



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI
DI MILANO

Dottorato di Ricerca in Scienze della Nutrizione
XXX Ciclo

**LIVELLI DI VITAMINA E
E LUNGHEZZA TELOMERICA
IN SOGGETTI AFFETTI DA
DEMENTIA DI ALZHEIMER**

RELATORE: Prof. Giovanni Vitale

COORDINATORE del CORSO: Prof. Luciano Pinotti

Tesi di Dottorato di:
Martina Casati
Matricola R10946

Anno Accademico 2016-2017

INDICE

RIASSUNTO	4
INTRODUZIONE	6
LA DEMENZA DI ALZHEIMER	6
DEFINIZIONE	6
EPIDEMIOLOGIA	7
QUADRO CLINICO	8
ALTERAZIONI ANATOMO-PATOLOGICHE	8
EZIOPATOGENESI	9
Ipotesi amiloidea	9
Ipotesi della proteina Tau	11
Ipotesi infiammatoria	12
Ipotesi dello stress ossidativo	14
Ipotesi dell'ipometabolismo del glucosio	15
Ipotesi del microbiota intestinale	15
FATTORI di RISCHIO	16
FATTORI PROTETTIVI	17
CRITERI DIAGNOSTICI	18
LE VITAMINE	20
VITAMINA E	22
RUOLO BIOLOGICO della VITAMINA E	23
VITAMINA E e DEMENZA di ALZHEIMER	24
LA BIOLOGIA DEI TELOMERI	27
TELOMERI	27
TELOMERASI	29
REGOLAZIONE dell'ATTIVITA' TELOMERASICA	30
REGOLAZIONE dell'ATTIVITA' TELOMERASICA nei LINFOCITI	31
DEMENTIA di ALZHEIMER. LUNGHEZZA TELOMERICA e ATTIVITA' TELOMERASICA	32
VITAMINA E. LUNGHEZZA TELOMERICA e ATTIVITA' TELOMERASICA	34

SCOPO	36
MATERIALI E METODI	37
DISEGNO dello STUDIO	37
ANALISI BIOCHIMICHE	38
ESTRAZIONE DNA	39
ANALISI del GENOTIPO dell'APOLIPROTEINA E	40
ANALISI della LUNGHEZZA TELOMERICA	41
ISOLAMENTO delle CELLULE MONONUCLEATE	
PERIFERICHE del SANGUE	43
ANALISI dell'ATTIVITA' TELOMERASICA	44
ANALISI STATISTICA	45
RISULTATI	46
CARATTERISTICHE della POPOLAZIONE	46
VITAMINA E e DEMENZA di ALZHEIMER	47
TELOMERI e DEMENZA di ALZHEIMER	49
VITAMINA E e LUNGHEZZA TELOMERICA e ATTIVITA'	
TELOMERASICA	50
DISCUSSIONE	51
CONCLUSIONI	58
BIBLIOGRAFIA	59

RIASSUNTO

Le persone affette da demenza di Alzheimer (AD) nel mondo sono circa 46,8 milioni e, come conseguenza dell'invecchiamento della popolazione mondiale, è previsto un aumento della prevalenza di questa malattia di circa quattro volte nelle prossime decadi. L'AD è un disordine neurodegenerativo che si manifesta con un progressivo decadimento cognitivo associato ad una perdita dell'autonomia funzionale. L'eziopatogenesi è tutt'oggi sconosciuta, ma è evidente un'alterazione del sistema infiammatorio e un aumento dello stress ossidativo nei pazienti affetti dalla questa patologia.

Negli ultimi anni sono aumentati notevolmente gli studi sull'alimentazione, considerata un "fattore di rischio modificabile" in grado di influire sullo sviluppo delle patologie neurodegenerative. Recenti studi sulle attività antiossidanti e antinfiammatorie della vitamina E, hanno evidenziato il potenziale ruolo neuroprotettivo di questa vitamina nell'AD.

È stato, inoltre, dimostrato che la compromissione dello stress ossidativo e dell'infiammazione può comportare un accorciamento telomerico e un'alterazione dell'attività telomerasica, determinando un'accelerata senescenza cellulare ed è stato osservato un ruolo della vitamina E nella protezione telomerica.

Lo scopo del nostro studio è stato quello di approfondire l'analisi della vitamina E nell'AD, valutando l'esistenza di una relazione tra i livelli sierici delle isoforme di vitamina E e il rischio di sviluppare AD e focalizzando l'analisi sul ruolo che le isoforme di vitamina E possono avere nella patologia, correlandole ai meccanismi legati alla senescenza cellulare.

I nostri risultati hanno evidenziato nei pazienti AD livelli sierici di vitamina E totale, di α -, β -, γ -, δ -tocoferolo e di tocoferoli totali, di δ -tocotrienolo e di tocotrienoli totali (normalizzati sui livelli di colesterolo) significativamente più bassi, e indici di danno ossidativo e nitrossidativo (rapporti α -tocoferilquinone/ α -tocoferolo e 5-nitro- γ -tocoferolo/ γ -tocoferolo, rispettivamente) significativamente più alti, rispetto a soggetti sani cognitivamente integri. Inoltre, bassi livelli sierici di vitamina E e delle isoforme α - e γ -tocoferolo e δ -tocotrienolo, ed elevati valori dei rapporti α -tocoferilquinone/ α -tocoferolo e 5-nitro- γ -tocoferolo/ γ -tocoferolo sono correlati ad un aumentato rischio di sviluppare AD.

Abbiamo poi evidenziato che nei soggetti AD i livelli sierici di α - e γ -tocoferolo sono significativamente più bassi nei portatori dell'allele $\epsilon 4$ dell'apolipoproteina E, noto fattore di rischio per lo sviluppo dell'AD. Al contrario, i rapporti α -tocoferilquinone/ α -tocoferolo e 5-nitro- γ -tocoferolo/ γ -tocoferolo sono significativamente più alti nei pazienti portatori dell' $\epsilon 4$.

Successivamente, ci siamo focalizzati sull'analisi del ruolo che le isoforme della vitamina E possono avere sul rischio di sviluppare AD. Prendendo in considerazione il fatto che un'accelerata senescenza cellulare è stata correlata allo sviluppo dell'AD e che le vitamine, con la loro attività antiossidante e antinfiammatoria, hanno un ruolo protettivo nei confronti dei telomeri, abbiamo valutato se i bassi livelli di vitamina E che si osservano nei pazienti affetti da AD potessero riflettersi in un'alterazione della lunghezza telomerica e dell'attività telomerasica.

Abbiamo osservato una correlazione positiva statisticamente significativa della lunghezza telomerica con i tocoferoli totali e con la vitamina E totale, indipendentemente dalla diagnosi, dal genere, dall'età, dall'attitudine al fumo e dalla terapia con statine. Possiamo quindi ipotizzare che i bassi livelli di vitamina E determinino un'accelerata senescenza cellulare, legata all'accorciamento telomerico, e che questo meccanismo esista a prescindere dalla presenza di uno stato patologico.

In conclusione, i risultati del nostro studio confermano il ruolo neuroprotettivo della famiglia della vitamina E nella neurodegenerazione e rafforzano l'ipotesi che ciascuna isoforma di vitamina E svolga un ruolo unico e che la sola analisi dell' α -tocoferolo non può fornire una valutazione accurata della vitamina E nell'uomo. Evidenziano, inoltre, il ruolo della vitamina E nei meccanismi legati alla senescenza cellulare, mostrato dalla correlazione tra i bassi livelli di questa vitamina e l'accorciamento telomerico.

INTRODUZIONE

LA DEMENZA DI ALZHEIMER

DEFINIZIONE

La demenza di Alzheimer (AD) è un disordine neurodegenerativo che si manifesta con un progressivo decadimento cognitivo associato ad una perdita dell'autonomia funzionale.

Fu descritta per la prima volta da Alois Alzheimer nel 1907 su una paziente di 51 anni, affetta da demenza progressiva, caratterizzata sul piano neuropatologico da peculiari alterazioni cerebrali, e fu considerata per lungo tempo una rara demenza presenile; solo negli anni '70 una serie di studi dimostrarono che la demenza presenile di Alzheimer e la demenza senile avevano la stessa sintomatologia e il medesimo substrato patologico, per cui attualmente si ritiene che esista un'unica entità nosologica, denominata "demenza di Alzheimer", diagnosi possibile solo quando al quadro clinico caratteristico si aggiunge la conferma istopatologica [1].

L'AD viene tradizionalmente classificata sulla base dell'età di esordio in "early onset AD" (EOAD), che interessa soggetti al di sotto dei 65 anni e costituisce il 5-10% di tutti i casi, e "late onset AD" (LOAD), che si manifesta oltre i 65 anni ed è la forma più frequente.

Inoltre, nell'ambito delle EOAD e LOAD, si riconoscono tre diverse varianti: l'AD autosomica dominante, familiare e sporadica.

L'AD autosomica dominante colpisce almeno tre individui di una stessa famiglia in due o più generazioni, con due dei soggetti malati parenti di primo grado del terzo; questa forma, che rappresenta meno del 5% dei casi di AD, è quasi sempre ad esordio precoce. Inoltre, in più del 50% dei casi sono presenti difetti genetici, mutazione della presenilina 1 e 2 e dell'*Amyloid Precursor Protein* (APP).

La variante di AD familiare colpisce più di un individuo di una stessa famiglia e almeno due dei soggetti malati sono parenti al massimo di terzo grado; essa rappresenta il 15-25% dei casi di AD. Nella metà dei casi, si manifesta come

LOAD, nell'altra metà come EOAD.

La variante di AD sporadica è caratterizzata dalla presenza di un caso isolato all'interno di una famiglia o di casi separati da più di tre gradi di parentela; rappresenta il 75% dei casi di AD e nella maggior parte dei casi è ad esordio tardivo [2].

EPIDEMIOLOGIA

L'AD è la più frequente causa di demenza oltre i 65 anni e si ritiene che rappresenti il 60% circa di tutti i casi di demenza.

La prevalenza della demenza nei paesi industrializzati è circa dell'8% negli ultrasessantacinquenni e sale ad oltre il 20% dopo gli ottanta anni. Si calcola che attualmente circa 600 mila persone in Italia sono affette da AD, pari al 4% della popolazione over 65 (www.censis.it).

In accordo con il *World Alzheimer Report 2016* le persone affette da AD nel mondo sono circa 46,8 milioni [3].

Come conseguenza dell'invecchiamento della popolazione mondiale, è previsto un aumento della prevalenza di questa malattia di circa quattro volte nelle prossime decadi. Recenti stime prevedono che più di 74 milioni di individui saranno affetti da questo tipo di demenza entro il 2030 e 131 milioni nel 2050 [3]. Pertanto l'AD è destinata a diventare una tra le più importanti emergenze sociosanitarie mondiali, con un aumento vertiginoso a livello mondiale dei costi della demenza.

Le donne presentano un rischio di sviluppare AD quasi doppio rispetto agli uomini e la prevalenza della malattia è nettamente maggiore, specie nelle fasce di età più avanzata. Anche se la maggior mortalità maschile può spiegare in parte queste differenze, è chiaro che altri fattori entrano in gioco [4]. Infatti, le femmine vivono significativamente più a lungo rispetto ai maschi [5]. Nelle donne, il vantaggio di sopravvivenza si associa però ad una peggiore qualità della vita in età avanzata, caratterizzata da un aumento della disabilità e della prevalenza di malattie degenerative [6]. Pertanto gli uomini e le donne vanno incontro ad un processo di invecchiamento qualitativamente diverso [7].

QUADRO CLINICO

L'AD è una malattia neurodegenerativa primitiva, irreversibile e progressiva, caratterizzata dalla perdita di più funzioni cognitive di entità tale da interferire con le usuali attività sociali del paziente. Oltre ai sintomi cognitivi sono presenti, soprattutto nelle fasi moderato-avanzate di malattia, alterazioni che riguardano la sfera della personalità, l'affettività, l'ideazione, la percezione, le funzioni vegetative e il comportamento [1].

ALTERAZIONI ANATOMO-PATOLOGICHE

Nell'AD le prime alterazioni a carico della corteccia cerebrale si riscontrano soprattutto nella regione entorinale, localizzata nelle porzioni anteriori del giro ippocampale del lobo temporale [8]; queste modificazioni interessano successivamente altre aree della corteccia cerebrale e specifici gruppi di nuclei sottocorticali. All'esame macroscopico, l'encefalo di un paziente affetto da AD mostra un grado variabile di atrofia corticale, riscontrabile in sede autoptica sia con la diminuzione del peso e del volume dell'organo, che con l'assottigliamento degli strati neocorticali e delle circonvoluzioni, che coinvolge regioni implicate nei processi di memoria e apprendimento, come la corteccia temporale, parietale, frontale, l'ippocampo e l'amigdala [9].

L'atrofia è dovuta prevalentemente alla degenerazione neuronale; a questa si accompagna un ingrandimento ventricolare compensatorio, secondario alla perdita di parenchima. In realtà, tutte le alterazioni macroscopiche riscontrate in pazienti AD si ritrovano anche in soggetti sani anziani e sono espressione dell'invecchiamento cerebrale fisiologico. L'AD è tuttavia caratterizzata da una loro maggiore quantità e dalla loro peculiare distribuzione.

A livello istologico, ci è l'accumulo di due diverse proteine: la proteina β amiloide (A β), che si deposita a livello extracellulare, e la proteina Tau fosforilata (pTau) che costituisce ammassi neurofibrillari intracellulari. L'A β si organizza in diverse forme, le placche senili, le placche diffuse e la cosiddetta angiopatia amiloidea.

Le placche senili sono costituite da una parte centrale compatta di fibrille insolubili della proteina A β , circondata da un agglomerato flogistico con neuriti

in degenerazione, astrociti reattivi e microglia attivata, monociti o macrofagi attivati derivati dal sistema reticolo-endoteliale residente nel sistema nervoso centrale (SNC); esse si trovano soprattutto a livello dell'ippocampo e strutture limbiche, dell'amigdala, del subiculum e della corteccia entorinale. Le placche diffuse sono composte invece da materiale scarsamente strutturato e mancano della componente neuritica. L'angiopatia amiloidea è causata dal deposito di A β a livello delle pareti delle arterie cerebrali e meninge.

I grovigli neurofibrillari sono costituiti da fasci compatti di filamenti anomali costituiti principalmente dalla proteina Tau; essi interessano principalmente il soma, ma possono estendersi anche ai dendriti. I *tangles* si trovano soprattutto a livello dei neuroni piramidali di medie dimensioni della corteccia entorinale, della corteccia limbica, dell'ippocampo, dell'amigdala, degli strati neocorticali dei lobi frontali e temporali e dei sistemi colinergici dei nuclei della base.

EZIOPATOGENESI

L'eziopatogenesi dell'AD è tuttora sconosciuta, nonostante gli sforzi attuati dalla comunità scientifica negli ultimi decenni.

IPOTESI AMILOIDEA

La teoria più accreditata è quella amiloidea, supportata dall'osservazione in sede autoptica di placche contenenti tale molecola a livello cerebrale di pazienti con AD.

Le placche senili cerebrali sono costituite da A β , che deriva dall'APP per mezzo di un processo proteolitico [10]. L'APP è una proteina integrale transmembrana presente in numerose isoforme, tutte codificate da un singolo gene localizzato sul cromosoma 21. L'APP è espressa nel SNC, ma è anche ubiquitariamente espressa in diverse varianti nei tessuti periferici, come le cellule muscolari, epiteliali e le cellule circolanti [11]. Ha funzioni di adesione alla matrice extracellulare, recettoriali e di modulazione dell'espressione genica. Inoltre, le molecole di APP secrete partecipano alla formazione delle sinapsi e giocano probabilmente un ruolo nell'integrità del processo mnemonico.

Questa proteina possiede una porzione N-terminale che si affaccia nello spazio extra-cellulare e una porzione C-terminale che costituisce il dominio intracitoplasmatico della proteina. Essa presenta in prossimità dell'estremità C-terminale una sequenza amminoacidica denominata A β , a livello della quale agiscono i tre principali enzimi coinvolti nel metabolismo dell'APP: α -secretasi, β -secretasi e γ -secretasi. In relazione all'attività di questi enzimi, l'APP può seguire due diverse vie di processazione.

La via non amiloidogena prevede la processazione da parte dell' α -secretasi, che cliva l'APP all'altezza del residuo 16 della sequenza A β e dà origine a un frammento solubile N-terminale di 83 amminoacidi, chiamato sAPP α , che viene rilasciato in circolo, e ad un altro frammento di 83 amminoacidi, a livello dell'estremità C-terminale, che rimane attaccato alla membrana cellulare dove, in seguito, andrà incontro a clivaggio da parte della γ -secretasi.

La via amiloidogena prevede l'azione della β -secretasi e successivamente un secondo taglio da parte della γ -secretasi, con rilascio del peptide A β . La β -secretasi effettua il clivaggio a livello dell'estremità N-terminale della sequenza A β , rilasciando nello spazio extracellulare un frammento solubile, detto sAPP β , e lasciando attaccato alla membrana cellulare un frammento C-terminale di 99 amminoacidi, che viene quindi clivato dalla γ -secretasi a livello del residuo 40 o 42 [12]. Pertanto, quest'azione combinata della β - e γ -secretasi determina il rilascio di frammenti amiloidogenici A β di 40 e 42 amminoacidi nello spazio extracellulare, dove essi si possono accumulare; l'A β 40 rappresenta la forma maggiormente prodotta, mentre l'A β 42 è la principale componente delle placche senili essendo dotata di un elevato potenziale fibrillogenico e neurotossico [13]. I frammenti di A β 40 e A β 42 si aggregano spontaneamente a formare una struttura a foglietti β tossica per i neuroni e per le sinapsi, sia nella sua forma precoce, monomerica, dimerica o oligomerica, sia come deposito in aggregati, le placche senili. Si ritiene che gli effetti tossici della A β possano causare lo sviluppo della demenza [14].

Nel soggetto sano le due vie di processazione dell'APP sono in equilibrio tra loro, mentre si ritiene che nell'individuo con malattia di Alzheimer si crei una condizione di disequilibrio, con prevalenza della via amiloidogena rispetto alla

via non amiloidogenica. Ciò determina una maggior produzione di A β 40 e A β 42 e una conseguente sovrasaturazione delle strutture addette allo smaltimento della stessa, che sono già compromesse a causa dell'invecchiamento.

Tre osservazioni non supporterebbero l'ipotesi amiloidea. La prima è di carattere funzionale: l'A β è normalmente presente a livello cerebrale e la concentrazione di A β solubile è maggiore nel cervello dei giovani che degli anziani non dementi [15] e un possibile ruolo dell'A β potrebbe essere quello di modulare la neuroplasticità [16, 17]. La seconda osservazione riguarda il fatto che il 20-30% dei soggetti sani dal punto di vista cognitivo presentano un significativo numero di placche di amiloide riscontrate pre o post-mortem [18, 19]. Quindi, la loro presenza non può giustificare da sola l'insorgenza dell'AD, facendo supporre che la deposizione delle placche sia in realtà un fenomeno parafisiologico e che discriminante per l'insorgenza dell'AD possa essere la sede in cui esse si depositano, nonché l'interazione con altri cofattori, altrettanto importanti per lo sviluppo della malattia. Inoltre, va precisato che l'immunoterapia può rimuovere le placche di A β , ma non incide sulla progressione della demenza [20, 21]. La terza osservazione sottolinea come gli individui con mutazioni completamente penetranti sia di APP che della γ -secretasi non sviluppano la demenza fino a 30-40 anni di età, suggerendo quindi che l'effetto tossico sia da ricondurre all'accumulo e deposizione dell'amiloide a livello cerebrale, accompagnato da altri fattori [22].

Dopo decenni di ricerche, anche se la maggior parte dei dati supporta ancora un ruolo dell'A β come principale iniziatore della complessa cascata patogena nell'AD, sempre più evidenze indicano che A β agisce da trigger nel processo precoce della malattia e sembra essere necessario ma non sufficiente nella fase tardiva della AD [23].

IPOTESI della PROTEINA TAU

I grovigli neurofibrillari, contenenti proteina pTau, costituiscono, insieme alle placche senili, un riscontro anatomo-patologico tipico nei pazienti con AD e rendono pertanto altamente probabile il coinvolgimento di questa proteina nell'eziopatogenesi della malattia.

La proteina Tau è la principale proteina neuronale associata ai microtubuli, la cui funzione è quella di assemblare la tubulina in microtubuli nella struttura portante del citoscheletro. E' codificata da un gene presente sul cromosoma 17 ed è espressa in 6 diverse isoforme generate da un meccanismo di splicing alternativo del suo mRNA. La disfunzione della proteina Tau nell'AD è dovuta alla sua iperfosforilazione, mediata dall'attivazione di una serie di protein-chinasi [24]. Questa anomalia ha due importanti ripercussioni: da un lato, la pTau sequestra quella normale e le altre proteine associate ai microtubuli, causando disassemblaggio dei microtubuli e alterazioni nel trasporto assonale e della plasticità neuronale, dall'altro essa è incline all'aggregazione con la formazione dei grovigli neurofibrillari, che compromettono il neurone e la funzione sinaptica [3].

I grovigli neurofibrillari non sono, però, specifici per l'AD, essendo stati osservati in molte altre patologie neurodegenerative, al punto che è stato coniato il termine generico di "Taupatie".

IPOTESI INFIAMMATORIA

La reazione infiammatoria che caratterizza la maggior parte dei disordini neurodegenerativi viene chiamata "neuroinfiammazione" e coinvolge prevalentemente componenti dell'immunità innata. La microglia attivata e gli astrociti sono le principali cellule che prendono parte a questa risposta nell'AD.

