving G, Eriksdotter M, Wahlund LO, Schultzberg M, Hjorth E, Cederholm T, Palmblad J. DHA-rich n-3 fatty acid supplementation decreases DNA methylation in blood leukocytes: the OmegAD study. *Am J Clin Nutr*. 2017 Oct;106(4):1157-1165. doi: 10.3945/ajcn.117.155648.
136. Ballarini T, Schröder A, van Lent DM, Wolfsgruber S, Priller J, Teipel SJ, Buerger K, Laske C, Peters O, Wiltfang J, Düzel E, Spottke A, Pernecky R, Fließbach K, Schneider A, Henek MT, Jessen F, Wagner M. The effects of Mediterranean diet on memory and Alzheimer's disease biomarkers. *Alzheimer's Dement*. 2020 Dec 7; 16: e045349. doi: 10.1002/alz.045349
137. Ballarini T, Melo van Lent D, Brunner J, Schröder A, Wolfsgruber S, Altenstein S, Brosseron F, Buerger K, Dechent P, Dobisch L, Duzel E, Ertl-Wagner B, Fließbach K, Freiesleben SD, Frommann I, Glanz W, Hauser D, Haynes JD, Heneka MT, Janowitz D, Kilimann I, Laske C, Maier F, Metzger CD, Munk M, Pernecky R, Peters O, Priller J, Ramirez A, Rauchmann B, Roy N, Scheffler K, Schneider A, Spottke A, Spruth EJ, Teipel SJ, Vukovich R, Wiltfang J, Jessen F, Wagner M; DELCODE study group. Mediterranean Diet, Alzheimer Disease Biomarkers and Brain Atrophy in Old Age. *Neurology*. 2021 May 5:10.1212/WNL.0000000000012067. doi: 10.1212/WNL.0000000000012067.
138. Leri M, Chaudhary H, Iashchishyn IA, Pansieri J, Svedružić ŽM, Gómez Alcalde S, Musteikyte G, Smirnovas V, Stefani M, Bucciantini M, Morozova-Roche LA. Natural Compound from Olive Oil Inhibits S100A9 Amyloid Formation and Cytotoxicity: Implications for Preventing Alzheimer's Disease. *ACS Chem Neurosci*. 2021 Jun 2;12(11):1905-1918. doi: 10.1021/acchemneuro.0c00828
139. <https://www.icar.cnr.it/bio-informatica/#>
140. <http://userver.bio.uniroma1.it/apps/mienturnet/>
141. <https://reactome.org/>
142. <http://www.microrna.gr/miRPathv3>

- 143.** Vlachos IS, Zagganas K, Paraskevopoulou MD, Georgakilas G, Karagkouni D, Vergoulis T, Dalamagas T, Hatzigeorgiou AG. DIANA-miRPath v3.0: deciphering microRNA function with experimental support. *Nucleic Acids Res.* 2015 Jul 1;43(W1):W460-6. doi: 10.1093/nar/gkv403.
- 144.** Villa C, Fenoglio C, De Riz M, Clerici F, Marcone A, Benussi L, Ghidoni R, Gallone S, Cortini F, Serpente M, Cantoni C, Fumagalli G, Martinelli Boneschi F, Cappa S, Binetti G, Franceschi M, Rainero I, Giordana MT, Mariani C, Bresolin N, Scarpini E, Galimberti D. Role of hnRNP-A1 and miR-590-3p in neuronal death: genetics and expression analysis in patients with Alzheimer disease and frontotemporal lobar degeneration. *Rejuvenation Res.* 2011 Jun;14(3):275-81. doi: 10.1089/rej.2010.1123.
- 145.** Geekiyanage H, Chan C. MicroRNA-137/181c regulates serine palmitoyltransferase and in turn amyloid  $\beta$ , novel targets in sporadic Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 2011 Oct 12;31(41):14820-30. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3883-11.2011.
- 146.** Hébert SS, Horré K, Nicolai L, Papadopoulou AS, Mandemakers W, Silaharoglu AN, Kauppinen S, Delacourte A, De Strooper B. Loss of microRNA cluster miR-29a/b-1 in sporadic Alzheimer's disease correlates with increased BACE1/beta-secretase expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Apr 29;105(17):6415-20. doi: 10.1073/pnas.0710263105.
- 147.** Kumar P, Dezso Z, MacKenzie C, Oestreicher J, AgoulNIK S, Byrne M, Bernier F, Yanagimachi M, Aoshima K, Oda Y. Circulating miRNA biomarkers for Alzheimer's disease. *PLoS One.* 2013 Jul 29;8(7):e69807. doi: 10.1371/journal.pone.0069807.
- 148.** Leidinger P, Backes C, Deutscher S, Schmitt K, Mueller SC, Frese K, Haas J, Ruprecht K, Paul F, Stähler C, Lang CJ, Meder B, Bartfai T, Meese E, Keller A. A blood based 12-miRNA signature of Alzheimer disease patients. *Genome Biol.* 2013 Jul 29;14(7):R78. doi: 10.1186/gb-2013-14-7-r78.
- 149.** Tan L, Yu JT, Tan MS, Liu QY, Wang HF, Zhang W, Jiang T, Tan L. Genome-wide serum microRNA expression profiling identifies serum biomarkers for Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2014;40(4):1017-27. doi: 10.3233/JAD-132144.
- 150.** Kiko T, Nakagawa K, Tsuduki T, Furukawa K, Arai H, Miyazawa T. MicroRNAs in plasma and cerebrospinal fluid as potential markers for Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2014;39(2):253-9. doi: 10.3233/JAD-130932.
- 151.** Müller M, Kuiperij HB, Claassen JA, Küsters B, Verbeek MM. MicroRNAs in Alzheimer's disease: differential expression in hippocampus and cell-free cerebrospinal fluid. *Neurobiol Aging.* 2014 Jan;35(1):152-8. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2013.07.005.

