

REVIEW

RUOLO DELL'ACCUMULO INTRACELLULARE DI COLESTEROLO NELLE PATOLOGIE NEURODEGENERATIVE E NIEMANN-PICK TYPE C1 NELL'ADULTO.

Presentazione di un caso clinico

Intracellular cholesterol storage in the neurodegenerative diseases and Niemann-Pick type C1 in the adult. A clinical case

FRANCESCO BOLZETTA¹, ENZO MANZATO¹, ALESSANDRA CODEMO²,
IRENE CORTELLA², NICOLA VERONESE¹, GIUSEPPE SERGI¹, PATRIZIA TARUGI³,
CARLO GABELLI²

¹Dipartimento di Medicina-DIMED, Clinica Geriatrica, Università degli Studi di Padova;

²Centro Regionale per lo studio e la cura dell'Invecchiamento Cerebrale (CRIC), Azienda Ospedaliera, Università degli Studi di Padova;

³Dipartimento di Scienze Biomediche, Università di Modena e Reggio Emilia

SUMMARY

Background: Changes in intracellular cholesterol metabolism are involved in neurodegeneration. Modifications in total cell cholesterol content or alterations in the composition of cellular membrane can probably alter the intracellular signaling and lead to degeneration of central nervous system cells. Niemann-Pick type C1 disease (NPC1) was thought to be found almost only in childhood. Recent reports indicate that this disease can affect also the adult and sometimes the elderly. Symptoms of this disease are not specific in the early phase and the disease shows a slow and progressive neurodegeneration. Due to the difficulty in early diagnosis of NPC1 some studies focus on the possibility that this form of the disease is underdiagnosed.

Study purpose: We report here a new case of adult onset NPC1. Two distinct novel mutations in NPC1 gene are responsible for the disease. Moving from this experience we collected the recent literature about the cholesterol intracellular metabolism in the CNS and analyzed the role of cholesterol metabolism in Alzheimer disease and other neurodegenerative disease as NPC1, Tangier disease and cerebrotendinous xanthomatosis.

Keywords: Cholesterol, Niemann-Pick C1 disease, Alzheimer disease, Tangier disease, Cerebrotendinous xanthomatosis.

Indirizzo per la corrispondenza

Prof. Enzo Manzato
Dipartimento di Medicina-DIMED,
Clinica Geriatrica,
Università degli Studi di Padova
E-mail: enzo.manzato@unipd.it

Introduzione

Il progressivo invecchiamento della popolazione in Italia ha implicazioni importanti da un punto di vista medico, economico e sociale. Uno dei problemi di maggior

rilievo riguarda il costante incremento dei casi di demenza.

Nelle patologie neurodegenerative ci sono alcune alterazioni microscopiche fondamentali: l'accumulo extracellulare di proteine come l'amiloide β ($A\beta$) che va a formare le placche senili nella malattia di Alzheimer o l'accumulo intracellulare di aggregati di proteine quali le neurofibrille tipiche di tale malattia; i corpi di Lewy nella malattia di Parkinson o nella demenza a corpi di Lewy e gli accumuli di proteina tau nella malattia di Pick (1).

Quesito fondamentale per i ricercatori che si occupano di tali patologie è se ci siano delle alterazioni del metabolismo intracellulare che possano essere correlate con l'accumulo di beta-amiloide. Negli ultimi anni è emerso un possibile ruolo del metabolismo del colesterolo nella genesi di tale patologia. Questa ipotesi nasce da un lato da osservazioni riguardanti la somministrazione di sostanze in grado di perturbare l'omeostasi del colesterolo *in vitro* e, in seguito, dalla somministrazione di statine a pazienti affetti da AD. I primi studi caso-controllo sull'efficacia di tale farmaci avevano suscitato un profondo interesse nella comunità scientifica, in quanto l'uso delle statine sembrava correlato ad una diminuzione dell'incidenza di malattia di Alzheimer e ad un rallentamento dei processi degenerativi correlato ad un miglioramento della *performance* intellettuale. Tali osservazioni iniziali, tuttavia, non han-

no ricevuto una conferma unanime e studi più estesi hanno messo in forte dubbio il ruolo protettivo delle statine (2, 3).

Nella AD alterazioni del metabolismo intracellulare del colesterolo sono ritenute una possibile causa di processi degenerativi a carico dei neuroni del sistema nervoso centrale (SNC). I livelli di colesterolo intracellulare e soprattutto l'alterazione nel *pattern* di distribuzione a livello delle membrane biologiche, porterebbero ad una alterazione della regolazione del *signaling* intracellulare dei neuroni con loro progressiva degenerazione (4).

L'importanza dell'omeostasi del colesterolo a livello del SNC per quanto riguarda la funzionalità neuronale, i fenomeni di plasticità cerebrale, la sinaptogenesi e la risposta a danni che colpiscono l'encefalo, è evidenziata dalla patogenesi anche di altre malattie neurodegenerative (*Tabella 1*). Accanto alla AD troviamo anche un'altra forma di demenza, la Niemann-Pick type C1 (NPC1), una patologia rara correlata alla mutazione del gene NPC1 che si associa ad un accumulo di colesterolo intracellulare.

La xantomatosi cerebrotendinea è una rara patologia degenerativa a trasmissione autosomica recessiva dovuta alla mutazione del gene CYP27A1 che provoca elevati livelli plasmatici di colestano e aumento degli alcoli biliari nelle urine con presenza di xantomi in varie sedi.

Un'altra patologia rara associata ad un'al-

Tabella 1 - Malattie neurodegenerative in cui è coinvolto il metabolismo del colesterolo e geni implicati nella genesi di tali patologie.

Malattia neurodegenerativa	Geni	Decadimento cognitivo/demenza
Malattia di Alzheimer	ApoE4, APP (multifattoriale)	si
Malattia di Niemann Pick type C1	NPC1, NPC2	si
Xantomatosi cerebrotendinea	CYP27A1	si
Malattia di Tangier	ABCA1	no

terazione dei geni coinvolti nell'omeostasi del colesterolo è la malattia di Tangier. Questa patologia è associata alla mutazione del gene ABCA1 (ATP-binding cassette 1), fondamentale per la formazione delle HDL (High Density Lipoproteins) e per l'espulsione del colesterolo in eccesso da parte delle cellule.

La presenza di uno spettro di patologie degenerative, tutte associate a modificazioni dell'omeostasi del colesterolo nel SNC o nel sistema nervoso periferico, porta alla evidente necessità di comprendere in modo più dettagliato le varie vie implicate nel metabolismo di tale molecola. Questa esigenza, oltre che avere un rilevante interesse scientifico si rivela anche necessaria ai fini terapeutici; negli ultimi anni, infatti, le nuove conoscenze acquisite hanno portato alla selezione di nuovi possibili *target* terapeutici.

Colesterolo nel sistema nervoso centrale

Il cervello contiene il 25% del colesterolo non esterificato dell'organismo ed è l'organo più ricco di colesterolo di tutto l'organismo; oltre il 70% del colesterolo nel SNC si trova associato alla mielina (5). Il colesterolo è implicato nei sistemi di *signaling* intracellulare e nel processo di trascrizione genica, oltre ad essere precursore di un grande numero di steroidi bioattivi (6). Determina, inoltre, le proprietà di membrana della mielina fondamentali per il suo ruolo, la presenza di colesterolo permette infatti di ottenere una diminuzione della permeabilità agli ioni, processo che consente all'impulso di viaggiare lungo l'assone verso le sinapsi, piuttosto che diffondere attraverso la membrana disperdendosi. Il colesterolo riveste un ruolo molto importante anche nei processi di riparazione

in seguito ad eventi che danneggiano il SNC, processi che richiedono la redistribuzione e la sintesi di colesterolo per la formazione di nuove membrane cellulari, che coinvolgono in particolare l'apolipoproteina E (ApoE) (7).