Nell'AD si osserva un'attivazione cronica della risposta immunitaria, la quale probabilmente svolge un ruolo dannoso e contribuisce alla progressione della malattia. D'altra parte, il coinvolgimento del sistema immunitario potrebbe giocare un ruolo positivo in acuto, per esempio attraverso processi di fagocitosi e produzione di fattori trofici e di riparazione, contribuendo a limitare la progressione della malattia stessa.

L'attivazione della microglia nel cervello di pazienti AD è stata dimostrata con studi effettuati con la *Positron Emission Tomography* (PET) [25]. La presenza delle placche di A β potrebbe mantenere la microglia costantemente attivata, conducendo ad una condizione di infiammazione cronica a livello del SNC; vari studi effettuati su colture di cellule gliali e su macrofagi hanno mostrato che l'A β

stimola la sintesi ed il rilascio di citochine pro-infiammatorie [26] e un'iperpressione delle stesse citochine è stata osservata nel cervello di pazienti con AD [27, 28]. È stato dimostrato che i polimorfismi presenti nei geni di alcune citochine (IL-1, IL-6, TNF- α) e di proteine di fase acuta (α 1-antichimotripsina) sono associati ad un aumentato rischio di AD [29]. Inoltre, recenti studi genetici e del trascrittoma hanno supportato l'ipotesi del coinvolgimento dei pathway dalla microglia nella patogenesi dell'AD [30-32] e numerose evidenze hanno dimostrato che la microglia gioca un ruolo centrale fin dai primi stadi della patologia. La microglia, attivata dal recettore trigger espresso sulle cellule mieloidi di tipo II (TREM2) e dal sistema del complemento, è responsabile dell'alterazione sinaptica riscontrata negli AD [33, 34]. Inoltre, nei pazienti affetti da AD e nei pazienti nelle fasi precliniche della patologia è stata dimostrata un'alterazione, sia a livello centrale che periferico, dell'espressione di TREM2, che ha un ruolo peculiare nell'attivazione della microglia [35]. La dimostrazione di un'attivazione di processi infiammatori negli stadi precoci di malattia supporterebbe l'ipotesi dell'infiammazione come "*primum movens*", sebbene l'infiammazione potrebbe svolgere un ruolo chiave nell'eziopatogenesi della malattia anche se intervenisse più tardivamente.

Le placche di A β inducono anche la proliferazione degli astrociti, cellule gliali, i quali parteciperebbero alla clearance e degradazione di A β formando una barriera protettiva tra i depositi di A β e i neuroni.

I neuroni stessi, reagendo agli stimoli tossici, potrebbero direttamente contribuire al mantenimento della risposta infiammatoria: tradizionalmente creduti bersagli passivi dell'infiammazione, evidenze suggeriscono che essi stessi sono fonte di fattori del complemento, di prostanoidei e di diverse citochine. Molti di questi fattori possono promuovere meccanismi neurodegenerativi, mentre altri possono contrastare la propagazione della flogosi o avere effetti neurotropici benefici.

La "neuroinfiammazione" potrebbe essere, quindi, la causa primaria dell'AD oppure essere una conseguenza della stessa.

IPOTESI dello STRESS OSSIDATIVO

Lo stress ossidativo è il risultato di una disregolazione tra la quantità di radicali liberi e non liberi prodotti. Questo può essere attribuito alla perdita di omeostasi causata dalla sovrapproduzione mitocondriale di ossidanti rispetto alla produzione di antiossidanti [36]. Il cervello utilizza più ossigeno di altri tessuti, il che aumenta il potenziale di esposizione ai *Reactive Oxygen Species* (ROS). I ROS, così come *Reactive Nitrogen Species* (RNS), sono prodotti in condizioni fisiologiche dai mitocondri, agiscono sui secondi messaggeri e possono influenzare le vie di segnale [37]. Allo stesso modo, i mitocondri sono in grado di produrre antiossidanti che neutralizzano gli effetti nocivi delle specie reattive dell'ossigeno, per mantenere l'equilibrio tra produzione e disintossicazione di ROS.

Lo sviluppo di stress ossidativo nell'AD è stato correlato ad una disfunzione mitocondriale, che porta alla sovrapproduzione di ROS e RNS e che comporta un danno sinaptico. Diversi autori hanno osservato una diminuzione dell'attività mitocondriale nei topi transgenici per l'AD e una disfunzione mitocondriale che potrebbe indurre un aumento della produzione di A β [38-40]. Gli autori hanno suggerito che il progressivo aumento della produzione di ossidanti correlato ad una diminuzione di componenti antiossidanti potrebbe causare la perdita dell'omeostasi cerebrale che si osserva nei pazienti AD. Anche se il ruolo dello stress ossidativo nelle malattie neurodegenerative non è del tutto chiaro, è stata osservata un'aumentata ossidazione e nitratura delle proteine, glicosilazione e perossidazione lipidica e si è visto che l'accumulo di A β può indurre stress ossidativo [41-43]. Inoltre, si verifica un modesto livello di danno ossidativo all'RNA nei neuroni di pazienti nello stadio precoce del declino cognitivo [44] e studi hanno dimostrato alterazioni nei marcatori ossidativi nell'ippocampo e nella corteccia parietale inferiore, regioni principalmente compromesse nell'AD [45].

IPOTESI dell'IPOMETABOLISMO del GLUCOSIO

L'ipometabolismo del glucosio è un evento patogenetico precoce osservato nella fase prodromica dell'AD e associato al declino cognitivo e funzionale dei pazienti affetti dalla patologia [46, 47]. Alla base dell'AD potrebbe esserci una diminuzione dell'attività sinaptico/metabolica cerebrale. Il glucosio è fondamentale per il rilascio e il re-uptake di neurotrasmettitori, per l'attività nel terminale post-sinaptico, per la depolarizzazione e la ripolarizzazione degli assoni. Alcuni dati indicano che l'attività sinaptica e il metabolismo cerebrale sembrano regolare l'attività e l'espressione delle β -secretasi e delle proteine derivate da APP, che aumentano in risposta a una diminuzione dell'attività metabolica. Un'attività metabolica cerebrale diminuita si è dimostrato essere associata all'AD [48].

Questa interpretazione permetterebbe di riunire i diversi fattori di rischio per la demenza in un'unica ipotesi e indirizzerebbe la ricerca sull'identificazione dei fattori che determinano una diminuzione dell'attività metabolica cerebrale, al fine di mantenerla adeguata e prevenire l'insorgenza della malattia [14].

IPOTESI del MICROBIOTA INTESTINALE

L'AD è convenzionalmente considerata un disturbo del SNC. Tuttavia, crescenti evidenze sperimentali, epidemiologiche e cliniche hanno suggerito che le manifestazioni dell'AD si possono estendere oltre il cervello. In particolare, la ricerca degli ultimi anni rivela che il microbiota intestinale ha un profondo impatto sulla formazione della barriera emato-encefalica, sulla mielinizzazione, sulla neurogenesi e sulla maturazione della microglia [49-51]. In particolare, test su animali esposti a infezioni microbiche patogene, antibiotici, probiotici o trapianto di microbiota fecale hanno mostrato che il microbiota intestinale modula molti aspetti comportamentali degli animali, suggerendo un suo ruolo nella cognizione e nella patogenesi dell'AD [52-54]. I meccanismi sottostanti all'influenza del microbiota intestinale a livello cerebrale potrebbero coinvolgere il sistema immunitario, il sistema endocrino, il nervo vago e i metaboliti derivati dai batteri.

FATTORI di RISCHIO

I numerosi fattori di rischio fino ad oggi identificati suggeriscono che l'AD sia a eziologia multifattoriale. I più rilevanti risultano essere:

- età avanzata: l'età è il fattore di rischio più rilevante per le demenze. E' da sottolineare tuttavia che, in assenza di conferme biologiche, la diagnosi di demenza dipende da test cognitivi e di comportamento i cui errori standard aumentano marcatamente con l'età;
- fattori genetici: nelle forme familiari a esordio precoce sono coinvolte mutazioni a carico di presenilina 2, presenilina 1 e APP. Per quanto riguarda le forme a esordio tardivo la presenza del genotipo $\epsilon 4$ dell'apolipoproteina E (apoE) determinerebbe un aumento del rischio di circa tre volte per i portatori del genotipo $\epsilon 3/\epsilon 4$ fino a 14 volte per i portatori del genotipo $\epsilon 4/\epsilon 4$ [55].
- basso livello d'istruzione: Katzmann [56] già nel 1993 ha proposto l'ipotesi secondo cui un'elevata scolarità potrebbe posticipare la manifestazione clinica dei sintomi della demenza, aumentando il numero di sinapsi nella neocorteccia (ipotesi di riserva cerebrale). Stern et al. [57] ipotizzarono in seguito che un alto livello di istruzione consentiva ai pazienti di mascherare più a lungo i sintomi della malattia (ipotesi riserva cognitiva). Altri autori [58] hanno suggerito poi che gli individui con più alto livello d'istruzione, e con un conseguente livello socio-economico più elevato, conducono stili di vita più sani accumulando quindi un minor numero di lesioni cerebrali (ipotesi *brain battering*);
- malattie cerebrovascolari: sono diversi i meccanismi attraverso i quali un'ischemia cerebrale può portare ad un decadimento cognitivo e all'AD. L'ischemia può direttamente colpire le regioni cerebrali implicate nella memoria, determinare un aumento della deposizione di A β ed indurre una risposta infiammatoria che danneggia le funzioni cognitive [59].
- pressione sanguigna: l'ipertensione determina una diminuzione dell'integrità vascolare della barriera ematoencefalica che porta ad uno stravasamento di proteine nel tessuto cerebrale [60]. Questo può comportare danno cellulare, riduzione della funzione sinaptica, apoptosi e aumento

dell'accumulo di A β [61]. In soggetti di età più avanzata l'effetto dell'ipertensione sullo sviluppo dell'AD diminuisce ed alcuni studi mostrano che la pressione alta potrebbe essere considerata un fattore protettivo [59].

- diabete: numerosi studi hanno dimostrato che persone affette da diabete di tipo 2 hanno un rischio quasi doppio di sviluppare l'AD [62, 63]. Sono stati proposti diversi meccanismi per spiegare il perché il diabete possa influenzare lo sviluppo dell'AD: l'insulina potrebbe competere con l'A β nel riconoscimento da parte dell'enzima predisposto alla degradazione dell'A β , ostacolandone la clearance dall'encefalo [64]; inoltre il tessuto adiposo produce adipochine e citochine e in persone affette da iperinsulinemia e insulino resistenza si osserva un aumento dei livelli di adipochine e citochine [65] che contribuiscono allo sviluppo dell'AD.
- peso corporeo: è stato osservato che sia un basso che un alto indice di massa corporea (BMI) sono da considerarsi un fattore di rischio per lo sviluppo di decadimento cognitivo e AD [66-68].
- sindrome metabolica: è stata dimostrata una correlazione positiva tra sindrome metabolica e disfunzione cognitiva [69-71].
- fumo: è stato dimostrato che una riduzione dell'incidenza di fumatori potrebbe ridurre la prevalenza futura di AD [72].
- alcolismo: l'alcol induce danno neuronale. L'abuso di alcol è associato ad un aumentato rischio di sviluppare AD [73].

L'istruzione, l'ipertensione, il diabete, la dieta, il livello di attività fisica, il fumo e il livello di consumo di alcool sono considerati fattori di rischio modificabili per l'AD [74-77].

FATTORI PROTETTIVI

- dieta: la dieta mediterranea riduce il rischio di sviluppare AD [78] e questi effetti sono indipendenti dal livello di attività fisica [79]. Ad oggi esistono dati contrastanti sul rapporto tra decadimento cognitivo e una dieta ricca di antiossidanti e acidi grassi insaturi: alcuni studi hanno evidenziato nelle persone che rispettano questa dieta un diminuito rischio

di sviluppare AD [80-82], decadimento cognitivo lieve (MCI) [83] e decadimento cognitivo età-correlato [84]. Studi hanno dimostrato che un alto apporto di vitamine E e C riduce il rischio di sviluppare decadimento cognitivo e AD [85-87]. Altri studi, invece, non trovano questa associazione [88].

- attività fisica: l'esercizio fisico può promuovere la salute cerebrale, aumentando il flusso di sangue al cervello, il metabolismo di glucosio e di ossigeno [89] e attivando i fattori di crescita che promuovono i cambiamenti strutturali cerebrali [90]. Studi hanno evidenziato che l'esercizio fisico riduce il rischio di sviluppare AD, e rallenta il decorso della malattia [91].

CRITERI DIAGNOSTICI

La diagnosi di demenza è posta in base ai criteri clinici del *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* (DSM IV TR) redatto dall'*American Psychiatric Association* (APA) [92].

La differenziazione delle diverse tipologie di demenza è affidata ai criteri introdotti nel 1984 dal *National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke* e dall'*Alzheimer's Disease and Related Disorders Association* (criteri NINCDS-ADRDA) [93]. Secondo questi criteri, la diagnosi clinica di AD viene definita *probabile* in presenza di decadimento cognitivo confermato dai test neuropsicologici. La diagnosi di *certezza* è possibile solo attraverso l'esame istopatologico cerebrale.

Dagli anni '80 ad oggi sono stati introdotti nuovi criteri diagnostici per altre forme di demenza prima misconosciute; inoltre, la ricerca ha reso disponibili marcatori biologici sierici e liquorali, indagini genetiche approfondite e avanzate tecniche di *neuroimaging*. Nel 2007 [94] e nel 2010 [95] Dubois et al. hanno proposto una revisione dei criteri NINCDS-ADRDA, suggerendo un'integrazione delle caratteristiche cliniche della malattia, con i parametri biologici (mutazioni dell'APP, della presenilina 1 e 2, presenza dell'allele $\epsilon 4$ dell'apoE) e liquorali (livelli di A β e pTau) e con dati di *neuroimaging* strutturale (atrofia delle strutture del lobo temporale mesiale rilevate con tecniche di RMN) e funzionale

(alterazioni del metabolismo cerebrale rilevato con PET). L'insieme di questi fattori aumenterebbe la specificità e la sensibilità dei criteri diagnostici dell'AD e permetterebbe di individuare i soggetti affetti da tale patologia già agli stadi più precoci di malattia.

Appare pertanto evidente come, nella pratica clinica, la diagnosi di AD necessita dell'integrazione di varie informazioni al fine di raggiungere la migliore accuratezza possibile. Fondamentali nel processo diagnostico risultano essere l'anamnesi che, accompagnata da un accurato esame obiettivo neurologico, deve indagare i fattori di rischio, la modalità di insorgenza dei sintomi, le aree cognitive interessate, la presenza o meno di cerebrovasculopatia. È importante la valutazione dello stato mentale, attraverso la somministrazione di test cognitivi, quali il *Mini Mental State Examination* (MMSE) [96] e test neuropsicologici, come la valutazione dell'autonomia funzionale del soggetto, attraverso l'utilizzo di scale che valutano le attività di base e strumentali del vivere quotidiano, quali ADL (*Activities of Daily Living, indice di Katz*) [97] e IADL (*Instrumental Activities of Daily Living, indice di Lawton*) [98]. Infine un quadro clinico completo necessita dell'esecuzione di analisi di laboratorio, volte a escludere demenze da encefalopatia tossica e da farmaci, da malattie cerebrali, a genesi endocrina, metabolica, infiammatoria, carenziale.

LE VITAMINE

Le vitamine, “amine della vita”, sono un composto organico e un nutriente essenziale che il nostro organismo non è in grado di sintetizzare in quantità sufficiente e pertanto devono essere assunte mediante la dieta.

Le vitamine possiedono diverse funzioni biochimiche e costituiscono un gruppo molecolare chimicamente eterogeneo. Sono classificate per la loro attività biologica e chimica, ma non per la loro struttura. Per ogni vitamina ci si riferisce a una serie di vitameri, composti chimici che, sebbene strutturalmente diversi tra di loro, presentano la stessa attività vitamERICA. Attualmente tredici vitamine sono universalmente riconosciute e raggruppate sotto sei denominazioni: vitamina A, B, C, D, E e K. Le vitamine si distinguono in idrosolubili (vitamina B e C) e liposolubili (vitamina A, D, K e E) a seconda della loro composizione e proprietà.

Le principali attività delle vitamine sono: coenzimatica, agendo come precursori dei cofattori enzimatici o direttamente come coenzimi implicati nel trasferimento di protoni e di elettroni; antiossidante, bloccando i radicali liberi e intervenendo così nella stabilizzazione delle membrane cellulari; ormonale, regolando il metabolismo minerale, della crescita tissutale e della differenziazione cellulare.

La vitamina A presenta funzioni biologiche che riguardano soprattutto la vista, la maturazione embrionale e la differenziazione cellulare, che svolge controllando l'espressione di svariati geni in seguito al legame con recettori nucleari ormonali.

Le vitamine B e K hanno principalmente una funzione coenzimatica.

Le vitamine C ed E hanno una peculiare attività antiossidante.

La vitamina D, tramite il legame con recettori nucleari specifici, svolge un ruolo essenziale nella regolazione del metabolismo del calcio, è implicata nella differenziazione cellulare ed esplica un'azione antiproliferativa in diversi tessuti.

Negli ultimi decenni stanno acquisendo sempre più importanza gli studi sull'alimentazione. Sono stati osservati differenti livelli sierici delle vitamine legati all'età, al genere, ai diversi stili di vita e influenzati dall'insorgenza di patologie. È emerso il coinvolgimento delle vitamine nei meccanismi fisiologici e patologici a livello cerebrale e numerosi studi hanno dimostrato una correlazione

tra le vitamine e lo sviluppo di malattie neurodegenerative, in particolare dell'AD.

La vitamina A è coinvolta in importanti processi nel SNC, come la differenziazione neuronale e il rilascio di neurotrasmettitori. Numerosi studi hanno evidenziato più bassi livelli sierici e plasmatici di vitamina A in pazienti affetti da AD [99, 100] ed è stato dimostrato come l'aumento dei livelli plasmatici di provitamina A è associato ad un miglioramento delle performance cognitive in pazienti anziani [101].

L'effetto della vitamina A sull'AD potrebbe essere parzialmente spiegato da una possibile regolazione trascrizionale dei geni rilevanti per l'eziopatogenesi dell'AD, come l'APP, le preseniline e le secretasi [102-104]. Inoltre, la vitamina A sembra avere un effetto negativo sull'oligomerizzazione dell'A β e sulla stabilità delle fibrille di A β [105, 106].

La vitamina D ha un'attività neuroprotettiva. Studi riportano bassi livelli di vitamina D in plasma e siero di soggetti affetti da demenza e AD [107-109]. Inoltre, bassi livelli di vitamina D sono associati ad un aumentato rischio di declino cognitivo e di AD [110, 111], mentre elevati livelli sierici e plasmatici sono legati ad un aumento delle funzioni cognitive e del volume cerebrale nelle aree tipicamente affette da AD [112]. È stato inoltre osservato che polimorfismi del recettore della vitamina D sono associati ad un aumentato rischio di sviluppare l'AD [113, 114]. La vitamina D ha effetto su meccanismi legati all'eziopatogenesi dell'AD, sulla produzione, clearance, fagocitosi e degradazione enzimatica dell'A β e sulla fosforilazione della proteina Tau [115].

Anche la vitamina K è stata osservata in concentrazione minore nei pazienti affetti da AD rispetto a soggetti sani [116, 117] ed è stata dimostrata una correlazione positiva tra i livelli sierici di vitamina K e le funzioni cognitive [117]. La vitamina K ha un'attività di inibizione dell'aggregazione di A β e di protezione neuronale della tossicità indotta da A β , che potrebbero dare a questa vitamina un ruolo anti-amiloidogenico [118].

Negli ultimi anni numerosi studi hanno focalizzato l'attenzione sulle proprietà antiossidanti della vitamina E e sulla sua potenzialità di prevenire il declino cognitivo dei pazienti AD.

VITAMINA E

Nel 1922, Evand e Bishop [119] hanno descritto per la prima volta la “sostanza X”, che venne successivamente denominata vitamina E.

Dalla sua scoperta, la vitamina E è stata ampiamente studiata per migliorare la comprensione del suo ruolo in diverse condizioni fisiopatologiche [120-122].

Con il termine vitamina E ci si riferisce ad una famiglia che comprende tocoferoli, a catena laterale isoprenoide satura, e tocotrienoli, a catena laterale isoprenoide insatura. Si osservano otto isoforme chimicamente distinte: α -, β -, γ - e δ -tocoferolo e α -, β -, γ - e δ -tocotrienolo che differiscono in base alla sostituzione metilica ed idrossilica sull'anello aromatico.

Alimenti ricchi in vitamina E sono frutta e verdura, noci e semi. Fonti alimentari ricche di α -tocoferolo sono mandorle, avocado, nocciole, arachidi e semi di girasole; di β -tocoferolo sono origano e semi di papavero; di γ -tocoferolo sono noci, pistacchi, semi di sesamo; di δ -tocoferolo sono fagioli di soia e lamponi. I tocotrienoli prevalgono nella crusca di riso, nell'orzo, nell'avena e nell'olio di palma. Altre fonti di tocotrienoli sono l'uva, l'olio di semi, l'avena, le nocciole, il mais, l'olio d'oliva, la segale, l'olio di semi di lino, l'olio di semi di papavero e l'olio di semi di girasole.