152. Dong H, Li J, Huang L, Chen X, Li D, Wang T, Hu C, Xu J, Zhang C, Zen K, Xiao S, Yan Q, Wang C, Zhang CY. Serum MicroRNA Profiles Serve as Novel Biomarkers for the Diagnosis of Alzheimer's Disease. *Dis Markers*. 2015; 2015:625659. doi: 10.1155/2015/625659.
153. Satoh J, Kino Y, Niida S. MicroRNA-Seq Data Analysis Pipeline to Identify Blood Biomarkers for Alzheimer's Disease from Public Data. *Biomark Insights*. 2015 Apr 15; 10:21-31. doi: 10.4137/BMI.S25132.
154. Denk J, Boelmans K, Siegismund C, Lassner D, Arlt S, Jahn H. MicroRNA Profiling of CSF Reveals Potential Biomarkers to Detect Alzheimer's Disease. *PLoS One*. 2015 May 20;10(5): e0126423. doi: 10.1371/journal.pone.0126423.
155. Wang WX, Huang Q, Hu Y, Stromberg AJ, Nelson PT. Patterns of microRNA expression in normal and early Alzheimer's disease human temporal cortex: white matter versus gray matter. *Acta Neuropathol*. 2011 Feb;121(2):193-205. doi: 10.1007/s00401-010-0756-0.
156. Pichler S, Gu W, Hartl D, Gasparoni G, Leidinger P, Keller A, Meese E, Mayhaus M, Hampel H, Riemenschneider M. The miRNome of Alzheimer's disease: consistent downregulation of the miR-132/212 cluster. *Neurobiol Aging*. 2017 Feb;50:167.e1-167.e10. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2016.09.019.
157. Lusardi TA, Phillips JI, Wiedrick JT, Harrington CA, Lind B, Lapidus JA, Quinn JF, Saugstad JA. MicroRNAs in Human Cerebrospinal Fluid as Biomarkers for Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*. 2017;55(3):1223-1233. doi: 10.3233/JAD-160835.
158. Yang G, Song Y, Zhou X, Deng Y, Liu T, Weng G, Yu D, Pan S. MicroRNA-29c targets  $\beta$ -site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1 and has a neuroprotective role in vitro and in vivo. *Mol Med Rep*. 2015 Aug;12(2):3081-8. doi: 10.3892/mmr.2015.3728.
159. Wang Y, Veremeyko T, Wong AH, El Fatimy R, Wei Z, Cai W, Krichevsky AM. Downregulation of miR-132/212 impairs S-nitrosylation balance and induces tau phosphorylation in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2017 Mar;51:156-166. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2016.12.015.
160. Weinberg RB, Mufson EJ, Counts SE. Evidence for a neuroprotective microRNA pathway in amnesic mild cognitive impairment. *Front Neurosci*. 2015 Nov 5; 9:430. doi: 10.3389/fnins.2015.00430.
161. Zhang Y, Xing H, Guo S, Zheng Z, Wang H, Xu D. MicroRNA-135b has a neuroprotective role via targeting of  $\beta$ -site APP-cleaving enzyme 1. *Exp Ther Med*. 2016 Aug;12(2):809-814. doi: 10.3892/etm.2016.3366.

