

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI MILANO-BICOCCA

Dipartimento di Scienze della Salute

Dottorato in Tecnologie Biomediche XXVII ciclo



**METABOLISMO DEL COLESTEROLO E
MALATTIE NEUROMETABOLICHE:
MODIFICAZIONI OSSERVATE IN SOGGETTI
AFFETTI DA XANTOMATOSI
CEREBROTENDINEA E PARAPARESI SPASTICA
DI TIPO 5**

Coordinatore: Chiar.ma Prof.ssa Marina DEL PUPPO

Relatore: Chiar.ma Prof.ssa Marina DEL PUPPO

Tesi di Dottorato di:

Alessandro MAGNI

Matr. n. 033108

Anno Accademico 2013/2014

*“La ricerca andrà perduta se istante per istante non ti ricordi di te
resta con te, resta con te, resta con te, insieme a te.”*

(Alice - “Le Baccanti”- testo di Juri Camisasca)

INDICE

RIASSUNTO	Pag. III
ABSTRACT	Pag. V
INTRODUZIONE	Pag. 7
METABOLISMO DEL COLESTEROLO NELL'UOMO	Pag. 7
<u>Sintesi endogena del colesterolo e sua regolazione</u>	Pag. 11
<u>Assorbimento intestinale di colesterolo e sua regolazione</u>	Pag. 14
<u>Trasporto del colesterolo: lipoproteine e loro metabolismo</u>	Pag. 20
<u>Eliminazione del colesterolo: acidi biliari e loro metabolismo</u>	Pag. 25
○ Secrezione biliare di colesterolo	Pag. 26
○ Acidi biliari	Pag. 27
○ Biosintesi degli acidi biliari	Pag. 29
○ Regolazione della biosintesi degli acidi biliari	Pag. 34
○ Trasporto degli acidi biliari e circolo enteroepatico	Pag. 39
<u>Metabolismo del colesterolo cerebrale</u>	Pag. 43
○ Sintesi del colesterolo cerebrale	Pag. 44
○ Trasporto del colesterolo in lipoproteine a livello cerebrale	Pag. 47
○ Eliminazione del colesterolo cerebrale e sua regolazione	Pag. 49
MALATTIE NEUROMETABOLICHE DEL METABOLISMO DEL COLESTEROLO E DEGLI ACIDI BILIARI	Pag. 52
<u>La Xantomatosi Cerebrotendinea</u>	Pag. 53
<u>La Paraparesi Spastica di tipo 5</u>	Pag. 62
<u>Ruolo del metabolismo del colesterolo in malattie neurodegenerative sporadiche</u>	Pag. 66
VALUTAZIONE EX VIVO DEL METABOLISMO DEGLI STEROLI	Pag. 70
<u>Markers del metabolismo di colesterolo e acidi biliari</u>	Pag. 71
○ Gli ossisteroli	Pag. 72
○ Gli steroli non-colesterolici	Pag. 75

SCOPO DELLO STUDIO	Pag. 78
MATERIALI E METODI	Pag. 80
<u>Solventi e reagenti - Standard</u>	Pag. 80
<u>Strumenti - Popolazione in studio</u>	Pag. 81
<u>Dosaggio del colestano plasmatico in GC-MS</u>	Pag. 83
<u>Dosaggio del 7α-idrossicolest-4-en-3-one plasmatico in GC-MS</u>	Pag. 88
<u>Dosaggio degli ossisteroli plasmatici in GC-MS</u>	Pag. 93
<u>Dosaggio di latosterolo e fitosteroli plasmatici in GC-MS</u>	Pag. 100
<u>Dosaggio colorimetrico del colesterolo plasmatico totale</u>	Pag. 107
RISULTATI	Pag. 110
<u>Pazienti CTX</u>	Pag. 110
<u>Pazienti SPG5</u>	Pag. 124
<u>Pazienti AD</u>	Pag. 134
DISCUSSIONE	Pag. 136
CONCLUSIONI E PROSPETTIVE	Pag. 148
BIBLIOGRAFIA	Pag. 149
RINGRAZIAMENTI	Pag. 184

RIASSUNTO

La Xantomatosi Cerebrotendinea (CTX) e la Paraparesi Spastica di tipo 5 (SPG5) sono due malattie neurometaboliche rare legate a difetti nel catabolismo del colesterolo ad acidi biliari (BA). La CTX è causata da mutazioni della sterolo 27-idrossilasi (CYP27A1), un enzima della sintesi degli acidi biliari il cui deficit ha come conseguenza una ridotta produzione di acido chenodeossicolico (CDCA) ed un incrementata sintesi di colestano (un derivato saturo del colesterolo). I pazienti CTX sono caratterizzati da xantomi a livello cerebrale e tendineo e progressivi sintomi neurologici. Sin dagli anni '80 è stato riportato che la somministrazione di BA è efficace nel ridurre i livelli plasmatici di colestano, bloccando potenzialmente la progressione della malattia. Tuttavia, le attuali conoscenze sulla CTX derivano principalmente da casi report mentre sono rari studi su ampie popolazioni. Inoltre alcuni report hanno evidenziato che, nonostante il trattamento, alcuni pazienti mostrano un declino delle funzioni cerebrali nel lungo periodo. Per questi motivi una più ampia ricerca sul metabolismo del colesterolo nei pazienti CTX potrebbe essere utile al fine di consolidare le conoscenze su questa patologia. Il primo scopo di questa tesi era dunque quello di riportare le modificazioni dei principali processi metabolici del colesterolo osservate in un gruppo di pazienti CTX e le eventuali correlazioni tra queste, lo stato clinico dei pazienti ed il decorso della malattia. Per raggiungere questo obiettivo tecniche di analisi in gascromatografia-spettrometria di massa (GC-MS) sono state utilizzate per dosare la concentrazione plasmatica di specifici ossisteroli e steroli non colesterolici la cui concentrazione è indicativa dei processi metabolici del colesterolo. L'analisi è stata condotta, in modo in gran parte retrospettivo, su una serie di campioni di plasma provenienti da 34 soggetti CTX e ha coperto un periodo di follow-up che, complessivamente, andava dal momento della diagnosi (in assenza di qualunque trattamento) fino a diversi anni di terapia sostitutiva con BA. La SPG5, invece, è una paraparesi spastica ereditaria (HSP) dovuta a mutazioni nel gene codificante per l'ossisterolo-7 α -idrossilasi (CYP7B1), un enzima della via alternativa di sintesi di BA necessario per la conversione del 27-idrossicolesterolo (27-OHC) in acido colico e chenodeossicolico. I pazienti SPG5 mostrano elevati livelli plasmatici di 27-OHC e i tipici sintomi di una paraparesi spastica. Attualmente le informazioni sulla SPG5 sono molto limitate e non c'è una terapia definita indirizzata a limitare l'accumulo di 27-OHC. Il secondo scopo di

questa tesi era dunque quello di indagare, sempre mediante GC-MS, il metabolismo del colesterolo in una coppia di fratelli SPG5, in qualità di soggetti probandi, e di verificare l'efficacia di farmaci ipocolesterolemizzanti (simvastatina e ezetimibe) nel ridurre il 27-OHC plasmatico.

Riguardo i risultati ottenuti, i pazienti CTX hanno mostrato un profilo basale degli steroli caratterizzato da elevati livelli di 7 α -idrossicolest-4-en-3-one (7 α C4) (indicativi di un'iperstimolazione della via classica di sintesi degli BA), di latosterolo e fitosteroli (*markers*, rispettivamente, della biosintesi e dell'assorbimento di colesterolo), oltre che (come atteso) di colestano. Inoltre sono state evidenziate correlazioni significative tra i valori di 7 α C4 e colestano ($\rho=0,51$, $p<<0,01$) e tra i valori di 7 α C4 e latosterolo ($\rho=0,66$, $p<<0,01$). Al contrario nessuna correlazione significativa è emersa tra i dati biochimici ed il fenotipo clinico dei pazienti. I livelli di tutti questi metaboliti sono significativamente diminuiti in seguito al trattamento con BA ($p<0,01$) e, successivamente, si sono mantenuti sostanzialmente stabili anche sul lungo periodo. Nel 36% dei pazienti, tuttavia, tale risposta non si è tradotta in una stabilizzazione dello stato clinico dei pazienti. Inoltre, il 24-idrossicolesterolo (24-OHC), un *marker* dell'omeostasi del colesterolo cerebrale, non ha mostrato particolari alterazioni nei suoi livelli plasmatici basali, né è stato possibile evidenziare un effetto del trattamento con BA sulla sua concentrazione. Questo dato è risultato assai differente da quanto invece osservato in un gruppo di 15 soggetti affetti da Alzheimer dove, sia i livelli di 24-OHC che di 27-OHC sono risultati nettamente ridotti rispetto a soggetti controlli ultrasettantenni. La correlazione tra alterazioni dell'omeostasi del colesterolo, fenotipo clinico e decorso della CTX rimane quindi poco chiara ed ulteriori studi si rendono necessari per chiarire questo aspetto. Riguardo alla SPG5, entrambi i pazienti hanno mostrato (come atteso) elevati livelli basali di 27-OHC e di 25-OHC (25-idrossicolesterolo), mentre non è stato possibile confermare alterazioni nei valori degli altri steroli ed ossisteroli dosati (7 α C4, 24-OHC, latosterolo e fitosteroli). Simvastatina ed ezetimibe si sono mostrati efficaci nel ridurre il 27-OHC plasmatico, anche se non fino a livelli normali. Non è stato invece possibile evidenziare un chiaro effetto del trattamento sui valori plasmatici di 25-OHC. Ulteriori studi su un più ampio numero di pazienti saranno necessari al fine di verificare se l'accumulo di 27-OHC sia effettivamente la causa del danno al tratto cortico-spinale e se una terapia a lungo termine con statina/ezetimibe possa essere proposta come trattamento per la SPG5.

ABSTRACT

Cerebrotendinous xanthomatosis (CTX) and Spastic Paraplegia type 5 (SPG5) are two rare neurometabolic diseases related to defects in the catabolism of cholesterol to bile acids (BA). CTX is a result of mutations to sterol 27-hydroxylase (CYP27A1), an enzyme involved in all pathways of bile acid synthesis. Such a deficiency results in a reduced production of chenodeoxycholic acid (CDCA) and in an increased formation of cholestanol, a saturated derivative of cholesterol. CTX patients are characterized by brain and tendon xanthomas as well as several progressive neurological symptoms. Since the 1980s it has been reported that administration of BA is effective in reducing cholestanol levels, potentially blocking disease progression. However, current information regarding CTX is based mainly on case reports, with only few large population studies performed. In addition, it has been reported that despite BA treatment some patients show a decline of cerebral functions in the long-term. For these reasons a larger investigation of cholesterol metabolism in CTX patients could be useful in order to consolidate our knowledge regarding this pathology. Therefore, the first aim of this thesis was to report the modifications of cholesterol metabolic processes observed in a group of CTX patients and their possible correlations with clinical phenotype and course of the disease. For this purpose, gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) techniques were used to quantify plasma levels of specific oxysterols and non-cholesterolic sterols that are indicative of cholesterol metabolic processes. This analysis was performed, in a largely retrospective manner, on a plasma sample collection derived from 34 CTX subjects that globally covered a follow-up period ranging from diagnosis (without any treatment) to several years of BA replacement therapy.

Indeed, SPG5 is a hereditary pure spastic paraplegia (HSP) due to mutations in the CYP7B1 gene, encoding for oxysterol-7 α -hydroxylase, a specific enzyme of the alternative pathway of BA synthesis, that is necessary for the conversion of 27-hydroxycholesterol (27-OHC) into BA. SPG5 patients show elevated plasma concentrations of 27-OHC and the typical symptoms of a pure spastic paraplegia. Current information on SPG5 is very limited and there is no defined therapy that focuses on preventing 27-OHC accumulation. Therefore, the second aim of this thesis was to investigate cholesterol metabolism on a couple of SPG5 siblings, as proband subjects, and to verify the efficacy of hypocholesterolemic drugs

(simvastatin and ezetimibe) in reducing 27-OHC levels. Also in this case, GC-MS analysis of circulating sterols was performed in order to reach our aim and monitor cholesterol metabolism.

Regarding the results, CTX patients showed a characteristic basal profile of circulating sterols with increased plasma concentrations of cholestanol, 7 α -hydroxy-4-cholesten-3-one (7 α C4) (indicating hyperstimulation of the classical pathway of BA synthesis), lathosterol (marker of cholesterol biosynthesis) and phytosterols (marker of cholesterol absorption). In addition, a significant correlation was found between 7 α C4 and cholestanol plasma values ($\rho=0.51$, $p<<0.01$) and between lathosterol and 7 α C4 ($\rho=0,66$, $p<<0.01$). Indeed, no significant correlation was found between biochemical data and clinical phenotype. The levels of all these metabolites consistently decreased after BA treatment ($p<0.01$) and remained stable in the long-term even if this normalization was not accomplished by clinical stabilization in 36% of the patients. Moreover, 24-hydroxycholesterol (24-OHC), a marker of cholesterol homeostasis in the brain, did not seem significantly altered in respect to normal values, and no effects of BA treatment was observed on this parameter. This situation was quite different when compared to what we found in 15 Alzheimer's patients, where both 24-OHC and 27-OHC were markedly reduced in respect to control subjects. Therefore, the correlation between alterations of cholesterol homeostasis, clinical phenotype and course of CTX remain elusive and additional studies are necessary in order to clarify this issue.

Regarding SPG5, both patients showed (as expected) elevated basal levels of 27-OHC and also 25-OHC (25-hydroxycholesterol), while we were not able to highlight alterations in the other oxysterols and non-cholesterolic sterols assayed (7 α C4, 24-OHC, lathosterol and phytosterols). Simvastatin and ezetimibe were shown to be effective in reducing 27-OHC values, even if not to normal levels. Indeed an effect on 25-OHC plasma levels was not demonstrated. Further studies on a larger population of patients are necessary in order to prove if 27OHC storage is responsible for cortico-spinal tract damage and if long-term statin/ezetimibe administration could be proposed in SPG5.

INTRODUZIONE

METABOLISMO DEL COLESTEROLO NELL'UOMO

Il colesterolo ha un ruolo determinante nella biologia dell'organismo umano in quanto costituente essenziale delle membrane plasmatiche e precursore obbligato per la sintesi di diversi ormoni e metaboliti coinvolti in numerosi processi fisiopatologici. Da un punto di vista chimico il colesterolo è una molecola lipidica appartenente alla famiglia degli steroidi, una classe di molecole organiche la cui struttura base è rappresentata dal ciclopentanoperidrofenantrene, un idrocarburo policiclico costituito da 17 atomi di carbonio formanti quattro anelli alifatici condensati tra loro (dei quali tre a 6 atomi di carbonio ed uno a 5 atomi di carbonio). Il colesterolo è il più importante rappresentante della classe degli steroli e come tale possiede, oltre al nucleo ciclopentanoperidrofenantrenico, un gruppo ossidrilico in posizione C-3, un doppio legame tra i carboni C-5 e C-6 ed una catena alifatica laterale ad otto atomi di carbonio in posizione C-17. Inoltre i carboni C-10 e C-13 presentano come sostituenti due gruppi metilici che, come il gruppo ossidrilico in C-3, si trovano in configurazione β (Figura 1A).

A causa di questa struttura peculiare il colesterolo possiede proprietà anfipatiche che gli consentono di essere incorporato nei doppi strati fosfolipidici delle membrane biologiche delle quali è, infatti, un costituente essenziale. Il colesterolo, inserendosi nel *bilayer* fosfolipidico, orienta il gruppo ossidrilico verso le teste polari dei fosfolipidi, in contatto con l'ambiente acquoso extracellulare, mentre con il nucleo steroideo, che ha una struttura planare relativamente rigida, prende contatto con i gruppi $-\text{CH}_2$ prossimali delle catene di acidi grassi (Figura 1B). Grazie a questa disposizione spaziale il colesterolo limita la libertà di movimento del tratto prossimale delle catene alifatiche dei fosfolipidi e quindi riduce la fluidità della membrana biologica, aumentandone pertanto la stabilità meccanica e conferendole maggiore integrità strutturale.

Il colesterolo tuttavia non è solo una molecola organica avente funzione strutturale. A livello dei pathways biochimici esso infatti rappresenta il substrato iniziale per la sintesi di alcune molecole bioattive quali gli ormoni steroidei, la vitamina D, gli ossisteroli e gli acidi biliari, che a loro volta contribuiscono a regolare il metabolismo dell'organismo agendo sia direttamente sia attraverso processi di *signaling* intracellulare ed extracellulare.

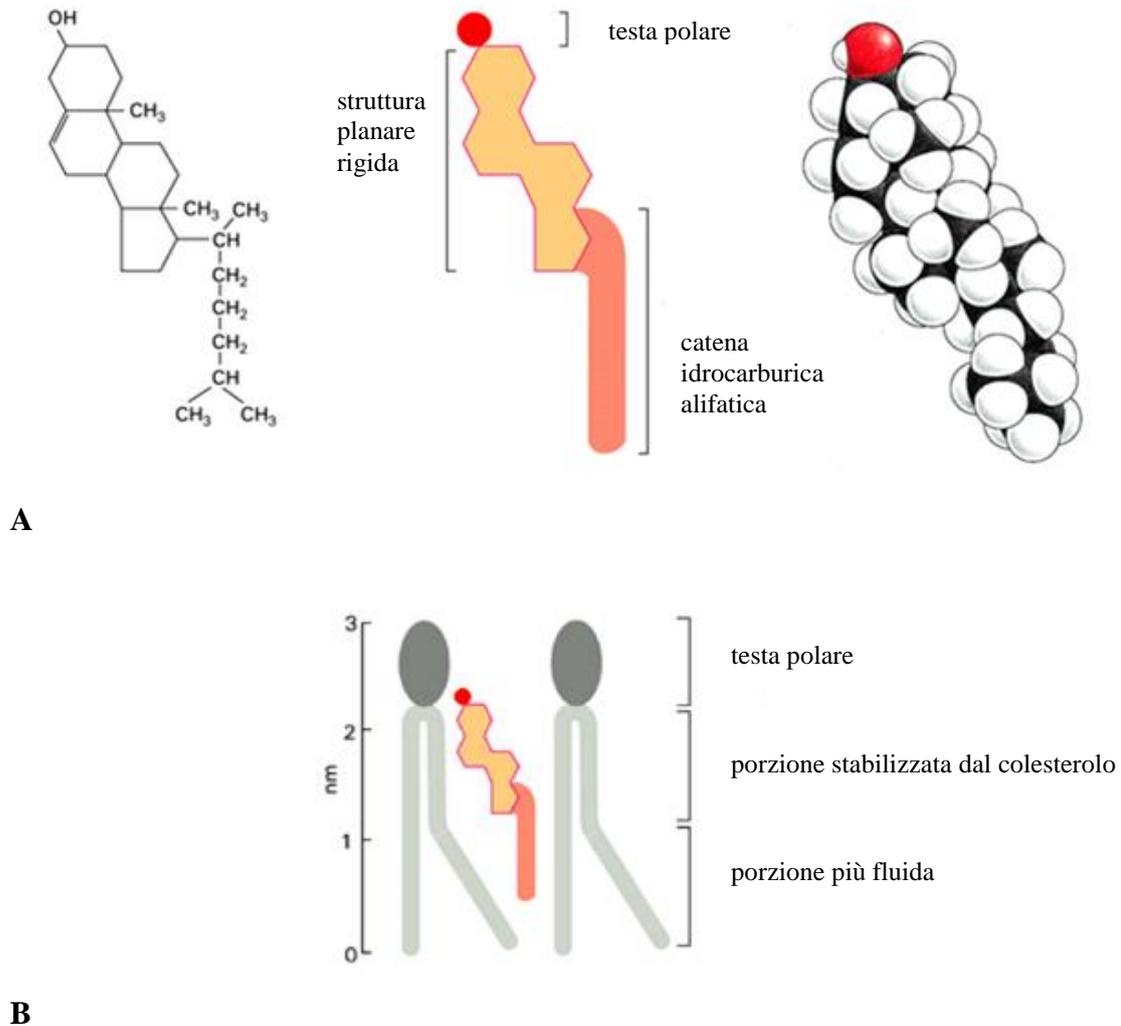


Figura 1. Struttura del colesterolo (A) e sua disposizione nel doppio strato fosfolipidico (B).

[immagine adattata da Alberts B. et al. 2002]

In condizioni fisiologiche, i livelli di colesterolo e dei suoi principali metaboliti dipendono da un equilibrio omeostatico tra processi di sintesi, assorbimento, trasporto, catabolismo ed escrezione. Alterazioni nell'omeostasi del colesterolo, dovute a fattori genetici e/o ambientali, risultano pertanto coinvolte in diverse patologie quali obesità [Tchernof A. e Després J.P., 2013], aterogenesi e disordini cardiovascolari [Tall A.R. et al., 2012], calcoli biliari [Jabłońska B., 2012] ed alcuni malattie neurometaboliche ereditarie quali la sindrome di Smith-Lemli-Opitz (SLOS) [Elias E.R. e Irons M., 1995], la xantomatosi cerebrotendinea (CTX) [Setoguchi T. et al., 1974] e la paraparesi spastica di tipo G5 (SPG5) [Tsaousidou M.K. et al., 2008]. Inoltre le problematiche legate ad alterazioni del metabolismo del colesterolo possono aggravarsi con l'invecchiamento e sono state trovate significative correlazioni tra alterati livelli dei metaboliti del colesterolo nel plasma e patologie a

carattere neurodegenerativo come la sindrome di Alzheimer (AD) e la demenza senile (SD) [Zuliani G. et al., 2011]. La formazione di accumuli di colesterolo e/o di qualcuno dei suoi metaboliti bioattivi va dunque evitata ed affinché questo possa avvenire è necessario che sia costantemente mantenuto un bilanciamento tra i meccanismi di ingresso e di uscita di questa molecola e dei suoi derivati biologici. I livelli totali di colesterolo presenti in ogni momento nell'organismo umano sono strettamente dipendenti dall'equilibrio che si instaura tra diversi processi metabolici:

- biosintesi “*de novo*”
- assorbimento intestinale
- trasporto/metabolismo delle lipoproteine plasmatiche
- biosintesi degli acidi biliari
- secrezione biliare

In una condizione di stato stazionario, in cui il peso dell'individuo non varia e la concentrazione di colesterolo nei diversi tessuti rimanga costante, i processi metabolici del colesterolo risulteranno perfettamente bilanciati. La presenza di qualche alterazione in uno di tali processi indurrà, come conseguenza, una risposta omeostatica dell'organismo con conseguenti variazioni degli altri processi al fine di giungere ad un nuovo stato di equilibrio. Sebbene il mantenimento dell'omeostasi del colesterolo nell'uomo sia il risultato dell'attività coordinata di diversi organi e tessuti, un ruolo centrale è sicuramente svolto dal fegato. Quest'organo infatti è responsabile di almeno quattro dei cinque processi da cui dipende il carico globale di steroli nell'organismo. In primo luogo le cellule del parenchima epatico sono sia la fonte principale del colesterolo sintetizzato *de novo*, sia le uniche cellule dell'organismo in cui la degradazione del colesterolo ad acidi biliari può essere portata a compimento. Inoltre il fegato regola sia la secrezione biliare che la *clearance* delle lipoproteine plasmatiche ricche di colesterolo. Infine il tessuto epatico, in quanto specializzato nell'esportazione e deposito di lipidi, è in grado di esterificare il colesterolo con acidi grassi e di immagazzinarlo e/o liberarlo nel plasma tramite la secrezione di specifiche lipoproteine [Dietschy J.M. et al., 1993; Koster A. et al., 2003]. La sintesi “*de novo*” e l'*uptake* delle lipoproteine plasmatiche rappresentano i principali meccanismi di ingresso del colesterolo nel fegato, mentre la biosintesi degli acidi biliari, l'escrezione attraverso la bile ed il rilascio di colesterolo nel plasma costituiscono i principali meccanismi di uscita (Figura 2).

Grazie agli studi sull'aumento di casi di obesità associati ad un elevato consumo di cibi grassi e ad alto contenuto energetico, è recentemente emerso che anche l'intestino gioca un ruolo significativo nella regolazione dell'omeostasi lipidica [Nada A.A. e Nicholas O.D., 2012]. A livello enterico, infatti, è stato evidenziato un equilibrio tra processi di sintesi *de novo*, assorbimento ed esportazione attraverso lipoproteine intestinali il cui contributo all'omeostasi del colesterolo sembra non possa essere trascurato. Nell'uomo l'organo con il più alto contenuto di colesterolo di tutto l'organismo (circa il 25% del totale) è il cervello, nel quale esso si trova per la maggior parte come costituente della guaina mielinica. Poiché a causa della presenza della barriera ematoencefalica (BBB, *Blood Brain Barrier*) non è possibile lo scambio di lipoproteine e colesterolo libero tra plasma e liquido cerebrospinale, il tessuto cerebrale regola l'omeostasi del colesterolo autonomamente [Lütjohann D. et al., 1996]. Come conseguenza di ciò il colesterolo cerebrale costituisce un *pool* di colesterolo a sé stante da quello di tutti gli altri distretti corporei [Dietschy J.M. e Turley S.D., 2001; Björkhem I. e Meaney S., 2004]. A livello cerebrale esiste, quindi, una bassa ma significativa sintesi *in loco* di colesterolo e parallelamente, una via deputata al catabolismo di tale composto al fine di mantenere, anche in tale compartimento, un equilibrio omeostatico.

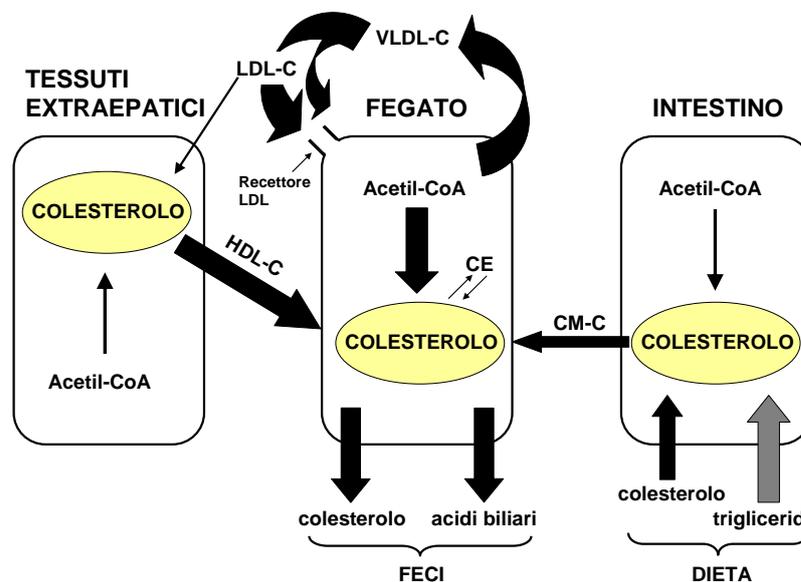


Figura 2. Principali vie metaboliche responsabili dell'omeostasi del colesterolo. Il colesterolo entra nel fegato attraverso la sintesi *de novo* ed il recupero dei chilomicroni (CM-C), delle lipoproteine a densità molto bassa (VLDL-C) e delle lipoproteine a bassa densità (LDL-C). Il colesterolo in eccesso presente nei tessuti extraepatici è portato al fegato attraverso le lipoproteine ad alta densità (HDL-C). Il colesterolo esce dal fegato attraverso l'escrezione biliare (colesterolo libero ed acidi biliari) e la sintesi delle VLDL.

SINTESI ENDOGENA DEL COLESTEROLO E SUA REGOLAZIONE

Data la centralità del colesterolo per la vita delle cellule animali ed il suo fondamentale ruolo come precursore per una vasta gamma di processi biologici, nel corso dell'evoluzione, l'organismo umano ha sviluppato e mantenuto un efficace meccanismo per la biosintesi endogena di tale composto. La sintesi "*de novo*" di colesterolo richiede l'attivazione di numerosi meccanismi strettamente regolati e correlati dall'attività di diversi enzimi appartenenti alla superfamiglia del citocromo P450 [McLean K.J. et al., 2012]. Si stima che in un uomo adulto di 70 Kg vengono prodotti circa 600-900 mg di colesterolo al giorno tramite sintesi endogena [Gylling H. et al., 1994]. Il colesterolo endogeno viene sintetizzato a partire dall'acetil-coenzima A attraverso una serie successiva di 30 reazioni enzimatiche, raggruppabili in tre fasi (Figura 3) [Bloch K., 1965]:

Fase 1: sintesi del mevalonato

La biosintesi ha inizio nel citosol con la reazione tra una molecola di acetil-CoA ed una molecola di acetoacetil-CoA a formare 3-idrossimetil-glutaril coenzima A (HMG-CoA), grazie all'azione dell'enzima HMG-CoA sintasi. Successivamente l'HMG-CoA viene ridotto a mevalonato dall'enzima HMG-CoA reduttasi, un ossidoreduttasi localizzata nel reticolo endoplasmatico liscio che utilizza il NADPH come cofattore.

Fase 2: sintesi dello squalene

Inizialmente, a livello del citosol, il mevalonato viene trasformato, con consumo di ATP, in isopentenil pirofosfato ed attraverso una serie di condensazioni testa-coda di unità isopreniche attivate si giunge alla formazione di geranil pirofosfato e farnesil pirofosfato. In seguito, nel reticolo endoplasmatico (RE), tramite la condensazione di due molecole di farnesil pirofosfato catalizzata dall'enzima squalene sintasi (SQS), si produce una molecola di squalene (C-30). Quest'ultima reazione è la prima strettamente specifica della biosintesi del colesterolo mentre le reazioni precedenti possono essere comuni alla sintesi dei diversi composti isoprenoidi endogeni presenti nell'uomo.

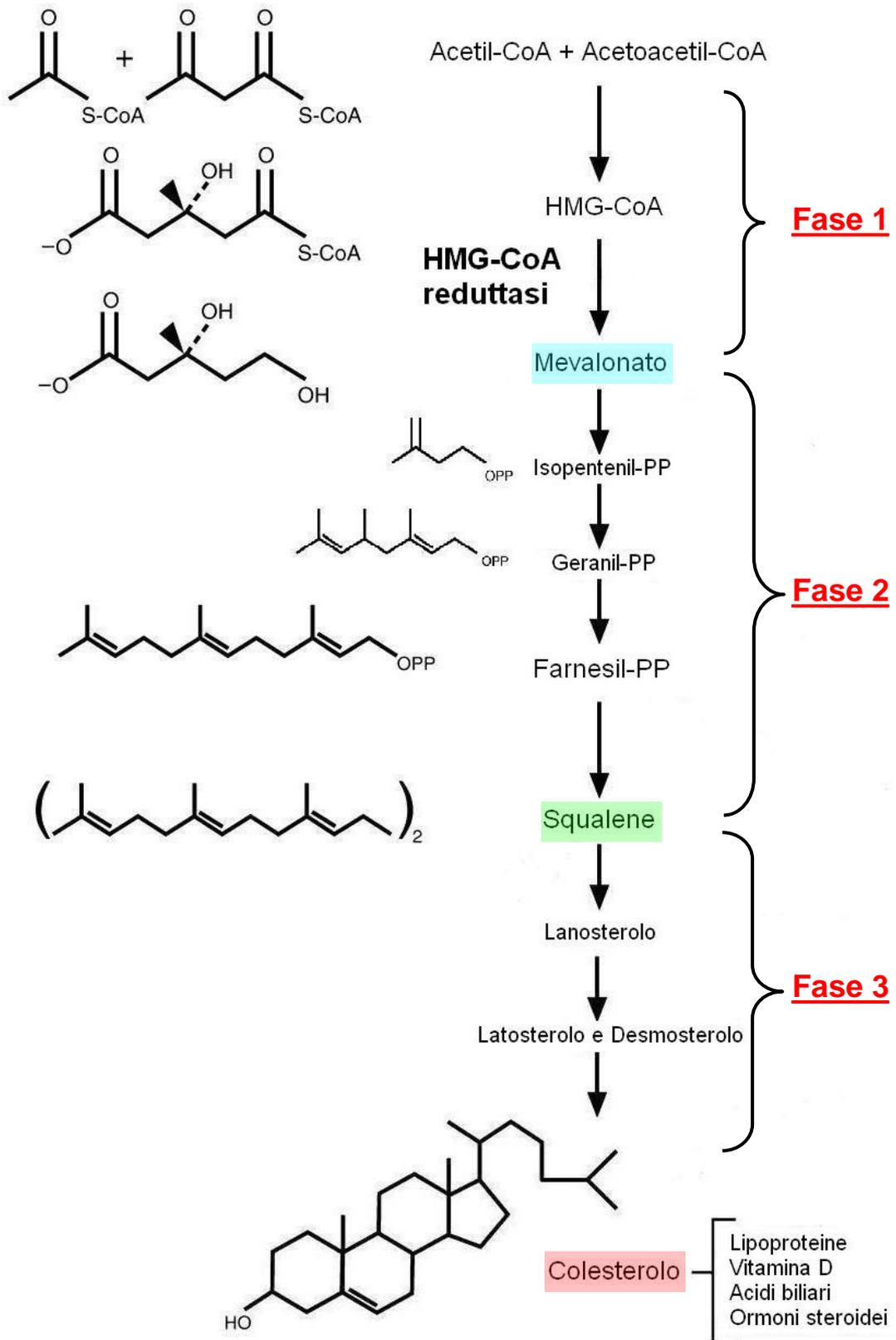


Figura 3. Schema della biosintesi del colesterolo.

Fase 3: ciclizzazione dello squalene e conversione a colesterolo

Questa terza fase avviene a livello del reticolo endoplasmatico liscio (REL) e prevede la ciclizzazione dello squalene a lanosterolo dal quale, attraverso una serie di 20 reazioni (tra demetilazioni e isomerizzazioni), si formano dapprima latosterolo e desmosterolo e poi il colesterolo.

La biosintesi del colesterolo è una via metabolica strettamente regolata che utilizza molteplici meccanismi di regolazione al fine di mantenere l'omeostasi. L'HMG-CoA reduttasi è l'enzima chiave del *pathway* di biosintesi del colesterolo poiché catalizza la reazione limitante di questo processo, ossia la trasformazione dell'HMG-CoA in mevalonato. Questa reazione, in condizioni fisiologiche, è praticamente irreversibile e rappresenta quindi il target ideale per la regolazione dell'intero processo. L'attività dell'HMG-CoA reduttasi è controllata dal colesterolo stesso e dai metaboliti derivanti dal mevalonato [Istvan E.S. e Deisenhofer J., 2000; Jiang J. et al. 2006] tramite molteplici meccanismi di feedback operanti a diversi livelli.

Regolazione a livello trascrizionale

Il promotore del gene codificante per l'HMG-CoA reduttasi contiene specifiche sequenze regolatrici dette *Sterol Regulatory Elements* (SRE) che sono presenti in più di 30 geni coinvolti nel metabolismo lipidico [Horton J.D. et al., 2003]. Tali elementi SRE devono essere legati da fattori trascrizionali detti SREBPs (*SRE Binding Proteins*) affinché ci sia un livello significativo di trascrizione. Il legame dei fattori SREBPs alle sequenze SRE è regolato mediante tagli proteolitici indotti dalla carenza di colesterolo intracellulare [Horton J.D. et al., 2002]; i fattori SREBPs sono infatti sintetizzati come precursori inattivi legati alla membrane del RE dove interagiscono con un'altra proteina denominata SCAP (*SREBP Cleavage Activating Protein*) che, a sua volta, è trattenuta nel RE dall'interazione con la proteina INSIG (*Insulin Induced Gene-1*) [Nohturfft A. et al., 1998]. In carenza di colesterolo intracellulare l'interazione tra SCAP and INSIG diventa più debole, il complesso SREBP/SCAP si stacca da INSIG e viene quindi esportato nel Golgi dove, tramite due successivi tagli proteolitici (operati da due specifiche proteasi denominate S1P e S2P), si ha la liberazione nel citosol dei fattori trascrizionali maturi [Eberlè D.Q.H. et al., 2004]. In questo modo il gene dell'HMG-CoA reduttasi è attivato solo quando la sintesi endogena di colesterolo si rende strettamente necessaria. Ad essere coinvolti in questo processo sono principalmente le isoforme SREBP-1a e SERBP-2 [Shimomura I. et al., 1997].

Regolazione mediante modifiche post-traduzionali

Alcuni studi hanno evidenziato come l'attività dell'HMG-CoA reduttasi possa essere modulata attraverso processi di fosforilazione e defosforilazione che avvengono a livello di un residuo di serina (Ser 872) presente nel sito attivo dell'enzima [Omkumar R.V. et al., 1994]. La fosforilazione di questo residuo causa una netta diminuzione dell'attività enzimatica. Si ritiene che tale fosforilazione sia mediata dalla protein-chinasi attivata dall'AMP (AMPK) e che aiuti la cellula a limitare il consumo di ATP in condizioni di stress [Hardie D.G. et al., 2006].

Regolazione a livello di degradazione

In cellule deprivate di colesterolo l'emivita dell'HMG-CoA reduttasi è superiore a 12 h, mentre l'accumulo di steroli ed isoprenoidi la riduce a meno di 1h [Gil G. et al., 1985]. Il meccanismo molecolare che regola questo aumento della velocità di degradazione dell'enzima è stato delucidato abbastanza recentemente e sembra coinvolgere il lanosterolo. Come abbiamo precedentemente illustrato questo metabolita è un precursore del colesterolo e viene prodotto nella seconda fase di sintesi di questa molecola dalla ciclizzazione dello squalene. E' stato dimostrato che l'accumulo di lanosterolo nelle membrane del RE è in grado di promuovere, mediante la proteina INSIG (*Insulin Induced Gene-1*), l'ubiquitinazione dell'HMG-CoA reduttasi che in questo modo viene conseguentemente avviata alla degradazione da parte del proteasoma [Song B.L. et al., 2005]. Mediante tale processo, il lanosterolo è dunque in grado di abbassare i livelli intracellulari di HMG-CoA reduttasi, limitando conseguentemente la sintesi di colesterolo. Non è ancora completamente chiaro come mai questo meccanismo di feedback sia attivato dal lanosterolo invece che dal colesterolo stesso. Una possibile spiegazione razionale di questo ruolo chiave giocato dal lanosterolo (invece che dal colesterolo) potrebbe risiedere nella forte citotossicità causata dall'accumulo di questa molecola [Xu F. et al., 2005].

ASSORBIMENTO INTESTINALE DI COLESTEROLO E SUA REGOLAZIONE

Il colesterolo sintetizzato “*de novo*” non rappresenta l'unica fonte di ingresso del pool totale di colesterolo presente nell'uomo. Alla quantità di colesterolo prodotta per via endogena va infatti aggiunta la quota di colesterolo alimentare che viene

giornalmente introdotta con la dieta. Un uomo adulto con dieta di tipo occidentale assume con gli alimenti una quantità di colesterolo che in media varia da circa 50 a circa 750 mg al giorno [Weihrauch J. e Gardner J., 1978]; inoltre ad ogni pasto nell'intestino si riversa anche una quota di colesterolo biliare che, nell'arco delle 24h, ammonta a circa 1 g [Grundy S.M. e Metzger A.L., 1972; Wilson M.D. e Rudel L.L., 1994]. A livello intestinale circa il 50% del colesterolo introdotto con l'alimentazione viene assorbito attraverso gli enterociti, mentre la quota rimanente è escreta con le feci [Bays H., 2002]. Questo quadro risulta tuttavia estremamente variabile da individuo ad individuo e tali variazioni sembrano influenzate da fattori genetici [Gylling H.M. e Mietinen T.A., 2002].

Per lungo tempo si è ritenuto che l'assorbimento intestinale del colesterolo si realizzasse per semplice diffusione passiva attraverso le membrane dell'orletto a spazzola degli enterociti, tuttavia studi condotti più recentemente hanno permesso l'identificazione di alcune proteine la cui funzione è risultata essenziale nell'assorbimento del colesterolo. L'identificazione di queste proteine chiave ha consentito di comprendere che l'assorbimento del colesterolo è un processo attivo, selettivo e finemente regolato (Figura 3). L'assorbimento intestinale del colesterolo è un processo che si compone di più fasi durante le quali gli enterociti catturano una parte del colesterolo che si viene a trovare ogni giorno nel lume intestinale derivante, in parte dall'alimentazione, in parte dalla bile e in parte dalla desquamazione delle cellule della mucosa enterica.

Una quota di colesterolo assorbito viene utilizzata dagli enterociti per il metabolismo cellulare mentre la maggior parte viene incorporata in lipoproteine e raggiunge il fegato; quest'ultimo deve quindi provvedere al metabolismo delle diverse centinaia di mg di colesterolo assorbito a livello intestinale.

Oltre al colesterolo gli alimenti che quotidianamente introduciamo con la dieta contengono anche una certa quantità di altri steroli di origine vegetale detti fitosteroli (o più semplicemente steroli vegetali) che tuttavia, data la loro scarsa concentrazione plasmatica, vengono assorbiti in misura nettamente inferiore rispetto al colesterolo [Altmann S.W. et al., 2004; Anderson L.J. et al., 1989]. Nonostante questo la concentrazione plasmatica di questi fitosteroli può risultare indicativa dell'entità del processo di assorbimento intestinale di colesterolo (come sarà approfondito nei capitoli successivi).

Il processo di assorbimento intestinale di colesterolo può essere suddiviso in tre fasi principali:

Fase 1: fase endoluminale

Inizialmente esteri del colesterolo vengono idrolizzati da parte delle lipasi pancreatiche e, successivamente, il colesterolo libero viene incorporato in micelle costituite da sali biliari, fosfolipidi, acidi grassi e monogliceridi. Quest'ultimo processo è fondamentale per la solubilizzazione del colesterolo libero che di per sé è scarsamente solubile in ambiente acquoso [Hofmann A.F. e Borgstroem B., 1964]. La diffusione lenta delle micelle attraverso la barriera acquosa che riveste la membrana degli enterociti garantisce che il colesterolo entri poi nella cellula in forma monomeric.

Fase 2: assunzione ed escrezione di colesterolo da parte degli enterociti

A livello enterico il processo di assorbimento di colesterolo è il risultato complessivo dell'equilibrio tra due processi di trasporto opposti e complementari operanti a livello della membrana apicale degli enterociti: l'*uptake* degli steroli e la loro riescrezione nel lume intestinale. Tali processi di trasporto sono mediati da specifiche proteine trasportatrici: Niemann Pick C1-Like 1 (NPC1L1) [Altmann S.W. et al., 2004], per quanto riguarda l'assunzione e ABCG5 / ABCG8 per quanto riguarda la riescrezione verso il lume [Berge K.E. et al., 2000; Lee M.H. et al., 2001]. È stato evidenziato che, mentre NPC1L1 media l'*uptake* sia del colesterolo che dei fitosteroli, il processo di secrezione a ritroso verso il lume dell'intestino da parte di ABCG5 e ABCG8 interessa soprattutto gli steroli vegetali [Hui D.Y. e Howless P.N., 2005] e questo spiegherebbe la minore entità di assorbimento degli stessi rispetto al colesterolo (Figura 4).

Come già accennato le principali proteine coinvolte in questa fase del processo di assorbimento sono:

- **Niemann Pick C1-Like 1**: si tratta di una proteina politopica transmembrana, responsabile dell'assorbimento del colesterolo assunto tramite la dieta e del riassorbimento del colesterolo biliare. NPC1L1 è costituita da 13 domini transmembrana, 3 *loops* che si affacciano nel lume intestinale, diversi piccoli *loops* citoplasmatici e un dominio C-terminale intracellulare conservato [Wang J. et al., 2009; Davies J.P. e Ioannou Y.A., 2000]. Dei 13 domini transmembrana 5 costituiscono un dominio sensibile agli steroli (SSD, *Sterol*

Sensing Domain), dominio che risulta essere conservato anche in diverse proteine di membrana coinvolte nella regolazione, metabolismo o assorbimento del colesterolo [Kuwabara P.E. e Labouesse M., 2002]. Il significato funzionale dell'SSD sembra quindi essere strettamente connesso al legame tra steroli e proteine [Ohgami N. et al. 2004].

Nell'uomo NPC1L1 è distribuita sull'orletto a spazzola della membrana degli enterociti e sulla membrana dei canalicoli biliari degli epatociti [Altamann S.W. et al., 2004; Garcia-Calvo M. et al., 2005]. Diverse evidenze suggeriscono che il meccanismo molecolare di azione di NPC1L1 potrebbe essere endocitosi mediata da clatrina [Yu L. et al., 2006; Ge L., 2008].

La scoperta del ruolo chiave giocato da NPC1L1 nell'assorbimento intestinale di colesterolo è emerso grazie alla sua identificazione come target molecolare dell'ezetimibe (Zetia®), un farmaco approvato dalla *US Food and Drug Administration* nel trattamento dell'ipercolesterolemia ed in grado di inibire l'ingresso del colesterolo negli enterociti [Gagne C. et al., 2002; Davidson M.H. et al., 2002]. Dato che l'inibizione dell'assorbimento mediata dall'ezetimibe viene compensata da un aumento della biosintesi del colesterolo [Davis H.R. e Veltri E.P., 2007], spesso questo farmaco viene somministrato in associazione ad una statina che blocca la sintesi endogena di colesterolo agendo a livello dell'HGM-CoA reduttasi [Endo A., 1992].

Ulteriori conferme del ruolo di NPC1L1 sono giunte da diversi studi che hanno dimostrato come la delezione del gene *Npc1l1* nei topi riduca l'assorbimento del colesterolo agli stessi livelli osservati nei topi trattati con *ezetimibe*, e come il trattamento con tale farmaco di topi privati di NPC1L1 non provochi alcuna riduzione della quantità di colesterolo assorbito [Altamann S.W., 2004; Davis Jr. H.R. et al., 2004]. Questi studi chiaramente evidenziano l'importanza di questa proteina nell'assorbimento del colesterolo.

- ABCG5 e ABCG8: queste due proteine sono trasportatori appartenenti alla superfamiglia delle proteine ABC (*ATP Binding Cassette*), polipeptidi di membrana che mediano un processo di trasporto attivo accoppiato all'idrolisi di ATP. In particolare ABCG5 e ABCG8 sono “emi-trasportatori”, ossia necessitano di accoppiarsi tra di loro formando un eterodimero per essere

funzionali [Graf G.A. et al., 2002]. La loro eterodimerizzazione è anche fondamentale per la traslocazione dal RE alla membrana [Graf G.A. et al., 2002]. Essi fanno parte della sottofamiglia G dei trasportatori ABC in quanto contengono un singolo dominio ATP magnesio-dipendente all'estremità N-terminale oltre che 6 segmenti transmembrana. Mutazioni nei geni codificanti per queste due proteine trasportatrici possono causare una malattia ereditaria detta β -sitosterolemia [Berge K.E. et al., 2000; Lee M.H. et al., 2001], una patologia caratterizzata da un accumulo di fitosteroli nel sangue (e in altri tessuti) dovuto ad un loro eccessivo assorbimento da parte dall'intestino (e/o scarsa secrezione nella bile). Questo fatto suggerisce che questi due trasportatori siano coinvolti nella formazione di un complesso funzionale che limita l'assorbimento degli steroli risecernendo gli stessi dall'epitelio intestinale nel lume al fine di promuoverne l'escrezione mediate le feci.

Topi privi di ABCG5/G8 mostrano infatti una riduzione dell'escrezione del colesterolo, mentre gli effetti sull'efficienza di assorbimento dello stesso sono minimi [Yu L. et al., 2002a].

I trasportatori ABCG5 e ABCG8 sono espressi sulla membrana apicale degli enterociti, così come a livello del polo biliare dell'epatocita; sono perciò coinvolti, da una parte nel sistema di regolazione dell'*uptake* del colesterolo e degli steroli vegetali presenti negli alimenti, dall'altra nella secrezione biliare del colesterolo, una delle principali vie attraverso cui il colesterolo endogeno è eliminato dall'organismo. Anche a livello della membrana dell'epatocita l'azione dell'eterodimero ABCG5-G8 è controbilanciata dall'attività di NPC1L1, contribuendo quindi a regolare oltre ai livelli di steroli biliari anche il contenuto di colesterolo nella membrana stessa.

L'espressione di ABCG5/G8 è regolata a livello trascrizionale dal contenuto intracellulare di colesterolo e/o di derivati ossidati dello stesso (ossisteroli). È stato difatti osservato, sempre su topi, come la somministrazione di una dieta ad elevato contenuto di colesterolo aumenti l'espressione di questi geni sia livello epatico che intestinale [Van der Veen J.N. et al., 2005].

- **SR-B1 e CD-36:** si tratta di recettori localizzati sulla membrana apicale e basale degli enterociti e che, secondo alcuni studi, potrebbero contribuire a regolare ulteriormente l'assorbimento di colesterolo. Inizialmente fu

ipotizzato un possibile coinvolgimento nel controllo dell'assorbimento del colesterolo da parte del recettore SR-B1 (*Scavenger Receptor B Class type 1*) [Cai L. et al., 2004] e questa possibilità fu ulteriormente suggerita da studi su topi che mostravano come un'overespressione di tale recettore a livello intestinale permettesse un aumento nell'assorbimento di colesterolo e trigliceridi [Bietrix F. et al., 2006]. In seguito si ipotizzò un ruolo anche per la traslocasi CD-36. Topi privi di CD-36 mostravano, infatti, una riduzione del trasporto del colesterolo dal lume intestinale al sistema linfatico [Nauli A.M. et al., 2006]; mentre l'overespressione di CD-36 in cellule COS-7 induceva un aumento dell'*uptake* del colesterolo dalle micelle [Van Bennekum A. et al., 2005]. Questa proteina sembra quindi coinvolta sia nell'assorbimento del colesterolo endoluminale che nel suo trasporto attraverso l'orletto a spazzola degli enterociti.

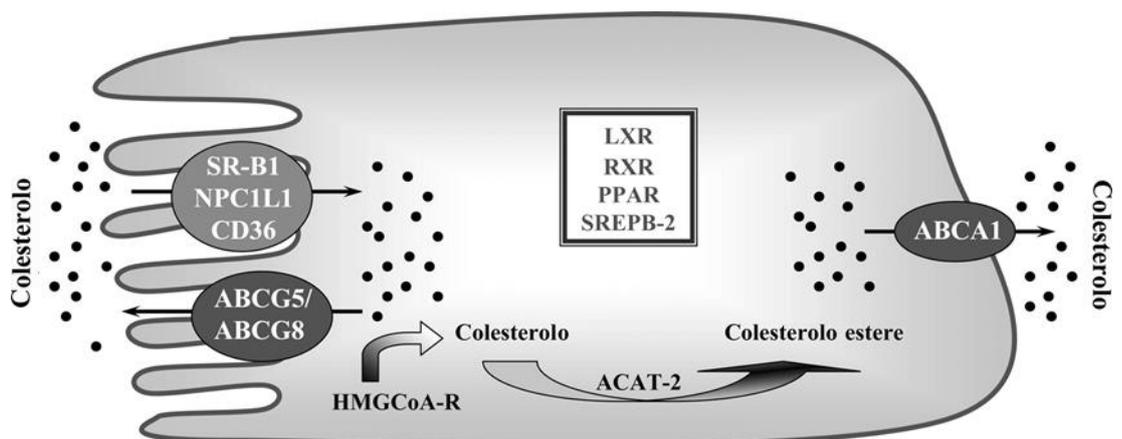


Figura 4. Assorbimento intestinale del colesterolo. L'immagine mostra l'attività coordinata dei diversi trasportatori che nell'enterocita mediano l'assorbimento del colesterolo alimentare (NPC1L1, SR-B1, CD36 e ABCG5/G8). All'interno della cellula il colesterolo può essere esterificato tramite ACAT-2 e poi incorporato in specifiche lipoproteine tramite ABCA-1. L'espressione di tutti questi trasportatori è regolata da specifici recettori nucleari (LXR, RXR, PPAR, SREBP-2). [immagine adattata da Ravid Z. et al. 2008].

Fase3: trasporto intracellulare e formazione delle lipoproteine

Nell'ultima fase del processo di assorbimento il colesterolo internalizzato dagli enterociti viene trasportato all'interno degli stessi per essere assemblato nelle lipoproteine. Esistono diversi meccanismi di assemblaggio e secrezione delle lipoproteine intestinali ed una loro trattazione esaustiva esula dagli scopi di questa tesi, tuttavia possiamo sinteticamente dire che le principali lipoproteine coinvolte

sono: chilomicroni (vie dipendenti da apoB) e HDL (vie indipendenti da apoB). Tali vie di esportazione del colesterolo assorbito a livello enterico sono complementari tra loro e probabilmente agiscono di concerto per assicurare un efficiente trasporto dei lipidi alimentari.

Il processo dell'assorbimento del colesterolo risulta quindi fondamentale per il corretto funzionamento dell'organismo. Disordini a questo livello possono portare a patologie cardiache come l'arteriosclerosi coronarica [Tall A.R. et al., 2012], a sitosterolemie [Berge K.E. et al., 2000; Lee M.H. et al., 2001], finanche alla formazione di calcoli biliari, il cui sviluppo può essere la conseguenza di una scarsa escrezione di colesterolo [Jabłońska B., 2012].

TRASPORTO DEL COLESTEROLO: LIPOPROTEINE E LORO METABOLISMO

Il trasporto del colesterolo nel circolo sanguigno è fondamentale affinché sia la quota assorbita a livello intestinale, sia quella endogena prodotta dal fegato possano raggiungere i diversi tessuti periferici al fine di essere utilizzate per la sintesi di membrane e la produzione di biomolecole. Parallelamente il colesterolo in eccesso che non viene utilizzato dai tessuti periferici deve poter essere ritrasportato al fegato che provvede alla sua eliminazione. Il colesterolo, tuttavia, pur essendo un composto anfipatico è complessivamente poco polare e quindi poco solubile in soluzione acquosa; per questo motivo il suo trasporto nel plasma deve avvenire all'interno di complessi plurimolecolari noti come lipoproteine. Le lipoproteine sono macromolecole sferiche contenenti lipidi e proteine in porzioni variabili e costituiscono le principali unità di trasporto di lipidi nel plasma. Tutte le lipoproteine presentano una struttura di base composta da un nucleo centrale di lipidi neutri (esteri del colesterolo e trigliceridi) ed un rivestimento superficiale idrofilo costituito da lipidi polari (colesterolo libero e fosfolipidi) e apoproteine [Gotto et al., 1986]. Il rivestimento superficiale, per certi versi assimilabile a quello delle membrane plasmatiche delle cellule, funziona da interfaccia tra il plasma acquoso ed il nucleo interno costituito da lipidi non polari. Questa superficie polare di rivestimento rende quindi possibile il trasporto nel plasma degli esteri del colesterolo e dei trigliceridi che sono sostanzialmente idrofobici (Figura 5). Le apoproteine di rivestimento

superficiale, oltre a costituire la maggior parte del rivestimento idrofilico delle lipoproteine, svolgono anche importanti funzioni per il metabolismo delle stesse particelle lipoproteiche; esse sono infatti necessarie per l'assemblaggio e la secrezione delle specifiche lipoproteine (di cui garantiscono la stabilità), agiscono come cofattori nell'attivazione di enzimi coinvolti nel metabolismo di queste macromolecole ed inoltre interagiscono con specifici recettori della superficie cellulare tramite i quali le particelle lipoproteiche possono entrare nelle cellule per rifornirle della quantità necessaria di lipidi e colesterolo.

Le lipoproteine sono differenziate in diverse classi di molecole sulla base della loro densità, delle loro dimensioni e della specifica composizione lipidica/aproteica. Queste caratteristiche sono il risultato dell'azione di diversi enzimi come: la lipoproteina lipasi (LPL) [Olivecrona T. e Bengtsson-Olivecrona G., 1990], la trigliceride lipasi epatica (HTGL) [Zambon A. et al., 1999], la lecitina-colesterolo aciltransferasi (LCAT) [Rousset X. et al., 2009; Applebaum-Bowden D., 1995] e la proteina di trasferimento degli esteri del colesterolo (CETP) [Hesler C.B. et al., 1987].

Le lipoproteine più conosciute sono quelle plasmatiche, deputate al trasporto dei lipidi dall'intestino al fegato e dal fegato ai diversi tessuti (Figura 6).

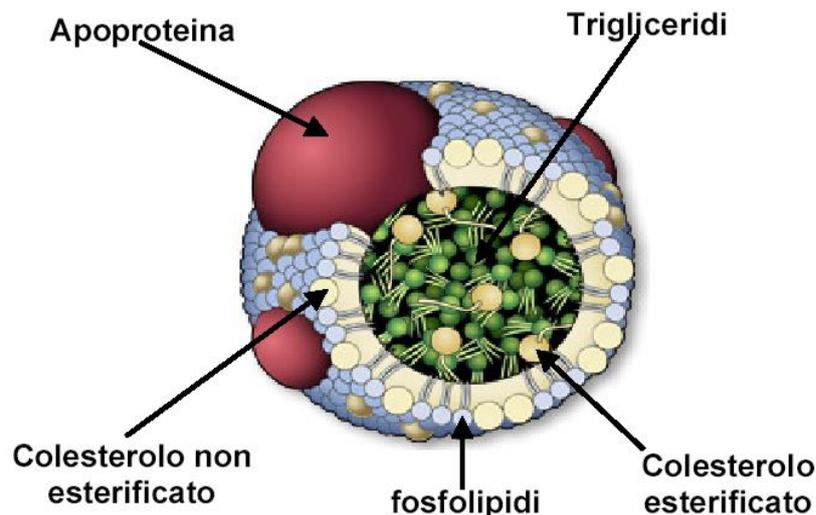


Figura 5. Struttura delle lipoproteine plasmatiche.

La struttura delle lipoproteine è simile a quella delle micelle fosfolipidiche. L'involucro esterno è composto da: 1) apoproteine, 2) fosfolipidi, 3) colesterolo non esterificato. I gruppi polari di queste molecole sono rivolti verso l'esterno così che la superficie del complesso è idrofila e pertanto può interagire con il plasma. Il nucleo interno, composto dai lipidi trasportati (trigliceridi e colesterolo esterificato), è invece del tutto apolare e interagisce con la porzione interna apolare dell'involucro.

I chilomicroni, particelle relativamente grandi e a densità molto bassa, trasportano principalmente lipidi di tipo alimentare. Essi sono costituiti da un core lipidico (trigliceridi) circondato da molecole proteiche (apoB-48) che conferiscono loro un maggiore grado di idrosolubilità. Sono prodotti dagli enterociti dai quali fuoriescono per entrare nel circolo linfatico [Powell L.M. et al., 1987] e arrivare quindi a quello ematico. Dopo aver distribuito il loro contenuto lipidico ai vari tessuti i chilomicroni si restringono fino a ridursi a residui (*remnants*) ricchi in colesterolo. Vengono quindi convogliati al fegato che provvede a degradare il loro involucro proteico ed a riciclare i residui lipidici racchiusi al loro interno. Essi sono rimossi dalla circolazione sanguinea molto rapidamente, difatti il loro periodo di dimezzamento è di circa 5 minuti [da Rawn D.J, *Biochimica II ED*, McGraw-Hill].

Le VLDL (*Very Low Density Lipoprotein*) sono lipoproteine a bassissima densità ricche di trigliceridi, sintetizzate e secrete dal fegato, hanno come componente proteica principale l'apoB100, seguita da varie apoC e apoE. Il loro tempo di dimezzamento è di circa 6 ore e la loro degradazione per perdita di trigliceridi e apolipoproteine (apoC e apoE) da origine dapprima alle IDL e poi alle LDL [da Voet D. et al., *Fondamenti di biochimica II ED*, Zanichelli].

Le IDL (*Intermediate Density Lipoprotein*) sono un tipo di lipoproteine prodotte per effetto della degradazione delle VLDL (e in misura minore dei chilomicroni); esse contengono trigliceridi e colesterolo in parti uguali [Eisenberg S. e Sehayek E., 1995; Cohn J.S. et al., 1999] e sono a loro volta precursori delle LDL. A causa del loro rapido metabolismo generalmente queste lipoproteine non raggiungono concentrazioni plasmatiche significative.

Le LDL (*Low Density Lipoprotein*) sono lipoproteine a bassa densità, di dimensioni inferiori rispetto alle precedenti, con maggior componente proteica (apoB100) e ricche di colesterolo esterificato. Derivano dal metabolismo delle VLDL e delle IDL e rappresentano il principale trasportatore plasmatico del colesterolo ai tessuti periferici.

Le HDL (*High Density Lipoprotein*) hanno funzione fondamentalmente opposta a quella delle LDL, il loro compito è la rimozione del colesterolo dai tessuti. Sono principalmente secrete nel sangue come precursori apolipoproteici da fegato e intestino. La componente proteica principale delle HDL è l'apoA-I e hanno un periodo di dimezzamento variabile da 3 a 6 giorni [da Rawn D.J, *Biochimica II ED*, McGraw-Hill].

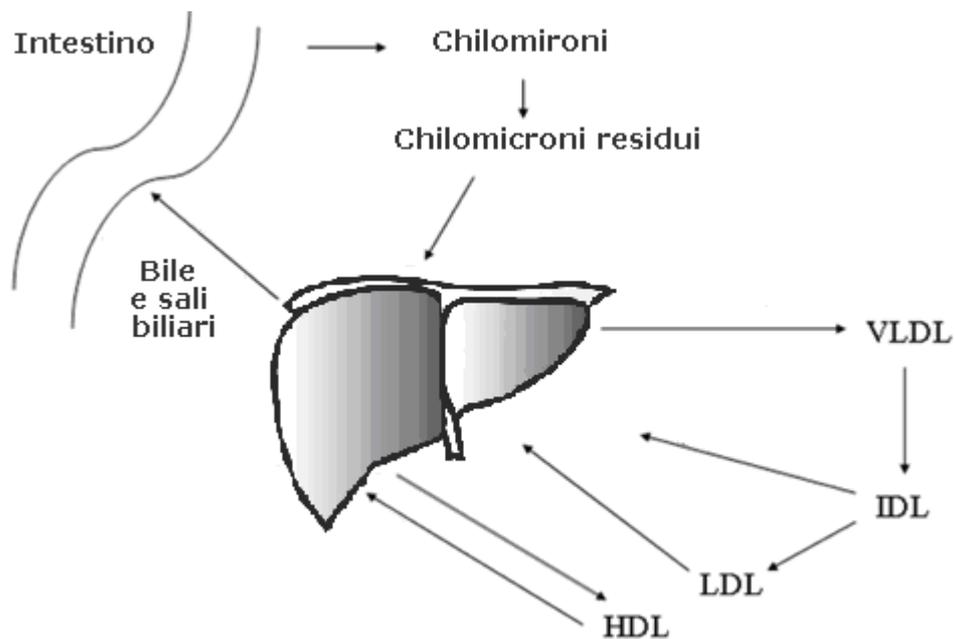


Figura 6. Schema del circolo delle lipoproteine.

Le LDL e le HDL rappresentano quindi le principali lipoproteine coinvolte nel trasporto e nel metabolismo del colesterolo (oltre ai chilomicroni necessari per il trasporto del colesterolo di origine alimentare).

Le LDL derivano dal catabolismo delle VLDL prodotte dal fegato ed hanno il ruolo di trasportare il colesterolo dal fegato ai tessuti periferici. Il nucleo delle VLDL di origine epatica contiene inizialmente trigliceridi ed una piccola quota di esteri del colesterolo; nei capillari del muscolo e del tessuto adiposo i trigliceridi-VLDL vengono rimossi, ad opera della lipoprotein lipasi (LPL). Inoltre, tramite reazioni di scambio con le altre classi di lipoproteine, i residui delle VLDL perdono tutte le apoproteine eccetto l'apoB-100. Tramite tali processi le VLDL sono convertite prima in IDL e poi in LDL nel cui nucleo sono presenti principalmente esteri del colesterolo. Le LDL trasportano il colesterolo in tutti i tessuti e sono rimosse dal plasma grazie alla presenza di specifici recettori extracellulari detti, recettori per lipoproteine a bassa densità (LDLR) grazie ai quali le cellule possono internalizzare le LDL per prelevarne il carico di colesterolo. Gli LDLR si trovano generalmente raggruppati in invaginazioni rivestite da clatrina e legano in modo specifico l'apoB-100. Una volta endocitate le LDL danno così origine a vescicole rivestite che, una volta perso il rivestimento di clatrina, formano endosomi all'interno dei quali le particelle lipoteiche si separano dai loro recettori. Dall'endosoma si formano quindi,

per gemmazione, una vescicola contenente solo i recettori che torna alla membrana plasmatica, ed una vescicola contenente LDL che si fonde con un lisosoma le cui lipasi acide idrolizzano gli esteri del colesterolo, i trigliceridi e gli altri componenti lipidici. Parallelamente la componente apolipoproteica viene degradata [da Voet D. et al., *Fondamenti di biochimica II ED*, Zanichelli].

I recettori delle LDL sono perciò fondamentali per il metabolismo del colesterolo e la loro espressione deve essere regolata in modo opportuno: un sistema difettoso dei recettori delle LDL provoca infatti livelli anormalmente alti di colesterolo circolante, con probabile aumento di malattie cardiache [da Voet D. et al., *Fondamenti di biochimica II ED*, Zanichelli]. La trascrizione del gene dell'LDLR è regolata dai fattori trascrizionali SREBPs e quando la concentrazione intracellulare di colesterolo aumenta essa viene soppressa e conseguentemente le LDL vengono trattenuate nel sangue [Horton J.D. et al., 2003]. A livello epatico, la quota di colesterolo che entra nella cellula, da un lato determina l'inibizione dell'attività dell'HMG-CoA reduttasi (l'enzima chiave nella sintesi del colesterolo) e dall'altro stimola l'attività dell'acil-colesteroloaciltransferasi (ACAT) (enzima che esterifica il colesterolo libero per poterlo conservare nei depositi cellulari). Il risultato di questo meccanismo coordinato è che la quantità intracellulare di colesterolo libero rimane costante.