La vitamina E introdotta con gli alimenti è idrolizzata da enzimi pancreatici e assorbita nella parte mediana dell'intestino tenue sotto forma di micelle miste insieme agli acidi biliari e ai prodotti dell'idrolisi lipidica, attraverso un processo di diffusione. Viene in seguito incorporata nei chilomicroni e raggiunge la circolazione tramite le vie linfatiche. Nel flusso ematico la vitamina E è legata prevalentemente alle *High Density Lipoprotein* (HDL), *Low Density Lipoprotein* (LDL) e *Very Low Density Lipoprotein* (VLDL). Esiste una differenza determinata dal sesso: nella donna la maggior parte è legata alle HDL mentre nell'uomo alle LDL. La vitamina E viene scambiata tra le diverse lipoproteine, ma è anche ceduta agli eritrociti ed ai tessuti tramite l'azione delle lipasi. A differenza dei tocoferoli che sono distribuiti in modo uniforme in tutte le lipoproteine, i tocotrienoli sono prevalentemente legati alle HDL [123].

RUOLO BIOLOGICO della VITAMINA E

Il ruolo biologico della vitamina E non è ancora del tutto stato chiarito nonostante l'imponente mole di studi scientifici condotti in questo campo negli ultimi decenni.

La vitamina E è considerata uno dei più potenti antiossidanti in natura. Tocoferoli e tocotrienoli sono antiossidanti lipofili che hanno un effetto protettivo sullo stress ossidativo, definito come uno sbilanciamento tra la produzione delle specie reattive dell'ossigeno e le difese antiossidanti che causa danno a DNA, proteine e lipidi. Le proprietà antiossidanti della vitamina E sono associate alla presenza del gruppo ossidrile nell'anello aromatico che dona idrogeno ai radicali liberi. Neutralizzando i radicali liberi, la vitamina E ha un ruolo importante nella prevenzione dell'ossidazione degli acidi grassi polinsaturi, evento chiave del processo di perossidazione lipidica e causa dell'alterazione delle membrane cellulari. L'attività antiossidante delle isoforme α -, β - e γ -tocoferolo e α -, β - e γ -tocotrienolo è simile, mentre l'isoforma δ ha un'attività più debole [124, 125].

La vitamina E è coinvolta nella regolazione della risposta infiammatoria. L' α - e γ -tocoferolo e i tocotrienoli hanno un'attività antinfiammatoria legata alla modulazione dell'espressione delle citochine. L' α - e il δ -tocotrienolo svolgono un ruolo immunostimolatorio.

La funzione neuroprotettiva della vitamina E è svolta dall' α -tocoferolo attraverso la modulazione della proteina fosfatasi 2A (PP2A), potenzialmente coinvolta nella patogenesi dell'AD [126-128], mentre dall' α - e γ -tocotrienolo tramite l'inibizione di specifiche chinasi e lipossigenasi.

La vitamina E ha un ruolo anti-neoplastico [123]. È stato osservato che i tocotrienoli agiscono sull'attivazione delle caspasi, l' α -, il γ - e il δ -tocoferolo e il γ - e δ -tocotrienolo sono in grado di regolare geni codificanti per le proteine coinvolte nell'apoptosi, nella regolazione del ciclo cellulare, nell'adesione cellulare, nella crescita, nella formazione e degradazione della matrice extracellulare, mentre l' α -tocotrienolo agisce sulla soppressione dell'angiogenesi. La vitamina E regola l'espressione di geni coinvolti nell'omeostasi del colesterolo e di recettori coinvolti nel metabolismo dei lipidi. È implicata nella regolazione

del traffico cellulare, compreso il trasporto delle vescicole sinaptiche e il rilascio dei neurotrasmettitori.

VITAMINA E e DEMENZA di ALZHEIMER

L'aumentato stress ossidativo e l'alterazione dell'infiammazione sono tra i possibili meccanismi coinvolti nella patogenesi dell'AD. Le proprietà della vitamina E spiegano il suo ruolo neuroprotettivo osservato in questa patologia.

La vitamina E ha effetti positivi sulle funzioni cognitive [100]. Bassi livelli plasmatici di vitamina E sono stati osservati in pazienti con decadimento cognitivo lieve e affetti da AD [99, 100, 129, 130], mentre alte concentrazioni plasmatiche e una dieta ricca di vitamina E e sono state associate ad un ridotto rischio di sviluppare AD [131-133]. Inoltre, alte concentrazioni di vitamina E a livello cerebrale in pazienti AD suggeriscono una possibile risposta compensatoria al danno ossidativo presente nel SNC in questi pazienti [134].

Numerosi studi hanno analizzato l'effetto della supplementazione con vitamina E sulla progressione dell'AD, portando a risultati contrastanti. Sebbene alcuni studi abbiano osservato una riduzione della progressione dell'AD in pazienti trattati con α -tocoferolo [135], altri hanno osservato che la supplementazione non comporta benefici in pazienti MCI e AD [136, 137]. I potenziali effetti benefici della supplementazione sono stati valutati in un modello murino di AD. È stata osservata una riduzione dell'A β a livello cerebrale in topi giovani, ma non in quelli in età avanzata [138]. Altri studi hanno dimostrato che la supplementazione con α -tocoferolo attenua le alterazioni del metabolismo dell'A β in modelli animali in età avanzata e previene i deficit delle funzioni mnemoniche [139]. Effetti simili sono stati osservati per un metabolita dell' α -tocoferolo la cui somministrazione orale migliora l'apprendimento in topi transgenici per APP e PS1, comporta una riduzione dei livelli cerebrali degli oligomeri di A β e determina una diminuzione dello stress ossidativo e della produzione dei mediatori infiammatori [140]. L' α -tocoferolo ha un effetto negativo sull'aggregazione e sulla tossicità indotta dall'A β , sui processi infiammatori, sulla generazione dei ROS e sull'ossidazione dei lipidi in colture cellulari [140-142].

La vitamina E ha un ruolo neuroprotettivo, modulando le vie di segnalazione cellulare. Studi condotti su ratti hanno dimostrato che, a livello ippocampale, la deprivazione della vitamina E è associata all'espressione di numerosi geni correlati allo sviluppo e progressione dell'AD. Questi geni sono stati identificati come importanti regolatori del metabolismo ormonale, dell'apoptosi, dei fattori di crescita, della neurotrasmissione e del metabolismo dell'A β [143]. È stato osservato che bassi livelli di α -tocoferolo cerebrali inducono una down-regolazione dei geni coinvolti nella mielinizzazione e sinaptogenesi, nel trasporto delle vescicole neuronali e nelle funzioni gliali [144]. È stato studiato anche l'effetto di α -, γ - e δ -tocoferolo sulla produzione e degradazione dell'A β in coltura e tutti i tocoferoli testati sono associati ad un incremento della secrezione di A β , causato da un aumento dell'espressione genica delle β - e γ -secretasi [145].

La vitamina E inibisce diversi enzimi implicati nella neuroinfiammazione e nel danno ossidativo, tipici dell'AD [146, 147]. Inoltre, la vitamina E attiva PP2A, una fosfatasi che gioca un ruolo significativo nell'omeostasi della proteina Tau, ed è stato dimostrato essere down-regolata a livello cerebrale nei pazienti AD [148].

La vitamina E ha un effetto ipocolesterolemico. Recentemente è stato mostrato che la vitamina E diminuisce i livelli di colesterolo in quanto influisce sul *pathway* delle proteine che regolano gli steroli [149]. Numerosi studi sulle colture cellulari hanno dimostrato che un ridotto contenuto di colesterolo è associato ad una diminuzione della produzione di A β , mentre l'aumento di colesterolo ha un effetto opposto [150, 151]. Una forte correlazione tra ipercolesterolemia e aumentati livelli di A β è stata osservata anche in modelli animali [151, 152] ed è stato visto che questi effetti sono dovuti alla diretta stimolazione dell'attività delle β - e γ -secretasi da parte del colesterolo [153, 154]. Gli alti livelli cellulari di colesterolo, inoltre, stimolano l'internalizzazione dell'APP, portando ad una over-produzione di A β [155].

La vitamina E e i suoi derivati giocano un ruolo importante anche nelle Taupatie. Il trattamento delle colture neuronali con vitamina E previene l'iperfosforilazione di Tau indotta da A β , sebbene i dati siano ancora contrastanti [156]. L'effetto della vitamina E sulle Taupatie è stato analizzato in vivo in

differenti modelli animali. La supplementazione con α -tocoferolo in topi transgenici per Tau determina una riduzione dello sviluppo della patologia e un miglioramento della salute [157].

LA BIOLOGIA DEI TELOMERI

TELOMERI

Il Premio Nobel 2009 per la Medicina è stato assegnato a Elizabeth Blackburn della *University of California*, a Carol Greider della *Johns Hopkins University School of Medicine* di Baltimora e a Jack Szostak della *Harvard Medical School* di Boston. I tre studiosi sono stati insigniti del premio per aver identificato per la prima volta i telomeri e l'enzima deputato alla ricostruzione dei telomeri, la telomerasi.

I telomeri sono complessi nucleoproteici localizzati nelle porzioni terminali dei cromosomi e consistono di sequenze specie-specifiche, non codificanti e altamente ripetute in tandem, associate a diverse proteine [158-161]. Le terminazioni 3' e 5' dei filamenti di DNA lineare sono estremamente suscettibili alla degradazione nucleasica ed altamente soggette a fenomeni di fusione e ricombinazione genica [162]. I telomeri, pertanto, fungono da "cappuccio" protettivo per le estremità dei cromosomi lineari [163] impedendo la degradazione progressiva del DNA e conferendo, di conseguenza, stabilità genetica. Inoltre, i telomeri regolano il riconoscimento e la separazione dei cromosomi durante la mitosi, facilitano la replicazione del DNA nei vari stadi del ciclo mitotico e meiotico [164, 165], e influenzano la trascrizione di geni posti nelle vicinanze delle estremità cromosomiche.

Il meccanismo di sintesi delle estremità dei cromosomi lineari causa l'insorgenza del "problema della replicazione terminale", descritto per la prima volta da Watson nel 1972 [163, 166], che consiste nell'incapacità delle DNA polimerasi di replicare completamente le estremità 3' dei cromosomi lineari.

La DNA polimerasi è capace infatti di procedere solo in direzione 5'→3' e la diversa conformazione dei due filamenti di DNA determina un processo di sintesi differente per ciascuna elica. Mentre il filamento guida viene sintetizzato interamente e in modo continuo, il filamento lento è sintetizzato in modo discontinuo a partire da piccoli primer di RNA, capaci di fornire alla DNA polimerasi l'innescò 3'-OH. Anche se un primer di RNA ibridasse lungo la sequenza più distale del cromosoma, la sua degradazione ad opera delle DNAsi

lascerebbe uno spazio vuoto e l'estremità 5' del filamento lento risulterebbe più corta rispetto all'estremità 3' del filamento complementare. Di conseguenza, ad ogni replicazione del DNA, si verifica la perdita di 50-100 paia basi [167].

Ad ogni ciclo di divisione cellulare i telomeri subiscono un accorciamento ed il ripetersi di tale processo, nel corso dei successivi eventi replicativi, conduce al raggiungimento di una lunghezza minima critica (limite di Hayflick) che segnala la fine della proliferazione, l'inizio della senescenza e/o la successiva morte per apoptosi della cellula [168-170].

Dopo molte divisioni cellulari i telomeri diventano infatti così corti che cessano di funzionare correttamente e producono un segnale intracellulare simile a quello prodotto da rotture del doppio filamento di DNA [171-173]. L'attivazione di questo *pathway* impedisce alla cellula di dividersi ulteriormente, bloccando il ciclo cellulare [174], secondo un processo noto come senescenza replicativa [175-177]. Molteplici sono i fattori che accelerano il deterioramento dei telomeri, tra i questi lo stress ossidativo e l'infiammazione. Di conseguenza, la lunghezza media dei telomeri riflette il danno cumulativo che risulta dall'esposizione a questi fattori negativi.

La vita replicativa della cellula è quindi scandita dall'accorciamento dei telomeri, aventi la funzione di "orologio mitotico" che memorizza o ricorda il numero delle divisioni cellulari permesse.

Nell'uomo il DNA telomerico è costituito da sequenze esanucleotidiche 5'-TTAGGG-3' nel filamento guida e 3'-CCCTAA-5' nel filamento lento, organizzate in una struttura a doppio filamento (dsDNA) ripetuta approssimativamente per 9-15 kb [165, 178]. L'estremità 3' della sequenza telomerica sul filamento guida termina con una protrusione a singolo filamento ricca in G, *G-strand overhang*, che sporge 50-300 nucleotidi rispetto al filamento complementare e termina con un'estremità 3'-OH libera [173].

Il *G-strand overhang* si ripiega ad ansa per insinuarsi nella doppia elica del DNA telomerico, che a sua volta si apre formando una struttura a tripla elica detta *D-loop*. L'anello maggiore generato dal ripiegamento dell'estremità protrudente è invece definito *T-loop* (Figura 1). Questa conformazione conferisce protezione dalle esonucleasi e da fenomeni di fusione termino-terminale, evita

che l'estremità 3' del cromosoma venga erroneamente riconosciuta come rottura del doppio filamento dai sistemi di riparazione del DNA e ostacola per ingombro sterico l'allungamento dei telomeri operato dalla telomerasi [168, 178-180]. Le sequenze telomeriche umane sono associate ad un complesso multiproteico noto come *shelterin complex* implicato nella formazione e nel mantenimento dell'architettura dei telomeri, oltre che nella regolazione della loro lunghezza. Il complesso delle proteine *shelterin* si associa specificamente con le ripetizioni telomeriche TTAGGG, media la formazione e la stabilità del *T-loop* [173, 179], stabilizza le estremità dei cromosomi interagendo sia con la struttura a singolo che a doppio filamento e contribuisce alla funzione protettiva dei telomeri.

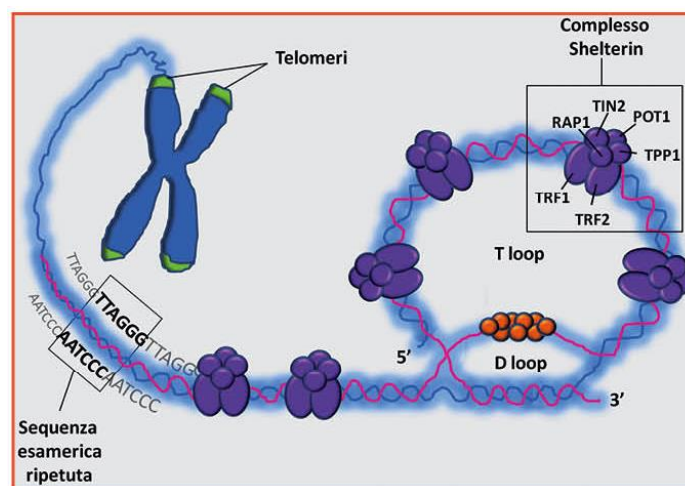


Figura 1: Il telomero. *T-loop*, *D-loop* e *shelterin complex*.

TELOMERASI

L'integrità dei telomeri è garantita dall'enzima telomerasi (60), una trascrittasi inversa telomero-specifica capace di aggiungere ripetizioni telomeriche all'estremità dei cromosomi lineari, controbilanciando in tal modo il meccanismo di accorciamento terminale. Il complesso telomerasico è costituito da una subunità catalitica avente funzione di trascrittasi inversa (TERT), da una componente a RNA (TERC) che funge da template, da una componente proteica principale detta discherina e da diverse proteine specie-specifiche che stabilizzano il complesso [178, 181] (Figura 2).

La telomerasi riconosce l'estremità 3' del filamento guida e sintetizza una o più copie dell'esanucleotide telomerico (5'-TTAGGG-3'). Dopo molti cicli di estensione, l'allungamento del filamento lento, all'estremità del cromosoma, viene effettuato dalla DNA polimerasi che usa il filamento guida neo-esteso come stampo [178]. Questo meccanismo assicura che l'estremità 3' del DNA telomerico sia sempre più lunga rispetto all'estremità 5' con la quale è appaiata (*3'-overhang*).

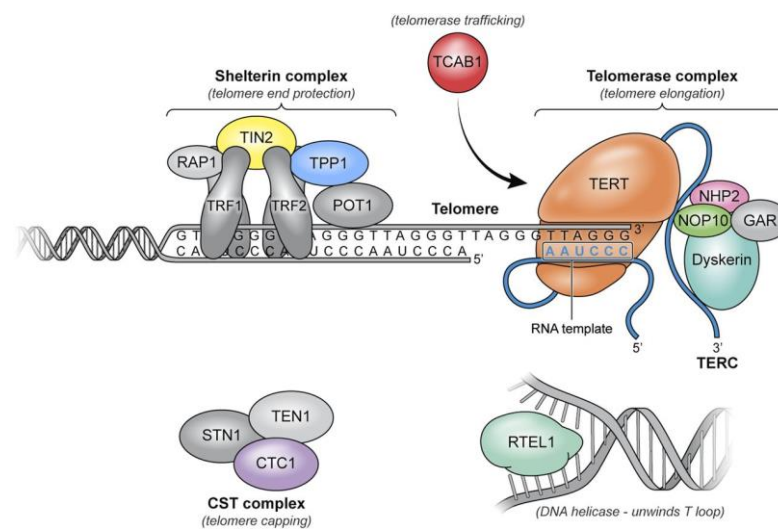


Figura 2: La telomerasi. Complesso della telomerasi (TERT, TERC e discherina) e componenti proteiche ad essa associate.

Ad eccezione delle cellule della linea germinale e staminale, l'espressione del gene della telomerasi è silenziata [182, 183] e pertanto, dopo un numero finito di divisioni cellulari, la maggior parte delle cellule umane entra nella fase di senescenza cellulare.

REGOLAZIONE dell'ATTIVITA' TELOMERASICA

Mentre il gene codificante TERC è espresso in maniera sostanzialmente sovrapponibile nei tessuti somatici e germinali, l'espressione del gene TERT è finemente regolata e generalmente risulta assente nella maggior parte delle cellule somatiche dopo la nascita. Pertanto, la componente proteica TERT, è il fattore limitante l'attività telomerasica e la sua espressione correla con l'attività

dell'enzima [44, 184, 185].

La regolazione della telomerasi è un fenomeno multifattoriale cui concorrono interazioni trascrizionali, post-traduzionali, meccanismi di fosforilazione e di controllo ormonale: fra questi sembra che il controllo trascrizionale del gene TERT giochi un ruolo fondamentale. Infatti, il promotore del gene TERT è inattivo nelle cellule somatiche umane normali e risulta attivato in diversi tumori primari e in linee cellulari immortalizzate [186]. La dettagliata analisi della sequenza ha evidenziato che il promotore di TERT è ricco in GC, manca della TATA e CAAT box e presenta siti di legame per diversi fattori di trascrizione, suggerendo che l'espressione della telomerasi potrebbe essere soggetta a livelli multipli di controllo e regolata da diversi fattori in differenti contesti cellulari [168, 187]. Studi in letteratura riportano inoltre che la fosforilazione di TERT da parte della proteina chinasi C up-regola fortemente l'attività telomerasica e risulta necessaria sia per l'assemblaggio dell'oloenzima che per la sua attività catalitica [188]. Il modello proposto per la telomerasi presume quindi un meccanismo di regolazione mediante fosforilazione/defosforilazione e l'esistenza dell'enzima in due differenti conformazioni tra loro reversibili. In aggiunta, al fine di ottenere la massima attività catalitica, la proteina chinasi B deve fosforilare di TERT. L'attività della telomerasi viene regolata anche attraverso meccanismi di splicing alternativo, che possono portare alla produzione di una forma tronca o inattiva della proteina [189]. In particolare, trascritti deleti di una o entrambe le regioni funzionali per l'attività catalitica sembrerebbero regolare negativamente l'attività della telomerasi.

REGOLAZIONE dell'ATTIVITA' TELOMERASICA nei LINFOCITI

A differenza di tutte le altre cellule somatiche, i linfociti hanno la straordinaria capacità di poter transitoriamente riattivare la telomerasi in seguito ad uno stimolo antigenico o proliferativo ma la quantità di telomerasi e l'arco temporale in cui essa rimane attiva variano da individuo a individuo e dipendono presumibilmente sia da fattori ambientali che da fattori genetici. Al momento non si conoscono i meccanismi responsabili della regolazione della telomerasi nei

linfociti e la caratterizzazione dei *pathways* coinvolti in questo processo potrebbe fornire nuovi spunti per l'identificazione di determinanti di longevità e di invecchiamento in buona salute.

DEMENZA di ALZHEIMER. LUNGHEZZA TELOMERICA e ATTIVITA' TELOMERASICA

Le cause dell'AD sono multifattoriali [190], e numerose evidenze mostrano come l'invecchiamento, il danno ossidativo del DNA, la disfunzione mitocondriale, lo stress ossidativo e l'alterazione della risposta infiammatoria contribuiscano allo sviluppo e alla progressione dell'AD [191].

L'alto contenuto in guanina rende i telomeri particolarmente sensibili allo stress ossidativo. Recenti studi hanno suggerito che lo stress ossidativo comporta un aumento di cellule senescenti, che hanno come caratteristica una lunghezza telomerica particolarmente ridotta [192]. Con l'avanzare dell'età il danno ossidativo aumenta, in parallelo alla produzione di ROS, i quali, a loro volta, accelerano l'accorciamento dei telomeri [193]. In particolare, la lunghezza dei telomeri è influenzata dalla relazione che intercorre tra stress ossidativo e l'efficienza delle difese antiossidanti dell'individuo. Se la capacità antiossidante viene meno, i telomeri, in presenza di elevate concentrazioni di ROS, si accorciano e inducono un'alterata proliferazione cellulare portando alla senescenza. I telomeri possono essere indice dell'esposizione allo stress ossidativo e della capacità della telomerasi di funzionare e mantenere i telomeri più lunghi e stabili.