- 162.** Cogswell JP, Ward J, Taylor IA, Waters M, Shi Y, Cannon B, Kelnar K, Kemppainen J, Brown D, Chen C, Prinjha RK, Richardson JC, Saunders AM, Roses AD, Richards CA. Identification of miRNA changes in Alzheimer's disease brain and CSF yields putative biomarkers and insights into disease pathways. *J Alzheimers Dis.* 2008 May;14(1):27-41. doi: 10.3233/jad-2008-14103.
- 163.** Wang WX, Rajeev BW, Stromberg AJ, Ren N, Tang G, Huang Q, Rigoutsos I, Nelson PT. The expression of microRNA miR-107 decreases early in Alzheimer's disease and may accelerate disease progression through regulation of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1. *J Neurosci.* 2008 Jan 30;28(5):1213-23. doi:10.1523/JNEUROSCI.5065-07.2008.
- 164.** Guo R, Fan G, Zhang J, Wu C, Du Y, Ye H, Li Z, Wang L, Zhang Z, Zhang L, Zhao Y, Lu Z. A 9-microRNA Signature in Serum Serves as a Noninvasive Biomarker in Early Diagnosis of Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis.* 2017;60(4):1365-1377. doi: 10.3233/JAD-170343.
- 165.** Qian Q, Zhang J, He FP, Bao WX, Zheng TT, Zhou DM, Pan HY, Zhang H, Zhang XQ, He X, Sun BG, Luo BY, Chen C, Peng GP. Down-regulated expression of microRNA-338-5p contributes to neuropathology in Alzheimer's disease. *FASEB J.* 2019 Mar;33(3):4404-4417. doi: 10.1096/fj.201801846R.
- 166.** Yang TT, Liu CG, Gao SC, Zhang Y, Wang PC. The Serum Exosome Derived MicroRNA-135a, -193b, and -384 Were Potential Alzheimer's Disease Biomarkers. *Biomed Environ Sci.* 2018 Feb;31(2):87-96. doi: 10.3967/bes2018.011.
- 167.** Ji Y, Wang D, Zhang B, Lu H. MiR-361-3p inhibits  $\beta$ -amyloid accumulation and attenuates cognitive deficits through targeting BACE1 in Alzheimer's disease. *Journal of Integrative Neuroscience.* 2019 Sep;18(3):285-291. DOI: 10.31083/j.jin.2019.03.1136.
- 168.** Alexandrov PN, Dua P, Hill JM, Bhattacharjee S, Zhao Y, Lukiw WJ. microRNA (miRNA) speciation in Alzheimer's disease (AD) cerebrospinal fluid (CSF) and extracellular fluid (ECF). *Int J Biochem Mol Biol.* 2012;3(4):365-73.
- 169.** Sethi P, Lukiw WJ. Micro-RNA abundance and stability in human brain: specific alterations in Alzheimer's disease temporal lobe neocortex. *Neurosci Lett.* 2009 Aug 7;459(2):100-4. doi: 10.1016/j.neulet.2009.04.052.
- 170.** Lukiw WJ. Micro-RNA speciation in fetal, adult and Alzheimer's disease hippocampus. *Neuroreport.* 2007 Feb 12;18(3):297-300. doi: 10.1097/WNR.0b013e3280148e8b.

171. Bhatnagar S, Chertkow H, Schipper HM, Yuan Z, Shetty V, Jenkins S, Jones T, Wang E. Increased microRNA-34c abundance in Alzheimer's disease circulating blood plasma. *Front Mol Neurosci*. 2014 Feb 4; 7:2. doi: 10.3389/fnmol.2014.00002.
172. Zhang C, Lu J, Liu B, Cui Q, Wang Y. Primate-specific miR-603 is implicated in the risk and pathogenesis of Alzheimer's disease. *Aging (Albany NY)*. 2016 Feb;8(2):272-90. doi: 10.18632/aging.100887.
173. Schipper HM, Maes OC, Chertkow HM, Wang E. MicroRNA expression in Alzheimer blood mononuclear cells. *Gene Regul Syst Bio*. 2007 Dec 20;1:263-74. doi: 10.4137/grsb.s361.
174. Wang X, Liu D, Huang HZ, Wang ZH, Hou TY, Yang X, Pang P, Wei N, Zhou YF, Dupras MJ, Calon F, Wang YT, Man HY, Chen JG, Wang JZ, Hébert SS, Lu Y, Zhu LQ. A Novel MicroRNA-124/PTPN1 Signal Pathway Mediates Synaptic and Memory Deficits in Alzheimer's Disease. *Biol Psychiatry*. 2018 Mar 1;83(5):395-405. doi: 10.1016/j.biopsych.2017.07.023.
175. Akhter R, Shao Y, Shaw M, Formica S, Khrestian M, Leverenz JB, Bekris LM. Regulation of ADAM10 by miR-140-5p and potential relevance for Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2018 Mar;63:110-119. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2017.11.007.
176. Sierksma A, Lu A, Salta E, Vanden Eynden E, Callaerts-Vegh Z, D'Hooge R, Blum D, Buée L, Fiers M, De Strooper B. Deregulation of neuronal miRNAs induced by amyloid- $\beta$  or TAU pathology. *Mol Neurodegener*. 2018 Oct 12;13(1):54. doi: 10.1186/s13024-018-0285-1.
177. Wang Z, Qin W, Wei CB, Tang Y, Zhao LN, Jin HM, Li Y, Wang Q, Luan XQ, He JC, Jia J. The microRNA-1908 up-regulation in the peripheral blood cells impairs amyloid clearance by targeting ApoE. *Int J Geriatr Psychiatry*. 2018 Jul;33(7):980-986. doi: 10.1002/gps.4881.
178. Derkow K, Rössling R, Schipke C, Krüger C, Bauer J, Föhling M, Stroux A, Schott E, Ruprecht K, Peters O, Lehnardt S. Distinct expression of the neurotoxic microRNA family let-7 in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. *PLoS One*. 2018 Jul 16;13(7):e0200602. doi: 10.1371/journal.pone.0200602.
179. Liu Y, He X, Li Y, Wang T. Cerebrospinal fluid CD4<sup>+</sup> T lymphocyte-derived miRNA-let-7b can enhance the diagnostic performance of Alzheimer's disease biomarkers. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018 Jan 1;495(1):1144-1150. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.11.122. Epub 2017 Nov 21.