Il SNC si trova pressoché isolato per quanto riguarda l'omeostasi del colesterolo, grazie alle peculiari caratteristiche della barriera emato-encefalica (BEE): i capillari che la compongono non sono fenestrati, condizione comune invece nelle altre parti dell'organismo. Nonostante alcuni studi abbiano dimostrato come i capillari della BEE posseggano i recettori per le LDL (Low Density Lipoproteins), questi ultimi sembrano non essere attivi (8). Il pool di colesterolo intracerebrale si è dimostrato estremamente stabile nel tempo, con un *turn-over* di circa 5 anni (9). Oltre il 95% del colesterolo contenuto nel SNC deriva da un processo di sintesi *de novo* (10).

Nel sistema nervoso centrale dell'adulto la maggior parte della sintesi del colesterolo è regolata dalla formazione di un metabolita idrossilato, il 24-idrossicolesterolo (24-OH). È stato infatti dimostrato che la più importante via di regolazione dell'omeostasi del colesterolo nel SNC è la sua ossidazione a 24-OH, processo che avviene principalmente nei neuroni. Il 24-OH inoltre è in grado di passare la barriera ematoencefalica ed entrare nel circolo sistemico (11) così che praticamente tutto il 24-OH presente nel plasma è di origine cerebrale (13).

I neuroni necessitano di un continuo apporto di colesterolo per mantenerne una concentrazione di membrana adeguata. Tale acquisizione avviene esclusivamente tramite due vie:

1. Sintesi *de novo* ad opera dell'enzima HMGCoA reduttasi (3-idrossi-3-metilglutaril coenzima A reduttasi); questa via è attiva e risulta essere la principale

a livello neuronale solo in fase embrionale e, in minima parte, nei neuroni maturi.

- Incorporazione dall'ambiente extracellulare del colesterolo sintetizzato negli astroцитi e trasportato in lipoproteine contenenti apo E. Questo colesterolo viene incorporato nel neurone per mezzo di due principali recettori: il recettore per le LDL (LDLR) e l'*LDLR Related Protein* (LRP). Entrambi questi recettori riconoscono Apo-E, che costituisce quindi una apolipoproteina fondamentale a livello encefalico (mancando Apo-B100, che è presente solo nel plasma). L'LRP è in grado di svolgere un effetto anche nei processi di trasmissione neuronale e nel *signaling* intracellulare (13).

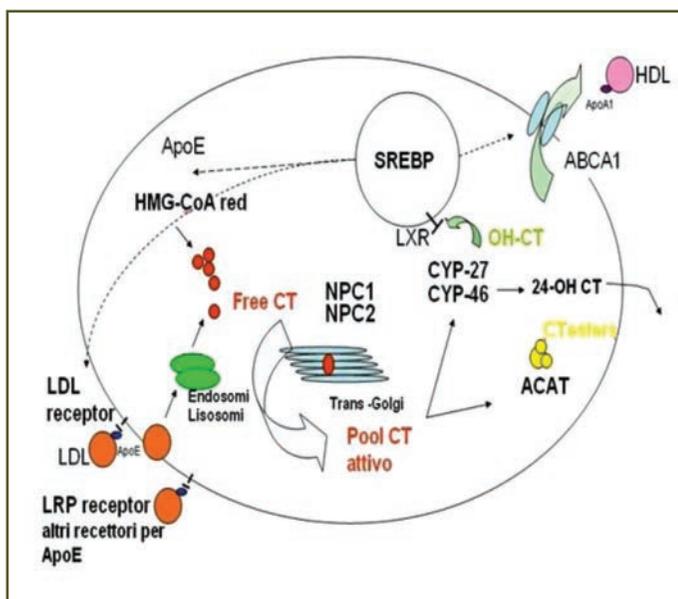


Figura 1 - Regolazione del colesterolo intracellulare. Il colesterolo può essere metabolizzato ad opera dell'AcilCoA colesterolo acil-transferasi (ACAT), con formazione di colesterolo esterificato; in alternativa può venire ossidato nelle posizioni 24, 25 o 27, per formare ossisteroli, che sono più idrofili del colesterolo e possono passare la barriera emato-encefalica. Il colesterolo può essere impiegato nella sintesi di altri steroidi o essere esportato dalla cellula in complesso con lipoproteine grazie al trasportatore ABCA1.

Le cellule del SNC sono in grado di utilizzare il colesterolo essenzialmente attraverso quattro vie (*Figura 1*):

- Il colesterolo può essere metabolizzato ad opera dell'AcilCoA colesterolo acil-transferasi (ACAT), con formazione di colesterolo esterificato.
- Può essere, in alternativa, ossidato nelle posizioni 24, 25 o 27, con formazione di ossisteroli; (14), che essendo più idrofili del colesterolo possono passare la barriera emato-encefalica. (9).
- Il colesterolo può essere impiegato nella sintesi di altri steroidi.

Può essere esportato dalla cellula in complesso con lipoproteine grazie al trasportatore ABCA1. La produzione di HDL nascenti ad opera dell'ABCA1 sembra avere anch'essa un ruolo molto importante nel mantenimento dell'omeostasi del colesterolo nel SNC (5).

Nell'encefalo il trasporto del colesterolo avverrebbe preferenzialmente dalle cellule gliali, che lo producono in gran parte, verso i neuroni. Un ruolo chiave nel trasporto di tale molecola tra questi due tipi cellulari è giocato dall'ApoE. I neuroni sarebbero in grado di captare particelle lipoproteiche contenenti ApoE attraverso LDLR, in alternativa l'uptake potrebbe avvenire tramite il recettore multi-ligando LRP (15). L'ApoE non sembra essere fondamentale per il mantenimento dell'omeostasi del colesterolo nel SNC in condizione di normalità; tuttavia sembra esplicitare un ruolo molto importante nei processi che determinano un danno o una degenerazione cerebrale: le diverse isoforme specifiche della proteina ApoE che un individuo geneticamente possiede svolgono ruoli differenziati. Esiste infatti ormai una consistente letteratura che indica nell'isoforma E4 dell'ApoE un importante fattore di rischio per lo sviluppo della forma late-on-

set di morbo di Alzheimer. Questa isoforma di ApoE si assocerebbe altresì ad una diminuita capacità di recupero in seguito ad un trauma cranico.

Almeno due proteine sono implicate nel trasporto del colesterolo non esterificato al pool di colesterolo attivo della cellula: la Niemann-Pick type C1 e C2. Cellule carenti dell'attività di tali proteine accumulano colesterolo non esterificato a carico endosomiale. Questa condizione nell'uomo si è dimostrata responsabile dello sviluppo della malattia di Niemann-Pick type C1 e C2 (16).