La lunghezza telomerica dipende anche dallo stato infiammatorio. A prescindere dal fatto che uno stato infiammatorio predispone ad un aumento dallo stress ossidativo, la proliferazione che si instaura nelle cellule del sistema immunitario in risposta ad uno stato infiammatorio provoca la perdita di ripetizioni telomeriche dovute all'aumentato numero di divisioni cellulari. La concentrazione plasmatica di proteina C reattiva, marker infiammatorio, è correlata negativamente alla lunghezza dei telomeri [194] e l'uso di farmaci antinfiammatori può ridurre l'accorciamento della lunghezza dei telomeri che segue l'infiammazione [195].

Il ruolo dell'accorciamento telomerico nell'AD non è chiaro. Alcuni studi riportano un'associazione tra l'accorciamento dei telomeri e AD e che la lunghezza telomerica presenta una correlazione positiva con le performance cognitive e una correlazione inversa con i livelli di citochine pro-infiammatorie, suggerendo che l'accorciamento telomerico potrebbe essere associato ad una disfunzione immunitaria e contribuire alla patogenesi dell'AD [196, 197]. Al contrario, altri studi dimostrano che l'AD è associato alla stabilità e allo stato funzionale dei telomeri, piuttosto che alla lunghezza telomerica [198, 199] e riportano una simile lunghezza telomerica tra AD e controlli [200-202].

Ad oggi non è chiaro se la lunghezza telomerica potrebbe essere considerata un biomarcatore per l'AD e se il cambiamento della lunghezza telomerica sia una risposta alla presenza della patologia o un contributo alla patogenesi dell'AD [203].

L'attività della telomerasi sembra avere un ruolo chiave nella neuroprotezione. L'attivazione costitutiva della telomerasi nei tessuti adulti di topo transgenico ha un ruolo nel rallentamento del tasso di invecchiamento [204, 205]. Grazie all'attivazione della telomerasi, i modelli di topo presentano un fenotipo migliore rispetto ai controlli e mostrano una riduzione nella maggior parte delle condizioni di disabilitanti associate all'invecchiamento, come l'osteoporosi e la resistenza all'insulina, e un significativo miglioramento delle prestazioni fisiche, delle funzioni metaboliche e delle abilità cognitive. Queste modifiche si riflettono su un aumento della lunghezza dei telomeri e una loro migliore qualità, con una riduzione di telomeri corti e molto corti [206]. Questo suggerisce che l'attivazione della telomerasi può giocare un ruolo importante nella stabilità dei telomeri corti e disfunzionali.

La perdita dell'attività della telomerasi può avere conseguenze indipendenti dalla lunghezza dei telomeri, determinare un accelerato invecchiamento e causare malattie legate all'invecchiamento. Nelle cellule cerebrali dei roditori, l'attività della telomerasi è elevata durante lo sviluppo embrionale ma è rapidamente down-regolata dopo la nascita [207]. Tuttavia, l'espressione della telomerasi persiste nei neuroni in età adulta in modelli di topi e ratti [207-210].

Ad oggi si sa ancora poco sull'espressione della telomerasi nel cervello umano adulto. Un recente studio ha dimostrato che la telomerasi è espressa in vitro nei neuroni di topo e nella microglia e nel citoplasma di neuroni ippocampali umani maturi, ma è assente negli astrociti [211-214]. Inoltre è emerso che la telomerasi può giocare un ruolo importante nel cervello dei mammiferi ed è coinvolta nel processo patologico dell'AD [214-217]. Zhu et al. [214-219] hanno dimostrato che la soppressione della telomerasi nei neuroni ippocampali di topo embrionale aumenta significativamente la vulnerabilità dei neuroni alla morte cellulare indotta da A β . Uno studio di Spilsbury et al. [214] ha recentemente mostrato che l'attività telomerasica persiste nei neuroni nel cervello umano adulto, dove può esercitare un ruolo protettivo contro le Taupatie. Wang et al. [220] hanno osservato che gli aggregati di A β possono inibire la telomerasi umana in vitro e in cellule viventi. Inoltre, l'espressione della telomerasi può proteggere i neuroni contro l'apoptosi indotta da A β . Queste osservazioni suggeriscono che l'up-regolazione dell'espressione e dell'attività della telomerasi può rappresentare una potenziale strategia per il trattamento dell'AD.

VITAMINA E. LUNGHEZZA TELOMERICA e ATTIVITA' TELOMERASICA

Lo stile di vita potrebbe contribuire alla regolazione della lunghezza telomerica attraverso meccanismi correlati allo stress ossidativo e all'infiammazione [192, 221]. Numerose evidenze hanno dimostrato come l'attività fisica [222, 223], il mantenimento di un normale peso corporeo [224] e una dieta salutare [225, 226] potrebbero essere associati a telomeri più lunghi, mentre l'esposizione a metalli pesanti [227], il fumo [228] e gli stress psicologici [222, 229] potrebbero portare ad un accorciamento dei telomeri.

Partendo dal presupposto che l'accorciamento telomerico è accelerato dallo stress ossidativo e dall'infiammazione e che la dieta ha effetto su entrambi questi processi, numerosi studi si sono concentrati sull'analisi della potenziale correlazione tra dieta e lunghezza telomerica. È stato dimostrato che la composizione corporea e la dieta sono correlati alla lunghezza telomerica [230], nello specifico, è stato osservato che in una popolazione femminile, una dieta

ricca di acidi grassi polinsaturi è inversamente associata alla lunghezza telomerica, mentre una dieta ricca di fibre è positivamente associata alla lunghezza telomerica [230]. È stato inoltre dimostrato che l'assunzione di vitamine con attività antiossidante, come la vitamina E, potrebbero influenzare la regolazione della lunghezza telomerica [230-232] ed in particolare l'assunzione di α - e γ -tocoferolo potrebbero contribuire alla conservazione della lunghezza telomerica, riducendo lo stress ossidativo [233].

Ad oggi esistono pochi studi che correlano la vitamina E e l'attività telomerasica. È stato dimostrato che i tocotrienoli hanno un ruolo nella regolazione della proteina chinasi C (PKC) [234] e che PKC è coinvolta nel controllo dell'attività della telomerasi [235, 236]. È stato quindi ipotizzato che i tocotrienoli possano agire come potenziali regolatori dell'attività telomerasica attraverso l'inibizione della PKC. Il potenziale ruolo di regolazione dell'attività telomerasica risulta essere più debole per quanto riguarda i tocoferoli [237].

SCOPO

L'alimentazione è ormai considerata un "fattore di rischio modificabile" in grado di influire sullo sviluppo delle patologie neurodegenerative.

Recenti evidenze dimostrano il legame tra la vitamina E e fattori, come lo stress ossidativo e l'infiammazione, che contribuiscono allo sviluppo e alla progressione dell'AD, e il potenziale ruolo neuroprotettivo della vitamina E. Gli studi si sono focalizzati inizialmente sulla vitamina E totale, mentre, negli ultimi anni, l'isolamento e l'identificazione delle diverse isoforme di tocoferoli e tocotrienoli, sono stati fondamentali per approfondire l'analisi degli effetti biologici legati ai diversi ruoli della vitamina E. La maggior parte degli studi si sono però limitati all'analisi dell' α -tocoferolo, la forma vitaminica più potente e attiva, e in pochi hanno esaminato le altre isoforme.

Lo scopo del nostro studio è stato quello di approfondire il ruolo della vitamina E nell'AD. Abbiamo investigato i livelli sierici di α -, β -, γ - e δ -tocoferolo e α -, β -, γ - e δ -tocotrienolo in pazienti AD paragonati a soggetti cognitivamente integri, in modo da valutare l'esistenza di una relazione tra le diverse isoforme di vitamina E e il rischio di sviluppare AD.

Abbiamo poi focalizzato lo studio su quale possa essere il ruolo delle isoforme di vitamina E sul rischio di sviluppare la patologia. Prendendo in considerazione il fatto che un'accelerata senescenza cellulare è stata correlata allo sviluppo dell'AD e che le vitamine, con la loro attività antiossidante e antinfiammatoria, hanno un ruolo protettivo nei confronti dei telomeri, abbiamo valutato se i bassi livelli di vitamine che si osservano nei pazienti affetti da AD possano riflettersi in un'alterazione della lunghezza telomerica e dell'attività telomerasica e, quindi, della senescenza cellulare.

MATERIALI E METODI

DISEGNO dello STUDIO

Per questo studio sono stati arruolati 53 soggetti (14 maschi e 39 femmine) affetti da malattia di Alzheimer ad insorgenza tardiva (AD) (età media $78,6 \pm 0,6$ anni) paragonabili per sesso ed età a 40 soggetti (17 maschi e 23 femmine) in buona salute cognitivamente integri (CT) ($78,9 \pm 0,9$ anni), afferenti all'Ambulatorio di Geriatria della Fondazione IRCCS Ca' Granda, Ospedale Maggiore Policlinico di Milano.

La diagnosi clinica di AD è stata effettuata basandosi sugli attuali criteri diagnostici [95].

Di tutti i soggetti arruolati è stata effettuata un'anamnesi approfondita raccogliendo anche le informazioni riguardanti l'assunzione di farmaci. Criteri di esclusione sono stati: la presenza di uno stato infiammatorio acuto, malattie infettive, diabete, patologie cardiache, tumori, disordini immunologici, alterazioni ematologiche, trattamento con farmaci antinfiammatori. Tutti i soggetti in studio hanno dichiarato di non essere in trattamento con vitamina E. Lo studio è stato approvato dal comitato etico vigente e tutti i partecipanti hanno sottoscritto un consenso informato.

Le performance cognitive dei soggetti sono state valutate mediante il *Mini Mental State Examination* (MMSE), a ciascun individuo è stato assegnato un punteggio compreso fra 0 (stato cognitivo estremamente compromesso) e 30 (stato cognitivo ottimale).

Lo stato funzionale è stato invece valutato mediante la scala *Lawton Instrumental Activities of Daily Living* (IADL) e la scala *Katz index of independence in Activities of Daily Living* (ADL). Ad ogni soggetto è stato assegnato un punteggio IADL compreso tra 0 (stato funzionale estremamente compromesso) e 8 (stato funzionale ottimale) ed un punteggio ADL compreso tra 0 (stato funzionale estremamente compromesso) e 6 (stato funzionale ottimale).

Lo stato nutrizionale dei soggetti in studio è stato valutato utilizzando l'indice di massa corporea (BMI), ricavato dal rapporto tra il peso in kilogrammi e il quadrato dell'altezza in metri, e il dosaggio del colesterolo totale.

È stata valutata inoltre l'attitudine al fumo dei soggetti in studio. I prelievi ematici sono stati effettuati da vena periferica a digiuno.

ANALISI BIOCHIMICHE

Il sangue prelevato in provetta Vacutainer con gel activator (Becton Dickinson Co., Rutherford, NJ) è stato centrifugato a 1200 g per 15 minuti. Il siero così ottenuto è stato conservato a -70°C e successivamente utilizzato per i dosaggi delle diverse isoforme di vitamine E e del colesterolo.

I livelli di tocoferoli, tocotrienoli e 5-nitro- γ -tocoferolo sono stati valutati mediante cromografia liquida ad alta prestazione (HPLC) a fase inversa, utilizzando un rivelatore elettrochimico (ESA, Chelmsford, MA, USA) in accordo con la metodica precedentemente pubblicata [238]. Nello specifico, a 500 μ l di siero sono stati aggiunti 100 μ l di acido ascorbico 30% e 1 ml di KOH 10%. Successivamente i campioni sono stati estratti tre volte con un rapporto 1:2 di etanolo in esano, concentrati a secco con gas nitrogeno ad elevata purezza e ricostituiti in 300 μ l fase mobile (30 mmol litio acetato/L, 83% HPLC aceto nitrile, 12% HPLC metanolo e 0,2% HPLC acido acetico (pH 6,5)).

Sono stati usati come standard l' α -, γ -, δ -tocoferolo (Sigma-Aldrich, Milano, IT), il β -tocoferolo (Superchrome, Milano, IT), l' α -, γ -, δ -tocotrienolo (LGC-Promochem, Milano, IT), il β -tocotrienolo (Matreya-DBA, Pleasant-Gap, PA, USA), il 5-nitro- γ -tocoferolo e l' α -tocoferilquinone (Research Organics, Roma, IT). Dopo la filtrazione, l'analisi di separazione è stata condotta a 30°C su una colonna Discovery-C18 (Sigma-Aldrich, Milano, IT). La fase mobile è stata rilasciata a 1 ml/minuto.

Il limite di rilevamento determinato per i tocoferoli, utilizzando questo metodo, è di circa 0,15 pmol, mentre è approssimativamente 50 fmol per i tocotrienoli. Coefficiente di variazione intra-assay è 5-6% per i tocoferoli e 6-7% per i tocotrienoli.

Il colesterolo totale sierico è stato valutato mediante un saggio enzimatico standardizzato [239].

L'analisi dei livelli delle diverse isoforme di vitamina E è stata effettuata considerando il rapporto tra vitamina E e colesterolo totale. La vitamina E è,

infatti, trasportata nel plasma dalle lipoproteine e quindi il metabolismo delle lipoproteine potrebbe avere effetto sul rilascio della vitamina E ai tessuti [240]. Oltre ad ogni isoforma considerata singolarmente, abbiamo analizzato anche i tocoferoli totali ($\alpha + \beta + \gamma + \delta$ tocoferoli), i tocotrienoli totali ($\alpha + \beta + \gamma + \delta$ tocotrienoli) e la vitamina E totale (tocoferoli + tocotrienoli). Inoltre sono stati analizzati i rapporti tra α -tocopherilquinone/ α -tocopherolo e 5-nitro- γ -tocopherolo/ γ -tocopherolo come indice di consumo di α - e γ -tocopherolo dovuto alla presenza, rispettivamente, di danno ossidativo e nitrossidativo.

ESTRAZIONE DNA

Il sangue prelevato in provette Vacutainer con Na-Citrato come anticoagulante (Becton Dickinson Co., Rutherford, NJ) è stato utilizzato per l'estrazione del DNA genomico mediante il metodo del salting out [241]. Previa centrifugazione a 1200 g per 15 minuti, il plasma è stato separato dalla parte corpuscolata del sangue e quest'ultima trasferita in provette Falcon. Dopo l'aggiunta di 20 ml di Buffer A (Saccarosio 0.32 M, $MgCl_2$ 5 mM, Triton X-100, Tris-HCl 1 mM pH 7.5), ogni campione è stato centrifugato a 1700 g per 40 minuti a 4°C. Una volta eliminato il surnatante, il pellet è stato lavato con 10 ml di Buffer A e nuovamente centrifugato a 1700 g per 40 minuti. Il pellet è stato quindi risospeso in 2,25 ml di Buffer B (NaCl 400 mM, EDTA 2 mM pH 8, Tris-HCl 10 mM pH 8) e successivamente sono stati aggiunti 250 μ l di Buffer C (SDS 5%, Proteinasi K 5 mg/ml). La soluzione è stata quindi incubata over-night a 37°C. Il giorno dopo ad ogni campione sono stati aggiunti 675 μ l di NaCl 4 M prima di procedere ad una centrifugazione a 1700 g per 45 minuti a 4°C. Il surnatante, trasferito in una nuova Falcon, è stato centrifugato nuovamente a 1700 g per 45 minuti a 4°C e successivamente il surnatante, trasferito in una nuova Falcon, è stato precipitato con due volumi di etanolo freddo al 100%. Mescolando per inversione si forma un flocculo di DNA che è stato prelevato, lavato con etanolo, asciugato in stufa a vuoto e risospeso in 400 μ l di TRIS-EDTA 1X (Tris-HCl 10 mM, EDTA 0,1 mM, pH 8). La concentrazione di DNA è stata valutata mediante lettura dell'assorbanza con spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 260 nm. Per stimare il grado di purezza dell'acido nucleico estratto, la misura

dell'assorbanza per ogni campione è stata valutata anche a 280 nm, lunghezza d'onda alla quale si legge la frazione proteica. Il rapporto tra la lettura a 260 nm e quella a 280 nm permette di determinare l'eventuale quantità di proteine contaminanti presenti nel campione in esame. Una preparazione pura deve avere un rapporto che si avvicini a 2, anche se rapporti a partire da 1,5 sono stati considerati sufficientemente puri da poter essere utilizzati nei successivi esperimenti.

ANALISI del GENOTIPO dell'APOLIPOPROTEINA E

La genotipizzazione è stata effettuata tramite PCR e successiva reazione di digestione con enzimi di restrizione.

È stato amplificato un frammento di 234 bp dell'esone 4 del gene dell'apolipoproteina E (apoE).

Nello specifico il protocollo prevede:

2 µg di DNA genomico

Primers 1 pM:

F4 ACAGAATTCGCCCGGCCTGGTACAC

F6 TAAGCTTGGCACGGCTGTCCAAGGA

Buffer 1x (Promega, Milano, IT)

MgCl₂ 1,5 mM (Promega, Milano, IT)

dNTPs 0,2 mM (Promega, Milano, IT)

Taq DNA polimerasi 1,25 U (Promega, Milano, IT)

Acqua sterile fino a raggiungere un volume finale di 50 µl

Condizioni di reazione:

96°C per 5 minuti

30 cicli: 95°C per 1 minuto

60°C per 70 secondi

70°C per 2 minuti

70°C per 10 minuti

Le tre diverse forme alleliche del gene ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$ e $\epsilon 4$) sono state determinate mediante digestione con l'enzima di restrizione HhaI (New England BioLabs, MA, USA).

La successiva corsa elettroforetica su gel d'agarosio al 4% permette di discriminare sei diverse combinazioni alleliche (Figura 3):

$\epsilon 2/\epsilon 2$: 3 frammenti rispettivamente a 33, 83 e 91 bp

$\epsilon 3/\epsilon 3$: 4 frammenti rispettivamente a 33, 35, 48 e 91 bp

$\epsilon 4/\epsilon 4$: 4 frammenti rispettivamente a 33, 35, 48 e 72 bp

$\epsilon 2/\epsilon 3$: 5 frammenti rispettivamente a 33, 35, 48, 83 e 91 bp

$\epsilon 2/\epsilon 4$: 6 frammenti rispettivamente a 33, 35, 48, 72, 83 e 91 bp

$\epsilon 3/\epsilon 4$: 5 frammenti rispettivamente a 33, 35, 48, 72 e 91 bp



Figura 3: Polimorfismi dell'apoE.

ANALISI della LUNGHEZZA TELOMERICA

Il DNA genomico estratto dal sangue periferico di ciascun soggetto arruolato è stato utilizzato per la misurazione della lunghezza telomerica. A tale scopo, è stata impiegata la metodica *real-time kinetic quantitative Polymerase Chain Reaction* (q-PCR), utilizzando il metodo di Cawthon modificato [242].

Per ogni campione è stato determinato il rapporto relativo (T/S) tra il numero di copie ripetute telomeriche (T) e il numero di copie di un gene a singola copia (S), utilizzando un approccio quantitativo comparativo. In particolare, per ogni campione di DNA è stata effettuata sia una q-PCR relativa alle estremità telomeriche, sia un'analisi analoga per l'amplificazione del gene a singola copia

36B4, localizzato sul cromosoma 12 e codificante per la fosfoproteina acida ribosomiale PO. La specificità di tale misurazione è garantita dall'impiego di primers in grado di appaiarsi in modo univoco alle ripetizioni telomeriche impedendo, al tempo stesso, l'amplificazione di eventuali dimeri. I protocolli per l'allestimento delle due q-PCR si differenziano per la sequenza dei primers usati, le loro temperature di annealing ed il numero totale dei cicli.

Nello specifico, il protocollo prevede:

- diluizioni seriali 1:2 del DNA dello standard interno (pool di DNA provenienti da diversi individui) allo scopo di ottenere 5 aliquote (da 1,77 a 0,22 ng/μl) utilizzate per l'allestimento di una curva standard;
- diluizioni dei DNA dei campioni in H₂O così da ottenere una concentrazione di 0,5 ng/μl.

Per ogni campione e standard sono stati caricati 20 μl di DNA (10ng) per pozzetto in triplicato.

Come controllo negativo è stata utilizzata H₂O.

Preparazione della Mix, 30 μl per reazione:

- Primers: 6 μl (Tabella 1)
- IQ SYBR green supermix (BioRad, CA, USA): 24 μl

		Sequenza primers	[] finale
T	Tel 1	5'-GGTTTTTGAGGGTGAGGGTGAGGGTGAGGGTGAGGGT-3'	270 nM
	Tel 2	5'-TCCCGACTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTA-3'	900 nM
S	36B4u	5'-CAGCAAGTGGGAAGGTGTAATCC-3'	300 nM
	36B4d	5'-CCCATTCTATCATCAACGGGTACAA-3'	500 nM

Tabella 1: Sequenza e concentrazioni finali dei primers utilizzati.

Condizioni di reazione relative all'amplificazione di T:

95°C per 10minuti

30 cicli: 95°C per 15 secondi

54°C per 2 minuti

Condizioni di reazione relative all'amplificazione di S:

95°C per 10 minuti

40 cicli: 95°C per 15 secondi

58°C per 1 minuto

La lunghezza telomerica di ogni campione è stata espressa come rapporto T/S.

Per confermare le lunghezze telomeriche, tutti i campioni sono stati analizzati due volte ed il coefficiente di variazione inter-assay è risultato essere < 5%.

ISOLAMENTO delle CELLULE MONONUCLEATE PERIFERICHE del SANGUE

Il sangue prelevato in provette Vacutainer con EDTA come anticoagulante (Becton Dickinson Co., Rutherford, NJ) è stato utilizzato per l'isolamento delle cellule mononucleate periferiche del sangue (PBMC). Dopo una centrifugazione a 1200 g per 15 minuti, il plasma è stato eliminato mentre la parte corpuscolata del sangue, raccolta in una provetta Falcon, è stata stratificata su 15 ml di Ficoll (Lympholyte, Cedarlane Burlington, NC, USA) e centrifugata per 25 minuti a 1000 g. Al termine della centrifugazione si osserva la presenza di un anello di cellule, i PBMC (figura 4). Queste cellule vengono prelevate e trasferite in una nuova Falcon, diluite in *Phosphate Buffer Saline* (PBS) e centrifugate per 15 minuti a 700 g ottenendo così il pellet cellulare. Il pellet, suddiviso in aliquote da 2×10^6 cellule, è stato quindi risospeso in 900 μ l di *Fetal Bovin Serum* (FBS) e 100 μ l di dimetildolfossido (DMSO) e conservato a -80°C.