180. Zhao X, Wang S, Sun W. Expression of miR-28-3p in patients with Alzheimer's disease before and after treatment and its clinical value. *Exp Ther Med.* 2020;20(3):2218-2226. doi:10.3892/etm.2020.8920.
181. Kumar S, Reddy PH. MicroRNA-455-3p as a Potential Biomarker for Alzheimer's Disease: An Update. *Front Aging Neurosci.* 2018 Feb 23;10:41. doi: 10.3389/fnagi.2018.00041.
182. Geng L, Zhang T, Liu W, Chen Y. Inhibition of miR-128 Abates A $\beta$ -Mediated Cytotoxicity by Targeting PPAR- $\gamma$  via NF- $\kappa$ B Inactivation in Primary Mouse Cortical Neurons and Neuro2a Cells. *Yonsei Med J.* 2018 Nov; 59(9):1096-1106. doi: 10.3349/ymj.2018.59.9.1096.
183. Schonrock N, Humphreys DT, Preiss T, Götz J. Target gene repression mediated by miRNAs miR-181c and miR-9 both of which are down-regulated by amyloid- $\beta$ . *J Mol Neurosci.* 2012 Feb;46(2):324-35.
184. Kim J, Yoon H, Ramírez CM, Lee SM, Hoe HS, Fernández-Hernando C, Kim J. MiR-106b impairs cholesterol efflux and increases A $\beta$  levels by repressing ABCA1 expression. *Exp Neurol.* 2012 Jun;235(2):476-83. doi: 10.1016/j.expneurol.2011.11.010.
185. Wang L, Liu J, Wang Q, Jiang H, Zeng L, Li Z, Liu R. MicroRNA-200a-3p Mediates Neuroprotection in Alzheimer-Related Deficits and Attenuates Amyloid-Beta Overproduction and Tau Hyperphosphorylation via Coregulating BACE1 and PRKACB. *Front Pharmacol.* 2019 Jul 19; 10:806. doi: 10.3389/fphar.2019.00806.
186. Yang Q, Zhao Q, Yin Y. miR-133b is a potential diagnostic biomarker for Alzheimer's disease and has a neuroprotective role. *Exp Ther Med.* 2019;18(4):2711-2718. doi:10.3892/etm.2019.7855.
187. Cao F, Liu Z, Sun G. Diagnostic value of miR-193a-3p in Alzheimer's disease and miR-193a-3p attenuates amyloid- $\beta$  induced neurotoxicity by targeting PTEN. *Exp Gerontol.* 2020 Feb;130:110814. doi: 10.1016/j.exger.2019.110814.
188. Li P, Xu Y, Wang B, Huang J, Li Q. miR-34a-5p and miR-125b-5p attenuate A $\beta$ -induced neurotoxicity through targeting BACE1. *J Neurol Sci.* 2020 Jun 15;413:116793. doi: 10.1016/j.jns.2020.116793.
189. Wang R, Zhang J. Clinical significance of miR-433 in the diagnosis of Alzheimer's disease and its effect on A $\beta$ -induced neurotoxicity by regulating JAK2. *Exp Gerontol.* 2020 Nov;141:111080. doi: 10.1016/j.exger.2020.111080.