Nella regolazione intracellulare del colesterolo gli ossisteroli giocano un ruolo fondamentale. Tali molecole si formano dall'ossidazione del colesterolo, processo fondamentale per rendere possibile l'eliminazione del colesterolo stesso (*Figura 2*). Un aumento della concentrazione di ossisteroli nel sangue facilita lo sviluppo dell'aterosclerosi (17). Gli ossisteroli sono in grado di sopprimere i livelli di mRNA codificante per i recettori delle LDL; sono in grado inoltre di diminuire la densità dei recettori stessi delle LDL a livello della membrana plasmatica e anche di diminuire il legame delle LDL ai loro recettori. È ormai accertato, inoltre, che i maggiori *carrier* del colesterolo a livello circolatorio, le LDL, quando si trovano in forma ossidata, a seguito di condizioni di stress ossidativo, sono molto più aterogene rispetto alla loro controparte non ossidata. Le LDL ossidate, inoltre, alterano la fluidità delle membrane cellulari e la loro permeabilità. Gli ossisteroli sono in grado di svolgere un effetto tossico in colture di astrociti primari, nonché di stimolare l'apoptosi nelle cellule che compongono la microglia (18). Nel SNC sono presenti enzimi, quali la 25-idrossilasi e la 7-alfa-idrossilasi, in grado di metabolizzare gli ossisteroli in metaboliti che mantengono, però, un cer-

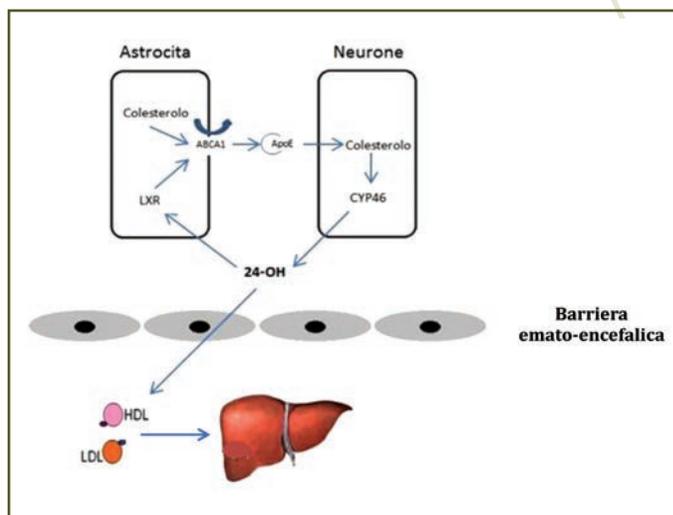


Figura 2 - Sintesi e regolazione del 24-idrossicolesterolo (24-OH). I neuroni maturi si riforniscono di colesterolo attraverso l'incorporazione dall'ambiente extracellulare del colesterolo sintetizzato negli astrociti e trasportato in lipoproteine contenenti apo E. La maggiore via di regolazione dell'omeostasi del colesterolo a livello del SNC è la sua ossidazione a 24-OH, processo che avviene principalmente nei neuroni. Quasi tutto il 24-OH presente nella circolazione sistemica è di origine cerebrale. In seguito esso viene trasportato al fegato.

to grado di tossicità. Gli studi di tali composti tuttavia hanno evidenziato anche dei possibili effetti positivi. È stato osservato che alcuni ossisteroli, come il 7-alfa-OH, il 7-beta-OH e il 7 keto, possono contrastare il ruolo proaterogenico delle LDL ossidate andando a diminuire l'attivazione dell'HMGCoA reduttasi (19). Si è osservato, inoltre, un effetto antiaterogenico degli ossisteroli, come il 24-OH (il principale ossisterolo prodotto a livello del SNC) che è in grado di aumentare l'espressione dei geni che diminuiscono la concentrazione di colesterolo intracellulare. Tale capacità deriva dall'interazione tra tali composti con i recettori nucleari LXR-alfa e LXR-beta (20, 21).

I recettori LXR sono in grado di regolare un gruppo di geni coinvolti nel trasporto del colesterolo in eccesso dai tessuti periferici al fegato ad opera delle particelle

HDL. In vivo è stato dimostrato come l'attivazione dei recettori LXR, ad opera di ligandi sintetici ad alta affinità, sia in grado di portare all'incremento dei livelli di HDL e di favorire l'escrezione di colesterolo dall'organismo (22).

In larga misura questa capacità di regolare il metabolismo del colesterolo è dipendente dalla capacità degli LXR di controllare l'espressione dei membri della superfamiglia ABC dei trasportatori di membrana, incluso l'ABCA1 (23). Vi sono ormai molte evidenze che l'ABCA1 è in grado di facilitare l'efflusso di colesterolo e fosfolipidi legati a lipoproteine povere di lipidi come l'ApoA-I (Apolipoproteina A1), fattore che contribuirebbe ad aumentare i livelli plasmatici di HDL.

Patologie neurodegenerative e colesterolo

Malattia di Alzheimer

All'interno del grande capitolo delle demenze la malattia di Alzheimer occupa il primo posto, attestandosi ad una frequenza del 60%. Uno dei fattori di rischio più importanti è sicuramente l'età. La prevalenza raddoppia ogni 5 anni dopo l'età di 60 anni, aumentando dal 2% tra i soggetti tra i 60 e i 64 anni al 23,6% sopra i 90 anni.

Gli studi riguardanti la correlazione tra livelli di colesterolo circolante e aumento del rischio di sviluppare AD sono ormai molteplici. Per quanto concerne i livelli di colesterolo totale, colesterolo LDL e HDL i risultati ottenuti nei vari studi sono altamente discordanti. In studi longitudinali è stato possibile identificare un aumento del rischio di sviluppare malattia di Alzheimer in soggetti con aumento del colesterolo totale (24), tuttavia tale riscontro si inquadra in un problema più ampio riguardante i fattori di rischio cardiovascolare e lo svi-

luppo di lesioni vascolari aterosclerotiche nei pazienti con AD.

Esiste ormai una consistente letteratura riguardante la correlazione tra livelli di colesterolo intracellulare e produzione di β -amiloide. In particolare è stato evidenziato come una riduzione della concentrazione del colesterolo intracellulare porti ad una riduzione della produzione di A β . Tra i farmaci più promettenti in quest'ottica ci sono le statine (25-27), anche se i trial clinici finora intrapresi hanno dimostrato risultati fortemente contrastanti. Wolozin (28) nel 2000 ha raccolto i dati riguardanti l'incidenza di malattia di Alzheimer in oltre 50.000 pazienti che assumevano statine rispetto ai pazienti che non assumevano tali farmaci. Gli autori hanno rilevato che l'incidenza di AD nel gruppo di pazienti che assumevano statine era diminuita di circa il 60-70% rispetto alla popolazione generale e rispetto a pazienti che assumevano altri medicinali per trattare l'ipertensione o altre malattie vascolari. Nello stesso anno anche Jick (29) ha confermato questo trend in uno studio coinvolgente 284 pazienti trattati per 4 anni con statine. Sparks (30) nel 2005 ha sottoposto 63 pazienti, con MMSE (Mini Mental State Examination) tra 12 e 28, a somministrazione per 3 mesi di 80 mg di atorvastatina/die. Lo studio, condotto con una metodica caso-controllo, ha rilevato un miglioramento statisticamente significativo nel Geriatric Depression Scale e nell'Alzheimer's Disease Assessment Scale-cognitive subscale. Non mancano, tuttavia, studi che non hanno rilevato una correlazione tra assunzione di statine e diminuzione dell'incidenza di malattia di Alzheimer (31). Un altro target terapeutico è stato individuato nell'Acil-coenzima A Colesterol Acil-Transferasi, un enzima presente a livello della membrana del RE deputato alla conversione del colesterolo libero in eccesso in cole-

sterolo esterificato. In uno studio del 2008 si è evidenziato come, in vivo, gli agenti in grado di bloccare tale enzima, come l'avasimibe, siano in grado di ridurre la formazione di A β (32).

Un'ipotesi interessante è che più che un eccesso, o un difetto, del colesterolo a livello cerebrale sia una sua alterata distribuzione a livello di membrana a facilitare il clivaggio dell'APP (Amyloid Precursor Protein) verso la via amiloidogenica. Sotto questo punto di vista acquistano un interesse particolare alcune aree delle membrane, i *lipid rafts*, particolarmente ricche di colesterolo. Essi sono delle vere e proprie piattaforme in grado di modulare varie vie del *signaling* intracellulare; tra le vie controllate c'è anche quella inerente il clivaggio dell'APP.