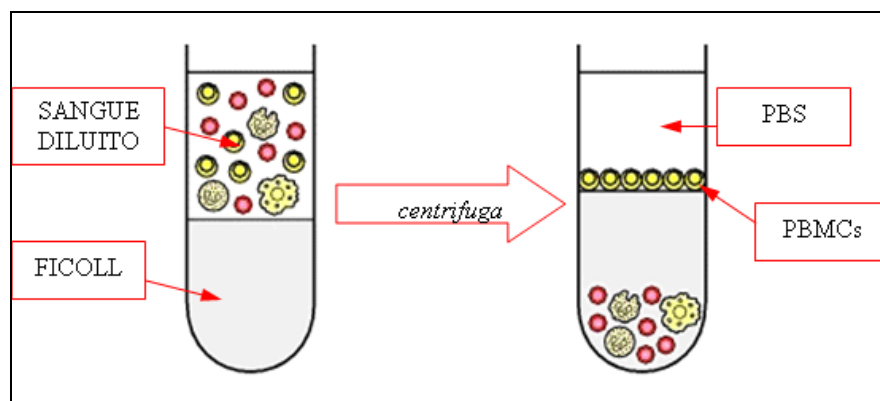


Figura 4: Isolamento PBMC.

ANALISI dell'ATTIVITA' TELOMERASICA

L'attività telomerastica nei PBMC è stata misurata usando un kit commerciale PCR-ELISA (Roche Diagnostics Corp., Indianapolis, IN, USA). Sono state seguite le procedure di analisi raccomandate dal produttore (Figura 5).

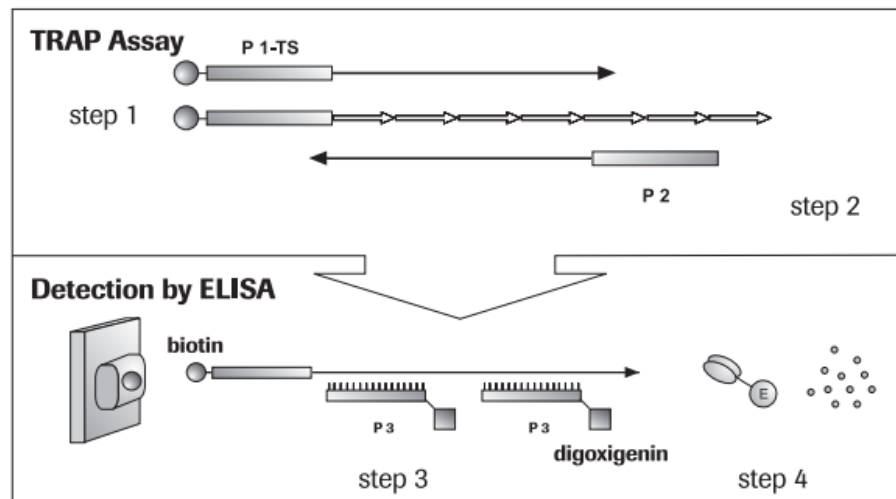


Figura 5: Saggio di attività telomerastica.

L'analisi è stata effettuata su 2×10^6 PBMC per ogni campione. Come controllo positivo è stato usato un estratto di cellule, fornito dal kit, preparato da cellule renali umane immortalizzate che esprimono la telomerasi; come controllo negativo, sono stati utilizzati estratti cellulari che hanno subito un trattamento termico per 10 minuti a 85°C . Ciascun campione è stato analizzato in doppio.

Le cellule dei campioni e dei controlli sono state lisate. La reazione di PCR prevede un primo step in cui la telomerasi aggiunge ripetizioni telomeriche (TTAGGG) all'estremità 3' dei primers P1-TS biotinilato all'estremità 5'. Successivamente questi prodotti sono stati amplificati tramite PCR usando i primers P1-TS e P2. Condizioni di reazione:

- 25°C per 10 minuti
- 94°C per 5 minuti
- 30 cicli: 94°C per 30 secondi
- 50°C per 30 secondi
- 72°C per 90 secondi
- 72°C per 10 minuti

Un'aliquota dell'amplificato in PCR è stata poi denaturata e la biotina dei primers P1-TS è stata immobilizzata stabilmente alla streptavidina con cui è attivata la piastra ELISA. Il campione è stato ibridato ad una sonda marcata con diossigenina (DIG) che identifica specificatamente le ripetizioni telomeriche (P3). È stato successivamente aggiunto l'anticorpo secondario anti-DIG coniugato alla perossidasi. Quindi, con l'aggiunta del substrato della perossidasi, è stata visualizzata la reazione colorimetrica con l'ausilio di uno lettore di piastra alla lunghezza d'onda di 450 nm.

Il coefficiente di variabilità intra-assay è del 3,2%, il coefficiente di variabilità inter-assay è del 3,6%. Il cut-off per il coefficiente di variazione è del 10%.

ANALISI STATISTICA

I dati sono stati analizzati mediante il programma statistico SPSS/PC (SPSS versione 24, Chicago, IL). Le variabili sono espresse come media \pm errore standard. Il test di Kolmogorov-Smirnov è stato effettuato per analizzare la distribuzione dei dati. Al fine di confrontare i gruppi in esame sono stati effettuati test a campioni indipendenti, test U di Mann-Whitney e student T test. Le variabili categoriche sono state confrontate con il test Chi-quadrato.

Utilizzando il test ρ di Spearman sono state analizzate le correlazioni tra le diverse isoforme della vitamina E e tra gli indici di senescenza cellulare e i parametri principalmente correlati all'AD, alla nutrizione e allo stile di vita.

L'analisi di regressione logistica è stata usata per valutare l'associazione tra i livelli delle diverse isoforme di vitamina E e l'aumentato rischio di sviluppare AD, indipendentemente da covariate multiple, come età, genere, genotipo dell'apoE e attitudine al fumo, che sono stati individuati come potenziali fattori confondenti per lo studio.

Allo scopo di valutare le relazioni tra lunghezza telomerica e attività telomerasica e i livelli delle diverse isoforme di vitamina E è stata effettuata un'analisi di regressione lineare indipendentemente da fattori confondenti come genere, età, attitudine al fumo e terapia con statine.

Per tutte le analisi è stato considerato statisticamente significativo un valore di $p < 0,05$.

RISULTATI

CARATTERISTICHE della POPOLAZIONE

In tabella 2 sono riportate le caratteristiche generali (età, genere), gli indici di valutazione dello stato cognitivo (MMSE), funzionale (ADL e IADL), nutrizionale (BMI e colesterolo totale), dello stile di vita (fumo) e la distribuzione del genotipo dell'apolipoproteina E (apoE) dei soggetti in studio.

Lo stato cognitivo e lo stato funzionale sono compromessi nei pazienti affetti da malattia di Alzheimer (AD) rispetto ai soggetti cognitivamente integri (CT).

La distribuzione dell'allele $\epsilon 4$ del genotipo dell'apoE risulta significativamente differente tra CT e AD, in linea con quanto riportato in letteratura [243, 244].

	CT (n°40)	AD (n°53)	p
Età	78,9 ± 0,9	78,6 ± 0,6	NS
Genere, % femmine	57,5%	73,6%	NS
MMSE	28,9 ± 0,2	20,5 ± 0,8	< 0,001
ADL	5,5 ± 0,1	4,9 ± 0,2	0,020
IADL	6,5 ± 0,3	4,5 ± 0,4	< 0,001
BMI (kg/m ²)	25,2 ± 0,7	24,0 ± 0,8	NS
Colesterolo (mmol/L)	4,9 ± 0,1	5,3 ± 0,1	NS
Fumatore, % (% ex)	10% (40%)	7,7% (21,2%)	NS
ApoE, % allele $\epsilon 4$	27,5%	52,8%	0,014

Tabella 2: Caratteristiche dei soggetti controllo (CT) e affetti da malattia di Alzheimer (AD). I risultati sono espressi come valore medio ± errore standard per età, MMSE, ADL, IADL, BMI, colesterolo totale e come distribuzione percentuale per il genere, il fumo e il genotipo dell'apolipoproteina E.

MMSE: *Mini Mental State Examination*; ADL: *Katz index of independence in Activities of Daily Living scale*; IADL: *Lawton Instrumental Activities of Daily Living scale*; BMI: indice di massa corporea; apoE: apolipoproteina E.

VITAMINA E e DEMENZA di ALZHEIMER

In tabella 3 sono riportati i livelli sierici delle isoforme di vitamina E, dei tocoferoli totali, dei tocotrienoli totali e della vitamina E totale normalizzati per i livelli di colesterolo e i rapporti α -tocoferilquinone/ α -tocoferolo e 5-nitro- γ -tocoferolo/ γ -tocoferolo, indici di danno ossidativo e nitrossidativo rispettivamente, nei soggetti CT e AD.

I livelli medi di α -, β -, γ -, δ -tocoferolo e dei tocoferoli totali, di δ -tocotrienolo e dei tocotrienoli totali e di vitamina E totale sono significativamente più bassi negli AD rispetto ai CT. I rapporti α -tocoferilquinone/ α -tocoferolo e 5-nitro- γ -tocoferolo/ γ -tocoferolo sono significativamente più alti negli AD rispetto ai CT.

	CT (n°40)	AD (n°53)	p
α-tocoferolo	6,55 \pm 0,22	5,21 \pm 0,17	< 0,001
β-tocoferolo	0,51 \pm 0,02	0,46 \pm 0,01	0,018
γ-tocoferolo	0,43 \pm 0,02	0,37 \pm 0,01	0,002
δ-tocoferolo	0,058 \pm 0,002	0,053 \pm 0,001	0,035
α -tocotrienolo	69,72 \pm 3,45	60,95 \pm 1,99	0,090
β -tocotrienolo	27,63 \pm 0,90	27,94 \pm 0,97	0,718
γ -tocotrienolo	13,38 \pm 0,74	14,30 \pm 0,51	0,251
δ-tocotrienolo	9,73 \pm 0,38	3,74 \pm 0,38	< 0,001
Tocoferoli totali	7,55 \pm 0,25	6,54 \pm 0,24	0,004
Tocotrienoli totali	120,47 \pm 4,62	106,94 \pm 2,74	0,021
Vitamina E totale	7,67 \pm 0,25	6,64 \pm 0,24	0,004
α-tocoferilquinone/ α-tocoferolo	1,62 \pm 0,04	1,88 \pm 0,04	< 0,001
5-nitro- γ-tocoferolo/ γ-tocoferolo	11,26 \pm 0,28	12,87 \pm 0,36	0,003

Tabella 3: Livelli sierici delle isoforme di vitamina E in controlli (CT) e in pazienti affetti da malattia di Alzheimer (AD). I livelli di vitamina E sono normalizzati in rapporto al dosaggio di colesterolo totale. I valori sono espressi come media \pm errore standard. I livelli di tocoferoli e vitamina E totale sono espressi come μ mol/mmol colesterolo. I livelli di tocotrienoli sono espressi come nmol/mmol colesterolo.

Abbiamo effettuato, suddividendo la popolazione in base alla patologia, un'analisi dei livelli sierici delle diverse isoforme della vitamina E in rapporto a parametri, come lo stato cognitivo e funzionale, principalmente correlati all'AD e non sono state osservate correlazioni significative.

Abbiamo poi analizzato le correlazioni tra i livelli delle isoforme della vitamina E e il BMI, indice di stato nutrizionale, e l'attitudine al fumo, indicativo dello stile di vita dei soggetti e non sono state osservate correlazioni sia considerando la popolazione generale, sia suddividendola in base alla patologia.

In tabella 4 sono riportati i livelli vitaminici suddividendo i soggetti affetti da AD in base alla presenza o assenza dell'allele $\epsilon 4$ del genotipo dell'apoE.

	$\epsilon 4^-$ (n°25)	$\epsilon 4^+$ (n°28)	p
α-tocoferolo	5,68 \pm 0,25	4,80 \pm 0,18	0,014
β -tocoferolo	0,50 \pm 0,01	0,45 \pm 0,02	0,080
γ-tocoferolo	0,39 \pm 0,02	0,34 \pm 0,01	0,014
δ -tocoferolo	0,054 \pm 0,002	0,052 \pm 0,002	0,512
α -tocotrienolo	64,50 \pm 3,49	57,80 \pm 2,00	0,236
β -tocotrienolo	27,77 \pm 1,15	28,08 \pm 1,54	0,993
γ -tocotrienolo	15,36 \pm 0,75	13,34 \pm 0,68	0,087
δ -tocotrienolo	3,81 \pm 0,50	3,68 \pm 0,58	0,331
Tocoferoli totali	6,81 \pm 0,30	6,29 \pm 0,37	0,159
Tocotrienoli totali	111,44 \pm 4,64	102,91 \pm 2,99	0,184
Vitamina E	6,92 \pm 0,30	6,40 \pm 0,37	0,176
α-tocoferilquinone/ α-tocoferolo	1,77 \pm 0,06	1,98 \pm 0,05	0,007
5-nitro- γ-tocoferolo/ γ-tocoferolo	11,65 \pm 0,48	13,96 \pm 0,43	0,001

Tabella 4: Livelli sierici delle isoforme di vitamina E in soggetti affetti da malattia di Alzheimer portatori ($\epsilon 4^+$) e non portatori ($\epsilon 4^-$) dell'allele $\epsilon 4$ dell'apolipoproteina E. I livelli di vitamina E sono stati normalizzati in rapporto al dosaggio di colesterolo totale nel sangue. I valori sono espressi come media \pm errore standard. I livelli di tocoferoli e vitamina E totale sono espressi come $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ colesterolo. I livelli di tocotrienoli sono espressi come nmol/mmol colesterolo.

Si osserva che i livelli medi di α - e γ -tocoferolo sono significativamente più bassi nei soggetti portatori dell'allele $\epsilon 4$. Al contrario, i rapporti α -tocoferilchinone/ α -tocoferolo e 5-nitro- γ -tocoferolo/ γ -tocoferolo, sono significativamente più alti nei pazienti portatori dell'allele $\epsilon 4$.

L'analisi di regressione logistica conferma che α -tocoferolo (OR: 0,511 95%CI: 0,337 - 0,776, $p = 0,002$), γ -tocoferolo (OR: 0,994 95%CI: 0,989 - 1,000, $p = 0,033$), tocoferoli totali (OR: 0,741 95%CI: 0,561 - 0,980, $p = 0,036$), δ -tocotrienolo (OR: 0,513 95%CI: 0,393 - 0,671, $p < 0,001$) e vitamina E (OR: 0,743 95%CI: 0,563 - 0,981, $p = 0,036$) sono fattori protettivi sul rischio di sviluppare AD; mentre il rapporto α -tocoferilchinone/ α -tocoferolo (OR: 19,052 95%CI: 2,891 - 125,538, $p = 0,002$) e il rapporto 5-nitro- γ -tocoferolo/ γ -tocoferolo (OR: 1,345 95%CI: 1,072 - 1,687, $p = 0,010$), si associano ad un aumentato rischio di sviluppare la patologia indipendentemente dal genere, dall'età, dall'attitudine al fumo e dal genotipo dell'apoE.

TELOMERI e DEMENZA di ALZHEIMER

In tabella 5 sono riportate la lunghezza telomerica e l'attività telomerasica osservata nei soggetti CT e AD. Non sono state osservate differenze statisticamente significative tra i gruppi.

	CT (n°40)	AD (n°53)	p
Lunghezza telomerica	0,71 \pm 0,05	0,62 \pm 0,04	0,159
Attività telomerasica	0,11 \pm 0,01	0,11 \pm 0,01	0,256

Tabella 5: Lunghezza telomerica e attività telomerasica in soggetti controllo (CT) e pazienti affetti da malattia di Alzheimer (AD). I valori sono espressi come media \pm errore standard.

Considerando l'influenza che la terapia con statine ha sulla biologia dei telomeri, abbiamo valutato se in AD e CT ci fossero differenze nell'assunzione di questi farmaci e non abbiamo evidenziato differenze significative (terapia con statine 24,3% in CT e 22% in AD).

Inoltre, considerando la popolazione generale, abbiamo osservato che, nonostante i soggetti in trattamento farmacologico con statine, mostrino una lunghezza telomerica maggiore ($0,67 \pm 0,28$) e un'attività telomerasica più alta ($0,12 \pm 0,08$) rispetto ai soggetti non in trattamento ($0,65 \pm 0,27$ e $0,10 \pm 0,04$ rispettivamente), non sono state evidenziate differenze statisticamente significative.

Abbiamo poi analizzato la lunghezza telomerica e l'attività telomerasica in rapporto ai parametri principalmente correlati all'AD. Non sono state osservate correlazioni significative tra i marcatori di senescenza e la valutazione dello stato cognitivo e non sono emerse differenze tra portatori e non portatori dell'allele $\epsilon 4$ del genotipo apoE sia nel gruppo degli AD che in quello dei CT.

Inoltre, valutando lo stile di vita dei soggetti, non abbiamo osservato differenze di lunghezza telomerica e attività telomerasica in base all'attitudine al fumo, sia considerando la popolazione generale, che suddividendola in base alla patologia.

VITAMINA E e LUNGHEZZA TELOMERICA e ATTIVITA' TELOMERASICA

Nella popolazione generale si osserva una correlazione positiva statisticamente significativa tra la lunghezza telomerica e i tocoferoli totali ($r^2 = 0,214$, $p = 0,05$) e tra la lunghezza telomerica e la vitamina E totale ($r^2 = 0,213$, $p = 0,05$) indipendentemente dalla diagnosi e da fattori confondenti come il genere, l'età, l'attitudine al fumo e la terapia con statine.

Non sono state osservate correlazioni significative tra attività telomerasica e livelli delle isoforme di vitamina E e gli indici di danno ossidativo e nitrossidativo.

Suddividendo poi la popolazione in base alla presenza o assenza della patologia non sono state osservate correlazioni significative.

DISCUSSIONE

La prevalenza della demenza nei paesi industrializzati è circa dell'8% negli ultrasessantacinquenni e sale ad oltre il 20% dopo gli ottanta anni. La demenza è in crescente aumento nella popolazione generale ed è da considerarsi una delle priorità mondiali da affrontare nell'ambito della salute pubblica. In Italia, il numero totale dei pazienti affetti da demenza è stimato ad oltre un milione, di cui circa 600 mila sono i soggetti affetti da demenza di Alzheimer (AD). I numeri sono destinati ad aumentare visto il progressivo incremento della popolazione anziana.

Negli ultimi anni sono aumentati notevolmente gli studi sull'alimentazione, che è da considerarsi un "fattore di rischio modificabile" per lo sviluppo dell'AD. L'importanza di un'alimentazione adeguata a sostegno di una sana funzione cerebrale era già stata dimostrata nel 1980, quando sono state stabilite relazioni dirette tra lo stato nutrizionale e le prestazioni cognitive [245]. Ad oggi c'è sempre maggiore interesse nell'indagare il ruolo di un'adeguata alimentazione come possibile fattore di prevenzione all'insorgenza dell'AD e recenti studi sulle attività antiossidanti e antinfiammatorie della vitamina E hanno permesso di evidenziare il potenziale ruolo neuroprotettivo di questa vitamina nella patologia.

Lo scopo del nostro studio è stato quello di approfondire l'analisi della vitamina E nell'AD, valutando l'esistenza di una relazione tra i livelli sierici delle isoforme di vitamina E e il rischio di sviluppare AD e focalizzando l'analisi sul ruolo che le isoforme della vitamina E possono avere nella patologia, correlandole ai meccanismi legati alla senescenza cellulare.

Abbiamo paragonato in pazienti affetti da AD e CT i livelli sierici delle otto isoforme di vitamina E, prendendo in considerazione il rapporto tra vitamina E e colesterolo totale. La vitamina E è, infatti, trasportata nel plasma dalle lipoproteine e quindi il loro metabolismo ha effetto sul rilascio della vitamina ai tessuti [240]. I nostri risultati evidenziano che i livelli di vitamina E totale, di α -, β -, γ -, δ -tocoferolo e di tocoferoli totali, di δ -tocotrienolo e di tocotrienoli totali sono significativamente più bassi negli AD rispetto ai CT.

Gli studi effettuati sui livelli della vitamina E in pazienti AD e CT sono molteplici, ma, per la maggior parte, si sono focalizzati sulla vitamina E totale o solo su alcune isoforme. Gli studi effettuati sull' α - e γ -tocoferolo e sulla vitamina E totale hanno osservato sia bassi livelli di queste isoforme in pazienti con decadimento cognitivo e AD [100, 246, 247], sia livelli simili ai CT [248, 249]. I nostri risultati sono allineati all'unico studio in cui vengono analizzati i livelli plasmatici di tutte le otto isoforme di vitamina E paragonando AD e CT, dove si osservano bassi livelli di vitamina E e di tutte le sue isoforme nei pazienti patologici [130].

Le differenze osservate nei confronti della letteratura potrebbero essere dovute alla particolare omogeneità geografica dei soggetti arruolati nel nostro studio e agli stringenti criteri diagnostici utilizzati per definire i pazienti AD. Abbiamo considerato, infatti, pazienti che presentavano sia le caratteristiche cliniche sia tutti i marcatori biologici, liquorali e di *neuroimaging* positivi per la presenza della patologia. Inoltre, tutti i partecipanti erano soggetti caucasici provenienti dal nord Italia e questo potrebbe aver determinato differenze in termini di abitudini alimentari [130], rispetto alle popolazioni analizzate negli altri studi.