L'altra classe di lipoproteine fondamentali per il trasporto del colesterolo è quella delle HDL. Queste molecole, a differenza delle LDL, hanno il compito di rimuovere il colesterolo dai tessuti poiché le cellule umane non possono degradare il colesterolo e l'eccesso di tale composto deve essere trasportato al fegato per il riutilizzo e/o l'eliminazione; tale processo è noto come "trasporto inverso del colesterolo" (CRT, *Cholesterol Reverse Transport*) [Glomset J.A. e Norum K.R., 1973]. La maggior parte delle HDL contengono l'apolipoproteina A-I (apoA-I) che è anche la più abbondante nel plasma umano. La prima tappa del trasporto inverso del colesterolo consiste nella produzione, da parte dell'intestino e del fegato, di precursori ApoA-I che vengono poi assemblati assieme a fosfolipidi sotto forma di aggregati discoidali (pre- β -HDL). Nei tessuti periferici il colesterolo in eccesso viene caricato nelle pre- β -HDL mediante l'azione del trasportatore transmembrana ATP-dipendente ABCA1, una proteina ubiquitaria appartenente alla famiglia ABC che media l'efflusso unidirezionale di colesterolo e fosfolipidi verso specifici accettori extracellulari poveri di lipidi (l'accettore preferenziale è appunto apoA-I); in questo modo il colesterolo in eccesso viene assemblato nelle pre- β -HDL. Successivamente, grazie

all'azione dell'enzima lecitina:colesterolo aciltransferasi (LCAT), il colesterolo viene esterificato con formazione di HDL "mature" a struttura sferica (α -HDL). Il ritorno al fegato del colesterolo HDL (HDL-C) nell'uomo può avvenire principalmente in due modi:

- assorbimento diretto tramite il recettore SR-B1
- scambio mediato da CETP di colesterolo HDL esterificato nelle lipoproteine contenenti apo-B seguito dal loro uptake epatico tramite il recettore LDL.

L'uptake mediato da SR-B1 è reso più efficiente grazie all'attività della lipasi epatica in grado di rimodellare le HDL idrolizzando i fosfolipidi di superficie e consentendo così il flusso del colesterolo esterificato dal core lipoproteico verso la membrana plasmatica. La particella di HDL svuotata tornerà poi nel circolo sanguineo [da Voet D. et al., *Fondamenti di biochimica II ED*, Zanichelli]. Il colesterolo che è stato rimosso, invece, viene riciclato in altre lipoproteine oppure escreto nella bile [Levinson S.S., 2006].

ELIMINAZIONE DEL COLESTEROLO: ACIDI BILIARI E LORO METABOLISMO

Come tutte le molecole biologiche presenti all'interno dell'organismo umano anche il colesterolo è soggetto ad un continuo *turn-over* e quindi il processo di eliminazione del colesterolo è un passaggio importante per la regolazione della sua omeostasi. Al fine di mantenere immutato il carico globale di steroli nell'organismo è quindi necessario che ogni giorno una quota di colesterolo venga escreta. Sebbene una piccola quota di colesterolo venga persa quotidianamente a causa della desepitelizzazione della cute e dell'intestino e della sintesi degli ormoni steroidei, la maggior parte del colesterolo viene eliminato attraverso due processi metabolici messi in opera dal fegato. Nell'uomo non esistono meccanismi biochimici che permettano la degradazione completa del colesterolo in composti inorganici (CO_2 e H_2O). Il principale processo epatico di eliminazione di questa molecola consiste nella degradazione e biotrasformazione del colesterolo in acidi biliari, acido colico (CA) e acido chenodesossicolico (CDCA), nella loro secrezione nella bile e conseguente perdita nelle feci. Si ritiene che, in condizioni fisiologiche, circa 300-400mg di colesterolo vengano quotidianamente eliminati con questa modalità [Bertolotti M. et al., 2008a]. Inoltre all'incirca la stessa quantità di colesterolo viene escreta

direttamente nella bile sotto forma di colesterolo libero bile e di questa quota, circa il 50%, viene successivamente riassorbito dall'epitelio intestinale [Yu L. et al., 2002a].

Secrezione biliare di colesterolo

Il pool di colesterolo destinato alla secrezione biliare non è ancora completamente noto, ma si ritiene che possa derivare da un deposito epatico preesistente di cui, una parte (5-20%) derivato dalla sintesi *de novo*, ed un'altra parte ricavata dall'uptake delle lipoproteine plasmatiche, in particolare dalle HDL [Robins S.J. et al., 1993; Empen K. et al., 1997].

Come abbiamo già avuto modo di accennare la secrezione diretta del colesterolo nella bile risulta mediata da un sistema di trasporto canicolare costituito dalle proteine transmembrana ABCG5 e ABCG8 di cui è stato dettagliatamente illustrato il ruolo svolto nella regolazione dell'assorbimento intestinale. Queste proteine, oltre che nel piccolo intestino, sono espresse anche sulla superficie apicale degli epatociti e si ritiene siano coinvolte nella secrezione biliare di colesterolo. Il loro ruolo chiave nel processo di secrezione è emerso grazie a studi condotti su topi geneticamente modificati. Un primo studio [Yu L. et al., 2002a] condotto su topi knockout per i geni *Abcg5* a *Abcg8* ha mostrato che la mancanza di questi due trasportatori impedisce la secrezione biliare di colesterolo. Un secondo studio condotto su topi transgenici [Yu L. et al., 2002b] ha evidenziato come l'overespressione dei geni *Abcg5* e *Abcg8* umani stimoli la secrezione biliare di colesterolo e, parallelamente, ne riduca del 50% l'assorbimento intestinale, con il risultato finale di incrementare di 3-6 volte l'escrezione fecale degli steroli. Le proteine ABCG5/G8, operando sia nel processo di assorbimento che nel processo di escrezione, ricoprono quindi un ruolo chiave nel bilancio globale degli steroli presenti nell'organismo [Hazard S.E. e Patel S.B., 2007]. I geni per questi 2 trasportatori sono coespressi e coregolati da un unico promotore intergenico contenente siti di legame per diversi fattori trascrizionali (tra cui due GATA-box) e delle sequenze di binding per i recettori nucleari *Liver Receptor Homologue-1* (LRH-1) [Freeman L.A. et al., 2004] e *Hepatocyte Nuclear Factor-4* (HNF-4) [Sumi K. et al., 2007]. Poiché ABCG5/G8 formano un complesso funzionale e sono instabili se espresse singolarmente, la presenza di un promotore intergenico e di un'unica regione di controllo in comune che agisce in modo bidirezionale fornisce un semplice meccanismo per una loro espressione coordinata. Sia LHR-1 che HNF-4 sono recettori intracellulari che giocano un ruolo chiave

anche nella regolazione della sintesi degli acidi biliari e dunque il processo di secrezione biliare del colesterolo e la sua degradazione ad acidi biliari sono controllati, almeno in parte, dagli stessi fattori. La co-regolazione di questi due processi è infatti fondamentale affinché il rapporto tra la quantità di colesterolo libero e di acidi biliari presenti nella bile sia adeguatamente bilanciata per evitare la precipitazione del colesterolo e la successiva formazione di calcoli a livello della colecisti o delle vie biliari.

Acidi biliari

Gli acidi biliari (BA) sono i prodotti finali idrosolubili del catabolismo del colesterolo e sono i principali soluti organici presenti nella bile. Si tratta di molecole anfipatiche simili a detergenti, coinvolte nell'emulsione in soluzione acquosa dei lipidi introdotti con la dieta che per loro natura non sono solubili in acqua. Gli acidi biliari (detti anche sali biliari) sono composti organici a 24 atomi di carbonio la cui struttura base è costituita dal nucleo sterideo del colesterolo; sono sintetizzati nel fegato e accumulati nella cistifellea sotto forma di coniugati degli amminoacidi glicina o taurina. Il processo di coniugazione li rende impermeabili alle membrane cellulari e in grado di persistere nella bile e nel contenuto intestinale anche a concentrazioni elevate. Dalla cistifellea gli acidi biliari sono poi secreti nel duodeno e nell'intestino tenue dove svolgono funzioni importanti nella digestione e nell'assorbimento dei lipidi [da Voet D. et al., *Fondamenti di biochimica II ED*, Zanichelli]. Dal punto di vista chimico gli acidi biliari si differenziano dal colesterolo per la presenza nella molecola di un maggior numero di gruppi idrossilici e per la catena laterale più corta e terminante con un gruppo carbossilico (dove viene poi coniugato l'amminoacido). La presenza di tali gruppi polari e soprattutto il loro specifico orientamento spaziale conferisce agli acidi biliari peculiari caratteristiche chimico-fisiche. I gruppi idrossilici ed il gruppo carbossilico della catena laterale sono infatti orientati lungo la superficie concava della molecola, mentre i gruppi metilici idrofobici risultano orientati lungo la superficie opposta (Figura 6) [Hofmann A.F., 1999a]. Conseguentemente gli acidi biliari risultano composti maggiormente idrosolubili (e quindi più facilmente eliminabili del colesterolo stesso) e soprattutto marcatamente anfipatici: se posti in soluzione acquosa ad una concentrazione superiore a 2 mM, si aggregano formando micelle (Figura 7) [Coello A. et al., 1996]. Molte delle funzioni fisiologiche svolte dagli acidi biliari sono

collegate proprio alla loro capacità di formare tali aggregati molecolari. Gli acidi biliari, infatti, formando micelle insieme ai fosfolipidi presenti nella bile (micelle miste), permettono l'emulsione dei grassi e delle vitamine liposolubili introdotti con la dieta, facilitandone la digestione e l'assorbimento a livello intestinale. In secondo luogo, tramite la formazione delle micelle miste, gli acidi biliari stimolano la secrezione biliare di lipidi e sono in grado di solubilizzare il colesterolo (e gli altri composti lipofili) che vengono escreti nella bile. In aggiunta la loro secrezione nei canalicoli biliari genera una pressione osmotica che permette e regola il flusso biliare stesso.

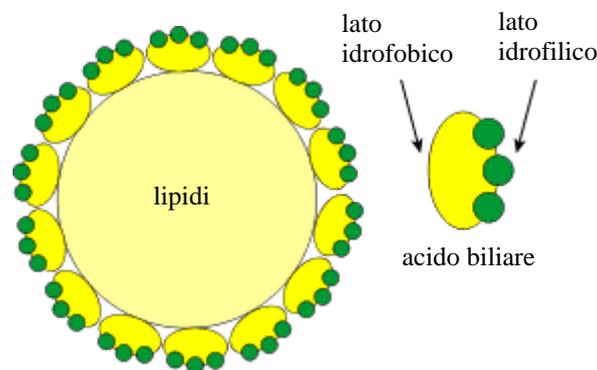


Figura 7. Natura anfipatica degli acidi biliari e formazione delle micelle. Nella molecola di un acido biliare i gruppi polari (pallini verdi) sono orientati tutti sullo stesso lato della molecola (lato inferiore) mentre i gruppi metilici ed il nucleo steroideo sono localizzati sul lato opposto. Questo permette agli acidi biliari di potersi raggruppare a formare le micelle per emulsionare i lipidi alimentari.

Gli acidi biliari si dividono in primari e secondari (Figura 8): i primari, prodotti direttamente dal fegato e sono, come già detto, l'acido colico (CA) e l'acido chenodesossicolico (CDCA). Nel lume intestinale questi possono essere metabolizzati dalla flora batterica in acidi biliari secondari (acido desossicolico, DCA e acido litocolico, LCA), dei quali circa il 20% viene assorbito e nuovamente veicolato al fegato attraverso il circolo enteroepatico (che verrà illustrato nel dettaglio nei successivi paragrafi).

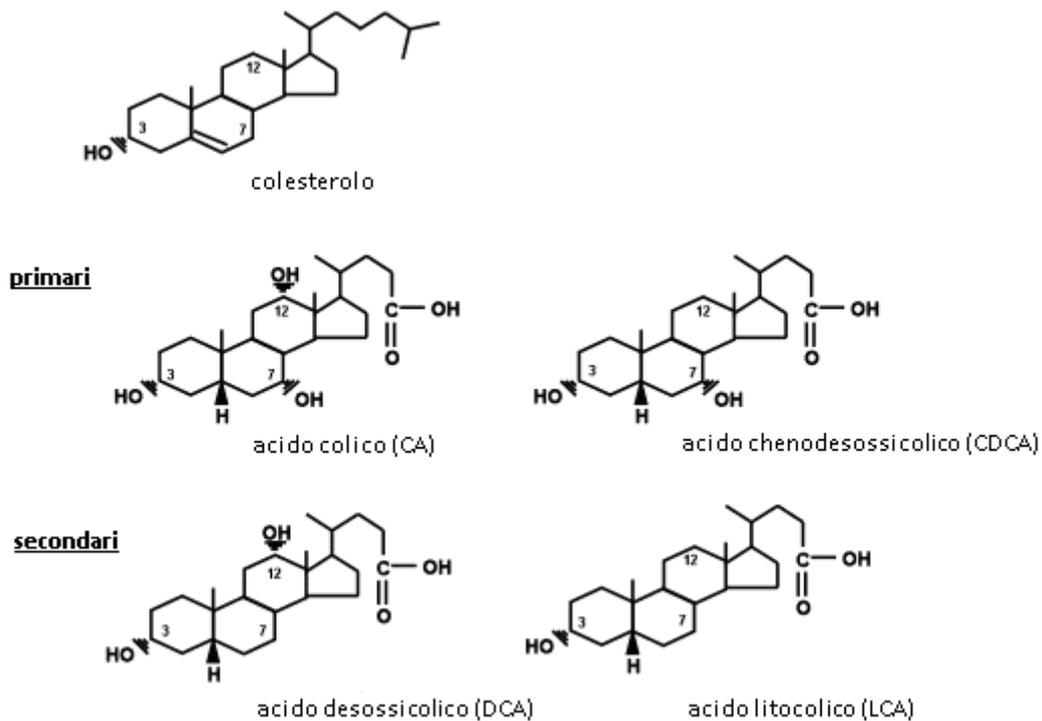


Figura 8. Struttura del colesterolo e degli acidi biliari primari e secondari.

Biosintesi degli acidi biliari

La sintesi degli acidi biliari a partire dal colesterolo coinvolge 17 diversi enzimi, la maggior parte dei quali espressi esclusivamente nel fegato, ed i diversi passaggi di questo processo biochimico possono essere suddivisi in tre fasi:

1. modificazioni della struttura anulare
2. ossidazione e accorciamento della catena laterale
3. coniugazione con un amminoacido

La produzione degli acidi biliari è localizzata principalmente negli epatociti che circondano la vena epatica centrale [Twisk J. et al., 1995]. In seguito al processo catabolico del colesterolo vengono prodotti dapprima gli acidi biliari primari che, in seguito a processi

di trasformazione messi in opera dai batteri della flora intestinale, vengono convertiti negli acidi biliari secondari [Lefebvre P. et al., 2009].

La degradazione del colesterolo ad acidi avviene attraverso 2 *pathways* principali che prendono il nome di **via classica** e **via alternativa** di biosintesi (Figura 9) [Russell D.W., 2003]. La via classica è esclusivamente epatica ed in questo *pathway* le modificazioni del nucleo steroideo del colesterolo precedono quelle della catena laterale; il primo step della via è infatti l'idrossilazione del colesterolo in posizione

C-7 α a dare 7 α -idrossicolesisterolo (7 α -OHC). La via alternativa è invece anche extraepatica ed in questo caso l'ossidazione della catena laterale precede le modificazioni della struttura ad anello; il primo intermedio che viene prodotto nella via alternativa è infatti il 27-idrossicolesisterolo (27-OHC).

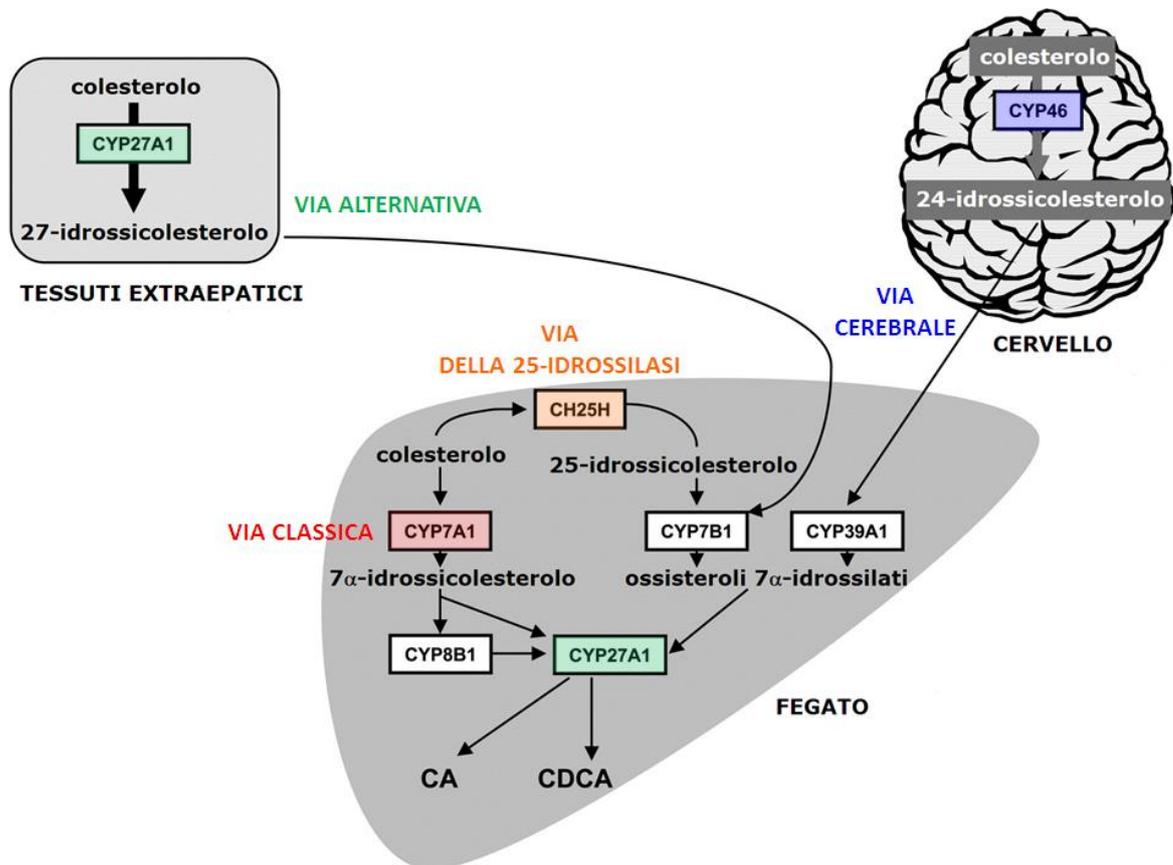


Figura 9. Le vie di sintesi degli acidi biliari nell'uomo. [immagine adattata da Fuchs M. 2003]

Oltre alla via classica e alla via alternativa esistono altri *pathways* di biosintesi degli acidi biliari tra cui emergono la **via cerebrale** (o via della 24-idrossilasi), che sarà discussa nel capitolo dedicato all'omeostasi del colesterolo nel sistema nervoso centrale e la **via della 25-idrossilasi** (Figura 9). Riguardo quest'ultima, il suo contributo alla biosintesi degli acidi biliari rimane da approfondire infatti, benché il gene codificante per la colesterolo 25-idrossilasi sia stato isolato e siano stati rilevati bassi livelli di mRNA nella maggior parte dei tessuti, topi KO per questo enzima non mostrano alterazioni nella sintesi degli acidi biliari o nel metabolismo del colesterolo [Lund E.G. et al., 1998]; di conseguenza ulteriori studi *in vivo* sarebbero necessari per determinare il ruolo di questa via che al momento appare comunque decisamente minoritario.

Via classica

La “via classica” (o “via neutra”) è costituita da una cascata di 14 reazioni enzimatiche (Figura 10) ed è operante esclusivamente a livello del fegato; è la via principale per la biosintesi degli acidi biliari, si stima infatti che in condizioni fisiologiche circa il 90% di tali composti sia prodotto tramite questo *pathway* [Duane W.C. e Javitt N.B., 1999]. Il primo step e reazione limitante di tutta la via è l'idrossilazione del colesterolo in posizione C-7 α catalizzata dall'enzima colesterolo-7 α -idrossilasi (CYPA1). Si tratta di una monossigenasi microsomiale che ossida il colesterolo a 7 α -idrossicolesterolo, utilizzando ossigeno molecolare, NADPH ed un cofattore proteico, la citocromo P450 reduttasi. La sintesi del secondo intermedio, il 7 α -idrossicolest-4-en-3-one è dovuta all'azione dell'enzima 3 β -idrossi- Δ^5 -C₂₇-sterolo-ossidoreduttasi, anch'essa situata a livello del reticolo endoplasmatico.

In seguito questo intermedio può subire l'attacco di due diversi enzimi:

- sterolo-12 α -idrossilasi, a livello del reticolo endoplasmatico.
- Δ^4 -3-chetosterolo-5 β -reduttasi, a livello del citosol.

Questi due enzimi portano rispettivamente alla formazione di:

- 7 α ,12 α -diidrossi-colest-4en-3-one, precursore dell'acido colico
- 7 α -idrossi-5 β -colestano-3-one, precursore dell'acido chenodeossicolico.

Poiché questi due acidi biliari (ed i loro metaboliti secondari) hanno differenti proprietà chimicofisiche e fisiologiche questo punto di diramazione della via svolge un potenziale ruolo regolatorio [Russell D.W. e Setchell K.D.R., 1992]. Successivamente il 7 α ,12 α -diidrossi-colest-4en-3-one subisce l'azione della Δ^4 -3-chetosterolo-5 β -reduttasi formando il 7 α ,12 α -diidrossi-5 β -colestano-3-one. Sia il 7 α ,12 α -diidrossi-5 β -cholestan-3-one che il 7 α -idrossi-5 β -colestano-3-one vengono ridotti ai rispettivi alcoli per opera dell'enzima 3 α -idrossisterolo-deidrogenasi.

Terminate le modificazioni del nucleo steroideo della molecola del colesterolo si passa al rimodellamento della catena laterale con il coinvolgimento dell'enzima sterolo-27-idrossilasi (CYP27A1). E' un'ossidasi a funzione mista contenente un citocromo P450 che risiede nella membrana interna dei mitocondri di fegato, cervello, reni ed altri organi e tessuti. La ω -idrossilazione catalizzata da questo enzima porta alla sintesi di 3 α ,7 α ,12 α ,27-tetraidrossi-5 β -colestano. In seguito la

stessa sterolo-27-idrossilasi catalizza, in due passaggi, la formazione dell'intermedio successivo, l'acido $3\alpha,7\alpha,12\alpha$ -triidrossi- 5β -colestanoico [Andersson S. et al., 1989; Pikuleva I.A. et al., 1998]. I passaggi terminali avvengono quasi esclusivamente nei perossisomi dove gli intermedi prodotti sono sottoposti all'accorciamento della catena laterale. I 3 atomi di carbonio terminali sono infatti rimossi tramite una serie di reazioni analoghe a quelle coinvolte nell'ossidazione degli acidi grassi [Reddy J.K. e Hashimoto T., 2001] e coinvolgono l'acido $3\alpha,7\alpha,12\alpha$ -triidrossi- 5β -colestanoico che viene inizialmente esterificato tramite una CoA-ligasi nel reticolo endoplasmico. Successivamente, nei perossisomi, interviene una 2-metilacilcoenzima-A racemasi che converte l'isomero 25(R) in 25(S). A questo punto l'acil-CoA è substrato di un'ossidasi e della proteina bifunzionale D, un enzima bifunzionale deidrogenasi/idratasi, con conseguente formazione di $3\alpha,7\alpha,12\alpha,24$ -tetraidrossi- 5β -colestanoil-CoA. Infine, per successivo attacco di una tiolasi, si ha la perdita di propionil-CoA e la formazione di un acido biliare a 24 atomi di carbonio (CA o CDCA). Infine gli acidi biliari neosintetizzati, prima di essere secreti nella bile, vengono coniugati con un amminoacido, generalmente glicina o taurina, tramite la reazione catalizzata dall'enzima acido biliare-CoA:amminoacido N-aciltransferasi, localizzato anch'esso nei perossisomi [Russell D.W., 2003]. La coniugazione incrementa il carattere anfipatico e diminuisce la costante di ionizzazione degli acidi biliari rendendoli maggiormente idrofilici. Poiché a pH fisiologico i glico- e i tauro-coniugati sono presenti prevalentemente in forma dissociata ci si riferisce ad essi con il termine di sali biliari.

Via alternativa

La biosintesi degli acidi biliari può avvenire anche attraverso la così detta "via alternativa" nella quale l'ossidazione della catena laterale del colesterolo precede le modificazioni del nucleo steroideo (Figura 10). Questa via, scoperta più recentemente, è conosciuta anche come "via acida" e produce principalmente CDCA. Non è esclusivamente epatica ma può iniziare anche in sede extraepatica in quanto i primi enzimi di tale via sono espressi in diversi tessuti. Le principali cellule da cui è attuata questa via di sintesi sono macrofagi e fibroblasti. Tuttavia la sintesi degli acidi biliari può essere portata a termine solamente nel fegato in quanto solo in quest'organo sono presenti tutti gli enzimi necessari: gli ossisteroli prodotti in sede

extraepatica devono perciò essere portati al fegato per essere completamente convertiti in acidi biliari.

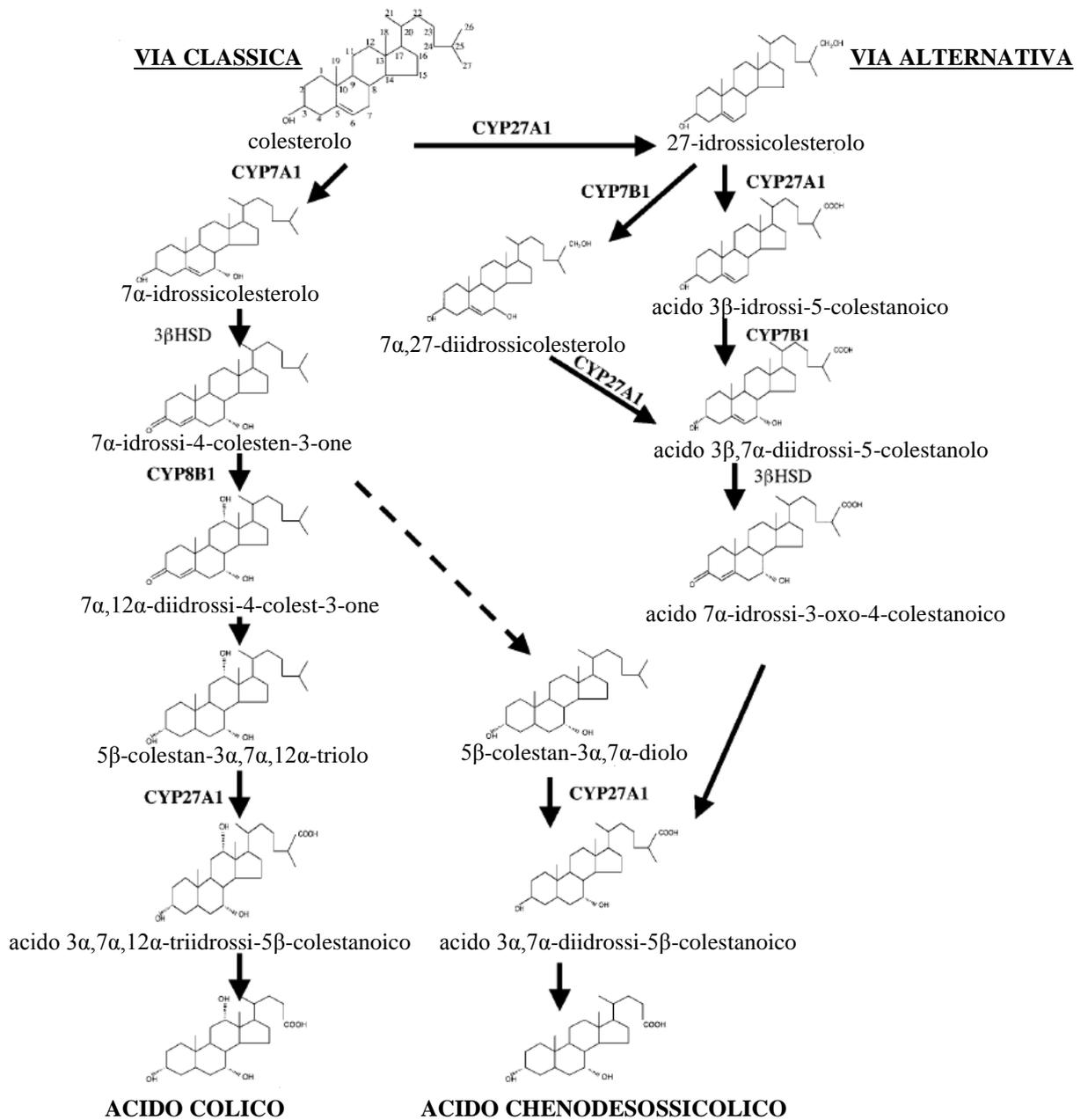


Figura 10. Via “classica” e “alternativa” di biosintesi degli acidi biliari. [immagine adattata da Chiang J.Y.L. 2002].

Come già accenato la prima reazione di questa via è l'idrossilazione del colesterolo in posizione C-27 catalizzata dell'enzima sterolo-27-idrossilasi (CYP27A1), seguita dalla trasformazione in 7 α ,27-diidrossicolesterolo ad opera dell'enzima ossisterolo-7 α -idrossilasi (CYP7B1), un enzima microsomiale specifico della “via alternativa”.

Gli ossisteroli prodotti in sede extraepatica dai primi enzimi di questa via vengono successivamente convertiti a livello epatico in acidi biliari (principalmente CDCA), grazie all'azione dell'enzima 3β -idrossi- Δ^5 -C27-sterolo-ossidoreduttasi ed agli altri enzimi della "via classica" [Pikuleva I.A. et al., 1998]. Dalle ricerche attualmente disponibili si stima che, in condizioni fisiologiche, la "via alternativa" porti alla produzione solamente del 6-10% dell'ammontare totale di acidi biliari [Duane W.C. e Javitt N.B., 1999] e che quindi la maggior parte di essi venga sintetizzato tramite la "via classica". Alcuni studi, tuttavia, sembrano indicare che in particolari condizioni, come durante lo sviluppo fetale [Back P. e Walter K., 1980] o in casi di patologie epatiche croniche [Crosignani A. et al., 2007], la "via alternativa" possa contribuire alla sintesi degli acidi biliari in modo molto più significativo. Inoltre questa via sembra avere un ruolo importante per l'eliminazione ed il trasporto inverso del colesterolo dai tessuti periferici al fegato; infatti trasformando il colesterolo in un composto più idrosolubile, ne permette una più facile eliminazione evitando in tal modo la formazione di accumuli potenzialmente pericolosi soprattutto a livello dei vasi sanguigni, con conseguente effetto anti-aterogenico. A conferma di questa ipotesi CYP27A1 è risultata altamente espressa sia nei macrofagi che nelle cellule endoteliali [Babiker A. et al., 1997].

Regolazione della biosintesi degli acidi biliari

Dato il ruolo fondamentale svolto dalla biosintesi degli acidi biliari nel mantenimento dell'omeostasi del colesterolo l'organismo umano è dotato di efficienti meccanismi di controllo per la regolazione di questo processo metabolico. Inoltre la quantità di acidi biliari all'interno di epatociti (ed enterociti) deve essere finemente regolata poiché queste molecole, a causa delle loro caratteristiche chimico-fisiche, risultano fortemente citotossiche quando le loro concentrazioni intracellulari o extracellulari raggiungono livelli elevati. Essi possono infatti provocare tossicità epatica ed eventualmente condurre a fibrosi e cirrosi del fegato [Hofmann A.F., 1999b]. La sintesi degli acidi biliari può essere regolata da numerosi fattori quali dieta, nutrienti, ormoni e acidi biliari stessi: la sintesi deve diminuire quando la concentrazione di acidi biliari aumenta, mentre deve essere indotta quando si ha accumulo di colesterolo. Come già illustrato la biosintesi degli acidi biliari nell'uomo può avvenire attraverso differenti vie metaboliche, ognuna delle quali dotata, presumibilmente, di propri meccanismi di regolazione. Tuttavia, attualmente, sono

stati in parte delucidati solo i meccanismi di controllo della via classica, *pathway* attraverso il quale viene prodotto più del 90% della quantità totale di sali biliari. Come già detto la reazione limitante di questa via è la trasformazione del colesterolo in 7 α -idrossicolesterolo catalizzata dalla colesterolo-7 α -idrossilasi (CYP7A1). Tale *step* costituisce dunque il principale punto di regolazione della via, regolazione che si esplica soprattutto a livello trascrizionale ed è principalmente mediata da recettori ormonali nucleari (NHR) [Crestani M. et al., 1998 ; Chiang J.Y.L., 2009]. Gli NHR sono fattori trascrizionali ligando-inducibili che possono esercitare un controllo regolatore in molti processi biologici e possiedono una struttura modulare costituita da:

- una regione N-terminale contenente un dominio di *binding* al DNA altamente conservato e la funzione attivazione 1 ligando-indipendente (AF-1)
- una regione cerniera
- una regione di legame con il ligando (*Ligand Binding Domain*, LBD)
- una regione C-terminale contenente un dominio di *binding* al DNA moderatamente conservato e la funzione attivazione 2 ligando-dipendente (AF-2).

Gli NHR, in presenza del ligando, interagiscono con le sequenze *consensus* localizzate nei geni e, in seguito all'interazione, vanno incontro a cambiamenti conformazionali a causa dei quali possono rilasciare (o legare) corepressori e/o reclutare (o perdere) coattivatori al fine di promuovere (o inibire) la trascrizione di specifici geni bersaglio [Glass C.K. et al., 1997; Xu L. et al., 1999].

La regolazione della biosintesi degli acidi biliari coinvolge un complesso insieme di NHR i quali, a livello epatico ed enterico, fungono sostanzialmente da sensori dei livelli di acidi biliari e regolano in maniera coordinata la trascrizione di un ampio network di geni coinvolti nella sintesi, coniugazione e trasporto di queste molecole bioattive. Non sarà possibile una trattazione completa di tutti i possibili meccanismi di regolazione finora scoperti od ipotizzati, tuttavia illustreremo in maniera sintetica i principali *pathways* regolativi.

Gli acidi biliari sono in grado di legare ed attivare direttamente almeno tre recettori nucleari: *Farnesoid X Receptor* (FXR) [Makishima et al., 1999], *Pregnane X Receptor* (PXR) [Staudinger J.L. et al., 2001] ed il recettore per la vitamina D (VDR) [Makishima M. et al., 2002]. Tra i diversi acidi biliari il CDCA è il ligando più

efficace di FXR ($EC_{50} \approx 10 \mu M$), mentre tra gli acidi biliari secondari l' LCA risulta essere il più potente attivatore di PXR e VDR ($EC_{50} \approx 0,1 \mu M$) [Tiangang L. e Chiang J.Y.L., 2013]. Tramite l'attivazione di questi recettori gli acidi biliari possono inoltre modificare l'attività di altri NHR, quali *Short Heterodimer Partner* (SHP), *Liver Receptor Homologue-1* (LRH-1), *Hepatocyte Nuclear Factor-4* (HNF-4), *Peroxisome Proliferator Activated Receptor- α* (PPAR- α). Tutti questi NHR sono espressi selettivamente nel tessuto enteroepatico e in quello periferico e sono coinvolti nella sintesi, nell'assorbimento e nel trasporto degli acidi biliari, così come nel trasporto di colesterolo e lipoproteine [Repa J.J. e Mangelsdorf D.J., 2000].

Tra tutte queste molecole di regolazione un ruolo chiave nel controllo nel metabolismo degli acidi biliari è sicuramente giocato da FXR. Infatti questo recettore, insieme a SHP, LRH-1 e HNF-4, fa parte del principale meccanismo di regolazione a feedback del catabolismo del colesterolo ad acidi biliari, detto **meccanismo SHP dipendente** [Goodwin B. et al., 2000]. Il primo recettore ad essere attivato in questa cascata di regolazione è appunto FXR, il quale riconosce come ligandi endogeni gli acidi biliari primari, in particolare il CDCA. Affinchè FXR possa svolgere la sua funzione deve formare un eterodimero con il *Retinoid X Receptor* (RXR) e legarsi a specifiche sequenze regolatrici dette *Bile Acid Response Elements* (BAREs) situate a livello dei promotori di molteplici geni coinvolti nel metabolismo degli acidi biliari [Makishima M., et al., 1999; Parks D.J., et al., 1999]. In condizioni basali a specifiche sequenze BAREs si trovano normalmente legati il recettore nucleare LRH-1 ed il recettore HNF-4, la cui funzione è di promuovere attivamente la trascrizione dei geni per CYP7A1 e CYP8B1 [Nitta M. et al., 1999; Lee Y.K. e Moore D.D., 2002]. LRH-1 ed HNF-4 entrano in gioco nel meccanismo di feedback per la regolazione dell'espressione di CYP7A1 proprio come bersagli finali della cascata di *signaling* innescata da FXR. Infatti, quando la concentrazione di acidi biliari nell'epatocita aumenta, il CDCA attiva FXR che a sua volta induce l'espressione della proteina SHP [Lu T.T. et al., 2000; Goodwin B. et al., 2000]. SHP è un recettore nucleare atipico, privo di un dominio di legame al DNA, ma dotato di un dominio di interazione con altri recettori nucleari e di un dominio repressore [Seol W. et al., 1997]. Nella cascata regolatoria attivata dagli acidi biliari (via FXR) SHP lega ed inibisce LHR-1 e HNF-4. In assenza di attività di questi due recettori la trascrizione dei geni codificanti per la colesterolo-7 α -idrossilasi e per la sterolo-12 α -

idrossilasi diminuisce e, di conseguenza, la sintesi degli acidi biliari declina [Crestani M. et al., 1998; Stroup D. e Chiang J.Y.L., 2000].

Sebbene questo sembri essere il principale meccanismo di regolazione della biosintesi epatica di acidi biliari alcuni studi hanno mostrato come in topi SHP-deficienti il CDCA (e altri agonisti di FXR) siano ancora in grado di ridurre la sintesi di sali biliari, evidenziando quindi la presenza anche di meccanismi di regolazione **SHP-indipendenti** [Makishima et al., 2002, Wang L. et al., 2002]. E' stato infatti riportato che l'attività di HNF-4 può essere regolata, oltre che via SHP, anche a livello post-trascrizionale tramite fosforilazione del sito di binding al DNA, ad opera di una proteina chinasi-A (PKA), modificazione che induce una riduzione della transattivazione del recettore [Viollet B. et al., 1997]. E' stato inoltre evidenziato che anche il *Peroxisome Proliferator Activated Receptor- α* (PPAR- α) potrebbe giocare un ruolo nella regolazione della sintesi degli acidi biliari, sempre agendo su HNF-4 [Hunt M.C et al., 2000]. In questo meccanismo di regolazione gli acidi biliari indurrebbero la trascrizione di PPAR- α (tramite FXR) [Pineda Torra I. et al., 2003] e PPAR- α , a sua volta, provocherebbe l'inibizione della trascrizione di CYP7A1 bloccando la transattivazione di HNF-4 [Marrapodi M. e Chiang J.Y., 2000].

Per quanto concerne il potenziale ruolo di PXR è stato inizialmente riportato come, nei roditori, agonisti di questo recettore fossero in grado di causare una riduzione dell'attività di CYP7A1 [Mason J.I. e Boyd G.S., 1978; Stahlberg D., 1995]. In seguito il ruolo di PXR è stato confermato da ulteriori studi condotti, sia *in vivo* su topi PXR-deficienti [Staudinger J.L. et al., 2001], sia *in vitro* su colture di epatociti umani [Li T. e Chiang J.Y., 2005]. Infine, più recentemente, è stato riportato che l'attivazione di PXR a livello intestinale è in grado di promuovere l'espressione fattori di crescita fibroblastici intestinali (FGF-15 e FGF-19) [Wistuba W. et al., 2007] i quali a loro volta vanno ad agire sul gene CYP7A1, modulano la produzione epatica di acidi biliari [Inagaki T. et al., 2005; Lundåsen T. et al., 2006]. Anche PXR sembra avere quindi un ruolo abbastanza importante nella regolazione del metabolismo di questi cataboliti del colesterolo.

Da ultimo acceniamo al possibile ruolo del recettore per la vitamina D (VDR). Inizialmente è stato evidenziato che questo recettore era in grado di agire a livello intestinale da sensore per i livelli intracellulari di acidi biliari (soprattutto LCA) e di attivare la trascrizione di geni importanti per limitarne la potenziale citotossicità [Schmiedlin-Ren P. et al., 2001; Thummel K.E. et al., 2001]. Successivamente è

stato mostrato come il trattamento di colture primarie di epatociti umani con $1\alpha,25$ -diidrossivitamina D3 sopprime l'espressione di CYP7A1 [Han S. e Chiang J.Y., 2009], probabilmente inibendo la transattivazione di HNF-4 [Han S. et al., 2010]. Inoltre uno studio più recente ha riportato che topi VDR-deficienti hanno una più elevata produzione di acidi biliari, mentre la somministrazione di $1\alpha,25$ -diidrossivitamina D3 riduce l'espressione di CYP7A1 [Schmidt D.R. et al., 2010]. Nel loro complesso questi risultati sembrano quindi indicare che sia in cellule umane in coltura che in modelli murini VDR possa regolare la sintesi degli acidi biliari. Tuttavia questi studi sono ancora limitati e non permettono di stabilire con certezza l'effettivo ruolo *in vivo* svolto da questo recettore nella regolazione del gene *Cyp7a1* umano.

Tutti i meccanismi di regolazione finora descritti operano esclusivamente a livello della via classica e portano ad una diminuita sintesi di acidi biliari (a partire dal colesterolo intraepatico), in risposta al ciclo quotidiano di alimentazione-digiuno (Figura 11).

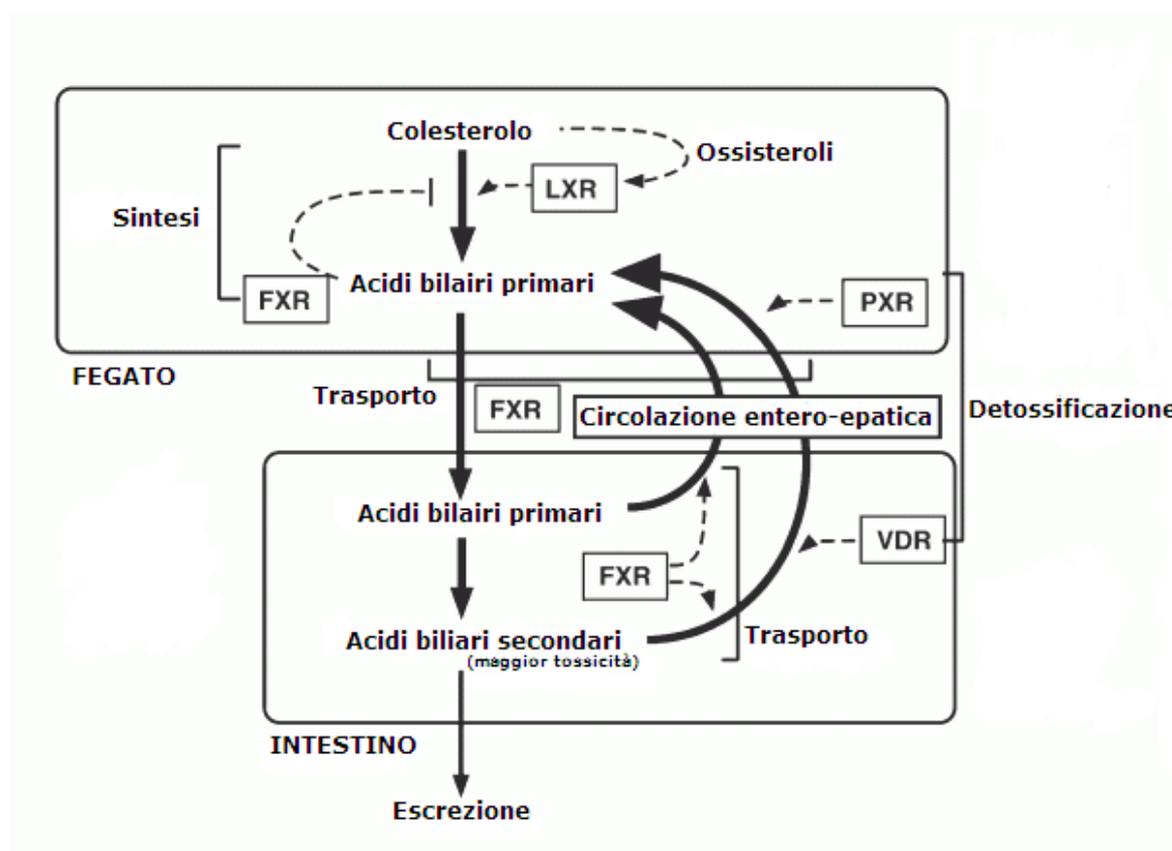


Figura 11. Regolazione della “via classica” di sintesi degli acidi biliari.
[immagine originale concessa per gentile cortesia di Phoenix Pharmaceuticals, Inc].

Nella via alternativa invece la regolazione dell'enzima CYP27A1 (il primo enzima di questa via) è importante principalmente nell'omeostasi del trasporto inverso del colesterolo e come meccanismo protettivo contro l'aterosclerosi. I meccanismi di regolazione della via alternativa sono ancora poco noti, tuttavia in cellule in cultura è stato visto che CYP27A1 può essere upregolata da alcuni recettori nucleari come RXR e PPAR- γ , suggerendo un possibile ruolo protettivo di questi recettori contro l'aterosclerosi [Szanto A. et al., 2004; Quinn C.M. et al., 2005]. Sebbene nel promotore del gene Cyp27a1 sia stato mappato un putativo elemento BARE [Chen W. e Chiang J.Y.L., 2003] non è stato finora possibile evidenziare *in vivo* un meccanismo di regolazione a feedback della via alternativa operato dagli acidi biliari, simile a quello presente nella via classica. Ulteriori studi sono dunque necessari per chiarire i meccanismi di regolazione di questo specifico *pathway* metabolico.

Trasporto degli acidi biliari e circolo enteroepatico

Gli acidi biliari sono distribuiti nell'organismo umano sostanzialmente a livello di fegato, vie biliari, intestino e sistema circolatorio [Towheed T.E. et al., 2005]. Essi sono circa da 100 a 1000 volte più concentrati nella bile rispetto al plasma e la loro secrezione vettoriale nei canalicoli biliari dagli epatociti rappresenta la principale forza trainante per la formazione del flusso biliare. Dai canalicoli biliari la bile scorre distalmente nel dotto biliare e viene raccolta nella colecisti, dove viene conservata durante le fasi interdigestive. Quando viene ingerito il pasto, i lipidi in esso contenuti stimolano la secrezione dell'ormone colecistochinina (CCK) che innesca lo svuotamento graduale della colecisti ed il rilascio degli acidi biliari nel lume del piccolo intestino. A livello enterico gli acidi biliari si associano insieme ai fosfolipidi biliari in micelle miste e, agendo come detergenti, svolgono la funzione di emulsionare i lipidi e le vitamine liposolubili presenti negli alimenti. Durante il transito nel lume intestinale gli acidi biliari sono efficientemente assorbiti tramite processi di trasporto attivo e passivo, riportati al fegato tramite la circolazione portale, ed escreti nuovamente con la bile. Questo movimento degli acidi biliari tra il fegato e l'intestino è noto come **circolo enteroepatico** e si ripete da 6 a 10 volte al giorno (Figura 11) [Martínez-Augustin O. e Sanchez de Medina F., 2008]. Si tratta di un'entità dinamica in cui il pool degli acidi biliari ricircola costantemente, realizzando le sue funzioni fisiologiche e subendo i processi di sintesi e le varie trasformazioni ad opera della flora batterica. L'efficienza del circolo enteroepatico è

tale che dal pool totale di acidi biliari presenti in un uomo adulto (3-4 g), solo una piccola quota, pari a circa 300-400 mg, viene persa ogni giorno con le feci. Tale quota rappresenta quindi la frazione di colesterolo eliminata quotidianamente dall'organismo e viene compensata, principalmente, tramite la sintesi *de novo* [Jansen P.L.M. e Sturm E., 2003]. Variazioni nell'efficienza del circolo enteroepatico possono dunque influenzare direttamente l'omeostasi del colesterolo, sia perché ne alterano la quantità che viene quotidianamente eliminata, sia perché a livello epatico gli acidi biliari riassorbiti dall'intestino sono in grado di regolare la propria stessa sintesi tramite il legame ai recettori nucleari (come illustrato nel precedente paragrafo).

Il circolo enteroepatico degli acidi biliari è un processo attivo e affinché possa compiersi è necessario che sia gli epatociti che gli enterociti possano trasportare efficientemente i sali biliari primari ed i loro metaboliti prodotti dalla flora intestinale. Per permettere tale processo sono necessari diversi trasportatori specifici (apicali e basolaterali) localizzati a livello della membrana plasmatica sia delle cellule epatiche che di quelle della mucosa enterica (Figura 12).

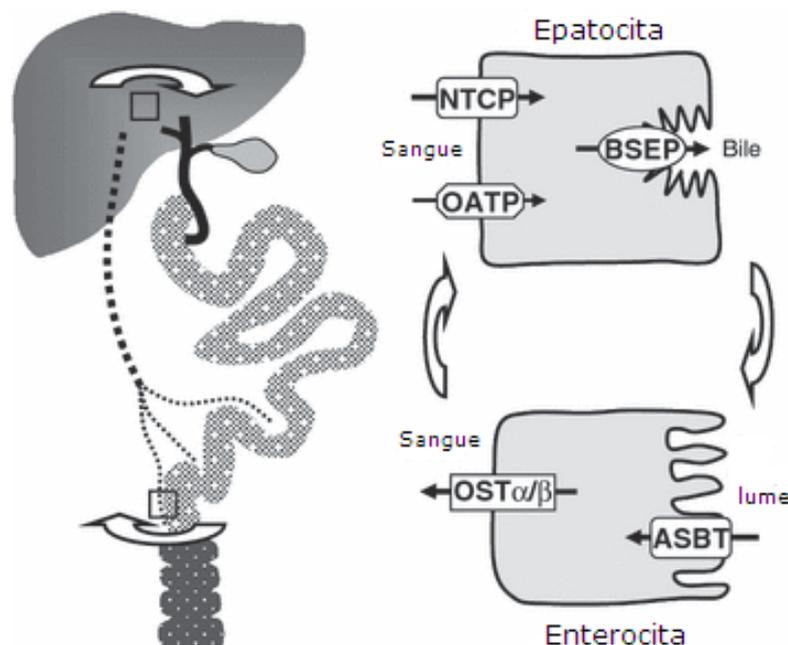


Figura 12. Circolo enteroepatico degli acidi biliari.
[immagine adattata da Pellicoro A. e Faber K.N. 2007].

In sintesi, gli acidi biliari quotidianamente riversati nel lume intestinale sono assorbiti in piccola parte passivamente durante il transito nel digiuno e nel l'ileo prossimale, ma il punto in cui avviene la maggior parte del riassorbimento attivo di questi composti è rappresentato dall'ileo distale. A livello dell'ileo distale infatti la digestione e l'assorbimento delle molecole lipidiche alimentari è sostanzialmente ultimato e conseguentemente gli acidi biliari non sono più necessari per mantenerle in soluzione. Gli enterociti localizzati in questo tratto di intestino esprimono dunque un trasportatore noto come ASBT (*Apical Bile Salt Transporter*) che media il co-transporto sodio-dipendente dei sali biliari glico- e tauro- coniugati. Si tratta di un meccanismo di simporto in cui due ioni Na^+ sono trasportati insieme ad una molecola di sale biliare [Craddock A.L. et al., 1998]. I sali biliari così internalizzati attraversano l'interno della cellula legati dalla proteina IBABP (*Ileal Bile Acid Binding Protein*), e giungono alla membrana basolaterale dove vengono rilasciati nel sangue venoso tramite un trasportatore eterodimerico detto OST α -OST β (*Organic Solute Transporter alpha and beta*) localizzato nella membrana basolaterale [Dawson P.A. et al. 2005]. Si ritiene che questo trasportatore sia uno scambiatore di anioni, ma il soluto scambiato per il trasporto degli acidi biliari coniugati non è ancora stato identificato. Gli acidi biliari assorbiti a livello intestinale sono quindi veicolati tramite la vena porta al fegato. Nel sangue portale essi sono parzialmente legati all'albumina: nell'uomo i CA-coniugati sono legati per il 60-80%, mentre i CDCA-coniugati sono legati maggiormente (>95%) [Meier P.J., 1995]. Il sangue portale confluisce poi nei sinusoidi epatici, dove gli epatociti possono captare gli acidi biliari presenti nel plasma attraverso diversi trasportatori localizzati nella membrana basolaterale. I glico- e i tauro-coniugati vengono internalizzati prevalentemente mediante il simporter basolaterale sodio-dipendente NTCP (*Na-Taurocholate Co-transport Polipeptide*) che ha elevato grado di omologia col trasportatore intestinale ASBT. [Hagenbuch B. e Meier P.J., 1994]. Inoltre l'*uptake* può essere mediato da uno o più trasportatori di anioni sodio-dipendenti appartenenti alla famiglia OATP (*Organic Acid Transporting Polipeptides*). Ad essere coinvolte in questo processo sono soprattutto le isoforme OATP1B1 e OATP1B3 [Kullak-Ublick G.A. et al., 2001]. Il trasportatore NTPC è responsabile dell'*uptake* di circa il 90% degli acidi biliari ed è stato il primo di questi trasportatori ad essere clonato [Hagenbuch B. e Meier P.J., 1994], la sua espressione dipende dagli acidi biliari stessi, da alcuni ormoni (prolattina ed estrogeni) e da citochine proinfiammatorie.

Oltre che internalizzati gli acidi biliari possono essere anche retro-trasportanti dagli epatociti al sangue sinusoidale da due trasportatori appartenenti alla famiglia ABC, MRP3 e MRP4 (*Multidrug Resistance Protein 3 and 4*) e dal trasportatore eterodimerico di soluti organici OST α -OST β . Si ritiene che il ruolo di questi trasportatori sia quello di evitare un accumulo intracellulare di acidi biliari in condizioni patologiche in cui la secrezione biliare è impedita (colestasi) [Schuetz E.G. et al., 2001]. All'interno degli epatociti gli acidi biliari, legando alcune proteine citosoliche (soprattutto 3 α -idrossisteroide-deidrogenasi e glutatione-S-transferasi), diffondono verso la membrana canicolare dove vengono estrusi. La secrezione è mediata dall'azione della proteina BSEP (*Bile Salt Export Pump*), un trasportatore della famiglia ABC (ABCB11) che trasporta gli acidi biliari utilizzando l'energia di idrolisi dell' ATP [Gerloff T. et al., 1998]. L'importanza di questa pompa è stata evidenziata in topi KO (dove l'eliminazione degli acidi biliari può comunque avvenire anche attraverso altri trasportatori, evitando così l'accumulo citotossico degli stessi all'interno delle cellule). Topi KO per questo trasportatore risultano affetti da una forma poco aggressiva di colelitiasi, compensata dalla formazione di tetraidrossi-acidi biliari (meno tossici ed esportati tramite il sistema alternativo canalicolare di efflusso). Mostrano inoltre una riduzione del 50% del flusso biliare [Makishima M. et al., 1999; Stieger B., 2011].

Il trasporto degli acidi biliari attraverso gli epatociti e gli enterociti deve essere finemente regolato in modo da garantirne un efficiente circolo enteroepatico ed evitarne un accumulo all'interno delle cellule. Come per le vie di biosintesi tale regolazione è in gran parte mediata dagli stessi acidi biliari, mediante il legame a specifici recettori nucleari. L'attività della maggior parte dei trasportatori coinvolti nel circolo enteroepatico degli acidi biliari è regolata tramite feedback negativo dal sistema di *signaling* mediato da FXR e SHP. [Dawson P.A. et al., 2009]. FXR, una volta attivato, induce infatti la trascrizione di geni codificanti per le proteine deputate all'estruzione degli acidi biliari (BSEP e OST α -OST β) e la trascrizione della proteina SHP che provoca l'inibizione della sintesi dei trasportatori coinvolti nel loro *uptake* (NTPC, ABST, OATPs). In questo modo, quando i livelli intracellulari di acidi biliari aumentano, viene favorito il loro trasporto extracellulare ed inibito il loro ingresso nella cellula [Zollner G. et al., 2006]. In questo modo la circolazione enteroepatica degli acidi biliari è regolata quotidianamente al fine di evitare accumuli intracellulari che possono essere dannosi.

METABOLISMO DEL COLESTEROLO CEREBRALE

Nei precedenti capitoli è stato illustrato come diversi processi metabolici contribuiscano quotidianamente al mantenimento dell'omeostasi del colesterolo nei diversi tessuti umani e come in questo meccanismo fisiologico fegato ed intestino giochino un ruolo centrale. Tuttavia, affinché i diversi comparti contenenti colesterolo possano essere regolati dall'attività coordinata di questi due organi è necessario l'intervento di lipoproteine trasportatrici che permettano un continuo scambio di steroli attraverso il circolo ematico. Le cellule del cervello sembrano invece escluse da questo circolo per via della barriera ematoencefalica (BBB) che impedisce lo scambio di lipoproteine e colesterolo, per tanto il tessuto cerebrale deve regolarne l'omeostasi in modo autonomo e indipendente. E' quindi possibile affermare che a livello del cervello si ha una forma di "compartimentalizzazione metabolica" in cui il metabolismo del colesterolo è regolato sostanzialmente dall'interazione tra due principali tipi cellulari: gli astrociti, identificati principalmente come produttori di colesterolo, ed i neuroni, identificati principalmente come consumatori di colesterolo (Figura 13) [Benarroch E.E., 2008].

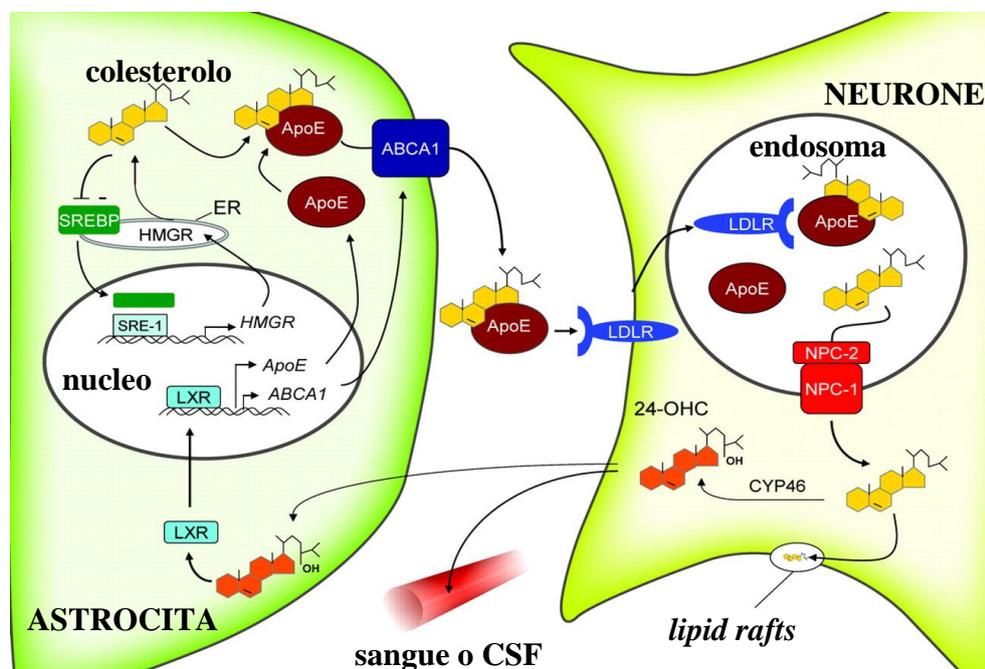


Figura 13. Omeostasi cerebrale del colesterolo. L'immagine illustra la distribuzione cellulare-specifica delle proteine coinvolte nel rilascio, trasporto intracellulare e immagazzinamento/eliminazione del colesterolo in neuroni ed astrociti. Si evidenzia come i neuroni dipendano dagli astrociti per il rifornimento di colesterolo (tramite endocitosi di apoE mediata da LDLR) e come i neuroni gestiscano l'eccesso di colesterolo tramite idrossilazione, immagazzinamento ed escrezione. [immagine adattata da Benarroch E.E., 2008].

Nel tessuto cerebrale il colesterolo è una molecola richiesta in quantità elevata ed è fondamentale per il corretto funzionamento del SNC: i neuroni infatti necessitano del colesterolo per formare le membrane di assoni, dendriti e sinapsi. Inoltre il colesterolo è presente in quantità elevate nelle membrane degli oligodendrociti in quanto è uno dei costituenti fondamentali della mielina: è stato calcolato che circa il 70% del colesterolo cerebrale è associato alle guaine mieliniche [Snipes G. e Suter U., 1997], l'integrità delle quali è essenziale per l'attività del SNC. Questo fatto spiega anche per quale motivo il cervello risulti essere l'organo umano contenente la maggiore quantità di questo sterolo.

Non è attualmente possibile misurare direttamente il fabbisogno di colesterolo da parte di neuroni ed astrociti, tuttavia alcuni studi sembrano indicare che l'emivita di una molecola di colesterolo nel tessuto cerebrale varia dai 2 ai 6 mesi [Björkhem I. et al., 1997]. Questo dato indica quindi che il *turnover* di colesterolo nel cervello è relativamente lento. E' tuttavia necessario considerare che la maggior parte del colesterolo cerebrale è contenuto nella mielina e conseguentemente le stime della sostanziale stabilità metabolica di questo sterolo nell'intero cervello sono da riferirsi principalmente a questo *pool* relativamente statico [Dietschy J.M. e Turley S.D., 2004]. In effetti il metabolismo del colesterolo nei singoli neuroni ed astrociti potrebbe essere molto alto e probabilmente dipendente dall'area cerebrale e dal tipo specifico di cellula nervosa. Questa ipotesi sembra supportata dal fatto che generalmente il *turnover* di colesterolo è direttamente proporzionale al tasso metabolico [Dietschy J.M. e Turley S.D., 2004] e poiché i neuroni necessitano di un intenso metabolismo per la generazione di potenziali d'azione e per la trasmissione sinaptica [Attwell D. e Laughlin S.B., 2001; Jolivet R. et al., 2009] il loro *turnover* di colesterolo dovrebbe essere abbastanza alto.

Sintesi del colesterolo cerebrale

Ci sono solide evidenze che quasi tutto (se non tutto) il colesterolo presente nel cervello umano sia sintetizzato *in situ* dalle cellule nervose [Jurevics H. e Morell P., 1995]. Questa sintesi autonoma risulterebbe necessaria a causa della BBB che impedisce alle cellule cerebrali di ricevere il colesterolo prodotto dal fegato o di assumere quello introdotto attraverso la dieta ed assorbito a livello intestinale.

Primissime evidenze dell'esistenza di una sintesi endogena di colesterolo nel cervello sono derivate da studi condotti su topi mediante l'utilizzo di acqua deuterata [Waelsch H. et al., 1940]. Da questi studi è risultato che il tasso di biosintesi di questo sterolo risulta più alto durante le prime fasi dello sviluppo post-natale mentre tende a diminuire nell'età adulta. Questi dati sono stati successivamente confermati da esperimenti condotti *post mortem* sull'uomo che hanno mostrato un effettivo declino di specifici precursori del colesterolo a livello cerebrale con l'aumentare dell'età. Di conseguenza sembra possibile affermare che la sintesi di colesterolo nel cervello diminuisce durante l'invecchiamento [Thelen K.M. et al., 2006]. Inoltre la quantità di tale sterolo prodotta dal cervello può variare anche in seguito ad un danno cerebrale: è stato ad esempio mostrato come, nel ratto, in seguito ad una lesione della corteccia entorinale la sintesi del colesterolo diminuisca negli 8 giorni successivi al danno, per tornare poi ai livelli normali nell'arco di circa un mese [Poirier J. et al., 1993]. In questi casi è stato anche osservato che le proteine coinvolte nell'*uptake* e nel rilascio del colesterolo risultano essere up-regolate. Questo sembra indicare che il riciclo e la sintesi del colesterolo in seguito ad un danno cerebrale sono importanti per la rigenerazione delle connessioni sinaptiche perdute [Poirier J. et al., 1993].

L'importanza della sintesi di colesterolo per le funzioni cerebrali è mostrata anche dal fatto che mutazioni negli enzimi coinvolti nella sua biosintesi possono portare a patologie con evidenti sintomi neurologici (sindrome di Smith-Lemli-Opitz) [Waterham H.R., 2006 ; Kelley R.I. e Hennekam R.C., 2000]. Studi condotti in modo cellula-specifico su topi KO hanno infatti mostrato che durante lo sviluppo embrionale i neuroni neoformati devono produrre colesterolo autonomamente per poter sopravvivere [Saito K. et al., 2009], mentre in un cervello adulto questi possono rifornirsi di colesterolo anche da altre fonti. Questi esperimenti sono stati eseguiti mediante delezione, nei precursori neuronali, del gene per l'enzima squalene-sintasi (SQS) che catalizza, nella via del mevalonato, il primo *step* specifico della biosintesi degli steroli [Tansey T.R. e Shechter I., 2001]. I topi mutanti così ottenuti hanno mostrato ridotte dimensioni cerebrali, letalità precoce e morte per apoptosi dei neuroni neoformati, ma non dei loro precursori.