Un altro importante fattore di rischio per lo sviluppo di AD è la presenza in un soggetto di almeno un allele per l'apolipoproteina E4 a livello del cromosoma 19. Nonostante questa correlazione patogenetica sia nota dai primi anni '90, resta ancora da stabilire con chiarezza il meccanismo attraverso il quale tale apolipoproteina sia in grado di favorire l'insorgenza di AD. La prevalenza totale nell'arco della vita di sviluppo di AD in pazienti portatori di almeno un allele E4 è di circa il 29%, contro il 9% dei soggetti non portatori. ApoE si è rivelata essere la principale lipoproteina contenuta nel cervello dei mammiferi; essa è presente in 3 isoforme (E2, E3 e E4) (33). Si ipotizza che uno dei ruoli principali dell'ApoE sia collegato al mantenimento dell'omeostasi del colesterolo in risposta a patologie neurodegenerative o a traumi cerebrali.

In preparati ottenuti da encefali di pazienti affetti da malattia di Alzheimer ApoE è presente sia a livello delle placche senili che delle neurofibrille, dove essa è in grado di legarsi direttamente all'A β e alla proteina tau (34). I soggetti portato-

ri dell'allele E4 sono altresì più proni alla formazione di placche senili, nonché presentano una maggiore concentrazione di colesterolo a livello plasmatico (35). L'isoforma E4, rispetto alle altre isoforme, è probabilmente in grado di favorire la formazione dell'amiloide e delle neurofibrille (36), ma non sarebbe in grado di favorire il processo di eliminazione dell'amiloide stessa (37). Infine ApoE4 si è rivelata tossica per i neuroni (38). L'espressione di apoE è regolata dai *peroxisome proliferator-activated receptor gamma* (PPAR γ) e dai LXR tramite legame con i *retinoid X receptors* (RXRs). L'agonista dell'RXR *bezafibrate* si è dimostrato in grado di promuovere la clearance apoE mediata della β -amiloide cerebrale, con conseguente miglioramento cognitivo, in modelli murini di malattia di Alzheimer (39).

Il ruolo giocato dagli ossisteroli nella patogenesi della malattia di Alzheimer è ancora controverso; è stato osservato come il CYP46, l'enzima che a livello cerebrale catalizza l'ossidazione del colesterolo a 24-OH, nell'encefalo di soggetti anziani sani è espresso a livello dei neuroni e degli astrociti, mentre nei pazienti con Alzheimer viene ad essere espresso prevalentemente a livello dei neuroni degenerati che circondano le placche senili. Si ipotizza che questo pattern alterato di idrossilazione sia in grado di esacerbare la deposizione di A β (40). Il 24-OH non solo sembra essere un fattore molto interessante per quanto riguarda la patogenesi dell'AD, ma secondo vari autori potrebbe essere usato quale marker precoce di insorgenza di tale patologia. Nel 2005 Leoni e Wahlund hanno riscontrato una correlazione significativa tra elevati livelli di 24-OH nel liquor e Mild Cognitive Impairment (MCI) (41); questo dato si aggiunge ad altre osservazioni che indicano un aumento dei livelli plasmatici di 24-OH in pazienti con

AD precoce rispetto a volontari sani (42). La malattia di Alzheimer, tuttavia, colpisce anche pazienti che non sono portatori dell'allele E4, indicando che ApoE rappresenta solo uno dei fattori di rischio. Tra i fattori coinvolti anche LRP1 potrebbe giocare un ruolo importante nell'omeostasi del colesterolo e di ApoE nel SNC. Diminuiti livelli di LRP1 sarebbero direttamente responsabili della perdita di colesterolo a livello di membrana e potrebbero quindi contribuire allo sviluppo di processi neurodegenerativi (4).

La patogenesi dell'Alzheimer è quindi verosimilmente multigenica, e non possiamo escludere che alterazioni che colpiscono differenti geni siano in grado di portare a modificazioni dell'omeostasi del colesterolo simili in grado di favorire l'insorgenza di tale patologia.

Malattia di Niemann-Pick type C1

La malattia di Niemann-Pick type C (NPC) è una rara patologia a trasmissione auto-

somica recessiva caratterizzata da processi neurodegenerativi e dall'accumulo di lipidi a carico di vari organi, tra i quali in particolare il fegato e la milza (43, 44). In questa malattia l'accumulo di colesterolo, sfingolipidi e altri lipidi avviene a livello del sistema endosomiale e lisosomiale dei vari tessuti. La prevalenza stimata è di 1:150.000 persone (45). La NPC è il risultato di mutazioni che riguardano il gene NPC1 o NPC2. Il ruolo della proteina NPC1 sembra essere correlato essenzialmente con il trasporto del colesterolo all'interno della cellula; è stato inoltre dimostrato che cellule con NPC1 mutato non sono in grado di sopprimere la sintesi e l'uptake dallo spazio extracellulare di colesterolo in risposta ad elevati livelli di LDL (46). Nelle cellule con NPC1 mutato è carente anche l'espressione dei geni regolati dal LXR e inoltre la produzione di 24-OH e di 27-OH risulta diminuita; la somministrazione esogena di questi ossisteroli, è in grado di eliminare l'eccesso di colesterolo in queste cellule, correggendo così il fenotipo della NPC1 mutata (Figura 3) (47). La carenza di ossisteroli si tradurrebbe in una riduzione del legame con l'LXR e, di conseguenza, in una diminuzione dell'espressione del trasportatore ABCA1, con ridotto efflusso di colesterolo dalla cellula.

La presentazione clinica della malattia di Niemann-Pick type C1 è molto variabile; la forma neonatale si associa a grave epatosplenomegalia. I pazienti che sopravvivono sviluppano alterazioni psicomotorie già a partire dall'infanzia, nonché un lento processo di neurodegenerazione con *Vertical Supranuclear Ophthalmoplegia* (VSO), convulsioni, spasticità e frequenti cadute. La peculiarità della presentazione nell'adulto risiederebbe nell'iniziale paucisintomaticità e nel progressivo sviluppo di deficit neurodegenerativi che possono manifestarsi

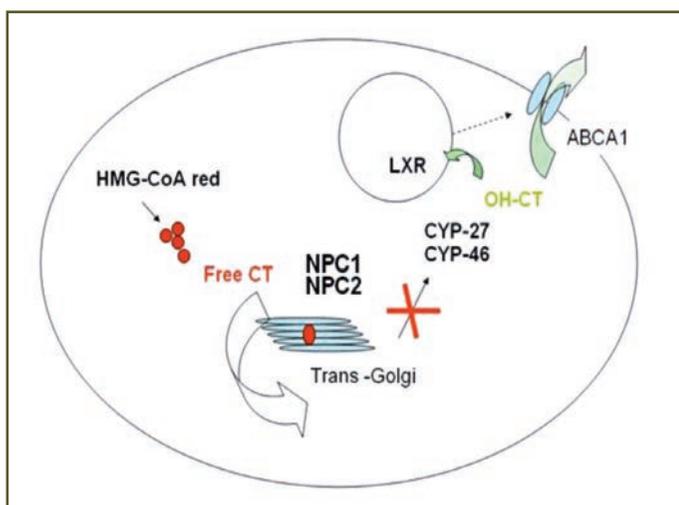


Figura 3 - Effetti degli ossisteroli nella malattia di NPC1. Nelle cellule con NPC1 mutato è carente l'espressione dei geni regolati dal LXR e la produzione di 24-OH e di 27-OH risulta diminuita; la somministrazione esogena di questi ossisteroli, è in grado di eliminare l'eccesso di colesterolo in queste cellule, correggendo così il fenotipo della NPC1 mutata.

in forma conclamata nel soggetto anziano (48). Nell'adulto, da un punto di vista motorio, spesso la presentazione avviene con la comparsa di atassia cerebrale, sebbene siano frequenti anche tremori intenzionali, distonia, dismetria, alterazioni della diadococinesi e alterazioni motorie coreo-atetotiche. L'indagine biochimica standard per effettuare la diagnosi di malattia di Niemann Pick type C si basa sull'analisi dei fibroblasti del paziente mediante biopsia cutanea. La conferma della diagnosi avviene con il riscontro a livello genetico delle mutazioni tipiche di tale patologia.