Sono sempre maggiori le evidenze sulle proprietà biologiche delle otto isoforme della vitamina E, le quali, pur avendo funzioni simili, presentano caratteristiche specificatamente differenti. Infatti, le diverse isoforme, nello svolgimento delle loro funzioni, intervengono su meccanismi molecolari differenti e quindi possono o meno essere influenzate dallo stato patologico dei soggetti.

La funzione antiossidante di α -, β -, γ -tocoferolo e α -, β -, γ -tocotrienolo è simile, mentre l'isoforma δ , ha un'attività più debole [124, 125]. Inoltre, studi hanno dimostrato il ruolo peculiare del γ -tocoferolo nell'eliminazione delle specie reattive dell'azoto [250, 251] e che i tocotrienoli sono più efficienti dell' α -tocoferolo nel neutralizzare i radicali liberi, grazie alla loro migliore distribuzione a livello della membrana cellulare [250].

L' α - e γ -tocoferolo e i tocotrienoli svolgono una funzione antinfiammatoria modulando l'espressione delle citochine e contrastando la neuroinfiammazione tipica dell'AD [250, 252]. È stato dimostrato che il δ -tocotrienolo ha un'attività immunostimolatoria, quindi i bassi livelli sierici di questa isoforma da noi

osservati negli AD potrebbero essere determinati dallo squilibrio dello stato infiammatorio che si crea all'instaurarsi della patologia.

I nostri risultati confermano, quindi, il ruolo neuroprotettivo della famiglia della vitamina E nell'AD. Gli equilibri tra i livelli delle diverse isoforme sono il risultato dei complessi meccanismi che si instaurano all'insorgere della patologia e delle specifiche funzioni proprie di ogni isoforma. Livelli ridotti della vitamina E totale, dei tocoferoli, dei tocotrienoli ed in particolare di α -, β -, γ -, δ -tocoferolo e di δ -tocotrienolo, potrebbero influire sul processo di neurodegenerazione, sia attraverso la ridotta attività antiossidante delle vitamine, sia per l'alterazione dei meccanismi molecolari specifici sui quali le isoforme intervengono.

I nostri risultati hanno evidenziato che i rapporti α -tocoferilquinone/ α -tocoferolo e 5-nitro- γ -tocoferolo/ γ -tocoferolo sierici sono significativamente più alti negli AD rispetto ai CT. Gli indici di stress ossidativo e nitrossidativo più elevati riscontrati nei pazienti AD, trovano conferma sia in studi in cui sono stati presi in considerazione questi indici a livello plasmatico [130], sia in lavori che li hanno analizzati a livello delle regioni corticali del cervello in pazienti AD rispetto a soggetti cognitivamente integri [251]. Gli alti valori di questi rapporti riscontrati nei pazienti AD, possono essere considerati lo specchio dell'alterato stato ossidativo che caratterizza la patologia.

I dati del nostro studio mostrano, inoltre, attraverso un'analisi di regressione logistica, che la vitamina E e in particolare le isoforme α - e γ -tocoferolo, tocoferolo totale e δ -tocotrienolo sono associate ad un minore rischio di sviluppare AD, mentre i rapporti α -tocoferilquinone/ α -tocoferolo e 5-nitro- γ -tocoferolo/ γ -tocoferolo sono correlati ad un aumentato rischio di sviluppare la patologia, indipendentemente da fattori confondenti come il genere, l'età, l'attitudine al fumo e il genotipo dell'apoE.

In letteratura è stato osservato che il rischio di sviluppare AD è associato a ridotti livelli di tocoferoli totale, tocotrienoli totali e vitamina E totale ed ad aumentati valori dei rapporti α -tocoferilquinone/ α -tocoferolo e 5-nitro- γ -tocoferolo/ γ -tocoferolo [130, 132, 133, 253]. I risultati ottenuti dal nostro studio hanno permesso di approfondire il ruolo della vitamina E nell'AD dimostrando che ci sono isoforme, nello specifico α - e γ -tocoferolo e δ -tocotrienolo che, per le

loro peculiari funzioni, sono maggiormente implicate nella protezione dal rischio di sviluppare la patologia.

In questo studio abbiamo successivamente valutato i livelli sierici della vitamina E in rapporto al BMI, indicativo dello stato nutrizionale, e all'attitudine al fumo, indicativo dello stile di vita, dei soggetti e non sono state osservate correlazioni significative sia considerando la popolazione generale, sia suddividendola in base alla patologia.

Anche in questo caso, in letteratura i dati sono contrastanti. È stata dimostrata un'associazione tra il BMI e il γ -tocoferolo [254], ma non con l' α -tocoferolo [254, 255] e ad oggi non sono presenti dati sui tocotrienoli. Anche gli studi effettuati sulla vitamina E nei fumatori hanno prodotto risultati inconsistenti. I livelli plasmatici di α - e γ -tocoferolo in soggetti fumatori sono simili rispetto ai non fumatori [256].

Abbiamo effettuato, inoltre, l'analisi dei livelli sierici della vitamina E in rapporto ai principali parametri correlati all'AD, come gli indici di valutazione dello stato cognitivo e funzionale e il genotipo dell'apolipoproteina E (apoE). Non sono state osservate correlazioni significative tra le vitamine e il MMSE sia nel gruppo dei pazienti AD, sia nei CT. In letteratura, se da un lato è stata dimostrata una correlazione positiva tra i livelli sierici di vitamina E e la valutazione dello stato cognitivo effettuata attraverso il MMSE [257], altri studi non hanno osservato questa relazione [258].

Il genotipo $\epsilon 4$ dell'apoE è associato ad una maggiore predisposizione all'insorgenza dell'AD [259], da tre volte per i portatori del genotipo $\epsilon 3/\epsilon 4$ a 14 volte per i portatori del genotipo $\epsilon 4/\epsilon 4$ [55] ed è, in generale, negativamente associato alla longevità [260]. Nella popolazione caucasica la frequenza dell'allele $\epsilon 4$ è del 14%, in Italia si abbassa al 6,3% [244].

La vitamina E è correlata al trasporto delle lipoproteine e l'apoE ha effetto sul loro metabolismo. Considerando che il genotipo dell'apoE potrebbe avere un impatto sui livelli della vitamina E, abbiamo valutato i livelli sierici delle sue isoforme suddividendo i soggetti in portatori e non portatori dell'allele $\epsilon 4$, nel gruppo dei pazienti affetti da AD. Abbiamo osservato bassi livelli sierici delle

isoforme della vitamina E nei soggetti portatori dell'allele $\epsilon 4$, con differenze statisticamente significative osservate solo per i livelli di α - e γ -tocoferolo.

Numerosi lavori hanno indagato l'influenza del genotipo dell'apoE sui livelli plasmatici di vitamina E. Se da una parte studi non hanno mostrato differenze nei livelli di vitamina E nei differenti genotipi dell'apoE in un gruppo di soggetti con decadimento cognitivo [238, 261, 262], in altri lavori sono stati osservati bassi livelli di α -tocoferolo cerebrali in pazienti portatori dell'allele $\epsilon 4$ dell'apoE [263]. È stata, inoltre, osservata un'alterazione nell'*uptake* e nella ritenzione dell' α -tocoferolo in differenti aree del cervello in modelli *knockout* per il gene dell'apoE, suggerendo un effetto diretto dell'apoE sul metabolismo dell' α -tocoferolo nel cervello [264].

L'apoE è la chiave regolatoria del metabolismo dei lipidi e del colesterolo. La presenza dell'allele $\epsilon 4$ contribuisce all'aumento del rischio di sviluppare malattie neurodegenerative attraverso l'aumento dell'infiammazione cronica, l'attivazione di fattori di rischio trascrizionali che regolano i processi ossidativi e la diminuzione del riparo neuronale [263]. Il genotipo $\epsilon 4$ è associato ad una bassa ritenzione di vitamina E nei tessuti periferici. Gli studi sono stati effettuati prevalentemente sull' α -tocoferolo, ma il γ -tocoferolo potrebbe avere un'influenza simile. I bassi livelli di α -tocoferolo nei pazienti AD portatori dell'allele $\epsilon 4$ potrebbero essere dovuti ad un alterato metabolismo delle lipoproteine che comporta un'aumentata ritenzione della vitamina E, una diminuzione dell'espressione dei recettori delle lipoproteine con conseguente ostacolo all'*uptake* cellulare di vitamina E ed un'aumentata degradazione dei tocoferoli. I bassi livelli di vitamina E potrebbero quindi contribuire all'aumento del rischio di sviluppare AD osservato nei portatori dell'allele $\epsilon 4$ dell'apoE [263].

I nostri dati riportano anche un aumento significativo dei rapporti α -tocoferilquinone/ α -tocoferolo e 5-nitro- γ -tocoferolo/ γ -tocoferolo nei pazienti AD portatori dell'allele $\epsilon 4$ dell'apoE rispetto ai non portatori. Pazienti AD portatori dell'allele $\epsilon 4$ presentano un aggravato danno ossidativo e una diminuzione dell'attività degli enzimi antiossidanti a livello cerebrale rispetto ai non portatori [265, 266]. Questo potrebbe spiegare i valori più elevati dei rapporti α -

tocoferilquinone/ α -tocoferolo e 5-nitro- γ -tocoferolo/ γ -tocoferolo osservato nei pazienti AD portatori dell'allele $\epsilon 4$.

Il nostro lavoro si è successivamente focalizzato sull'analisi di quale possa essere il ruolo delle isoforme della vitamina E sul rischio di sviluppare AD. Prendendo in considerazione il fatto che un'accelerata senescenza cellulare è stata correlata allo sviluppo dell'AD e che le vitamine, con la loro attività antiossidante e antinfiammatoria hanno un ruolo protettivo nei confronti dei telomeri, abbiamo valutato se i bassi livelli di vitamine che si osservano nei pazienti affetti da AD potessero riflettersi in un'alterazione della lunghezza telomerica e dell'attività telomerasica e, quindi, della senescenza cellulare.

Non sono state osservate differenze statisticamente significative nella lunghezza telomerica e nell'attività telomerasica tra soggetti AD e CT.

Sebbene studi abbiano dimostrato che lo stress ossidativo e l'infiammazione, potenziali cause eziopatogenetiche dell'AD, siano implicati anche nell'accorciamento dei telomeri, il ruolo della lunghezza telomerica nell'AD non è chiaro. Alcuni osservano telomeri più corti in AD rispetto ai CT, una correlazione positiva della lunghezza telomerica con le performance cognitive e una correlazione negativa con i livelli di citochine pro-infiammatorie, suggerendo che l'accorciamento telomerico potrebbe essere associato ad una disfunzione immunitaria e contribuire quindi alla patogenesi dell'AD [196, 197]. Al contrario, altri studi riportano una lunghezza telomerica simile tra AD e CT [200-202, 267]. L'attività telomerasica sembra essere aumentata nei pazienti affetti da AD [268].

Inoltre, dato che è stato dimostrato che la terapia con le statine potrebbe avere effetti benefici sulla biologia dei telomeri nel prevenire l'accorciamento telomerico in soggetti sani [225] e alterare l'attività telomerasica [225], abbiamo verificato che non ci fossero differenze significative nel numero di pazienti in terapia con statine tra AD e CT, che avrebbero potuto alterare i nostri risultati. Abbiamo osservato, poi, che, nonostante i soggetti in trattamento farmacologico con statine, mostrino una lunghezza telomerica maggiore e un'attività telomerasica più alta rispetto ai soggetti non in trattamento, non sono state evidenziate differenze statisticamente significative.

Abbiamo studiato le possibili correlazioni tra i parametri principalmente correlati all'AD (MMSE e genotipo dell'apoE) e lunghezza telomerica e attività telomerasica e, suddividendo la popolazione in base alla patologia, non abbiamo osservato alcuna relazione. Tedone et al. hanno mostrato una correlazione positiva nei pazienti AD tra MMSE e lunghezza telomerica [202], ma altri studi hanno osservato che alti punteggi al MMSE sono associati a telomeri più corti, mentre l'attività telomerasica sembra essere inversamente correlata con il MMSE [268].

Inoltre, in letteratura sono stati osservati telomeri più lunghi in soggetti portatori dell'allele ϵ 4 dell'apoE, ma anche la mancanza di associazione tra queste variabili [269].

Studi associano il fumo, sia a telomeri più corti [270] che a telomeri più lunghi [271] e ad un'aumentata attività telomerasica [271]. I nostri dati non hanno evidenziato nessuna differenza considerando lunghezza telomerica e attività telomerasica in base all'attitudine al fumo.

Analizzando la potenziale correlazione tra i livelli delle isoforme di vitamine E e lunghezza telomerica e attività telomerasica nella popolazione generale, si osserva una correlazione positiva statisticamente significativa della lunghezza telomerica con i tocoferoli totali e con la vitamina E totale, indipendentemente dalla diagnosi, dal genere, dall'età, dall'attitudine al fumo e dalla terapia con statine. Non sono emerse correlazioni con l'attività telomerasica. Considerando singolarmente il gruppo degli AD e dei CT non si osservano correlazioni significative tra le vitamine e i marcatori di senescenza. Questo potrebbe essere dovuto alla diminuzione della numerosità del campione.

Possiamo quindi ipotizzare che i bassi livelli della vitamina E possano accelerare la senescenza cellulare e che questo meccanismo esista a prescindere dalla presenza di uno stato patologico in corso.

CONCLUSIONI

Il nostro studio conferma quindi il ruolo neuroprotettivo della famiglia della vitamina E nella neurodegenerazione. I risultati rafforzano l'ipotesi che ciascuna isoforma di vitamina E svolga un ruolo unico nella salute e che la sola valutazione dell' α -tocoferolo non può fornire una valutazione accurata della vitamina E nell'uomo.

Lo studio delle diverse isoforme della vitamina E ha infatti fatto emergere che α - e γ -tocoferolo e δ -tocotrienolo sono maggiormente implicate nella protezione dal rischio di sviluppare AD.

Alla luce dei risultati ottenuti possiamo, inoltre, ipotizzare un potenziale il ruolo della vitamina E nei meccanismi legati alla senescenza cellulare, mostrato dalla correlazione tra i bassi livelli di questa vitamina e l'accorciamento telomerico, e che questo meccanismo esiste a prescindere dalla presenza di uno stato patologico.

BIBLIOGRAFIA

1. Loeb, C. and E. Favale, *"Neurologia di Fazio, Loeb"*. 4 ed: Società Editrice Universo.
2. Goldman, J.S., et al., *Genetic counseling and testing for Alzheimer disease: joint practice guidelines of the American College of Medical Genetics and the National Society of Genetic Counselors*. Genet Med, 2011. **13**(6): p. 597-605.
3. Du, X., X. Wang, and M. Geng, *Alzheimer's disease hypothesis and related therapies*. Translational neurodegeneration, 2018. **7**: p. 2.
4. Paul, L., *Diet, nutrition and telomere length*. The Journal of nutritional biochemistry, 2011. **22**(10): p. 895-901.
5. Ostan, R., et al., *Gender, aging and longevity in humans: an update of an intriguing/neglected scenario paving the way to a gender-specific medicine*. Clinical science, 2016. **130**(19): p. 1711-25.
6. Van Oyen, H., et al., *Gender differences in healthy life years within the EU: an exploration of the "health-survival" paradox*. International journal of public health, 2013. **58**(1): p. 143-55.
7. Arosio, B., et al., *Cognitive status in the oldest old and centenarians: a condition crucial for quality of life methodologically difficult to assess*. Mechanisms of ageing and development, 2017. **165**(Pt B): p. 185-194.
8. Haroutunian, V., et al., *Neurofibrillary tangles in nondemented elderly subjects and mild Alzheimer disease*. Arch Neurol, 1999. **56**(6): p. 713-8.
9. Terry and E. Masliah, *Structure-function correlations in Alzheimer's disease*1990.
10. Tanzi, R.E., et al., *Amyloid beta protein gene: cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus*. Science, 1987. **235**(4791): p. 880-4.
11. Bush, A.I., et al., *The amyloid precursor protein of Alzheimer's disease is released by human platelets*. J Biol Chem, 1990. **265**(26): p. 15977-83.
12. Borroni, B., et al., *Blood cell markers in Alzheimer Disease: Amyloid Precursor Protein form ratio in platelets*. Exp Gerontol, 2010. **45**(1): p. 53-6.
13. Small, S.A. and K. Duff, *Linking Abeta and tau in late-onset Alzheimer's disease: a dual pathway hypothesis*. Neuron, 2008. **60**(4): p. 534-42.
14. Struble, R.G., et al., *Is brain amyloid production a cause or a result of dementia of the Alzheimer's type?*J Alzheimers Dis, 2010. **22**(2): p. 393-9.

15. van Helmond, Z., et al., *Higher soluble amyloid beta concentration in frontal cortex of young adults than in normal elderly or Alzheimer's disease*. Brain Pathol, 2010. **20**(4): p. 787-93.
16. Morley, J.E., et al., *A physiological role for amyloid-beta protein: enhancement of learning and memory*. Journal of Alzheimer's disease : JAD, 2010. **19**(2): p. 441-9.
17. Tampellini, D., et al., *Synaptic activity reduces intraneuronal Abeta, promotes APP transport to synapses, and protects against Abeta-related synaptic alterations*. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 2009. **29**(31): p. 9704-13.
18. Bennett, D.A., et al., *Neuropathology of older persons without cognitive impairment from two community-based studies*. Neurology, 2006. **66**(12): p. 1837-44.
19. Aizenstein, H.J., et al., *Frequent amyloid deposition without significant cognitive impairment among the elderly*. Archives of neurology, 2008. **65**(11): p. 1509-17.
20. Holmes, C., et al., *Long-term effects of Abeta42 immunisation in Alzheimer's disease: follow-up of a randomised, placebo-controlled phase I trial*. Lancet, 2008. **372**(9634): p. 216-23.
21. Salloway, S., et al., *A phase 2 multiple ascending dose trial of bapineuzumab in mild to moderate Alzheimer disease*. Neurology, 2009. **73**(24): p. 2061-70.
22. Bird, T.D., *Genetic aspects of Alzheimer disease*. Genet Med, 2008. **10**(4): p. 231-9.
23. Musiek, E.S. and D.M. Holtzman, *Three dimensions of the amyloid hypothesis: time, space and 'wingmen'*. Nature neuroscience, 2015. **18**(6): p. 800-6.
24. Mandelkow, E.M., et al., *Tau domains, phosphorylation, and interactions with microtubules*. Neurobiol Aging, 1995. **16**(3): p. 355-62; discussion 362-3.
25. Cagnin, A., et al., *In-vivo measurement of activated microglia in dementia*. Lancet, 2001. **358**(9280): p. 461-7.
26. Sala, G., et al., *Peripheral cytokine release in Alzheimer patients: correlation with disease severity*. Neurobiol Aging, 2003. **24**(7): p. 909-14.
27. Bauer, J., et al., *Interleukin-6 and alpha-2-macroglobulin indicate an acute-phase state in Alzheimer's disease cortices*. FEBS Lett, 1991. **285**(1): p. 111-4.

28. Griffin, W.S., et al., *Brain interleukin 1 and S-100 immunoreactivity are elevated in Down syndrome and Alzheimer disease*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1989. **86**(19): p. 7611-5.
29. Akiyama, H., et al., *Inflammation and Alzheimer's disease*. Neurobiol Aging, 2000. **21**(3): p. 383-421.
30. Song, W., et al., *Alzheimer's disease-associated TREM2 variants exhibit either decreased or increased ligand-dependent activation*. Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association, 2017. **13**(4): p. 381-387.
31. Colonna, M. and Y. Wang, *TREM2 variants: new keys to decipher Alzheimer disease pathogenesis*. Nature reviews. Neuroscience, 2016. **17**(4): p. 201-7.
32. Bolos, M., J.R. Perea, and J. Avila, *Alzheimer's disease as an inflammatory disease*. Biomolecular concepts, 2017. **8**(1): p. 37-43.
33. Hong, S., L. Dissing-Olesen, and B. Stevens, *New insights on the role of microglia in synaptic pruning in health and disease*. Current opinion in neurobiology, 2016. **36**: p. 128-34.
34. Paolicelli, R.C., et al., *Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development*. Science, 2011. **333**(6048): p. 1456-8.
35. Casati, M., et al., *Increased expression of TREM2 in peripheral cells from mild cognitive impairment patients that progress into Alzheimer's disease*. European journal of neurology, 2018.
36. Swomley, A.M. and D.A. Butterfield, *Oxidative stress in Alzheimer disease and mild cognitive impairment: evidence from human data provided by redox proteomics*. Archives of toxicology, 2015. **89**(10): p. 1669-80.
37. Valko, M., et al., *Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease*. The international journal of biochemistry & cell biology, 2007. **39**(1): p. 44-84.
38. Bhat, A.H., et al., *Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neurodegenerative diseases: a mechanistic insight*. Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie, 2015. **74**: p. 101-10.
39. Friedland-Leuner, K., et al., *Mitochondrial dysfunction: cause and consequence of Alzheimer's disease*. Progress in molecular biology and translational science, 2014. **127**: p. 183-210.
40. Muller, W.E., et al., *Mitochondrial dysfunction: common final pathway in brain aging and Alzheimer's disease--therapeutic aspects*. Molecular neurobiology, 2010. **41**(2-3): p. 159-71.