- 190.** Fernández-de Frutos M, Galán-Chilet I, Goedeke L, Kim B, Pardo-Marqués V, Pérez-García A, Herrero JI, Fernández-Hernando C, Kim J, Ramírez CM. MicroRNA 7 Impairs Insulin Signaling and Regulates A $\beta$  Levels through Posttranscriptional Regulation of the Insulin Receptor Substrate 2, Insulin Receptor, Insulin-Degrading Enzyme, and Liver X Receptor Pathway. *Mol Cell Biol.* 2019 Oct 28;39(22):e00170-19. doi: 10.1128/MCB.00170-19.
- 191.** Tao W, Yu L, Shu S, Liu Y, Zhuang Z, Xu S, Bao X, Gu Y, Cai F, Song W, Xu Y, Zhu X. miR-204-3p/Nox4 Mediates Memory Deficits in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Mol Ther.* 2021 Jan 6;29(1):396-408. doi: 10.1016/j.ymthe.2020.09.006.
- 192.** Chen FZ, Zhao Y, Chen HZ. MicroRNA-98 reduces amyloid  $\beta$ -protein production and improves oxidative stress and mitochondrial dysfunction through the Notch signaling pathway via HEY2 in Alzheimer's disease mice. *Int J Mol Med.* 2019 Jan;43(1):91-102. doi: 10.3892/ijmm.2018.3957.
- 193.** Zhou Y, Wang ZF, Li W, Hong H, Chen J, Tian Y, Liu ZY. Protective effects of microRNA-330 on amyloid  $\beta$ -protein production, oxidative stress, and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease by targeting VAV1 via the MAPK signaling pathway. *J Cell Biochem.* 2018 Jul;119(7):5437-5448. doi: 10.1002/jcb.26700.
- 194.** Wu DM, Wen X, Wang YJ, Han XR, Wang S, Shen M, Fan SH, Zhuang J, Zhang ZF, Shan Q, Li MQ, Hu B, Sun CH, Lu J, Chen GQ, Zheng YL. Effect of microRNA-186 on oxidative stress injury of neuron by targeting interleukin 2 through the janus kinase-signal transducer and activator of transcription pathway in a rat model of Alzheimer's disease. *J Cell Physiol.* 2018 Dec;233(12):9488-9502. doi: 10.1002/jcp.26843.
- 195.** Lin Y, Liang X, Yao Y, Xiao H, Shi Y, Yang J. Osthole attenuates APP-induced Alzheimer's disease through up-regulating miRNA-101a-3p. *Life Sci.* 2019 May 15;225:117-131. doi: 10.1016/j.lfs.2019.04.004.
- 196.** Shu B, Zhang X, Du G, Fu Q, Huang L. MicroRNA-107 prevents amyloid- $\beta$ -induced neurotoxicity and memory impairment in mice. *Int J Mol Med.* 2018 Mar;41(3):1665-1672. doi: 10.3892/ijmm.2017.3339.
- 197.** Wei Z, Meng X, El Fatimy R, Sun B, Mai D, Zhang J, Arora R, Zeng A, Xu P, Qu S, Krichevsky AM, Selkoe DJ, Li S. Environmental enrichment prevents A $\beta$  oligomer-induced synaptic dysfunction through mirna-132 and hdac3 signaling pathways. *Neurobiol Dis.* 2020 Feb;134:104617. doi: 10.1016/j.nbd.2019.104617.
- 198.** Wu BW, Wu MS, Guo JD. Effects of microRNA-10a on synapse remodeling in hippocampal neurons and neuronal cell proliferation and apoptosis through the BDNF-TrkB signaling pathway in a rat model of Alzheimer's disease. *J Cell Physiol.* 2018 Jul;233(7):5281-5292. doi: 10.1002/jcp.26328.