Per quanto riguarda la terapia al momento non ci sono ancora trattamenti specifici in grado di modificare la progressione della malattia e per la maggior parte dei casi vengono messe in atto solamente interventi di tipo palliativo. Sono in corso numerosi studi volti a testare la capacità d'azione di un farmaco inibitore della sintesi degli sfingolipidi, il miglustat (49).

Negli ultimi anni tale patologia ha risvegliato anche l'interesse di ricercatori che si occupano di malattia di Alzheimer dovuto al fatto che si stanno evidenziando dei paralleli tra queste due forme. Anche nella NPC1 è stato possibile osservare la deposizione di fibrille di amiloide. È stato ipotizzato che l'alterazione del metabolismo intracellulare del colesterolo, in particolare modo per quanto riguarda il traffico vescicolare di tale molecola, sia in grado di favorire la processazione dell'APP verso la via amiloidogena. Gli aggregati di A β si ritrovano tuttavia all'interno delle cellule e non nello spazio intercellulare come accade invece nell'AD (1).

Caso clinico

Il caso riguarda una donna, afferente al Centro Regionale per l'Invecchiamento Cerebrale di Arcugnano (VI), che ha presentato un progressivo declino cognitivo

a partire dall'età di 53 anni. All'anamnesi familiare non era presente familiarità per patologie neuropsichiatriche. La storia clinica comincia nel 1995, quando la paziente accusa una crisi depressiva apparentemente reattiva alla recente morte della suocera. A distanza di circa 2 anni inizia a presentare i primi disturbi della memoria, consistenti nella perdita del senso del tempo e in piccole dimenticanze inerenti la gestione familiare. Tale sintomatologia si aggrava ulteriormente negli anni successivi e si assiste alla comparsa di deliri di gelosia verso il marito e di allucinazioni visive. Alla luce di questi disturbi e per la ricorrenza delle crisi depressive, la paziente viene ricoverata e dimessa con una diagnosi di probabile demenza pre-senile con deterioramento delle funzioni cognitive. Compaiono gradualmente anche turbe comportamentali, manifestatesi con aggressività verbale, disinibizione e permalosità. In seguito ad una caduta la paziente ha riportato il crollo vertebrale di D5 e D7 con riduzione in altezza dei due corpi vertebrali. La densitometria ossea ha evidenziato un T-score a livello del rachide lombare di -3,92 DS diagnostico per osteoporosi.

All'esame obiettivo la paziente appare in sovrappeso (BMI 29,2) con un aumento ponderale di circa 10 Kg negli ultimi 2 anni in corrispondenza di un aumento dell'assunzione di cibo. I valori dei principali parametri vitali sono nella norma. Da un punto di vista anamnestico è presente una menopausa precoce (40 anni) e la presenza di una documentata ipercolesterolemia nel 2001 con colesterolo totale di 286 mg/dl e un'iperglicemia (121 mg/dl). La paziente è affetta da ipertensione arteriosa e diabete mellito non in trattamento farmacologico.

L'obiettività neurologica dimostra una grave compromissione cognitiva associata a

sindrome extrapiramidale acinetica rigida con distonia del collo e un deficit di coniugazione dello sguardo deviato, con oftalmoplegia verticale e fissità dello sguardo. La paziente appare apatica, presenta evidenti deficit di comprensione, mutacismo e un'afasia non fluente. La presenza di allucinazioni visive contribuisce ad un affaccendamento afinalistico ed ad uno stato ansioso con verbalizzazioni persistenti ed ecolalia.

Gli esami ematochimici dimostrano una moderata ipercolesterolemia (colesterolo totale 249 mg/dl, LDL-C 172 mg/dl, HDL-C 50 mg/dl, trigliceridi 135 mg/dl) ed un modesto incremento degli enzimi epatocitari. Sono risultati nel range di normalità i valori di TSH, vitamina B12, acido folico, VES, PCR e il profilo proteico.

Per quanto concerne i marcatori di neurodegenerazione l'esame del liquor rivela un valore di CSF-tau di 119 pg/mL, la CSF-A β 1-42 è risultata 197 pg/mL e la P-tau 59 pg/mL. In base a questi dati è stato possibile calcolare l'indice IATI (INNO-TEST[®], Innogenetics) definito come A β 1-42 / (240+1,18 x hTau) che è risultato pari a 0,5. La combinazione di tale valore con il valore di P-tau ha collocato la paziente nel range di valori di normalità, al di fuori quindi dall'area dei pazienti con demenza di Alzheimer o con Mild Cognitive Impairment. La ricerca della proteina 14-3-3 ha mostrato una lieve positività; tale riscontro suggerisce la presenza di un processo di degenerazione in atto ma non tipico per una diagnosi di malattia di Creutzfeldt-Jakob. Alla Risonanza Magnetica Nucleare il complesso ventricolare appare in sede, con modesta dilatazione del sistema ventricolare e segni di atrofia prevalenti ai lobi temporali e parietali bilateralmente. La SPECT cerebrale perfusoria dimostra una discreta e disomogenea ipoperfusione della corteccia e dei lobi frontale, parietali

e temporale bilateralmente; appaiono ipoperfusi anche entrambi gli ipotalami e i nuclei della base. All'ecografia addominale viene rilevato un fegato di dimensioni e morfologia nei limiti con ecostruttura finemente disomogenea di tipo steatosico. Non vengono rilevate alterazioni morfologiche o strutturali a carico di altri organi addominali.

La paziente, a completamento delle indagini svolte, esegue una ricerca genetica per valutare l'eventuale presenza di malattia di Niemann-Pick type C1, che risulta positiva. Le mutazioni riscontrate sono a carico dell'introne 12 -1G/C e dell'esone 25 A/G Asn1227 Ser. La prima mutazione riguarda un'alterazione eterozigote del sito di splicing; tale alterazione porta alla creazione di un sito alternativo di splicing, con eliminazione di parte dell'esone 12. Si determina in questo modo un frameshift con la comparsa di un codone di stop nell'esone 13. Si viene così a formare una proteina in parte alterata e di dimensioni di circa il 50%, rispetto alla proteina nativa. La seconda mutazione, riscontrata sempre in condizioni di eterozigosi, risulta essere una nuova mutazione a carico dell'esone 25. Tale mutazione potrebbe portare ad un'alterazione del targeting della proteina a livello lisosomiale, essendo tale sequenza altamente conservata in numerose specie animali.

Xantomatosi cerebrotendinea

Si tratta di una rara patologia degenerativa a trasmissione autosomica recessiva; in alcuni gruppi etnici, come ad esempio in Marocco, ha tuttavia una frequenza di 1:108 abitanti (50).

Questa patologia è dovuta alla mutazione del gene CYP27A1, che codifica per l'enzima 27-idrossilasi. Tale enzima a livello epatico catalizza la prima tappa di conversione del colesterolo ad acidi biliari; nei

tessuti periferici, invece, catalizza la conversione del colesterolo a 27-idrossicolesterolo e ad acido 3-idrossi-5-colestenoico. Entrambi questi composti sono convertiti nel fegato in acidi biliari. Si ipotizza che questi due composti possano agire come regolatori del metabolismo lipidico con un'azione diretta a livello intracellulare, o agendo come ligandi dei LXR (51). Il 27-OH si è dimostrato in grado di avere un effetto di *down-regulation* nei confronti dell'HMGCoA reductasi (52). Questa alterazione enzimatica esita nella mancata produzione di acido colico e chenodesossicolico, con disregolazione dei normali meccanismi di controregolazione sulla sintesi di colesterolo con conseguenti elevati livelli plasmatici di colestano e aumento degli acoli biliari nelle urine.