41. Butterfield, D.A., et al., *Roles of amyloid beta-peptide-associated oxidative stress and brain protein modifications in the pathogenesis of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment*. Free radical biology & medicine, 2007. **43**(5): p. 658-77.
42. Cheignon, C., et al., *Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease*. Redox biology, 2018. **14**: p. 450-464.
43. Sultana, R. and D.A. Butterfield, *Redox proteomics studies of in vivo amyloid beta-peptide animal models of Alzheimer's disease: Insight into the role of oxidative stress*. Proteomics. Clinical applications, 2008. **2**(5): p. 685-96.
44. Nunomura, A., et al., *The earliest stage of cognitive impairment in transition from normal aging to Alzheimer disease is marked by prominent RNA oxidation in vulnerable neurons*. Journal of neuropathology and experimental neurology, 2012. **71**(3): p. 233-41.
45. Floyd, R.A. and K. Hensley, *Oxidative stress in brain aging. Implications for therapeutics of neurodegenerative diseases*. Neurobiology of aging, 2002. **23**(5): p. 795-807.
46. Caldwell, C.C., J. Yao, and R.D. Brinton, *Targeting the prodromal stage of Alzheimer's disease: bioenergetic and mitochondrial opportunities*. Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics, 2015. **12**(1): p. 66-80.
47. Daulatzai, M.A., *Cerebral hypoperfusion and glucose hypometabolism: Key pathophysiological modulators promote neurodegeneration, cognitive impairment, and Alzheimer's disease*. Journal of neuroscience research, 2017. **95**(4): p. 943-972.
48. Blass, J.P., G.E. Gibson, and S. Hoyer, *The role of the metabolic lesion in Alzheimer's disease*. J Alzheimers Dis, 2002. **4**(3): p. 225-32.
49. Banks, W.A., *The blood-brain barrier in neuroimmunology: Tales of separation and assimilation*. Brain, behavior, and immunity, 2015. **44**: p. 1-8.
50. Erickson, M.A., K. Dohi, and W.A. Banks, *Neuroinflammation: a common pathway in CNS diseases as mediated at the blood-brain barrier*. Neuroimmunomodulation, 2012. **19**(2): p. 121-30.
51. Liu, M., et al., *Telomere Shortening in Alzheimer's Disease Patients*. Annals of clinical and laboratory science, 2016. **46**(3): p. 260-5.
52. Collins, S.M., M. Surette, and P. Bercik, *The interplay between the intestinal microbiota and the brain*. Nature reviews. Microbiology, 2012. **10**(11): p. 735-42.

53. Cryan, J.F. and T.G. Dinan, *Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour*. Nature reviews. Neuroscience, 2012. **13**(10): p. 701-12.
54. Sampson, T.R. and S.K. Mazmanian, *Control of brain development, function, and behavior by the microbiome*. Cell host & microbe, 2015. **17**(5): p. 565-76.
55. Farrer, L.A., et al., *Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium*. JAMA, 1997. **278**(16): p. 1349-56.
56. Katzman, R., *Education and the prevalence of dementia and Alzheimer's disease*. Neurology, 1993. **43**(1): p. 13-20.
57. Stern, Y., et al., *Relationship between lifetime occupation and parietal flow: implications for a reserve against Alzheimer's disease pathology*. Neurology, 1995. **45**(1): p. 55-60.
58. Del Ser, T., et al., *An autopsy-verified study of the effect of education on degenerative dementia*. Brain, 1999. **122 (Pt 12)**: p. 2309-19.
59. Reitz, C., C. Brayne, and R. Mayeux, *Epidemiology of Alzheimer disease*. Nature reviews. Neurology, 2011. **7**(3): p. 137-52.
60. Kalaria, R.N., *Vascular basis for brain degeneration: faltering controls and risk factors for dementia*. Nutrition reviews, 2010. **68 Suppl 2**: p. S74-87.
61. Deane, R., Z. Wu, and B.V. Zlokovic, *RAGE (yin) versus LRP (yang) balance regulates alzheimer amyloid beta-peptide clearance through transport across the blood-brain barrier*. Stroke, 2004. **35**(11 Suppl 1): p. 2628-31.
62. Luchsinger, J.A., et al., *Diabetes mellitus and risk of Alzheimer's disease and dementia with stroke in a multiethnic cohort*. American journal of epidemiology, 2001. **154**(7): p. 635-41.
63. Ott, A., et al., *Diabetes mellitus and the risk of dementia: The Rotterdam Study*. Neurology, 1999. **53**(9): p. 1937-42.
64. Craft, S., *Insulin resistance and Alzheimer's disease pathogenesis: potential mechanisms and implications for treatment*. Current Alzheimer research, 2007. **4**(2): p. 147-52.
65. Lieb, W., et al., *Association of plasma leptin levels with incident Alzheimer disease and MRI measures of brain aging*. JAMA, 2009. **302**(23): p. 2565-72.
66. Gustafson, D., et al., *An 18-year follow-up of overweight and risk of Alzheimer disease*. Archives of internal medicine, 2003. **163**(13): p. 1524-8.

67. Razay, G. and A. Vreugdenhil, *Obesity in middle age and future risk of dementia: midlife obesity increases risk of future dementia*. *BMJ*, 2005. **331**(7514): p. 455; author reply 455.
68. Stewart, R., et al., *A 32-year prospective study of change in body weight and incident dementia: the Honolulu-Asia Aging Study*. *Archives of neurology*, 2005. **62**(1): p. 55-60.
69. Raffaitin, C., et al., *Metabolic syndrome and risk for incident Alzheimer's disease or vascular dementia: the Three-City Study*. *Diabetes care*, 2009. **32**(1): p. 169-74.
70. Solfrizzi, V., et al., *Metabolic syndrome and the risk of vascular dementia: the Italian Longitudinal Study on Ageing*. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 2010. **81**(4): p. 433-40.
71. Yaffe, K., et al., *The metabolic syndrome and development of cognitive impairment among older women*. *Archives of neurology*, 2009. **66**(3): p. 324-8.
72. Durazzo, T.C., N. Mattsson, and M.W. Weiner, *Smoking and increased Alzheimer's disease risk: a review of potential mechanisms*. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association*, 2014. **10**(3 Suppl): p. S122-45.
73. Li, J. and J. Cheng, *Apolipoprotein E4 exacerbates ethanol-induced neurotoxicity through augmentation of oxidative stress and apoptosis in N2a-APP cells*. *Neuroscience letters*, 2018. **665**: p. 1-6.
74. Barnes, D.E. and K. Yaffe, *The projected effect of risk factor reduction on Alzheimer's disease prevalence*. *The Lancet. Neurology*, 2011. **10**(9): p. 819-28.
75. Daviglus, M.L., et al., *Risk factors and preventive interventions for Alzheimer disease: state of the science*. *Archives of neurology*, 2011. **68**(9): p. 1185-90.
76. Ersche, K.D., et al., *Abnormal structure of frontostriatal brain systems is associated with aspects of impulsivity and compulsivity in cocaine dependence*. *Brain : a journal of neurology*, 2011. **134**(Pt 7): p. 2013-24.
77. Etgen, T., et al., *Mild cognitive impairment and dementia: the importance of modifiable risk factors*. *Deutsches Arzteblatt international*, 2011. **108**(44): p. 743-50.
78. Scarmeas, N., et al., *Mediterranean diet and risk for Alzheimer's disease*. *Annals of neurology*, 2006. **59**(6): p. 912-21.
79. Scarmeas, N., et al., *Physical activity, diet, and risk of Alzheimer disease*. *JAMA*, 2009. **302**(6): p. 627-37.

80. Huang, T.L., et al., *Benefits of fatty fish on dementia risk are stronger for those without APOE epsilon4*. *Neurology*, 2005. **65**(9): p. 1409-14.
81. Kalmijn, S., et al., *Dietary fat intake and the risk of incident dementia in the Rotterdam Study*. *Annals of neurology*, 1997. **42**(5): p. 776-82.
82. Schaefer, E.J., et al., *Plasma phosphatidylcholine docosahexaenoic acid content and risk of dementia and Alzheimer disease: the Framingham Heart Study*. *Archives of neurology*, 2006. **63**(11): p. 1545-50.
83. Roberts, R.O., et al., *Polyunsaturated fatty acids and reduced odds of MCI: the Mayo Clinic Study of Aging*. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 2010. **21**(3): p. 853-65.
84. Solfrizzi, V., et al., *Dietary intake of unsaturated fatty acids and age-related cognitive decline: a 8.5-year follow-up of the Italian Longitudinal Study on Aging*. *Neurobiology of aging*, 2006. **27**(11): p. 1694-704.
85. Engelhart, M.J., et al., *Dietary intake of antioxidants and risk of Alzheimer disease*. *JAMA*, 2002. **287**(24): p. 3223-9.
86. Masaki, K.H., et al., *Association of vitamin E and C supplement use with cognitive function and dementia in elderly men*. *Neurology*, 2000. **54**(6): p. 1265-72.
87. Morris, M.C., et al., *Dietary intake of antioxidant nutrients and the risk of incident Alzheimer disease in a biracial community study*. *JAMA*, 2002. **287**(24): p. 3230-7.
88. Engelhart, M.J., et al., *Diet and risk of dementia: Does fat matter?: The Rotterdam Study*. *Neurology*, 2002. **59**(12): p. 1915-21.
89. Abbott, R.D., et al., *Walking and dementia in physically capable elderly men*. *JAMA*, 2004. **292**(12): p. 1447-53.
90. Colcombe, S. and A.F. Kramer, *Fitness effects on the cognitive function of older adults: a meta-analytic study*. *Psychological science*, 2003. **14**(2): p. 125-30.
91. Scarmeas, N., et al., *Physical activity and Alzheimer disease course*. *Am J Geriatr Psychiatry*, 2011. **19**(5): p. 471-81.
92. *Diagnostic and Statistical manual of mental disorders 4ed1994*, Washington: American Psychiatric Association.
93. McKhann, G., et al., *Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease*. *Neurology*, 1984. **34**(7): p. 939-44.

94. Dubois, B., et al., *Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria*. Lancet Neurol, 2007. **6**(8): p. 734-46.
95. Dubois, B., et al., *Revising the definition of Alzheimer's disease: a new lexicon*. The Lancet. Neurology, 2010. **9**(11): p. 1118-27.
96. Folstein, M.F., S.E. Folstein, and P.R. McHugh, *"Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician*. J Psychiatr Res, 1975. **12**(3): p. 189-98.
97. Katz, S., et al., *Studies of Illness in the Aged. The Index of Adl: A Standardized Measure of Biological and Psychosocial Function*. JAMA, 1963. **185**: p. 914-9.
98. Lawton, M.P. and E.M. Brody, *Assessment of older people: self-maintaining and instrumental activities of daily living*. Gerontologist, 1969. **9**(3): p. 179-86.
99. Bourdel-Marchasson, I., et al., *Antioxidant defences and oxidative stress markers in erythrocytes and plasma from normally nourished elderly Alzheimer patients*. Age and ageing, 2001. **30**(3): p. 235-41.
100. Rinaldi, P., et al., *Plasma antioxidants are similarly depleted in mild cognitive impairment and in Alzheimer's disease*. Neurobiology of aging, 2003. **24**(7): p. 915-9.
101. Perrig, W.J., P. Perrig, and H.B. Stahelin, *The relation between antioxidants and memory performance in the old and very old*. Journal of the American Geriatrics Society, 1997. **45**(6): p. 718-24.
102. Jarvis, C.I., et al., *Retinoic acid receptor-alpha signalling antagonizes both intracellular and extracellular amyloid-beta production and prevents neuronal cell death caused by amyloid-beta*. The European journal of neuroscience, 2010. **32**(8): p. 1246-55.
103. Koryakina, A., et al., *Regulation of secretases by all-trans-retinoic acid*. The FEBS journal, 2009. **276**(9): p. 2645-55.
104. Prinzen, C., et al., *Genomic structure and functional characterization of the human ADAM10 promoter*. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 2005. **19**(11): p. 1522-4.
105. Ono, K., et al., *Vitamin A exhibits potent anti-amyloidogenic and fibril-destabilizing effects in vitro*. Experimental neurology, 2004. **189**(2): p. 380-92.
106. Takasaki, J., et al., *Vitamin A has anti-oligomerization effects on amyloid-beta in vitro*. Journal of Alzheimer's disease : JAD, 2011. **27**(2): p. 271-80.

107. Kipen, E., et al., *Bone density, vitamin D nutrition, and parathyroid hormone levels in women with dementia*. Journal of the American Geriatrics Society, 1995. **43**(10): p. 1088-91.
108. Mohajeri, M.H., B. Troesch, and P. Weber, *Inadequate supply of vitamins and DHA in the elderly: implications for brain aging and Alzheimer-type dementia*. Nutrition, 2015. **31**(2): p. 261-75.
109. Sato, Y., T. Asoh, and K. Oizumi, *High prevalence of vitamin D deficiency and reduced bone mass in elderly women with Alzheimer's disease*. Bone, 1998. **23**(6): p. 555-7.
110. Balion, C., et al., *Vitamin D, cognition, and dementia: a systematic review and meta-analysis*. Neurology, 2012. **79**(13): p. 1397-405.
111. Littlejohns, T.J., et al., *Vitamin D and the risk of dementia and Alzheimer disease*. Neurology, 2014. **83**(10): p. 920-8.
112. Hooshmand, B., et al., *Vitamin D in relation to cognitive impairment, cerebrospinal fluid biomarkers, and brain volumes*. The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences, 2014. **69**(9): p. 1132-8.
113. Lee, Y.H., J.H. Kim, and G.G. Song, *Vitamin D receptor polymorphisms and susceptibility to Parkinson's disease and Alzheimer's disease: a meta-analysis*. Neurological sciences : official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology, 2014. **35**(12): p. 1947-53.
114. Wang, L., et al., *Vitamin D receptor and Alzheimer's disease: a genetic and functional study*. Neurobiology of aging, 2012. **33**(8): p. 1844 e1-9.
115. Keeney, J.T. and D.A. Butterfield, *Vitamin D deficiency and Alzheimer disease: Common links*. Neurobiology of disease, 2015. **84**: p. 84-98.
116. Presse, N., et al., *Low vitamin K intakes in community-dwelling elders at an early stage of Alzheimer's disease*. Journal of the American Dietetic Association, 2008. **108**(12): p. 2095-9.
117. Sato, Y., et al., *Vitamin K deficiency and osteopenia in elderly women with Alzheimer's disease*. Archives of physical medicine and rehabilitation, 2005. **86**(3): p. 576-81.
118. Huy, P.D., et al., *In silico and in vitro characterization of anti-amyloidogenic activity of vitamin K3 analogues for Alzheimer's disease*. Biochimica et biophysica acta, 2013. **1830**(4): p. 2960-9.
119. Evans, H.M. and K.S. Bishop, *On the Existence of a Hitherto Unrecognized Dietary Factor Essential for Reproduction*. Science, 1922. **56**(1458): p. 650-1.

120. Granados, H. and H. Dam, *On the histochemical relationship between peroxidation and the yellow-brown pigment in the adipose tissue of vitamin E-deficient rats*. Acta pathologica et microbiologica Scandinavica, 1950. **27**(4): p. 591-8.
121. Harris, P.L. and N.D. Embree, *Quantitative Consideration of the Effect of Polyunsaturated Fatty Acid Content of the Diet Upon the Requirements for Vitamin E*. The American journal of clinical nutrition, 1963. **13**: p. 385-92.
122. Sondergaard, E. and H. Dam, *Influence of the level of dietary linoleic acid on the amount of d-alpha-tocopherol acetate required for protection against encephalomalacia*. Zeitschrift fur Ernährungswissenschaft, 1966. **6**(4): p. 253-8.
123. Boccardi, V., et al., *Vitamin E family: Role in the pathogenesis and treatment of Alzheimer's disease*. Alzheimer's & dementia, 2016. **2**(3): p. 182-191.
124. Brigelius-Flohe, R., *Vitamin E: the shrew waiting to be tamed*. Free radical biology & medicine, 2009. **46**(5): p. 543-54.
125. Muller, L., K. Theile, and V. Bohm, *In vitro antioxidant activity of tocopherols and tocotrienols and comparison of vitamin E concentration and lipophilic antioxidant capacity in human plasma*. Molecular nutrition & food research, 2010. **54**(5): p. 731-42.
126. Mangialasche, F., et al., *Lymphocytic mitochondrial aconitase activity is reduced in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment*. Journal of Alzheimer's disease : JAD, 2015. **44**(2): p. 649-60.
127. Mangialasche, F., et al., *Biomarkers of oxidative and nitrosative damage in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment*. Ageing research reviews, 2009. **8**(4): p. 285-305.
128. Picco, A., et al., *Plasma antioxidants and brain glucose metabolism in elderly subjects with cognitive complaints*. European journal of nuclear medicine and molecular imaging, 2014. **41**(4): p. 764-75.
129. Lopes da Silva, S., et al., *Plasma nutrient status of patients with Alzheimer's disease: Systematic review and meta-analysis*. Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association, 2014. **10**(4): p. 485-502.
130. Mangialasche, F., et al., *Tocopherols and tocotrienols plasma levels are associated with cognitive impairment*. Neurobiology of aging, 2012. **33**(10): p. 2282-90.

131. Li, F.J., L. Shen, and H.F. Ji, *Dietary intakes of vitamin E, vitamin C, and beta-carotene and risk of Alzheimer's disease: a meta-analysis*. Journal of Alzheimer's disease : JAD, 2012. **31**(2): p. 253-8.
132. Mangialasche, F., et al., *High plasma levels of vitamin E forms and reduced Alzheimer's disease risk in advanced age*. Journal of Alzheimer's disease : JAD, 2010. **20**(4): p. 1029-37.
133. Morris, M.C., et al., *Relation of the tocopherol forms to incident Alzheimer disease and to cognitive change*. The American journal of clinical nutrition, 2005. **81**(2): p. 508-14.
134. Grundman, M., *Vitamin E and Alzheimer disease: the basis for additional clinical trials*. The American journal of clinical nutrition, 2000. **71**(2): p. 630S-636S.
135. Dysken, M.W., et al., *Effect of vitamin E and memantine on functional decline in Alzheimer disease: the TEAM-AD VA cooperative randomized trial*. JAMA, 2014. **311**(1): p. 33-44.
136. Galasko, D.R., et al., *Antioxidants for Alzheimer disease: a randomized clinical trial with cerebrospinal fluid biomarker measures*. Archives of neurology, 2012. **69**(7): p. 836-41.
137. Petersen, R.C., et al., *Vitamin E and donepezil for the treatment of mild cognitive impairment*. The New England journal of medicine, 2005. **352**(23): p. 2379-88.
138. Sung, S., et al., *Early vitamin E supplementation in young but not aged mice reduces Abeta levels and amyloid deposition in a transgenic model of Alzheimer's disease*. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 2004. **18**(2): p. 323-5.
139. Sinha, M., et al., *Multiple mechanisms of age-dependent accumulation of amyloid beta protein in rat brain: Prevention by dietary supplementation with N-acetylcysteine, alpha-lipoic acid and alpha-tocopherol*. Neurochemistry international, 2016. **95**: p. 92-9.
140. Wang, S.W., et al., *Alpha-tocopherol quinone ameliorates spatial memory deficits by reducing beta-amyloid oligomers, neuroinflammation and oxidative stress in transgenic mice with Alzheimer's disease*. Behavioural brain research, 2016. **296**: p. 109-117.

141. Dai, X., Y. Sun, and Z. Jiang, *Protective effects of vitamin E against oxidative damage induced by A β 1-40Cu(II) complexes*. Acta biochimica et biophysica Sinica, 2007. **39**(2): p. 123-30.
142. Qi, X.L., et al., *Oxidative stress induced by beta-amyloid peptide(1-42) is involved in the altered composition of cellular membrane lipids and the decreased expression of nicotinic receptors in human SH-SY5Y neuroblastoma cells*. Neurochemistry international, 2005. **46**(8): p. 613-21.
143. Rota, C., et al., *Dietary vitamin E modulates differential gene expression in the rat hippocampus: potential implications for its neuroprotective properties*. Nutritional neuroscience, 2005. **8**(1): p. 21-9.
144. Gohil, K., et al., *Gene expression profile of oxidant stress and neurodegeneration in transgenic mice deficient in alpha-tocopherol transfer protein*. Free radical biology & medicine, 2003. **35**(11): p. 1343-54.
145. Grimm, M.O., et al., *Vitamin E: Curse or Benefit in Alzheimer's Disease? A Systematic Investigation of the Impact of alpha-, gamma- and delta-Tocopherol on Ass Generation and Degradation in Neuroblastoma Cells*. The journal of nutrition, health & aging, 2015. **19**(6): p. 646-56.
146. Block, M.L., *NADPH oxidase as a therapeutic target in Alzheimer's disease*. BMC neuroscience, 2008. **9 Suppl 2**: p. S8.
147. Chu, J. and D. Pratico, *5-lipoxygenase as an endogenous modulator of amyloid beta formation in vivo*. Annals of neurology, 2011. **69**(1): p. 34-46.
148. Voronkov, M., S.P. Braithwaite, and J.B. Stock, *Phosphoprotein phosphatase 2A: a novel druggable target for Alzheimer's disease*. Future medicinal chemistry, 2011. **3**(7): p. 821-33.
149. Nohturfft, A., et al., *Regulated step in cholesterol feedback localized to budding of SCAP from ER membranes*. Cell, 2000. **102**(3): p. 315-23.
150. Fassbender, K., et al., *Simvastatin strongly reduces levels of Alzheimer's disease beta-amyloid peptides A β 42 and A β 40 in vitro and in vivo*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001. **98**(10): p. 5856-61.
151. Maulik, M., et al., *Role of cholesterol in APP metabolism and its significance in Alzheimer's disease pathogenesis*. Molecular neurobiology, 2013. **47**(1): p. 37-63.
152. Refolo, L.M., et al., *Hypercholesterolemia accelerates the Alzheimer's amyloid pathology in a transgenic mouse model*. Neurobiology of disease, 2000. **7**(4): p. 321-31.