Sebbene il tessuto nervoso sia in grado di attivare il *pathway* del mevalonato al momento non è ancora completamente noto il contributo relativo di neuroni e cellule gliali (astrociti) alla produzione del *pool* cerebrale di colesterolo. Uno studio condotto su colture di cellule ganglionali retiniche di ratto (RGC) ha rivelato che i

neuroni adulti necessitano di una fonte esterna di colesterolo per poter formare sinapsi efficienti [Mauch D. et al., 2001]. Tuttavia non è stato chiarito se le cellule RGC possano comunque produrre una certa quota di colesterolo, sebbene insufficiente, o se questo processo metabolico sia in esse completamente assente, rendendole quindi dipendenti da un apporto di colesterolo di origine gliale. Un supporto all'ipotesi di una produzione solo residuale di colesterolo nelle cellule neuronali sembra provenire da un altro studio condotto su colture primarie di cellule delle radici gangliari di coniglio, le quali hanno mostrato la necessità dell'aggiunta di colesterolo esogeno per poter promuovere la crescita dell'assone [Handelmann G.E. et al., 1992]. Inoltre, in cellule derivate da embrioni di pollo, il tasso di sintesi di colesterolo è risultato essere diverse volte più elevato nelle cellule gliali rispetto ai neuroni [Saito M. et al., 1987 ; Taberbero A. et al., 1993]. Infine esperimenti più recenti hanno dimostrato che il contenuto di precursori del colesterolo e di alcuni enzimi del *pathway* di biosintesi negli astrociti e nei neuroni è differente: in particolare nelle cellule neuronali è stato riscontrato un tasso molto basso dell'enzima 24-deidrocolesterolo reductasi (che converte il lanosterolo), suggerendo che queste ultime non metabolizzano il lanosterolo in modo efficiente e che quindi i neuroni devono utilizzare anche metodi alternativi alla sintesi endogena per rifornirsi di colesterolo [Nieweg K. et al., 2009].

Nel loro complesso queste osservazioni suggeriscono che durante lo sviluppo postnatale i neuroni down-regolino la propria sintesi di colesterolo, importando questo composto dagli astrociti che, una volta differenziati, rilasciano lipoproteine [Pfrieger F.W., 2003]. Il motivo per cui i neuroni maturi limiterbbero la propria sintesi di colesterolo potrebbe risiedere nell'alto dispendio energetico richiesto da questa via metabolica il quale renderebbe, per questo tipo cellulare, maggiormente vantaggioso approvvigionarsi di colesterolo tramite lo scambio di lipoproteine con le cellule gliali. E' tuttavia possibile che solo alcuni specifici neuroni dipendano da un apporto esterno di colesterolo. Ci sono infatti evidenze che l'omeostasi di questo composto non è uniforme nelle differenti aree cerebrali: il contenuto [Zhang Y. et al., 1996] ed i livelli di espressione di enzimi colesterolo-specifici mostra infatti forti variazioni nelle diverse regioni del cervello [Runquist M. et al., 1995 ; Bae S. et al., 1999]. Molti aspetti della sintesi di colesterolo nel SNC restano dunque da chiarire così come rimangono da delucidare le relazioni tra l'attività di biosintesi neuronale di questo sterolo e le funzioni specifiche delle diverse aree cerebrali.

Trasporto del colesterolo in lipoproteine a livello cerebrale

Come già accennato nel precedente paragrafo i neuroni sembrano in buona parte dipendenti per il loro mantenimento dal colesterolo che viene prodotto dalle cellule gliali. Anche a livello cerebrale esiste dunque uno trasporto ed uno scambio di colesterolo veicolato da specifiche lipoproteine. Diversi studi sono stati quindi condotti al fine di capire come tale processo venga attuato dai neuroni e dagli astrociti.

Il cervello dei mammiferi contiene un sottoinsieme di apolipoproteine (presenti anche nel plasma) che comprende l'apolipoproteina E (apoE), l'apolipoproteina J (apoJ) e l'apolipoproteina D (apoD). Alcuni studi inoltre hanno evidenziato la presenza di ApoE nel fluido cerebrospinale sia nel topo che nell'uomo [Pitas R.E. et al., 1987; Vance J.E. e Hayashi H., 2010]. Dato che le lipoproteine plasmatiche non possono raggiungere il SNC (per via della BBB) tali molecole devono essere state sintetizzate *in loco*. Alcuni lavori suggeriscono che in condizioni normali apoE sia prodotta esclusivamente dagli astrociti [Boyles J.K. et al., 1985; Lin C.T. et al., 1986], i quali esprimono poi anche apoJ e apoD. Quest'ultime apoproteine sono state anche ritrovate in alcuni tipi di neuroni sia umani che murini [Rassart E. et al., 2000; Smith K.M. et al., 1990]. Ulteriori evidenze sembrano confermare che siano effettivamente gli astrociti a produrre e rilasciare apoE *in vivo* [Amaratunga A. et al., 1996] e che quindi questi ultimi siano con ogni probabilità la principale fonte delle particelle lipoproteiche cerebrali. L'effettivo ruolo *in vivo* delle apoE prodotte dagli astrociti rimane, tuttavia, ancora da chiarire [Fagan A.M. et al., 1999; Karten B. et al., 2006]. Infatti topi KO per apoE sembrano mostrare un normale contenuto ed un normale *turnover* del colesterolo in varie regioni cerebrali [Fagan A.M. et al., 1999]. Altri ricercatori hanno invece osservato che topi carenti di apoE appaiono caratterizzati da alterati livelli di colesterolo e di alcuni suoi precursori (desmosterolo) a livello dell'ippocampo: livelli diminuiti se gli animali sono mantenuti in condizioni normali, aumentati se cresciuti in ambienti ricchi di stimoli motori (giochi, tunnel e ruote) [Serougne-Gautheron C. e Chevallier F., 1973]. Studi *in vitro* hanno mostrato che le lipoproteine secrete da astrociti in coltura contengono soprattutto colesterolo e fosfolipidi e solo in quantità minori esteri del colesterolo e trigliceridi. La presenza di precursori del colesterolo (latosterolo e desmosterolo) in lipoproteine secrete dalle cellule della glia suggerisce che gli

astrociti secernono dei precursori che sono poi captati dai neuroni e convertiti in colesterolo [Wang N. et al., 2008; Mutka A.L. et al., 2004]. Questo sistema di *outsourcing* potrebbe essere molto efficiente in quanto bypassa la scarsa capacità dei neuroni nel convertire il lanosterolo in colesterolo. Queste lipoproteine astrocitarie, *in vitro*, hanno una forma discoidale con un raggio di circa 8-17 nm e di densità simile a quella delle HDL. Tuttavia le loro proprietà *in vivo* sono ancora poco conosciute per via della mancanza di metodi adeguati di isolamento.

È ancora poco chiaro come le lipoproteine siano prodotte e secrete dagli astrociti. Probabilmente il meccanismo è simile a quello con cui gli epatociti secernono le lipoproteine e coinvolge trasportatori appartenenti alla famiglia ABC. Ovviamente la presenza di cellule secernenti lipoproteine implica, di conseguenza, l'esistenza di recettori per l'*uptake* di tali particelle. Sono 2 i tipi di recettori principalmente coinvolti nel trasporto del colesterolo a livello cerebrale: LDLR e LRP1 (*LDL Receptor-Related Protein 1*) [Herz J. E Bock H.H., 2002]. Il colesterolo entra quindi nella cellula neuronale mediante endocitosi mediata da recettore e va poi a distribuirsi nel compartimento membranale subcellulare. Nei neuroni questo è molto importante poiché è stato osservato che disfunzioni nelle proteine NPC1 (*Niemann-Pick type C1*) e NPC2 (*Niemann-Pick type C2*), componenti che mediano l'uscita del colesterolo dagli endosomi, causano sintomi neurologici. La patologia da cui risultano affetti i soggetti che hanno difetti in questi 2 sistemi di trasporto prende appunto il nome di sindrome di Niemann-Pick di tipo C [Karten B. et al., 2009]. Questo aspetto può ulteriormente sottolineare come i neuroni siano altamente dipendenti da un approvvigionamento esterno di colesterolo per il loro funzionamento.

Riassumendo, sulla base delle attuali conoscenze, possiamo affermare che gli astrociti rilasciano colesterolo attraverso la secrezione di lipoproteine le quali presentano caratteristiche differenti da quelle plasmatiche e che molto probabilmente sono rilasciate tramite trasportatori di tipo ABC. Studi *in vivo* e *in vitro* hanno mostrato che l'*uptake* di tale colesterolo da parte dei neuroni avviene tramite recettori specifici (LDLR e LRP1) mediante la formazione di endosomi e che esso è molto utile per mantenere l'integrità delle sinapsi. Infine, la degenerazione età-dipendente di alcuni tipi di neuroni collegata a danni a NPC1 indica la forte necessità dell'approvvigionamento di colesterolo tramite lipoproteine anche nel cervello.

Eliminazione del colesterolo cerebrale e sua regolazione

Affinchè il *turnover* del colesterolo cerebrale possa essere completato dal cervello in maniera autonoma questo sterolo deve poter essere eliminato dal SNC in modo indipendente. Tra le diverse modalità con cui ciò potrebbe essere attuato la principale è sicuramente l'ossidazione della molecola del colesterolo da parte dei neuroni.

Nel cervello infatti opera una terza via catabolica per l'eliminazione del colesterolo, la **via cerebrale** (o via della 24-idrossilasi), la cui prima (e limitante) reazione è la trasformazione del colesterolo in 24(S)-idrossicolesterolo (24-OHC o cerebrosterolo). La presenza di livelli relativamente elevati di 24-OHC nel tessuto cerebrale è nota da circa 50 anni, tuttavia solo recentemente è stato possibile chiarire il ruolo di questo composto nell'eliminazione del colesterolo dal SNC. Il 24-OHC, a differenza del colesterolo, è risultato infatti in grado di attraversare la BBB (grazie alla maggiore polarità della sua molecola) e quindi può essere allontanato dal tessuto cerebrale mediante il circolo ematico. Dal sangue il cerebrosterolo viene poi efficacemente captato dal fegato, convertito in acidi biliari ed eliminato tramite la bile [Björkhem I. et al., 1998; Lütjohann D. et al., 1996].

Come per la via alternativa quindi anche il *pathway* cerebrale inizia in sede extraepatica (in questo caso a livello del SNC), ma poi viene portato a compimento nel fegato dove, grazie agli enzimi della via classica, il 24-OHC può essere convertito in acidi biliari. L'enzima chiave di questa via catabolica è la colesterolo 24-idrossilasi (CYP46A1), un altro membro della famiglia del citocromo P450 che si trova localizzato all'interno della sostanza grigia e che utilizza ossigeno molecolare e NADPH come cofattori. I livelli di CYP46A1 sono inizialmente bassi nel neonato ed aumentano costantemente durante lo sviluppo postnatale per raggiungere un *plateau* nell'adulto [Lund E.G. et al., 1999; Ohyama Y. et al., 2006]. Studi condotti su topi e su neuroni in coltura hanno mostrato che questo enzima si trova in diversi tipi di cellule neuronali e che in queste si localizza a livello del reticolo endoplasmatico, del soma e dei dendriti, ma non dell'assone. Non è stato invece possibile evidenziare la presenza di CYP46A1 negli astrociti [Ramirez D.M. et al. 2008], e questo dato sembra riconfermare il fatto che, all'interno del SNC, gli astrociti siano i principali produttori mentre i neuroni i principali consumatori di colesterolo.

Ulteriori studi condotti sui livelli di ossisteroli nel cervello hanno permesso di evidenziare che, oltre al 24-OHC, nel tessuto cerebrale è possibile rilevare anche la presenza di 27-OHC, sebbene in concentrazioni minori (10-20% dei livelli di

cerebrosterolo) [Lütjohann D. et al., 1996]. La presenza di questo ossisterolo potrebbe lasciare presupporre un'attivazione della via alternativa di sintesi degli acidi biliari anche a livello cerebrale. Tuttavia accurati studi condotti, prima mediante l'utilizzo di ossisteroli marcati con deuterio [Leoni V. et al., 2003] e, successivamente, mediante misurazione della differenza nei livelli di ossisteroli tra la vena giugulare interna e l'arteria brachiale, hanno permesso di verificare che esiste un flusso netto in ingresso di 27-OHC dal plasma al cervello e che quindi la stragrande maggioranza del 27-OHC ivi riscontrato è di origine extracerebrale [Heverin M. et al., 2005]. Questo 27-OHC sarebbe poi rapidamente metabolizzato grazie all'enzima CYP7B1 in 7 α ,27-diidrossicolesterolo e nuovamente rilasciato nel plasma sotto forma di acido 7 α -idrossi-3-oxo-colestanoico [Meaney S. et al., 2007]. Non è tuttavia possibile escludere che anche nel cervello possa esserci una attività, sebbene minoritaria, della via alternativa. Parallelamente tramite gli stessi studi è stata riconfermata l'origine pressochè esclusivamente cerebrale del 24-OHC e la presenza di un suo efflusso dal SNC al circolo ematico attraverso la BBB.

Per quanto concerne la regolazione della via della 24-idrossilasi dobbiamo innanzitutto riportare che, rispetto all'enzima chiave della via classica del catabolismo del colesterolo, ossia CYP7A1, la regolazione a livello trascrizionale di CYP46A1 è molto limitata.

Il promotore del gene codificante per questo enzima è stato studiato e caratterizzato rispetto alla sua struttura e alla sua funzione: è una regione ricca in GC (caratteristica tipica dei geni *housekeeping*) all'interno della quale non si evidenziano sequenze TATA- o CAAT-box e lo stress ossidativo sembra essere l'unico fattore che influisce significativamente sulla sua attività [Ohyama Y. et al., 2006].

L'ipotesi di una possibile regolazione di CYP46A1 dipendente dal substrato o dal prodotto è stata studiata in topi mutanti *dhcr24 null* privi dell'enzima 24-deidrocolesterolo reduttasi (DHCR24) e nei quali quasi tutto il colesterolo è stato sostituito dal desmosterolo (che non è substrato di CYP46A1). L'enzima 24-deidrocolesterolo reduttasi catalizza, infatti, la riduzione del doppio legame Δ -24 negli intermedi finali della biosintesi del colesterolo e i topi mutanti per questo enzima sono colesterolo-carenti. In questi topi non sono state rilevate differenze significative nei livelli di mRNA di CYP46A1 rispetto a topi eterozigoti. Nonostante questo durante le prime 2 settimane di vita nei topi *wild type* si sono potuti osservare aumenti significativi nei livelli di mRNA insieme ad un aumento del 24-

idrossicolesterolo ed a una riduzione della sintesi di colesterolo [Ohyama Y. et al., 2006]. Tuttavia, non è stato possibile osservare un meccanismo di regolazione della via cerebrale di catabolismo del colesterolo pari a quello trovato per la via classica.

Oltre allo stress ossidativo, un altro fattore che si è ipotizzato possa influire sulla regolazione trascrizionale di CYP46A1 è l'induzione del gene durante la fase neonatale, anche se non è stato ancora chiarito quali possano essere i fattori (o il fattore) responsabile di questa induzione. Infine, esperimenti recenti hanno mostrato che anche la struttura della cromatina potrebbe essere un importante regolatore dell'espressione dell'enzima [Björkem I., 2006]. I meccanismi molecolari di questo processo restano, tuttavia, da chiarire.

MALATTIE NEUROMETABOLICHE DEL METABOLISMO DEL COLESTEROLO E DEGLI ACIDI BILIARI

Nel primo capitolo abbiamo illustrato come l'equilibrio nel metabolismo del colesterolo e degli acidi biliari, così cruciale per il corretto funzionamento dell'organismo umano, dipenda da un complesso *network* di interazioni tra diversi recettori, enzimi e proteine trasportatrici. I geni che codificano per queste macromolecole, se mutati, possono quindi essere causa di malattie metaboliche ereditarie più o meno gravi. Attualmente nel *database OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man)* risultano elencate diverse patologie la cui causa è stata riconosciuta essere un difetto genetico nel metabolismo del colesterolo: tali deficit possono interessare i processi di sintesi, assorbimento e trasporto, sia del colesterolo stesso che degli acidi biliari (suoi cataboliti). Queste malattie sono quasi sempre legate a disordini a livello epatico poiché il fegato, avendo un ruolo centrale nel metabolismo degli steroli e dei loro derivati, è spesso il primo organo a risentire degli effetti tossici dovuti all'accumulo di questi metaboliti. Inoltre data l'importanza del colesterolo nella fisiologia del SNC molte di queste disfunzioni genetiche sono associate a disturbi neurologici, accompagnati da più o meno estesi processi neurodegenerativi. Per questo motivo tali patologie rientrano spesso nell'ambito delle cosiddette **malattie neurometaboliche**.

Nel corso dei tre anni di dottorato, di cui questa tesi è il risultato finale, ho avuto modo di occuparmi in particolare dello studio di alcune malattie neurometaboliche dovute a deficit nella sintesi degli acidi biliari e nello specifico ho indagato le variazioni nel metabolismo del colesterolo che occorrono in soggetti affetti da questo tipo di patologie.

I disordini nella sintesi degli acidi biliari possono essere classificati come primari o secondari. I disordini primari riguardano deficienze congenite in enzimi responsabili della catalisi di reazioni chiave nella sintesi di CA e CDCA e comprendono deficit di 7α -idrossilasi (CYP7A1), 3β -idrossi- C_{27} -steroidi ossidoreduttasi, Δ_4 -3-ossosterolo- 7α -idrossilasi, 27 -idrossilasi (CYP27A1), 2-metilacil-CoA racemasi, triidrossicolestanoil-CoA ossidasi, acido biliare CoA ligasi e difetti nell'ossidazione della catena laterale nel *pathway* della 25 -idrossilasi. In aggiunta a questi disordini metabolici primari vi sono alcuni deficit metabolici secondari che impattano sulla sintesi degli acidi biliari; essi includono malattie perossisomali quali la sindrome

cerebroepatorenale di Zellweger e la sindrome di Smith-Lemli-Opitz che è invece causata dalla mancanza di Δ_7 -desaturasi (con conseguente deficit di colesterolo endogeno). Nello specifico le due patologie di cui mi sono occupato sono la xantomatosi cerebrotendinea (CTX) e la paraparesi spastica di tipo G5 (SPG5).

LA XANTOMATOSI CEREBROTENDINEA

La Xantomatosi Cerebrotendinea (CTX) (MIM #213700) è una raro disordine genetico del metabolismo del colesterolo e degli acidi biliari. Si tratta di una malattia da accumulo di lipidi di tipo autosomico recessivo ed è caratterizzata dalla deposizione di steroli e stanoli in diversi tessuti con conseguenti disturbi a livello sistemico e neurologico. Il primo caso di CTX fu riportato da van Bogaert e colleghi nel 1937 e riguardava un paziente con sintomatologia caratterizzata da demenza, atassia, cataratta e presenza di xantomi al livello dei tendini e del cervello (da cui il nome di xantomatosi cerebrotendinea) [Van Bogaert L. et al., 1937]. L'origine di tali disturbi era all'epoca completamente ignota. In seguito, nel corso degli anni, diverse centinaia di altri casi di CTX sono stati segnalati in diverse parti del mondo e la patologia è stata caratterizzata da un punto di vista clinico, biochimico e genetico. In linea generale i pazienti CTX presentano normali livelli di colesterolo nel sangue, ma elevate concentrazioni dello stesso nei tessuti. Inoltre, rispetto ai soggetti affetti da ipercolesterolemia familiare, gli xantomi dei pazienti CTX contengono elevate quantità (fino al 30%) di in analogo 5α -saturato del colesterolo detto colestano [Björkhem I. e Hansson M., 2010]. Le tipiche prime manifestazioni della patologia si hanno già nell'infanzia e sono generalmente rappresentate da diarrea cronica e cataratta bilaterale precoce [Cruysberg J.R., 2002]. Gli xantomi tipicamente si presentano nella seconda/terza decade di vita e sono specificamente localizzati a livello dei tendini e del cervello [Moghadasian M.H., 2004]. La presenza di questi accumuli lipidici a livello cerebrale rappresentano la conseguenza più seria della CTX e sono la causa dei tipici sintomi neurologici che la caratterizzano. Nella terza decade di vita compaiono infatti segni piramidali-cerebellari, atassia, disfunzioni extrapiramidali e ritardo mentale [Björkhem I. e Hansson M., 2010]. A livello cerebrale gli xantomi si accumulano preferenzialmente nella sostanza bianca del cervelletto. Se la malattia rimane non trattata questi sintomi peggiorano progressivamente fino alla morte del soggetto, tipicamente nella sesta decade di vita. Chiaramente la presentazione ed il corso della patologia possono variare ampiamente

da soggetto a soggetto [Moghadasian M.H. et al., 2002] e l'intervento terapeutico (che è possibile) permette di modificare radicalmente la storia naturale di questo disordine metabolico, soprattutto se iniziato precocemente [Berginer V.M. et al., 1984]. Attualmente sono stati riportati più di 300 casi di pazienti CTX in tutto il mondo con una prevalenza stimata della malattia pari a 1:50.000, nella popolazione bianca [Lorincz M.T. et al., 2005]. Sulla base di queste stime è possibile calcolare che nei soli USA circa 8.000-14.000 persone siano affette da questa patologia, tuttavia i casi attualmente diagnosticati sono in numero nettamente inferiore, lasciando quindi presupporre che la CTX sia assai frequentemente non riconosciuta. I casi di CTX attualmente riportati in letteratura hanno un'ampia distribuzione geografica (Cina, Canada, Belgio, Brasile, Arabia Saudita, India, Germania, Taiwan, Francia, Svizzera, Sud Africa, Australia, Israele e Argentina) con una maggior numero di report per quanto riguarda l'Italia, la Spagna e il Giappone.

La scoperta (sorprendente) che questa patologia neurologica è legata ad un difetto genetico nella sintesi degli acid biliari è da attribuire a Setoguchi e colleghi, i quali riscontrarono che i pazienti CTX avevano una ridotta sintesi di acidi biliari (con assenza pressoché totale di CDCA) e presentavano invece elevati livelli di alcol biliari 25-idrossilati nelle urine e nelle feci [Setoguchi T. et al., 1974]. Tuttavia solo qualche anno più tardi, mentre venivano chiariti i diversi *pathways* di sintesi degli acidi biliari e gli enzimi coinvolti in questi processi, è stato possibile identificare la causa dell'insorgenza della CTX con il deficit di sterolo 27-idrossilasi (CYP27A1) [Oftebro H. et al., 1980]. Il gene per CYP27A1, clonato e caratterizzato nel 1991, è localizzato sul cromosoma 2q35-qter e conta 9 esoni per un totale di 18,6Kb di DNA [Cali J.J. e Russell D.W., 1991]. Evidenze di mutazioni in questo gene nei soggetti affetti da CTX sono state riportate a partire dallo stesso anno della sua clonazione [Cali J.J. et al., 1991] e da allora ne sono state identificate più di 30 di diversi tipi (missenso, nonsense, *frame shift* e mutazioni nei siti di *splicing*) [Gallus G.N. et al., 2006]. Come già accennato la sterolo 27-idrossilasi è un enzima localizzato nella membrana mitocondriale interna dove è coinvolto nell'ossidazione della catena laterale degli steroli, in relazione alla loro biotrasformazione in acidi biliari [Russell D.W., 2003]. Poiché la principale via di produzione di acidi biliari nell'uomo è la via classica che inizia con un'idrossilazione in posizione 7α , CYP27A1 riconosce come substrati preferenziali gli intermedi 7α -idrossilati di questo *pathway* metabolico. L'enzima, tuttavia, può anche ossidare direttamente il colesterolo a 27-

idrossicolesterolo, dando inizio alla via alternativa; CYP27A1 svolge quindi un ruolo chiave in entrambe le principali vie di sintesi degli acidi biliari e se viene mutata il funzionamento di entrambi i *pathway* è compromesso. Questo dà ragione dei ridotti livelli di acidi biliari riscontrati nei pazienti CTX, così come dell'elevata escrezione di alcol biliari nelle urine e nelle feci. La mancata produzione di acidi biliari, in particolare di CDCA, fa infatti venir meno il meccanismo di regolazione a feedback della 7 α -idrossilasi (CYP7A1) (illustrato nei precedenti capitoli) con conseguente iperattivazione della via classica (Figura 14). Questo *pathway*, tuttavia, non può essere portato a compimento per la mancata azione di CYP27A1, necessaria per l'ossidazione e l'accorciamento della catena laterale dei precursori idrossilati degli acidi biliari. Conseguentemente nel tessuto epatico vengono ad accumularsi, anche per attivazione di altre idrossilasi, alcol biliari 25-idrossilati che sono rilasciati nella bile (e nel plasma) e quindi escreti nelle feci (e nelle urine).

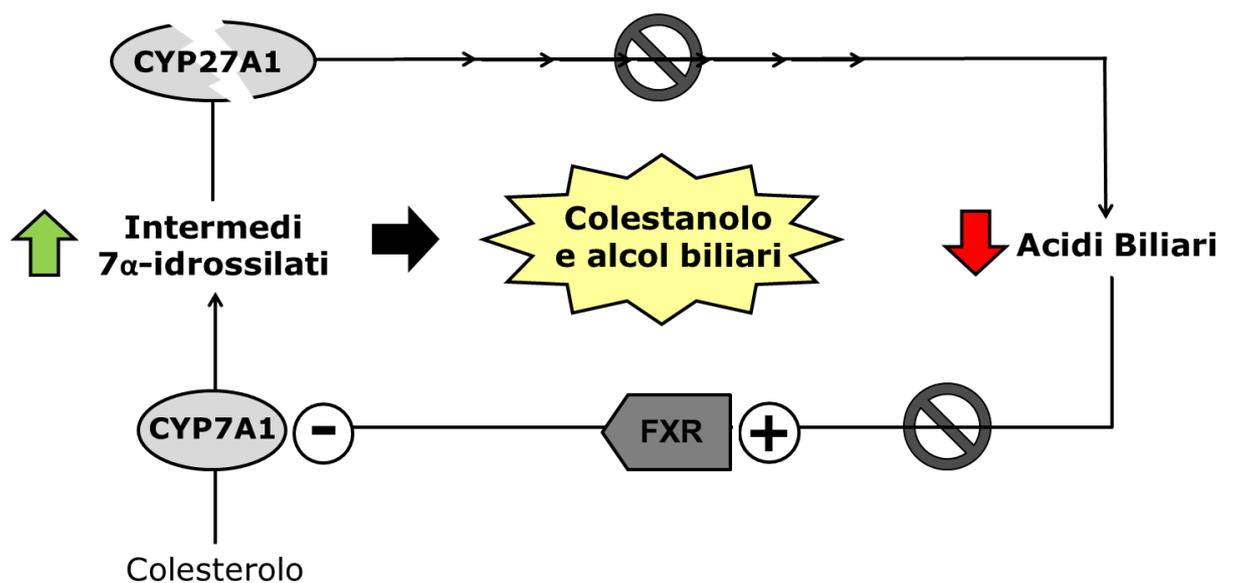


Figura 14. Alterazioni della sintesi di acidi biliari nella CTX.

In realtà nei soggetti CTX la sintesi degli acidi biliari, sebbene ridotta, non è completamente assente. Se infatti i livelli di CDCA in questi pazienti sono drasticamente ridotti, il livelli di CA sono circa la metà di quelli normali [Salen G. et al., 1985]. Questo è dovuto al fatto che il precursore del CA, il 5 β -coletan-3 α ,7 α ,12 α -triolo può subire oltre all'azione di CYP27A1 (a livello mitocondriale)

quella della 25-idrossilasi microsomiale CYP3A4 che lo converte in 5β-colestan-3α,7α,12α,25-tetrololo. Quest'ultimo intermedio può poi essere trasformato in CA ad opera di altri enzimi epatici (Figura 15) [Shefer S. et al., 1976 ; Björkhem I., 1992]. Il precursore del CDCA (5β-colestan-3α,7α-diolo) invece può essere ossidato solo da CYP27A1 e quindi se quest'ultimo enzima non è funzionante la sintesi di questo acido biliare è pressoché abolita. Il CA, tuttavia, è un attivatore debole di FXR rispetto al CDCA [Wang H. et al., 1999 ; Chiang J.Y.L., 2009] e conseguentemente risulta poco efficace nell'inibire l'enzima CYP7A1 che rimane overespresso (con le conseguenze che abbiamo appena illustrato).

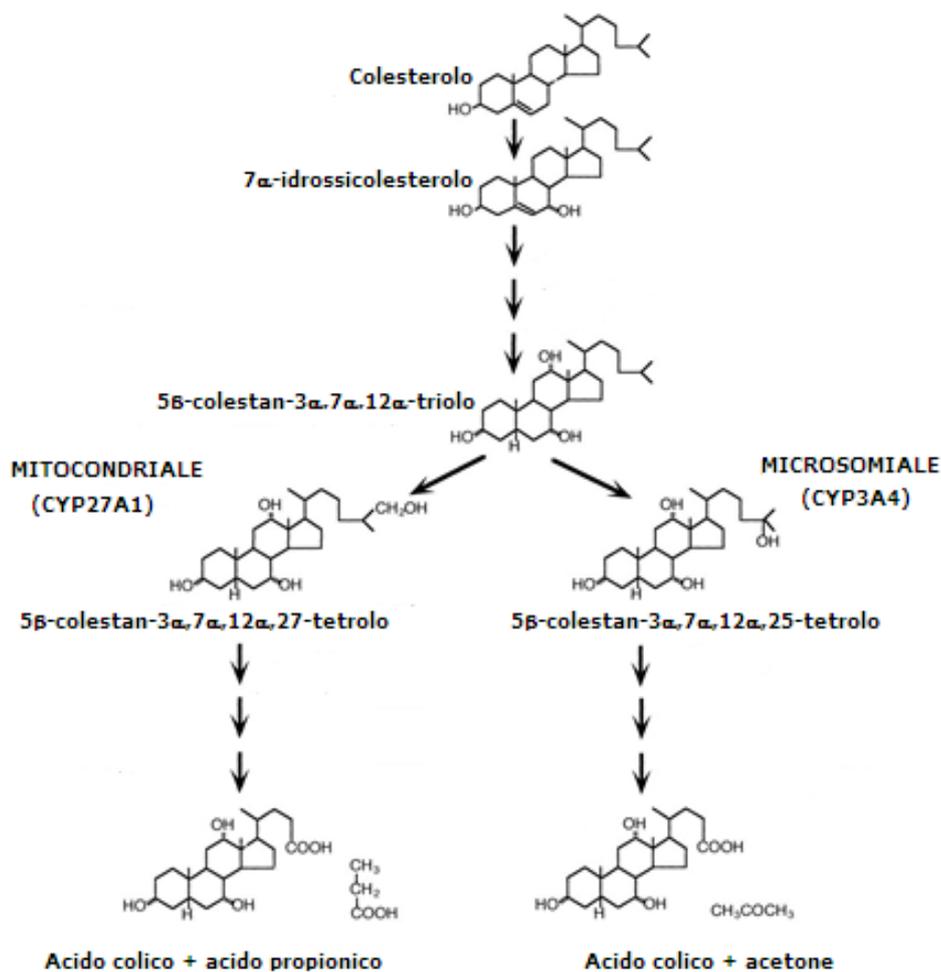


Figura 15. Via mitocondriale e microsomiale per la sintesi di acido colico. [immagine adattata da Honda A. et al. 2000].

L'altro metabolita che marcatamente si accumula nei soggetti CTX, in particolar modo a livello degli xantomati, è il colestano. Come già accennato, si tratta di un

derivato saturo del colesterolo e, sebbene una piccola quota di questo composto sia fisiologicamente riscontrabile nei tessuti, nel plasma la sua concentrazione è circa 1000 volte più bassa di quella del colesterolo. La formazione di xantomi arricchiti in colestano è la caratteristica peculiare della CTX che la contraddistingue da altre patologie da accumulo di steroli (ipercolesterolemie e sitosterolemie). Il legame tra la formazione di questi accumuli lipidici e la mancata sintesi di acidi biliari non è, tuttavia, così facilmente intuibile. Molto probabilmente è la produzione di colestano a costituire la forza trainante per lo sviluppo degli xantomi, ed il colesterolo in essi contenuto verrebbe a depositarsi solo in un secondo tempo. Contrariamente a quanto si potrebbe ipotizzare il colestano nei pazienti CTX non sembra originarsi direttamente dalla riduzione del colesterolo, ma mediante un meccanismo che prevede l'iniziale 7α -idrossilazione di quest'ultimo. Esperimenti condotti infondendo in pazienti CTX una mistura di colesterolo marcato in con ^{14}C in posizione 4 e con ^3H in posizione 7α hanno infatti mostrato come la maggior parte del colestano prodotto avesse perso ^3H , permettendo quindi di concludere che la sintesi di questo composto nell'uomo procede a partire da metaboliti del colesterolo idrossilati in 7α [Skrede S. et al., 1985]. Tra questi il più importante sembra essere il 7α -idrossi-colest-4-en-3-one ($7\alpha\text{C4}$) poiché in alcuni studi è risultato essere un efficiente precursore del colestano in diversi tessuti, il substrato iniziale di un *pathway* di sintesi che coinvolgerebbe anche il colest-4,6-dien-3-one ed il colest-4-en-3-one come metaboliti intermedi (Figura 16) [Skrede S. et al., 1985b ; Panzenboeck U. et al., 2007]. Il $7\alpha\text{C4}$ è il secondo intermedio della via classica di sintesi degli acidi biliari e, a riconferma del suo ruolo nella sintesi del colestano, i suoi livelli plasmatici risultano marcatamente aumentati nei soggetti CTX [Björkhem I. et al., 1997]. La ragione di questo accumulo è chiaramente l'upregolazione dell'enzima chiave della sintesi degli acidi biliari, ossia la 7α -idrossilasi (CYP7A1). Anche l'origine del colestano presente a livello cerebrale non è immediatamente identificabile. Il meccanismo più semplice che si può ipotizzare è un passaggio diretto di colestano formato in sede extracerebrale (mediante il meccanismo appena descritto) attraverso la BBB. È stato infatti riportato che animali (conigli e topi) alimentati con una dieta arricchita di colestano hanno un significativo incremento di questo composto nel cervello [Buchmann M.S. e Clausen O.P., 1986 ; Byun D.S. et al., 1988]. Tuttavia la possibilità di una contaminazione dai vasi sanguigni dei tessuti cerebrali asportati rende le conclusioni di questi studi assai incerte. Se infatti

un passaggio di colestanolesiste tra plasma e tessuto cerebrale questo è presumibilmente molto basso. Il colestanoles ha infatti una struttura chimica molto simile al colesterolo e, siccome quest'ultimo non passa la BBB [Björkhem I. e Meaney S., 2004] è assai probabile che anche il colestanoles non sia in grado di attraversare questa barriera.

Il $7\alpha C4$, invece, si è dimostrato capace di attraversare facilmente modelli in vitro di BBB ed inoltre è stata evidenziata una sua efficace conversione in colestanoles da parte di colture cellulari di neuroni e cellule gliali, così come da parte di macrofagi coltivati *in vitro* [Panzenboeck U. et al., 2007].

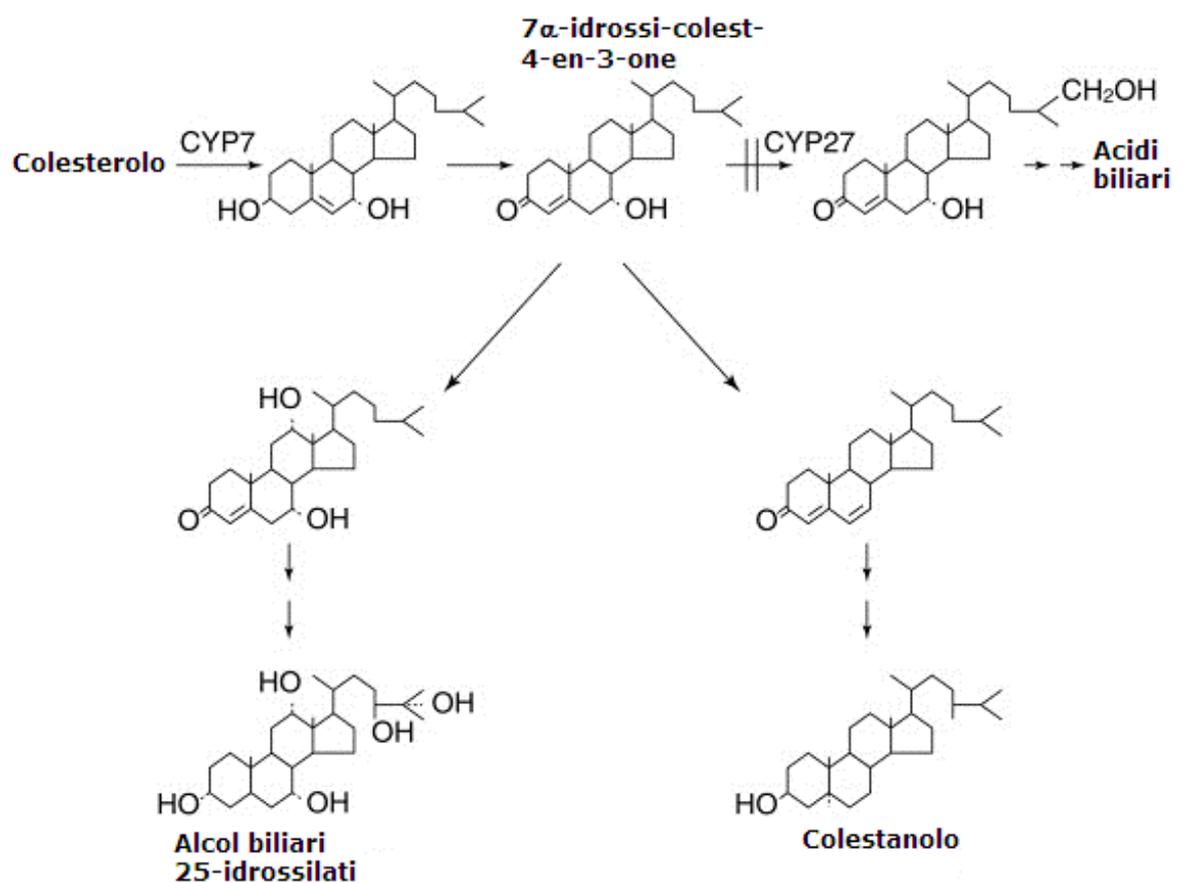


Figura 16. Sintesi di colestanoles ed alcol biliari nella CTX. [immagine adattata da Björkhem I. e Leitersdorf E. 2000].

Più recentemente, esperimenti condotti su topi KO per *cyp27a1* hanno permesso di verificare l'esistenza di un flusso di $7\alpha C4$ dal plasma al cervello e una sua correlazione con l'accumulo di colestanoles a livello cerebrale [Båvner A. et al., 2010]. Nel loro complesso tutti questi risultati sembrano quindi indicare fortemente

che nei soggetti CTX ci sia una overproduzione di $7\alpha C4$ (dovuta all'iperattivazione della via classica di sintesi degli acidi biliari) che attraverso il plasma arriva a tutti i distretti corporei, principalmente cervello e tendini, dove viene poi convertito in accumuli di colestano. Questi ultimi in seguito incorporerebbero anche colesterolo, tramite un meccanismo ancora poco noto. La ragione di questa deposizione di colesterolo potrebbe essere correlata alla scarsa capacità del colestano di inibire l'HMG-CoA reduttasi; la diluizione del pool di colesterolo, dovuta all'accumulo del suo metabolita ridotto, potrebbe quindi provocare un compensatorio aumento della biosintesi dello stesso. Questa ipotesi troverebbe supporto in alcuni esperimenti condotti su ratti nei quali è stato indicato come una dieta arricchita con 2% di colestano induca un significativo aumento dell'attività epatica dell'HMG-CoA reduttasi [Shefer S. et al., 1994]. Tuttavia questo aumento potrebbe essere dovuto al fatto che il colestano interferisce con l'assorbimento di colesterolo a livello intestinale e quindi potrebbe trattarsi solo di una risposta omeostatica dell'organismo ad un minor apporto alimentare di questa molecola.

Come già accennato, la maggior parte della sintomatologia della CTX, soprattutto per quanto riguarda i disturbi neurologici, è da attribuire alla presenza degli xantomi a livello cerebrale ed in particolar modo nel cervelletto. Lo spettro dei disturbi neurologici in questi pazienti è abbastanza ampio ed include: ritardo psicomotorio, demenza precoce, atassia, segni piramidali ed epilessia [Moghadasian M.H. et al., 2002 ; Gallus G.N. et al., 2006]. Inoltre anche la presenza di sintomi extrapiramidali [Grandas F. et al., 2002], neuropatia periferica [Argov Z et al., 1986 ; Pilo B. et al., 2011] e disturbi psichiatrici (quali depressione o psicosi) [Lee Y. Et al., 2002] sono abbastanza comuni. Esperimenti di *imaging* a risonanza magnetica cerebrale (*T₂-weighted MRI*) hanno evidenziato un'iperintensità bilaterale nei tratti di sostanza bianca e nel *nucleus dentatus* del cervelletto, così come atrofia cerebrale e cerebellare [Vanrietvelde F. et al., 2000]. A livello dei tendini invece l'MRI mostra un rigonfiamento diffuso con molteplici aree di iper-segnale intersperse tra zone di iso-segnale [Pardo J. Et al., 1993].

Al momento non esiste una cura risolutiva per la CTX, tuttavia la patologia può essere tenuta efficacemente sotto controllo grazie alla terapia sostitutiva con acidi biliari (BART, *Bile Acid Replacement Therapy*). Infatti, se nella produzione di colestano i precursori 7α -idrossilati degli acidi biliari giocano un ruolo chiave (come diversi studi hanno dimostrato) la soppressione dell'attività di CYP7A1 risulta

essere il miglior trattamento per prevenire la formazione degli xantomi. In accordo con questa ipotesi la somministrazione orale di CDCA 750 mg al giorno (mg/d), si è rivelata in grado di inibire efficacemente l'iperattivazione della via classica con conseguente riduzione dell'accumulo di $7\alpha C4$ e della sintesi di colestano e correzione, almeno parziale, delle alterazioni biochimiche tipiche della malattia [Berginer V.M. et al., 1984]. Al momento la terapia con CDCA rappresenta quindi il trattamento d'elezione della CTX. Non solo gli xantomi a livello dei tendini, ma anche quelli presenti nel SNC possono essere ridotti o addirittura scomparire grazie a questo tipo di trattamento, sebbene i danni cerebrali già causati non possano generalmente essere revertiti. Per questi motivi risulta estremamente importante una diagnosi precoce della patologia in modo da garantire un immediato intervento terapeutico e prevenire così l'insorgere di danni permanenti. Recentemente, in alcuni casi la BART è stata affiancata al trattamento con statine per limitare la biosintesi di colestano e quindi ridurre ulteriormente l'accumulo lipidico, tuttavia, l'effettiva efficacia questa terapia combinata non è ancora stata effettivamente dimostrata [Verrips A. et al., 1999 ; Keren Z. e Falik-Zaccai T.C., 2009].

Benché la CTX sia attualmente considerata una patologia del tutto trattabile rimangono alcuni problemi irrisolti che necessitano di ulteriori ricerche ed approfondimenti. Le conoscenze su questa malattia metabolica riportate in letteratura sono infatti basate in gran parte su singoli casi report e studi su gruppi di pazienti più ampi sono molto limitati. Da alcune di queste rare ricerche [Pilo-de-la-Fuente B. et al., 2011 ; Lionnet C. et al., 2014], così come da casi report [Mignarri A. et al., 2012] emerge innanzitutto che la BART non si rivela sempre efficace nel bloccare il decorso della malattia. Alcuni soggetti infatti mostrano un progressivo peggioramento dei sintomi neurologici nonostante l'assunzione continuativa di CDCA e la conseguente normalizzazione del quadro biochimico. Esiste quindi una percentuale non trascurabile (anche se ancora difficile da stimare) di pazienti che, pur rispondendo apparentemente alla terapia da un punto di vista biochimico, presentano una condizione clinica di peggioramento progressivo ed inarrestabile. Al momento, data la scarsità degli studi e delle segnalazioni a riguardo, non sono noti quali fattori siano coinvolti in questo processo neurodegenerativo non trattabile con la terapia standard. Questo fatto, tuttavia, potrebbe lasciare supporre che l'accumulo di colestano non sia la sola causa della processo neurodegenerativo tipico della malattia, ma che possano intervenire anche altri fattori.

In secondo luogo le manifestazioni cliniche della CTX sono estremamente variabili da soggetto a soggetto e non vi è una netta correlazione tra genotipo e fenotipo: non tutti i pazienti sviluppano xantomi ed anche il grado di disabilità motoria e/o cognitiva può variare molto tra i diversi pazienti. Non è noto se questa variabilità di quadri clinici possa dipendere da geni modificatori che impattano sul decorso della patologia.

In fine un ultimo aspetto che occorre sottolineare è che sebbene la BART sia in grado di inibire l'iperattivazione della via classica, limitando l'accumulo di metaboliti tossici, la somministrazione di acidi biliari non può ripristinare il funzionamento della via alternativa e la conseguente produzione di 27-OHC da parte dell'enzima CYP27A1 mutato. Questo aspetto non deve essere trascurato poiché, sebbene il contributo della via alternativa alla produzione giornaliera di acidi biliari sembra essere minoritario [Duane W.C. e Javitt N.B., 1999], essa potrebbe rappresentare un importante meccanismo di rimozione dell'eccesso di colesterolo dalle pareti dei vasi sanguigni e quindi avere un importante ruolo anti-aterogenico. Inoltre, abbastanza recentemente è emerso come gli ossisteroli, tra cui anche il 27-OHC, non sono solo un intermedi della sintesi degli acidi biliari ma possono anche agire come modulatori della trascrizione genica mediante il legame a specifici recettori nucleari [Schroepfer G.J. Jr., 2000 ; Wollam J. e Antebi A., 2011]. In particolare il 27-OHC si è dimostrato in grado di inibire l'attivazione dei fattori trascrizionali SREBP [Hua X. et al., 1996] e di indurre l'espressione dei trasportatori ABC tramite il legame al recettore LXR α [Costet P. et al., 2000]. Sia SREBP che LXR α sono coinvolti nel metabolismo e nell'omeostasi del colesterolo. Per cui anche l'assenza di questo metabolita nei pazienti CTX potrebbe avere un effetto su altri processi del metabolismo lipidico. Inoltre studi relativamente recenti hanno permesso di rivelare il ruolo del 27-OHC come modulatore selettivo del recettore degli estrogeni (SERM) [Umetani M. e Shaul P.W., 2011]. Non si può quindi escludere che un deficit di 27OHC possa alterare anche alcuni dei processi fisiologici regolati da questo recettore. Da ultimo occorre sottolineare che anche a livello cerebrale l'assenza di 27-OHC potrebbe avere una qualche influenza sui processi neurodegenerativi. L'evidenza di un costante flusso di 27-OHC dal plasma al tessuto cerebrale permette di ipotizzare che questo metabolita possa svolgere un ruolo fisiologico a livello del SNC, sebbene al momento non siano ancora state riportate evidenze a riguardo.

Nonostante sia nota da più di 80 anni la CTX rimane dunque una patologia ancora degna di ricerche ed approfondimenti per una migliore comprensione del ruolo del colesterolo e dei suoi derivati nella fisiopatologia umana.

LA PARAPARESI SPASTICA DI TIPO 5

La paraparesi spastica di tipo 5 (SPG5) è una malattia neurometabolica facente parte del gruppo delle cosiddette paraparesi spastiche ereditarie (*Hereditary Spastic Paresis*, HSP). Le HSP sono un gruppo clinicamente molto eterogeneo di malattie neurodegenerative dei motoneuroni superiori. Si tratta di un tipo di patologie caratterizzate tutte da una progressiva paralisi spastica degli arti inferiori, accompagnata da debolezza muscolare degli stessi (iposteina), a cui frequentemente si associa una perdita della sensibilità profonda [Lo Giudice T. et al., 2014]. La causa di questi sintomi è rappresentata dalla progressiva degenerazione retrograda delle fibre nervose del fascio cortico-spinale e dei cordoni dorsali del midollo spinale stesso. Tali fibre nervose sono costituite dagli assoni dei motoneuroni primari il cui soma si trova localizzato nel cervello, a livello della corteccia motoria. Occorre ricordare che, nell'uomo, gli impulsi motori partono dai motoneuroni primari corticali i quali, tramite i loro assoni, formano contatti sinaptici con motoneuroni di secondo ordine localizzati a livello del midollo spinale. Da questi ultimi il segnale viene poi trasmesso ai muscoli, tramite i fasci di nervi e le placche neuromuscolari. Nelle HSP la degenerazione degli assoni dei motoneuroni primari corticali inficia la trasmissione degli impulsi motori ai motoneuroni secondari del midollo spinale e da quest'ultimi ai muscoli, con conseguente ipostenia e spasticità. I primi muscoli colpiti sono generalmente quelli degli arti inferiori, a causa della maggiore lunghezza degli assoni dei motoneuroni primari deputati al controllo dei muscoli delle gambe e del bacino.

La presenza esclusiva dei sintomi motori permette di classificare una HSP come "pura", mentre la compresenza di altri sintomi neurologici quali, atassia, ritardo mentale, demenza, disfunzioni visive, ed epilessia è caratteristica delle cosiddette HSP "combinata" o "complesse". I diversi sottogruppi di HSP presentano tutti i tipi di ereditarietà (autosomica dominante/recessiva, legata al sesso dominante/recessiva) e, al momento, sono state descritte mutazioni in più di 50 differenti loci [Lo Giudice T. et al., 2014].

La SPG5 (MIM #270800) è la prima HSP “pura” autosomica recessiva che è stata descritta ed il locus mutato che causa questa patologia è localizzato sul cromosoma 8q12.3 [Muglia M. et al., 2004 ; Klebes S. et al., 2007]. Recentemente questo locus è stato indentificato, con una certa sorpresa, come il gene codificante per l'enzima ossisterolo 7 α -idrossilasi (CYP7B1) [Tsaousidou M.K. et al., 2008]. Come abbiamo già illustrato nei precedenti capitoli tale enzima interviene nella via alternativa di sintesi degli acidi biliari e si tratta di una proteina di 506 amminoacidi localizzata nel reticolo endoplasmatico che dipende dal NADPH e dalla citocromo P-450 reduttasi per la sua attività. L'espressione di questo enzima è ampia e riguarda fegato, rene, cervello e tessuti endocrini. Anche la sua specificità di substrato è piuttosto ampia, comprende due ossisteroli, il 27-OHC ed il 25-OHC [Schwarz M. et al., 1997] e altri steroidi neuroattivi a 19 e 21 atomi di carbonio [Rose K.A. et al., 1997]. Il gene Cyp7b1 è evolutivamente conservato ed è di rilevante importanza, sia per la sintesi degli acidi biliari, sia per il metabolismo dei cosiddetti neurosteroidi.

Il ruolo di CYP7B1 nella sintesi degli acidi biliari è ben definito: esso catalizza la 7 α -idrossilazione del 27-OHC (e del 25-OHC) prodotti all'inizio della via alternativa (e della via della 25-idrossilasi). Tale reazione di ossidazione del nucleo steroideo della molecola del colesterolo è indispensabile per la biotrasformazione di questa molecola in acidi biliari [Russell D.W., 2003]. Poiché la via alternativa può avere inizio in diversi tessuti extraepatici (l'enzima CYP27A1 è espresso da diversi tipi cellulari) si ha una certa produzione extraepatica di 27-OHC che, essendo in grado di attraversare le membrane biologiche, fluisce dai vari distretti corporei ai due organi che hanno i più efficienti sistemi per metabolizzarlo: il fegato ed il cervello. A livello epatico il 27-OHC (ed i suoi metaboliti periferici) vengono ulteriormente ossidati in acidi biliari [Russell D.W., 2003], mentre a livello del cervello esso viene convertito in acido 7 α -idrossi-3-ossido-4-colestenoico [Meaney S. et al., 2007]. Quest'ultimo è in grado di passare la BBB e viene captato dal fegato per essere in fine convertito anch'esso in acidi biliari. Entrambi questi processi necessitano dell'azione di CYP7B1.

Meno definito è invece il ruolo che CYP7B1 potrebbe avere per il metabolismo dei neurosteroidi. Quest'ultimi sono ormoni steroidei che sono sintetizzati sia nel SNC che nel SNP (*de novo* o dal metabolismo *in situ* di precursori plasmatici) e che si accumulano nel SN indipendentemente dai tassi di secrezione delle classiche ghiandole steroidogeniche [Baulieu E.E., 1997]. Questa classe di composti includono

il pregnenolone (PREG), il deidroepiandrosterone (DHEA), il progesterone (PROG) ed il loro derivati, tra cui ci sono dei composti 7α -idrossilati. Da alcuni anni è noto che questi neurosteroidi hanno proprietà neuroprotettive e che potrebbero essere importanti per la sopravvivenza delle cellule nervose [Wojtal K. Et al., 2006]. Poiché la produzione dei metaboliti 7α -idrossilati di alcuni neurosteroidi (PREG, DHA) richiede l'azione di CYP7B1, mutazioni a carico di questo enzima potrebbe portare ad alterazioni nell'equilibrio ormonale del SNC. Non è attualmente noto se tali alterazioni possano essere in qualche modo coinvolte nei processi neurodegenerativi della SPG5.

Da un punto di vista biochimico i soggetti SPG5 mostrano elevati livelli plasmatici di 27-OHC (di circa 6-9 volte) e 25-OHC (di circa 100 volte) e anche nel liquor cerebrospinale i valori di 27-OHC sono notevolmente aumentati rispetto ai soggetti sani (di circa 30-50 volte). Da un punto di vista clinico i pazienti sono caratterizzati da una progressiva paraparesi spastica la cui età di insorgenza è abbastanza variabile. Si tratta di una HPS "pura" nella maggior parte dei casi, ma in alcuni soggetti la paresi può essere accompagnata da una moderata atassia cerebellare e atrofia ottica [Schule R. et al. 2009 ; Goizet C. et al., 2009].

Attualmente non è ancora noto quale sia il meccanismo patogenetico alla base dell'insorgenza della SPG5, né come la mutazione di un'enzima della via alternativa di sintesi degli acidi biliari possa essere correlata alla degenerazione delle fibre nervose dei motoneuroni primari. Esperimenti condotti su modelli animali hanno evidenziato come topi KO per Cyp7b1, pur mostrando un accumulo di 27-OHC e 25-OHC, non abbiano alcun apparente fenotipo patologico. Questi animali, in contrasto con la situazione nell'uomo, non sviluppano infatti nessuna paraparesi spastica nonostante gli elevati livelli di ossisteroli [Li-Hawkins J. et al., 2000]. Anche topi transgenici overesprimenti CYP27A1 (e quindi con elevati livelli di 27-OHC, simili a quelli dei topi Cyp7b1 -/-) non sembrano avere un particolare fenotipo [Meir K. et al., 2002]. Da questi esperimenti si potrebbe dunque concludere che i soli livelli elevati di 27-OHC e 25-OHC non siano di per sé sufficienti per lo sviluppo della patologia. Tuttavia, nell'uomo la situazione sembra essere differente. Infatti i livelli di ossisteroli nei pazienti SPG5 sono molto più elevati che non nel modello animale, probabilmente per una minor efficienza di smaltimento di tali metaboliti da parte dell'organismo umano. Inoltre anche la minore lunghezza e maggiore ridondanza del tratto cortico-spinale dei roditori rispetto a quello umano potrebbe avere una

influenza sullo sviluppo della malattia. Per questi motivi, come nel caso della CTX, i modelli animali di SPG5 sembrano non essere particolarmente indicativi della situazione nell'uomo, a causa di alcune differenze sostanziali sia di tipo metabolico che di tipo anatomico. Di conseguenza non è ancora possibile stabilire se il fattore patogenetico di maggiore importanza nella SPG5 siano gli alti livelli di ossisteroli oppure delle alterazioni nel metabolismo dei neurosteroidi. Alcuni studi *in vitro*, comunque, hanno evidenziato come elevati livelli di 27-OHC e 25-OHC risultino citotossici [Clare K. et al., 1995 ; Bjorkhem I. e Diczfalusy U., 2002]. E' stato inoltre riportato che il 25-OHC è in grado di indurre la produzione di interleuchina-8 (IL-8) ed interleuchina-1 β (IL-1 β) nei macrofagi, con conseguente stimolazione di una risposta infiammatoria [Liu Y. et al., 1997 ; Rosklint T. et al., 2002]. Una produzione locale di IL-8 ed IL-1 β , indotta dal 25-OH, potrebbe quindi essere un possibile fattore patogenetico della SPG5. Anche se al momento non vi sono studi in grado di supportare questa ipotesi. Per quanto riguarda un possibile ruolo dell'accumulo di 27-OHC sulla neurodegenerazione, alcuni studi condotti su malati di Alzheimer hanno mostrato come i pazienti AD mostrino ridotti livelli di CYP7B1 nel cervello e conseguentemente elevati livelli di 27-OH nel tessuto cerebrale. Non è, tuttavia, noto se tale diminuzione possa contribuire allo sviluppo della malattia e se sia solo una conseguenza della perdita di neuroni che esprimono l'enzima [Bjorkhem I. et al., 2009]. Nel complesso nessuna di queste ipotesi sui possibili meccanismi molecolari di insorgenza della SPG5 risulta quindi supportata.

Non essendone ancora stata chiarita la patogenesi, oggi, non esiste una terapia definita per la SPG5. Tuttavia, se l'accumulo di 27-OHC e 25-OHC fosse il fattore patogenetico principale, strategie terapeutiche indirizzate ad una riduzione dei livelli plasmatici di questi ossisteroli potrebbero rivelarsi utili. Attualmente non sono noti inibitori dell'enzima CYP27A1 e l'unico fattore limitante alla sua attività sembra essere la disponibilità del substrato. Il trattamento con farmaci ipocolesterolemizzanti (inibitori della sintesi o dell'assorbimento di colesterolo) potrebbero quindi avere un certa efficacia terapeutica [Schule R. et al., 2010].

La SPG5 rappresenta dunque una malattia neurometabolica che deve essere ancora ben compresa ed approfondita, il cui svelamento dei meccanismi molecolari potrebbe contribuire a far luce sul ruolo del metabolismo degli steroli nell'omeostasi del sistema nervoso e per la quale si rendono necessari nuovi studi in grado definire un efficace approccio terapeutico.

RUOLO DEL METABOLISMO DEL COLESTEROLO IN MALATTIE NEURODEGENERATIVE SPORADICHE

Nei precedenti due capitoli abbiamo trattato di due malattie neurometaboliche ereditarie correlate ad alterazioni nel metabolismo del colesterolo ad acidi biliari. Tuttavia è noto da tempo che disturbi nell'omeostasi del colesterolo possono essere associati anche a patologie neurodegenerative non ereditarie (sporadiche), tra cui la principale è sicuramente la sindrome di Alzheimer (AD). Durante lo svolgimento del mio progetto di dottorato abbiamo ritenuto utile fare alcune valutazioni sul metabolismo del colesterolo anche in alcuni pazienti affetti da AD per poter avere un parametro di confronto circa le alterazioni metaboliche a carico di colesterolo (e metaboliti) tra differenti patologie accomunate da fenomeni neurodegenerativi. Accenneremo quindi alle attuali conoscenze sulle interazioni tra metabolismo del colesterolo ed AD.

L'AD (come noto) è la più diffusa forma di demenza neurodegenerativa invalidante nei paesi sviluppati. È una patologia complessa e geneticamente eterogenea, caratterizzata da progressivo deficit di memoria, deterioramento cognitivo e cambiamenti di personalità, accompagnati da specifiche alterazioni strutturali nel cervello. Salvo per alcune forme familiari, legate a mutazioni in specifici geni, l'esordio della malattia è generalmente tardivo (oltre i 65 anni di età). Le principali caratteristiche istologiche dell'AD sono depositi extracellulari di proteina β -amiloide ($A\beta$) sotto forma di placche senili e accumuli intracellulari di una forma iperfosforilata della proteina TAU in grovigli neurofibrillari. I danni a livello cognitivo e gli altri sintomi clinici della malattia sono una conseguenza della degenerazione dei neuroni, soprattutto a livello dell'ippocampo e della neocorteccia, e della conseguente perdita delle sinapsi [Querfurth H.W. e LaFerla F.M., 2010]. L'AD inizia con un anomalo processamento della proteina precorritrice dell'amiloide (APP) ad opera dell'azione sequenziale di una β -secretasi (BACE1) ed una γ -secretasi. L'azione di questi due enzimi proteolitici porta ad una eccessiva produzione e/o ridotta *clearance* di peptidi $A\beta$ costituiti da 39-43 amminoacidi. Questo sbilanciamento causa l'accumulo dell' $A\beta$ nel cervello e quest'ultimo può dare inizio alla patologia.

Diversi meccanismi possono contribuire allo sviluppo ed alla progressione della malattia, tra cui alterazioni del metabolismo cerebrale, stress ossidativo,

infiammazione e presenza dell'isoforma E4 di apoE (allele $\epsilon 4$) [Blennow K. et al., 2006]. Nel corso degli anni è emerso inoltre un numero sempre maggiore di evidenze, sia epidemiologiche che molecolari, le quali sembrano suggerire un legame tra colesterolo e progressione dell'AD. Diversi geni coinvolti nel metabolismo del colesterolo sono stati infatti identificati come loci di suscettibilità per la forma sporadica della malattia [Wollmer M.A., 2010], e sembra che un alterato metabolismo del colesterolo giochi un ruolo fondamentale sia nella formazione delle placche senili che nell'iperfosforilazione della proteina tau [Ghribi O., 2008 ; Di Paolo G. e Kim T.W., 2011]. Inoltre l'ipercolesterolemia è unanimemente riconosciuta come un fattore di rischio per la forma ad esordio tardivo dell'AD (forma che riguarda la stragrande maggioranza dei casi) [Pappolla M.A. et al., 2003 ; Marins I.J. et al., 2009]. Un'ultima evidenza del coinvolgimento del colesterolo nello sviluppo dell'AD deriva da studi epidemiologici i quali hanno mostrato come l'utilizzo di farmaci ipocolesterolemizzanti (come le statine) riduce la prevalenza della malattia [Jick H. et al., 2000 ; Wolozin B. et al., 2000.], sebbene quest'ultima conclusione non sia ancora completamente accettata a causa dei risultati contraddittori riportati da alcuni studi clinici [Fonseca A.C. et al., 2010].

A livello neuronale il colesterolo è principalmente localizzato a livello di specifici microdomini di membrana detti *lipid rafts* dove, come suggerito da diverse ricerche, avviene il *pathway* amiloidogenico [Vetrivel K.S. e Thinakaran G., 2010.]. A questo riguardo è stato riportato che il colesterolo cellulare (specialmente quando la sua concentrazione in membrana è elevata) lega direttamente l'APP e ne promuove l'inserzione nei *lipid rafts* dove β - e γ -secretasi agiscono, favorendo quindi l'accumulo di $A\beta$ [Beel A.J. et al., 2010 ; Wahrle S. et al., 2002]. Al contrario, nel *pathway* non-amiloidogenico l'APP è processata da una α -secretasi in domini *non-rafts* e questo evento è favorito dalla diminuzione del contenuto intracellulare di colesterolo. L'attività amiloidogenica risulta così correlata positivamente ai livelli di colesterolo intracellulare [Grimm M.O. et al., 2008 ; Xiong H. et al., 2008]. Il colesterolo inoltre promuove la formazione di aggregati neurotossici da parte dell' $A\beta$ [Yanagisawa K., 2005]; è stato evidenziato come l' $A\beta$ abbia una specifica affinità per il colesterolo, il quale lega strettamente le protofibrille di amiloide [Harris J.R., 2008]. Tutte queste ricerche sembrano suggerire che la distribuzione ed il traffico di colesterolo all'interno delle cellule cerebrali siano fattori rilevanti nel processamento

dell'APP, nell'accumulo di A β e quindi nella progressione dell'AD [Burns M.P. et al., 2006].

Come conseguenza dei risultati ottenuti circa il coinvolgimento del colesterolo sono iniziati studi anche sulla correlazione tra ossisteroli cerebrali e AD. Come abbiamo già avuto modo di vedere che, a livello cerebrale, i principali ossisteroli presenti sono il 24-OHC, prodotto *in situ* per l'eliminazione del colesterolo cerebrale, ed il 27-OHC, la cui origine è per la maggior parte extracerebrale. Diversi studi hanno riscontrato livelli di 24-OHC più elevati nella circolazione periferica e nel liquor di pazienti AD ai primi stadi della malattia rispetto ad individui sani [Lütjohann D. et al., 2000 ; Papassotiropoulos A. et al., 2002]. Per contro la concentrazione plasmatica di quest'ossisterolo diminuisce negli stadi più avanzati della patologia, suggerendo che il *turnover* del colesterolo si riduce durante la progressione dell'AD [Kölsch H. et al., 2004]. Questi risultati apparentemente contraddittori possono essere spiegati considerando l'iniziale aumento di 24-OHC come conseguenza della neurodegenerazione e/o demielinizzazione, mentre la successiva diminuzione come il risultato della perdita di neuroni esprimenti CYP46A1. Inoltre è stata trovata una correlazione significativa tra la riduzione di questo ossisterolo nel plasma, la severità del deficit cognitivo ed il grado di atrofia cerebrale [Papassotiropoulos A. et al., 2000; Solomon A. et al., 2009].

Per quanto riguarda il 27-OHC, invece, studi condotti analizzando tutte le aree cerebrali di soggetti AD deceduti hanno evidenziato come le concentrazioni di quest'ossisterolo siano aumentate, mentre quelle del 24-OHC diminuite [Heverin M. et al., 2004]. Se la diminuzione del 24-OHC è in linea con una perdita dei neuroni, gli aumentati livelli di 27-OHC potrebbero essere dovuti ad un aumento del flusso di tale sterolo attraverso la BBB (dovuto o all'ipercolesterolemia o a difetti nella BBB). Un'altra possibile spiegazione dei più alti livelli di 27-OHC implicherebbe un suo ridotto metabolismo; come già accennato nel precedente capitolo i livelli di CYP7B1 sono ridotti nel cervello di pazienti AD e questo comporterebbe una maggior difficoltà nello smaltimento di tale molecola [Yau J.L. et al., 2003]. Sulla base di queste osservazioni è stato ipotizzato che potrebbe essere il bilancio tra 24-OHC e 27-OHC ad essere importante per l'amiloidogenesi [Björkhem I. et al., 2009 ; Heverin M. et al., 2004]. Per cui una modificazione di tale bilancio potrebbe portare ad una aumentata produzione ed accumulo di A β , mentre una regolazione del rapporto 24-OHC/27-OHC potrebbe essere una strategia importante per controllare i

livelli di peptidi tossici. Data la complessità, e a volte la contraddittorietà, delle informazioni ricavate dai diversi studi su AD e metabolismo del colesterolo, ulteriori ricerche sono, tuttavia, necessarie al fine di definire meglio il reale ruolo del metabolismo degli steroli nello sviluppo di questa patologia neurodegenerativa sporadica.