- 199.** Song D, Li G, Hong Y, Zhang P, Zhu J, Yang L, Huang J. miR-199a decreases Neuritin expression involved in the development of Alzheimer's disease in APP/PS1 mice. *Int J Mol Med.* 2020 Jul;46(1):384-396. doi: 10.3892/ijmm.2020.4602.
- 200.** Jiang Y, Xu B, Chen J, Sui Y, Ren L, Li J, Zhang H, Guo L, Sun X. MicroRNA-137 Inhibits Tau Hyperphosphorylation in Alzheimer's Disease and Targets the CACNA1C Gene in Transgenic Mice and Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells. *Med Sci Monit.* 2018 Aug 13;24:5635-5644. doi: 10.12659/MSM.908765.
- 201.** Higaki S, Muramatsu M, Matsuda A, Matsumoto K, Satoh JI, Michikawa M, Niida S. Defensive effect of microRNA-200b/c against amyloid-beta peptide-induced toxicity in Alzheimer's disease models. *PLoS One.* 2018 May 8;13(5):e0196929. doi: 10.1371/journal.pone.0196929.
- 202.** Rodriguez-Ortiz CJ, Prieto GA, Martini AC, Forner S, Trujillo-Estrada L, LaFerla FM, Baglietto-Vargas D, Cotman CW, Kitazawa M. miR-181a negatively modulates synaptic plasticity in hippocampal cultures and its inhibition rescues memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Aging Cell.* 2020 Mar;19(3):e13118. doi: 10.1111/acel.13118.
- 203.** Fu S, Zhang J, Zhang S. Knockdown of miR-429 Attenuates A $\beta$ -Induced Neuronal Damage by Targeting SOX2 and BCL2 in Mouse Cortical Neurons. *Neurochem Res.* 2018 Dec;43(12):2240-2251. Doi: 10.1007/s11064-018-2643-3.
- 204.** Miao J, Jing J, Shao Y, Sun H. MicroRNA-138 promotes neuroblastoma SH-SY5Y cell apoptosis by directly targeting DEK in Alzheimer's disease cell model. *BMC Neurosci.* 2020 Jul 31;21(1):33. doi: 10.1186/s12868-020-00579-z.
- 205.** Lu Y, Tan L, Wang X. Circular HDAC9/microRNA-138/Sirtuin-1 Pathway Mediates Synaptic and Amyloid Precursor Protein Processing Deficits in Alzheimer's Disease. *Neurosci Bull.* 2019 Oct;35(5):877-888. doi: 10.1007/s12264-019-00361-0.
- 206.** Pai SG, Carneiro BA, Mota JM, Costa R, Leite CA, Barroso-Sousa R, Kaplan JB, Chae YK, Giles FJ. Wnt/beta-catenin pathway: modulating anticancer immune response. *J Hematol Oncol.* 2017 May 5;10(1):101. doi: 10.1186/s13045-017-0471-6.
- 207.** Koni M, Pinnarò V, Brizzi MF. The Wnt Signalling Pathway: A Tailored Target in Cancer. *Int J Mol Sci.* 2020 Oct 18;21(20):7697. doi: 10.3390/ijms21207697.
- 208.** Palomer E, Buechler J, Salinas PC. Wnt Signaling Deregulation in the Aging and Alzheimer's Brain. *Front Cell Neurosci.* 2019 May 22;13:227. doi: 10.3389/fncel.2019.00227.

- 209.** Aghaizu ND, Jin H, Whiting PJ. Dysregulated Wnt Signalling in the Alzheimer's Brain. *Brain Sci.* 2020 Nov 24;10(12):902. doi: 10.3390/brainsci10120902.
- 210.** MacDonald BT, Tamai K, He X. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell.* 2009 Jul;17(1):9-26. doi: 10.1016/j.devcel.2009.06.016.
- 211.** Jia L, Piña-Crespo J, Li Y. Restoring Wnt/ $\beta$ -catenin signaling is a promising therapeutic strategy for Alzheimer's disease. *Mol Brain.* 2019 Dec 4;12(1):104. doi: 10.1186/s13041-019-0525-5.
- 212.** Mateo I, Infante J, Llorca J, Rodríguez E, Berciano J, Combarros O. Association between glycogen synthase kinase-3 $\beta$  genetic polymorphism and late-onset Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 2006;21(4):228-32. doi: 10.1159/000091044.
- 213.** Buechler J, Salinas PC. Deficient Wnt Signaling and Synaptic Vulnerability in Alzheimer's Disease: Emerging Roles for the LRP6 Receptor. *Front Synaptic Neurosci.* 2018 Oct 30;10:38. doi: 10.3389/fnsyn.2018.00038.
- 214.** Liu CC, Tsai CW, Deak F, Rogers J, Penuliar M, Sung YM, Maher JN, Fu Y, Li X, Xu H, Estus S, Hoe HS, Fryer JD, Kanekiyo T, Bu G. Deficiency in LRP6-mediated Wnt signaling contributes to synaptic abnormalities and amyloid pathology in Alzheimer's disease. *Neuron.* 2014 Oct 1;84(1):63-77. doi: 10.1016/j.neuron.2014.08.048.
- 215.** Salcedo-Tello P, Hernández-Ortega K, Arias C. Susceptibility to GSK3 $\beta$ -induced tau phosphorylation differs between the young and aged hippocampus after Wnt signaling inhibition. *J Alzheimers Dis.* 2014;39(4):775-85. doi: 10.3233/JAD-130749.
- 216.** Torres-Berrío A, Hernandez G, Nestler EJ, Flores C. The Netrin-1/DCC Guidance Cue Pathway as a Molecular Target in Depression: Translational Evidence. *Biol Psychiatry.* 2020 Oct 15;88(8):611-624. doi: 10.1016/j.biopsych.2020.04.025.
- 217.** Lourenço FC, Galvan V, Fombonne J, Corset V, Llambi F, Müller U, Bredesen DE, Mehlen P. Netrin-1 interacts with amyloid precursor protein and regulates amyloid-beta production. *Cell Death Differ.* 2009 May;16(5):655-63. doi: 10.1038/cdd.2008.191. Epub 2009 Jan 16.
- 218.** Sun L, Ju T, Wang T, Zhang L, Ding F, Zhang Y, An R, Sun Y, Li Y, Lu Y, Zhang X, Chi L. Decreased Netrin-1 and Correlated Th17/Tregs Balance Disorder in A $\beta$ <sub>1-42</sub> Induced Alzheimer's Disease Model Rats. *Front Aging Neurosci.* 2019 May 28;11:124. doi: 10.3389/fnagi.2019.00124.