153. Grimm, M.O., et al., *Independent inhibition of Alzheimer disease beta- and gamma-secretase cleavage by lowered cholesterol levels*. The Journal of biological chemistry, 2008. **283**(17): p. 11302-11.
154. Osenkowski, P., et al., *Direct and potent regulation of gamma-secretase by its lipid microenvironment*. The Journal of biological chemistry, 2008. **283**(33): p. 22529-40.
155. Cossec, J.C., et al., *Clathrin-dependent APP endocytosis and Abeta secretion are highly sensitive to the level of plasma membrane cholesterol*. Biochimica et biophysica acta, 2010. **1801**(8): p. 846-52.
156. Giraldo, E., et al., *Abeta and tau toxicities in Alzheimer's are linked via oxidative stress-induced p38 activation: protective role of vitamin E*. Redox biology, 2014. **2**: p. 873-7.
157. Nakashima, H., et al., *Effects of alpha-tocopherol on an animal model of tauopathies*. Free radical biology & medicine, 2004. **37**(2): p. 176-86.
158. Blackburn, E.H. and J.G. Gall, *A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in Tetrahymena*. Journal of molecular biology, 1978. **120**(1): p. 33-53.
159. Dahlman, D., F. Fyhrquist, and P.M. Nilsson, *[Telomeres, aging and life style--research with contradictory finding]*. Lakartidningen, 2010. **107**(48): p. 3053-5.
160. Shukla, S., et al., *Telomere--the twilight to immortality*. The Journal of the Association of Physicians of India, 2010. **58**: p. 553-60.
161. Sugimoto, K., *Telomere maintenance by DNA damage response machinery*. Seikagaku. The Journal of Japanese Biochemical Society, 2010. **82**(12): p. 1145-50.
162. Haber, J.E. and P.C. Thorburn, *Healing of broken linear dicentric chromosomes in yeast*. Genetics, 1984. **106**(2): p. 207-26.
163. McKenzie, K.E., C.B. Umbricht, and S. Sukumar, *Applications of telomerase research in the fight against cancer*. Molecular medicine today, 1999. **5**(3): p. 114-22.
164. Blackburn, E.H., *Structure and function of telomeres*. Nature, 1991. **350**(6319): p. 569-73.
165. de Lange, T., et al., *Structure and variability of human chromosome ends*. Molecular and cellular biology, 1990. **10**(2): p. 518-27.
166. Levy, M.Z., et al., *Telomere end-replication problem and cell aging*. Journal of molecular biology, 1992. **225**(4): p. 951-60.

167. Meyerson, M., *Role of telomerase in normal and cancer cells*. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology, 2000. **18**(13): p. 2626-34.
168. Calado, R.T. and N.S. Young, *Telomere diseases*. The New England journal of medicine, 2009. **361**(24): p. 2353-65.
169. Hayflick, L., *Recent advances in the cell biology of aging*. Mechanisms of ageing and development, 1980. **14**(1-2): p. 59-79.
170. Hayflick, L., *The cell biology of aging*. Clinics in geriatric medicine, 1985. **1**(1): p. 15-27.
171. Gottlieb, T.M. and M. Oren, *p53 and apoptosis*. Seminars in cancer biology, 1998. **8**(5): p. 359-68.
172. Guillouf, C., et al., *p53 involvement in control of G2 exit of the cell cycle: role in DNA damage-induced apoptosis*. Oncogene, 1995. **10**(11): p. 2263-70.
173. Zhu, H., M. Belcher, and P. van der Harst, *Healthy aging and disease: role for telomere biology?* Clinical science, 2011. **120**(10): p. 427-40.
174. Granger, M.P., W.E. Wright, and J.W. Shay, *Telomerase in cancer and aging*. Critical reviews in oncology/hematology, 2002. **41**(1): p. 29-40.
175. Allsopp, R.C., et al., *Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1992. **89**(21): p. 10114-8.
176. Harley, C.B., A.B. Futcher, and C.W. Greider, *Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts*. Nature, 1990. **345**(6274): p. 458-60.
177. Hastie, N.D., et al., *Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing*. Nature, 1990. **346**(6287): p. 866-8.
178. Wyatt, H.D., S.C. West, and T.L. Beattie, *InTERTpreting telomerase structure and function*. Nucleic acids research, 2010. **38**(17): p. 5609-22.
179. de Lange, T., *Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres*. Genes & development, 2005. **19**(18): p. 2100-10.
180. Young, N.S., *Telomere biology and telomere diseases: implications for practice and research*. Hematology. American Society of Hematology. Education Program, 2010. **2010**: p. 30-5.
181. Calado, R.T., *Telomeres and marrow failure*. Hematology. American Society of Hematology. Education Program, 2009: p. 338-43.

182. Mabruk, M.J. and C. O'Flatharta, *Telomerase: is it the future diagnostic and prognostic tool in human cancer?* Expert review of molecular diagnostics, 2005. **5**(6): p. 907-16.
183. Yui, J., C.P. Chiu, and P.M. Lansdorp, *Telomerase activity in candidate stem cells from fetal liver and adult bone marrow.* Blood, 1998. **91**(9): p. 3255-62.
184. Terrin, L., et al., *Relationship between tumor and plasma levels of hTERT mRNA in patients with colorectal cancer: implications for monitoring of neoplastic disease.* Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research, 2008. **14**(22): p. 7444-51.
185. Nakamura, T.M., et al., *Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human.* Science, 1997. **277**(5328): p. 955-9.
186. Zhang, A., et al., *Frequent amplification of the telomerase reverse transcriptase gene in human tumors.* Cancer research, 2000. **60**(22): p. 6230-5.
187. Sikand, K., D. Kaul, and N. Varma, *Receptor Ck-dependent signaling regulates hTERT gene transcription.* BMC cell biology, 2006. **7**: p. 2.
188. Chang, J.T., et al., *hTERT phosphorylation by PKC is essential for telomerase holoprotein integrity and enzyme activity in head neck cancer cells.* British journal of cancer, 2006. **94**(6): p. 870-8.
189. Ulaner, G.A., et al., *Tissue-specific alternate splicing of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) influences telomere lengths during human development.* International journal of cancer, 2001. **91**(5): p. 644-9.
190. Fillit, H.M., et al., *Achieving and maintaining cognitive vitality with aging.* Mayo Clinic proceedings, 2002. **77**(7): p. 681-96.
191. Mecocci, P., et al., *Brain Aging and Late-Onset Alzheimer's Disease: A Matter of Increased Amyloid or Reduced Energy?* Journal of Alzheimer's disease : JAD, 2018.
192. von Zglinicki, T., *Oxidative stress shortens telomeres.* Trends in biochemical sciences, 2002. **27**(7): p. 339-44.
193. Saretzki, G. and T. Von Zglinicki, *Replicative aging, telomeres, and oxidative stress.* Annals of the New York Academy of Sciences, 2002. **959**: p. 24-9.
194. Aviv, A., et al., *Menopause modifies the association of leukocyte telomere length with insulin resistance and inflammation.* The Journal of clinical endocrinology and metabolism, 2006. **91**(2): p. 635-40.

195. Mirabello, L., et al., *The association between leukocyte telomere length and cigarette smoking, dietary and physical variables, and risk of prostate cancer*. Aging cell, 2009. **8**(4): p. 405-13.
196. Honig, L.S., et al., *Shorter telomeres are associated with mortality in those with APOE epsilon4 and dementia*. Annals of neurology, 2006. **60**(2): p. 181-7.
197. Panossian, L.A., et al., *Telomere shortening in T cells correlates with Alzheimer's disease status*. Neurobiology of aging, 2003. **24**(1): p. 77-84.
198. Guan, J.Z., et al., *The Subtelomere of Short Telomeres is Hypermethylated in Alzheimer's Disease*. Aging and disease, 2012. **3**(2): p. 164-70.
199. Guan, J.Z., et al., *Analysis of telomere length and subtelomeric methylation of circulating leukocytes in women with Alzheimer's disease*. Aging clinical and experimental research, 2013. **25**(1): p. 17-23.
200. Moverare-Skrtic, S., et al., *Leukocyte telomere length (LTL) is reduced in stable mild cognitive impairment but low LTL is not associated with conversion to Alzheimer's disease: a pilot study*. Experimental gerontology, 2012. **47**(2): p. 179-82.
201. Takata, Y., et al., *Association between ApoE phenotypes and telomere erosion in Alzheimer's disease*. The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences, 2012. **67**(4): p. 330-5.
202. Tedone, E., et al., *Leukocyte Telomere Length in Alzheimer's Disease Patients with a Different Rate of Progression*. Journal of Alzheimer's disease : JAD, 2015. **46**(3): p. 761-9.
203. Boccardi, V., et al., *From cellular senescence to Alzheimer's disease: The role of telomere shortening*. Ageing research reviews, 2015. **22**: p. 1-8.
204. Blasco, M.A., *Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond*. Nature reviews. Genetics, 2005. **6**(8): p. 611-22.
205. Tomas-Loba, A., et al., *Telomerase reverse transcriptase delays aging in cancer-resistant mice*. Cell, 2008. **135**(4): p. 609-22.
206. Boccardi, V. and U. Herbig, *Telomerase gene therapy: a novel approach to combat aging*. EMBO molecular medicine, 2012. **4**(8): p. 685-7.
207. Klapper, W., T. Shin, and M.P. Mattson, *Differential regulation of telomerase activity and TERT expression during brain development in mice*. Journal of neuroscience research, 2001. **64**(3): p. 252-60.
208. Eitan, E., et al., *Telomerase expression in adult and old mouse Purkinje neurons*. Rejuvenation research, 2012. **15**(2): p. 206-9.

209. Eitan, E., et al., *Novel telomerase-increasing compound in mouse brain delays the onset of amyotrophic lateral sclerosis*. EMBO molecular medicine, 2012. **4**(4): p. 313-29.
210. Lee, J., et al., *Telomerase deficiency affects normal brain functions in mice*. Neurochemical research, 2010. **35**(2): p. 211-8.
211. Flanary, B.E. and W.J. Streit, *Effects of axotomy on telomere length, telomerase activity, and protein in activated microglia*. Journal of neuroscience research, 2005. **82**(2): p. 160-71.
212. Fu, W., et al., *The catalytic subunit of telomerase is expressed in developing brain neurons and serves a cell survival-promoting function*. Journal of molecular neuroscience : MN, 2000. **14**(1-2): p. 3-15.
213. Fu, W., et al., *Seizures and tissue injury induce telomerase in hippocampal microglial cells*. Experimental neurology, 2002. **178**(2): p. 294-300.
214. Spilsbury, A., et al., *The role of telomerase protein TERT in Alzheimer's disease and in tau-related pathology in vitro*. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 2015. **35**(4): p. 1659-74.
215. Flanary, B.E., et al., *Evidence that aging and amyloid promote microglial cell senescence*. Rejuvenation research, 2007. **10**(1): p. 61-74.
216. Franco, S., et al., *Telomeres and telomerase in Alzheimer's disease: epiphenomena or a new focus for therapeutic strategy?* Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association, 2006. **2**(3): p. 164-8.
217. Rolyan, H., et al., *Telomere shortening reduces Alzheimer's disease amyloid pathology in mice*. Brain : a journal of neurology, 2011. **134**(Pt 7): p. 2044-56.
218. Zhu, H., W. Fu, and M.P. Mattson, *The catalytic subunit of telomerase protects neurons against amyloid beta-peptide-induced apoptosis*. Journal of neurochemistry, 2000. **75**(1): p. 117-24.
219. Zhu, X., et al., *Neuronal CDK7 in hippocampus is related to aging and Alzheimer disease*. Neurobiology of aging, 2000. **21**(6): p. 807-13.
220. Wang, J., et al., *New insights in amyloid beta interactions with human telomerase*. Journal of the American Chemical Society, 2015. **137**(3): p. 1213-9.
221. Shiels, P.G., et al., *Accelerated telomere attrition is associated with relative household income, diet and inflammation in the pSoBid cohort*. PloS one, 2011. **6**(7): p. e22521.
222. Latifovic, L., et al., *The Influence of Alcohol Consumption, Cigarette Smoking, and Physical Activity on Leukocyte Telomere Length*. Cancer epidemiology,

- biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology, 2016. **25**(2): p. 374-80.
223. Soares-Miranda, L., et al., *Physical Activity, Physical Fitness, and Leukocyte Telomere Length: The Cardiovascular Health Study*. *Medicine and science in sports and exercise*, 2015. **47**(12): p. 2525-34.
224. Mundstock, E., et al., *Effect of obesity on telomere length: Systematic review and meta-analysis*. *Obesity*, 2015. **23**(11): p. 2165-74.
225. Boccardi, V., et al., *A new pleiotropic effect of statins in elderly: modulation of telomerase activity*. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 2013. **27**(9): p. 3879-85.
226. Tiainen, A.M., et al., *Leukocyte telomere length and its relation to food and nutrient intake in an elderly population*. *European journal of clinical nutrition*, 2012. **66**(12): p. 1290-4.
227. Zota, A.R., et al., *Associations of cadmium and lead exposure with leukocyte telomere length: findings from National Health and Nutrition Examination Survey, 1999-2002*. *American journal of epidemiology*, 2015. **181**(2): p. 127-36.
228. Verde, Z., et al., *Effects of cigarette smoking and nicotine metabolite ratio on leukocyte telomere length*. *Environmental research*, 2015. **140**: p. 488-94.
229. Epel, E.S., et al., *Accelerated telomere shortening in response to life stress*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004. **101**(49): p. 17312-5.
230. Cassidy, A., et al., *Associations between diet, lifestyle factors, and telomere length in women*. *The American journal of clinical nutrition*, 2010. **91**(5): p. 1273-80.
231. Min, K.B. and J.Y. Min, *Association between leukocyte telomere length and serum carotenoid in US adults*. *European journal of nutrition*, 2017. **56**(3): p. 1045-1052.
232. Xu, Q., et al., *Multivitamin use and telomere length in women*. *The American journal of clinical nutrition*, 2009. **89**(6): p. 1857-63.
233. Honarbakhsh, S. and M. Schachter, *Vitamins and cardiovascular disease*. *The British journal of nutrition*, 2009. **101**(8): p. 1113-31.
234. Sylvester, P.W., et al., *Vitamin E inhibition of normal mammary epithelial cell growth is associated with a reduction in protein kinase C(alpha) activation*. *Cell proliferation*, 2001. **34**(6): p. 347-57.

235. Li, H., et al., *Telomerase is controlled by protein kinase Calpha in human breast cancer cells*. The Journal of biological chemistry, 1998. **273**(50): p. 33436-42.
236. Sheng, W.Y., Y.L. Chien, and T.C. Wang, *The dual role of protein kinase C in the regulation of telomerase activity in human lymphocytes*. FEBS letters, 2003. **540**(1-3): p. 91-5.
237. Eitsuka, T., K. Nakagawa, and T. Miyazawa, *Down-regulation of telomerase activity in DLD-1 human colorectal adenocarcinoma cells by tocotrienol*. Biochemical and biophysical research communications, 2006. **348**(1): p. 170-5.
238. Mangialasche, F., et al., *Serum levels of vitamin E forms and risk of cognitive impairment in a Finnish cohort of older adults*. Experimental gerontology, 2013. **48**(12): p. 1428-35.
239. Solomon, A., et al., *Serum cholesterol changes after midlife and late-life cognition: twenty-one-year follow-up study*. Neurology, 2007. **68**(10): p. 751-6.
240. Traber, M.G. and I. Jialal, *Measurement of lipid-soluble vitamins--further adjustment needed?* Lancet, 2000. **355**(9220): p. 2013-4.
241. Miller, S.A., D.D. Dykes, and H.F. Polesky, *A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells*. Nucleic acids research, 1988. **16**(3): p. 1215.
242. Cawthon, R.M., *Telomere measurement by quantitative PCR*. Nucleic acids research, 2002. **30**(10): p. e47.
243. Saunders, A.M., *Apolipoprotein E and Alzheimer disease: an update on genetic and functional analyses*. Journal of neuropathology and experimental neurology, 2000. **59**(9): p. 751-8.
244. Singh, P.P., M. Singh, and S.S. Mastana, *APOE distribution in world populations with new data from India and the UK*. Annals of human biology, 2006. **33**(3): p. 279-308.
245. Goodwin, J.S., J.M. Goodwin, and P.J. Garry, *Association between nutritional status and cognitive functioning in a healthy elderly population*. JAMA, 1983. **249**(21): p. 2917-21.
246. Kang, J.H. and F. Grodstein, *Plasma carotenoids and tocopherols and cognitive function: a prospective study*. Neurobiology of aging, 2008. **29**(9): p. 1394-403.
247. Pratico, D. and S. Sung, *Lipid peroxidation and oxidative imbalance: early functional events in Alzheimer's disease*. Journal of Alzheimer's disease : JAD, 2004. **6**(2): p. 171-5.

248. Engelhart, M.J., et al., *Plasma levels of antioxidants are not associated with Alzheimer's disease or cognitive decline*. Dementia and geriatric cognitive disorders, 2005. **19**(2-3): p. 134-9.
249. Ravaglia, G., et al., *Plasma tocopherols and risk of cognitive impairment in an elderly Italian cohort*. The American journal of clinical nutrition, 2008. **87**(5): p. 1306-13.
250. Sen, C.K., et al., *Tocotrienols: the emerging face of natural vitamin E*. Vitamins and hormones, 2007. **76**: p. 203-61.
251. Williamson, K.S., et al., *The nitration product 5-nitro-gamma-tocopherol is increased in the Alzheimer brain*. Nitric oxide : biology and chemistry, 2002. **6**(2): p. 221-7.
252. Reiter, E., Q. Jiang, and S. Christen, *Anti-inflammatory properties of alpha- and gamma-tocopherol*. Molecular aspects of medicine, 2007. **28**(5-6): p. 668-91.
253. Devore, E.E., et al., *Dietary antioxidants and long-term risk of dementia*. Archives of neurology, 2010. **67**(7): p. 819-25.
254. White, E., et al., *Correlates of serum alpha- and gamma-tocopherol in the Women's Health Initiative*. Annals of epidemiology, 2001. **11**(2): p. 136-44.
255. Wright, M.E., et al., *Higher baseline serum concentrations of vitamin E are associated with lower total and cause-specific mortality in the Alpha-Tocopherol, Beta-Carotene Cancer Prevention Study*. The American journal of clinical nutrition, 2006. **84**(5): p. 1200-7.
256. Bruno, R.S. and M.G. Traber, *Vitamin E biokinetics, oxidative stress and cigarette smoking*. Pathophysiology : the official journal of the International Society for Pathophysiology, 2006. **13**(3): p. 143-9.
257. Raszewski, G., et al., *Homocysteine, antioxidant vitamins and lipids as biomarkers of neurodegeneration in Alzheimer's disease versus non-Alzheimer's dementia*. Annals of agricultural and environmental medicine : AAEM, 2016. **23**(1): p. 193-6.
258. Charlton, K.E., et al., *Lowered plasma vitamin C, but not vitamin E, concentrations in dementia patients*. The journal of nutrition, health & aging, 2004. **8**(2): p. 99-107.
259. Corder, E.H., et al., *Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families*. Science, 1993. **261**(5123): p. 921-3.
260. Schachter, F., et al., *Genetic associations with human longevity at the APOE and ACE loci*. Nature genetics, 1994. **6**(1): p. 29-32.

261. Battino, M., et al., *Coenzyme Q, Vitamin E and Apo-E alleles in Alzheimer Disease*. BioFactors, 2003. **18**(1-4): p. 277-81.
262. Vatassery, G.T., et al., *Apolipoprotein E exerts selective and differential control over vitamin E concentrations in different areas of mammalian brain*. Journal of neuroscience research, 2006. **84**(6): p. 1335-42.
263. Huebbe, P., J.K. Lodge, and G. Rimbach, *Implications of apolipoprotein E genotype on inflammation and vitamin E status*. Molecular nutrition & food research, 2010. **54**(5): p. 623-30.
264. Vatassery, G.T., et al., *Apolipoprotein e deficiency leads to altered brain uptake of alpha tocopherol injected into lateral cerebral ventricles*. Biochimica et biophysica acta, 2007. **1772**(7): p. 797-803.
265. Ramassamy, C., et al., *Oxidative damage and protection by antioxidants in the frontal cortex of Alzheimer's disease is related to the apolipoprotein E genotype*. Free radical biology & medicine, 1999. **27**(5-6): p. 544-53.
266. Ramassamy, C., et al., *Oxidative insults are associated with apolipoprotein E genotype in Alzheimer's disease brain*. Neurobiology of disease, 2000. **7**(1): p. 23-37.
267. Zekry, D., et al., *Telomere length is not predictive of dementia or MCI conversion in the oldest old*. Neurobiology of aging, 2010. **31**(4): p. 719-20.
268. Zhang, J., et al., *Telomere dysfunction of lymphocytes in patients with Alzheimer disease*. Cognitive and behavioral neurology : official journal of the Society for Behavioral and Cognitive Neurology, 2003. **16**(3): p. 170-6.
269. Kota, L.N., et al., *Reduced telomere length in subjects with dementia and diabetes mellitus type 2 is independent of apolipoprotein E4 genotype*. Asian journal of psychiatry, 2014. **12**: p. 58-62.
270. Lu, L., et al., *Association between exposure to second-hand smoke and telomere length: cross-sectional study of 1303 non-smokers*. International journal of epidemiology, 2017. **46**(6): p. 1978-1984.
271. Marcon, F., et al., *Telomerase activity, telomere length and hTERT DNA methylation in peripheral blood mononuclear cells from monozygotic twins with discordant smoking habits*. Environmental and molecular mutagenesis, 2017. **58**(8): p. 551-559.