VALUTAZIONE EX-VIVO DEL METABOLISMO DEGLI STEROLI

Lo studio delle malattie neurometaboliche e/o neurodegenerative legate ad alterazioni nell'omeostasi del colesterolo richiede l'utilizzo di tecniche analitiche che permettano una valutazione (il più possibile quantitativa) delle alterazioni dei processi metabolici di questo sterolo e dei livelli plasmatici e/o tissutali dei suoi metaboliti bioattivi. Questo tipo di indagine a livello molecolare risulta infatti essenziale sia per lo studio di nuove vie di prevenzione e di cura, sia per una valutazione routinaria del paziente. Negli ultimi 30-40 anni l'avvento delle tecniche di spettrometria di massa (MS) ha fornito una serie di strumenti fondamentali per questo tipo di analisi. La MS, infatti, permette uno studio approfondito dei composti biologici al fine di rilevarne la presenza e la concentrazione nell'organismo, chiarirne le funzioni biologiche ed individuarne interazioni con strutture cellulari. Le caratteristiche peculiari della MS che la rendono particolarmente adatta agli scopi indicati sono, da una parte l'elevata selettività che permette di riconoscere una determinata sostanza anche se presente in miscela con molte altre, e dall'altra l'alta sensibilità che risulta spesso così elevata da permettere di considerare la MS quale tecnica di elezione per l'analisi di sostanze di ogni tipo in matrici complesse, come quelle di origine biologica.

L'accoppiamento della MS con tecniche separative cromatografiche (in gas o in liquido) ha ulteriormente incrementato le potenzialità analitiche di questa metodica. Se da una parte, infatti, i sistemi cromatografici permettono una preventiva separazione dei diversi componenti di una miscela complessa (come può essere un fluido biologico od un omogenato di tessuto), dall'altra l'utilizzo di uno spettrometro di massa come rivelatore implementa notevolmente la *performance* della cromatografia, grazie all'altissima sensibilità ed alla capacità di identificare i composti chimici incogniti di cui non sono disponibili tempi di ritenzione.

Per questo progetto di dottorato è stato fatto ricorso alle tecniche di **gascromatografia accoppiata alla spettrometria di massa** (GC-MS) al fine di monitorare le alterazioni nel metabolismo del colesterolo in soggetti affetti da patologie neurometaboliche e/o neurodegenerative. Tale valutazione è stata condotta mediante l'analisi in GC-MS di specifici metaboliti *markers* in campioni di plasma.

MARKERS DEL METABOLISMO DI COLESTEROLO ED ACIDI BILIARI

Le tecniche di GC-MS possono essere efficacemente utilizzate per monitorare *ex vivo* il metabolismo degli steroli nell'uomo; tale possibilità risulta particolarmente utile per la valutazione routinaria di soggetti affetti da malattie (neuro)metaboliche e da altre patologie legate a difetti nel metabolismo del colesterolo e degli acidi biliari. Come abbiamo già specificato i soggetti affetti da questi tipi di malattie sono caratterizzati da un alterato profilo plasmatico degli steroli, il quale è il risultato del deficit enzimatico portato dai relativi pazienti. L'evidenza di specifiche alterazioni dei livelli plasmatici dei diversi steroli costituisce, quindi, un *marker* diagnostico per queste patologie. Inoltre, se i principali sintomi della malattia sono dovuti proprio alle variazioni del contenuto di alcuni particolari steroli, l'efficacia di terapie volte ad una normalizzazione della concentrazione degli stessi deve essere valutata attraverso un'analisi nel tempo di questi metaboliti specifici. Un ultimo aspetto non meno importante da sottolineare è che, dato il complesso *network* di interazioni che esiste tra i diversi processi metabolici del colesterolo nei diversi distretti corporei, un deficit in un determinato *pathway* potrebbe riflettersi anche su altre vie metaboliche, con una conseguente globale alterazione del metabolismo di colesterolo ed acidi biliari.

Nel corso degli anni è stato possibile identificare nel plasma specifici metaboliti *markers* che sono indicativi sia dei principali processi metabolici del colesterolo, sia di quei *pathways* che risultano alterati nei soggetti affetti da malattie neurometaboliche, quali la CTX e l'SPG5, e da malattie neurodegenerative sporadiche come l'AD.

Il dosaggio di questi *biomarkers* può essere facilmente effettuato grazie alle tecniche di GC-MS a partire da una ridotta quantità di plasma (< 1ml). I metaboliti in questione sono rappresentati sostanzialmente dagli **ossisteroli**, primi intermedi delle diverse vie cataboliche del colesterolo, e da alcuni **steroli non-colesterolici** (precursori del colesterolo e fitosteroli) che sono indicativi dei processi di sintesi endogena ed assorbimento intestinale di colesterolo. A questi va aggiunto, nel caso della CTX, il colestano in qualità di principale e caratteristico metabolita che si accumula specificatamente nei soggetti affetti da questa patologia.

Gli ossisteroli

Gli ossisteroli sono una categoria di derivati del colesterolo prodotti dall'aggiunta di un gruppo ossidrilico allo scheletro della molecola del colesterolo. Sono composti a 27 atomi di carbonio che si differenziano in base alla posizione, al numero e/o allo stato di ossidazione del(i) gruppo(i) ossidrilico (Figura 17).

Nell'uomo la formazione endogena degli ossisteroli avviene principalmente tramite:

- reazioni enzimatiche di biotrasformazione del colesterolo
- alcune reazioni non enzimatiche con l'O₂, specie nelle sue forme reattive (ROS)

Tra gli ossisteroli che si formano per reazioni enzimatiche, in particolar modo per ossidazione della catena laterale, troviamo il 27-idrossicolesterolo (27-OHC), il 24(S)-idrossicolesterolo (24-OHC) e il 25-idrossicolesterolo (25-OHC). Anche il 7 α -idrossicolesterolo (7 α -OHC) si può formare per reazione enzimatica, ma in questo caso per ossidazione non sulla catena laterale ma sulla struttura ad anello.

Per via non enzimatica sono invece prodotti principalmente lo stesso 7 α -OHC, il 7 β -idrossicolesterolo (7 β -OHC) e 7-cetocolesterolo (7-KC).

Gli ossisteroli, sia quelli presenti nei tessuti periferici che nel SNC, sono fondamentali per il metabolismo del colesterolo e possono essere coinvolti in diversi processi, sia fisiologici che patologici.

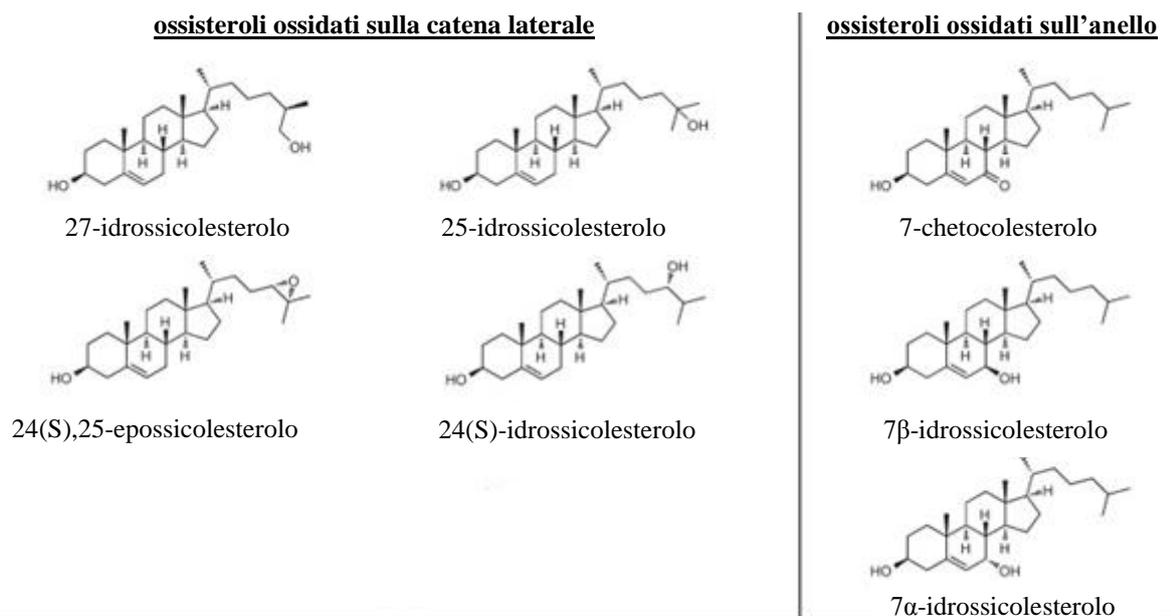


Figura 17. Principali tipi di ossisteroli.

Il **7 α -idrossicolesterolo (7 α -OHC)** è il primo intermedio che si forma nella via classica di sintesi degli acidi biliari, prodotto per ossidazione del colesterolo da parte dell'enzima epatico CYP7A1. Tale enzima è limitante per questo *pathway* biosintetico e, come ampiamente descritto, è regolato tramite inibizione a *feedback* dagli acidi biliari stessi [Russel D.W. et al., 2003].

L'emivita di questo composto è assai limitata *in vivo*, in quanto è rapidamente convertito nell'intermedio successivo, il **7 α -idrossi-4-colesten-3-one (7 α C4)** (Figura 18), da parte dell'enzima 3 β -idrossi- Δ^5 -C27-steroidi deidrogenasi/ossidoreduttasi (C₂₇ β -HSD). Entrambi questi ossisteroli sono riscontrabili nel plasma alla concentrazione di pochi μ g/dl. Poiché l'espressione degli enzimi CYP7A1 e C₂₇ β -HSD è esclusivamente epatica, la presenza del 7 α -OHC e 7 α C4 a livello del circolo ematico è probabilmente imputabile ad un fenomeno di *spillover* di questi metaboliti dal fegato.

Dosaggi sui livelli plasmatici di 7 α -OHC [Björkhem I. et al., 1987; Hahn C. et al., 1995] e 7 α C4 [Axelson M. et al., 1988; Bertolotti M. et al., 2008] sono stati efficacemente proposti come metodi indiretti per misurare la sintesi degli acidi biliari e l'attività dell'enzima CYP7A1.

La concentrazione plasmatica di 7 α C4 è in genere maggiormente indicativa a riguardo rispetto a quella di 7 α -OHC. Questo è dovuto al fatto che il 7 α -OHC non si origina solo per via enzimatica, ma può anche essere prodotto in quantità non trascurabili per autossidazione diretta del colesterolo ad opera dell'O₂. Il 7 α C4, invece, viene sintetizzato esclusivamente per via enzimatica, è un intermedio più stabile del 7 α -OHC e quindi i suoi livelli plasmatici risultano correlati più strettamente con l'attività di CYP7A1.

Per ciò che concerne i livelli plasmatici di questi ossisteroli nel caso di malattie neurometaboliche, ricordiamo che i livelli di entrambi questi metaboliti risultano aumentati nei soggetti CTX per mancanza di inibizione dell'enzima CYP7A1 da parte del CDCA [Björkhem I. et al., 1997], e che l'accumulo di 7 α C4 sembra essere la causa principale della patogenesi della malattia [Panzenboeck U. et al., 2007 ; Bävner A. et al., 2010]. Da qui l'utilità di monitorarne i livelli plasmatici.

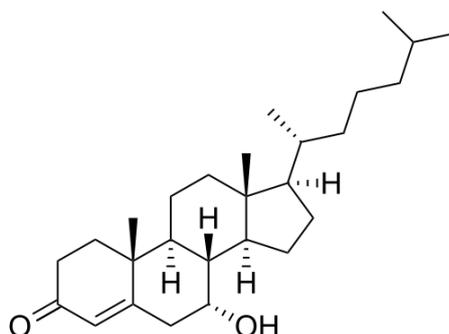


Figura 18. Struttura del 7 α -idrossi-4-colesten-3-one (7 α C4).

Il **27-idrossicolesterolo (27-OHC)** è invece il primo intermedio della via alternativa per il catabolismo del colesterolo ad acidi biliari ed è sintetizzato, attraverso l'azione dell'enzima CYP27A1, in diversi distretti corporei tra cui fegato, intestino, tessuto vascolare, macrofagi e cervello.

La maggior parte del 27-OH circolante deriva soprattutto dalle fonti extraepatiche, è trasportato principalmente con le particelle LDL e HDL [Burkard I. et al., 2007] ed i suoi livelli plasmatici sono stati utilizzati in diversi studi come indicatori dell'attività della via alternativa di sintesi degli acidi biliari [Del Puppo et al., 1998 ; Crosignani et al., 2007].

Nel caso di malattie neurometaboliche del metabolismo degli acidi biliari può essere utile monitorare i livelli di quest'ossisterolo, almeno per tre motivi fondamentali che occorre ricordare. Il primo aspetto è che il 27-OHC è ligando per alcuni recettori intracellulari coinvolti nella regolazione metabolismo del colesterolo (LXR α , SREBP) [Hua X. et al., 1996 ; Costet P. et al., 2000]. Alterazioni nei suoi livelli possono ripercuotersi quindi su altri processi del metabolismo lipidico. Il secondo luogo il 27-OHC è un modulatore selettivo del recettore degli estrogeni (SERM) [Umetani M. e Shaul P.W., 2011] e quindi potrebbe influenzare tutti quei processi controllati da questi ormoni. In fine l'esistenza di un flusso di 27-OHC dal plasma al cervello [Heverin M. et al., 2005] potrebbe essere di rilievo per il mantenimento dell'omeostasi di quest'organo.

I livelli di 27-OHC sono drasticamente ridotti (virtualmente nulli) nei soggetti CTX (per mancanza di CYP27A1), mentre marcatamente aumentati nei pazienti SPG5 (per deficit nell'enzima CYP7B1 che converte il 27-OHC in 7 α ,27-OHC).

Il **24(S)-idrossicolesterolo (24-OHC)**, o cerebrosterolo, è il primo metabolita che si forma nella via cerebrale di eliminazione del colesterolo. È prodotto a seguito

dell'introduzione in posizione 24 di un gruppo idrossilico da parte dell'enzima CYP46A1.

Dal momento che il cerebrosterolo viene sintetizzato esclusivamente nel cervello (dove è infatti presente a concentrazioni maggiori rispetto a tutti gli altri organi) il suo dosaggio plasmatico è spesso usato in letteratura per valutare l'omeostasi del metabolismo del colesterolo nel SNC [Pfrieger F.W., 2003; Mauch D.H. et al., 2001] e come marker di processi neurodegenerativi [Leoni V. et al., 2004]. Poiché le malattie neurometaboliche sono accompagnate spesso da fenomeni neurodegenerativi è utile valutare periodicamente i livelli plasmatici di quest'ossisterolo nei pazienti e cercare eventuali correlazioni tra questi ed il grado dei sintomi neurologici.

Il **25-idrossicolesterolo (25-OHC)** è invece il prodotto dell'ossidazione del colesterolo catalizzata dall'enzima microsomiale CH25H, all'inizio della cosiddetta via della 25-idrossilasi. La concentrazione plasmatica di quest'ossisterolo nell'uomo è nettamente inferiore rispetto a quelle di 7α -OHC, 7α C4, 24-OHC e 27-OHC ed il suo ruolo biologico non è stato ancora compreso; ad oggi sono state formulate alcune ipotesi, sulla base di diversi studi condotti nel corso degli anni, ma nessuna conclusione definitiva è stata raggiunta [Diczfalusy U., 2013]. Esso è insieme al 27-OHC uno dei metaboliti che si accumula nei soggetti SPG5, poiché è anch'esso substrato dell'enzima CYP7B1.

Gli steroli non-colesterolici

Gli steroli non-colesterolici presenti nell'organismo umano sono rappresentati soprattutto da precursori del processo biosintetico del colesterolo e dagli steroli vegetali (o fitosteroli), composti esogeni che derivano dagli alimenti di origine vegetale introdotti con la dieta e che sono assorbiti a livello intestinale.

Questi metaboliti sono importanti nella ricerca sulle malattie legate ad alterazioni del metabolismo del colesterolo perché sono utilizzati come *markers* rispettivamente della sintesi endogena e dell'assorbimento intestinale di colesterolo [Miettinen T.A. et al., 1990].

La determinazione *in vivo* dell'entità di questi processi richiederebbe, infatti, complesse e laboriose procedure analitiche (la cui trattazione esula dallo scopo di questa tesi) che sono difficilmente utilizzabili per una valutazione routinaria dei pazienti. Sebbene possa fornire solo una stima semi-quantitativa dell'entità di tali

processi, il dosaggio di questi metaboliti in condizioni di stato stazionario e coi soggetti sottoposti alla loro dieta abituale, è una metodica facilmente eseguibile in GC-MS. I livelli dei precursori del colesterolo (squalene, colesteno, desmosterolo e latosterolo) riflettono l'attività dell'HMG-CoA reduttasi, mentre i livelli di steroli vegetali (campesterolo e sitosterolo) riflettono l'azione relativa di NPC1L1 e ABCG5/G8. La validità di questi *markers* è stata valutata in diversi studi, sia per i precursori del colesterolo che per i fitosteroli [Simonen P. et al., 2008 ; Miettinen T.A. et al., 2011].

Il **latosterolo** è il precursore immediato del colesterolo da cui differisce per la posizione del doppio legame in C-7 anziché in C-5 (Figura 19). La concentrazione plasmatica di latosterolo, o più esattamente, il rapporto tra la concentrazione plasmatica di latosterolo e quella del colesterolo totale è forse il *marker* di biosintesi di colesterolo più utilizzato.

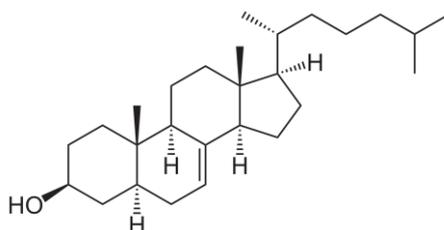


Figura 19. Struttura del latosterolo.

Il **β -sitosterolo** ed il **campesterolo** sono invece i principali fitosteroli usati come *markers* di assorbimento del colesterolo (Figura 20). Anche in questo caso ad essere maggiormente indicativa non è tanto la concentrazione plasmatica assoluta di questi composti, ma il rapporto tra questa ed il colesterolo totale.

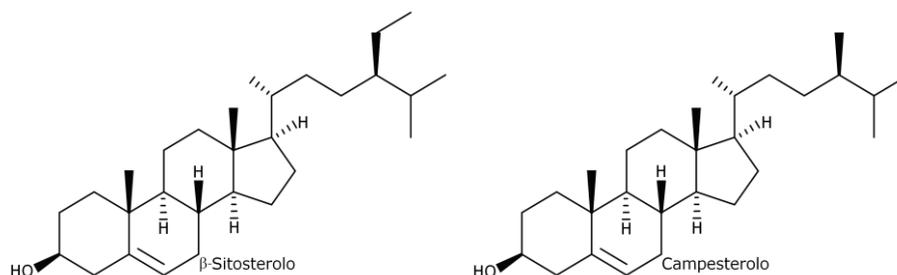


Figura 20. Struttura del β -sitosterolo e del campesterolo.

Tra gli steroli non colesterolici di interesse per lo studio delle malattie neurometaboliche c'è ovviamente anche il **colestano** (Figura 21) in quanto principale metabolita che si accumula specificatamente nella CTX.

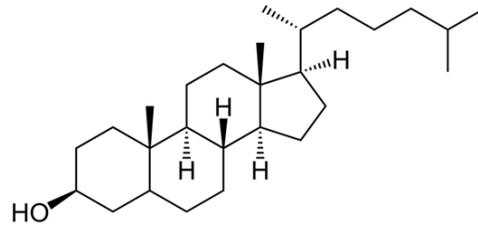


Figura 21. Struttura del colestano.

SCOPO DELLO STUDIO

Il lavoro di ricerca svolto durante i tre anni del mio dottorato ha riguardato l'applicazione delle tecniche di GC-MS per la valutazione *ex-vivo* del metabolismo del colesterolo in soggetti affetti da malattie neurometaboliche dovute a difetti nella sintesi degli acidi biliari.

Un primo studio ha riguardato la xantomatosi cerebrotendinea (CTX) ed era inserito nell'ambito di un più ampio progetto di ricerca promosso dal Centro di Neurologia e Malattie Neurometaboliche dell'Università degli Studi di Siena. L'obiettivo finale di tale progetto sarebbe la creazione di un *database* nazionale sulla CTX che raccolga un elevato numero di casi con i relativi dati clinici, biochimici, neurofisiologici e di *neuroimaging*. Sebbene sia nota da quasi 80 anni e trattata da più di 40, la maggior parte delle attuali conoscenze sulla xantomatosi cerebrotendinea derivano, infatti, principalmente da singoli casi report, mentre assai scarsi sono studi di *follow-up* condotti su un più ampio numero di soggetti. La raccolta di dati su popolazioni più rappresentative risulta quindi necessaria per consolidare un *background* di conoscenze il più possibile dettagliato sui vari aspetti della patologia, sul suo decorso e sulla sua terapia. Dall'altra parte occorre anche portare alla luce alcune problematiche legate alla terapia sostitutiva con acidi biliari rimaste finora poco indagate. In particolare la presenza di soggetti CTX che mostrano un lento ma progressivo peggioramento delle funzioni cerebrali nonostante la continuativa assunzione di CDCA deve essere ulteriormente approfondita; occorre infatti chiarire se il fallimento terapeutico debba essere attribuito ad una scarsa (o minore) efficacia del trattamento nel ridurre i livelli plasmatici di colestano ed ossisteroli, oppure e se tale situazione sia imputabile ad altri fattori che debbono ancora essere identificati. Nel corso degli anni il nostro laboratorio ha accumulato un buon numero di campioni plasma di diversi soggetti CTX, per il routinario *follow-up* dei valori plasmatici di colestano. Lo scopo che ci siamo prefissi per questo primo progetto di ricerca è stato dunque quello di valutare, mediante analisi GC-MS di tali campioni di plasma, i livelli sierici dei principali *markers* del metabolismo di colesterolo ed acidi biliari al fine di: 1) raccogliere i principali dati biochimici circa le alterazioni del metabolismo del colesterolo tipiche della patologia; 2) verificare l'efficacia a lungo termine della terapia sostitutiva con BA ed i suoi effetti sui principali processi metabolici del colesterolo; 3) individuare correlazioni tra i

principali *markers* metabolici del colesterolo e tra questi e la situazione clinica dei pazienti, a fini diagnostici, prognostici e di ricerca di base.

Il secondo studio di cui mi sono occupato durante il dottorato ha invece riguardato un'altra patologia neurometabolica legata a difetti negli enzimi della sintesi degli acidi biliari, la paraparesi spastica di tipo 5 (SPG5), ed è stato condotto sempre in collaborazione con il Centro di Neurologia e Malattie Neurometaboliche dell'Università di Siena. La SPG5 è una patologia ancora poco nota, di cui è stato possibile identificare la causa genetica solo in tempi relativamente recenti. Conseguentemente, a parte il marcato accumulo di 27-idrossicolesterolo (27-OHC) e 25-idrossicolesterolo (25-OHC), non sono ancora note tutte le possibili alterazioni del metabolismo del colesterolo nei soggetti affetti da questa malattia genetica, così come non è ancora stato possibile verificare l'efficacia di trattamenti farmacologici per il contenimento e/o miglioramento dei sintomi neurologici. Data la scarsa prevalenza di questa specifica forma di paraparesi ereditaria, al momento il nostro laboratorio ha potuto esaminare solo una coppia di fratelli affetti da SPG5, come soggetti probandi di un preliminare studio di ricerca. Lo scopo che ci siamo prefissi per questo secondo progetto di studio è stato dunque quello di valutare, sempre mediante analisi GC-MS dei *markers* metabolici di colesterolo ed acidi biliari: 1) l'efficacia di diversi farmaci ipocolesterolemizzanti nel ridurre i livelli plasmatici di 27-OHC e 25-OHC e nel migliorare i sintomi neurologici della malattia; 2) la presenza di eventuali altre alterazioni del metabolismo del colesterolo correlate all'accumulo di questi ossisteroli.

Il fine ultimo di questa ricerca preliminare sarebbe quello di avviare un più ampio ciclo di studi indirizzati, da una parte alla comprensione dei meccanismi molecolari della patologia e dall'altra all'identificazione di una efficace strategia terapeutica.

Sia la CTX che la SPG5 sono malattie neurometaboliche connesse ad uno sbilanciamento dei livelli di steroli ed ossisteroli circolanti. Poiché studi recenti hanno mostrato come livelli alterati di colesterolo ed ossisteroli possano correlarsi anche con lo sviluppo di altre malattie neurodegenerative (sindrome di Alzheimer), lo studio di queste malattie neurometaboliche può, nel complesso, rappresentare una promettente area di ricerca per una maggiore comprensione del ruolo del metabolismo degli steroli nel mantenimento dell'omeostasi del tessuto cerebrale.

MATERIALI E METODI

Solventi e Reagenti

I solventi ed i reagenti utilizzati per l'estrazione e per il dosaggio degli steroli sono stati i seguenti:

- acetonitrile, acetato d'etile, acido acetico, diclorometano, esano, etanolo, etere di petrolio, metanolo, sodio cloruro, toluene, triclorometano, trietilammina, acquistati da Merck (Darmstadt, Germania);
- butilidrossitoluene, 2,3,4,5,6-pentafluorobenzoilcloruro, piperidina, sodio idrossido, trimetilsililimidazolo, acquistati da Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA).
- Colonnine per SPE in silice (Supelclean LC-Si da 1 ml), acquistate dalla Supelco Inc. (Bellefonte, PA, USA)
- Total cholesterol assay kit (colorimetric) acquistato da Cell Biolabs Inc. (San Diego, CA, USA).

Tutti i solventi ed i reagenti utilizzati erano di grado analitico.

Standard

Standard interni: tutti gli steroli deuterati utilizzati come standard interni (colestano deuterato, 27-idrossicolesterolo deuterato e latosterolo deuterato) sono stati sintetizzati dal nostro laboratorio. Per il 27-idrossicolesterolo sono stati prodotti due diversi *batch*: uno con 4 e uno con 9 atomi di deuterio (questo perché le condizioni sperimentali per la sintesi di tale composto comportavano l'aggiunta di atomi di deuterio da 4 a 9) e sono stati utilizzati entrambi nel corso dello studio.

Il colestano è stato acquistato da Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA), mentre il 19-idrossicolesterolo è stato ottenuto da Steraloids (Newport, RI, USA).

Steroli standard: Colestano, latosterolo, campesterolo, β -sitosterolo e 25-idrossicolesterolo sono stati acquistati da Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA), mentre 7 α -idrossicolest-4-en-3-one, 27-idrossicolesterolo e 24-(S)-idrossicolesterolo sono stati procurati da Steraloids (Newport, RI, USA).

Tutti gli standard sono stati preparati in soluzione concentrata (0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), utilizzando come solvente acetato di etile con aggiunta di BHT (concentrazione

finale 50 µg/ml) in qualità di antiossidante. Da queste soluzioni stock sono state poi preparate opportune soluzioni diluite. Tutte le soluzioni sono state conservate in freezer ad una temperatura di -40°C.

Strumenti

Per l'estrazione ed il dosaggio dei diversi steroli ed ossisteroli plasmatici sono stati utilizzati i seguenti strumenti:

- Bilancia analitica *Crystal 100* (Gibertini, Novate milanese, Italia)
- Centrifuga da banco (*Centrifuge 4225*)
- Detector UV per hplc *Intelligent UV/VIS Detector* (Jasco Europe, Milano, Italia)
- Elettrobilancia automatica *Cahn 25* (Cahn, Paramount, CA, USA)
- Forno per colonna hplc (Jones Chromatography Inc., Columbus, OH, USA)
- Gascromatografo *Trace GC Ultra* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA)
- Integratore per hplc *C-R3A Chromatopac* (Shimadzu, Kyoto, Giappone)
- Miscelatore per hplc *Ternary Gradient Unit* (Jasco Europe, Milano, Italia)
- Pompa per hplc *Intelligent HPLC Pump* (Jasco Europe, Milano, Italia)
- Spettrometro di massa *Polaris Q* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA)
- *Visiprep SPE Vacuum Manifold* (Supelco Inc., Bellefonte, PA, USA)
- Vortex (Heidolph, Schwabach, Germania)
- Lettore di piastre *FLUOstar Omega* (BGM Labtech, Cary, NC, USA)

Popolazione in studio

PAZIENTI CTX: Lo studio sulla CTX ha preso in esame complessivamente 33 pazienti (14 maschi e 19 femmine) di età compresa tra i 13 e i 67 anni (al momento della prima visita presso il Centro di Neurologia e Malattie Neurometaboliche dell'Università di Siena) ed una bambina diagnosticata CTX all'età di 6 mesi (i cui dati saranno trattati a parte, data la particolarità del caso).

Per ogni soggetto erano disponibili una serie di campioni di plasma il cui prelievo è avvenuto in corrispondenza delle periodiche visite neurologiche effettuate presso il centro specialistico dell'Università di Siena. Di ogni soggetto erano inoltre noti i sintomi presentati al momento della diagnosi ed il grado di disabilità neurologica, valutato mediante le scale EDSS (*Expanded Disability Status Scale*) [Kurtzke J.F., 1983] ed RS (*Ranking Scale*) [van Swieten J.C. et al., 1988]. I soggetti nei quali non si sono riscontrate variazioni di questi indici sono stati considerati "stabili", mentre quelli che hanno presentato un incremento di uno di questi indici sono stati

considerati “peggioranti”. Poiché lo studio è stato in gran parte retrospettivo (e non pianificato a priori), non per tutti i pazienti è stato possibile avere prelievi di plasma per ciascuno dei periodi di follow-up considerati: alcuni soggetti (n = 19) sono stati seguiti dal momento della diagnosi (in assenza di qualunque trattamento) e poi a tempi successivi dall’inizio della somministrazione di CDCA 750 mg/d, mentre altri pazienti (n = 14) sono stati reclutati mentre la terapia sostitutiva con acidi biliari era già in corso (da 1 ad oltre 10 anni di trattamento). Per valutare le variazioni del metabolismo del colesterolo prima e durante la terapia sostitutiva con acidi biliari i diversi campioni di plasma sono stati suddivisi in cinque gruppi, sulla base del tempo trascorso dall’inizio dell’assunzione giornaliera di CDCA: t₀ (basale), t₁ (da 0 a 1,5 anni di terapia), t₂ (da 1,5 a 3 anni) di terapia, t₃ (da 3 a 5 anni di terapia), t₄ (da 5-10 anni di terapia), t₅ (oltre 10 anni di terapia). Inoltre, per verificare la presenza di correlazioni tra i *markers* plasmatici del metabolismo del colesterolo, lo stato clinico e il decorso della patologia, per ognuno dei periodi di follow-up sono stati confrontati i valori dei pazienti rimasti stabili con quelli che invece hanno mostrato un progressivo peggioramento. È stata altresì indagata la presenza di differenze significative nei livelli di questi *markers* sulla base dei sintomi neurologici presentati dai pazienti al momento della diagnosi.

PAZIENTI SPG5: Lo studio sulla SPG5 ha preso invece in esame, come soggetti probandi, una coppia di fratelli (Pz.1 femmina e Pz.2 maschio) di 29 e 24 anni di età (rispettivamente). Entrambi i soggetti hanno subito un prelievo di plasma in assenza di qualunque trattamento farmacologico. In seguito il Pz.1 ha seguito una terapia a base di simvastatina (inibitore della sintesi di colesterolo) con la successiva aggiunta di ezetimibe (inibitore dell’assorbimento di colesterolo). Il Pz.2, invece, dopo un iniziale periodo di assenza di trattamento (a causa di una reazione avversa alla statina), ha iniziato un trattamento a base di solo ezetimibe. La simvastatina è stata somministrata a differenti dosi (20, 40 e 60 mg/d), mentre la dose di ezetimibe è rimasta costante (10 mg/d). I pazienti sono stati seguiti per oltre un anno, con periodici prelievi di plasma ed aggiustamenti del trattamento farmacologico.

PAZIENTI AD: Infine sono stati analizzati anche 15 soggetti con AD conclamato (12 femmine e 3 maschi, età compresa tra 54 e 95 anni), per avere un parametro di confronto circa le alterazioni dei *markers* del metabolismo del colesterolo in soggetti affetti da malattie neurodegenerative di tipo prevalentemente sporadico.

Dosaggio del colestano in plasma in GC-MS

Il dosaggio di colestano è stato svolto in cinque fasi: saponificazione, estrazione, derivatizzazione, separazione HPLC e analisi in GC-MS.

1. SAPONIFICAZIONE

Aliquote di 200 µl di plasma per ogni campione sono state trasferite in *vials* di vetro da 6 ml, nelle quali era stato precedentemente aggiunto 1 µg di colestano deuterato, in qualità di standard interno. Dopo aver diluito i campioni con 1 ml di NaOH 1N in etanolo al 90%, le *vials* sono state tappate con chiusure ermetiche dotate di setto in butile/ptfe e quindi insufflate con azoto puro per eliminare l'ossigeno atmosferico ed evitare l'ossidazione degli steroli. I campioni sono stati quindi saponificati ponendoli sotto agitazione in bagnetto termostato a 60°C per 90 min, al fine di liberare il colestano esterificato. Al termine della saponificazione i campioni sono stati lasciati raffreddare fino a temperatura ambiente.

2. ESTRAZIONE

I campioni saponificati sono stati diluiti con 1 ml di soluzione fisiologica (0,9% NaCl) e successivamente si è proceduto all'estrazione. Gli steroli plasmatici totali sono stati estratti mediante l'aggiunta di 2 ml di etere di petrolio seguita dall'agitazione su *vortex* e quindi dalla raccolta della fase organica (tale procedura è stata ripetuta per 2 volte). L'estratto lipidico ottenuto è stato quindi posto sotto flusso di azoto fino alla completa evaporazione del solvente.

3. DERIVATIZZAZIONE

Gli steroli estratti nella fase precedente sono stati derivatizzati con pentafluorobenzoilcloruro (PFB), per ottenere i corrispondenti PFB-derivati. La reazione è stata eseguita aggiungendo in sequenza ai campioni 100 µl di trietilammina 0,4% in diclorometano e 100 µl di pentafluorobenzoilcloruro 1% in diclorometano. Dopo aver agitato i campioni su *vortex*, la reazione è stata condotta al buio per 20 min. Al termine il solvente è stato evaporato sotto flusso d'azoto.

3. SEPARAZIONE HPLC

Poiché il colesterolo è presente nel plasma in quantità circa 1000 volte superiori rispetto al colestano, esso deve essere rimosso dai campioni prima che questi vengano analizzati in GC-MS. Per rimuovere il colesterolo dall'estratto lipidico è

stata quindi condotta una separazione hplc secondo il metodo descritto da Kuriyama M. e collaboratori [Kuriyama M. et al., 1991].

Il sistema HPLC impiegato per la cromatografia era costituito da *Intelligent HPLC Pump*, *Ternary Gradient Unit* e *Intelligent UV/VIS Detector* (Jasco Europe, Italia), un forno per riscaldamento della colonna cromatografica (Jones Chromatography, USA) ed un integratore *C-R3A Chromatopac* (Shimadzu, Giappone). La separazione è stata condotta su una colonna Inertsil[®] ODS-2 (4,6 mm x 150 mm) con precolonna (GL Sciences Inc., Giappone) mantenuta alla temperatura costante di 50°C, utilizzando come fase mobile una miscela di acetonitrile/acqua/acido acetico 100:3:0,2 (v:v:v), al flusso di 1 ml al minuto per tutta la durata della corsa cromatografica. I tempi di ritenzione dei PFB-derivati di colesterolo e colestano sono stati controllati mediante iniezione di standard puri (precedentemente derivatizzati). Per ogni campione, le frazioni corrispondenti ai picchi cromatografici di colesterolo-PFB e colestano-PFB sono state raccolte e poste sotto flusso di azoto fino a completa evaporazione del solvente.

4. ANALISI IN GC-MS

Le frazioni contenenti colestano-PFB sono state riprese in 25 µl di toluene ed aliquote di circa 1 µl sono state sottoposte all'analisi GC-MS. Al tal fine è stato utilizzato un gascromatografo *Trace-GC* (Thermo Fisher Scientific Inc.) interfacciato ad uno spettrometro di massa *Polaris Q* (Thermo Fisher Scientific Inc.) a trappola ionica (operante con 70 eV di energia elettronica, 0,1 mA di corrente di emissione, sorgente e transfer line alla temperatura di 250°C e 300°C, rispettivamente). Il campione è stato introdotto nello strumento mediante iniettore *PTV* in modalità *splitless* alla temperatura di 250°C. La separazione cromatografica è stata ottenuta utilizzando una colonna capillare HP-5MS (Agilent Technologies, USA) di 0,25 mm di diametro, 0,25 µm di spessore film, 30 m di lunghezza, operando con flusso costante del carrier elio di 1 ml/min per tutta l'analisi. La temperatura del forno è stata programmata da 180 a 300°C (25°C/min). L'acquisizione del cromatogramma è stata condotta in modalità TIC (*Total Ion Current*) ottenendo una scansione completa di tutti gli ioni di frammentazione compresi fra 200 e 450 m/z. L'analisi del tracciato e la determinazione delle aree dei picchi cromatografici è stata condotta focalizzando specifici ioni di interesse: m/z 215 e 427 per il colestano e m/z 219 e 431 per il colestano deuterato.

In figura 22 sono rappresentati gli spettri di massa esemplificativi dei PFB-derivati relativi a colestanolo e colestanolo deuterato. In figura 23 sono riportati esempi dei rispettivi tracciati cromatografici.

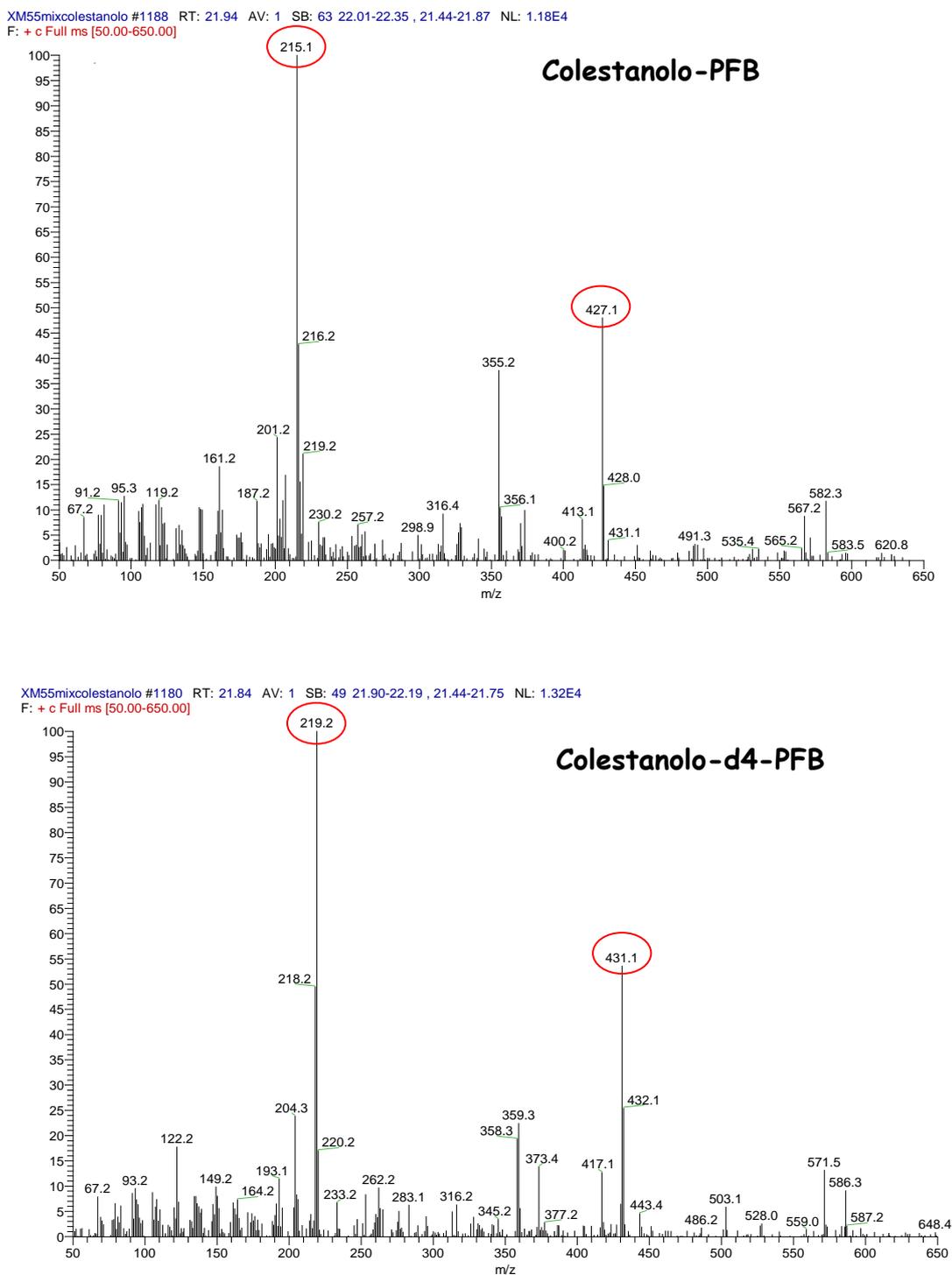


Figura 22. Spettri di massa di colestanolo-PFB e colestanolo deuterato-PFB.

RT: 12.23 - 22.62 SM: 7G

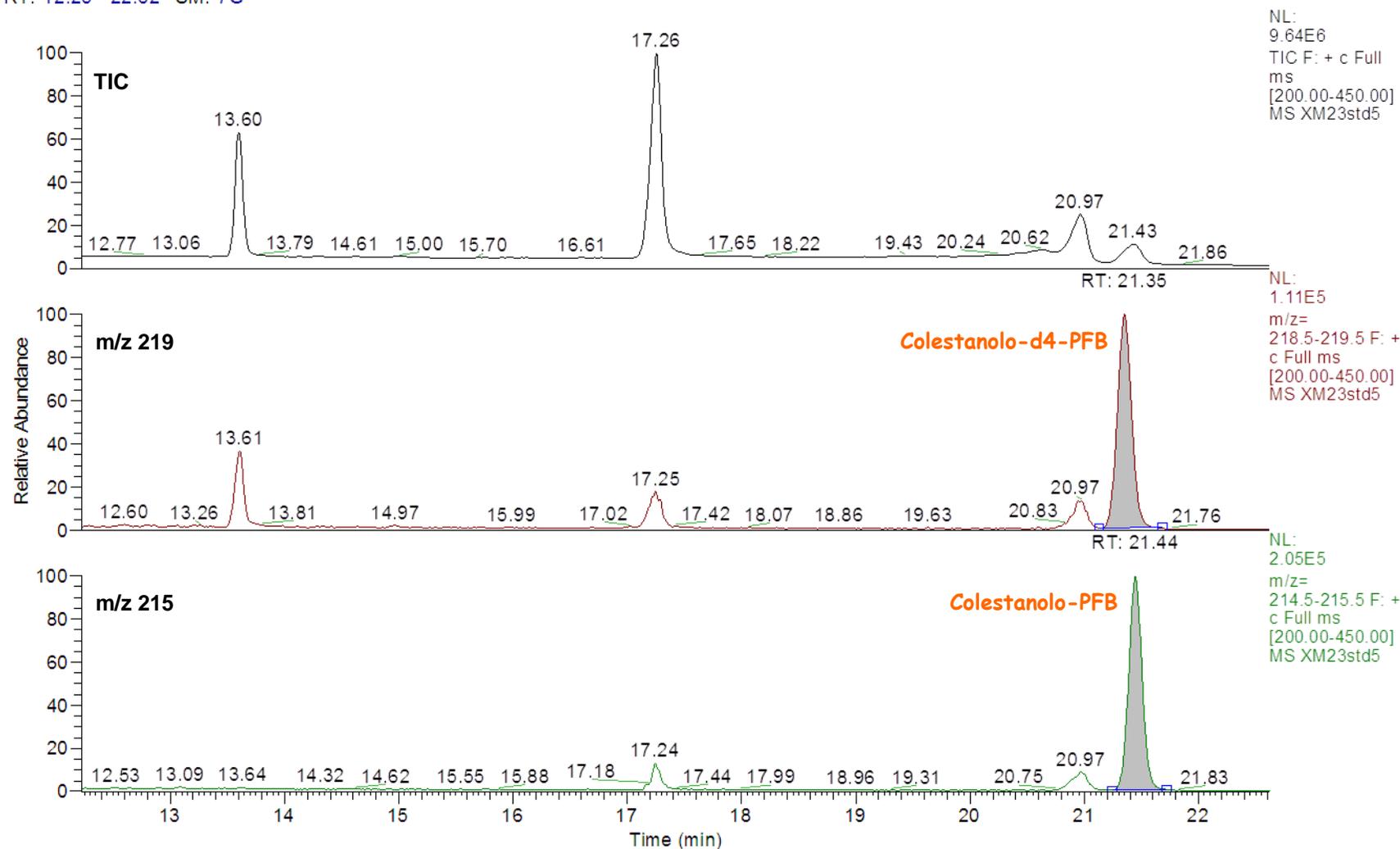


Figura 23. Dosaggio dei livelli plasmatici di coletanolo. Tracciato cromatografico.

La linearità del metodo utilizzato per il dosaggio del colestano è stata valutata mediante preparazione di curve standard ottenute aggiungendo a plasma di soggetti controllo ($V = 200 \mu\text{l}$) quantità fisse di standard interno (1 μg di colestano deuterato) e quantità crescenti di colestano standard (Tabella 1).

Ogni punto della curva standard è stato sottoposto alle stesse fasi di preparazione del campione precedentemente descritte. L'analisi in GC-MS di ogni campione standard ha permesso di ottenere, mediante regressione lineare, una retta di taratura in cui l'ascissa era rappresentata dal rapporto tra i ng di colestano ed i ng di standard interno, mentre l'ordinata era il rapporto tra le aree dei picchi corrispondenti all'analita ed allo standard interno nei rispettivi tempi di ritenzione (Figura 24). La concentrazione di colestano in ogni campione incognito dello studio è stata calcolata mediante la retta di regressione.

Plasma controllo	Colestano-d4	Colestano
200 μl	1000 ng	-
500 μl	1000 ng	200 ng
500 μl	1000 ng	400 ng
500 μl	1000 ng	1000 ng
500 μl	1000 ng	2000 ng

Tabella 1. Curva standard per il dosaggio del colestano.

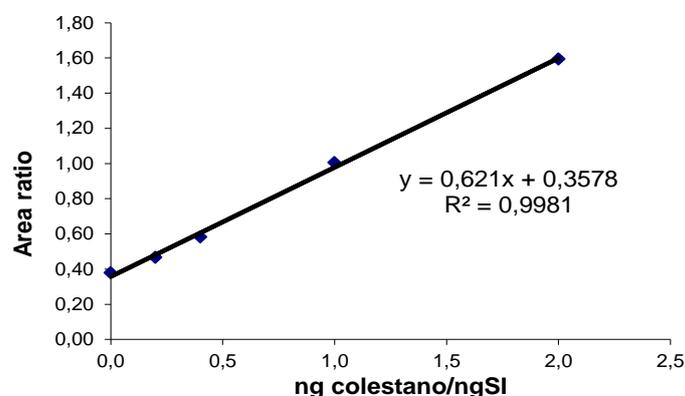


Figura 24. Curva standard per il dosaggio del colestano.

Dosaggio del 7 α -idrossicolest-4-en-3-one plasmatico in GC-MS

Il dosaggio di 7 α -idrossicolest-4-en-3-one è stato svolto in quattro fasi: estrazione, purificazione SPE, derivatizzazione ed analisi in GC-MS.

1. ESTRAZIONE

Aliquote di 500 μ l di plasma per ogni campione sono state poste in provette di vetro da 50 ml nelle quali erano stati precedentemente aggiunti 250 ng di 19-idrossicolesterolo, in qualità di standard interno. Dopo aver diluito i campioni con 2 ml di soluzione fisiologica, gli steroli liberi sono stati estratti (senza saponificazione), mediante l'aggiunta di 10 ml di triclorometano:metanolo 2:1 (v:v) e successiva agitazione su *vortex* per 30 sec. Le provette sono state quindi centrifugate per 10 min a 3000 rpm, al fine di ottenere una buona separazione tra la fase organica d'interesse e la fase acquosa. L'estratto lipidico è quindi stato raccolto e l'estrazione ripetuta una seconda volta. Al termine la fase organica contenente gli steroli è stata posta sotto flusso d'azoto fino a completa evaporazione del solvente.

2. PURIFICAZIONE SPE

L'estratto lipidico ricavato nella precedente fase è stato purificato mediante estrazione in fase solida (SPE, *Solid Phase Extraction*) al fine di rimuovere la maggior parte del colesterolo plasmatico che, essendo presente in quantità notevolmente più elevate rispetto all'analita di interesse, interferirebbe con l'analisi. La SPE è una procedura cromatografica che consente di rimuovere alcuni composti da una miscela, sfruttando le loro diverse affinità chimiche o fisiche per la fase stazionaria o per la fase mobile. Per la purificazione del 7 α -idrossicolest-4-en-3-one sono state utilizzate colonnine da SPE Supelclean LC-Si da 1 ml (Supelco Inc.) precedentemente condizionate mediante il passaggio attraverso la fase stazionaria di 1,8 ml dei seguenti solventi a polarità decrescente:

- metanolo
- acetato d'etile
- toluene:acetato d'etile 2:3 (v:v)
- toluene:acetato d'etile 9:1 (v:v)

Per favorire l'eluizione è stato utilizzato il VisiprepTM SPE Vacuum Manifold (Supelco Inc.).

Il campione lipidico è stato caricato sulla testa della colonna con 400 μ l di toluene:acetato d'etile 9:1 (v:v), ed in seguito eluito con solventi a polarità crescente. L'eluizione dell'estratto lipidico con 1,2 ml di toluene:acetato d'etile 9:1 (v:v) ha permesso la raccolta di una prima frazione contenente gli steroli meno polari, quale il colesterolo. La successiva eluizione con 1,2 ml di toluene:acetato d'etile 2:3 (v:v) ha permesso di raccogliere una seconda frazione contenente gli steroli idrossilati (più polari) tra cui il 19-idrossicolesterolo ed il 7 α -idrossicolest-4-en-3-one.

3. DERIVATIZZAZIONE

Il 19-idrossicolesterolo ed il 7 α -idrossicolest-4-en-3-one, purificati mediante SPE, sono stati derivatizzati utilizzando 50 μ l di una miscela composta da trimetilsililimidazolo:piperidina 1:1 (v:v) in modo da ottenere i rispettivi trimetilsilil eteri (TMS). La reazione è stata condotta al buio per 20 min e successivamente il sililante è stato evaporato sotto flusso d'azoto.

4. ANALISI IN GC-MS

I trimetilsilil eteri di analita e standard interno sono stati ripresi in 25 μ l di esano ed aliquote di circa 1 μ l sono state sottoposte all'analisi GC-MS. Al tal fine è stato utilizzato un gascromatografo *Trace-GC* (Thermo Fisher Scientific Inc.) interfacciato ad uno spettrometro di massa *Polaris Q* (Thermo Fisher Scientific Inc.) a trappola ionica (operante con 70 eV di energia elettronica, 0,1 mA di corrente di emissione, sorgente e transfer line alla temperatura di 250°C e 300°C, rispettivamente). Il campione è stato introdotto nello strumento mediante iniettore *PTV* in modalità *splitless* alla temperatura di 250°C. La separazione cromatografica è stata ottenuta utilizzando una colonna capillare HP-5MS (Agilent Technologies, USA) di 0,25 mm di diametro, 0,25 μ m di spessore film, 30 m di lunghezza, operando con flusso costante del carrier elio di 1 ml/min per tutta l'analisi. La temperatura del forno è stata programmata da 180°C a 300°C (15°C/min). L'acquisizione del cromatogramma è stata condotta in modalità TIC (*Total Ion Current*) ottenendo una scansione completa di tutti gli ioni di frammentazione compresi fra 340 e 480 m/z. L'analisi del tracciato e la determinazione delle aree dei picchi cromatografici è stata condotta focalizzando specifici ioni di interesse: m/z 353 e 456 per il 19-idrossicolesterolo e m/z 382 e 472 per il 7 α -idrossicolest-4-en-3-one.

In figura 25 sono rappresentati gli spettri di massa esemplificativi dei derivati TMS relativi a 19-idrossicolesterolo e 7 α -idrossicolest-4-en-3-one. Mentre in figura 26 sono osservabili esempi dei rispettivi tracciati cromatografici.

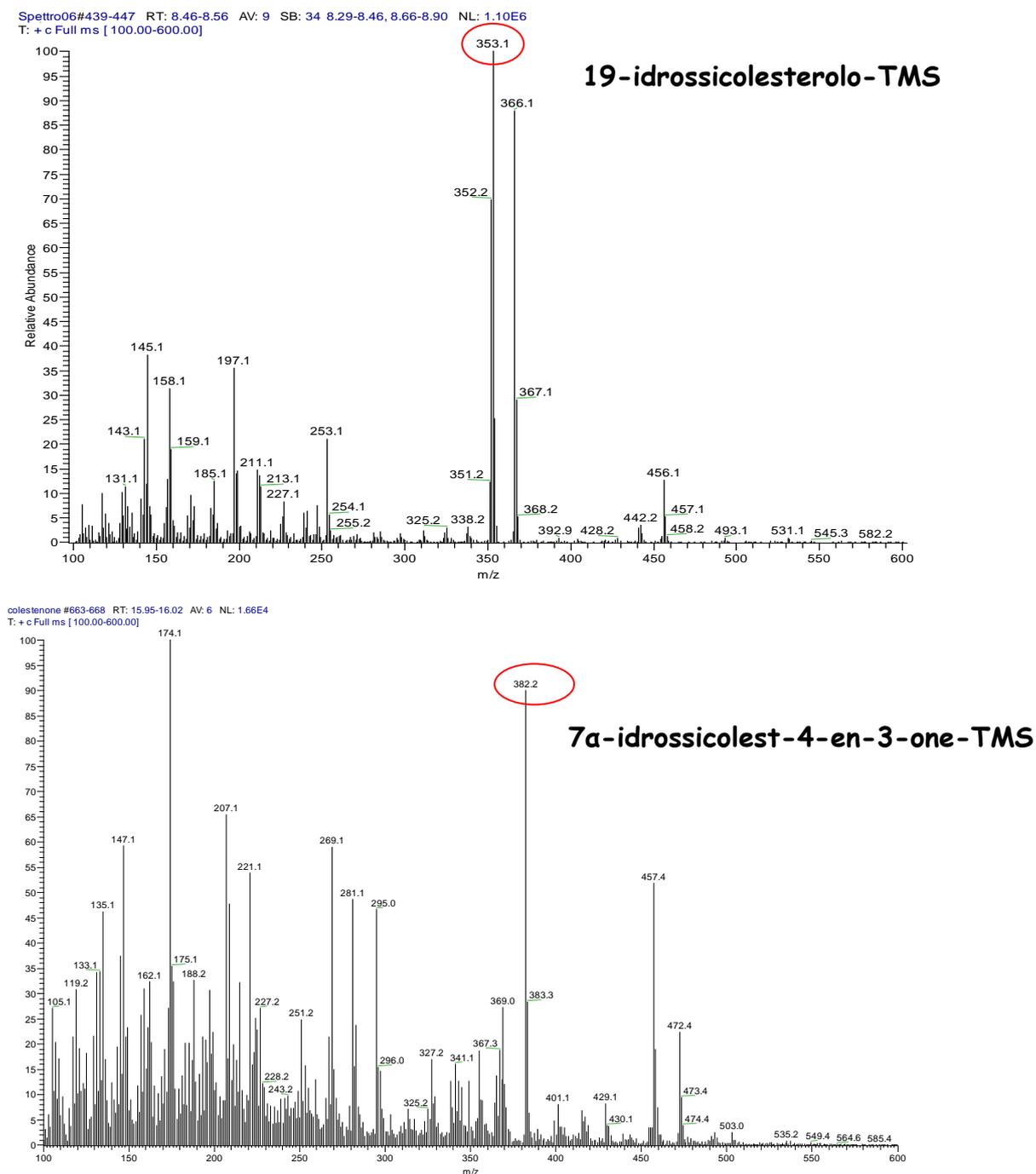


Figura 25. Spettri di massa di 19-idrossicolesterolo-TMS e 7 α -idrossicolest-4-en-3-one-TMS.

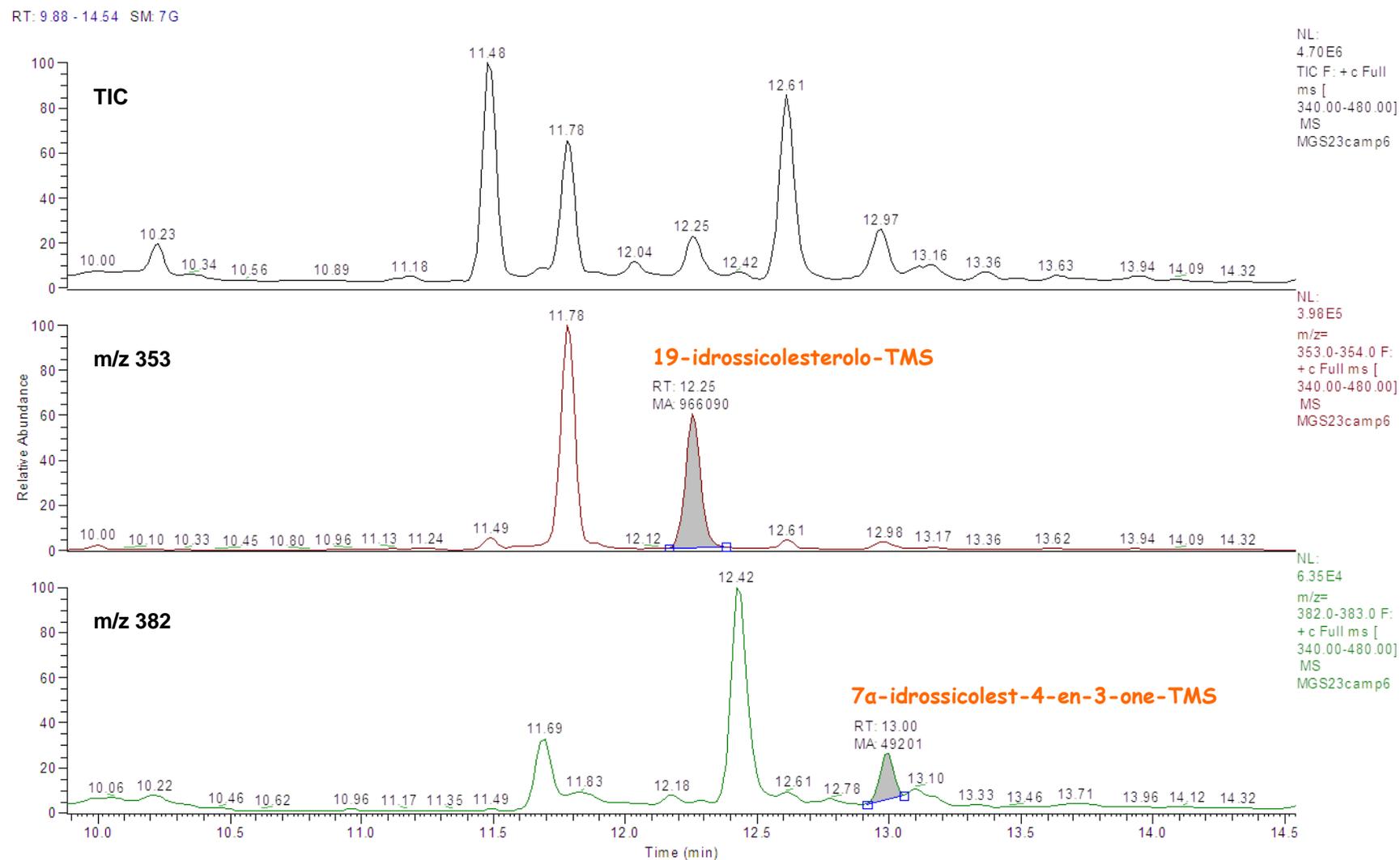


Figura 26. Dosaggio dei livelli plasmatici di 7α-idrossicolest-4-en-3-one. Tracciato cromatografico.

La linearità del metodo utilizzato per il dosaggio del 7 α -idrossicolest-4-en-3-one è stata valutata mediante preparazione di curve standard ottenute aggiungendo a plasma di soggetti controllo (V = 500 μ l) quantità fisse di standard interno (250 ng di 19-idrossicolesterolo) e quantità crescenti di 7 α -idrossicolest-4-en-3-one (Tabella 2). Ogni punto della curva standard è stato sottoposto alle stesse fasi di preparazione del campione precedentemente descritte. L'analisi in GC-MS di ogni campione standard ha permesso di ottenere, mediante regressione lineare, una retta di taratura in cui la variabile indipendente è rappresentata dal rapporto tra i ng di 7 α C4 ed i ng di standard interno, mentre la variabile dipendente è il rapporto tra le aree dei picchi corrispondenti allo sterolo e allo standard interno nei rispettivi tempi di ritenzione (Figura 27). La concentrazione di 7 α C4 in ogni campione incognito dello studio è stata calcolata mediante la retta di regressione.

Plasma controllo	19-idrossicolesterolo	7 α -idrossicolest-4-en-3-one
500 μ l	250 ng	-
500 μ l	250 ng	10 ng
500 μ l	250 ng	20 ng
500 μ l	250 ng	40 ng
500 μ l	250 ng	60 ng

Tabella 2. Curva standard per il dosaggio del 7 α -idrossicolest-4-en-3-one.

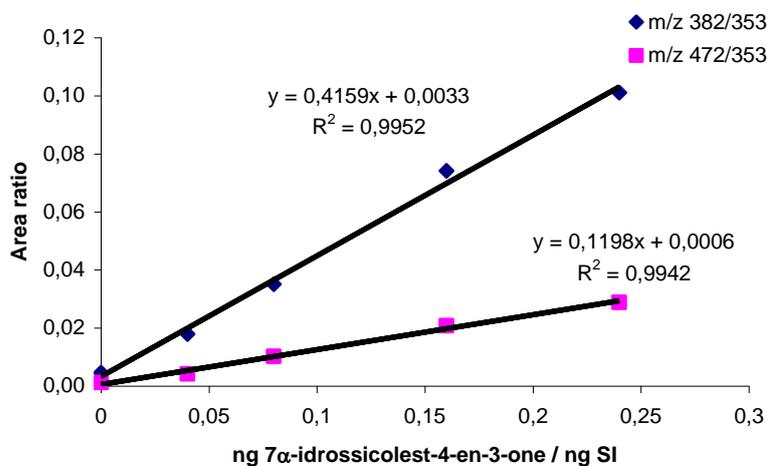


Figura 27. Curve standard per il dosaggio del 7 α -idrossicolest-4-en-3-one.

Dosaggio degli ossisteroli plasmatici in GC-MS

Il dosaggio degli ossisteroli (24-idrossicolesterolo, 25-idrossicolesterolo e 27-idrossicolesterolo) ha previsto cinque fasi: saponificazione, estrazione, purificazione SPE, derivatizzazione ed analisi in GC-MS.

1. SAPONIFICAZIONE

Aliquote di 200 µl di plasma per ogni campione sono state trasferite in *vials* di vetro da 6 ml, nelle quali erano stati precedentemente aggiunti 100 ng di 19-idrossicolesterolo e 100 ng di 27-idrossicolesterolo deuterato, in qualità di standard interni. Dopo aver diluito i campioni con 1 ml di NaOH 1N in etanolo al 90%, le *vials* sono state tappate con chiusure ermetiche dotate di setto in butile/ptfe e quindi insufflate con azoto puro per eliminare l'ossigeno atmosferico ed evitare l'ossidazione degli steroli. I campioni sono stati quindi saponificati ponendoli sotto agitazione in bagnetto termostato a 60°C per 90 min, al fine di liberare gli ossisteroli esterificati. Al termine i campioni sono stati lasciati raffreddare fino a temperatura ambiente.

2. ESTRAZIONE

I campioni saponificati sono stati diluiti con 1 ml di soluzione fisiologica (0,9% NaCl) e successivamente si è proceduto all'estrazione. Gli steroli plasmatici totali sono stati estratti mediante l'aggiunta di 2 ml di etere di petrolio seguita dall'agitazione su *vortex* e quindi dalla raccolta della fase organica (tale procedura è stata ripetuta per 2 volte). L'estratto lipidico ottenuto è stato quindi posto sotto flusso di azoto fino alla completa evaporazione del solvente.

3. PURIFICAZIONE SPE

L'estratto lipidico ottenuto nella fase precedente viene purificato mediante estrazione in fase solida (SPE, *Solid Phase Extraction*), allo scopo di separare gli ossisteroli dal colesterolo. La metodica di separazione è identica a quella utilizzata per la purificazione del 7 α -idrossicolest-4-en-3-one, precedentemente descritta. Si utilizzano anche in questo caso colonnine da SPE Supelclean LC-Si da 1 ml (Supelco Inc.), che vengono dapprima condizionate mediante il passaggio attraverso la fase stazionaria di 1,8 ml dei seguenti solventi a polarità decrescente: metanolo, acetato di etile, toluene:acetato di etile 2:3 (v:v) e toluene:acetato di etile 9:1 (v:v).

L'eluizione viene facilitata dalle condizioni di pressione negativa ottenute mediante il VisiprepTM SPE *Vacuum Manifold* (Supelco Inc.).

In seguito all'ambientamento della colonna il campione ottenuto nella fase di estrazione viene caricato disciolto in 400 ml di toluene:acetato di etile 9:1 (v:v) e successivamente eluito con solventi a polarità crescente. Per la raccolta degli steroli meno polari (colesterolo) il campione viene eluito con 1,2 ml di toluene:acetato di etile 9:1 (v:v); in seguito l'eluizione con 1,2 ml di toluene:acetato di etile 2:3 (v:v) permette la raccolta della frazione contenente gli ossisteroli

3. DERIVATIZZAZIONE

Gli ossisteroli, eluiti mediante SPE, sono stati derivatizzati utilizzando 50 µl di una miscela composta da trimetilsililimidazolo:piperidina 1:1 (v:v) in modo da ottenere i rispettivi trimetilsilil eteri (TMS). La reazione è stata condotta al buio per 20 min e successivamente il sililante è stato evaporato sotto flusso d'azoto.