219. Zhang X, Yin WK, Shi XD, Li Y. Curcumin activates Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway through inhibiting the activity of GSK-3 $\beta$  in APPswe transfected SY5Y cells. *Eur J Pharm Sci.* 2011 Apr 18;42(5):540-6. doi: 10.1016/j.ejps.2011.02.009.
220. Tiwari SK, Agarwal S, Seth B, Yadav A, Nair S, Bhatnagar P, Karmakar M, Kumari M, Chauhan LK, Patel DK, Srivastava V, Singh D, Gupta SK, Tripathi A, Chaturvedi RK, Gupta KC. Curcumin-loaded nanoparticles potently induce adult neurogenesis and reverse cognitive deficits in Alzheimer's disease model via canonical Wnt/ $\beta$ -catenin pathway. *ACS Nano.* 2014 Jan 28;8(1):76-103. doi: 10.1021/nn405077y.
221. Yao Y, Gao Z, Liang W, Kong L, Jiao Y, Li S, Tao Z, Yan Y, Yang J. Osthole promotes neuronal differentiation and inhibits apoptosis via Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in an Alzheimer's disease model. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2015 Dec 15;289(3):474-81. doi: 10.1016/j.taap.2015.10.013.
222. Zhou YX, Zhang H, Peng C. Puerarin: a review of pharmacological effects. *Phytother Res.* 2014 Jul;28(7):961-75. doi: 10.1002/ptr.5083.
223. Yao Y, Chen X, Bao Y, Wu Y. Puerarin inhibits  $\beta$ -amyloid peptide 1-42-induced tau hyperphosphorylation via the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway. *Mol Med Rep.* 2017 Dec;16(6):9081-9085. doi: 10.3892/mmr.2017.7702.
224. Zhu L, Chi T, Zhao X, Yang L, Song S, Lu Q, Ji X, Liu P, Wang L, Zou L. Xanthoceraside modulates neurogenesis to ameliorate cognitive impairment in APP/PS1 transgenic mice. *J Physiol Sci.* 2018 Sep;68(5):555-565. doi: 10.1007/s12576-017-0561-9.
225. Han Z, Xu Q, Li C, Zhao H. Effects of sulforaphane on neural stem cell proliferation and differentiation. *Genesis.* 2017 Mar;55(3). doi: 10.1002/dvg.23022.
226. Chien MY, Chuang CH, Chern CM, Liou KT, Liu DZ, Hou YC, Shen YC. Salvianolic acid A alleviates ischemic brain injury through the inhibition of inflammation and apoptosis and the promotion of neurogenesis in mice. *Free Radic Biol Med.* 2016 Oct;99:508-519. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.09.006.
227. Palomera-Avalos V, Griñán-Ferré C, Puigoriol-Ilamola D, Camins A, Sanfeliu C, Canudas AM, Pallàs M. Resveratrol Protects SAMP8 Brain Under Metabolic Stress: Focus on Mitochondrial Function and Wnt Pathway. *Mol Neurobiol.* 2017 Apr;54(3):1661-1676. doi: 10.1007/s12035-016-9770-0.