La CTX si caratterizza per la presenza di xantomi a livello dei tendini, dei polmoni e del cervello. Nonostante tali reperti, i livelli plasmatici di colesterolo risultano normali o solo lievemente aumentati. Altri sintomi che possono manifestarsi in questi pazienti sono: aterosclerosi precoce, sviluppo di infarti miocardici, diarrea e cataratta. Per quanto riguarda i sintomi neurologici si assiste alla comparsa di atassia cerebrale progressiva, demenza, paralisi spinale, segni di coinvolgimento del sistema piramidale ed extrapiramidale. Possono comparire più raramente anche osteoporosi, fratture ossee, predisposizione alla calcolosi epatica e renale (53).

È stato ipotizzato che gli acoli biliari in eccesso siano in grado di alterare la permeabilità della barriera emato-encefalica, con deposito di colestano e colesterolo a livello della materia bianca, che sarebbero responsabili dei processi degenerativi a carico del SNC. La terapia della CTX è attualmente basata sulla somministrazione di acido chenodesossicolico (CDCA) e statine; questo trattamento si è dimostrato

in grado di apportare notevoli miglioramenti clinici, nonché di abbassare i livelli plasmatici di colestano e di prodotti intermedi della bile (54).

Malattia di Tangier

I pazienti con malattia di Tangier presentano tonsille particolarmente sviluppate, di colore giallo-grigio che contrastano con la normale mucosa rossa. Un'altra peculiarità di tale patologia consiste nella quasi totale assenza di colesterolo HDL a livello plasmatico e ad un'elevazione dei livelli di trigliceridi (55). Nella malattia di Tangier il colesterolo viene ad accumularsi a livello del sistema reticolo-istocitario in vari organi, tra i quali la milza e il fegato; i portatori di questa malattia presentano, inoltre, un aumentato rischio di sviluppare precocemente e in maniera importante processi di aterosclerosi. La carenza di HDL tipica di questa patologia autosomica recessiva è dovuta ad una mutazione del gene del trasportatore ABCA1 posto nel cromosoma 9. L'alterazione di tale proteina porta all'incapacità da parte delle cellule di eliminare il colesterolo in eccesso con un suo progressivo accumulo. La neuropatia periferica è la più comune forma di presentazione di tale patologia nell'adulto; tale neuropatia può presentarsi o come una forma simile alla siringomielia o come una neuropatia multifocale con periodi di esacerbazione e periodi di remissione (56).

Gli studi inerenti questa malattia sono molto importanti, poiché hanno permesso di comprendere più a fondo la dinamica dei geni coinvolti nella formazione delle HDL, lipoproteine ormai universalmente valorizzate per il loro ruolo protettivo nei confronti dell'aterosclerosi. Sotto questo punto di vista i meccanismi in grado di promuovere l'efflusso di colesterolo tramite l'ABCA1 da parte delle cellule sono un campo di ricerca molto interessante,

in prospettiva, per la prevenzione delle patologie cardiovascolari. A prescindere quindi dalla malattia di Tangier in cui tali presidi terapeutici non potrebbero essere impiegati, sono in studio varie molecole che siano in grado di stimolare la sintesi del trasportatore ABCA1, attraverso il legame con l'LXR, che regola per l'appunto l'espressione del trasportatore in questione (57).

Considerazioni conclusive

I primi indizi che il colesterolo avesse un ruolo attivo nei fenomeni legati alla demenza sono emersi già negli anni '90 con la scoperta che ApoE, una apolipoproteina di fondamentale importanza nella ridistribuzione del colesterolo circolante, rappresenta con il suo polimorfismo genetico il fattore di rischio più importante di demenza di Alzheimer (36, 37). A ciò si sono aggiunte le osservazioni su cellule in coltura dove una riduzione del contenuto cellulare di colesterolo era associato ad una sostanziale riduzione della produzione di frammenti di beta amiloide. Infine, più recentemente, i dati retrospettivi sull'uso di statine e la riduzione del rischio di demenza hanno suscitato un grande interesse generale anche per i possibili risvolti clinici che queste osservazioni lasciavano immaginare (2). Le ricerche di questi ultimi anni, pur confermando in larga parte i risultati iniziali, hanno tuttavia fatto emergere come questi rapporti siano assai più complessi di quanto previsto. Anzitutto il metabolismo del colesterolo nel SNC presenta delle sostanziali peculiarità rispetto al metabolismo lipidico e lipoproteico sistemico. Il cervello è l'organo che in assoluto è più ricco di questo sterolo e nelle diverse fasi della vita il SNC è in grado di sintetizzare colesterolo in completa auto-

nomia rispetto al colesterolo circolante e quindi di modularne il metabolismo cellulare in modo estremamente accurato.

E' possibile che alterazioni metaboliche del colesterolo intracellulare possano influenzare i processi neurodegenerativi nell'anziano. Importante sarebbe individuare tra i tanti possibili attori quali possano essere i principali passaggi metabolici su cui puntare gli obiettivi terapeutici.

Al momento l'unico modello animale di danno neurodegenerativo collegato ad un'alterazione del metabolismo del colesterolo è proprio il topo NPC1. Ciò che cambia sensibilmente le manifestazioni di malattia è la modulazione del LXR. Nel caso di animali NPC1-/- a cui veniva deletato il gene LXR la sopravvivenza era drasticamente ridotta. Al contrario se all'animale NPC1 veniva somministrato un farmaco agonista LXR (T1317) si riusciva a migliorare sensibilmente la sopravvivenza e a ridurre i processi flogistici responsabili della perdita di neuroni riscontrabile in questi animali nel corso dell'invecchiamento (58).

In conclusione al momento emerge con sempre maggiore chiarezza che non è tanto il contenuto globale di colesterolo del SNC a condizionare la propensione verso fenomeni neurodegenerativi quanto piuttosto la presenza di specifici metaboliti (in particolare i diversi ossisteroli) che agiscono in determinati compartimenti cellulari in modo da influenzare i meccanismi di regolazione nucleare (LXR alfa e beta) che agiscono su più geni contemporaneamente modulando la sintesi e l'estruzione del colesterolo dalla cellula. Questo spiegherebbe perché, dopo un iniziale grande entusiasmo, gli effetti terapeutici e preventivi delle statine nella malattia di Alzheimer siano stati fortemente ridimensionati. Le statine agiscono sì in modo protettivo nei confronti della neurodegenerazione, ma assai più limitatamente rispetto alle stime

proposte nei primi studi e probabilmente con meccanismi diversi rispetto alla riduzione della sintesi del colesterolo intracellulare. Il parziale insuccesso di questi tentativi terapeutici però non deve scoraggiare. Le conoscenze attuali sono miglio-

rate ed appare sempre più chiaro lo stretto legame tra metabolismo del colesterolo e processi cellulari coinvolti nella neurodegenerazione, lasciando quindi intravedere nuovi obiettivi per il trattamento e la prevenzione della demenza nell'anziano.

RIASSUNTO

Background: Alterazioni del metabolismo intracellulare del colesterolo sono considerate causa di processi degenerativi nel sistema nervoso centrale (SNC). L'alterazione dei livelli di colesterolo intracellulare, o una modificazione della composizione della membrana plasmatica, possono probabilmente alterare i processi di signaling con conseguente degenerazione neuronale. Si credeva che la malattia di Niemann-Pick type C1 (NPC1) potesse colpire solo la fascia d'età pediatrica; recenti studi riportano come invece tale patologia possa colpire anche gli adulti e, a volte, gli anziani. Nell'adulto la particolarità della presentazione della NPC1 è data dall'aspecificità dei sintomi d'esordio. La patologia nell'anziano evolve molto lentamente con neurodegenerazione progressiva. A causa della difficoltà nella diagnosi della NPC1 nella forma adulta non esistono dati certi sull'incidenza di tale patologia.