4. ANALISI IN GC-MS

I trimetilsilil eteri degli ossisteroli sono stati ripresi in 25 µl di esano ed aliquote di circa 1 µl sono state sottoposte all'analisi GC-MS. Al tal fine è stato utilizzato un gascromatografo *Trace-GC* (Thermo Fisher Scientific Inc.) interfacciato ad uno spettrometro di massa *Polaris Q* (Thermo Fisher Scientific Inc.) a trappola ionica (operante con 70 eV di energia elettronica, 0,1 mA di corrente di emissione, sorgente e transfer line alla temperatura di 250°C e 300°C, rispettivamente). Il campione è stato introdotto nello strumento mediante iniettore *PTV* in modalità *splitless* alla temperatura di 250°C. La separazione cromatografica è stata ottenuta utilizzando una colonna capillare HP-5MS (Agilent Technologies, USA) di 0,25 mm di diametro, 0,25 µm di spessore film, 30 m di lunghezza, operando con flusso costante del carrier elio di 1 ml/min per tutta l'analisi. La temperatura del forno è stata programmata da 180°C a 300°C (10°C/min). L'acquisizione del cromatogramma è stata condotta in modalità TIC (*Total Ion Current*) ottenendo una scansione completa di tutti gli ioni di frammentazione compresi fra 340 e 480 m/z. L'analisi del tracciato e la determinazione delle aree dei picchi cromatografici è stata condotta focalizzando specifici ioni di interesse: m/z 353 per il 19-idrossicolesterolo, e 465 per il 27-idrossicolesterolo deuterato (rispettivamente per il d4 e per il d9), m/z 456 per il 25-idrossicolesterolo e per il 27-idrossicolesterolo, m/z 413 per il 24(S)-idrossicolesterolo.

Nelle figure 28-29 sono rappresentati gli spettri di massa esemplificativi dei derivati TMS relativi ai diversi ossisteroli. Mentre in figura 30 sono osservabili esempi dei rispettivi tracciati cromatografici.

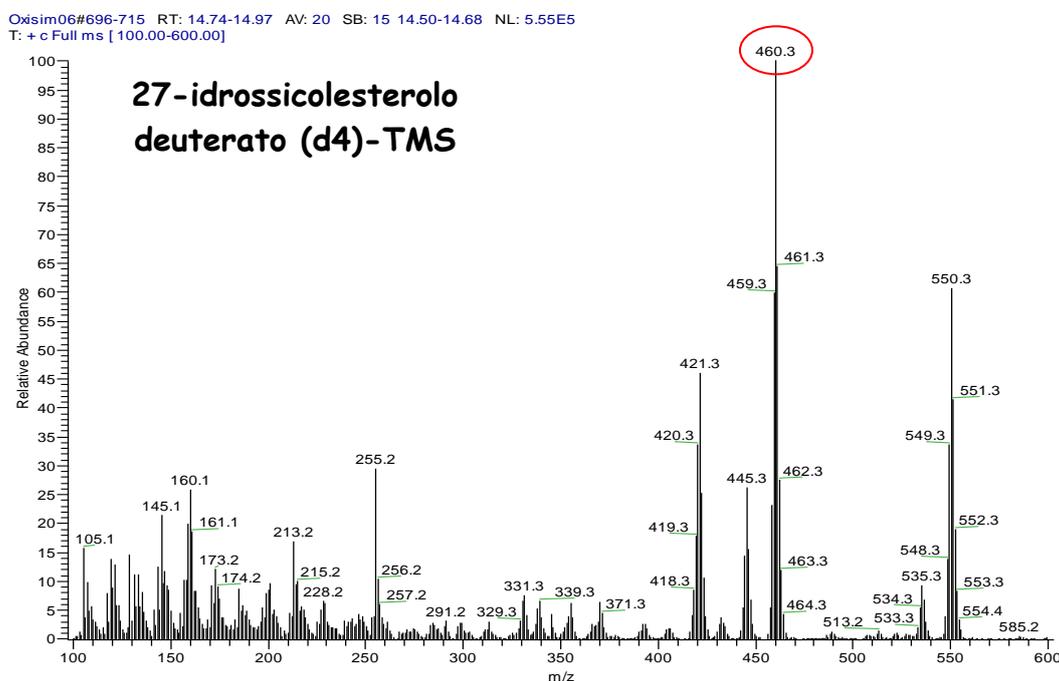
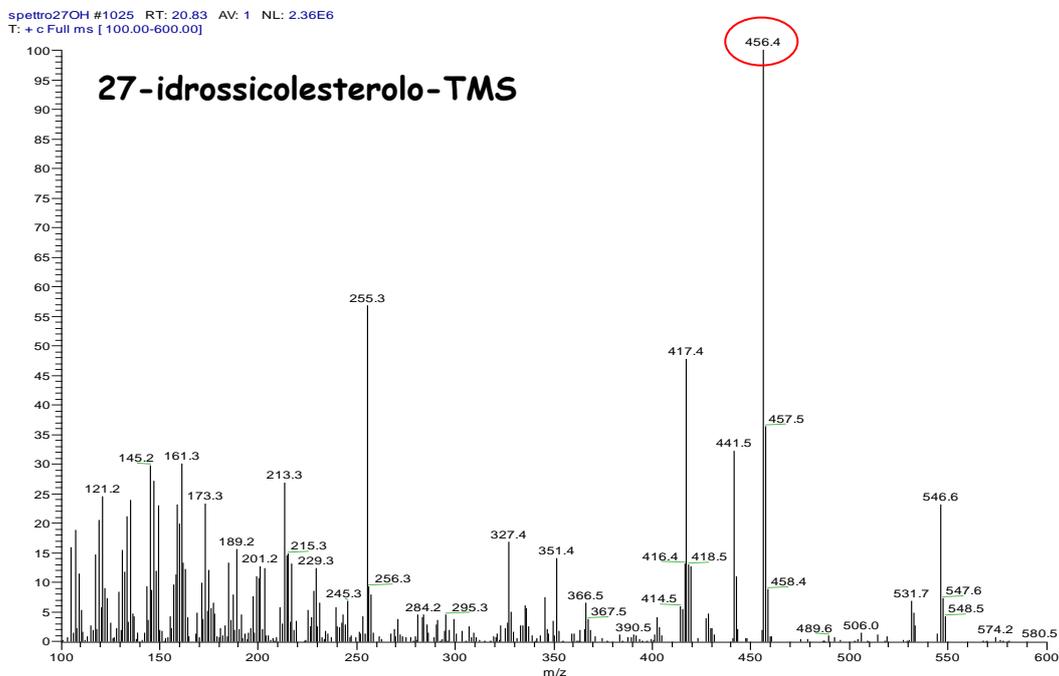
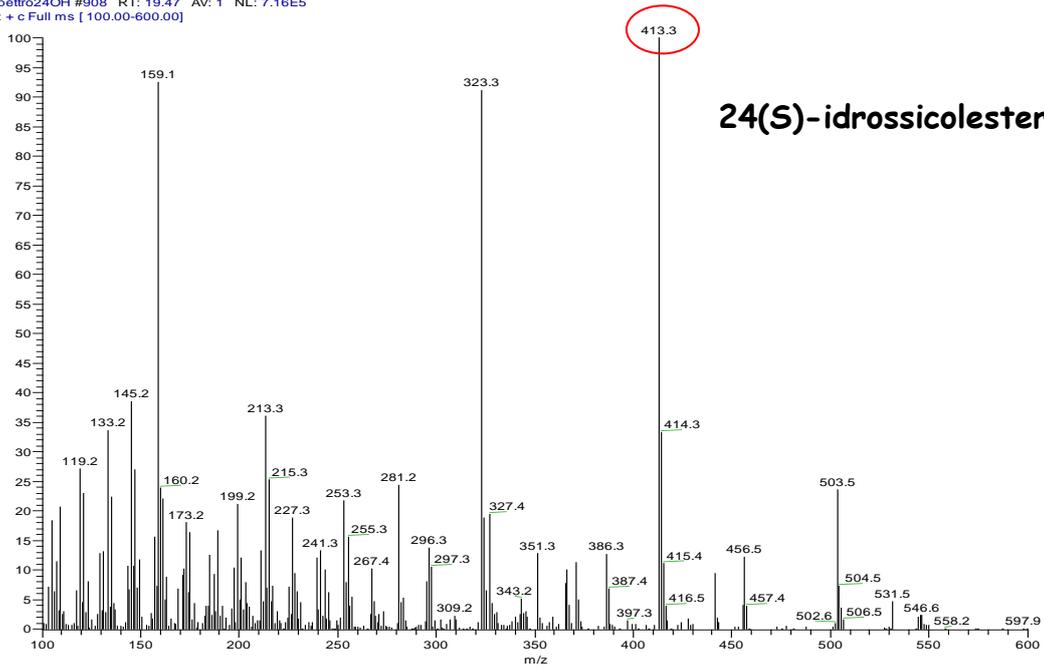


Figura 28. Spettri di massa di 27-idrossicolesterolo-TMS e 27-idrossicolesterolo deuterato-TMS

spettro24OH #908 RT: 19.47 AV: 1 NL: 7.16E5
T: + c Full ms [100.00-600.00]



25-OH_spettro #840 RT: 19.71 AV: 1 SB: 68 19.95-20.64, 19.21-19.56 NL: 1.00E5
T: + c Full ms [50.00-600.00]

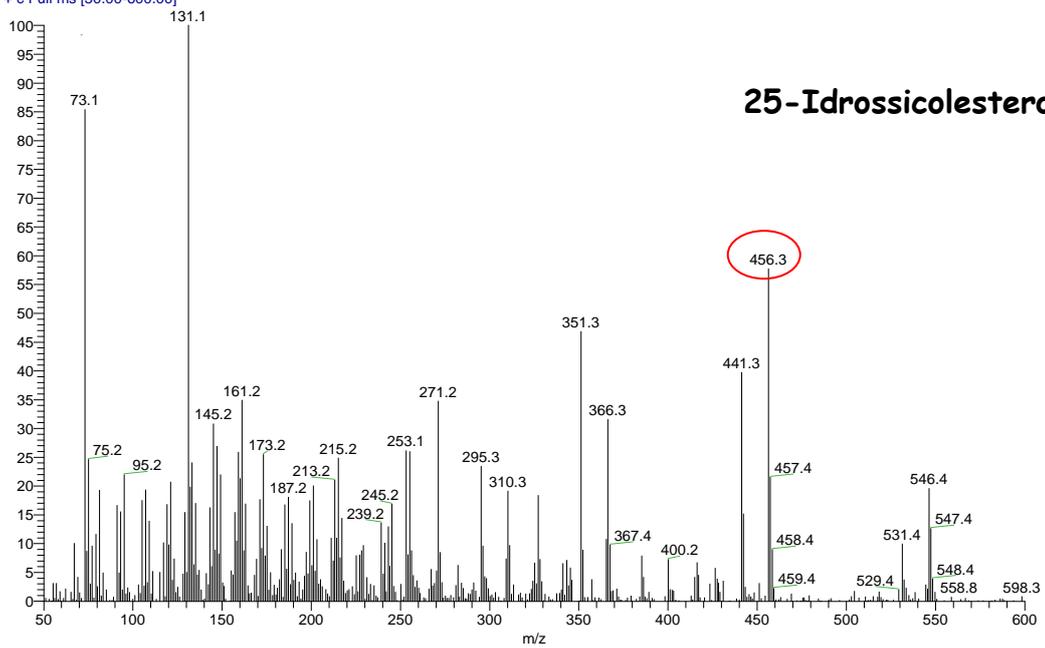


Figura 29. Spettri di massa di 24(S)-idrossicolesterolo-TMS e 25-idrossicolesterolo-TMS

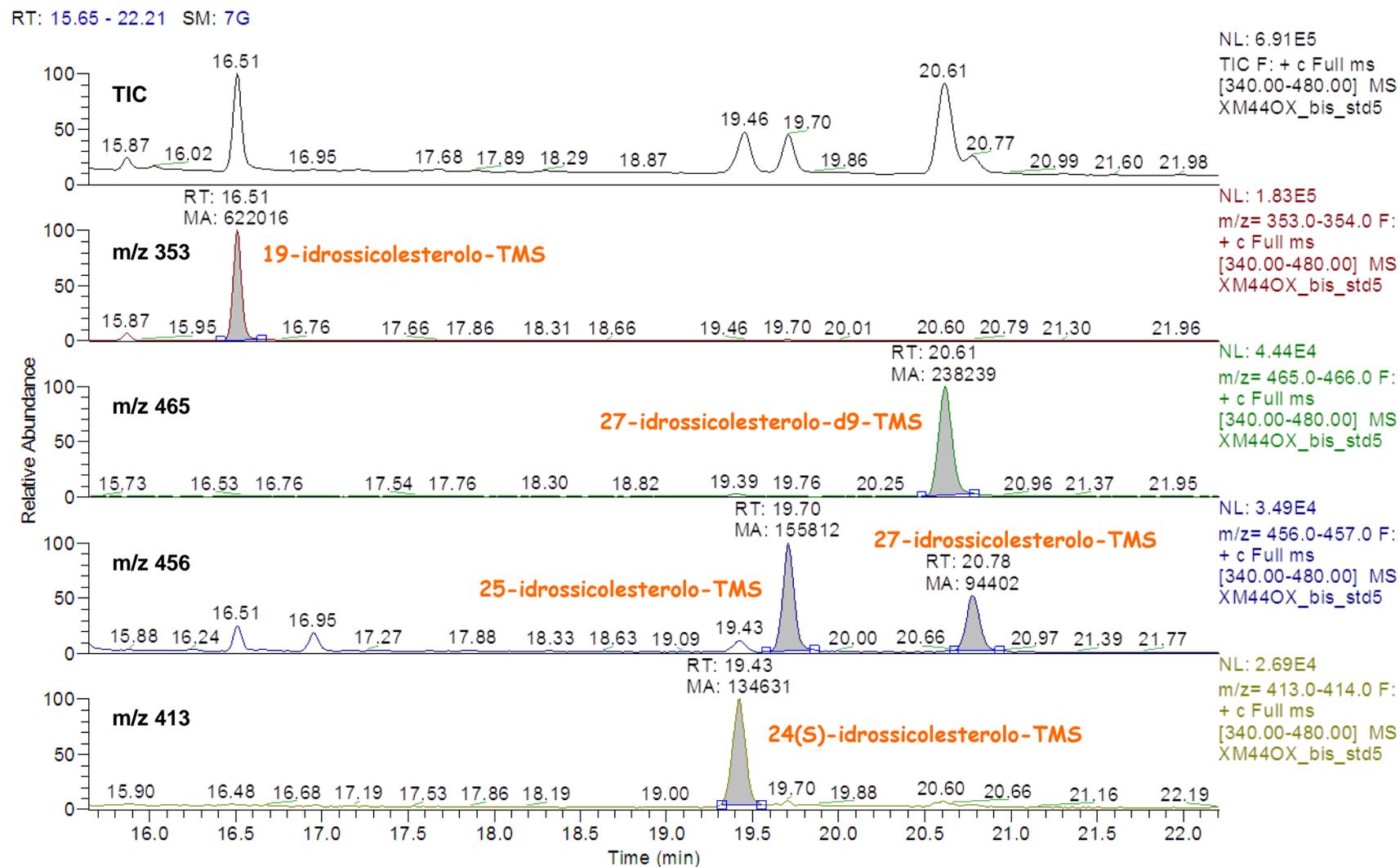


Figura 30. Dosaggio dei livelli plasmatici di ossisteroli. Tracciato cromatografico.

La linearità del metodo utilizzato per il dosaggio degli ossisteroli è stata valutata mediante preparazione di curve standard (estratte da plasma) ottenute aggiungendo a plasma di soggetti controllo ($V = 200 \mu\text{l}$) quantità fisse di standard interni (100 ng di 19-idrossicolesterolo e 100 ng di 27-idrossicolesterolo deuterato) e quantità crescenti di 24(S)-idrossicolesterolo, 27-idrossicolesterolo e 25-idrossicolesterolo (Tabella 3).

	Plasma	19-OH	27-OHd	24-OH	27-OH	25-OH
STD 1	200 μl	100 ng	100 ng	-	-	-
STD 2	200 μl	100 ng	100 ng	5 ng	5 ng	5 ng
STD 3	200 μl	100 ng	100 ng	10 ng	10 ng	10 ng
STD 4	200 μl	100 ng	100 ng	20 ng	20 ng	20 ng
STD 5	200 μl	100 ng	100 ng	50 ng	50 ng	50 ng

Tabella 3. Curve standard per il dosaggio degli ossisteroli.

Ogni punto della curva è stato sottoposto alle stesse fasi di preparazione del campione precedentemente descritte. L'analisi in GC-MS di ogni campione standard ha permesso di ottenere, mediante regressione lineare, tre rette di taratura in ognuna delle quali in ascissa è stato riportato il rapporto tra i ng di ossisterolo ed i ng di standard interno, mentre in ordinata è stato posto il rapporto tra le aree dei picchi corrispondenti agli ossisteroli ed agli standard interni, nei rispettivi tempi di ritenzione (Figura 31). La concentrazione degli ossisteroli in ogni campione incognito dello studio è stata calcolata mediante estrapolazione della retta di regressione.

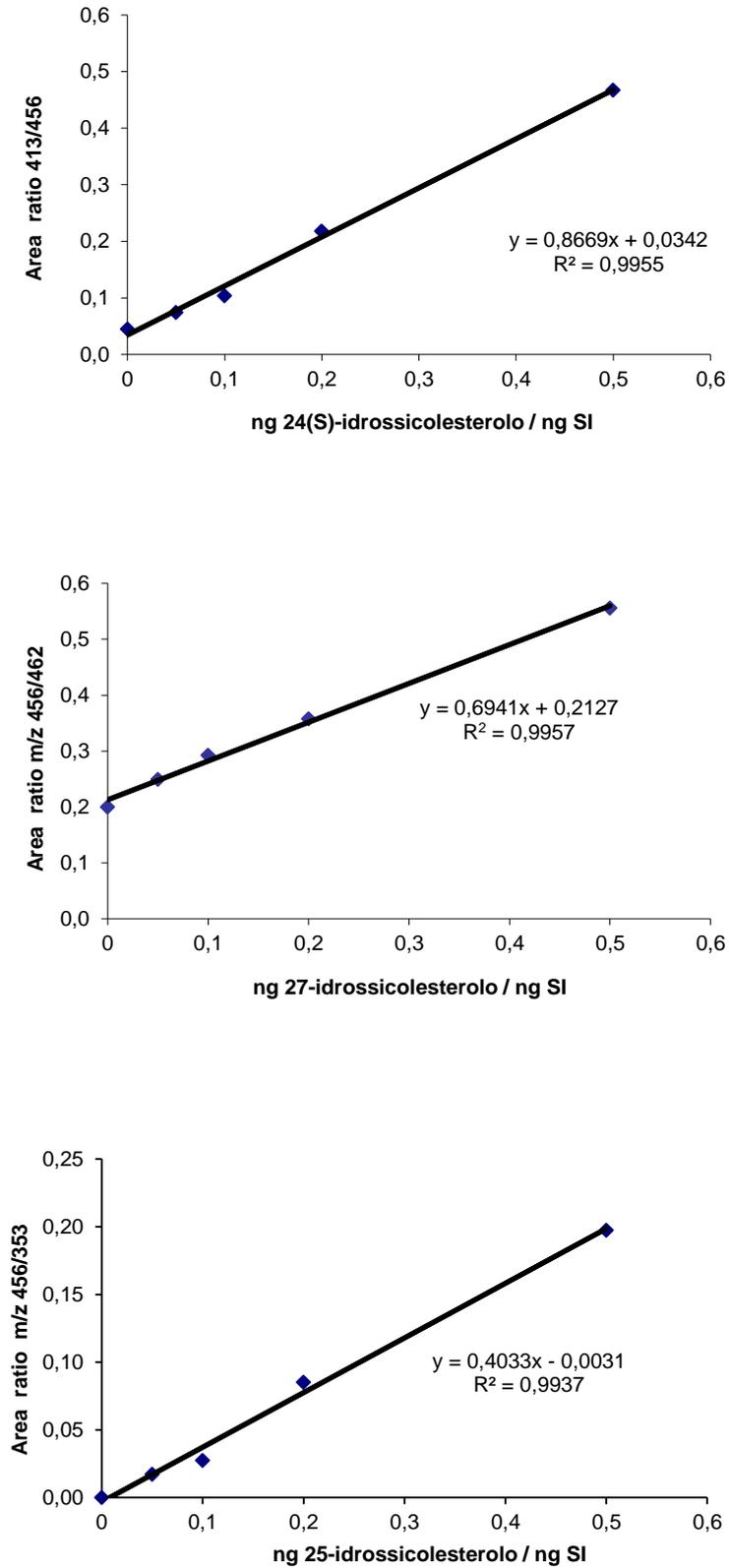


Figura 31. Curve standard per il dosaggio degli ossisteroli.

Dosaggio di latosterolo e fitosteroli plasmatici in GC-MS

Il dosaggio di latosterolo, campesterolo e β -sitosterolo è stato svolto in quattro fasi: saponificazione, estrazione, derivatizzazione ed analisi in GC-MS.

1. SAPONIFICAZIONE

Aliquote di 100 μ l di plasma per ogni campione sono state trasferite in vials di vetro da 6 ml, nelle quali erano stati precedentemente aggiunti 500 ng di colestano e 500 ng di latosterolo deuterato, in qualità di standard interni rispettivamente per i fitosteroli e per il latosterolo. Dopo aver diluito il campione con 1 ml di NaOH 1N in etanolo al 90%, le *vials* sono state tappate con chiusure ermetiche dotate di setto in butile/ptfe e quindi insufflate con azoto puro per eliminare l'ossigeno atmosferico ed evitare l'ossidazione degli steroli. I campioni sono stati quindi saponificati ponendoli sotto agitazione in bagnetto termostato a 60°C per 90 min, al fine di liberare gli steroli esterificati. Al termine i campioni sono stati lasciati raffreddare fino a temperatura ambiente.

2. ESTRAZIONE

I campioni saponificati sono stati diluiti con 1 ml di soluzione fisiologica (0,9% NaCl) e successivamente si è proceduto all'estrazione. Gli steroli sono stati estratti mediante l'aggiunta di 2 ml di etere di petrolio seguita dall'agitazione su vortex e quindi dalla raccolta della fase organica (tale procedura è stata ripetuta per 2 volte). L'estratto lipidico ottenuto è stato quindi posto sotto flusso di azoto fino alla completa evaporazione del solvente.

3. DERIVATIZZAZIONE

Gli steroli estratti sono stati derivatizzati utilizzando 50 μ l di una miscela composta da trimetilsililimidazolo:piperidina 1:1 (v:v) in modo da ottenere i rispettivi trimetilsilil eteri (TMS). La reazione è stata condotta al buio per 20 min e successivamente il sililante è stato evaporato sotto flusso d'azoto.

4. ANALISI IN GC-MS

I trimetilsilil eteri degli steroli sono stati ripresi in 50-100 μ l di esano ed aliquote di circa 1 μ l sono state sottoposte all'analisi GC-MS. Al tal fine è stato utilizzato un

gascromatografo *Trace-GC* (Thermo Fisher Scientific Inc.) interfacciato ad uno spettrometro di massa *Polaris Q* (Thermo Fisher Scientific Inc.) a trappola ionica (operante con 70 eV di energia elettronica, 0,1 mA di corrente di emissione, sorgente e transfer line alla temperatura di 250°C e 300°C, rispettivamente). Il campione è stato introdotto nello strumento mediante iniettore *PTV* in modalità *splitless* alla temperatura di 250°C. La separazione cromatografica è stata ottenuta utilizzando una colonna capillare HP-5MS (Agilent Technologies, USA) di 0,25 mm di diametro, 0,25 µm di spessore film, 30 m di lunghezza, operando con flusso costante del carrier elio di 1 ml/min per tutta l'analisi. La temperatura del forno è stata programmata da 180°C a 300°C (10°C/min). L'acquisizione del cromatogramma è stata condotta in modalità TIC (*Total Ion Current*) ottenendo una scansione completa di tutti gli ioni di frammentazione compresi fra 245 e 410 m/z. L'analisi del tracciato e la determinazione delle aree dei picchi cromatografici è stata condotta focalizzando specifici ioni di interesse: m/z 373 per il colestano, m/z 255 per il latosterolo, m/z 250 per il latosterolo deuterato, m/z 382 per il campesterolo e m/z 396 per il β-sitosterolo.

Nelle figure 32-34 sono rappresentati gli spettri di massa esemplificativi del colestano e dei derivati TMS relativi a latosterolo e fitosteroli. In figura 35 sono invece osservabili esempi dei rispettivi tracciati cromatografici.

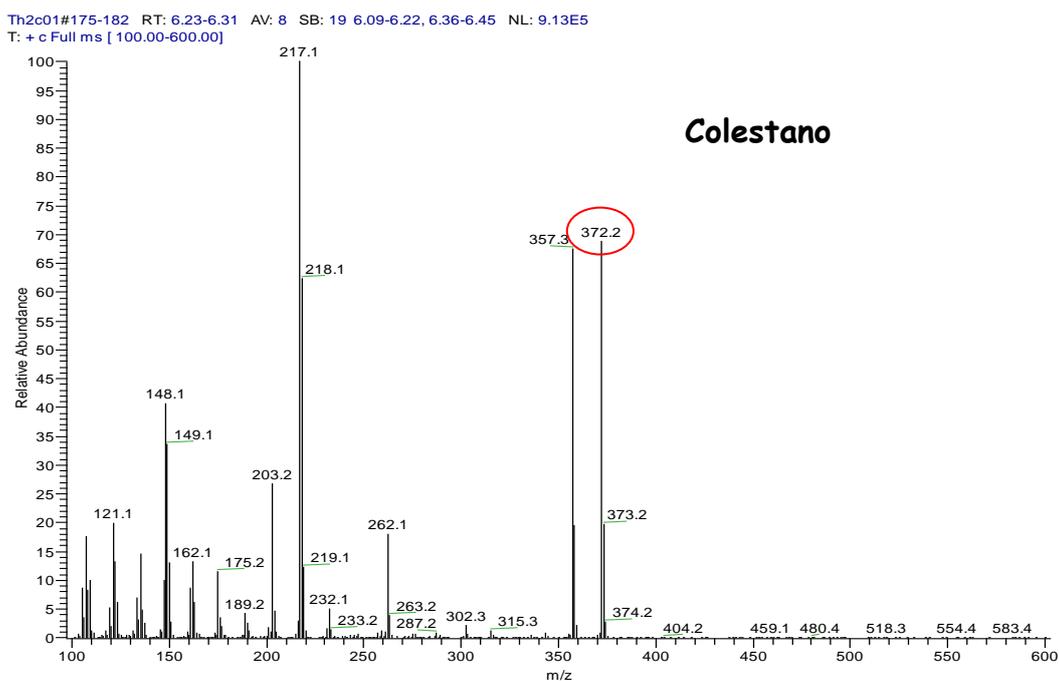
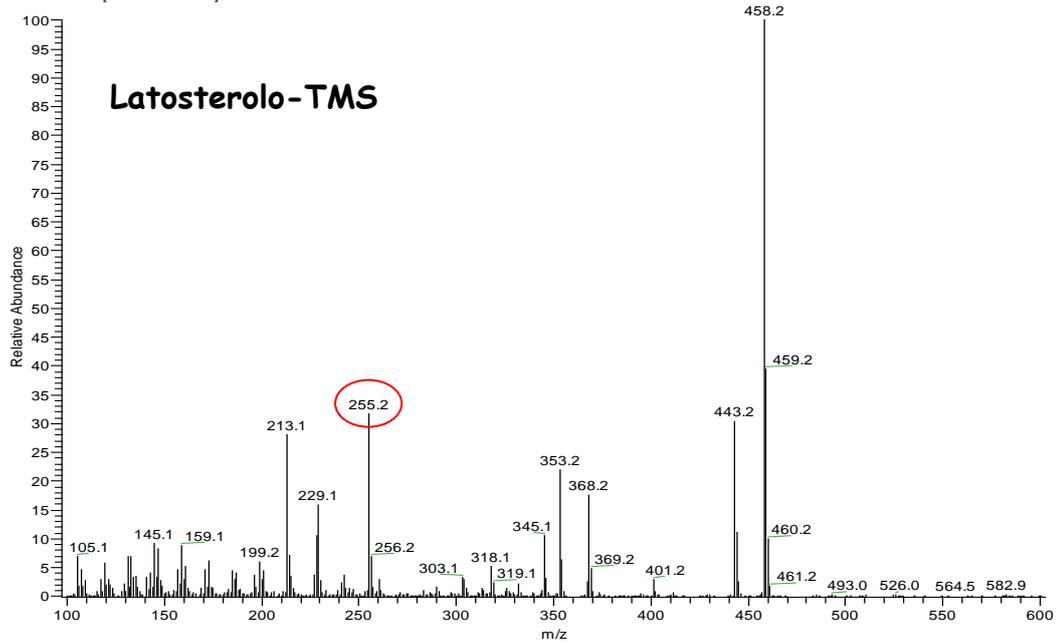


Figura 32. Spettro di massa del colestano.

Spettro04#451-463 RT: 8.59-8.74 AV: 13 SB: 13 8.88-9.03 NL: 1.53E6
T: + c Full ms [100.00-600.00]



Spettro05#449-459 RT: 8.58-8.70 AV: 11 SB: 25 8.32-8.44, 8.78-8.94 NL: 1.32E6
T: + c Full ms [100.00-600.00]

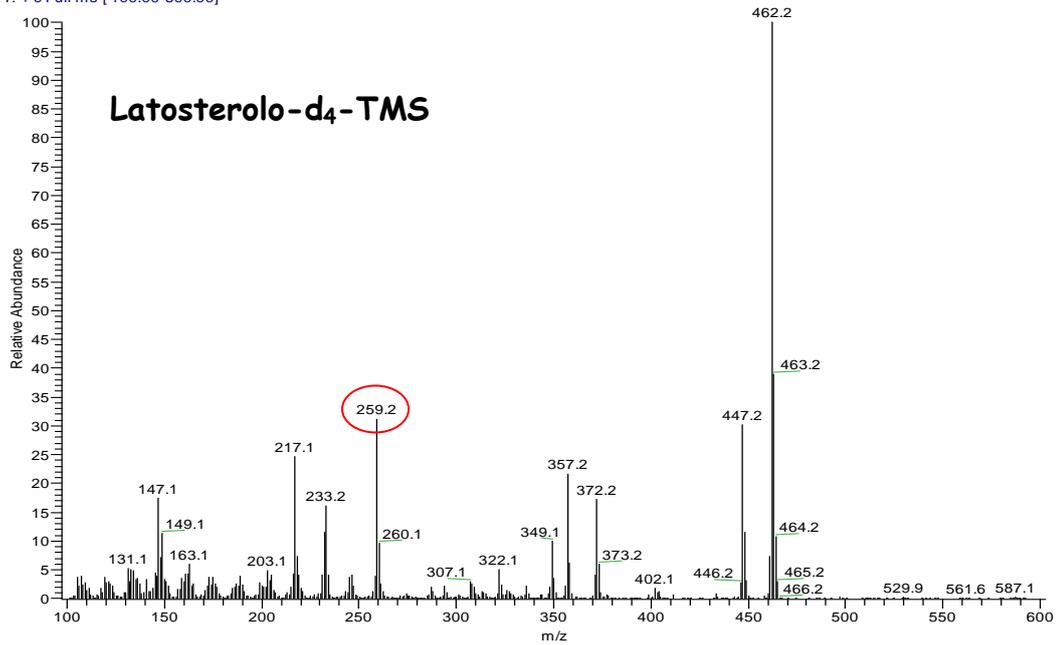
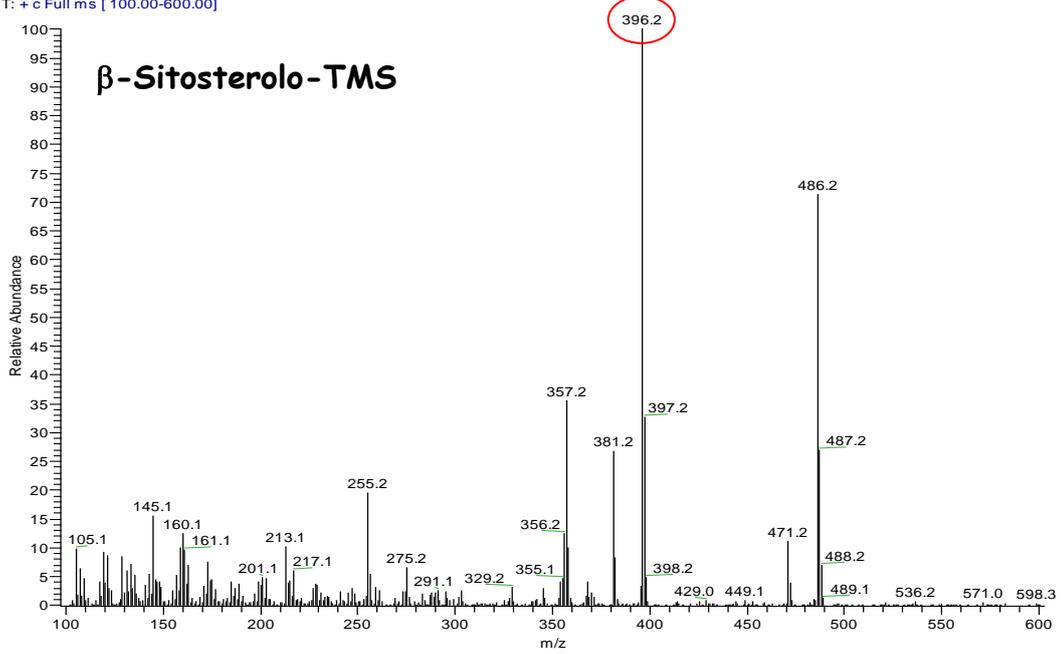


Figura 33. Spettri di massa di latosterolo-TMS e latosterolo deuterato-TMS.

Spettro03#560-573 RT: 9.95-10.11 AV: 14 SB: 10 9.78-9.83, 10.39-10.44 NL: 4.93E5
T: + c Full ms [100.00-600.00]



Spettro02#484-495 RT: 9.02-9.15 AV: 12 SB: 7 8.93-9.01 NL: 1.91E6
T: + c Full ms [100.00-600.00]

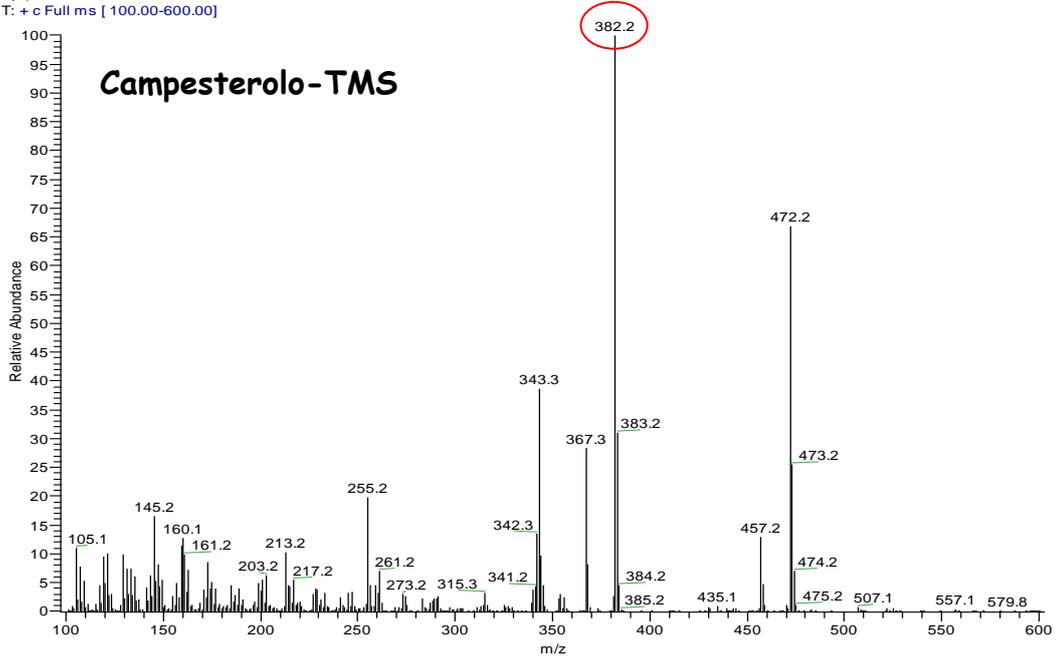


Figura 34. Spettri di massa di β -sitosterolo-TMS e campesterolo-TMS.

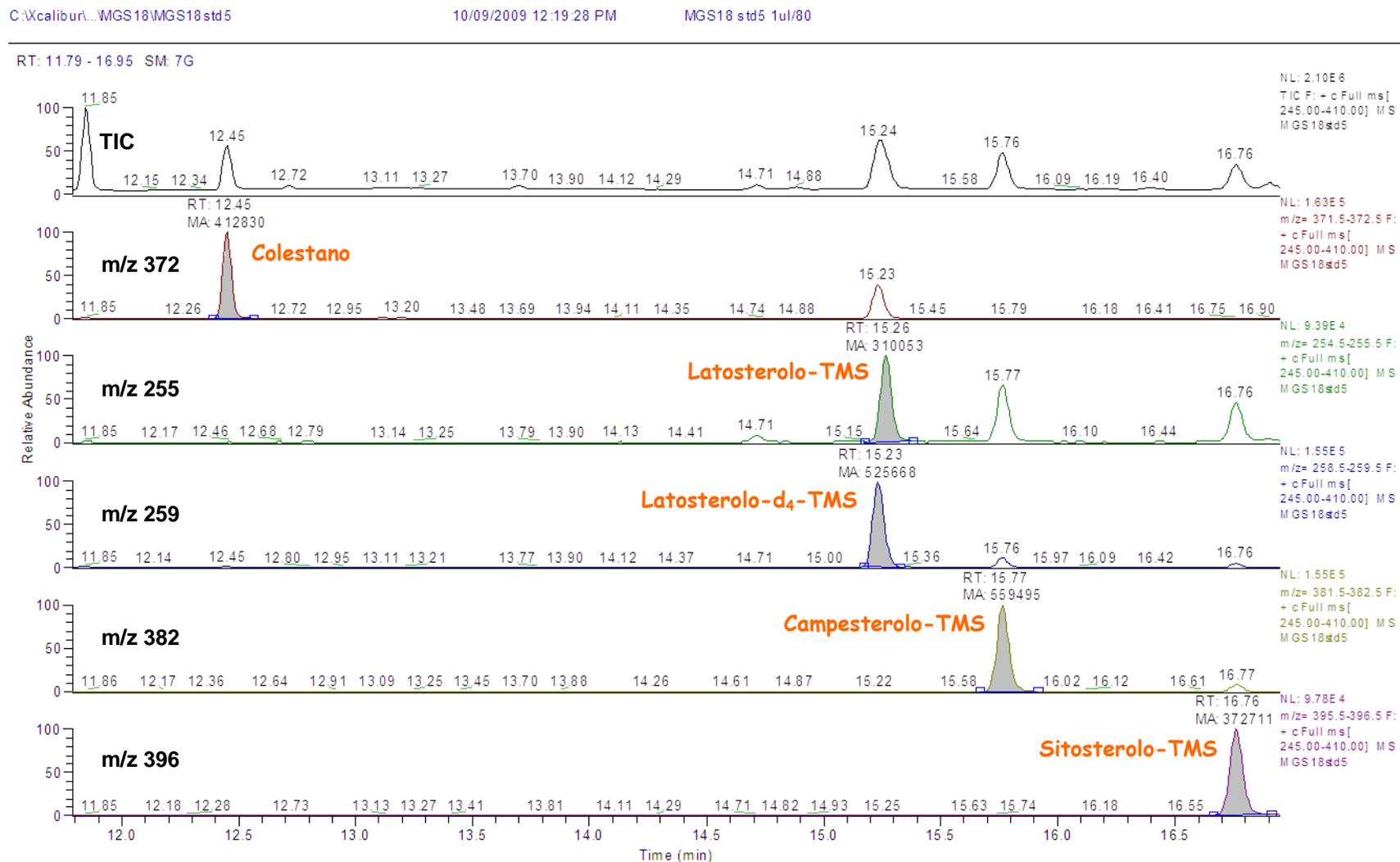


Figura 35. Dosaggio dei livelli plasmatici di latosterolo e steroli vegetali. Tracciato cromatografico.

La linearità del metodo utilizzato per il dosaggio del latosterolo e dei fitosteroli è stata valutata mediante preparazione di curve standard ottenute aggiungendo direttamente in *vials* quantità fisse di standard interni (500 ng di latosterolo deuterato e 500 ng di colestano) e quantità crescenti di latosterolo, campesterolo e β -sitosterolo (Tabella 4). In questo caso la curva non è stata estratta da plasma, ma è costituita da standard puri. Questo perché il dosaggio di questi steroli non richiede nessun passaggio di purificazione, ma solo la semplice estrazione e quindi si ottengono misure accurate anche con curve non estratte. Ogni punto della curva è stato quindi derivatizzato (senza saponificazione ed estrazione) come precedentemente descritto. L'analisi in GC-MS di ogni campione standard ha permesso di ottenere, mediante regressione lineare, tre rette di taratura in ognuna delle quali la variabile indipendente è rappresentata dal rapporto tra i ng di analita ed i ng di standard interno, mentre la variabile dipendente è il rapporto tra le aree dei picchi corrispondenti agli steroli di interesse ed agli standard interni, nei rispettivi tempi di ritenzione (Figura 36). La concentrazione di latosterolo, campesterolo e β -sitosterolo in ogni campione incognito dello studio è stata calcolata mediante estrapolazione dalla retta di regressione.

	Colestano	Latosterolo deuterato	Latosterolo normale	Campesterolo	Sitosterolo
STD 1	500 ng	500 ng	-	25 ng	50
STD 2	500 ng	500 ng	25 ng	50 ng	125 ng
STD 3	500 ng	500 ng	50 ng	100 ng	250 ng
STD 4	500 ng	500 ng	125 ng	250 ng	500 ng
STD 5	500 ng	500 ng	250 ng	500 ng	1000 ng

Tabella 4. Curve standard per il dosaggio di latosterolo e steroli vegetali.

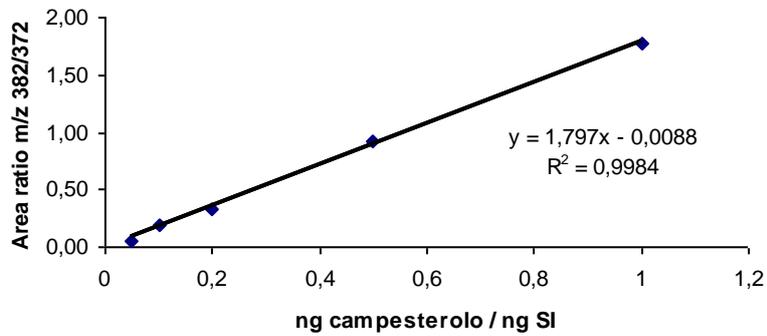
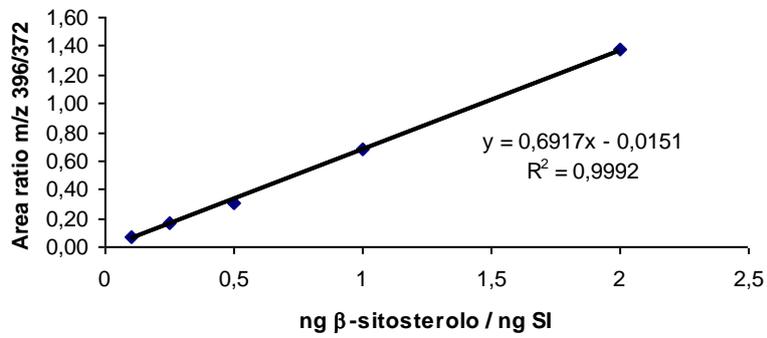
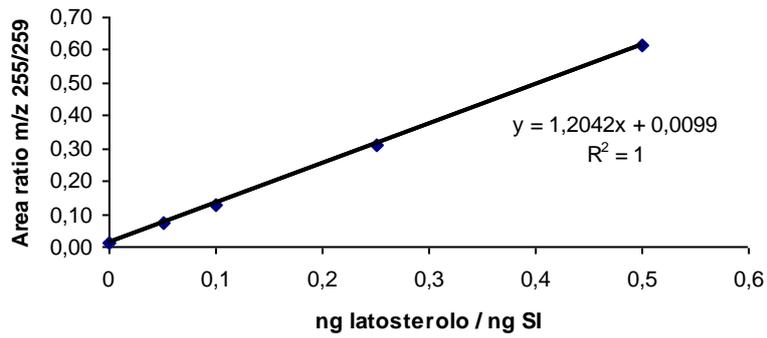


Figura 36. Curve standard per il dosaggio di latosterolo e fitosteroli.

Dosaggio colorimetrico del colesterolo plasmatico totale

Per la determinazione del contenuto totale di colesterolo nei campioni di plasma è stato effettuato un test colorimetrico mediante l'utilizzo del *Total Cholesterol Assay Kit* (Cell Biolabs, Inc.).

Questo tipo di test si basa su una serie di reazioni enzimatiche che permettono la quantificazione sia del colesterolo libero che di quello esterificato. Questa sequenza di reazioni prevede prima l'azione della colesterolo esterasi, che converte gli esteri del colesterolo in colesterolo libero. Quest'ultimo è quindi substrato della colesterolo ossidasi che lo trasforma in colest-4-en-3-one e perossido di idrogeno. L' H_2O_2 prodotto viene in fine rivelato grazie alla perossidasi di rafano (HRP) che utilizza l' H_2O_2 per ossidare una sonda colorimetrica altamente specifica, con picco di assorbanza a 540-570 nm (Figura 37).

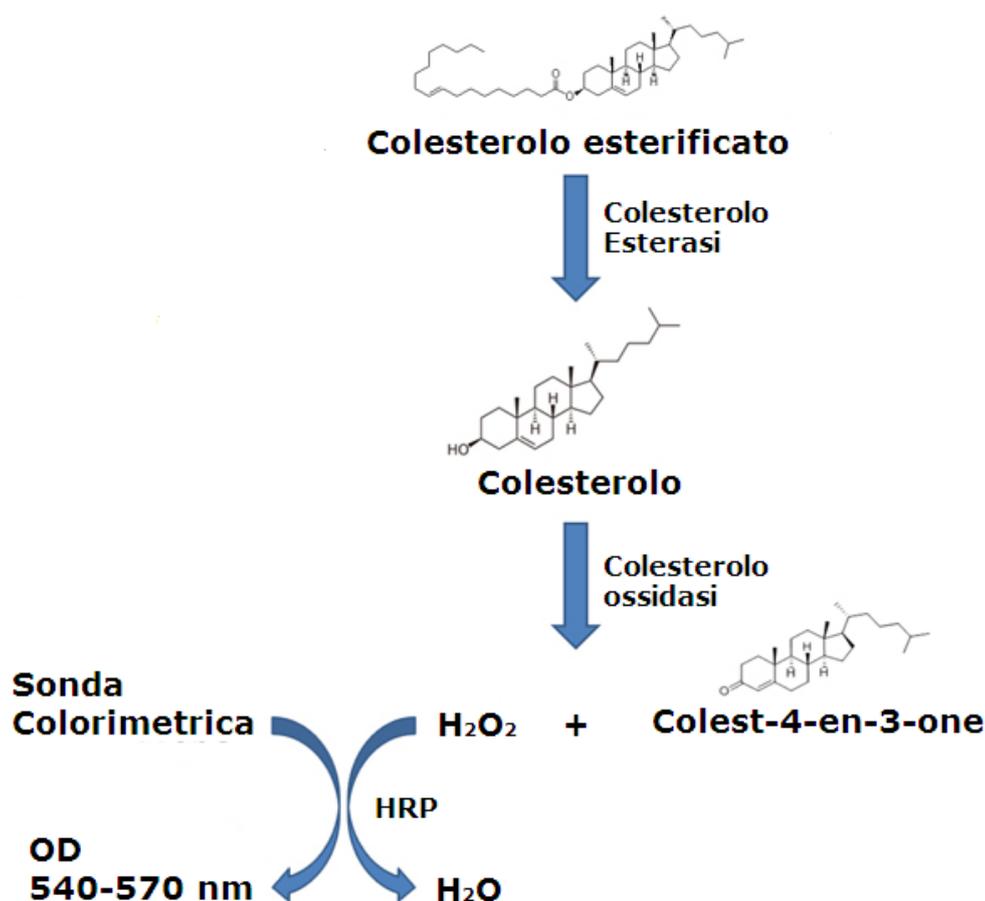


Figura 37. Principio del dosaggio colorimetrico di colesterolo. [immagine originale concessa per gentile cortesia di Cell Biolabs, Inc].

Il test è stato eseguito seguendo il protocollo della ditta fornitrice. In breve, 5 μ l di plasma per ogni campione sono diluiti con 495 μ l di *Assay diluent* e 50 μ l di questi campioni diluiti sono stati posti in piastra multiwell da 96 pozzetti (trasparente, fondo piatto). E' stato quindi preparato un mix di reazione in *Assay diluent* contenente colesterolo esterasi, colesterolo ossidasi, HRP e sonda colorimetrica, nelle proporzioni indicate dalla ditta fornitrice. Dopo aver aggiunto 50 μ l di mix di reazione ad ogni campione, la piastra è stata incubata al buio per 45 min a 37°C. Al termine l'assorbanza di ciascun campione a 570 nm è stata letta mediante il lettore di piastre *FLUOstar Omega* (BGM Labtech). La determinazione quantitativa del contenuto di colesterolo totale è avvenuta mediante la preparazione di curve standard ottenute diluendo serialmente la soluzione di colesterolo standard fornita insieme al kit secondo lo schema riportato in tabella 5.

	Colesterolo Standard	Assay diluent	Concentrazione finale di colesterolo
STD 1	200 μ l	-	250 μ M (965 mg/dl)
STD 2	100 μ l di STD1	100 μ l	125 μ M (483 md/dl)
STD 3	100 μ l di STD2	100 μ l	62,5 μ M (241 mg/dl)
STD 4	100 μ l di STD3	100 μ l	31,3 μ M (121 mg/dl)
STD 5	100 μ l di STD4	100 μ l	15,6 μ M (60 mg/dl)
STD 6	100 μ l di STD5	100 μ l	7,8 μ M (30 mg/dl)
Bianco	-	100 μ l	0 μ M (0 mg/dl)

Tabella 5. Curva standard per il dosaggio del colesterolo totale.

La lettura in assorbanza di ogni campione standard ha permesso di ottenere, mediante regressione lineare, una retta di taratura nella quale in ascissa è stata posta la concentrazione di colesterolo, mentre in ordinata l'assorbanza della soluzione a 570

nm (Figura 38). La concentrazione di colesterolo totale in ogni campione incognito dello studio è stata calcolata mediante estrapolazione dalla retta di regressione, tenendo conto del fattore di diluizione (1:100).

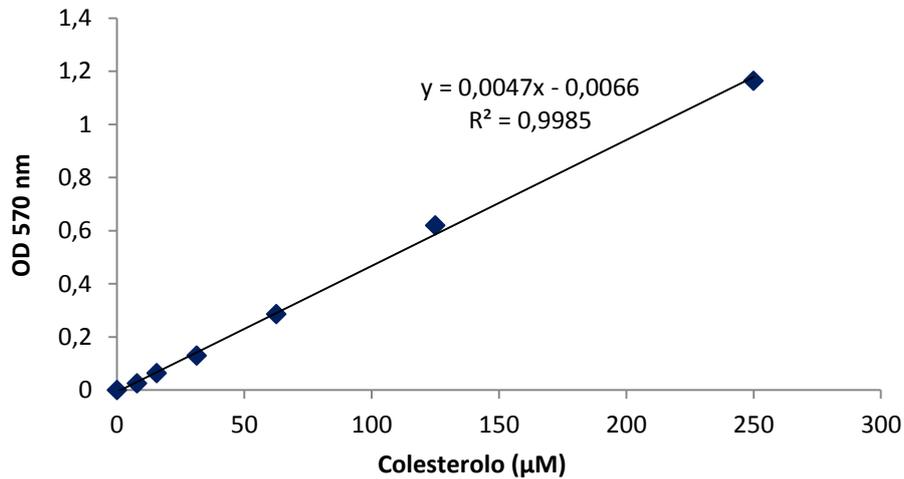


Figura 38. Curva standard per il dosaggio del colesterolo totale.

Analisi statistica

I dati sono stati riportati sia come $media \pm ds$, sia come *range* interquartile (IQR) e mediana. La normalità o non normalità delle distribuzioni è stata valutata utilizzando il test di Anderson-Darling. In caso di distribuzioni normali per evidenziare differenze significative tra i diversi gruppi di campioni sono stati utilizzati test parametrici: il test t di Student per i confronti tra due gruppi ed il test di Duncan per i confronti multipli. Per le distribuzioni risultate non normali sono stati invece utilizzati test non parametrici: il test U di Mann-Whitney per i confronti tra due gruppi, ed il test di Kruskal-Wallis (con *post-hoc* Dunn's test) per i confronti multipli. Sono inoltre state effettuate analisi di correlazione tra variabili mediante calcolo del coefficiente di Spearman (ρ) e relativo *p-value*. Sono stati considerati statisticamente significativi valori di $p < 0,05$.

RISULTATI

PAZIENTI CTX

VALUTAZIONE CLINICA

In tabella 6 è riportata la distribuzione dei principali sintomi (neurologici e sistemici) tipici della patologia per la popolazione in studio. L'indice EDSS è risultato compreso tra 1 e 7, con una media pari a 3,7, una mediana di 3,5 ed una deviazione standard di 1,7 (con 0 si indica la situazione di normalità e con 10 la morte dovuta alla patologia); l'indice RS è risultato invece compreso tra 0 e 4, con una media pari a 2,1, una mediana di 2,0 ed una deviazione standard di 1,3 (con 0 si indica la situazione di normalità e con 6 la morte dovuta alla patologia). Per quanto concerne la progressione della malattia durante il follow-up, in 21 pazienti (64%) gli indici si sono mantenuti stabili, mentre in 12 pazienti (36%) si è verificato un aggravamento dei sintomi neurologici (incremento di EDSS o RS).

	PAZIENTI AFFETTI	
	<u>Si</u> : ()	<u>No</u> : ()
Xantomi tendinei	Si: 27 (82%)	No: 6 (18%)
Atassia	Si: 12 (36%)	No: 21 (64%)
Paraparesi spastica	Si: 21 (64%)	No: 12 (36%)
Lesioni nucleo dentato	Si: 13 (39%)	No: 20 (61%)
Disabilità intellettuale	Si: 20 (61%)	No: 13 (39%)
Disturbi psichiatrici	Si: 17 (52%)	No: 16 (48%)
Osteoporosi precoce	Si: 16 (48%)	No: 17 (52%)
Epilessia	Si: 8 (24%)	No: 25 (76%)
Parkinsonismi	Si: 2 (6%)	No: 31 (94%)
Polineuropatia	Si: 13 (39%)	No: 20 (61%)

Tabella 6. Distribuzione dei sintomi in un gruppo di pazienti CTX

FOLLOW-UP DEI LIVELLI PLASMATICI DI COLESTEROLO TOTALE

Per ciò che concerne i valori di colesterolo totale, solo due pazienti solo risultati ipercolesterolemici (> 300 mg/dl), mentre la maggioranza dei soggetti analizzati ha mostrato valori di colesterolo totale sostanzialmente nella norma (< 240 mg/dl). Complessivamente tali valori non hanno mostrato significative variazioni in seguito al trattamento con BA, né sul breve né sul lungo periodo (Tabella 7, Grafico 1).

Colesterolo Totale (mg/dl)			
t0 (basale)	<i>IQR (mediana)</i>	149-215 (160)	
	<i>media±ds</i>	187±67	n= 19
t1 (0-1,5 anni)	<i>IQR (mediana)</i>	151-184 (168)	
	<i>media±ds</i>	187±78	n= 21
t2 (1,5-3 anni)	<i>IQR (mediana)</i>	160-191 (179)	
	<i>media±ds</i>	180±35	n= 18
t3 (3-5 anni)	<i>IQR (mediana)</i>	136-220 (183)	
	<i>media±ds</i>	182±47	n= 20
t4 (5-10 anni)	<i>IQR (mediana)</i>	166-204 (178)	
	<i>media±ds</i>	182±40	n= 22
t5 (oltre 10 anni)	<i>IQR (mediana)</i>	155-205 (190)	
	<i>media±ds</i>	184±40	n= 29
Valore normale		< 240mg /dl	

Tabella 7. Follow-up del colesterolo plasmatico totale in un gruppo di pazienti CTX.
I dati sono riportati sia come *range* interquartile (IQR) e mediana, sia come *media±ds*.

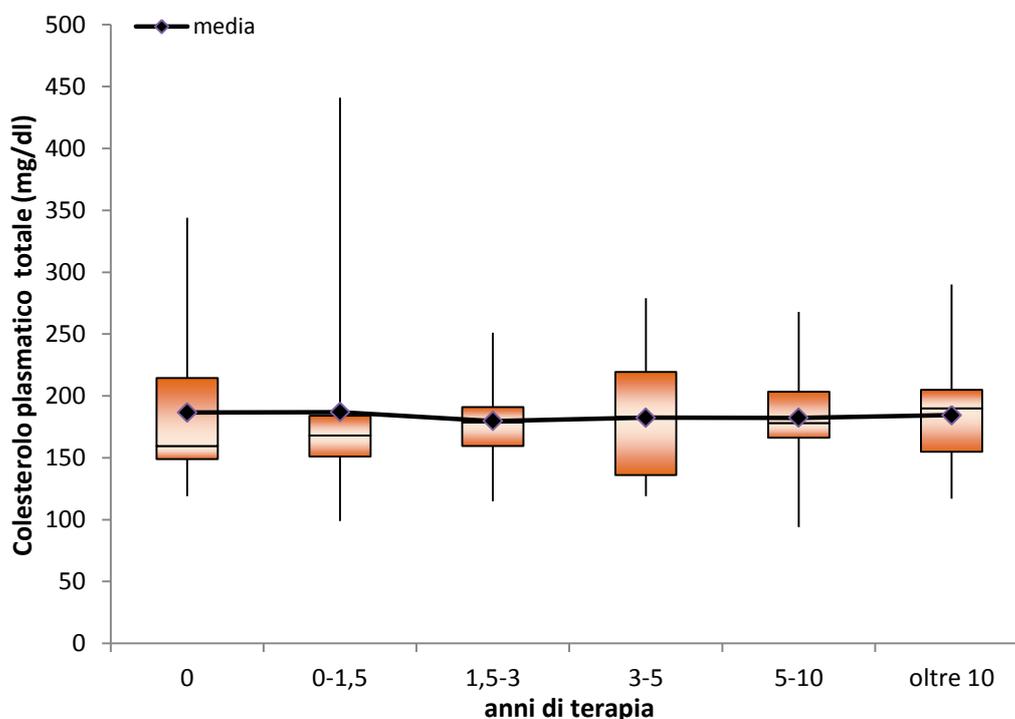


Grafico 1. Follow-up dei valori plasmatici di colesterolo totale in un gruppo di pazienti CTX.
I dati sono riportati come *box-plot* (*range* interquartile, mediana, valore minimo e massimo) e come *media*.

FOLLOW-UP DEI LIVELLI PLASMATICI DI COLESTANOLO

Il colestanoLO è il principale e caratteristico metabolita che si accumula nei soggetti CTX, depositandosi a livello cerebrale e tendineo sotto forma di xantomi.

I risultati ottenuti circa il follow-up del colestanoLO plasmatico sul gruppo di pazienti CTX oggetto dello studio sono mostrati in Tabella 8. Come atteso, i valori basali di colestanoLO sono risultati notevolmente aumentati ($3,42 \pm 0,29$ mg/dl, *range*: 1,37-6,6 mg/dl), rispetto a quelli riportati in letteratura per soggetti sani ($0,34 \pm 0,16$ mg/dl) [Kuriyama M. et al., 1991]. Con l'inizio della terapia sostitutiva con CDCA i valori hanno mostrato una notevole riduzione rispetto al basale ($p < 0,05$), riduzione che è risultata ancora più marcata per i periodi di trattamento superiori ai 18 mesi ($p < 0,01$). A partire da 1,5-3 anni di terapia valori si sono mantenuti mediamente stabili e non è stata riscontrata nessuna perdita di efficacia della trattamento sul lungo periodo (Grafico 2). Dividendo i pazienti in base all'evoluzione della malattia non è stato possibile evidenziare alcuna differenza significativa tra i pazienti stabili e quelli in peggioramento, né nei valori di colestanoLO basali, né in quelli successivi (Tabella 9)

		ColestanoLO (mg/dl)	
t0 (basale)	<i>IQR (mediana)</i>	2,46-4,01 (3,72)	
	<i>media±ds</i>	$3,42 \pm 0,29$	n= 19
t1 (0-1,5 anni)	<i>IQR (mediana)</i>	0,58-1,09 (0,74)*	
	<i>media±ds</i>	$0,99 \pm 0,70$	n= 21
t2 (1,5-3 anni)	<i>IQR (mediana)</i>	0,33-0,77 (0,44)**	
	<i>media±ds</i>	$0,55 \pm 0,36$	n= 18
t3 (3-5 anni)	<i>IQR (mediana)</i>	0,36-0,57 (0,42)**	
	<i>media±ds</i>	$0,54 \pm 0,31$	n= 20
t4 (5-10 anni)	<i>IQR (mediana)</i>	0,30-0,70 (0,39)**	
	<i>media±ds</i>	$0,48 \pm 0,23$	n= 22
t5 (oltre 10 anni)	<i>IQR (mediana)</i>	0,35-0,65 (0,49)**	
	<i>media±ds</i>	$0,51 \pm 0,21$	n= 29
Valore			(Kuriyama M. et al. 1991)
controllo	<i>media±ds</i>	$0,34 \pm 0,16$	

Tabella 8. Follow-up del colestanoLO plasmatico in un gruppo di pazienti CTX.

I dati sono riportati sia come *range* interquartile (IQR) e mediana, sia come *media±ds*.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (rispetto al basale).

		Colestanolo (mg/dl)			
		STABILI		PEGGIORANTI	
t0 (basale)	<i>IQR (mediana)</i>	2,50-3,90 (3,52)		2,34-4,77 (3,84)	
	<i>media±ds</i>	3,24±0,82	n= 12	3,72±1,89	n= 7
t1 (0-1,5 anni)	<i>IQR (mediana)</i>	0,52-1,21 (0,73)		0,66-1,09 (0,84)	
	<i>media±ds</i>	1,04±0,88	n= 12	0,94±0,38	n= 9
t2 (1,5-3 anni)	<i>IQR (mediana)</i>	0,33-0,58 (0,40)		0,37-0,88 (0,73)	
	<i>media±ds</i>	0,47±0,21	n= 13	0,75±0,59	n= 5
t3 (3-5 anni)	<i>IQR (mediana)</i>	0,38-0,77 (0,43)		0,35-0,42 (0,37)	
	<i>media±ds</i>	0,59±0,34	n= 14	0,39±0,07	n= 5
t4 (5-10 anni)	<i>IQR (mediana)</i>	0,31-0,69 (0,50)		0,30-0,62 (0,35)	
	<i>media±ds</i>	0,48±0,21	n= 14	0,46±0,27	n= 7
t5 (oltre 10 anni)	<i>IQR (mediana)</i>	0,35-0,67 (0,47)		0,37-0,54 (0,51)	
	<i>media±ds</i>	0,50±0,21	n= 18	0,52±0,22	n= 11

Tabella 9. Follow-up del colestanolo plasmatico: confronto tra pazienti stabili e peggioranti.
I dati sono riportati sia come range interquartile (IQR) e mediana, sia come $media\pm ds$.

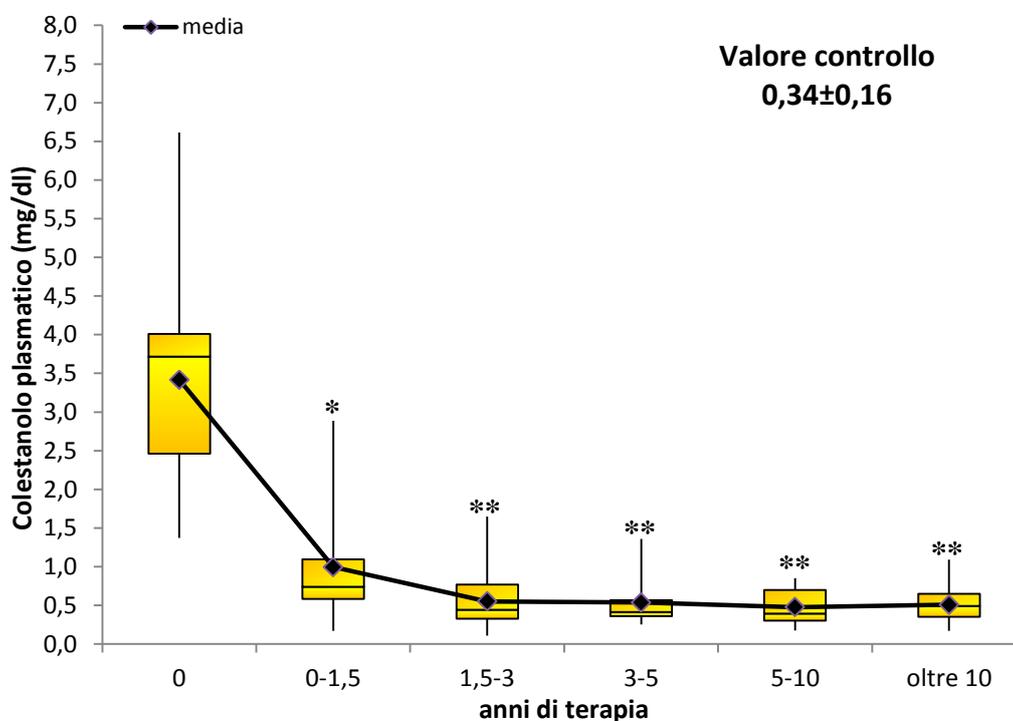


Grafico 2. Follow-up dei valori plasmatici di colestanolo in un gruppo di pazienti CTX.
I dati sono riportati come *box-plot* (range interquartile, mediana, valore minimo e massimo) e come media. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (rispetto al basale).