- 228.** Li MY, Chang CT, Han YT, Yu JY, Wang TW. Ginkgolide B promotes neuronal differentiation through the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in neural stem cells of the postnatal mammalian subventricular zone. *Sci Rep.* 2018 Oct 18; 8:14947. doi: 0.1038/s41598-018-32960-8.
- 229.** Varela-Nallar L, Arredondo SB, Tapia-Rojas C, Hancke J, Inestrosa NC. Andrographolide Stimulates Neurogenesis in the Adult Hippocampus. *Neural Plast.* 2015;2015:935403. doi: 10.1155/2015/935403.
- 230.** Velazquez R, Winslow W, Mifflin MA. Choline as a prevention for Alzheimer's disease. *Aging (Albany NY).* 2020 Feb 9;12(3):2026-2027. doi: 10.18632/aging.102849.
- 231.** Caudill MA, Strupp BJ, Muscalu L, Nevins JEH, Canfield RL. Maternal choline supplementation during the third trimester of pregnancy improves infant information processing speed: a randomized, double-blind, controlled feeding study. *FASEB J.* 2018 Apr;32(4):2172-2180. doi: 10.1096/fj.201700692RR.
- 232.** Albright CD, Mar MH, Craciunescu CN, Song J, Zeisel SH. Maternal dietary choline availability alters the balance of netrin-1 and DCC neuronal migration proteins in fetal mouse brain hippocampus. *Brain Res Dev Brain Res.* 2005 Oct 6;159(2):149-54. doi: 10.1016/j.devbrainres.2005.07.002.
- 233.** Velazquez R, Ferreira E, Knowles S, Fux C, Rodin A, Winslow W, Oddo S. Lifelong choline supplementation ameliorates Alzheimer's disease pathology and associated cognitive deficits by attenuating microglia activation. *Aging Cell.* 2019 Dec;18(6):e13037. doi: 10.1111/acel.13037.
- 234.** Nuru M, Muradashvili N, Kalani A, Lominadze D, Tyagi N. High methionine, low folate and low vitamin B6/B12 (HM-LF-LV) diet causes neurodegeneration and subsequent short-term memory loss. *Metab Brain Dis.* 2018 Dec;33(6):1923-1934. doi: 10.1007/s11011-018-0298-z.
- 235.** <https://ods.od.nih.gov/factsheets/VitaminB6-Consumer/>
- 236.** <https://www.epicentro.iss.it/vitamine/>
- 237.** <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Folate-HealthProfessional/>
- 238.** Zhang L, Qi Z, Li J, Li M, Du X, Wang S, Zhou G, Xu B, Liu W, Xi S, Xu Z, Deng Y. Roles and Mechanisms of Axon-Guidance Molecules in Alzheimer's Disease. *Mol Neurobiol.* 2021 Mar 5. doi: 10.1007/s12035-021-02311-2.

## RINGRAZIAMENTI

Intraprendere un nuovo percorso non è mai facile e se poi, nel mentre, scoppia una pandemia le cose di certo non si semplificano. Alla 'fine', però, tra alti e bassi, si arriva comunque e la soddisfazione è grande.

Per il percorso seguito ed il lavoro di tesi svolto, ci tengo a ringraziare quanti ne hanno preso parte e mi hanno permesso di portarli a termine.

Un ringraziamento è rivolto ai docenti che con prontezza sono riusciti a sopperire all' impossibilità di svolgere lezioni frontali riformulando i loro insegnamenti e rendendosi disponibili in svariati 'luoghi' e momenti, mettendoci comunque in condizioni di poter apprendere e comprendere senza avvertire troppo il 'peso' della lontananza forzata.

Un ringraziamento è rivolto alla mia Relatrice, la Professoressa Fabiola Olivieri, alle Correlatrici la Dottoressa Alessandra Pasquo e la Dottoressa Ilaria Pettrignani, fonti di conoscenza ed ispirazione, che mi hanno seguito costantemente nella ricerca e nella stesura della tesi, consigliandomi, indirizzandomi, supportandomi fino al suo completamento.

Desidero ringraziare la Dottoressa Laura Teodori, un 'vulcano di energie e idee', che ha permesso la realizzazione di questo lavoro guidandomi nelle pratiche burocratiche, creando un gruppo di lavoro fenomenale tutto al femminile ed essendo sempre pronta a fornire spunti, consigli e soluzioni in questo lungo percorso.

Inoltre, un ringraziamento a lei, mia sorella maggiore, Dottoressa Fabiola Coccia, medico di mestiere e che per me è la migliore delle 'cure'; al mio fianco in ogni momento sempre pronta ad offrirmi la mano e darmi il sostegno, la forza, il coraggio che fino ad oggi mi hanno permesso di affrontare ogni 'sfida' e raggiungere gli obiettivi che mi ero prefissata ed un ringraziamento a lui, 'la mia isola felice' che con un sorriso è in grado di riaccendere anche le giornate più grigie e con poche parole di far scomparire ogni timore.

Un grazie anche alla mia mamma ed al mio papà perché tutto ciò che di bello posso essere e posso fare, è sempre e comunque grazie a loro.

Grazie a tutti Voi, di cuore.