Scopo dello studio: Abbiamo studiato e descritto un nuovo caso di NPC1 nell'adulto e individuato la mutazione sul gene NPC1. Si tratta di una doppia eterozigosi per due distinte mutazioni sinora non descritte in letteratura. Partendo da questa esperienza abbiamo analizzato le conoscenze attuali riguardanti il controllo del metabolismo intracellulare del colesterolo nel sistema nervoso centrale e l'importanza del metabolismo di tale molecola nella patogenesi di alcune patologie neurodegenerative, quali la malattia di Alzheimer (AD), la NPC1, la xantomatosi cerebrotendinea (CTX) e la malattia di Tangier.

Parole chiave: *Colesterolo, Niemann-Pick C1, Malattia di Alzheimer, Malattia di Tangier, Xantomatosi cerebrotendinea.*

Glossario

Amiloide β : maggior costituente delle placche senili, origina dalla proteina APP (Amyloid Precursor Protein) codificata in un gene del cromosoma 21.

Ossisteroli: sono prodotti dell'ossidazione del colesterolo e sono implicati in molti processi biologici inclusa l'omeostasi del colesterolo stesso, il metabolismo degli sfingolipidi, l'aggregazione piastrinica e fenomeni di apoptosi.

Malattia di Niemann Pick type C1: rara patologia a trasmissione autosomica recessiva caratterizzata da processi neurodegenerativi e dall'accumulo di lipidi a carico di vari organi. E' risultato di mutazioni a carico dei geni NPC1 o NPC2. La forma neonatale si associa a grave epatosplenomegalia. I pazienti che sopravvivono sviluppano alterazioni psicomotorie, nonché processi di neurodegenerazione con "Vertical Supranuclear Ophthalmoplegia", convulsioni, spasticità e cadute.

Xantomatosi cerebrotendinea: rara patologia degenerativa a trasmissione autosomica recessiva; è dovuta alla mutazione del gene CYP27A1. Porta ad elevati livelli plasmatici di colesanololo e aumento degli alcoli biliari nelle urine con presenza di xantomi a livello dei tendini, dei polmoni e del cervello, aterosclerosi precoce e sviluppo di infarti miocardici, atassia cerebrale progressiva, demenza, paralisi spinale, segni di coinvolgimento del sistema piramidale ed extrapiramidale.

Malattia di Tangier: in questa malattia autosomica recessiva il colesterolo viene ad accumularsi in vari organi tra i quali la milza e il fegato; i portatori presentano, inoltre, un aumentato rischio di sviluppare precocemente e in maniera importante processi di aterosclerosi. La carenza di HDL tipica di questa patologia è dovuta ad una mutazione del gene del trasportatore ABCA1 posto nel cromosoma 9.

Bibliografia

- Jin LW, Shie FS, Maezawa I, Vincent I et al. Intracellular accumulation of amyloidogenic fragments of amyloid-beta precursor protein in neurons with Niemann-Pick type C defects is associated with endosomal abnormalities. *Am J Pathol.* 2004; 164: 975-985.
- Hoyer S, Riederer P. Alzheimer disease-no target for statin treatment. A mini review. *Neurochem Res.* 2007; 32: 695-706.
- Sano M, Bell KL, Galasko D, Galvin JE et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of simvastatin to treat Alzheimer disease. *Neurology.* 2011; 9: (6) 77.
- Liu Q, Zerbinatti CV, Zhang J, Hoe HS et al. Amyloid precursor protein regulates brain apolipoprotein E and cholesterol metabolism through lipoprotein receptor LRP1. *Neuron.* 2007; 56: 66-78.
- Vaya J, Schipper HM. Oxysterols, cholesterol homeostasis, and Alzheimer disease. *J Neurochem.* 2007; 102: 1727-1737.
- Barenholz Y. Cholesterol and other membrane active sterols: from membrane evolution to "rafts". *Prog Lipid Res.* 2002; 41: 1-5.
- Gaudreault SB, Blain JF, Gratton JP, Poirier J. A role for caveolin-1 in post-injury reactive neuronal plasticity. *J Neurochem.* 2005; 92: 831-839.
- Dehouck B, Fenart L, Dehouck MP, Pierce A et al. A new function for the LDL receptor: transcytosis of LDL across the blood-brain barrier. *J Cell Biol.* 1997; 138: 877-889.
- Bjorkhem I, Lutjohann D, Diczfalussy U, Stahle L et al. Cholesterol homeostasis in human brain: turnover of 24S-hydroxycholesterol and evidence for a cerebral origin of most of this oxysterol in the circulation. *J Lipid Res.* 1998; 39:1594-1600.
- Meaney S, Hassan M, Sakinis A, Lutjohann D et al. Evidence that the major oxysterols in human circulation originate from distinct pools of cholesterol: a stable isotope study. *J Lipid Res.* 2001; 42: 70-78.
- Leoni V, Caccia C. 24S-hydroxycholesterol in plasma: a marker of cholesterol turnover in neurodegenerative diseases. *Biochimie.* 2013; 95(3): 595-612.
- Bretillon L, Siden A, Wahlund LO, Lutjohann D et al. Plasma levels of 24S-hydroxycholesterol in patients with neurological diseases. *Neurosci Lett.* 2000; 293: 87-90.
- Herz J, Strickland DK. LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor. *J Clin Invest.* 2001; 108: 779-784.
- Bogdanovic N, Bretillon L, Lund EG, Diczfalussy U et al. On the turnover of brain cholesterol in patients with Alzheimer's disease. Abnormal induction of the cholesterol-catabolic enzyme CYP46 in glial cells. *Neurosci Lett.* 2001; 314: 45-48.
- Bu G, Maksymovitch EA, Nerbonne JM, Schwartz AL. Expression and function of the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) in mammalian central neurons. *J Biol Chem.* 1994; 269: 18521-18528.
- Nixon RA. Niemann-Pick Type C disease and Alzheimer's disease: the APP-endosome connection fattens up. *Am J Pathol.* 2004; 164: 757-761.
- Maor I, Kaplan M, Hayek T, Vaya J et al. Oxidized monocyte-derived macrophages in aortic atherosclerotic lesion from apolipoprotein E-deficient mice and from human carotid artery contain lipid peroxides and oxysterols. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000; 269: 775-780.
- Chang JY, Liu LZ. Neurotoxicity of cholesterol oxides on cultured cerebellar granule cells. *Neurochem Int.* 1998; 32: 317-323.
- Kandutsch AA, Chen HW, Heiniger HJ. Biological activity of some oxygenated sterols. *Science.* 1978; 201: 498-501.
- Zhang J, Dricu A, Sjoval J. Studies on the relationships between 7 alpha-hydroxylation and the ability of 25- and 27-hydroxycholesterol to suppress the activity of HMG-CoA reductase. *Biochim Biophys Acta.* 2001; 1344: 241-249.
- Lehmann JM, Kliewer SA, Moore LB, Smith-Oliver TA et al. Activation of the nuclear receptor LXR by oxysterols defines a new hormone response pathway. *J Biol Chem.* 1997; 272: 3137-3140.
- Repa JJ, Turley SD, Lobaccaro JA, Medina J et al. Regulation of absorption and ABC1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers. *Science.* 2000; 289: 1524-1529.