FOLLOW-UP DEI LIVELLI PLASMATICI DI 7 α -IDROSSICOLEST-4-EN-3-ONE

Essendo il 7 α -idrossicolest-4-en-3-one (7 α C4) il secondo metabolita della via classica di sintesi degli acidi biliari plasmatico, i suoi livelli plasmatici sono indicativi dell'attività di questo *pathway* metabolico.

I risultati ottenuti hanno mostrato per il 7 α C4 un andamento molto simile a quello riscontrato per il colestano (Tabella 10). Anche in questo caso infatti i valori ottenuti nei soggetti CTX non trattati sono risultati nettamente aumentati (368 \pm 221 μ g/dl, *range*: 126-827 mg/dl) rispetto a quelli normalmente riscontrati in soggetti sani (2,33 \pm 1,97 μ g/dl) [Camilleri M. et al., 2009], indicando quindi un'iperstimolazione della via classica di sintesi degli acidi biliari.

		7α-C4 (μg/dl)	
t0 (basale)	<i>IQR (mediana)</i>	200-527 (297)	
	<i>media\pmds</i>	368 \pm 221	n= 19
t1 (0-1,5 anni)	<i>IQR (mediana)</i>	6,8-33,4 (14,9)**	
	<i>media\pmds</i>	29,7 \pm 43,7	n= 21
t2 (1,5-3 anni)	<i>IQR (mediana)</i>	2,0-14,7 (8,6)**	
	<i>media\pmds</i>	10,6 \pm 11,9	n= 18
t3 (3-5 anni)	<i>IQR (mediana)</i>	2,7- 38,1(7,3)**	
	<i>media\pmds</i>	18,6 \pm 22,71	n= 20
t4 (5-10 anni)	<i>IQR (mediana)</i>	1,4-36,4 (4,8)**	
	<i>media\pmds</i>	21,4 \pm 31,5	n= 22
t5 (oltre 10 anni)	<i>IQR (mediana)</i>	1,7-7,3 (4,3)**	
	<i>media\pmds</i>	6,8 \pm 11,9	n= 29
Valore controllo	<i>media\pmds</i>	2,23\pm1,97	<i>(Camilleri M. et al. 2009)</i>

Tabella 10. Follow-up del 7 α C4 plasmatico in un gruppo di pazienti CTX.

I dati sono riportati sia come *range* interquartile (IQR) e mediana, sia come *media \pm ds*.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (rispetto al basale).

Tali valori sono nettamente diminuiti in seguito all'assunzione di CDCA ed infatti per tutti i periodi di trattamento la differenza rispetto la basale è risultata statisticamente significativa ($p < 0,01$). E' tuttavia possibile evidenziare come un

certo grado di iperattività della via classica sia ancora riscontrabile in diversi soggetti (Grafico 3).

Inoltre, a riconferma del simile andamento dei valori di colesanolo e $7\alpha C4$, è stata trovata tra questi due parametri biochimici una correlazione statisticamente significativa ($\rho = 0,51$, $p \ll 0,01$).

Anche in questo caso sono state ricercate differenze nei valori di questo metabolita tra il gruppo di pazienti rimasti stabili e quelli le cui condizioni si sono aggravate. I valori basali di $7\alpha C4$ nel gruppo di pazienti in peggioramento sono risultati tendenzialmente più elevati, in media, rispetto a quelli dei pazienti stabili (464 ± 253 $\mu\text{g/dl}$ vs 312 ± 190 $\mu\text{g/dl}$), tuttavia tale differenza non è risultata statisticamente significativa, sia a causa della grande dispersione dei dati sperimentali, sia per il numero limitato di soggetti di cui si disponevano i valori basali ($n = 12$, per i pazienti stabili ; $n = 7$ per quelli in peggioramento). Non è inoltre emersa nessuna differenza di risposta alla terapia (a breve o lungo termine) tra i due gruppi di soggetti per quanto riguarda questo parametro biochimico (Tabella 11).

		$7\alpha\text{-C4}$ ($\mu\text{g/dl}$)			
		STABILI		PEGGIORANTI	
t0 (basale)	<i>IQR (mediana)</i>	173-392 (243)		281-636 (410)	
	<i>media\pmds</i>	312 \pm 190	n= 12	464 \pm 253	n= 7
t1 (0-1,5 anni)	<i>IQR (mediana)</i>	7,7-45,9 (20,1)		6,7-21,0 (13,2)	
	<i>media\pmds</i>	40,3 \pm 55,3	n= 12	15,6 \pm 13,1	n= 9
t2 (1,5-3 anni)	<i>IQR (mediana)</i>	3,0-16,7 (9,8)		1,7-2,7 (2,1)	
	<i>media\pmds</i>	12,9 \pm 12,9	n= 13	4,7 \pm 5,8	n= 5
t3 (3-5 anni)	<i>IQR (mediana)</i>	3,2-44,6 (10,5)		2,2-6,7 (4,8)	
	<i>media\pmds</i>	24,7 \pm 24,9	n= 14	4,5 \pm 2,8	n= 5
t4 (5-10 anni)	<i>IQR (mediana)</i>	1,8-25,8 (4,5)		1,3-34,2 (5,1)	
	<i>media\pmds</i>	20,5 \pm 31,6	n= 14	23,3 \pm 33,9	n= 7
t5 (oltre 10 anni)	<i>IQR (mediana)</i>	2,4-7,1 (4,4)		1,6-6,6 (4,3)	
	<i>media\pmds</i>	4,8 \pm 3,1	n= 18	10,4 \pm 19,6	n= 11

Tabella 11. Follow-up del $7\alpha C4$ plasmatico: confronto tra pazienti stabili e peggioranti.
I dati sono riportati sia come *range* interquartile (IQR) e mediana, sia come *media \pm ds*.

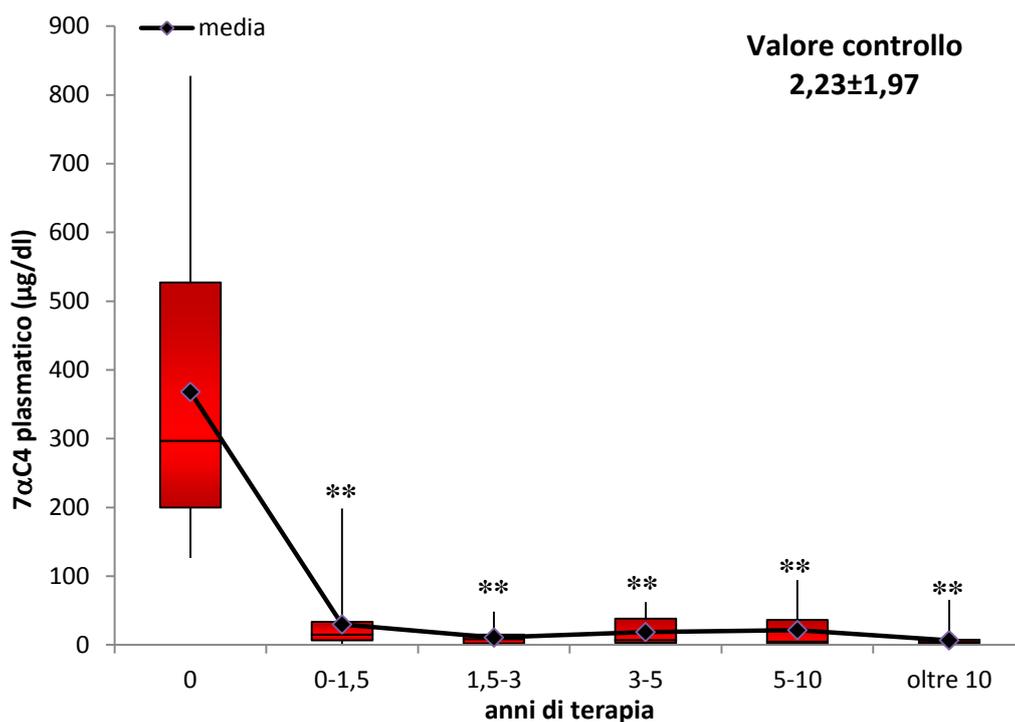


Grafico 3. Follow-up dei valori plasmatici di 7 α C4 in un gruppo di pazienti CTX. I dati sono riportati come *box-plot* (range interquartile, mediana, valore minimo e massimo) e come media. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (rispetto al basale).

FOLLOW-UP DEI LIVELLI PLASMATICI DI 24- E 27- IDROSSICOLESTEROLO

Oltre ai livelli di 7 α C4 sono stati dosati anche i livelli di 24-idrossicolesterolo e di 27-idrossicolesterolo, il primo in quanto *marker* del metabolismo del colesterolo a livello cerebrale, mentre il secondo (virtualmente assente nei soggetti CTX per mancanza dell'enzima CYP27A1) per verificare se ci fosse un'attività residua della via alternativa di sintesi degli acidi biliari.

Per ciò che concerne i livelli di 24-OHC i risultati ottenuti sono mostrati in tabella 12. Nonostante i tipici sintomi neurologici della malattia i valori basali di tale ossisterolo non si sono mostrati, nel complesso, marcatamente alterati ($8,1 \pm 4,1$ mg/dl, *range*: 3,4-20,4 mg/dl) rispetto a quelli medi riportati in letteratura ($6,4 \pm 2,4$ µg/dl) [Dzeletovic S. et al., 1995], sebbene alcuni soggetti abbiamo mostrato, singolarmente, livelli più elevati. Tale situazione ha riguardato in modo particolare la coppia di soggetti risultati ipercolesterolemici.

Non è stato possibile riscontrare nessun particolare effetto della terapia sui livelli di questo metabolita, tranne forse una lieve tendenza alla diminuzione sul lungo periodo che, tuttavia, non è risultata significativa da un punto di vista statistico (Grafico 4).

		24-OHC (µg/dl)	
t0 (basale)	<i>IQR (mediana)</i>	5,4-10,1 (7,1)	
	<i>media±ds</i>	8,1±4,1	n= 19
t1 (0-1,5 anni)	<i>IQR (mediana)</i>	5,1-10,3 (6,7)	
	<i>media±ds</i>	8,1±3,9	n= 21
t2 (1,5-3 anni)	<i>IQR (mediana)</i>	5,9-8,8 (7,4)	
	<i>media±ds</i>	7,6±2,9	n= 18
t3 (3-5 anni)	<i>IQR (mediana)</i>	5,2- 9,3 (7,5)	
	<i>media±ds</i>	7,1±2,7	n= 20
t4 (5-10 anni)	<i>IQR (mediana)</i>	6,4-9,1 (7,8)	
	<i>media±ds</i>	7,8±2,3	n= 22
t5 (oltre 10 anni)	<i>IQR (mediana)</i>	5,7-7,5 (6,9)	
	<i>media±ds</i>	6,9±1,8	n= 29
Valore			<i>(Dzeletovic S. et al. 1995)</i>
controllo	<i>media±ds</i>	6,4±2,4	

Tabella 12. Follow-up del 24-OHC plasmatico in un gruppo di pazienti CTX.

I dati sono riportati sia come *range* interquartile (IQR) e mediana, sia come *media±ds*.

Un andamento particolare nei valori di 24-OHC è stato invece riscontrato in una bambina diagnosticata CTX all'età di 6 mesi ed i cui dati sono stati, proprio per la particolarità del caso, considerati separatamente dal resto dei pazienti analizzati. In questo caso specifico all'età di 8 mesi (e dopo meno di 2 mesi di terapia con CDCA), il soggetto ha mostrato infatti valori plasmatici di 24-OHC circa 10 volte più elevati rispetto a quelli di riferimento per soggetti adulti sani (64,5 µg/dl vs 6,4±2,4 µg/dl). Tali valori si sono progressivamente ridotti durante il successivo periodo di follow-up, sebbene dopo 7 anni si siano mostrati ancora più elevati di quelli di soggetti controllo adulti (valore finale: 15,4 µg/dl) (Grafico 5).

Per ciò che riguarda invece il 27-OHC esso è risultato, come atteso, sotto i limiti di rilevabilità nella quasi totalità dei campioni di plasma analizzati e, nei campioni in cui era dove rilevabile, la sua concentrazione era comunque nettamente inferiore rispetto ai valori medi dei soggetti controllo (< 2 µg/dl vs 15,4±4,3 µg/dl [Dzeletovic S. et al., 1995]).

Nessuna correlazione è emersa tra i livelli di 24-OHC e 27-OHC e l'evoluzione clinica della malattia (dati non mostrati).

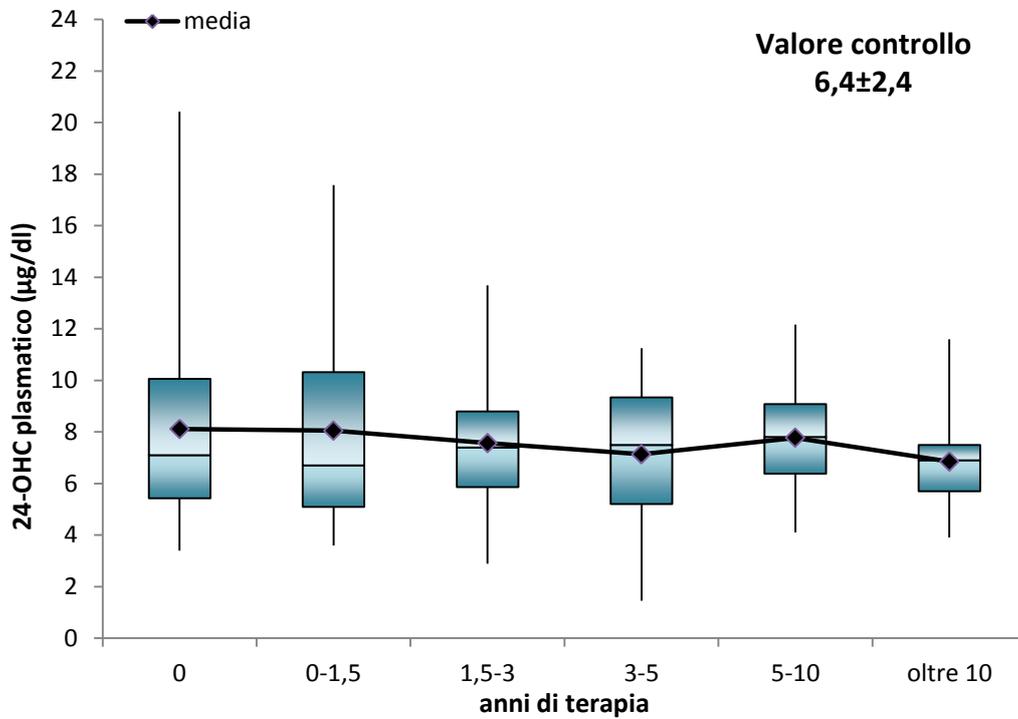


Grafico 4. Follow-up dei valori plasmatici di 24-OHC in un gruppo di pazienti CTX. I dati sono riportati come *box-plot* (range interquartile, mediana, valore minimo e massimo) e come media.

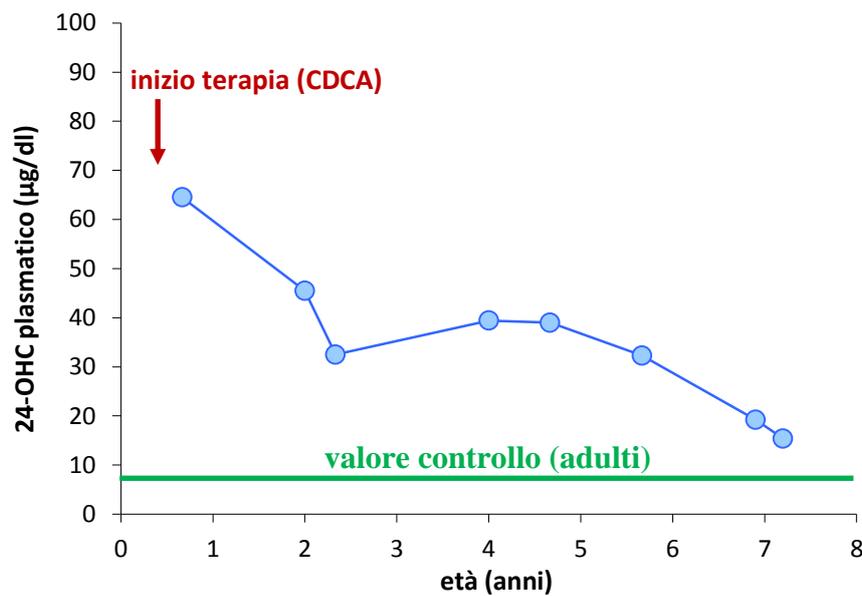


Grafico 5. Valori plasmatici di 24-OHC in una bambina CTX da 8 mesi a 7 anni di età.

FOLLOW-UP DEI LIVELLI PLASMATICI DI LATOSTEROLO E STEROLI VEGETALI

Da ultimo, per completare la valutazione del metabolismo del colesterolo nei soggetti CTX abbiamo analizzato anche i livelli plasmatici di latosterolo e di fitosteroli come *markers*, rispettivamente, della sintesi “*de novo*” e dell’assorbimento intestinale di colesterolo. I dati ottenuti sono riportati in Tabella 13.

I livelli di latosterolo, assoluti e normalizzati per 100 mg di colesterolo totale (questi ultimi considerati un valido *marker* della sintesi epatica di colesterolo), sembrano indicare un aumento della sintesi di colesterolo nei pazienti CTX non trattati, se paragonati a quelli di riferimento per soggetti sani. Anche in questo caso, la somministrazione di CDCA 750 mg/d ha indotto una significativa riduzione rispetto al basale ($p < 0,01$), già riscontrabile dopo i primi 18 mesi di terapia. I livelli di questo metabolita sono in seguito rimasti, nel complesso, sostanzialmente costanti (Grafico 6).

Inoltre, il calcolo del coefficiente di Spearman ha mostrato una significativa correlazione tra i valori di questo metabolita e quelli di $7\alpha C4$ ($\rho = 0,66$, $p << 0,01$).

Come per il $7\alpha C4$, dividendo i pazienti in base alla loro risposta alla terapia è emersa una tendenza dei pazienti in peggioramento ad avere valori basali di latosterolo più elevati rispetto ai soggetti rimasti stabili ($1066 \pm 413 \mu\text{g/dl}$ vs $857 \pm 293 \mu\text{g/dl}$), tuttavia anche in questo caso la scarsità di campioni non ha permesso il raggiungimento di una significatività statistica.

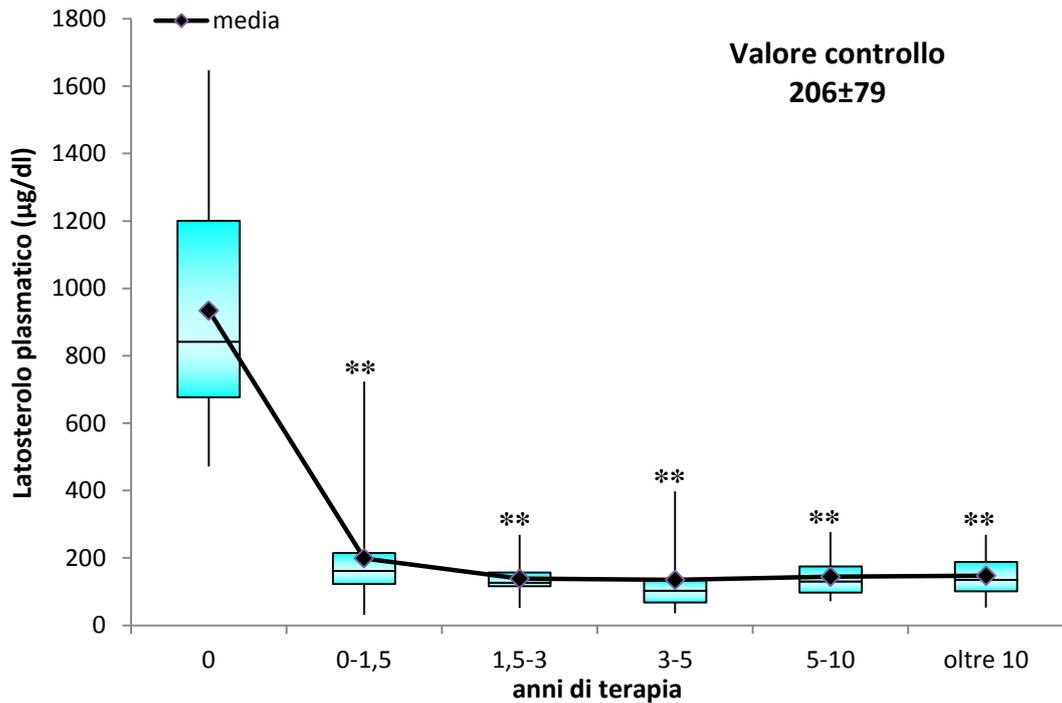
Riguardo ai fitosteroli si è osservato un comportamento simile al latosterolo: valori tendenzialmente più elevati nei pazienti CTX non trattati e successiva riduzione a seguito della terapia con acidi biliari ($p < 0,01$) (Grafici 7 e 8). Tale andamento ha riguardato sia i valori assoluti, sia quelli normalizzati per 100 mg di colesterolo totale (i quali sono normalmente correlati con l’entità dell’assorbimento intestinale di colesterolo).

Nessuna significativa differenza è emersa tra pazienti stabili ed in peggioramento riguardo i livelli plasmatici di fitosteroli, né prima né durante la terapia con acidi biliari (dati non mostrati).

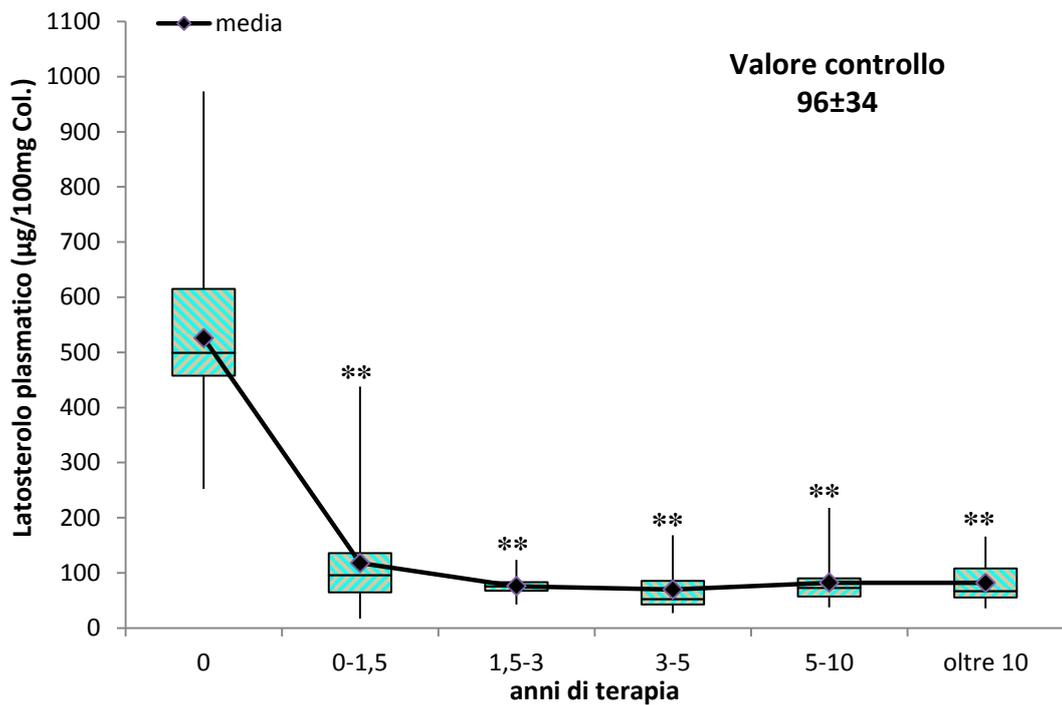
		Latosterolo ($\mu\text{g/dl}$) / ($\mu\text{g}/100\text{mg Col}$)	Campesterolo ($\mu\text{g/dl}$) / ($\mu\text{g}/100\text{mg Col}$)	Sitosterolo ($\mu\text{g/dl}$) / ($\mu\text{g}/100\text{mg Col}$)	
t0 (basale)	<i>IQR (mediana)</i>	677-1200 (842) / 458-615 (499)	346-734 (525) / 208-328 (260)	651-1628 (938) / 426-678 (537)	
	<i>media±ds</i>	934±347 / 526±160	561±286 / 294±118	1119±595 / 598±249	n= 19
t1 (0-1,5 anni)	<i>IQR (mediana)</i>	123-215 (162)** / 65-136 (96)**	141-263 (196)** / 75-158 (104)**	362-613 (459)** / 205-366 (277)**	
	<i>media±ds</i>	199±150 / 118±97	212±91 / 128±82	474±199 / 284±150	n= 21
t2 (1,5-3 anni)	<i>IQR (mediana)</i>	116-157 (127)** / 68-83 (75)**	143-256 (187)** / 78-142 (108)**	357-584 (437)** / 155-354 (256)**	
	<i>media±ds</i>	138±53 / 76±21	197±79 / 116±58	455±192 / 269±142	n= 18
t3 (3-5 anni)	<i>IQR (mediana)</i>	68-135 (103)** / 42-85 (53)**	111-252 (163)** / 64-133 (84)**	276-543 (326)** / 154-333 (213)**	
	<i>media±ds</i>	135±102 / 70±39	183±82 / 107±63	462±269 / 274±189	n= 20
t4 (5-10 anni)	<i>IQR (mediana)</i>	97-175 (130)** / 57-90 (72)**	114-256 (170)** / 69-111 (95)**	292-574 (373)** / 160-285 (205)**	
	<i>media±ds</i>	144±59 / 82±40	187±101 / 105±69	453±274 / 257±190	n= 22
t5 (oltre 10 anni)	<i>IQR (mediana)</i>	101-188 (135)** / 55-108 (67)**	119-227 (153)** / 65-138 (85)**	319-669 (505)* / 171-380 (267)**	
	<i>media±ds</i>	147±61 / 82±37	194±104 / 110±66	541±259 / 307±153	n= 29
Valore		(Kempen H.J.M. et al. 1988)	(Kuriyama M. et al. 1991)	(Kuriyama M. et al. 1991)	
controllo	<i>media±ds</i>	206±79 / 96±34	399±218 / 240±120	629±171 / 410±90	

Tabella 13. Follow-up del latosterolo e dei fitosteroli plasmatici in un gruppo di pazienti CTX.

I dati sono riportati sia come *range* interquartile (IQR) e mediana, sia come *media±ds*. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (rispetto al basale).



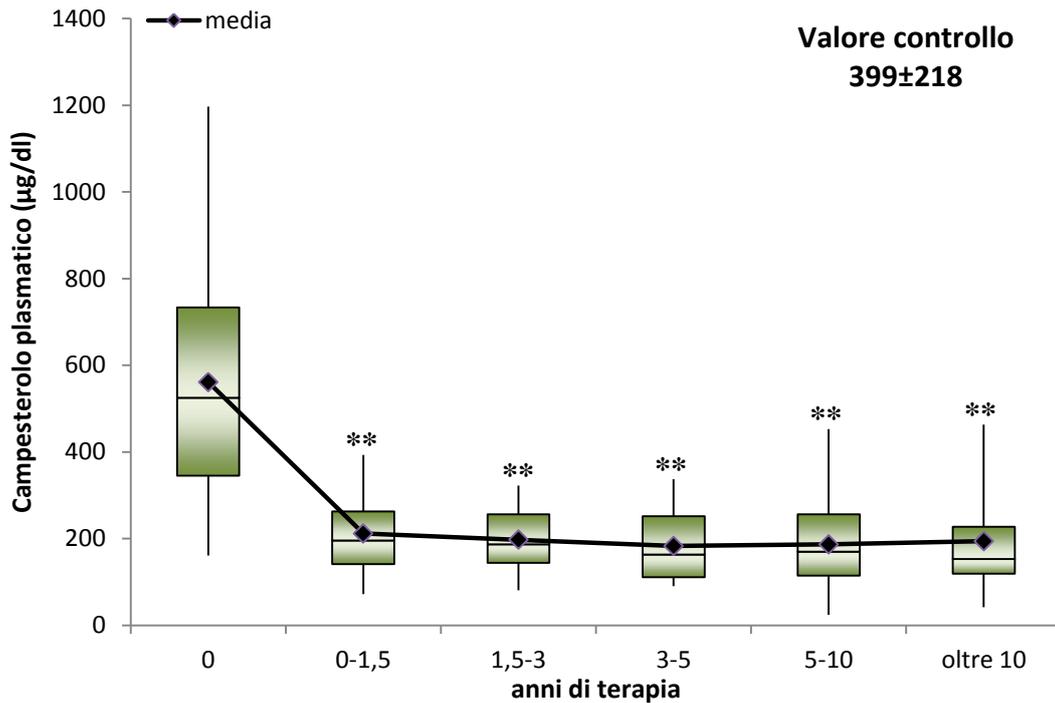
A



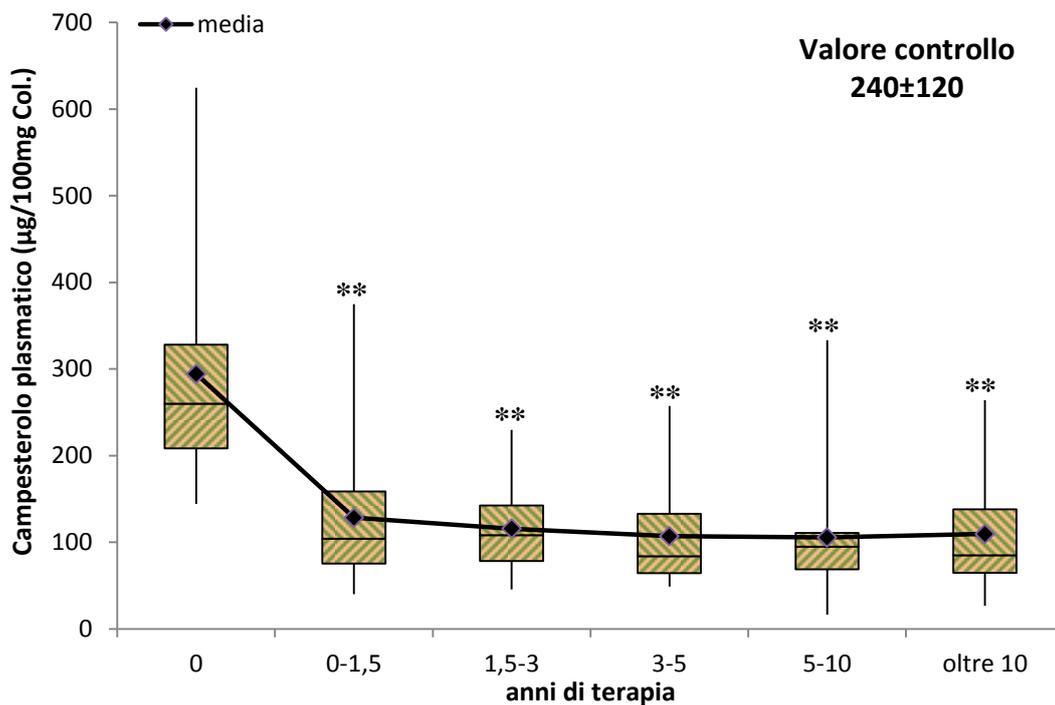
B

Grafico 6. Follow-up dei valori plasmatici di latosterolo assoluti (A) e normalizzati per 100mg di colesterolo totale (B) in un gruppo di pazienti CTX. I dati sono riportati come *box-plot* (range interquartile, mediana, valore minimo e massimo) e come media.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (rispetto al basale).



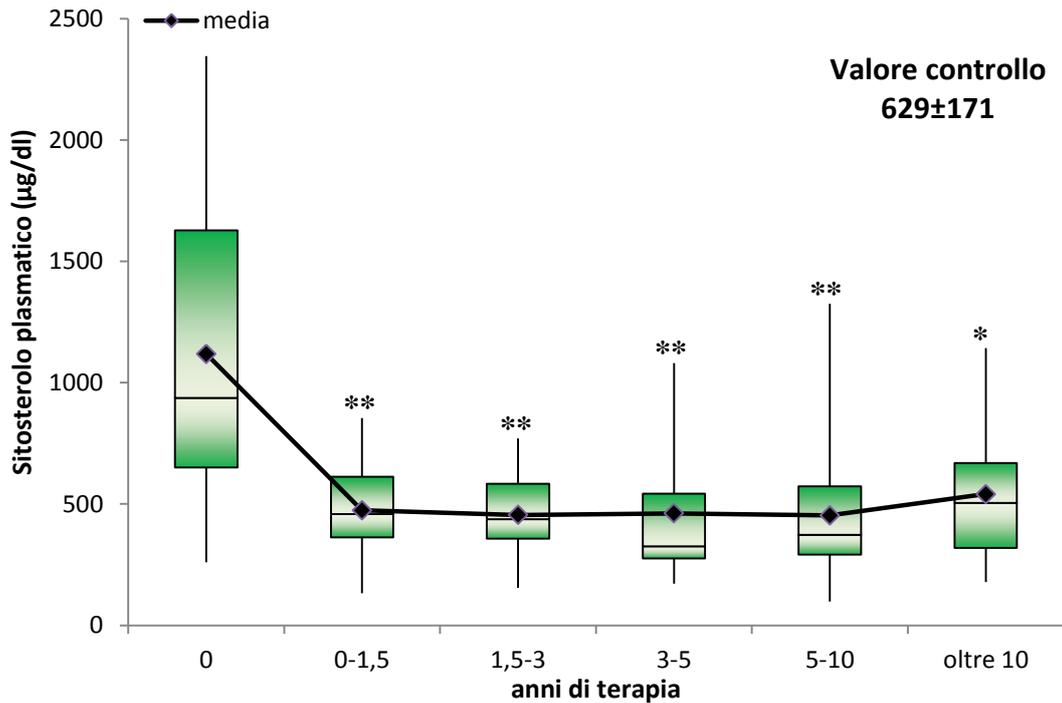
A



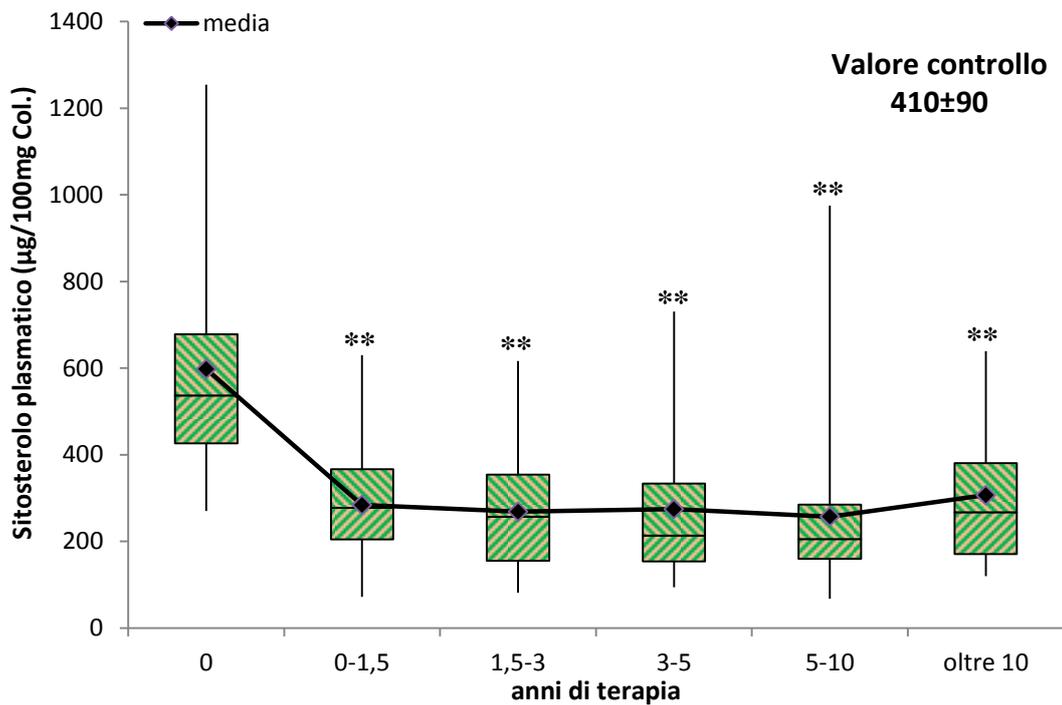
B

Grafico 7. Follow-up dei valori plasmatici di campesterolo assoluti (A) e normalizzati per 100mg di colesterolo totale (B) in un gruppo di pazienti CTX. I dati sono riportati come *box-plot* (range interquartile, mediana, valore minimo e massimo) e come media.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (rispetto al basale).



A



B

Grafico 8. Follow-up dei valori plasmatici di sitosterolo assoluti (A) e normalizzati per 100mg di colesterolo totale (B) in un gruppo di pazienti CTX. I dati sono riportati come *box-plot* (range interquartile, mediana, valore minimo e massimo) e come media.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (rispetto al basale).

PAZIENTI SPG5

VALUTAZIONE CLINICA

La valutazione clinica della coppia di soggetti SPG5 è stata effettuata dai nostri collaboratori del Centro di Neurologia e Malattie Neurometaboliche dell'Università degli Studi di Siena. L'esame neurologico, effettuato all'inizio dello studio, ha rivelato per entrambi i pazienti un fenotipo clinico caratterizzato da una paraparesi spastica pura con un indice SPRS (*Spastic Paraplegia Rating Scale*) di 15/52 e 10/52, rispettivamente per Pz.1 e Pz.2 (con 0 si indica la situazione normale e con 52 quella più grave). Tramite MRI è stato possibile evidenziare in entrambi i soggetti zone di ipersegnale nella sostanza bianca periventricolare ed in quella del centro ovale. Nessuna alterazione è stata invece evidenziata a livello del midollo spinale. Lo studio dei potenziali evocati motori (MEP, *Motor Evoked Potential*) ha rivelato anomalie nel tempo di conduzione motorio tra corteccia e midollo spinale (CMCT, *Central Motor Conduction Time*), sia negli arti inferiori che in quelli superiori. L'elettromiografia è risultata normale.

Durante il periodo di follow-up (15 mesi) l'indice SPRS si è mantenuto stabile per entrambi i pazienti. L'MRI ha evidenziato un maggior coinvolgimento della sostanza bianca nel Pz.2, mentre nel Pz.1 è rimasta invariata. Lo studio dei MEP è risultato inconcludente. Nessun effetto collaterale è stato riscontrato (a parte l'iniziale reazione avversa alla statina nel Pz.2 che ha subito sospeso il farmaco).

FOLLOW-UP DEI LIVELLI PLASMATICI DI STEROLI ED OSSISTEROLI

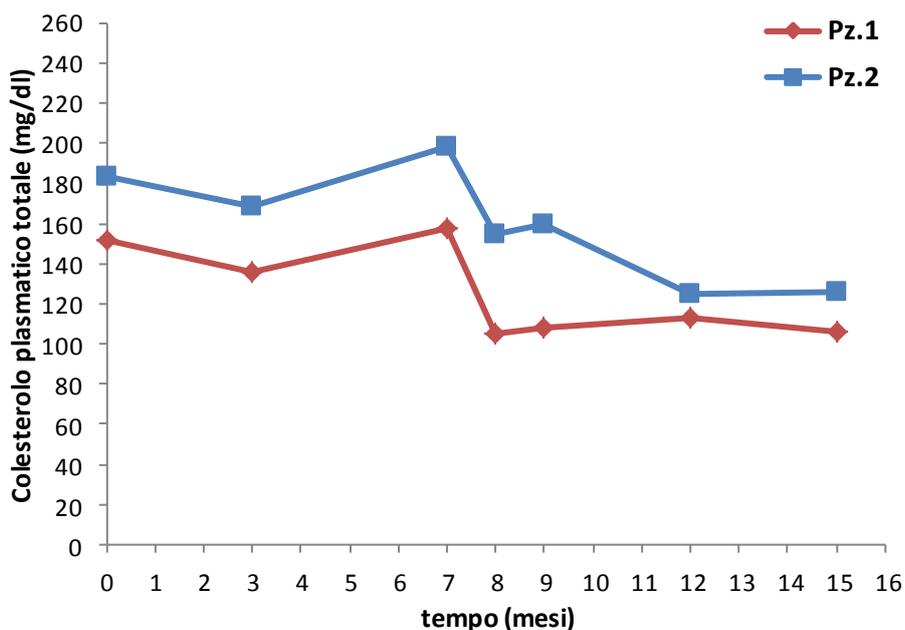
I risultati ottenuti circa i livelli plasmatici dei diversi steroli ed ossisteroli *markers* del metabolismo di colesterolo ed acidi biliari nei due pazienti SPG5 sono mostrati in Tabella 14.

I valori basali di colesterolo totale sono risultati nella norma (< 240 mg/dl) per entrambi i pazienti (Pz1: 152 mg/dl ; Pz.2: 184 mg/dl): nel Pz.1 il trattamento con statina (successivamente con l'aggiunta di ezetimibe) ha causato una riduzione del colesterolo plasmatico (valore finale: 113 mg/dl); nel Pz.2 invece tali valori si sono mantenuti costanti per tutto il periodo di non trattamento, per poi ridursi in seguito alla somministrazione di ezetimibe (valore finale: 126 mg/dl). L'andamento del colesterolo plasmatico totale in entrambi i pazienti è mostrato nel grafico 9.

SPG5 Follow-up

Mesi di terapia		Tipo di terapia	Col. (mg/dl)	27-OHC (µg/dl)	25-OHC (µg/dl)	24-OHC (µg/dl)	7αC4 (µg/dl)	Latosterolo (µg/dl) / (µg/100mg Col)	Campesterolo (µg/dl) / (µg/100mg Col).	Sitosterolo (µg/dl) / (µg/100mg Col)
t0	<u>Pz.1</u>	nessuna	152	87,9	4,4	2,7	2,1	64 / 42	135 / 89	358 / 236
	<u>Pz.2</u>	nessuna	184	159,1	8,0	5,4	1,1	196 / 107	141 / 77	353 / 192
3	<u>Pz.1</u>	simvastatina (20 mg/d)	136	78,7	5,7	3,3	3,2	42 / 31	149 / 110	280 / 206
	<u>Pz.2</u>	nessuna	169	205,3	9,9	4,9	5,6	137 / 81	100 / 59	244 / 144
7	<u>Pz.1</u>	simvastatina (40 mg/d)	158	58,3	3,3	3,0	0,3	38 / 24	187 / 118	340 / 215
	<u>Pz.2</u>	nessuna	198	143,0	5,2	3,5	1,2	159 / 80	132 / 67	297 / 150
8	<u>Pz.1</u>	simvastatina (60 mg/d)	105	59,7	3,6	3,3	0,5	37 / 35	132 / 126	284 / 270
	<u>Pz.2</u>	nessuna	155	162,6	5,8	3,5	0,7	149 / 96	144 / 93	308 / 199
9	<u>Pz.1</u>	simvastatina (60 mg/d)	108	59,5	3,1	2,3	0,6	32 / 30	191 / 177	479 / 444
	<u>Pz.2</u>	nessuna	160	158,4	4,8	3,7	2,2	121 / 76	83 / 52	251 / 157
12	<u>Pz.1</u>	simvastatina (40 mg/d)	113	47,6	2,9	3,8	0,5	43 / 38	253 / 224	487 / 430
	<u>Pz.2</u>	ezetimibe (10mg/d)	125	98,2	3,6	3,5	1,5	173 / 138	67 / 54	173 / 138
15	<u>Pz.1</u>	simv+ezet (40+10 mg/d)	106	37,5	2,1	3,0	0,5	39 / 37	85 / 82	193 / 182
	<u>Pz.2</u>	ezetimibe (10mg/d)	126	80,5	3,3	3,4	0,3	129 / 102	51 / 40	123 / 98

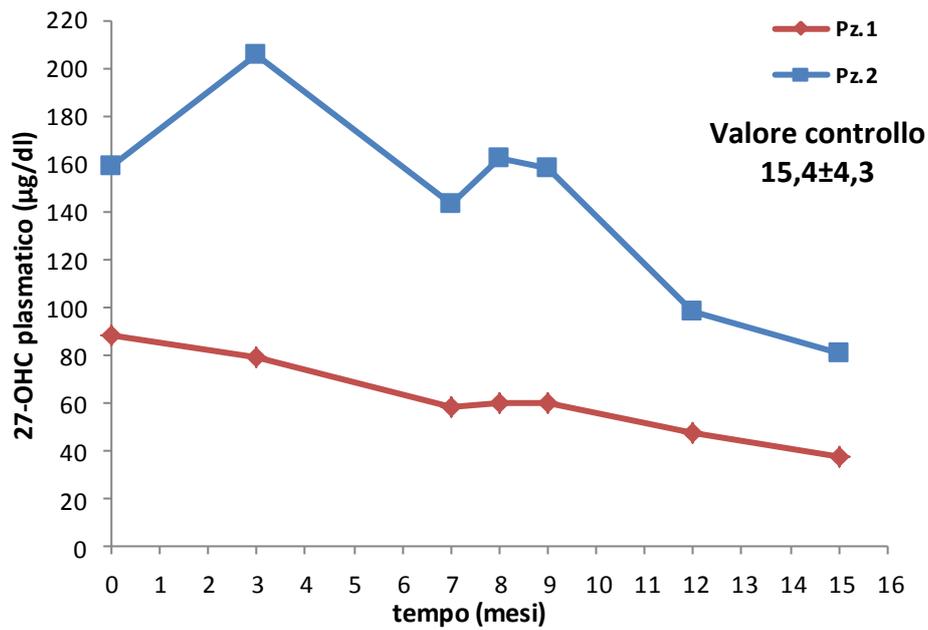
Tabella14. Dosaggio di steroli ed ossisteroli circolanti in una coppia di pazienti SPG5.



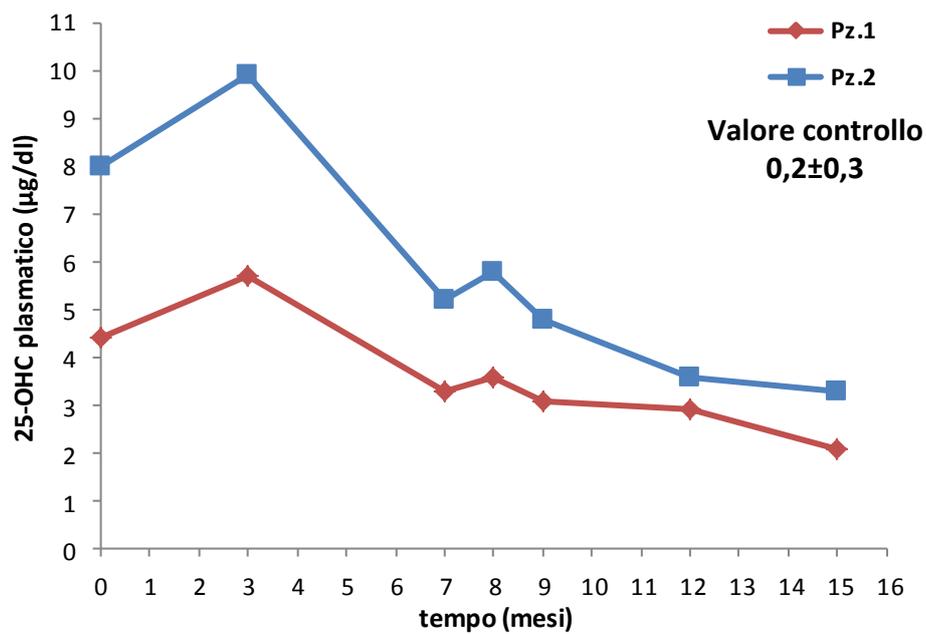
	Paziente1	Paziente 2
Basale	nessuna terapia	nessuna terapia
Mese 3	simvast 20mg	nessuna terapia
Mese 7	simvast 40mg	nessuna terapia
Mese 8	simvast 60mg	nessuna terapia
Mese 9	simvast 40mg	nessuna terapia
Mese 12	simvast 40mg	eze 10mg
Mese 15	simvast 40mg + eze 10mg	eze 10mg

Grafico 9. Valori plasmatici colesterolo totale in una coppia di pazienti SPG5.

Per ciò che concerne i dati relativi a 27-OHC e 25-OHC, è possibile osservare che in entrambi i pazienti i valori basali di 27-OHC sono risultati notevolmente più elevati (Pz.1: 88 $\mu\text{g/dl}$; Pz.2: 159 $\mu\text{g/dl}$) rispetto a quelli riportati in letteratura per soggetti controllo (15.4 \pm 4.3 $\mu\text{g/dl}$ [Dzeletovic S. et al., 1995]). Nel Pz.1 il trattamento con simvastatina sembra aver indotto una progressiva riduzione del valore plasmatico di quest'ossisterolo (da 88 a 48 $\mu\text{g/dl}$), riduzione che appare diventare più marcata quando a questo inibitore della sintesi di colesterolo è stato aggiunto l'ezetimibe, un inibitore dell'assorbimento (valori scesi fino a 37 $\mu\text{g/dl}$) (Grafico 10A). Anche nel Pz.2 il trattamento con il solo ezetimibe sembra causare una netta riduzione nei livelli di 27-OHC (da 159 a 80 $\mu\text{g/dl}$), livelli che erano rimasti sostanzialmente costanti rispetto al basale durante il periodo di non trattamento. In entrambi i casi, e specialmente per il Pz.2, i valori sono comunque rimasti marcatamente più elevati rispetto a quelli di soggetti controllo (Grafico 10A).



A



B

	Paziente1	Paziente 2
Basale	nessuna terapia	nessuna terapia
Mese 3	simvast 20mg	nessuna terapia
Mese 7	simvast 40mg	nessuna terapia
Mese 8	simvast 60mg	nessuna terapia
Mese 9	simvast 40mg	nessuna terapia
Mese 12	simvast 40mg	eze 10mg
Mese 15	simvast 40mg + eze 10mg	eze 10mg

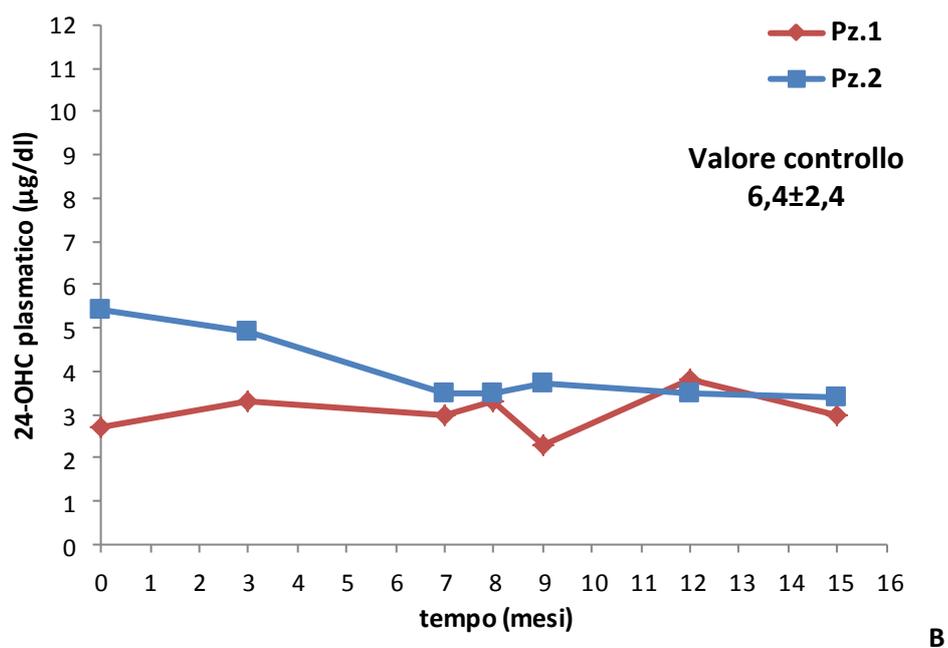
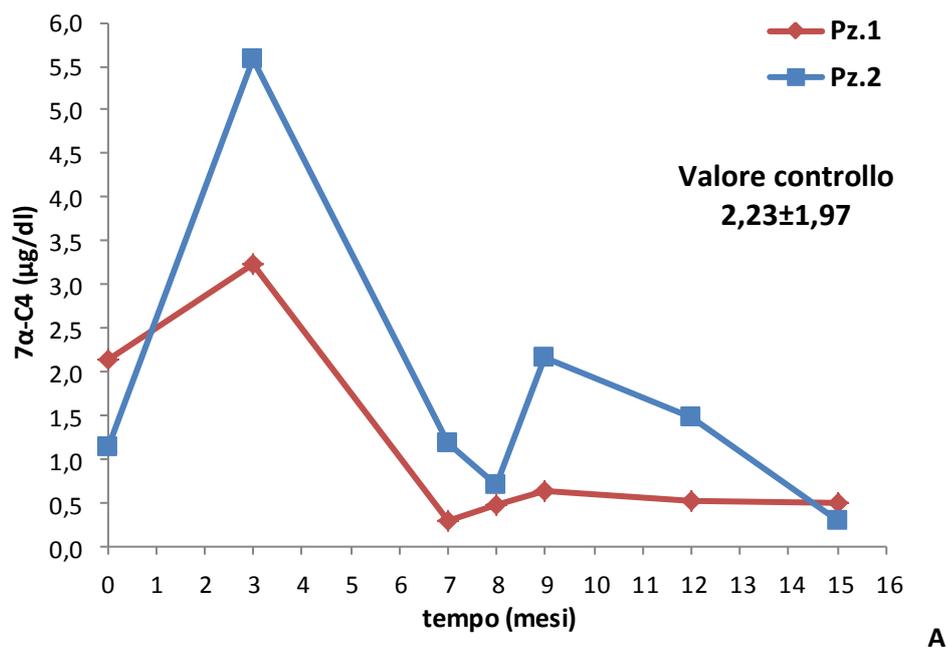
Grafico 10. Valori plasmatici di 27-idrossicolesterolo (A) e 25-idrossicolesterolo (B) in una coppia di pazienti SPG5.

E' possibile notare come, per entrambi i pazienti la riduzione di 27-OHC vada di pari passo con quella del colesterolo totale. L'analisi statistica, tramite calcolo del coefficiente di correlazione di Spearman, ha infatti evidenziato l'esistenza di una correlazione statisticamente significativa tra i valori di 27-OHC dei due pazienti e quelli di colesterolo totale ($\rho = 0,72$; $p < 0,01$).

Per quanto riguarda i valori plasmatici di 25-OHC, anche in questo caso è stato possibile notare una maggiore concentrazione basale di questo metabolita nei due pazienti SPG5 (4,4 e 8,8 $\mu\text{g/d}$) rispetto ai soggetti sani, dove normalmente la concentrazione risulta inferiore a 1 $\mu\text{g/dl}$ [Dzeletovic S. et al., 1995]. Durante il follow-up entrambi i pazienti hanno mostrato lo stesso andamento di riduzione nei livelli di quest'ossisterolo, senza apparente correlazione con il trattamento farmacologico: nel Pz.2 il 25-OHC si riduce anche in assenza di alcuna terapia (Grafico 10B). Anche per questo metabolita si è comunque evidenziata una correlazione statisticamente significativa con i livelli plasmatici di colesterolo totale ($\rho = 0,74$; $p < 0,01$). Inoltre i valori 25-OHC e 27-OHC sono risultati strettamente correlati tra loro ($\rho = 0,89$; $p \ll 0,01$).

Per ciò che concerne gli altri ossisteroli, il 7 α C4 (indicatore dell'attività della via classica di sintesi degli acidi biliari) non ha mostrato particolari alterazioni nei suoi livelli plasmatici basali, così come non sembra ci sia stato un particolare effetto della terapia, ad eccezione forse di una certa tendenza alla diminuzione (in parallelo alla riduzione del colesterolo totale) (Grafico 11A).

Anche il 24-OHC (indicatore del catabolismo del colesterolo cerebrale) è risultato sostanzialmente costante nel tempo, sebbene i livelli plasmatici ottenuti, sembrano essere complessivamente un po' più bassi rispetto a quelli riportati in letteratura (6,4 \pm 2,4 $\mu\text{g/dl}$ [Dzeletovic S. et al., 1995]) (Grafico 11B). Non sono emerse correlazioni significative tra i valori di questi ossisteroli e quelli di colesterolo totale o degli altri metaboliti *markers* dosati.



	Paziente1	Paziente 2
Basale	nessuna terapia	nessuna terapia
Mese 3	simvast 20mg	nessuna terapia
Mese 7	simvast 40mg	nessuna terapia
Mese 8	simvast 60mg	nessuna terapia
Mese 9	simvast 40mg	nessuna terapia
Mese 12	simvast 40mg	eze 10mg
Mese 15	simvast 40mg + eze 10mg	eze 10mg

Grafico 11. Valori plasmatici di 7-idrossicolest-4-en-3-one (A) e 24-idrossicolessterolo (B) in una coppia di pazienti SPG5.

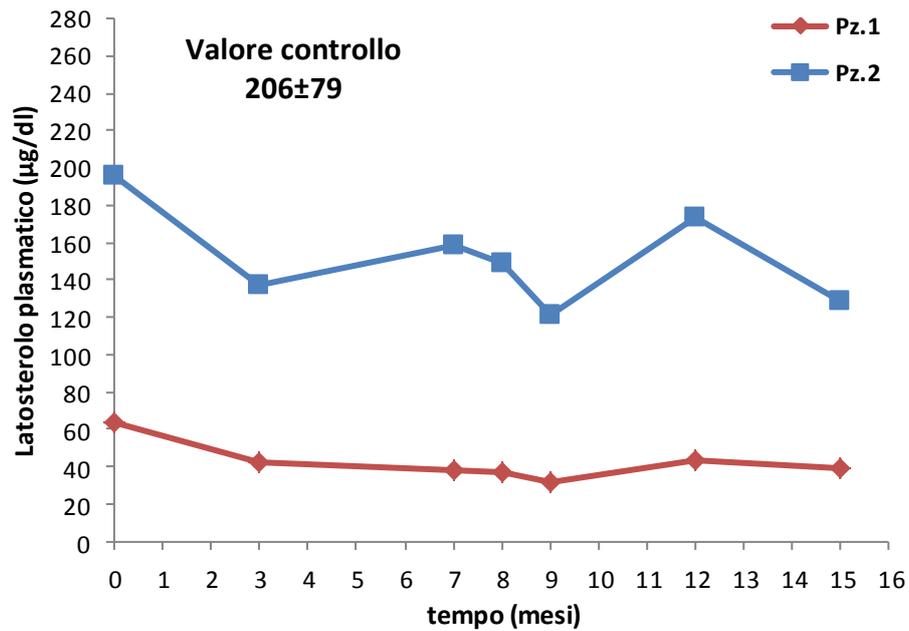
Infine l'analisi dei livelli di latosterolo e steroli vegetali di entrambi i pazienti non ha mostrato evidenti alterazioni basali dei processi di sintesi endogena e assorbimento intestinale di colesterolo, anche se nel Pz.1 i valori basali di latosterolo sono risultati più bassi rispetto ai valori di riferimento ed entrambi i pazienti hanno mostrato livelli di fitosteroli ridotti rispetto a quelli medi riportati in letteratura. Tuttavia, data la limitatezza dei soggetti analizzati, questi risultati non permettono di affermare la presenza di alterazioni nella sintesi endogena e/o nell'assorbimento di colesterolo, in quanto è possibile che tale situazione sia dovuta esclusivamente a caratteristiche biologiche specifiche di questi soggetti.

Anche in questo caso, per il follow-up, sono stati considerati sia i valori assoluti che quelli normalizzati per 100 mg di colesterolo (Tabella 14).

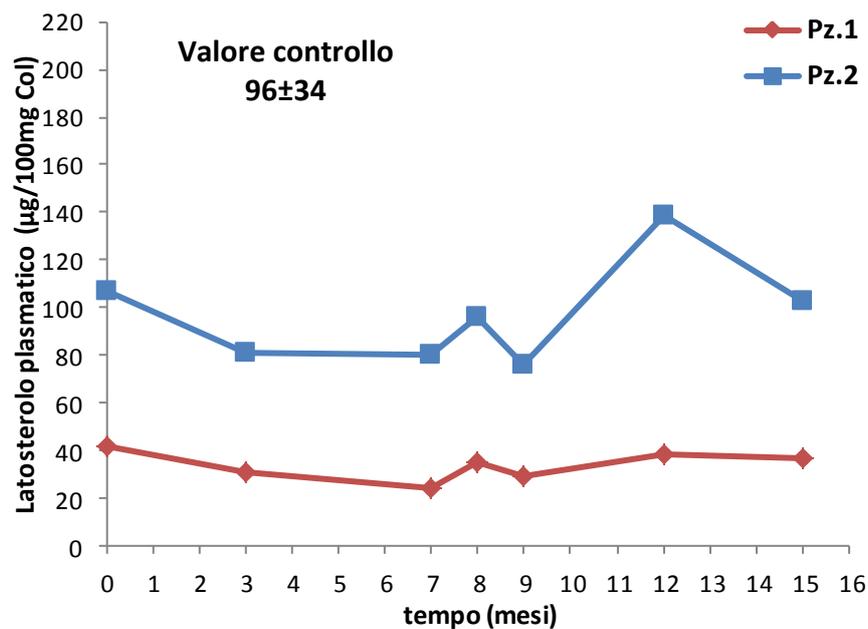
Durante il follow-up i valori di latosterolo nel Pz.1 sono diminuiti, in relazione con la somministrazione della statina, indicando (come atteso) una riduzione della sintesi di colesterolo. A partire dai 7 mesi di trattamento i valori assoluti di tale metabolita si sono mantenuti sostanzialmente costanti nel tempo, indicando il raggiungimento della massima inibizione dell' HMG-CoA reduttasi con una dose di simvastatina pari a 40 mg/d (Grafico 12A). Anche i valori normalizzati hanno mostrato sostanzialmente lo stesso andamento sebbene con la presenza di maggiori fluttuazioni, dovute probabilmente al contemporaneo effetto della statina sui valori plasmatici di colesterolo totale (Grafico 12B). Il Pz.2 (che non ha assunto la statina) non ha invece mostrato nessun andamento particolare nei valori di latosterolo (né assoluti, né normalizzati).

Per ciò che concerne invece i valori di fitosteroli, l'andamento è risultato più variabile, tuttavia, in entrambi i pazienti la somministrazione di ezetimibe ha provocato una riduzione del campesterolo e del sitosterolo plasmatici. Anche in questo caso sono stati riportati sia i valori assoluti (Grafici 13A e 14A) sia quelli normalizzati per 100 mg di colesterolo totale (Grafici 13B e 14B).

Non sono state riscontrate correlazioni significative tra i livelli di latosterolo e fitosteroli e gli altri metaboliti analizzati.



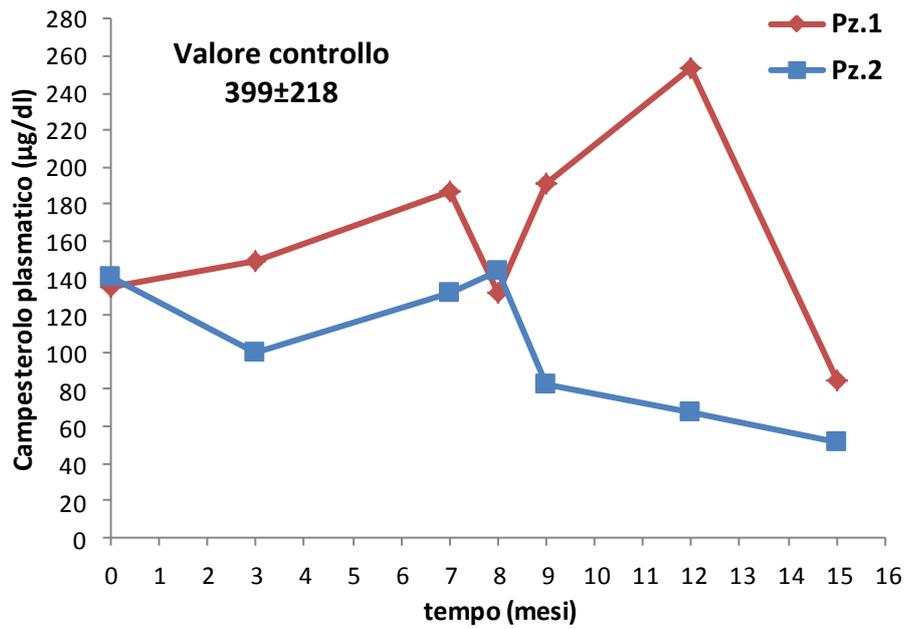
A



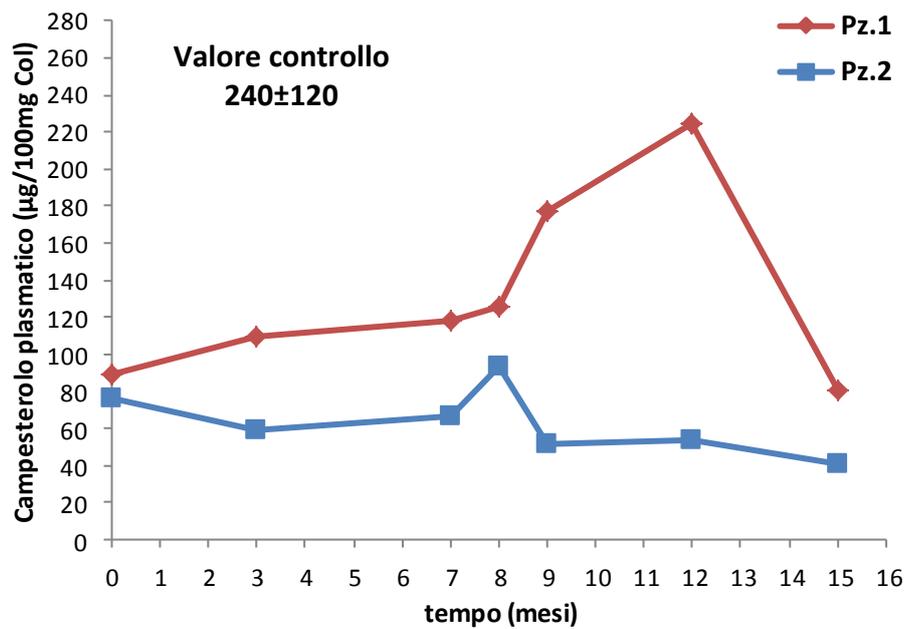
B

	Paziente1	Paziente 2
Basale	nessuna terapia	nessuna terapia
Mese 3	simvast 20mg	nessuna terapia
Mese 7	simvast 40mg	nessuna terapia
Mese 8	simvast 60mg	nessuna terapia
Mese 9	simvast 40mg	nessuna terapia
Mese 12	simvast 40mg	eze 10mg
Mese 15	simvast 40mg + eze 10mg	eze 10mg

Grafico 12. Valori plasmatici di latosterolo assoluti (A) e normalizzati (B) in una coppia di pazienti SPG5.



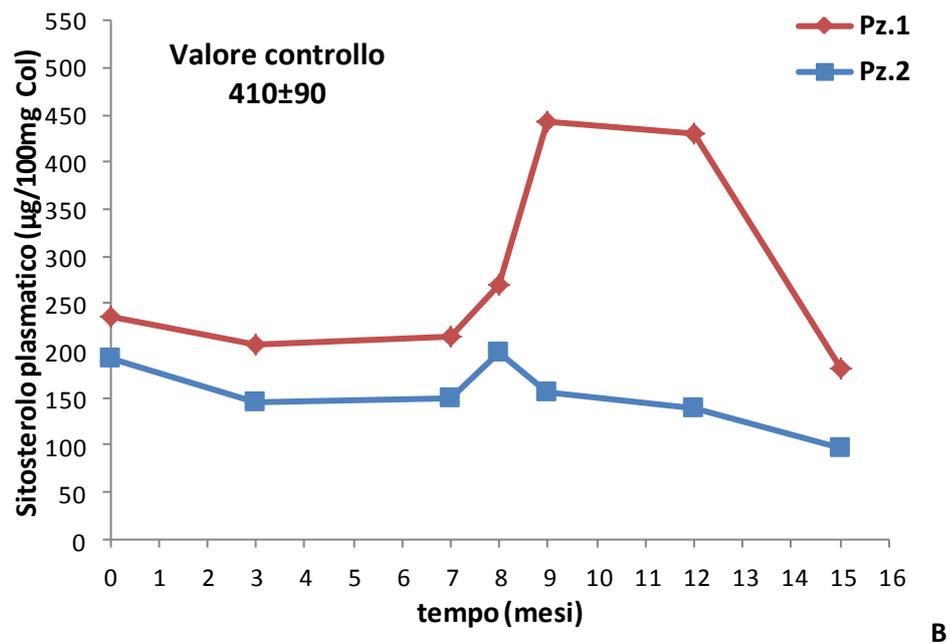
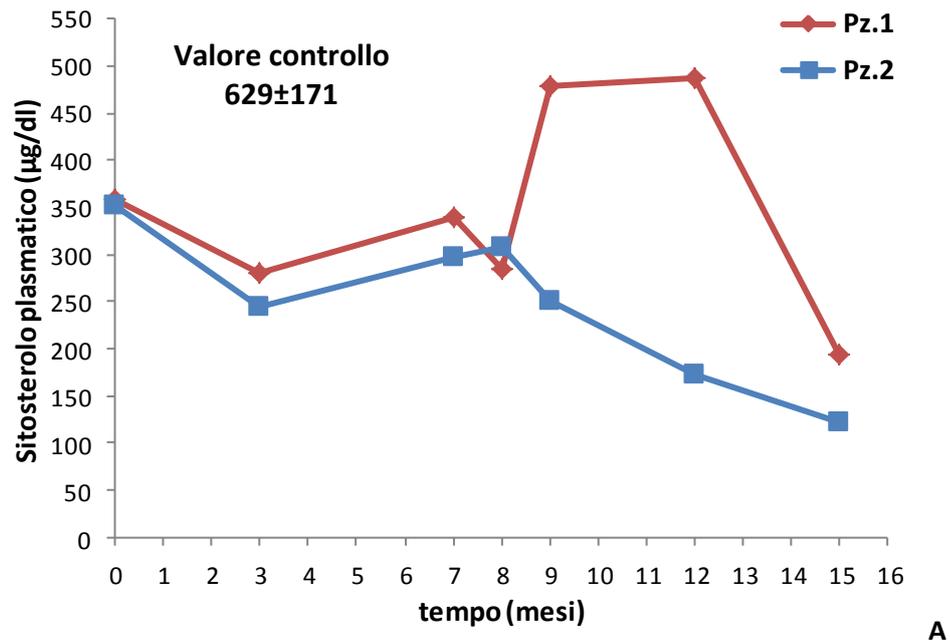
A



B

	Paziente1	Paziente 2
Basale	nessuna terapia	nessuna terapia
Mese 3	simvast 20mg	nessuna terapia
Mese 7	simvast 40mg	nessuna terapia
Mese 8	simvast 60mg	nessuna terapia
Mese 9	simvast 40mg	nessuna terapia
Mese 12	simvast 40mg	eze 10mg
Mese 15	simvast 40mg + eze 10mg	eze 10mg

Grafico 13. Valori plasmatici di campesterolo assoluti (A) e normalizzati (B) in una coppia di pazienti SPG5.



	Paziente1	Paziente 2
Basale	nessuna terapia	nessuna terapia
Mese 3	simvast 20mg	nessuna terapia
Mese 7	simvast 40mg	nessuna terapia
Mese 8	simvast 60mg	nessuna terapia
Mese 9	simvast 40mg	nessuna terapia
Mese 12	simvast 40mg	eze 10mg
Mese 15	simvast 40mg + eze 10mg	eze 10mg

Grafico 14. Valori plasmatici di sitosterolo assoluti (A) e normalizzati (B) in una coppia di pazienti SPG5.

PAZIENTI AD

Da ultimo riportiamo anche i valori di steroli ed ossisteroli ottenuti su un gruppo di pazienti Alzheimer (Tabella 15), la cui analisi è stata effettuata principalmente per verificare se processi neurodegenerativi fossero effettivamente accompagnati da una riduzione del 24-OHC (come riportato in letteratura). A tal fine abbiamo analizzato campioni di plasma di 15 soggetti con AD conclamato e li abbiamo confrontati con quelli di 32 soggetti sani ultrasessantenni (provenienti da un precedente studio). I valori di ossisteroli sono risultati differenti nei due gruppi: i soggetti AD hanno mostrato ridotti livelli sia di 24-OHC ($p < 0,001$), sia di 27-OHC ($p < 0,01$) rispetto ai soggetti controllo (Grafico 15). Nessuna differenza significativa è invece emersa per gli altri metaboliti *markers* analizzati. Non sono inoltre state evidenziate correlazioni significative tra i dati di metabolismo del colesterolo ed i parametri clinici della malattia.

		AD (n = 15)	CTRL (n = 32)
24-OHC (µg/dl)	<i>IQR (mediana) media±ds</i>	4,1-5,2 (4,6) ^{***} 4,8±1,1	6,2-10,6 (8,5) 8,7±3,4
27-OHC (µg/dl)	<i>IQR (mediana) media±ds</i>	12,6-18,6 (15,7) ^{**} 15,7±3,7	16,3-27,3 (21,8) 22,0±8,2
7αC4 (µg/dl)	<i>IQR (mediana) media±ds</i>	0,8-1,55 (0,97) 1,6±1,4	0,6-1,2 (0,9) 1,0±0,8
Latosterolo (µg/dl)	<i>IQR (mediana) media±ds</i>	114-184 (158) 163±88	126-214 (175) 178±73
(µg/100mg Col)	<i>IQR (mediana) media±es</i>	61-84 (77) 73±31	61-93 (80) 86±45
Campesterolo (µg/dl)	<i>IQR (mediana) media±ds</i>	191-349 (225) 267±128	184-577 (340) 417±311
(µg/100mg Col)	<i>IQR (mediana) media±es</i>	92-163 (120) 126±57	86-229 (141) 186±140
Sitosterolo (µg/dl)	<i>IQR (mediana) media±ds</i>	398-833 (542) 651±356	414-1255 (803) 926±661
(µg/100mg Col)	<i>IQR (mediana) media±ds</i>	185-411 (245) 310±176	190-498 (345) 406±287

Tabella15. Dosaggio di steroli ed ossisteroli circolanti in un gruppo di 15 pazienti AD e di 32 soggetti sani ultrasessantenni. I dati sono riportati sia come *range* interquartile (IQR) e mediana, sia come *media±ds*. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

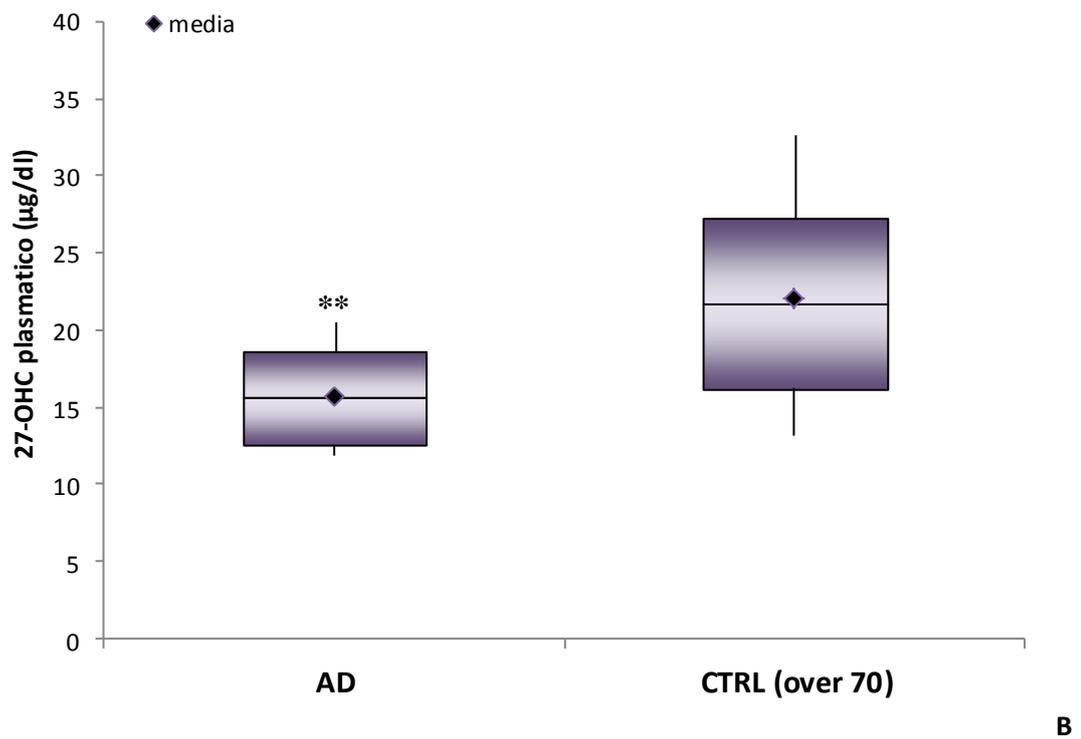
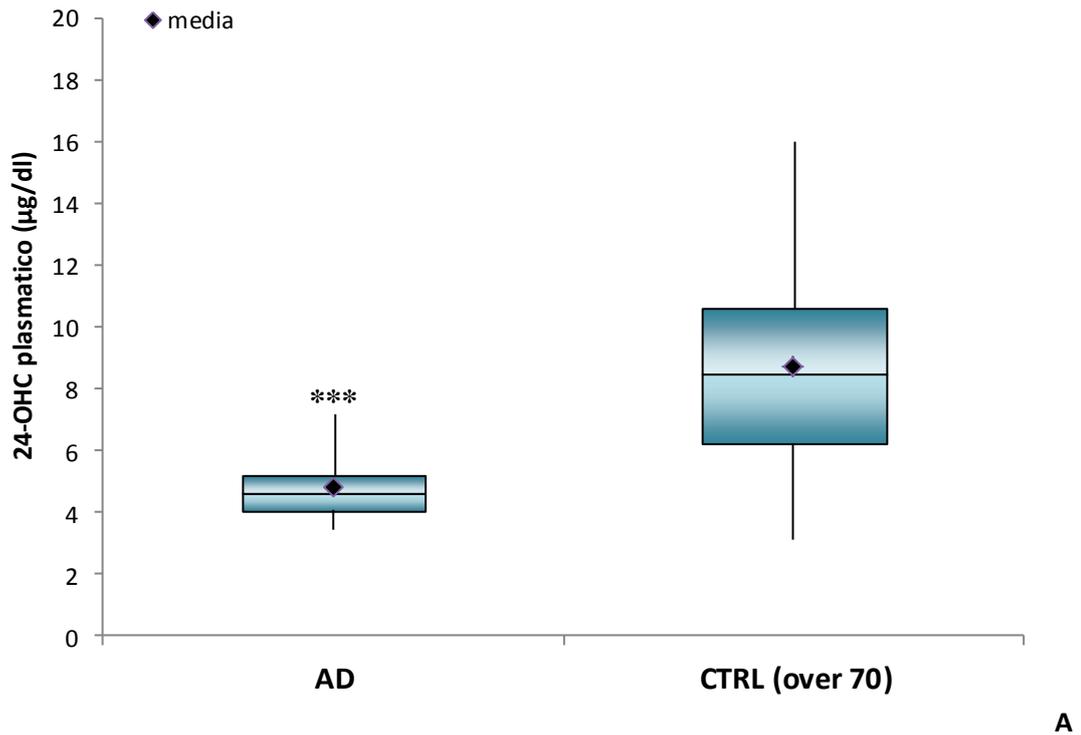


Grafico 15. Valori plasmatici di 24-OHC (A) e 27-OHC (B) in un gruppo di 15 pazienti AD e di 32 soggetti sani ultrasessantenni. I dati sono riportati come *box-plot* (range interquartile, mediana, valore minimo e massimo) e come media. $**$ $p < 0,01$; $***$ $p < 0,001$

DISCUSSIONE

L'applicazione di tecniche di analisi in GC-MS per il dosaggio della concentrazione plasmatica di ossisteroli e steroli non-colesterolici rappresenta una metodica semplice ed efficace per monitorare il metabolismo del colesterolo in situazioni nelle quali è difficile (o impossibile) l'applicazione di metodi di misura *in vivo*, ossia quando si debbono analizzare ampie popolazioni di soggetti oppure per gli studi di follow-up (soprattutto se retrospettivi). In questa tesi di dottorato tale tecnica è stata applicata su un gruppo di pazienti CTX e su una coppia di soggetti probandi SPG5 al fine di indagare le modificazioni del metabolismo del colesterolo associate a queste due malattie genetiche, valutare l'effetto di specifici trattamenti farmacologici ed indagare la relazione tra biochimica di questi processi ed evoluzione clinica della patologia.

La ricerca che abbiamo condotto sulla CTX rappresenta, al momento, l'unico report circa le modificazioni dei valori plasmatici dei principali steroli ed ossisteroli circolanti osservate su una popolazione di pazienti relativamente ampia (casistica di livello nazionale), e con periodo di follow-up che, complessivamente, risulta di oltre 10 anni. Il motivo di quest'estesa indagine era derivato dalla necessità di ottenere dati circa le alterazioni del metabolismo del colesterolo tipiche della CTX che andassero al di là di semplici casi report, in modo da poter consolidare le conoscenze a riguardo ed eventualmente indagare la presenza di correlazioni tra il profilo degli steroli plasmatici e la situazione clinica dei pazienti.

Il primo sterolo preso in considerazione per questo studio è stato, ovviamente, il colestano plasmatico, in quanto metabolita considerato patognomico della CTX. Considerando le distribuzioni di valori plasmatici di colestano ottenute per i diversi periodi di trattamento possiamo confermare, anche su un ampio numero di soggetti, sia l'evidente incremento basale dei valori ematici di questo metabolita, sia la successiva riduzione in seguito alla somministrazione di CDCA 750 mg/d. Questo dato risulta quindi in perfetto accordo con quanto già riportato da precedenti studi circa l'efficacia della somministrazione di acidi biliari esogeni nel limitare l'accumulo di colestano [si veda come *review* Shuke N. et al., 2014]. L'aspetto ulteriore che, grazie a questa specifica ricerca, abbiamo potuto verificare è stata la sostanziale stabilità dei valori plasmatici di questo derivato del colesterolo anche sul lungo periodo di trattamento. L'effettivo ruolo giocato dal colestano nella

patogenesi e progressione della CTX rimane, tuttavia, difficile da determinare. I livelli basali di colestano, infatti, non si sono rivelati indicativi della situazione clinica dei pazienti al momento della diagnosi: nessuna correlazione è stata, infatti, riscontrata tra i valori di questo derivato del colesterolo, gli indici EDSS e RS, la presenza di determinati sintomi neurologici e/o la risposta clinica del paziente alla terapia sostitutiva con acidi biliari. Inoltre anche la sostanziale normalizzazione dei valori plasmatici di colestano, in seguito al trattamento con CDCA, non è stata sempre accompagnata da una stabilità dei pazienti da un punto di vista clinico. Infatti, sebbene la totalità dei soggetti abbia mostrato una riduzione significativa del colestano plasmatico, il 36% dei pazienti ha subito un peggioramento progressivo ed apparentemente inarrestabile della patologia, e questa situazione non è risultata correlata con i livelli plasmatici di colestano. Questo dato è in accordo con quanto riportato da una recente ricerca (di livello nazionale) condotta in Spagna nel 2011, dove su una popolazione di 25 pazienti CTX (retrospettivamente analizzati) solo il 28% dei soggetti aveva mostrato una situazione di sostanziale stabilità, mentre ben il 60% aveva subito un progressivo declino, nonostante la normalizzazione dei livelli plasmatici di colestano [Pilo-de-la-Fuente B. et al., 2011]. Nel complesso questi risultati sembrano consolidare l'ipotesi che la terapia con CDCA, sebbene efficace nel limitare l'accumulo di colestano, non sia spesso sufficiente ad arrestare i processi neurodegenerativi tipici della CTX.

Sebbene il colestano sia il metabolita caratteristico di questa patologia esso, tuttavia, non è né il solo né (probabilmente) il primo sterolo la cui concentrazione plasmatica viene alterata in seguito alla mutazione dell'enzima CYP27A1. Studi precedenti, condotti su piccoli gruppi di pazienti, avevano infatti riportato come questi soggetti presentassero anche elevati valori basali di $7\alpha C4$, secondo intermedio della via classica di sintesi degli acidi biliari e *marker* dell'attività dell'enzima CYP7A1 [Björkhem I. et al., 1997 ; DeBarber A.E. et al., 2010; Matysik S. et al., 2011]. Inoltre, tramite il lavoro di Panzenboeck e colleghi si è rafforzata l'ipotesi che la maggior parte del colestano presente negli xantomi dei pazienti CTX si origini proprio dalla conversione di questo metabolita [Panzenboeck U. et al., 2007]. Per tale motivo abbiamo ritenuto fondamentale la raccolta a lungo termine dei dati sui valori ematici di $7\alpha C4$ nella popolazione oggetto di studio, considerando anche il fatto che al momento le osservazioni su questo metabolita nei soggetti CTX sono molto limitate. I risultati che abbiamo ottenuto circa i valori basali di $7\alpha C4$, ed il suo

andamento in seguito alla terapia con acidi biliari, sono risultate in gran parte in linea con i pochi report precedenti: valori assai elevati al momento della diagnosi e successiva riduzione in seguito all'assunzione di CDCA. Tutti i pazienti CTX da noi analizzati hanno quindi mostrato un'iperstimolazione della via classica di sintesi degli acidi biliari. Tale alterazione biochimica nei soggetti CTX era attesa poiché la carenza di CDCA, causata dalla perdita di funzione dell'enzima mutato, riduce l'azione di inibizione a feedback su CYP7A1, con conseguente iperstimolazione di questo *pathway* metabolico. L'inibizione viene ripristinata in seguito all'assunzione di acidi biliari esogeni, e tale effetto si osserva come riduzione dei valori ematici di 7 α C4. Nel complesso l'andamento di questo metabolita è risultato abbastanza speculare a quello del colestano, come anche confermato dalla correlazione significativa osservata tra i valori plasmatici di questi due metaboliti. Quest'ultimo dato potrebbe fornire un'ulteriore conferma del probabile ruolo del 7 α C4 in qualità di precursore del colestano. Occorre comunque sottolineare che i valori di 7 α C4, sebbene significativamente ridotti dall'assunzione di CDCA, non si sono normalizzati in tutti i soggetti ed un certo grado di accumulo è stato riscontrato in diversi pazienti analizzati. Questo potrebbe suggerire che la dose di CDCA normalmente somministrata per la terapia della CTX (750 mg/d) potrebbe non essere sufficiente per inibire efficacemente l'attività di CYP7A1 in tutti i soggetti. La possibilità di valutare periodicamente i valori ematici di questo metabolita per decidere un eventuale aggiustamento della terapia potrebbe dunque essere presa in considerazione.

Se da un punto di vista puramente biochimico l'analisi di quest'ossisterolo ha dato sostanziale conferma di quanto già segnalato da casi report, l'altro aspetto che ci premeva evidenziare era capire se ci fossero correlazioni tra i valori plasmatici di 7 α C4, sintomi neurologici e decorso della malattia. Delle differenze significative, almeno tra pazienti stabili ed in peggioramento erano ipotizzabili, considerando quanto riportato da uno studio recente circa la capacità del 7 α C4 di attraversare la BBB ed accumularsi nel tessuto cerebrale [Båvner A. et al., 2010]. L'analisi statistica, tuttavia, ha rivelato solo una lieve tendenza (non significativa) dei soggetti che hanno subito un aggravamento della malattia ad avere valori basali di 7 α C4 più elevati rispetto a quelli dei pazienti rimasti stabili. Nessuna differenza è invece emersa sul medio e lungo periodo di trattamento. Anche in questo caso non è stato, quindi, possibile dimostrare che il peggioramento riscontrabile in più di un terzo dei

soggetti esaminati fosse causato da una minore efficacia della terapia nel ridurre la concentrazione plasmatica di questo metabolita. E' possibile che la tendenza ad una maggiore variabilità biologica di questo parametro ed il numero comunque limitato di soggetti di cui erano disponibili i campioni basali (n=19) possa in effetti non aver permesso un'adeguata analisi statistica. Inoltre allo stato attuale non vi sono dati sperimentali sulla potenziale neurotossicità di quest'ossisterolo. Perciò il ruolo del 7 α C4 nello sviluppo della patologia necessita di ulteriori studi per essere meglio definito.

Risultati interessanti sarebbero potuti emergere anche circa i valori plasmatici di 24-OHC, in quanto *marker* dell'omeostasi del colesterolo cerebrale e di processi neurodegenerativi. Considerando i tipici sintomi neurologici della CTX ed il danno provocato a livello cerebrale dall'accumulo di colestano, significative variazioni nei livelli sierici di quest'ossisterolo erano attese. Tuttavia, ad eccezione di un unico e particolare caso, i dati ottenuti non hanno permesso di evidenziare particolari modificazioni a carico di questo metabolita, la cui concentrazione plasmatica non sembra influenzata dalla patologia e/o della terapia sostitutiva con CDCA. Non è emersa inoltre nessuna correlazione tra i valori di quest'ossisterolo ed i sintomi neurologici della malattia, né una differenza sostanziale tra pazienti stabili e pazienti in peggioramento. L'unico caso in cui il 24-OHC ha mostrato un andamento particolare è stato quello della bambina CTX seguita dall'età di 6 mesi fino a 7 anni. In questo soggetto i valori di 24-OHC erano inizialmente 10 volte più alti rispetto a quelli di soggetti controlli adulti e si sono progressivamente ridotti nel tempo. Tale andamento, tuttavia, risulta ampiamente spiegabile esclusivamente sulla base della crescita del soggetto. E' stato infatti riportato che durante l'infanzia i livelli di 24-OHC risultano fisiologicamente più elevati rispetto all'età adulta [Lütjohann D. et al., 1996] e questo sembra dovuto ad una difficoltà di smaltimento di questo metabolita causata da una disproporzione tra le dimensioni del fegato (più piccolo) e del cervello (più grande) nell'infanzia [Bretillon L. et al., 2000]. Anche in questo caso quindi non è stato possibile evidenziare una modificazione dei livelli di 24-OHC che fosse specificamente correlata con la patologia. Tale situazione si differenzia profondamente da quanto invece riscontrato in un gruppo di 15 pazienti AD, dove i livelli di 24-OHC si sono mostrati significativamente ridotti rispetto ad un gruppo di soggetti controllo ultrasettantenni. Tale risultato, in accordo con studi precedenti [Kölsch H. et al., 2004 ; Solomon A. et al., 2009], ci ha permesso di

confermare la presenza di modificazioni nei valori di quest'ossisterolo in seguito a processi neurodegenerativi, sebbene anche in questo caso non si siano evidenziate correlazioni tra livelli di questo metabolita e stato clinico dei pazienti. La mancata osservazione di alterazioni a carico del 24-OHC nei pazienti CTX è stata quindi piuttosto inattesa. Occorre osservare, tuttavia, che i processi neurodegenerativi che si accompagnano alla CTX non possono, probabilmente, essere accomunati per entità di danno a quelli della malattia di Alzheimer. Inoltre anche le aree cerebrali colpite sono differenti: l'AD interessa prevalentemente la sostanza grigia di ippocampo e neocorteccia; nella CTX l'accumulo di colestano è prevalente nella sostanza bianca del cervelletto. E' ragionevole ipotizzare che il metabolismo del colesterolo sia differente in queste aree cerebrali e che quindi, danni a queste zone si riflettano in maniera diversa sui livelli di 24-OHC. Al momento non ci sono studi circa l'attività della 24-idrossilasi nella sostanza bianca del cervelletto, nuove ricerche sarebbero quindi necessarie per valutare il metabolismo del colesterolo nelle aree cerebrali preferenzialmente colpite da questa patologia. E' tuttavia noto che la 24-idrossilasi non è espressa nell'assone delle cellule neuronali [Ramirez D.M. et al. 2008] e nemmeno negli oligodendrociti che formano la guaina mielinica [Lund E.G. et al, 1999], per cui è possibile che la deposizione di steroli a livello della sostanza bianca incida poco sui processi catabolici del colesterolo cerebrale.

Inconcludente si è rivelata anche la verifica della possibilità di una produzione residua di 27-OHC nei pazienti CTX. Questo metabolita, essendo il prodotto diretto dell'enzima mutato (CYP27A1), è virtualmente assente nel plasma di questi soggetti. Non è tuttavia possibile escludere a priori che una piccola quantità di quest'ossisterolo possa comunque essere prodotta per incompleta inattivazione dell'enzima. Le analisi a riguardo si sono, in ogni caso, rivelate poco significative: in alcuni campioni è stato possibile evidenziare tracce di quest'ossisterolo (a concentrazioni nettamente inferiori rispetto al normale), ma nella maggior parte dei casi esso è risultato al di sotto della soglia di determinabilità. Non è stato quindi possibile verificare se il differente quadro e decorso clinico dei soggetti fosse in qualche modo correlato ad una differente produzione residua di 27-OHC, che alcuni studi hanno rivelato essere anche un importante molecola segnale [Schroepfer G.J. Jr., 2000 ; Wollam J. e Antebi A., 2011]. A tale riguardo è interessante notare come i 15 soggetti AD analizzati abbiamo mostrato livelli di 27-OHC significativamente ridotti rispetto ai controlli ultrasettantenni, lasciando quindi presupporre che

alterazioni a livello del metabolismo periferico del colesterolo potrebbero essere correlate a fenomeni neurodegenerativi. Questo dato, in accordo con quanto già riportato da due precedenti studi [Leoni V. et al., 2004 ; Solomon A. et al., 2009], pare evidenziare come il 27-OHC possa giocare un ruolo importante nell'omeostasi del tessuto cerebrale, sebbene ancora da definire.

Dati interessanti sono invece emersi circa i valori plasmatici di latosterolo e steroli vegetali, *markers* di sintesi endogena ed assorbimento intestinale (rispettivamente). Tutti questi metaboliti hanno, infatti, mostrato un andamento per certi versi simile a quello evidenziato per colestano e 7 α C4: valori più elevati dei controlli al momento della diagnosi e riduzione in seguito alla terapia. La presenza di elevati livelli di steroli non-colesterolici in pazienti CTX era già stata riportata da due precedenti studi, sebbene su di un numero di soggetti più limitato [Kuriyama M. et al., 1991 ; de Sain-van der Velden M.G.M. et al., 2008]. Nel complesso questi dati sembrerebbero confermare che tale caratteristica è propria della patologia, considerando anche il fatto che nei soggetti sani latosterolo e fitosteroli risultano inversamente correlati tra loro [Miettinen T.A. et al., 1990]. L'entità dell'aumento di questi steroli nei pazienti CTX non trattati è comunque risultata minore rispetto a quella osservata per colestano e 7 α C4: 3-4 volte per il latosterolo e 1,5-2 volte per i fitosteroli, rispetto a 10 volte per il colestano e 100 volte per il 7 α C4. Questo differenzia la CTX da altre malattie da accumulo di steroli come la sitosterolemia e la latosterolosi, dove l'accumulo dei rispettivi metaboliti è decisamente più elevato [Escolà-Gil J.C. et al., 2014 ; Krakowiak P.A. et al., 2003]. Gli alti valori basali di latosterolo suggeriscono che nei pazienti CTX non trattati la sintesi endogena di colesterolo è incrementata. Questa situazione potrebbe essere dovuta alla stimolazione della HMG-CoA reduttasi indotta, a livello epatico, dal continuo consumo di colesterolo per iperattività dell'enzima CYP7A1. In altre parole la mancata inibizione della via classica di sintesi degli acidi biliari provocherebbe una diminuzione dei livelli intracellulari di colesterolo con conseguente attivazione della via di sintesi "de-novo". Tale ipotesi sembrerebbe supportata da due precedenti studi condotti sia su modelli murini che sull'uomo. Nel primo studio si era evidenziato come topi transgenici over esprimenti l'enzima CYP7A1, mostrassero un incremento dell'attività dell'HMG-CoA reduttasi e di tutta una serie di altri enzimi lipogenici [Miyake J.H., et al., 2001]. Il secondo studio, condotto invece su un gruppo di soggetti con ipercolesterolemia primaria, aveva mostrato come l'inibizione

farmacologica del riassorbimento dei sali biliari stimolasse la sintesi degli stessi ed, in parallelo, anche quella del colesterolo [Bertolotti M. et al., 2003]. Sembrerebbe dunque che sintesi di colesterolo e sintesi degli acidi biliari tendano a modificarsi in parallelo, come anche evidenziato dalla riduzione del latosterolo plasmatico in seguito all'assunzione di CDCA, riduzione che procede parallelamente a quella del 7 α C4 (correlazione positiva osservata tra i due metaboliti).

Di più difficile interpretazione sono invece i dati ottenuti circa i fitosteroli. La concentrazione plasmatica di questi composti, in particolare in rapporto al colesterolo totale, è infatti considerata *marker* di assorbimento intestinale di colesterolo. E' tuttavia difficile spiegare come i soggetti CTX non trattati possano avere un aumentato assorbimento di colesterolo, poiché in assenza di un adeguato *pool* di sali biliari i composti lipidici, tra cui il colesterolo, sono generalmente mal assorbiti. Gli aumentati livelli basali di fitosteroli da noi osservati potrebbero quindi essere dovuti ad altri fattori e non essere in realtà strettamente correlati ad un aumentato *uptake* di colesterolo a livello enterico. L'ipotesi che sembra più probabile è che quest'accumulo di fitosteroli possa essere dovuto ad una difficoltà nella loro escrezione. In effetti, alcuni studi condotti su topi KO per il recettore FXR hanno evidenziato come questi animali mostrino una ridotta espressione dei trasportatori ABCG5/G8 che a livello epatico e intestinale mediano l'escrezione di fitosteroli [Lambert G. et al., 2003] e la cui mutazione è la causa genetica della sitosterolemia [Berge K.E. et al., 2000; Lee M.H. et al., 2001]. Poiché il recettore FXR è attivato dagli acidi biliari, in particolare dal CDCA, è possibile ipotizzare che nei soggetti CTX la mancanza del ligando riduca il segnale mediato da FXR con conseguente ridotta espressione di questi due trasportatori; conseguentemente questo provocherebbe un innalzamento della sitosterolemia, innalzamento che viene in seguito contrastato con il ripristino del normale pool di acidi biliari. Non è possibile, tuttavia, escludere che effettivamente la CTX possa accompagnarsi ad un aumento di assorbimento intestinale di colesterolo; solo misurazioni *in vivo* potrebbero permettere di chiarire questo aspetto.

Anche riguardo a latosterolo e steroli vegetali sono state indagate possibili correlazioni tra dato biochimico e situazione clinica dei pazienti. Nessun risultato significativo è, tuttavia, emerso se non una tendenza (non significativa) dei soggetti in peggioramento ad avere valori basali di latosterolo tendenzialmente più alti

rispetto a quelli dei pazienti rimasti stabili; tale situazione è simile a quanto già osservato per il 7 α C4 con il quale il latosterolo risulta strettamente correlato.

Nel suo complesso questa estesa indagine sul metabolismo del colesterolo nei soggetti CTX ha permesso di evidenziare come questi pazienti, al momento della diagnosi, sembrano mostrare un profilo degli steroli abbastanza tipico che va oltre la semplice ipercolestanolemia. Tali caratteristiche biochimiche, sebbene possano risultare utili ai fini della diagnosi, non paiono tuttavia essere correlate con lo stato clinico dei pazienti né avere un particolare valore prognostico: l'arresto o la progressione della malattia in seguito all'assunzione di CDCA, sembrano infatti dipendere da altri fattori non strettamente correlati alle variazioni nei livelli plasmatici degli steroli analizzati. Al momento quindi nessuna ipotesi può essere fatta circa il coinvolgimento dei principali processi metabolici del colesterolo nella differente risposta dei pazienti alla terapia sostitutiva con acidi biliari. I risultati di questo studio, ovviamente, non possono essere ritenuti conclusivi, poiché la ricerca da noi condotta è stata in gran parte retrospettiva e non pianificata a priori e, conseguentemente, non per tutti i soggetti è stato possibile avere campioni di plasma al momento della diagnosi e poi per tutti i tempi successivi presi in considerazione. D'altro canto la bassa incidenza di questa patologia, unita alla difficoltà della sua diagnosi, non ha permesso di condurre una raccolta controllata dei diversi campioni di plasma, né è stato sempre possibile un monitoraggio approfondito e regolare dello stato clinico di tutti i pazienti. Questo chiaramente non ha permesso di compiere una più estesa analisi dei metaboliti plasmatici né ha reso possibile approfondite analisi statistiche, le quali avrebbero potuto permetterci di evidenziare delle differenze significative tra diversi sottogruppi di pazienti. Un altro fattore che potrebbe essere stato limitante per la nostra indagine è stato il fatto che le analisi biochimiche sono state condotte esclusivamente sul plasma, il quale potrebbe non rappresentare il fluido biologico migliore per evidenziare correlazioni tra profilo biochimico e decorso clinico di questa patologia. Un vecchio studio aveva, infatti, segnalato come i soggetti CTX non trattati presentassero significative alterazioni della BBB, con incremento oltre che della concentrazioni di steroli (colestano e colesterolo) nel liquido cerebro-spinale anche di proteine plasmatiche, normalmente escluse da questo comparto. Tali difetti nella BBB sembravano scomparire in seguito a diversi mesi di trattamento con CDCA [Salen G. et al., 1987]. Nessun ulteriore studio è stato fatto per indagare le condizioni della BBB nei pazienti CTX. Si potrebbero quindi

prospettare per il futuro analisi di metabolomica e/o proteomica sul liquido cerebrospinale, le quali forse potrebbero fornire indicazioni maggiormente utili circa i meccanismi molecolari di patogenesi e progressione della CTX. La presenza di correlazioni tra modificazioni dei processi metabolici del colesterolo e condizioni cliniche dei pazienti CTX dovrebbe quindi essere ulteriormente indagata.

Per ciò che concerne la SPG5, lo studio esplorativo che abbiamo condotto su coppia di soggetti probandi rappresenta un primo e preliminare tentativo di ricerca finalizzato all'individuazione di possibili approcci terapeutici per quest'altra malattia neurometabolica i cui aspetti biochimico-clinici sono ancora poco noti. In questo caso le nostre analisi sono state focalizzate principalmente sui livelli plasmatici di 27-OHC e 25-OHC, i principali metaboliti che vengono ad accumularsi a causa dell'enzima mutato, e sulle loro variazioni in seguito all'assunzione di farmaci ipocolesterolemizzanti. A tale riguardo occorre innanzitutto osservare come gli elevati livelli basali di 27-OHC mostrati da entrambi i pazienti siano risultati in accordo con i dati precedentemente riportati in letteratura relativi ad altri 4 pazienti SPG5 [Schule R. et al. 2009]; inoltre la tendenza alla riduzione del 27-OHC plasmatico che è stata evidenziata in seguito alla somministrazione di simvastatina ed ezetimibe sembra indicare come, sia inibitori della sintesi che inibitori dell'assorbimento di colesterolo possano risultare utili nel ridurre i livelli ematici di questo ossisterolo, sebbene non fino a valori normali. La possibilità di limitare l'azione di CYP27A1 (ed il conseguente accumulo di 27-OHC) per deprivazione del substrato (colesterolo) si è dimostrata, quindi, almeno parzialmente valida come anche evidenziato dalla correlazione significativa mostrata tra i valori ematici di 27-OHC e quelli di colesterolo totale. Da studi precedenti è noto che la maggior parte del 27-OHC presente nel cervello ha origine extracerebrale [Heverin M. et al., 2005], è quindi ragionevole ipotizzare che l'inibizione dell'HMG-CoA reduttasi e/o della proteina NPC1L1 possa ridurre l'accumulo di 27-OHC oltre che a livello plasmatico anche nel SNC. Tale ipotesi, tuttavia, andrebbe ulteriormente verificata mediante determinazione del contenuto di 27-OHC direttamente nel liquido cerebrospinale.

Se l'effetto del trattamento farmacologico sui livelli di 27-OHC è risultato abbastanza evidente, maggiormente dubbia è invece l'azione esercitata sull'accumulo di 25-OHC. Infatti, sebbene anche questo metabolita abbia mostrato una tendenza alla riduzione nel periodo di follow-up considerato (15 mesi), tale andamento non appare correlato con il regime terapeutico. In particolare la riduzione mostrata dal

Pz.2 anche in assenza di trattamento farmacologico lascerebbe ipotizzare che la riduzione da noi osservata possa non essere conseguenza della terapia, quanto piuttosto frutto del caso. Chiaramente la scarsità di pazienti presi in esame non ha permesso di compiere analisi statistiche a riguardo e quindi, essendo anche il primo report sulla potenziale utilità di questo approccio farmacologico, non siamo in grado di trarre delle conclusioni definitive a riguardo. In ogni caso la correlazione positiva osservata tra la colesterolemia totale e la concentrazione plasmatica di 25-OHC potrebbe lasciar ipotizzare che, anche per questo metabolita, l'utilizzo di farmaci ipocolesterolemizzanti potrebbe essere utile per limitarne l'accumulo. Se da un punto di vista puramente biochimico questo primo tentativo di approccio terapeutico sembra aver mostrato una certa efficacia, un maggiore periodo di osservazione dei soggetti sarà necessario per poter effettivamente verificare se questo tipo di terapia possa avere delle ricadute da un punto di vista clinico, in termini di miglioramento della sintomatologia e della qualità della vita del paziente.

Riguardo agli altri steroli analizzati, i livelli basali di $7\alpha C4$ si sono mostrati nella norma per entrambi i pazienti e quindi la via classica di sintesi degli acidi biliari non sembra alterata nella SPG5. Questo risultato è corroborato dall'unico altro report precedente, dove si era evidenziato come anche in altri 4 pazienti SPG5 la sintesi degli acidi biliari sembrasse sostanzialmente normale [Schule R. et al. 2009]. Tali dati non sono sorprendenti poiché l'enzima CYP7B1 agisce esclusivamente nella via alternativa ed è ormai noto come tale *pathway* contribuisca in modo decisamente minoritario alla produzione endogena totale di acidi biliari [Duane W.C. e Javitt N.B., 1999].

Differenti, rispetto a quanto precedentemente osservato nel medesimo studio, sono risultati invece i valori di 24-OHC: entrambi i pazienti da noi analizzati hanno mostrato, nel complesso, valori apparentemente più bassi rispetto a quelli riportati in letteratura per soggetti sani. Tuttavia, avendo potuto analizzare solo due soggetti ed essendo comunque anche lo studio di Schule e collaboratori limitato a soli 4 pazienti, non è possibile stabilire se alterazioni dei livelli plasmatici di quest'ossisterolo possano o meno essere associati alla SPG5. Si potrebbe ipotizzare che l'accumulo di 27-OHC nel SNC possa in qualche modo alterare il metabolismo cerebrale di colesterolo, tuttavia tale ipotesi potrà essere verificata solo analizzando una casistica più ampia.

Un discorso simile può essere fatto anche circa i livelli di latosterolo e steroli vegetali. Gli apparentemente ridotti livelli di questi steroli mostrati da Pz.1 e Pz.2 (relativamente ai soli fitosteroli), non possono essere interpretati come chiare alterazioni dei processi di sintesi endogena ed assorbimento di colesterolo, poiché le osservazioni sono troppo limitate ed, in questo caso, nessun altro dato è disponibile in letteratura. Modificazioni a carico di questi processi nei soggetti SPG5 potrebbero, tuttavia, essere ipotizzate. E' ormai nota la capacità del 27-OHC di interagire con alcuni recettori nucleari, quali LXR α [Costet P. et al., 2000] e SREBP [Hua X. et al., 1996] la cui attivazione è direttamente coinvolta nella regolazione dell'omeostasi del colesterolo. In particolare uno studio recente ha evidenziato come l'attivazione di LXR α , di cui il 27-OHC è un agonista, induca l'espressione dei trasportatori ABCG5/G8 che mediano l'escrezione degli steroli vegetali [Costet P. et al., 2000]. I valori relativamente bassi di questi metaboliti osservati nei nostri soggetti probandi potrebbero, quindi, essere dovuti ad una stimolazione di questa via di *signaling*, una situazione in qualche modo opposta a quella dei soggetti CTX, dove la carenza di 27-OHC potrebbe invece favorire la sitosterolemia. Chiaramente, al momento, possiamo fare solo supposizioni e nessun dato certo può essere portato a supporto di questa ipotesi; ulteriori ricerche a riguardo sono quindi necessarie. Anche la sintesi di colesterolo potrebbe in qualche modo essere influenzata dall'accumulo di 27-OHC, poiché uno studio precedente aveva evidenziato la capacità di quest'ossisterolo di inibire l'attivazione dei fattori trascrizionali SREBPs, i quali normalmente promuovono la colesterologenesi [Hua X. et al., 1996]. Anche in questo caso solo un'analisi su un più ampio numero di pazienti potrebbe permettere di chiarire se alterazioni nella sintesi di colesterolo si accompagnano alla SPG5.

Per concludere, è possibile fare un'ultima riflessione su correlazioni tra metabolismo del colesterolo e malattie neurodegenerative, confrontando complessivamente i dati ottenuti sui tre gruppi di pazienti analizzati: CTX, SPG5 e AD. E' interessante notare a riguardo che l'unico sterolo che si è dimostrato significativamente alterato in tutte e tre queste patologie è risultato essere il 27-OHC: assente nella CTX, incrementato della SPG5, ridotto nell' AD. Si potrebbe quindi ipotizzare che quest'ossisterolo e/o i suoi derivati possano, in effetti, aver un ruolo molto più importante nel mantenimento dell'omeostasi del metabolismo cerebrale di quanto finora ipotizzato. Sebbene sia solo una speculazione, tale ipotesi potrebbe trovare supporto, almeno per indirizzare ulteriori ricerche a riguardo, da un recentissimo *paper* circa il ruolo svolto

dagli acidi colestanoici nello sviluppo e nella sopravvivenza delle cellule neuronali, in particolar modo dei motoneuroni [Theofilopoulos S. et al., 2014]. Gli acidi colestanoici sono metaboliti del 27-OHC e sono prodotti proprio attraverso l'azione degli enzimi CYP27A1 e CYP7B1 che sono mutati nella CTX e nella SPG5 (rispettivamente) [Russell D.W., 2003]. Nel loro studio Theofilopoulos e collaboratori hanno condotto una ricerca molto ampia, dosando i livelli di diversi acidi colestanoici nel liquido cerebrospinale umano e valutando, mediante studi *in vitro* (su cellule neuronali in coltura) ed *in vivo* (con modelli murini e di zebra fish) le potenzialità neuroprotettive o neurotossiche dei metaboliti più abbondanti riscontrati nell'uomo. Quello che è emerso è che gli acidi colestanoici, lungi dall'essere semplici metaboliti della sintesi degli acidi biliari, rappresentano un'ampia famiglia di composti bioattivi, capaci di interagire con recettori nucleari. In particolare essi si sono dimostrati in grado di attivare il recettore LXR e di stimolare un ampio spettro di funzioni tra cui la regolazione positiva o negativa della sopravvivenza dei motoneuroni. E' altresì emerso che la concentrazioni dei diversi acidi colestanoici nel liquido cerebrospinale dei soggetti CTX e SPG5 sono alterate: nei pazienti CTX si è osservata mancanza di acidi colestanoici neuroprotettivi, mentre nella SPG5 una combinazione di riduzione di metaboliti neuroprotettivi ed incremento di metaboliti tossici. I risultati ottenuti da Theofilopoulos e colleghi potrebbero quindi rappresentare un buon punto di partenza (o di ripartenza) per delucidare gli aspetti molecolari sia della CTX che della SPG5. Inoltre, sebbene questo studio non abbia preso in considerazione pazienti AD, è possibile ipotizzare che anche in questa malattia gli acidi colestanoici possano giocare un ruolo nella sopravvivenza delle cellule neuronali. Di conseguenza studi a riguardo potrebbero rivelarsi essenziali.

CONCLUSIONI E PROSPETTIVE

In conclusione dai risultati ottenuti in questo studio è emerso come la CTX sia caratterizzata da specifiche variazioni dei livelli degli steroli plasmatici, indicative di alterazioni nei principali processi metabolici del colesterolo: aumentati valori di $7\alpha C_4$, latosterolo e fitosteroli, si accompagnano all'ipercolestanolemia come tratto distintivo di questa malattia neurometabolica. La somministrazione di CDCA 750 mg/d si è dimostrata in grado di normalizzare o ridurre significativamente i livelli alterati dei metaboliti analizzati, sebbene in più di un terzo dei pazienti tale effetto biochimico non sia stato accompagnato da una relativa stabilizzazione della patologia. La correlazione tra alterazioni dei livelli degli steroli plasmatici, stato clinico e decorso della malattia rimane quindi difficile da determinare. I fattori responsabili della variabilità fenotipica della patologia, così come la responsività alla terapia con CDCA debbono quindi essere ulteriormente indagati, possibilmente estendendo il campo al metabolismo degli acidi colestanoici e dei neurosteroidi a livello cerebrale. La presenza di un particolare profilo basale degli steroli plasmatici potrebbe comunque rivelarsi utile ai fini dell'elaborazione di test diagnostici maggiormente predittivi rispetto alla semplice determinazione del colestano sierico. Data la rarità della patologia, forse solo studi di livello internazionale potrebbero consentire, su una casistica sufficientemente ampia, più elaborate analisi statistiche sui gli aspetti clinici, biochimici, genetici e molecolari della malattia che siano in grado di chiarire i meccanismi di patogenesi e progressione della CTX.

Riguardo alla SPG5, i dati ottenuti sulla coppia di soggetti probandi da noi analizzati sembrano indicare che farmaci ipocolesterolemizzanti possono risultare utili per ridurre l'accumulo di 27-OHC, pur non ripristinando una situazione di normalità. L'utilità clinica di tale approccio terapeutico deve, tuttavia, essere confermata da studi su un più ampio numero di soggetti e, soprattutto, considerando un maggiore periodo di follow-up. La presenza di alterazioni nei processi di sintesi endogena, assorbimento e metabolismo cerebrale di colesterolo associate alla SPG5 rimangono da verificare su una casistica più ampia. Alla luce dei recenti studi, il coinvolgimento degli acidi colestanoici nell'evoluzione clinica della patologia dovrebbe essere ulteriormente approfondito, anche al fine di determinare una possibile azione farmacologica di tali composti che potrebbe rivelarsi utile non solo per la terapia della SPG5, ma anche di altre malattie neurodegenerative quali CTX e AD.

BIBLIOGRAFIA

- **Alberts B., Johnson A., Lewis J. et al.** “Molecular Biology of the Cell, Fourth Edition”. Published by *Garland Science*. 2002; Chapter 10: fig. 10.10-10.11.
- **Altmann S.W., Davis H.R. Jr., Zhu L.J. et al.** “Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption”. *Science*. 2004; 303: 1201–1204.
- **Amaratunga A., Abraham C.R., Edwards R.B. et al.** “Apolipoprotein E is synthesized in the retina by Muller glial cells, secreted into the vitreous, and rapidly transported into the optic nerve by retinal ganglion cells”. *Journal of Biological Chemistry*. 1996; 271: 5628-5632.
- **Anderson L.J., Boyles J.K. e Hussain M.M.** “A rapid method for staining large chylomicrons”. *Journal of Lipid Research*. 1989; 30: 1819-1824.
- **Andersson S., Davis D.L., Dahlback H. et al.** “Cloning, structure, and expression of the mitochondrial cytochrome P-450 sterol 26-hydroxylase, a bile acid biosynthetic enzyme”. *Journal of Biological Chemistry*. 1989; 264: 8222-8229.
- **Applebaum-Bowden D.** “Lipases and lecithin: cholesterol acyltransferase in the control of lipoprotein metabolism”. *Current Opinion in Lipidology*. 1995; 6 :130-135.
- **Argov Z., Soffer D., Eisenberg S. e Zimmerman Y.** “Chronic demyelinating peripheral neuropathy in cerebrotendinous xanthomatosis”. *Annals of Neurology*. 1986; 20: 89-91.
- **Attwell D. e Laughlin S.B.** “An energy budget for signaling in the grey matter of the brain”. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2001; 21: 1133-1145.
- **Babiker A., Andersson O., Lund E. et al.** “Elimination of cholesterol in macrophages and endothelial cells by the sterol 27-hydroxylase mechanism”. *Journal of Biological Chemistry*. 1997; 272: 26253-26261.
- **Back P. e Walter K.** “Developmental pattern of bile acid metabolism as revealed by bile acid analysis of meconium”. *Gastroenterology*. 1980; 78: 671-678.

- **Bae S.H., Lee J.N., Fitzky B. et al.** “Cholesterol biosynthesis from lanosterol: molecular cloning, tissue distribution, expression, chromosomal localization, and regulation of rat 7-dehydrocholesterol reductase, a Smith-Lemli-Opitz syndrome-related protein”. *Journal of Biological Chemistry*. 1999; 274: 14624-14631.
- **Baulieu E.E.** “Neurosteroids: of the nervous system, by the nervous system, for the nervous system”. *Recent Progress in Hormone Research*. 1997; 52: 1-32.
- **Båvner A., Shafaati M., Hansson M. et al.** “On the mechanism of accumulation of cholestanol in the brain of mice with a disruption of sterol 27-hydroxylase”. *Journal of Lipid Research*. 2010; 51: 2722-2730.
- **Bays H.** “Ezetimibe”. *Expert Opinion on Investigational Drugs*. 2002; 11: 1587-1604.
- **Beel A.J., Sakakura M., Barrett P.J. e Sanders C.R.** “Direct binding of cholesterol to the amyloid precursor protein: An important interaction in lipid-Alzheimer's disease relationships?”. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2010; 1801: 975-982.
- **Benarroch E.E.** “Brain cholesterol metabolism and neurologic disease”. *Neurology*. 2008; 71: 1368-1373.
- **Berge K.E., Tian H., Graf G.A. et al.** “Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters”. *Science*. 2000; 290: 1771-1775.
- **Berginer V.M., Salen G. e Shefer S.** “Long-term treatment of cerebrotendinous xanthomatosis with chenodeoxycholic acid”. *The New England Journal of Medicine*. 1984; 311:1649-52.
- **Bertolotti M., Zambianchi L., Carulli L. et al.** “Influence of new synthesized cholesterol on bile acid synthesis during chronic inhibition of bile acid absorption”. *Hepatology*. 2003; 38: 939-946.
- **Bertolotti M., Gabbi C., Anzivino C. et al.** “Nuclear receptors as potential molecular targets in cholesterol accumulation conditions: Insights from evidence on hepatic cholesterol degradation and gallstone disease in humans”. *Current Medicinal Chemistry*. 2008a; 15: 2271-2284.

- **Bietrix F., Yan D., Nauze M. et al.** “Accelerated lipid absorption in mice overexpressing intestinal SR-BI”. *Journal of Biological Chemistry*. 2006; 281: 7214–7219.
- **Björkhem I.** “Mechanism of degradation of the steroid side chain in the formation of bile acids”. *Journal of Lipid Research*. 1992; 33: 455-471.
- **Björkhem I.** “Crossing the barrier: oxysterols as cholesterol transporters and metabolic modulators in the brain”. *Journal of Internal Medicine*. 2006; 260: 493-508.
- **Björkhem I. e Diczfalusy U.** “Oxysterols: friends, foes, or just fellow passengers?”. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2002; 22: 734-742.
- **Björkhem I. e Hansson M.** “Cerebrotendinous xanthomatosis: an inborn error in bile acid synthesis with defined mutations but still a challenge”. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2010; 396: 46-49.
- **Björkhem I. e Leitersdorf E.** “Sterol 27-hydroxylase Deficiency: A Rare Cause of Xanthomas in Normocholesterolemic Humans”. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 2000; 11: 180-183.
- **Björkhem I. e Meaney S.** “Brain cholesterol: long secret life behind a barrier”. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. 2004; 24: 806-815.
- **Björkhem I., Cedazo-Minguez A., Leoni V. e Meaney S.** “Oxysterols and neurodegenerative diseases”. *Molecular Aspects of Medicine*. 2009; 30: 171-179.
- **Björkhem I., Lütjohann D., Breuer O. et al.** “Importance of a novel oxidative mechanism for elimination of brain cholesterol. Turnover of cholesterol and 24(S)-hydroxycholesterol in rat brain as measured with 18O2 techniques in vivo and in vitro”. *Journal of Biological Chemistry*. 1997; 272: 30178-30184.
- **Björkhem I., Lütjohann D., Diczfalusy U. et al.** “Cholesterol homeostasis in human brain: turnover of 24(S)-hydroxycholesterol and evidence for a cerebral origin of most of this oxysterol in the circulation”. *Journal of Lipid Research*. 1998; 39: 1594-1600.
- **Björkhem I., Skrede S., Buchmann M.S. et al.** “Accumulation of 7 α -hydroxy-4-cholesten-3-one and cholesta-4,6-dien-3-one in patients with

- CTX. Effect of treatment with chenodeoxycholic acid". *Hepatology*. 1997; 7: 266-271.
- **Blennow K., de Leon M.J. e Zetterberg H.** "Alzheimer disease." *Lancet*. 2006; 368: 387-403.
 - **Bloch K.** "The biological synthesis of cholesterol". *Science*. 1965; 150: 19-28.
 - **Boyles J.K., Pitas R.E., Wilson E. et al.** "Apolipoprotein E associated with astrocytic glia of the central nervous system and with nonmyelinating glia of the peripheral nervous system". *Journal of Clinical Investigation*. 1985; 76: 1501-1513.
 - **Bretillon L., Lütjohann D., Stahle L. et al.** "Plasma levels of 24S-hydroxycholesterol reflect the balance between cerebral production and hepatic metabolism and are inversely related to body surface". *Journal of Lipid Research*. 2000; 41: 840-845.
 - **Buchmann M.S. e Clausen O.P.** "Effects of cholestanol feeding and cholestyramine treatment on the tissue sterols in the rabbit". *Lipids*. 1986; 21: 738 -743.
 - **Burns M.P., Igbavboa U., Wang L. et al.** "Cholesterol distribution, not total levels, correlate with altered amyloid precursor protein processing in statin-treated mice". *Neuromolecular Medicine*. 2006; 8: 319-328.
 - **Byun D.S., Kasama T., Shimizu T. et al.** "Effect of cholestanol feeding on sterol concentrations in the serum, liver, and cerebellum of mice". *Journal of Biochemistry*. 1988; 103: 375-379.
 - **Cai L., Eckhardt E.R., Shi W. et al.** "Scavenger receptor class B type I reduces cholesterol absorption in cultured enterocyte CaCo-2 cells". *Journal of Lipid Research*. 2004; 45: 253-262.
 - **Cali J.J., Hsieh C.-L., Francke U. e Russell D.W.** "Mutations in the bile acid biosynthetic enzyme sterol 27-hydroxylase underlie cerebrotendinous xanthomatosis". *Journal of Biochemical Chemistry*. 1991; 266: 7779-7783.
 - **Cali J.J. e Russell D.W.** "Characterization of the human sterol 27-hydroxylase. A mitochondrial cytochrome P-450 that catalyzes multiple oxidations in bile acid biosynthesis" *Journal of Biochemical Chemistry*. 1991; 266: 7774-7778.

- **Cheng W. e Chiang J.Y.L.** “Regulation of human sterol 27-hydroxylase gene (CYP27A1) by bile acids and hepatocyte nuclear factor 4a (HNF4a)”. *Gene*. 2003; 313: 71-82.
- **Chiang J.Y.L.** “Bile acids regulation of gene expression: roles of nuclear hormone receptors”. *Endocrine Reviews*. 2002; 23: 443-463.
- **Chiang J.Y.L.** “Bile acids: regulation of synthesis”. *Journal of Lipid Research*. 2009; 50: 1955-1966.
- **Clare K., Hardwick S.J., Carpenter K.L. et al.** “Toxicity of oxysterols to human monocytemacrophages”. *Atherosclerosis*. 1995; 118: 67-75.
- **Coello A., Meijide F., Núñez E.R. et al.** “Aggregation behavior of bile salts in aqueous solution”. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1996; 85: 9-15.
- **Cohn J.S., Marcoux C. e Davignon J.** “Detection, quantification, and characterization of potentially atherogenic triglyceride-rich remnant lipoproteins”. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 1999; 19: 2474-2486.
- **Costet P., Luo Y., Wang N. e Tall A.R.** “Sterol-dependent transactivation of the ABC1 promoter by the liver X receptor/retinoid X receptor. *Journal of Biological Chemistry*. 2000; 275: 28240-28245.
- **Craddock A.L., Love M.W., Daniel R.W. et al.** “Expression and transport properties of the human ileal and renal sodium-dependent bile acid transporter”. *American journal of physiology: Gastrointestinal and liver physiology*. 1998; 274: 157-169.
- **Crestani M., Sadeghpour A., Stroup D. et al.** “Transcriptional activation of the cholesterol 7 α -hydroxylase gene (CYP7A) by nuclear hormone receptors. *Journal of Lipid Research*. 1998; 39: 2192-2200.
- **Crosignani A., Del Puppo M., Longo M. et al.** “Changes in classic and alternative pathways of bile acid synthesis in chronic liver disease”. *Clinica Chimica Acta*. 2007; 382: 82-88.
- **Cruysberg J.R.** “Cerebrotendinous xanthomatosis: juvenile cataract and chronic diarrhea before the onset of neurologic disease”. *Archives of Neurology*. 2002; 59: 1975.
- **Davidson M.H., McGarry T., Bettis R. et al.** “Ezetimibe coadministered with simvastatin in patients with primary hypercholesterolemia”. *Journal of the American College of Cardiology*. 2002; 40: 2125-2134.

- **Davies J.P. e Ioannou Y.A.** “Topological analysis of Niemann–Pick C1 protein reveals that the membrane orientation of the putative sterol-sensing domain is identical to those of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase and sterol regulatory element binding protein cleavage-activating protein”. *Journal of Biological Chemistry*. 2000; 275: 24367-24374.
- **Davis H.R. e Veltri E.P.** “Zetia: inhibition of Niemann–Pick C1 Like 1 (NPC1L1) to reduce intestinal cholesterol absorption and treat hyperlipidemia”. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*. 2007; 14: 99-108.
- **Davis Jr. H.R., Zhu L.J., Hoos L.M. et al.** “Niemann–Pick C1 Like 1 (NPC1L1) is the intestinal phytosterol and cholesterol transporter and a key modulator of whole-body cholesterol homeostasis”. *Journal of Biological Chemistry*. 2004; 279, 33586-33592.
- **Dawson P.A., Hubbert M., Haywood J. et al.** “The heteromeric organic solute transporter alpha-beta, Ostalpha-Ostbeta, is an ileal basolateral bile acid transporter”. *The Journal of Biological Chemistry*. 2005; 280: 6960-6968.
- **Dawson P.A., Lan T. e Rao A.** “Bile acid transporters”. *Journal of Lipid Research*. 2009; 50: 2340-2357.
- **DeBarber A.E., Connor W.E., Pappu A.S. et al.** “ESI-MS/MS quantification of 7alpha-hydroxy-4-cholesten-3-one facilitates rapid, convenient diagnostic testing for cerebrotendinous xanthomatosis”. *Clinica Chimica Acta*. 2010; 411: 43-48.
- **Del Puppo M., Galli Kienle M., Petroni M.L. et al.** “Serum 27-hydroxycholesterol in patients with primary biliary cirrhosis suggests alteration of cholesterol catabolism to bile acids via the acidic pathway”. *Journal of Lipid Research*. 1998; 39: 2477-2482.
- **Di Paolo G. e Kim T.W.** “Linking lipids to Alzheimer’s disease: cholesterol and beyond”. *Nature Reviews Neuroscience*. 2011; 12: 284-296.
- **Dietschy J.M. e Turley S.D.** “Cholesterol metabolism in the brain”. *Current Opinion in Lipidology*. 2001; 12: 105-112.
- **Dietschy J.M. e Turley S.D.** “Thematic review series: brain lipids. Cholesterol metabolism in the central nervous system during early

- development and in the mature animal". *Journal of Lipid Research*. 2004; 45: 1375-1397.
- **Dietschy J.M., Turley S.D. e Spady D.K.** "Role of liver in the maintenance of cholesterol and low density lipoprotein homeostasis in different animal species, including humans". *Journal of Lipid Research* 1993; 34: 1637-1659.
 - **Duane W.C. e Javitt N.B.** "27-hydroxycholesterol: production rates in normal humans subjects". *Journal of Lipid Research*. 1999; 40: 1194-1199.
 - **Eberlè D.Q.H., Hegarty B., Bossard P. et al.** "SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis". *Biochimie*. 2004; 86: 839-848.
 - **Eisenberg S. e Sehayek E.** "Remnant particles and their metabolism". *Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1995; 9: 739-753.
 - **Elias E.R. e Irons M.** "Abnormal cholesterol metabolism in Smith-Lemli-Opitz syndrome". *Current Opinion in Pediatrics*. 1995; 7: 710-714.
 - **Empen K., Lange K., Stange E.F. et al.** "Newly synthesized cholesterol in human bile and plasma: quantitation by mass isotopomer distribution analysis". *American journal of physiology: Gastrointestinal and liver physiology*. 1997; 272: 367-373.
 - **Endo A.** "The discovery and development of HMG-CoA reductase inhibitors". *Journal of Lipid Research*. 1992; 33: 1569-1582.
 - **Escolà-Gli J.C., Quesada H., Julve J. et al.** "Sitosterolemia: diagnosis, investigation, and management". *Current Atherosclerosis Reports*. 2014; 16: 424.
 - **Fagan A.M., Holtzman D.M., Munson G. et al.** "Unique lipoproteins secreted by primary astrocytes from wild type, apoE (-/-), and human apoE transgenic mice". *Journal of Biological Chemistry*. 1999; 274: 30001-30007.
 - **Fonseca A.C., Resende R., Oliveira C.R. e Pereira C.M.** "Cholesterol and statins in Alzheimer's disease: current controversies". *Experimental Neurology*. 2010; 223: 282-293.
 - **Freeman L.A., Kennedy A., Wu J. et al.** "The orphan nuclear receptor LRH-1 activates the ABCG5/ABCG8 intergenic promoter". *Journal of Lipid Research*. 2004; 45: 1197-1206.
 - **Fuchs M.** "Bile acid regulation of hepatic physiology: III. Regulation of bile acid synthesis: past progress and future challenges". *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2003; 284: G551-G557.

- **Gagne C., Bays H.E., Weiss S.R. et al.** “Efficacy and safety of ezetimibe added to ongoing statin therapy for treatment of patients with primary hypercholesterolemia”. *American Journal of Cardiology*. 2002; 90: 1084-1091.
- **Gallus G.N., Dotti M.T. e Federico A.** “Clinical and molecular diagnosis of cerebrotendinous xanthomatosis with a review of the mutations in the CYP27A1 gene”. *Neurological Sciences*. 2006; 27:143-149.
- **Garcia-Calvo M., Lisnock J., Bull H.G. et al.** “The target of ezetimibe is Niemann–Pick C1-Like 1 (NPC1L1)”. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2005; 102: 8132-8137.
- **Ge L., Wang J., Qi W. et al.** “The cholesterol absorption inhibitor ezetimibe acts by blocking the sterol-induced internalization of NPC1L1”. *Cell Metabolism*. 2008; 7: 508-519.
- **Gerloff T., Stieger B., Hagenbuch B. et al.** “The sister of P-glycoprotein represents the canalicular bile salt export pump of mammalian liver”. *Journal of Biological Chemistry*. 1998; 273: 10046-10050.
- **Ghribi O.** “Potential mechanisms linking cholesterol to Alzheimer’s disease-like pathology in rabbit brain, hippocampal organotypic slices, and skeletal muscle”. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2008; 15: 673-684.
- **Gil G., Faust J.R., Chin D.J., Goldstein, J.L. et al.** “Membrane-bound domain of HMG CoA reductase is required for sterol-enhanced degradation of the enzyme”. *Cell*. 1985; 41: 249–258.
- **Glass C.K., Rose D.W. e Rosenfeld M.G.** “Nuclear receptor coactivators”. *Current Opininion in Cell Biology*. 1997; 9: 222-232.
- **Glomset J.A. e Norum K.R.** “The metabolic role of lecithin: cholesterol acyltransferase: perspectives form pathology”. *Advances in Lipid Research*. 1973; 11: 1-65.
- **Goizet C., Boukhris A., Durr A. et al.** “CYP7B1 mutations in pure and complex forms of hereditary spastic paraplegia type 5”. *Brain*. 2009; 132 :1589-1600.
- **Goodwin B., Jones S.A., Price R.R. et al.** “A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LRH-1 represses bile acid biosynthesis”. *Molecular Cell*. 2000; 6: 517-526.