23. Borst P, Elferink RO. Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annu Rev Biochem.* 2002; 71: 537-592.
24. Kivipelto M, Helkala EL, Laakso MP, Hanninen T et al. Midlife vascular risk factors and Alzheimer's disease in later life: longitudinal, population based study. *Bmj.* 2001; 2322: 1447-1451.
25. Tramontina AC, Wartchow KM, Rodrigues L, Biasibetti R et al. The neuroprotective effect of two statins: simvastatin and pravastatin on a streptozotocin-induced model of Alzheimer's disease in rats. *J Neural Transm.* 2001; 118(11): 1641-1649.
26. Kozuki M, Kurata T, Miyazaki K, Morimoto N et al. Atorvastatin and pitavastatin protect cerebellar Purkinje cells in AD model mice and preserve the cytokines MCP-1 and TNF- α . *Brain Res.* 2011; 1388:32-8.
27. Kurata T, Miyazaki K, Kozuki M, Morimoto N et al. Atorvastatin and pitavastatin reduce senile plaques and inflammatory responses in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurol Res.* 2012; 34(6): 601-610.
28. Wolozin B, Kellman W, Russeau P, Celesia GG et al. Decreased prevalence of Alzheimer disease associated with 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Arch Neurol.* 2000; 57: 1439-1443.
29. Jick H, Zornberg GL, Jick SS, Seshadri S et al.: Statins and the risk of dementia. *Lancet.* 2000; 356: 1627-1631.
30. Sparks DL, Sabbagh MN, Connor DJ, Lopez J et al. Atorvastatin for the treatment of mild to moderate Alzheimer disease: preliminary results. *Arch Neurol.* 2005; 62: 753-757.
31. Zandi PP, Sparks DL, Khachaturian AS, Tschanz J et al. Do statins reduce risk of incident dementia and Alzheimer disease? The Cache County Study. *Arch Gen Psychiatry.* 2005; 62: 217-224.
32. Rojo L, Sjoberg MK, Hernandez P, Zambrano C et al.: Roles of cholesterol and lipids in the etiopathogenesis of Alzheimer's disease. *J Biomed Biotechnol* 2006. (3) 73976.
33. Mahley RW. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science.* 1998; 240: 622-630.
34. Beffert U, Poirier J. ApoE associated with lipid has a reduced capacity to inhibit beta-amyloid fibril formation. *Neuroreport.* 1998; 9: 3321-3323.
35. Schmechel DE, Saunders AM, Strittmatter WJ, Crain BJ et al. Increased amyloid beta-peptide deposition in cerebral cortex as a consequence of apolipoprotein E genotype in late-onset Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993; 90: 9649-9653.
36. Holtzman DM, Bales KR, Tenkova T, Fagan AM et al. Apolipoprotein E isoform-dependent amyloid deposition and neuritic degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000; 97: 2892-2897.
37. Zerbinatti CV, Bu G. LRP and Alzheimer's disease. *Rev Neurosci.* 2005; 16: 123-135.
38. Huang Y: Molecular and cellular mechanisms of apolipoprotein E4 neurotoxicity and potential therapeutic strategies. *Curr Opin Drug Discov Devel* 2006; 9: 627-641.
39. Cramer PE, Cirrito JR, Wesson DW, Lee CY, et al. ApoE-directed therapeutics rapidly clear β -amyloid and reverse deficits in AD mouse models. *Science.* 2012; 335: 1503-1506.
40. Brown J, Theisler C, Silberman S, Magnuson D et al. Differential expression of cholesterol hydroxylases in Alzheimer's disease. *J Biol Chem.* 2001; 279: 34674-34681.
41. Leoni V, Shafaati M, Salomon A, Kivipelto M et al. Are the CSF levels of 24S-hydroxycholesterol a sensitive biomarker for mild cognitive impairment? *Neurosci Lett.* 2006; 397: 83-87.
42. Vega GL, Weiner MF, Lipton AM, Von Bergmann K et al. Reduction in levels of 24S-hydroxycholesterol by statin treatment in patients with Alzheimer disease. *Arch Neurol.* 2003; 60: 510-515.
43. Chiba Y, Komori H, Takei S, Hasegawa-Ishii S, et al. Niemann-Pick disease type C1 predominantly involving the frontotemporal region, with cortical and brainstem Lewy bodies: An autopsy case. *Neuropathology.* 2013 May 27. doi: 10.1111/neup.12047. [Epub ahead of print]
44. Bauer P, Balding DJ, Klünemann HH, Linden DE, et al. Genetic screening for Niemann-Pick disease type C in adults with neurological and psychiatric symptoms: findings from

- the ZOOM study. *Hum Mol Genet.* 2013 Jun 26. [Epub ahead of print]
45. Ribeiro I, Marcao A, Amaral O, Sa Miranda MC et al. Niemann-Pick type C disease: NPC1 mutations associated with severe and mild cellular cholesterol trafficking alterations. *Hum Genet.* 2001; 109: 24-32.
 46. Liscum L, Faust JR. Low Density Lipoprotein (LDL)-mediated suppression of cholesterol synthesis and LDL uptake is defective in Niemann-Pick Type C fibroblasts. *J Biol Chem.* 1987; 262: 17002-17008.
 47. Frolov A, Zielinski SE, Crowley JR, Dudley-Rucker N et al. NPC1 and NPC2 regulate cellular cholesterol homeostasis through generation of low density lipoprotein cholesterol-derived oxysterols. *J Biol Chem.* 2003; 278: 25517-25525.
 48. Vanier MT, Millat G: Niemann-Pick disease type C. *Clin Genet.* 2003; 64: 269-281.
 49. Patterson MC, Vecchio D, Prady H, Abel L et al. Miglustat for treatment of Niemann-Pick C disease: a randomised controlled study. *Lancet Neurol.* 2007; 6: 765-772.
 50. Lorincz MT, Rainier S, Thomas D, Fink JK. Cerebrotendinous xanthomatosis: possible higher prevalence than previously recognized. *Arch Neurol.* 2005; 62: 1459-1463.
 51. Dubrac S, Lear SR, Ananthanarayanan M, Balasubramaniyan N, et al. Role of CYP27A in cholesterol and bile acid metabolism. *J Lipid Res.* 2005; 46: 76-85.
 52. Axelson M, Larsson O. Low density lipoprotein (LDL) cholesterol is converted to 27-hydroxycholesterol in human fibroblasts. Evidence that 27-hydroxycholesterol can be an important intracellular mediator between LDL and the suppression of cholesterol production. *J Biol Chem.* 1995; 270: 15102-15110.
 53. Schols L, Nagele T, Schule R, Berg D. Cerebrotendinous xanthomatosis. *Neurology.* 67: E20, 2006.
 54. Berginer VM, Salen G, Shefer S. Long-term treatment of cerebrotendinous xanthomatosis with chenodeoxycholic acid. *N Engl J Med.* 1984; 311: 1649-1652.
 55. Nofer JR, Remaley AT. Tangier disease: still more questions than answers. *Cell Mol Life Sci.* 2005; 62: 2150-2160.
 56. Cai Z, Blumbergs PC, Cash K, Rice PJ et al. Paranodal pathology in Tangier disease with remitting-relapsing multifocal neuropathy. *J Clin Neurosci.* 2006; 13: 492-497.
 57. Miao B, Zondlo S, Gibbs S, Cromley D et al. Raising HDL cholesterol without inducing hepatic steatosis and hypertriglyceridemia by a selective LXR modulator. *J Lipid Res.* 2004; 45: 1410-1417.
 58. Repa JJ, Li H, Frank-Cannon TC, Valasek MA et al. Liver X receptor activation enhances cholesterol loss from the brain, decreases neuroinflammation, and increases survival of the NPC1 mouse. *J Neurosci.* 2007; 27: 14470-14480.