- **Gotto A.M., Pownall J.E., Havel R.J.** “Introduction to the plasma lipoproteins”. *Methods in Enzymology*. 1986; 128: 3-41.
- **Graf G.A., Li W.P., Gerard R.D. et al.** “Coexpression of ATP-binding cassette proteins ABCG5 and ABCG8 permits their transport to the apical surface”. *Journal of Clinical Investigation*. 2002; 110: 659-669.
- **Grandas F., Martin-Moro M., Garcia-Munozguren S. e Anaya F.** “Early-onset parkinsonism in cerebrotendinous xanthomatosis”. *Movement Disorders*. 2002; 17: 1396-1397.
- **Grimm M.O., Grimm H.S., Tomic I. et al.** “Independent inhibition of Alzheimer disease beta- and gamma-secretase cleavage by lowered cholesterol levels”. *Journal of Biological Chemistry*. 2008; 283: 11302-11311.
- **Grundy S.M. e Metzger A.L.** “A physiological method for estimation of hepatic secretion of biliary lipids in man”. *Gastroenterology*. 1972; 62: 1200-1217.
- **Gylling H., Strandberg T., Tilvis R. et al.** “Regulation of serum cholesterol level in middle-aged and elderly men. Relation of cholesterol absorption and synthesis to lipoprotein metabolism.”. *Arteriosclerosis and Thrombosis: A Journal of Vascular Biology*. 1994; 14: 694-700.
- **Gylling H.M. e Miettinen T.A.** “Inheritance of cholesterol metabolism of probands with high or low cholesterol absorption”. *Journal of Lipid Research*. 2002; 43: 1472-1476.
- **Hagenbuch B. e Meier P.J.** “Molecular cloning, chromosomal localization, and functional characterization of a human liver Na⁺ /bile acid cotransporter”. *Journal of Clinical Investigation*. 1994; 93: 1326-1331.
- **Han S., Chiang J.Y.** “Mechanism of vitamin D receptor inhibition of cholesterol 7 α -hydroxylase gene transcription in human hepatocytes”. *Drug Metabolism and Disposition*. 2009; 37: 469-478.
- **Han S., Li T., Ellis E. et al.** “A novel bile acid-activated vitamin D receptor signaling in human hepatocytes”. *Molecular Endocrinology*. 2010; 24: 1151-1164.
- **Handelmann G. E., Boyles J. K., Weisgraber K. H. et al.** “Effects of apolipoprotein E, beta very low density lipoproteins, and cholesterol on the

- extension of neurites by rabbit dorsal root ganglion neurons in vitro". *Journal of Lipid Research*. 1992; 33: 1677-1688.
- **Hardie D.G., Hawley S.A., Scott J.W.** "AMP-activated protein kinase - development of the energy sensor concept". *The Journal of Physiology*. 2006; 574: 7-15.
 - **Harris J.R.** "Cholesterol binding to amyloid-beta fibrils: a TEM study". *Micron*. 2008; 9: 1192-1196.
 - **Hazard S.E., Patel S.B.** "Sterolins ABCG5 and ABCG8: regulators of whole body dietary sterols". *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*. 2007; 453: 745-752.
 - **Hesler C.B., Swenson T.L. e Tall A.R.** "Purification and characterization of a human plasma cholesterol ester transfer protein". *Journal of Biological Chemistry*. 1987; 262: 2275-2282.
 - **Heverin M., Bogdanovic N., Lütjohann D. et al.** "Changes in the levels of cerebral and extracerebral sterols in the brain of patients with Alzheimer's disease". *Journal of Lipid Research*. 2004; 45: 186-193.
 - **Heverin M., Meaney S., Lütjohann D. et al.** "Crossing the barrier: net flux of 27-hydroxycholesterol into the human brain". *Journal of Lipid Research*. 2005; 46: 1047-1052.
 - **Hofmann A.F.** "Bile acid: the good, the bad and the ugly". *News in Physiological Sciences*. 1999a; 14: 24-29.
 - **Hofmann A.F.** "The continuing importance of bile acids in liver and intestinal disease". *Archives of Internal Medicine*. 1999b; 159: 2647-2658.
 - **Hofmann A.F. e Borgstroem B.** "The intraluminal phase of fat digestion in man: the lipid content of the micellar and oil phases of intestinal content obtained during fat digestion and absorption". *Journal of Clinical Investigation*. 1964; 43: 247-257.
 - **Honda A., Salen G., Shefer S. et al.** "Regulation of 25- and 27-hydroxylation side chain cleavage pathways for cholic acid biosynthesis in humans, rabbits, and mice: assay of enzyme activities by high-resolution gas chromatography-mass spectrometry". *Journal of Lipid Research*. 2000; 41: 442-451.

- **Horton J.D., Goldstein J.L. e Brown M.S.** “SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver”. *Journal of Clinical Investigation*. 2002; 109: 1125-1131.
- **Horton J.D., Shah N.A., Warrington J.A. et al.** “Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003; 100: 12027-12032.
- **Hua X., Nohturfft A., Goldstein J.L. e Brown M.S.** “Sterol resistance in CHO cells traced to point mutation in SREBP cleavage-activating protein”. *Cell* 1996; 87: 415-26.
- **Hui D.Y. e Howles P.N.** “Molecular mechanism of cholesterol absorption and transport in the intestine”. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. 2005; 16: 183-1892.
- **Inagaki T., Choi M., Moschetta A. et al.** “Fibroblast growth factor 15 functions as an enterohepatic signal to regulate bile acid homeostasis”. *Cell Metabolism*. 2005; 2: 217-225.
- **Istvan E.S. e Deisenhofer J.** “The structure of the catalytic portion of human HMGCoA reductase”. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2000; 1529: 9-18.
- **Jabłońska B.** “Biliary cysts: etiology, diagnosis and management”. *World Journal of Gastroenterology*. 2012; 18: 4801-4810.
- **Jansen P.L.M. e Sturm E.** “Genetic cholestasis, causes and consequences for hepatobiliary transport”. *Liver International*. 2003; 23: 315-322.
- **Jiang J., Kai. G., Cao. X. et al.** “Molecular cloning of a HMG-CoA reductase gene from *Eucommia ulmoides* Oliver”. *Bioscience Reportes*. 2006; 26: 171-181.
- **Jick H., Zornberg G.L., Jick S. S. et al.** “Statins and the risk of dementia”. *Lancet*. 2000; 356: 1627-1631.
- **Jolivet R., Magistretti P.J. e Weber B.** “Deciphering neuron-glia compartmentalization in cortical energy metabolism”. *Frontiers in Neuroenergetics*. 2009; 1: 4.
- **Jurevics H. e Morell P.** “Cholesterol for synthesis of myelin is made locally, not imported into brain”. *Journal of Neurochemistry*. 1995; 64: 895-901-

- **Karten B., Campenot R.B., Vance D.E. e Vance J.E.** “Expression of ABCG1, but not ABCA1, correlates with cholesterol release by cerebellar astroglia”. *Journal of Biological Chemistry*. 2006; 281: 4049-4057.
- **Karten B., Peake K.B. e Vance J.E.** “Mechanisms and consequences of impaired lipid trafficking in Niemann-Pick type C1-deficient mammalian cells”. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2009; 1791: 659-670.
- **Kelley R.I. e Hennekam R.C.** “The Smith–Lemli–Opitz syndrome”. *Journal of Medical Genetics*. 2000; 37: 321-335.
- **Keren Z. e Falik-Zaccai T.C.** “Cerebrotendinous xanthomatosis (CTX): a treatable lipid storage disease”. *Pediatric Endocrinology Reviews*. 2009; 7: 6-11.
- **Klebe S., Durr A., Bouslam N. et al.** “Spastic paraplegia 5: Locus refinement, candidate gene analysis and clinical description”. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*. 2007; 144: 854-861.
- **Kölsch H., Heun R., Kerksiek A. et al.** “Altered levels of plasma 24S- and 27-hydroxycholesterol in demented patients”. *Neuroscience Letters*. 2004; 368: 303-308.
- **Kosters A., Jirsa M., e Groen A.K.** “Genetic background of cholesterol gallstone disease”. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2003; 1637: 1-19.
- **Krakowiak P.A., Wassif C.A., Kratz L. et al.** “Lathosterolosis: an inborn error of human and murine cholesterol synthesis due to lathosterol 5-desaturase deficiency”. *Human Molecular Genetics*. 2003; 12: 1631-1641.
- **Kullak-Ublick G.A., Ismail M.G., Stieger B. et al.** “Organic anion-transporting polypeptide B (OATP-B) and its functional comparison with three other OATPs of human liver”. *Gastroenterology*. 2001; 120: 525-533.
- **Kuriyama M., Fujiyama J., Kasama T. e Osame M.** “High levels of plant sterols and cholesterol precursors in cerebrotendinous xanthomatosis”. *Journal of Lipid Research*. 1991; 32: 223-229.
- **Kurtzke J.F.** “Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS)”. *Neurology*. 1983; 33: 1444-1452.
- **Kuwabara P.E. e Labouesse M.** “The sterol-sensing domain: multiple families, a unique role?” *Trends in Genetics*. 2002; 18: 193-201.

- **Lambert G., Marcelo J.A., Amar A. et al.** “The farnesoid X-receptor is an essential regulator of cholesterol homeostasis”. *Journal of Biological Chemistry*. 2003; 278: 2563-2570.
- **Lee M.H., Lu K., Hazard S. et al.** “Identification of a gene, ABCG5, important in the regulation of dietary cholesterol absorption”. *Nature Genetics*. 2001; 27: 79-83.
- **Lee Y., Lin P.Y., Chiu N.M. et al.** “Cerebrotendinous xanthomatosis with psychiatric disorders: report of three siblings and literature review”. *Chang Gung Medical Journal*. 2002; 25: 334-340.
- **Lee Y.K. e Moore D.D.** “Dual mechanisms for repression of the monomeric orphan receptor liver receptor homologous protein-1 by the orphan small heterodimer partner”. *The Journal of Biological Chemistry*. 2002; 277: 2463-2467.
- **Lefebvre P., Cariou B., Lien F. et al.** “Role of bile acids and bile acid receptors in metabolic regulation”. *Physiological Reviews*. 2009; 89: 147-191.
- **Leoni V., Masterman F.S., Mousavi B. et al.** “Diagnostic use of cerebral and extracerebral oxysterols”. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2004; 42: 186-191.
- **Leoni V., Masterman T., Patel P. et al.** “Side chain oxidized oxysterols in cerebrospinal fluid and the integrity of blood-brain and blood-cerebrospinal fluid barriers”. *Journal of Lipid Research*. 2003; 44: 793-799.
- **Li T., Chiang J.Y.** “Mechanism of rifampicin and pregnane X receptor inhibition of human cholesterol 7 alpha-hydroxylase gene transcription”. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2005; 288: G74-G84.
- **Li-Hawkins J., Lund E.G., Turley S.D. e Russell D.W.** “Disruption of the oxysterol 7alpha-hydroxylase gene in mice”. *Journal of Biological Chemistry*. 2000; 275: 16536-16542.
- **Lin C.T., Xu Y.F., Wu J.Y. e Chan L.** “Immunoreactive apolipoprotein E is a widely distributed cellular protein. Immunohistochemical localization of apolipoprotein E in baboon tissues”. *Journal of Clinical Investigation*. 1986; 78: 947-958.

- **Liu Y., Hulten L.M. e Wiklund O.** “Macrophages isolated from human atherosclerotic plaques produce IL-8, and oxysterols may have a regulatory function for IL-8 production”. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 1997; 17: 317-323.
- **Levinson S.S.** “Il metabolismo delle lipoproteine ad alta densità e il trasporto inverso del colesterolo”. *Journal of Clinical Ligand Assay* (Ed. Italiana). 2006; 29: 21-27.
- **Lionnet C., Carra C., Ayrignac X. et al.** “Étude rétrospective multicentrique de 15 cas adultes de xanthomatose cérébrotendineuse: aspects cliniques et paracliniques typiques et atypiques”. *Revue Neurologique*. 2014; 170: 445-453.
- **Lo Giudice T., Lombardi F., Santorelli F.M. et al.** “Hereditary spastic paraplegia: Clinical-genetic characteristics and evolving molecular mechanisms”. *Experimental Neurology*. 2014; 261: 518-539.
- **Lorincz M.T., Rainier S., Thomas D. e Fink J.K.** “Cerebrotendinous xanthomatosis: possible higher prevalence than previously recognized”. *Archives of Neurology*. 2005; 62:1459-63.
- **Lu T.T., Markishima M., Repa J.J. et al.** “Molecular basis for feedback regulation of bile acid synthesis by nuclear receptors”. *Molecular Cell*. 2000; 6: 507-515.
- **Lund E.G., Guileyardo J.M. e Russel D.W.** “cDNA cloning of cholesterol 24-hydroxylase, a mediator of cholesterol homeostasis in the brain”. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1999; 96: 7238-7243.
- **Lund E.G., Kerr T.A., Sakai J. et al.** “cDNA cloning of mouse and human cholesterol 25-hydroxylases, polytopic membrane proteins that synthesize a potent oxysterol regulator of lipid metabolism”. *Journal of Biological Chemistry*. 1998; 273: 34316-34327.
- **Lundåsen T., Gälman C., Angelin B. et al.** “Circulating intestinal fibroblast growth factor 19 has a pronounced diurnal variation and modulates hepatic bile acid synthesis in man”. *Journal of Internal Medicine*. 2006; 260: 530-536.
- **Lütjohann D., Breuer O., Ahlborg G. et al.** “Cholesterol homeostasis in human brain: evidence for an age-dependent flux of 24S-hydroxycholesterol

from the brain into the circulation". *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1996; 93: 9799-9804.

- **Lütjohann D., Papassotiropoulos A., Björkhem I. et al.** "Plasma 24(S)-hydroxycholesterol (cerebrosterol) is increased in Alzheimer and vascular demented patients". *Journal of Lipid Research*. 2000; 41: 195-198.
- **Makishima M., Okamoto A.Y., Repa J.J. et al.** "Identification of a nuclear receptor for bile acids". *Science*. 1999; 284: 1362-1365.
- **Makishima M., Lu T.T., Xie W. et al.** "Vitamin D receptor as an intestinal bile acid sensor". *Science*. 2002; 296: 1313-1316.
- **Marrapodi M. e Chiang J.Y.** "Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR α) and agonist inhibit cholesterol 7 α -hydroxylase gene (CYP7A1) transcription". *Journal of Lipid Research*. 2000; 41: 514-520.
- **Martinez-Augustin O, Sanchez de Medina F.** "Intestinal bile acid physiology and pathophysiology". *World Journal of Gastroenterology*. 2008; 14: 5630-5640.
- **Martins I.J., Berger T., Sharman M.J. et al.** "Cholesterol metabolism and transport in the pathogenesis of Alzheimer's disease". *Journal of Neurochemistry*. 2009; 111: 1275-1308.
- **Mason J.I. e Boyd G.S.** "The suppressive effect of the catatoxic steroid, pregnenolone-16 α -carbonitrile, on liver microsomal cholesterol-7 α -hydroxylase". *Steroids*. 1978; 31: 849-854.
- **Matysik S., Orsò E., Black A. et al.** "Monitoring of 7 α -hydroxy-4-cholesten-3-one during therapy of cerebrotendinous xanthomatosis: a case report". *Chemistry and Physics of Lipids*. 2011; 164: 530-534.
- **Mauch D.H., Nagler K., Schumacher S. et al.** "CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol". *Science*. 2001; 294: 1354-1357.
- **McLean K.J., Hans M. e Munro A.W.** "Cholesterol, an essential molecule: diverse roles involving cytochrome P450 enzymes". *Biochemical Society Transactions*. 2012; 40: 587-593.
- **Meaney S., Heverin M., Panzenboeck U. et al.** "Novel route for elimination of brain oxysterols across the blood-brain barrier: conversion into 7 α hydroxy-3-oxo-4-cholestenoic acid". *Journal of Lipid Research*. 2007; 48 : 944-951 .

- **Meier P.J.** “Molecular mechanisms of hepatic bile salt transport from sinusoidal blood into bile”. *American journal of physiology: Gastrointestinal and liver physiology*. 1995; 269: 801-812.
- **Meir K., Kitsberg D., Alkalay I. et al.** “Human sterol 27-hydroxylase (CYP27) overexpressor transgenic mouse model. Evidence against 27-hydroxycholesterol as a critical regulator of cholesterol homeostasis”. *Journal of Biological Chemistry*. 2002; 277: 34036-34041.
- **Miettinen T.A., Tilvis R.S. e Kesäniemi Y.A.** “Serum plant sterols and cholesterol precursors reflect cholesterol absorption and synthesis in volunteers of a randomly selected male population”. *American Journal of Epidemiology*. 1990; 131: 20-31.
- **Miettinen T.A., Gylling H. e Nissinen M.J.** “The role of serum non-cholesterol sterols as surrogate markers of absolute cholesterol synthesis and absorption”. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. 2011; 21: 765-769.
- **Mignarri A., Dotti M.T., Del Puppo M. et al.** “Cerebrotendinous xanthomatosis with progressive cerebellar vacuolation. Six-year MRI follow-up”. *Neuroradiology*. 2012; 54: 649-651.
- **Miyake J.H., Doung X.D., Strauss W. et al.** “Increased production of apolipoprotein B-containing lipoproteins in the absence of hyperlipidemia in transgenic mice expressing cholesterol 7 α -hydroxylase”. *Journal of Biological Chemistry*. 2001; 276: 23304-23311.
- **Moghadasian M.H.** “Cerebrotendinous xanthomatosis: clinical course, genotypes and metabolic backgrounds”. *Clinical & Investigative Medicine*. 2004; 27: 42-50.
- **Moghadasian M.H., Salen G., Frohlich J.J. e Scudamore C.H.** “Cerebrotendinous xanthomatosis: a rare disease with diverse manifestations”. *Archives of Neurology*. 2002; 59:527-529.
- **Muglia M., Criscuolo C., Magariello A. et al.** “Narrowing of the critical region in autosomal recessive spastic paraplegia linked to the SPG5 locus”. *Neurogenetics*. 2004; 5:49-54.
- **Mutka A.L., Lusa S., Linder M.D. et al.** “Secretion of sterols and the NPC2 protein from primary astrocytes”. *Journal of Biological Chemistry*. 2004; 279: 48654-48662.

- **Nada A.A. e Nicholas O.D.** “Role of the gut in lipid homeostasis”. *Physiological Reviews*. 2012; 92: 1061-1085.
- **Nauli A.M., Nassir F., Zheng S., Yang Q. et al.** “CD36 is important for chylomicron formation and secretion and may mediate cholesterol uptake in the proximal intestine”. *Gastroenterology*. 2006; 131: 1197-1207.
- **Nieweg K., Schaller H. e Pfrieger F.W.** “Marked differences in cholesterol synthesis between neurons and glial cells from postnatal rats”. *Journal of Neurochemistry*. 2009; 109: 125-134.
- **Nitta M., Ku S., Brown C. et al.** “CPF: an orphan nuclear receptor that regulates liver-specific expression of the human cholesterol 7 α -hydroxylase gene”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999; 96: 6660-6665.
- **Nohturfft A., Brown M.S., Goldstein J.L.** “Topology of SREBP cleavage-activating protein, a polytopic membrane protein with a sterol-sensing domain”. *Journal of Biological Chemistry*. 1998; 273: 17243-17250.
- **Oftebro H., Björkhem I., Skrede S. et al.** “Cerebrotendinous xanthomatosis. A defect in mitochondrial 26-hydroxylase required for normal biosynthesis of cholic acid” *Journal of Clinical Investigation*. 1980; 65: 1418-1430.
- **Ohgami N., Ko D.C., Thomas M. et al.** “Binding between the Niemann–Pick C1 protein and a photoactivatable cholesterol analog requires a functional sterol-sensing domain”. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2004; 101: 12473-12478.
- **Ohyama Y., Meaney S., Heverin M. et al.** “Studies on the transcriptional regulation of cholesterol 24-hydroxylase (CYP46A1): marked insensitivity toward different regulatory axes”. *Journal of Biological Chemistry*. 2006; 281: 3810-3820.
- **Olivecrona T. e Bengtsson-Olivecrona G.** “Lipoprotein lipase and hepatic lipase”. *Current Opinion in Lipidology*. 1990; 1: 222-230.
- **Omkumar R.V., Darnay B.G. e Rodwell V.W.** “Modulation of Syrian hamster 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase activity by phosphorylation. Role of serine 871”. *Journal of Biological Chemistry*. 1994; 269: 6810-6814.

- **Panzenboeck U., Andersson U., Hanson M. et al.** “On the mechanism of cerebral accumulation of cholestanol in cerebrotendinous xanthomatosis”. *Journal of Lipid Research*. 2007; 48: 1167-1174.
- **Papassotiropoulos A., Lütjohann D., Bagli M. et al.** “24S-hydroxycholesterol in cerebrospinal fluid is elevated in early stages of dementia”. *Journal of Psychiatric Research*. 2002; 36: 27-32.
- **Papassotiropoulos A., Lütjohann D., Bagli M. et al.** “Plasma 24(S)-hydroxycholesterol, a peripheral indicator of degeneration and potential state marker for Alzheimer’s disease”. *Neuroreport*. 2000; 11: 1959-1962.
- **Pappolla M.A., Bryant-Thomas T.K., Herbert D. et al.** “Mild hypercholesterolemia is an early risk factor for the development of Alzheimer amyloid pathology”. *Neurology*. 2003; 61: 199-205.
- **Pardo J., Prieto J.M., Rodriguez J.R. et al.** “Magnetic resonance of brain and Achilles tendon in cerebrotendinous xanthomatosis”. *Neurologia*. 1993; 8: 268-270.
- **Parks D.J., Blanchard S.G., Bledsoe R.K. et al.** “Bile acid: natural ligands for an orphan nuclear receptor”. *Science*. 1999; 284: 1365-1368.
- **Pellicoro A. e Faber K.N.** “Review article: the function and regulation of proteins involved in bile salt biosynthesis and transport”. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 2007; 26 (Suppl 2): 149-160.
- **Pfriefer F.W.** “Outsourcing in the brain: do neurons depend on cholesterol delivery by astrocytes?” *Bioessays*. 2003; 25: 72-78.
- **Pikuleva I.A., Babiker A. e Waterman M.R.** “Activities of recombinant human cytochrome P450c27 (CYP27) which produce intermediates of alternative bile acid biosynthetic pathways”. *Journal of Biological Chemistry*. 1998; 273: 18153-18160.
- **Pilo B., de Blas G. e Sobrido M.J.** “Neurophysiological study in cerebrotendinous xanthomatosis”. *Muscle & Nerve*. 2011; 43: 531-536.
- **Pilo-de-la-Fuente B., Jimenez-Escrig A., Lorenzo J.R. et al.** “Cerebrotendinous xanthomatosis in Spain: clinical, prognostic, and genetic survey”. *European Journal of Neurology*. 2011; 18: 1203-1211.
- **Pineda Torra I., Claudel T., Duval C. et al.** “Bile acids induce the expression of the human peroxisome proliferator-activated receptor alpha

gene via activation of the farnesoid X receptor". *Molecular Endocrinology*. 2003; 17: 259-272.

- **Pitas R.E., Boyles J.K., Lee S.H. et al.** "Lipoproteins and their receptors in the central nervous system. Characterization of the lipoproteins in cerebrospinal fluid and identification of apolipoprotein B, E(LDL) receptors in the brain". *Journal of Biological Chemistry*. 1987; 262: 14352-14360.
- **Poirier J., Baccichet A., Dea D. e Gauthier S.** "Cholesterol synthesis and lipoprotein reuptake during synaptic remodelling in hippocampus in adult rats". *Neuroscience*. 1993; 55: 81-90.
- **Powell L.M., Wallis S.C., Pease R.J. et al.** "A novel form of tissue specific RNA processing produces apolipoprotein B48 in intestine". *Cell*. 1987; 50: 831-840.
- **Querfurth H.W. e LaFerla F.M.** "Alzheimer's disease". *The New England Journal of Medicine*. 2010; 362: 329-344.
- **Quinn C.M., Jessup W., Wong J. et al.** "Expression and regulation of sterol 27-hydroxylase (CYP27A1) in human macrophages: A role for RXR and PPARgamma ligands". *Biochemical Journal*. 2005; 385: 823-830.
- **Ramirez D.M., Andersson S. e Russell D.W.** "Neuronal expression and subcellular localization of cholesterol 24-hydroxylase in the mouse brain". *Journal of Comparative Neurology*. 2008; 507: 1676-1693.
- **Rassart E., Bedirian A., Do C.S. et al.** "Apolipoprotein". *Biochimica et Biophysica Acta*. 2000; 1482: 185-198.
- **Ravid Z. Bendayan M., Delvin E. et al.** "Modulation of intestinal cholesterol absorption by high glucose levels: impact on cholesterol transporters, regulatory enzymes, and transcription factors" *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2008; 295: G873-G885.
- **Rawn D.J.** "Biochimica II ED". McGraw-Hill.
- **Reddy J.K. e Hashimoto T.** "Peroxisomal beta-oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor alpha: an adaptive metabolic system". *Annual Review of Nutrition*. 2001; 21: 193-230.
- **Repa J.J. e Mangelsdorf D.J.** "The role of orphan nuclear receptors in the regulation of cholesterol homeostasis". *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 2000; 16: 459-481.

- **Robins S.J., Fasulo J.M., Lessard P.D. et al.** “Hepatic cholesterol synthesis and the secretion of newly synthesized cholesterol in bile”. *The Biochemical Journal*. 1993; 289: 41- 44.
- **Rose K.A., Stapleton G., Dott K. et al.** “Cyp7b, a novel brain cytochrome P450, catalyzes the synthesis of neurosteroids 7 α -hydroxy dehydroepiandrosterone and 7 α hydroxy pregnenolone”. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1997; 94: 4925-4930 .
- **Rosklint T., Ohlsson B.G., Wiklund O. et al.** “Oxysterols induce interleukin-1 β production in human macrophages”. *European Journal of Clinical Investigation*. 2002; 32: 35-42.
- **Rousset X., Vaisman B., Amar M. et al.** “Lecithin: cholesterol acyltransferase – from biochemistry to role in cardiovascular disease”. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity*. 2009; 16: 163-171.
- **Runquist M., Parmryd I., Thelin A. et al.** “Distribution of branch point prenyltransferases in regions of bovine brain”. *Journal of Neurochemistry*. 1995; 65: 2299-2306.
- **Russel D.W.** “The enzymes, regulation and genetics of bile acid synthesis”. *Annual Review of Biochemistry*. 2003; 72: 137-174.
- **Russel D.W. e Setchell K.D.R.** “Bile acid biosynthesis”. *Biochemistry*. 1992; 31: 4737-4749.
- **Saito K., Dubreuil V., Arai Y. et al.** “Ablation of cholesterol biosynthesis in neural stem cells increases their VEGF expression and angiogenesis but causes neuron apoptosis”. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009; 106: 8350-8355.
- **Saito M., Benson E. P., Saito M. e Rosenberg A.** “Metabolism of cholesterol and triacylglycerol in cultured chick neuronal cells, glial cells, and fibroblasts: accumulation of esterified cholesterol in serum-free culture”. *Journal of Neuroscience Research*. 1987; 18: 319-325.
- **Salen G., Shefer S., Tint G.S. et al.** “Biosynthesis of bile acids in cerebrotendinous xanthomatosis. Relationship of bile acid pool sizes and synthesis rates to hydroxylations at C-12, C-25, and C-26”. *Journal of Clinical Investigation*. 1985; 76: 744-751.
- **Salen G., Berginer V., Shore V. et al.** “Increased concentrations of cholestanol and apolipoprotein B in the cerebrospinal fluid of patients with

- cerebrotendinous xanthomatosis. Effect of chenodeoxycholic acid". *The New England Journal of Medicine*. 1987; 316: 1233-1238.
- **Schmidt D.R., Holmstrom S.R., Fon Tacer K. et al.** "Regulation of bile acid synthesis by fat-soluble vitamins A and D". *Journal of Biological Chemistry*. 2010; 285: 14486-14494.
 - **Schmiedlin-Ren P., Thummel K.E., Fisher J.M. et al.** "Induction of CYP3A4 by 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 is human cell line-specific and is unlikely to involve pregnane X receptor". *Drug Metabolism and Disposition*. 2001; 29: 1446-1453.
 - **Schroepfer GJ Jr.** "Oxysterols: modulators of cholesterol metabolism and other processes". *Physiological Reviews*. 2000; 80: 361-554.
 - **Schuetz E.G., Strom S., Yasuda K. et al.** "Disrupted bile acid homeostasis reveals an unexpected interaction among nuclear hormone receptors, transporters, and cytochrome P450". *The Journal of Biological Chemistry*. 2001; 276: 39411-39418.
 - **Schule R., Brandt E., Karle K.N. et al.** "Analysis of CYP7B1 in non-consanguineous cases of hereditary spastic paraplegia". *Neurogenetics* 2009; 10: 97-104 .
 - **Schule R., Siddique T., Deng H.X. et al.** "Marked accumulation of 27-hydroxycholesterol in SPG5 patients with hereditary spastic paresis". *Journal of Lipid Research*. 2010; 51: 819-823.
 - **Schwarz M., Lund E.G., Lathe R. et al.** "Identification and characterization of a mouse oxysterol 7alpha-hydroxylase cDNA". *The Journal of Biological Chemistry*. 1997; 272: 23995-24001 .
 - **Seol W., Chung M. e Moore D.D.** "Novel receptor interaction and repression domains in the orphan receptor SHP". *Molecular Cell Biology*. 1997; 17: 7126-7131.
 - **Serougne-Gautheron C. e Chevallier F.** "Time course of biosynthetic cholesterol in the adult rat brain". *Biochimica et Biophysica Acta*. 1973; 316: 244-250.
 - **Setoguchi T., Salen G., Tint G.S. e Mosbach E.H.** "A biochemical abnormality in cerebrotendinous xanthomatosis: impairment of bile acid biosynthesis associated with incomplete degradation of the cholesterol side chain". *Journal of Clinical Investigation*. 1974; 531: 1393-1401.

- **Shefer S., Cheng F.W., Dayal B. et al.** “A 25-hydroxylation pathway of cholic acid biosynthesis in man and rat”. *Journal of Clinical Investigation*. 1976; 57: 897-903.
- **Shefer S., Hauser S., Salen G. et al.** “Comparative effects of cholestanol and cholesterol on hepatic sterol and bile acid metabolism in the rat”. *Journal of Clinical Investigation*. 1994; 74: 1773-1781.
- **Shimomura I., Shimano H., Horton J.D. et al.** “Differential expression of exons 1a and 1c in mRNAs for sterol regulatory element binding protein-1 in human and mouse organs and cultured cells”. *Journal of Clinical Investigation*. 1997. 99: 838-845.
- **Nie S., Chen G., Cao X. e Zhang Y.** “Cerebrotendinous xanthomatosis: a comprehensive review of pathogenesis, clinical manifestation, diagnosis, and management”. *Orfanet Journal of Rare Diseases*. 2014; 9: 179-189.
- **Simonen P., Gylling H. e Miettinen T.A.** “The validity of serum squalene and noncholesterol sterols as surrogate markers of cholesterol synthesis and absorption in type 2 diabetes”. *Atherosclerosis*. 2008; 197: 883-888.
- **Skrede S., Björkhem I., Buchmann M.S. et al.** “A novel pathway for biosynthesis of cholestanol with 7 α -hydroxysteroid as intermediates and its importance for the accumulation of cholestanol in CTX” *Journal of Clinical Investigation*. 1985; 75: 448-455.
- **Skrede S., Björkhem I., Buchmann M.S. et al.** “Biosynthesis of cholestanol from bile acid intermediates in the rabbit and the rat”. *Journal of Biological Chemistry*. 1985b; 260: 77-81.
- **Smith K.M., Lawn R.M. e Wilcox J.N.** “Cellular localization of apolipoprotein D and lecithin: cholesterol acyltransferase mRNA in rhesus monkey tissues by in situ hybridization”. *Journal of Lipid Research*. 1990; 31: 995-1004.
- **Snipes G. e Suter U.** “Cholesterol and myelin”. In: Bittman R. (ed). *Subcellular Biochemistry Vol. 28*. 1997.
- **Solomon A., Leoni V., Kivipelto M. et al.** “Plasma levels of 24(S)-hydroxycholesterol reflect brain volumes in patients without objective cognitive impairment but not those with Alzheimer’s disease”. *Neuroscience Letters*. 2009; 462: 89-93.

- **Song B.L., Javitt N.B. e DeBose Boyd R.A.** “Insig-mediated degradation of HGM-CoA reductase stimulated by lanosterol, an intermediated in the synthesis of cholesterol”. *Cell Metabolism*. 2005; 1: 179-189.
- **Stahlberg D.** “Effects of pregnenolone-16 alpha-carbonitrile on the metabolism of cholesterol in rat liver microsomes”. *Lipids*. 1995; 30: 361-364.
- **Staudinger J.L., Goodwin B., Jones S.A. et al.** “The nuclear receptor PXR is a lithocholic acid sensor that protects against liver toxicity”. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2001; 98: 3369-3374.
- **Stieger B.** “The role of the sodium-taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) and of the bile salt export pump (BSEP) in physiology and pathophysiology of bile formation”. *Handbook of Experimental Pharmacology*. 2011; 201: 205-259.
- **Stroup D. e Chiang J.Y.L.** “HNF4 and COUP-TFII interact to modulate transcription of the cholesterol 7 α -hydroxylase gene (CYP7A)”. *Journal of Lipid Research*. 2000; 41: 1-11.
- **Sumi K., Tanaka T., Uchida A. et al.** “Cooperative interaction between hepatocyte nuclear factor 4 α and GATA transcriptional factors regulates ATP-binding cassette sterol transporters ABCG5 and ABCG8”. *Molecular and Cellular Biology*. 2007; 27: 4248-4260.
- **Szanto A., Benko S., Szatmari I. et al.** “Transcriptional regulation of human CYP27 integrates retinoid, peroxisome proliferator-activated receptor, and liver X receptor signaling in macrophages”. *Molecular Cell Biology*. 2004; 24: 8154-8166.
- **Tabernero A., Bolanos J. P. e Medina J. M.** “Lipogenesis from lactate in rat neurons and astrocytes in primary culture”. *The Biochemical Journal*. 1993; 294: 635-638.
- **Tall A.R., Yvan-Charvet L., Westerterp M. e Murphy A.J.** “Cholesterol efflux: a novel regulator of myelopoiesis and atherogenesis”. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. 2012; 32: 2547-2552.
- **Tansey T.R. e Shechter I.** “Squalene synthase: structure and regulation”. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*. 2001; 65: 157-195.

- **Tchernof A. e Després J.P.** “Pathophysiology of human visceral obesity: an update”. *Physiological Reviews*. 2013; 93: 359-404.
- **Thelen K.M., Falkai P., Bayer T.A. e Lütjohann D.** “Cholesterol synthesis rate in human hippocampus declines with aging”. *Neuroscience Letters*. 2006; 403: 15-19.
- **Theofilopoulos S., Griffiths W.J., Crick P.J. et al.** “Cholestenic acids regulate motor neuron survival via liver X receptors”. *Journal of Clinical Investigation*. 2014; 124: 4829-4842.
- **Tiangang L. e Chiang J.Y.L.** “Nuclear receptors in bile acid metabolism”. *Drug Metabolism Reviews*. 2013; 45: 145-155.
- **Towheed T.E., Maxwell L., Anastassiades T.P. et al.** “Glucosamine therapy for treating osteoarthritis”. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2005; Issue 2. Art. No.:CD002946. pub2. DOI: 10. 1002/14651858. CD002946.
- **Tsaousidou M.K., Ouahchi K., Warner T.T. et al.** “Sequence alterations within CYP7B1 implicate defective cholesterol homeostasis in motor-neuron degeneration”. *The American Journal of Human Genetics*. 2008; 82: 510-515.
- **Thummel K.E., Brimer C., Yasuda K. et al.** “Transcriptional control of intestinal cytochrome P-4503A by 1 α ,25-dihydroxy vitamin D $_3$ ”. *Molecular Pharmacology*. 2001; 60: 1399-1406.
- **Twisk J., Hoekman M.F., Mager W.H. et al.** “Heterogeneous expression of cholesterol 7 α -hydroxylase and sterol 27-hydroxylase genes in the rat liver lobulus”. *Journal of Clinical Investigation*. 1995; 95: 1235-1243.
- **Umetani M. e Shaul P.W.** “27-Hydroxycholesterol: the First Identified Endogenous SERM”. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 2011; 22: 130-135.
- **Van Bennekum A., Werder M., Thuahnai S.T. et al.** “Class B scavenger receptor-mediated intestinal absorption of dietary beta-carotene and cholesterol”. *Biochemistry*. 2005; 44: 4517-4525.
- **Van Bogaert L., Scherer H.J., Froelich A. e Epstein E.** “Une deuxième observation de cholesterinose tendineuse symétrique avec symptômes cérébraux” *Annals of Medicine*. 1937; 42: 69-101.

- **Van der Veen J.N., Kruit J.K., Havinga R. et al.** “Reduced cholesterol absorption upon PPARdelta activation coincides with decreased intestinal expression of NPC1L1”. *Journal of Lipid Research*. 2005; 46: 526-534.
- **van Sweieten J.C., Koudstaal P.J., Visser M.C. et al.** “Interobserver agreement for the assessment of handicap in stroke patients”. *Stroke*. 1988; 19: 604-607.
- **Vance J.E. e Hayashi H.** “Formation and function of apolipoprotein E-containing lipoproteins in the nervous system”. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2010; 1801: 806-818.
- **Vanrietvelde F., Lemmerling M., Mesprenue M. et al.** “MRI of the brain in cerebrotendinous xanthomatosis (van Bogaert-Scherer-Epstein disease)”. *European Radiology*. 2000; 10: 576-578.
- **Verrips A., Wevers R.A., van Engelen B.G. et al.** “Effect of simvastatin in addition to chenodeoxycholic acid”. *The New England Journal of Medicine*. 1999; 48: 233-238.
- **Vetrivel K.S. e Thinakaran G.** “Membrane rafts in Alzheimer’s disease beta-amyloid production”. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2010; 1801: 860-867.
- **Viollet B., Kahn A., Raymondjean M.** “Protein kinase A-dependent phosphorylation modulates DNA-binding activity of hepatocyte nuclear factor 4”. *Molecular and Cellular Biology*. 1997; 17: 4208-4219.
- **Voet D., Voet J.J. e Pratt C.W.** “Fondamenti di biochimica II ED”. Zanichelli.
- **Waelsch H., Sperry W.B. e Stoyanoff V.A.** “Lipid metabolism in brain during myelination”. *Journal of Biological Chemistry*. 1940; 35: 297-302.
- **Wahrle S., Das P., Nyborg A.C. et al.** “Cholesterol-dependent gamma-secretase activity in buoyant cholesterol-rich membrane microdomains”. *Neurobiology of Disease*. 2002; 9: 11-23.
- **Wojtal K., Trojnar M.K. e Czuczwar S.J.** “Endogenous neuroprotective factors: neurosteroids”. *Pharmacological Reports*. 2006; 58: 335-340.
- **Wollmer M.A.** “Cholesterol-related genes in Alzheimer’s disease”. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2010; 1801: 762-773.

- **Wolozin B., Kellman W., Ruosseau P. et al.** “Decreased prevalence of Alzheimer disease associated with 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors”. *Archives of Neurology*. 2000; 57: 1439-1443.
- **Wang H., Chen J., Hollister K. et al.** “Endogenous bile acids are ligands for the nuclear receptor FXR/BAR”. *Molecular Cell*. 1999; 3: 543-553.
- **Wang J., Chu B.B, Ge L. et al.** “Membrane topology of human NPC1L1, a key protein in enterohepatic cholesterol absorption”. *Journal of Lipid Research*. 2009; 50: 1653-1662.
- **Wang L., Lee Y.K., Bundman D. et al.** “Redundant pathways for negative feedback regulation of bile acid production”. *Developmental Cell*. 2002; 2: 721-731.
- **Wang N., Yvan-Charvet L., Lütjohann D. et al.** “ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cholesterol and desmosterol efflux to HDL and regulate sterol accumulation in the brain”. *FASEB Journal*. 2008; 22: 1073-1082.
- **Waterham H.R.** “Defects of cholesterol biosynthesis”. *FEBS Letters*. 2006; 580: 5442-5449.
- **Weihrauch J. e Gardner J.** “Sterol content of foods of plant origin”. *Journal of the American Diet Association*. 1978; 73: 39-47.
- **Wilson M.D. e Rudel L.L.** “Review of cholesterol absorption with emphasis on dietary and biliary cholesterol”. *Journal of Lipid Research*. 1994; 35: 943-955.
- **Wistuba W., Gnewuch C., Liebisch G. et al.** “Lithocholic acid induction of the FGF19 promoter in intestinal cells is mediated by PXR”. *World Journal of Gastroenterology*. 2007; 13: 4230-4235.
- **Wollam J. e Antebi A.** “Sterol regulation of metabolism, homeostasis and development”. *Annual Review of Biochemistry*. 2011; 80: 885-916.
- **Xiong H., Callaghan D., Jones A. et al.** “Cholesterol retention in Alzheimer's brain is responsible for high beta- and gamma-secretase activities and Aβ production”. *Neurobiology of Disease*. 2008; 29: 422-437.
- **Xu F., Rychnovsky S.D., Belani, J.D. et al.** “Dual roles for cholesterol in mammalian cells”. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2005; 102: 14551-14556.

- **Xu L., Glass C.K. e Rosenfeld M.G.** “Coactivator and corepressor complexes in nuclear receptor function”. *Current Opininion in Genetic & Development*. 1999; 9: 140-147.
- **Yanagisawa K.** “Cholesterol and amyloid beta fibrillogenesis”. *Subcellular Biochemistry*. 2005; 38: 179-202.
- **Yau J.L., Rasmuson S., Andrew R. et al.** “Dehydroepiandrosterone 7-hydroxylase CYP7B: predominant expression in primate hippocampus and reduced expression in Alzheimer’s disease”. *Neuroscience*. 2003; 121: 307-314.
- **Yu L., Bharadwaj S., Brown J.M. et al.** “Cholesterol-regulated translocation of NPC1L1 to the cell surface facilitates free cholesterol uptake”. *Journal of Biological Chemistry*. 2006; 281, 6616-6624.
- **Yu L., Hammer R.E., Li-Hawkins J. et al.** “Disruption of ABCG5 and ABCG8 in mice reveals their crucial role in biliary cholesterol secretion”. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002a; 99: 16237-16242.
- **Yu L., Li-Hawkins J., Hammer R.E. et al.** “Overexpression of ABCG5 and ABCG8 promotes biliary cholesterol secretion and reduces fractional absorption of dietary cholesterol”. *The Journal of Clinical Investigation*. 2002b; 110: 671-680.
- **Zambon A., Hokanson J.E., Brown B.G. e Brunzell J.D.** “Evidence for a new pathophysiological mechanism for coronary artery disease regression: hepatic lipase-mediated changes in LDL density”. *Circulation*. 1999; 99: 1959-1964.
- **Zhang Y., Appelkvist E.L., Kristensson K. e Dallner G.** “The lipid compositions of different regions of rat brain during development and aging”. *Neurobiology of Aging*. 1996; 17: 869-875.
- **Zollner G., Marschall H.U., Wagner M. e Trauner M.** “Role of nuclear receptors in the adaptive response to bile acid and cholestasis: pathogenic and therapeutic consideration”. *Molecular Pharmaceutics*. 2006; 3: 231-251.
- **Zuliani G., Perrone Donnorso M., Bosi C., Passaro A. et al.** “Plasma 24S-hydroxycholesterol levels in elderly subjects with late onset Alzheimer’s disease or vascular dementia: a case-control study”. *BioMedCentral Neurology*. 2011; 11: 121-128.

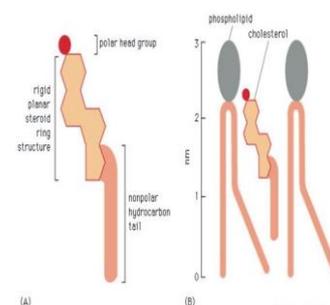
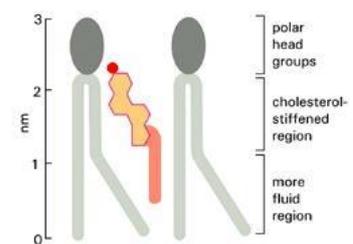
**Garland Science - Books LICENSE
TERMS AND CONDITIONS**

Feb 03, 2015

This is a License Agreement between Alessandro Magni ("You") and Garland Science - Books ("Garland Science - Books") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Garland Science - Books, and the payment terms and conditions.

All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.

License Number	3558291479944
License date	Jan 29, 2015
Licensed content publisher	Garland Science - Books
Licensed content title	Molecular biology of the cell
Licensed content date	Jan 1, 2002
Type of Use	Thesis/Dissertation
Requestor type	Academic institution
Format	Print, Electronic
Portion	image/photo
Number of images/photos requested	2
Title or numeric reference of the portion(s)	Chapter 10, Figure 10.10 and Figure 10.11
Title of the article or chapter the portion is from	Membrane Structure
Editor of portion(s)	N/A
Author of portion(s)	N/A
Volume of serial or monograph.	N/A
Issue, if republishing an article from a serial	N/A
Page range of the portion	630-631
Publication date of portion	2002
Rights for	Main product
Duration of use	Life of current edition
Creation of copies for the disabled	no
With minor editing privileges	no
For distribution to	Worldwide
In the following language(s)	Original language plus one translation
Specific languages	italian, english (abstract only)
With incidental promotional use	no
The lifetime unit quantity of new product	Up to 499
Made available in the following markets	university
The requesting person/organization is:	Alessandro Magni / University of Milano-Bicocca
Order reference number	None
Author/Editor	ALESSANDRO MAGNI
The standard identifier	none
Title	METABOLISMO DEL COLESTEROLO E MALATTIE NEUROMETABOLICHE: MODIFICAZIONI OSSERVATE IN SOGGETTI AFFETTI DA XANTOMATOSI CEREBROTENDINEA E PARAPARESI SPASTICA DI TIPO 5
Publisher	none
Expected publication date	Feb 2015
Estimated size (pages)	180
Total (may include CCC user fee)	0.00 USD



Copyright Clearance Center **RightsLink**[®] [Home](#) [Create Account](#) [Help](#)



Title: Modulation of intestinal cholesterol absorption by high glucose levels: impact on cholesterol transporters, regulatory enzymes, and transcription factors

Author: Z. Ravid, M. Bendayan, E. Delvin, A. T. Sane, M. Elchebly, J. Lafond, M. Lambert, G. Mailhot, E. Levy

Publication: Am J Physiol-Gastrointestinal and Liver Physiology

Publisher: The American Physiological Society

Date: Jan 1, 2015
Copyright © 2015, The American Physiological Society

[LOGIN](#)
If you're a **copyright.com** user, you can login to RightsLink using your copyright.com credentials. Already a **RightsLink** user or want to [learn more?](#)

Welcome to RightsLink

American Physiological Society has partnered with Copyright Clearance Center's RightsLink service to offer a variety of options for reusing American Physiological Society content. Select the "I would like to ..." drop-down menu to view the many reuse options available to you.

I would like to... ? reuse in a thesis/dissertation

- make a selection
- reuse in a book/textbook
- post on a website/blog
- reuse in training materials
- reuse in promotional materials/pamphlet
- reuse in a journal/magazine
- reuse in a presentation/slide kit
- post on an intranet
- reuse in a newspaper/newsletter
- reuse in a thesis/dissertation**
- make photocopies
- send in an email
- reuse in a coursepack

Copyright © 2015 Copyright Clearance Center. Comments? We would like to hear from you. [Privacy statement.](#) [Contact us.](#) [Copyright.com](#)

Copyright Clearance Center **RightsLink**[®] [Home](#) [Create Account](#) [Help](#)



Title: Modulation of intestinal cholesterol absorption by high glucose levels: impact on cholesterol transporters, regulatory enzymes, and transcription factors

Author: Z. Ravid, M. Bendayan, E. Delvin, A. T. Sane, M. Elchebly, J. Lafond, M. Lambert, G. Mailhot, E. Levy

Publication: Am J Physiol-Gastrointestinal and Liver Physiology

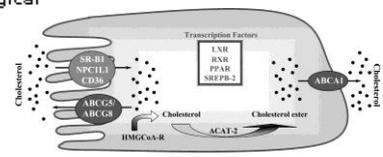
Publisher: The American Physiological Society

Date: Jan 1, 2015
Copyright © 2015, The American Physiological Society

[LOGIN](#)
If you're a **copyright.com** user, you can login to RightsLink using your copyright.com credentials. Already a **RightsLink** user or want to [learn more?](#)

Permission Not Required

Permission is not required for this type of use.





RightsLink®

[Home](#)
[Create Account](#)
[Help](#)



Title: III. Regulation of bile acid synthesis: past progress and future challenges

Author: Michael Fuchs

Publication: Am J Physiol-Gastrointestinal and Liver Physiology

Publisher: The American Physiological Society

Date: Jan 1, 2015

Copyright © 2015, The American Physiological Society

LOGIN

If you're a copyright.com user, you can login to RightsLink using your copyright.com credentials. Already a **RightsLink user** or want to [learn more?](#)

Welcome to RightsLink

American Physiological Society has partnered with Copyright Clearance Center's RightsLink service to offer a variety of options for reusing American Physiological Society content. Select the "I would like to ..." drop-down menu to view the many reuse options available to you.

I would like to... ?

- reuse in a thesis/dissertation
- make a selection
- reuse in a book/textbook
- post on a website/blog
- reuse in training materials
- reuse in promotional materials/pamphlet
- reuse in a journal/magazine
- reuse in a presentation/slide kit
- post on an intranet
- reuse in a newspaper/newsletter
- reuse in a thesis/dissertation
- make photocopies
- send in an email
- reuse in a coursepack

Copyright © 2015 [Copyright Clearance Center, Inc.](#) All Rights Reserved. [Privacy statement.](#)
 Comments? We would like to hear from you. E-mail us at customer@copyright.com



RightsLink®

[Home](#)
[Create Account](#)
[Help](#)



Title: III. Regulation of bile acid synthesis: past progress and future challenges

Author: Michael Fuchs

Publication: Am J Physiol-Gastrointestinal and Liver Physiology

Publisher: The American Physiological Society

Date: Jan 1, 2015

Copyright © 2015, The American Physiological Society

LOGIN

If you're a copyright.com user, you can login to RightsLink using your copyright.com credentials. Already a **RightsLink user** or want to [learn more?](#)

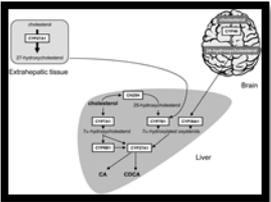
Permission Not Required

Permission is not required for this type of use.

BACK

CLOSE WINDOW

Copyright © 2015 [Copyright Clearance Center, Inc.](#) All Rights Reserved. [Privacy statement.](#)
 Comments? We would like to hear from you. E-mail us at customer@copyright.com





Confirmation Number: 11289056
Order Date: 01/09/2015

Customer Information

Customer: Alessandro Magni
Account Number: 3000876958
Organization: Alessandro Magni
Email: a.magni11@campus.unimib.it
Phone: +39 3203348066
Payment Method: Invoice

This is not an invoice

Order Details

Endocrine reviews

Order detail ID: 66016035
ISSN: 1945-7189
Publication Type: e-Journal
Volume:
Issue:
Start page:
Publisher: ENDOCRINE SOCIETY
Author/Editor: Endocrine Society

Billing Status:
N/A

Permission Status: Granted
Permission type: Republish or display content
Type of use: Republish in a thesis/dissertation
Order License Id: 3544650169541

Requestor type: Academic institution
Format: Print, Electronic
Portion: chart/graph/table/figure

Number of charts/graphs/tables/figures: 1

Title or numeric reference of the portion(s): Figure 1

Title of the article or chapter the portion is from: Bile Acid Regulation of Gene Expression: Roles of Nuclear Hormone Receptors

Editor of portion(s): ENDOCRINE SOCIETY

Author of portion(s): JOHN Y. L. CHIANG

Volume of serial or monograph: 23

Issue, if republishing an article from a serial: 4

Page range of portion: 445

Publication date of portion: 2002, Aug

Rights for: Main product

Duration of use: Life of current edition

Creation of copies for the disabled: no

With minor editing privileges: yes

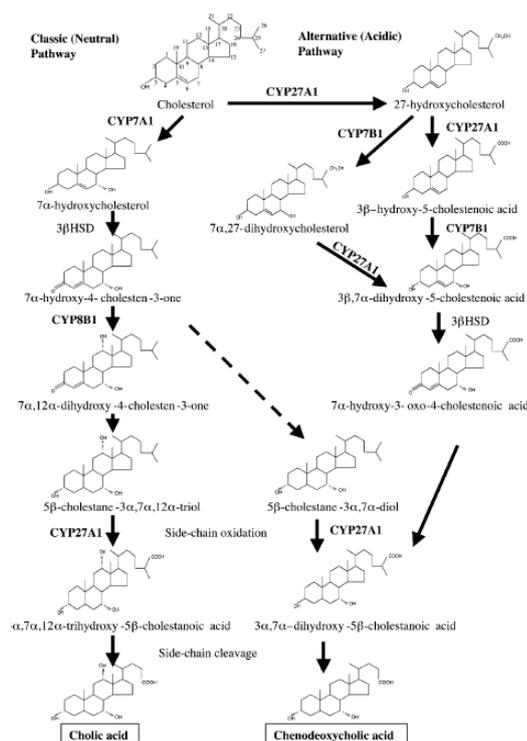
For distribution to: Worldwide

In the following language(s): Original language plus one translation

Specific languages: italian, english (abstract only)

With incidental promotional use: no

Lifetime unit quantity of new product: Up to 499



Note: This item was invoiced separately through our RightsLink service. [More info](#)

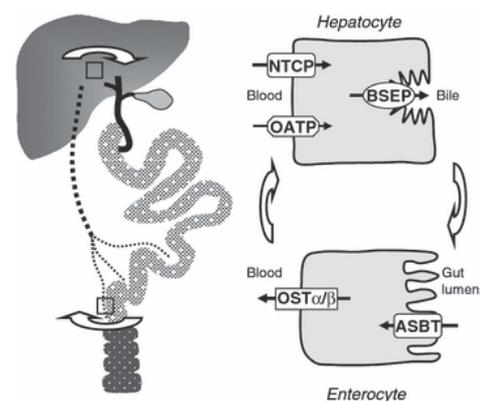
\$ 0.00

**JOHN WILEY AND SONS LICENSE
TERMS AND CONDITIONS**

Jan 20, 2015

This Agreement between Alessandro Magni ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") consists of your license details and the terms and conditions provided by John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center.

License Number	3552960263065
License date	Jan 20, 2015
Licensed Content Publisher	John Wiley and Sons
Licensed Content Publication	Alimentary Pharmacology & Therapeutics
Licensed Content Title	Review article: the function and regulation of proteins involved in bile salt biosynthesis and transport
Licensed Content Author	A. PELLICORO, K. N. FABER
Licensed Content Date	Dec 7, 2007
Pages	12
Type of use	Dissertation/Thesis
Requestor type	University/Academic
Format	Print and electronic
Portion	Figure/table
Number of figures/tables	1
Original Wiley figure/table number(s)	Figure 1
Will you be translating?	Yes, including English rights
Number of languages	1
Languages	Italian English
Title of your thesis / dissertation	METABOLISMO DEL COLESTEROLO E MALATTIE NEUROMETABOLICHE: MODIFICAZIONI OSSERVATE IN SOGGETTI AFFETTI DA XANTOMATOSI CEREBROTENDINEA E PARAPARESIA SPASTICA DI TIPO 5
Expected completion date	Feb 2015
Expected size (number of pages)	180
Requestor Location	Alessandro Magni via Raffaele Merelli 10 Monza, Italy 20900 Attn: Alessandro Magni
Billing Type	Invoice
Billing Address	Alessandro Magni via Raffaele Merelli 10 Monza, Italy 20900 Attn: Alessandro Magni
Total	0.00 USD



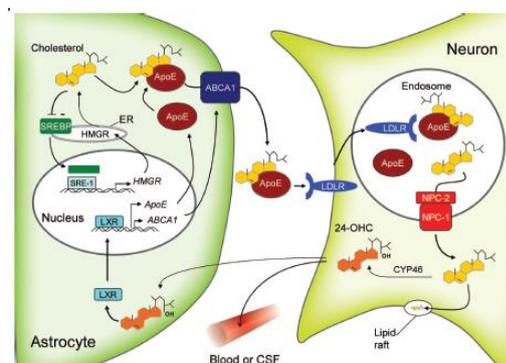
**WOLTERS KLUWER HEALTH LICENSE
TERMS AND CONDITIONS**

Jan 08, 2015

This is a License Agreement between Alessandro Magni ("You") and Wolters Kluwer Health ("Wolters Kluwer Health") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Wolters Kluwer Health, and the payment terms and conditions.

All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.

License Number	3544231033329
License date	Jan 08, 2015
Licensed content publisher	Wolters Kluwer Health
Licensed content publication	Neurology
Licensed content title	Brain cholesterol metabolism and neurologic disease SYMBOL.
Licensed content author	Benarroch, Eduardo
Licensed content date	Jan 1, 2008
Volume Number	71
Issue Number	17
Type of Use	Dissertation/Thesis
Requestor type	Individual
Portion	Figures/table/illustration
Number of figures/tables /illustrations	1
Figures/tables/illustrations used	Figure
Author of this Wolters Kluwer No article	
Title of your thesis / dissertation	METABOLISMO DEL COLESTEROLO E MALATTIE NEUROMETABOLICHE: MODIFICAZIONI OSSERVATE IN SOGGETTI AFFETTI DA XANTOMATOSI CEREBROTENDINEA E PARAPARESIA SPASTICA DI TIPO 5
Expected completion date	Feb 2015
Estimated size(pages)	180
Billing Type	Invoice
Billing Address	Alessandro Magni via Raffaele Merelli 10
	Monza, Italy 20900 Attn: Alessandro Magni
Total	0.00 USD
Terms and Conditions	





RightsLink®

Home

Create Account

Help



Title: Regulation of 25- and 27-hydroxylation side chain cleavage pathways for cholic acid biosynthesis in humans, rabbits, and mice: assay of enzyme activities by high-resolution gas chromatography-mass spectrometry

Author: Akira Honda, Gerald Salen, Sarah Shefer, Yasushi Matsuzaki, Guorong Xu, Ashok K. Batta, G. Stephen Tint, Naomi Tanaka

Publication: Journal of Lipid Research

Publisher: The American Society for Biochemistry and Molecular Biology

Date: Mar 1, 2000

Copyright © 2000, by the American Society for Biochemistry and Molecular Biology

LOGIN

If you're a **copyright.com user**, you can login to RightsLink using your copyright.com credentials. Already a **RightsLink user** or want to [learn more?](#)

Welcome to Rightslink for Commercial Use

The American Society for Biochemistry and Molecular Biology has partnered with Copyright Clearance Center's Rightslink service to offer a variety of options for reusing ASBMB content **for Commercial Use, including authors reusing content by a commercial publisher**. Select the "I would like to ..." drop-down menu to view the many reuse options available to you.

I would like to...

make a selection

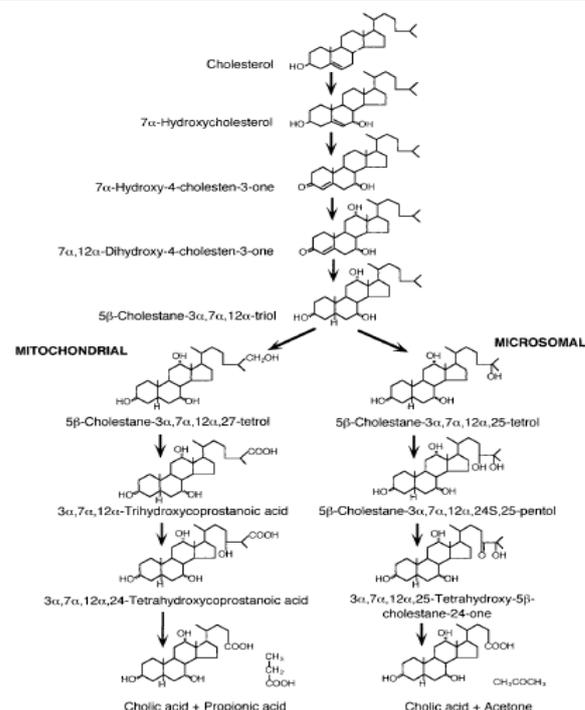


For Non-profit/Non-commercial uses: You are FREE to copy, distribute, transmit and to adapt the work under the following conditions:

Attribution. You must attribute the work in the manner specified by the author or licensor (but not in any way that suggests that they endorse you or your use of the work).

Non-commercial. You may not use the work for commercial purposes; including original authors reusing content by a commercial publisher.

Copyright © 2015 [Copyright Clearance Center, Inc.](#) All Rights Reserved. [Privacy statement.](#)



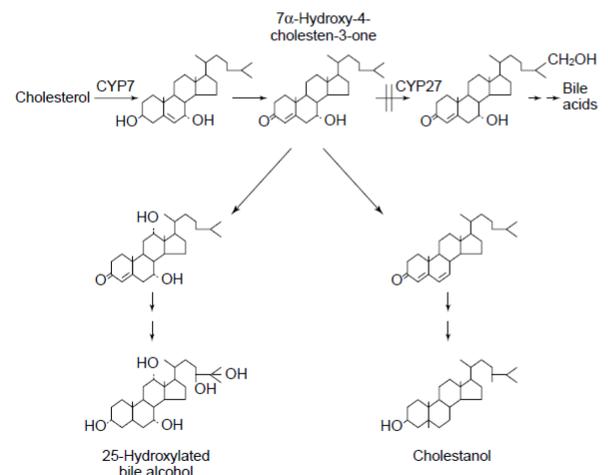
**ELSEVIER LICENSE
TERMS AND CONDITIONS**

Jan 08, 2015

This is a License Agreement between Alessandro Magni ("You") and Elsevier ("Elsevier") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Elsevier, and the payment terms and conditions.

All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.

Supplier	Elsevier Limited The Boulevard, Langford Lane Kidlington, Oxford, OX5 1GB, UK
Registered Company Number	1982084
Customer name	Alessandro Magni
Customer address	via Raffaele Merelli 10 Monza, Monza / Lombardia 20900
License number	3544211079312
License date	Jan 08, 2015
Licensed content publisher	Elsevier
Licensed content publication	Trends in Endocrinology & Metabolism
Licensed content title	Sterol 27-hydroxylase Deficiency: A Rare Cause of Xanthomas in Normocholesterolemic Humans
Licensed content author	Ingemar Björkhem, Eran Leitersdorf
Licensed content date	1 July 2000
Licensed content volume number	11
Licensed content issue number	5
Number of pages	4
Start Page	180
End Page	183
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	No
Will you be translating?	Yes
Number of languages	1
Languages	Italiano English (abstract only)
Original figure numbers	Figure 2
Title of your thesis/dissertation	METABOLISMO DEL COLESTEROLO E MALATTIE NEUROMETABOLICHE: MODIFICAZIONI OSSERVATE IN SOGGETTI AFFETTI DA XANTOMATOSI CEREBROTENDINEA E PARAPARESIA SPASTICA DI TIPO 5
Expected completion date	Feb 2015
Estimated size (number of pages)	180
Elsevier VAT number	GB 494 6272 12
Permissions price	0.00 EUR
VAT/Local Sales Tax	0.00 EUR / 0.00 GBP
Total	0.00 EUR



RINGRAZIAMENTI

Sono giunto alla fine della scrittura della mia terza tesi, quella (forse) più importante di tutte e solo ora mi sono accorto di non aver mai inserito, nelle precedenti dissertazioni, una pagina di ringraziamenti. In questa sede voglio quindi cogliere l'occasione per ringraziare tutti coloro che mi hanno supportato finora, a partire da tutte le persone care mi sono state vicine in questi anni (e i diretti interessati che leggeranno queste righe sanno bene che mi sto rivolgendo a loro).

Ringrazio la professoressa Marina Del Puppo per avermi dato l'opportunità di svolgere questo dottorato presso il suo laboratorio, per il suo costante aiuto e supporto durante la ricerca e per avermi dato l'occasione di fare anche piccole esperienze di didattica.

Ringrazio i nostri collaboratori dell'Università di Siena, in particolare il dottor Andrea Mignarri, il dottor Gian Nicola Gallus, il professor Antonio Federico e la professoressa Maria Teresa Dotti, senza i quali questa ricerca non avrebbe potuto essere svolta.

Ringrazio l'ormai dottoressa Jessica Biffi per la collaborazione, la compagnia e l'amicizia dimostratami durante il suo periodo di tesi, anche se i nostri gusti musicali rimarranno sempre ed irrimediabilmente incompatibili.

Vorrei inoltre ringraziare il professor Fulvio Magni (no, non sono suo parente!) e tutto lo staff del suo laboratorio per tutto l'aiuto ricevuto, in particolare un ringraziamento a Clizia Chinello per il puntale supporto tecnico, a Marta Cazzaniga per quello amministrativo-burocratico, a Manuel Galli per quello statistico, a Gabriele De Sio per quello morale e ad Andrew Smith per quello sulla lingua inglese. Infine un pensiero va ai miei colleghi del XXVII ciclo di questo dottorato ed in particolare a Samuele Corbetta, con il quale ho condiviso diversi momenti di formazione e le tappe più salienti di questo corso di dottorato.

GRAZIE A TUTTI E BUONA VITA!

Alessandro