

AKTIVITAS *GLIAL FIBRILLARY ACIDIC PROTEIN* PADA OTAK MARMUT (*Cavia porcellus*) SEBAGAI MODEL PENYAKIT ALZHEIMER DENGAN DEPLESI HORMON TESTOSTERON

Activity of Glial Fibrillary Acidic Protein in Guinea pig (Cavia porcellus) Brain as a Model of Alzheimer's Disease with Testosterone Hormone Depletion

Yuli Purwandari K.¹, Ekowati Handharyani², Dondin Sajuthi³, dan Erni Sulistiawati⁴

¹Bagian Patologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

²Laboratorium Patologi Departemen Klinik Reproduksi dan Patologi Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor, Bogor

³Laboratorium Klinik Ilmu Penyakit Dalam Departemen Klinik Reproduksi dan Patologi Fakultas Kedokteran Hewan

Institut Pertanian Bogor, Bogor

⁴Laboratorium Patologi Pusat Studi Satwa Primata Institut Pertanian Bogor, Bogor

E-mail: yuli.purwandari@yahoo.co.id

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan mengarakterisasi marmut sebagai hewan model untuk penyakit Alzheimer dengan mengamati histopatologis otak dan aktivitas seluler *glial fibrillary acidic protein* (GFAP) pada otak yang diakibatkan oleh depleksi hormon testosteron. Dua belas marmut dibagi dua kelompok berdasarkan umur, yaitu enam marmut umur 16-32 bulan dan enam marmut umur 32-48 bulan. Depleksi testosteron dilakukan dengan cara kastrasi. Dua marmut dari setiap kelompok di nekropsikan untuk koleksi sampel otak pada waktu satu, tiga, dan lima bulan setelah kastrasi. Bagian otak yang diambil adalah korteks, lobus parietalis, temporalis, dan hipokampus. Sampel otak dilakukan evaluasi patologis dengan pewarnaan hematoxililin dan eosin dan imunohistokimia dengan antibodi GFAP. Hasil penelitian menunjukkan bahwa depleksi testosteron dapat menyebabkan kerusakan otak yang ditandai oleh kematian sel neuron, peningkatan aktivitas sel-sel glia dan ekspresi GFAP pada jaringan otak. Kesimpulan penelitian adalah penurunan kadar testosteron dalam plasma darah menyebabkan terjadinya kematian sel neuron dan peningkatan aktivitas sel-sel glia pada otak.

Kata kunci: penyakit Alzheimer, testosteron, marmut, GFAP, neurodegenerasi

ABSTRACT

This aimed of this study to characterize the guinea pig as an animal model for Alzheimer's disease by observing brain histopathology and cellular activity of *glial fibrillary acidic protein* (GFAP) caused by testosterone hormone depletion. Twelve male of guinea pigs (*Cavia porcellus*) were divided into two groups based on age, six animals on 16-32 months and six animals on 32-48 months. Both group had testosterone depletion as a result of castration. Two animals of each group underwent necropsy to collect the brain for cellular evaluation on first, third and fifth month after castration. Brain samples of cortex, parietal lobe, temporal and hippocampus were done by macroscopic and microscopic evaluation through Hematoxylin & Eosin staining and immunohistochemistry with GFAP. The results showed that depletion of testosterone can cause brain damage characterized by neuronal cell death, increased activity of glial cells and GFAP expression in brain tissue. Conclusion of this study was reduction of the testosterone level in the blood plasma caused neuron cell death and increased activity of glial cells in the brain.

Key words: Alzheimer's disease, testosterone, guinea pig, GFAP, neurodegenerative

PENDAHULUAN

Alzheimer's disease (AD) merupakan penyakit neurodegeneratif yang bersifat *irreversible*, dan ditandai dengan kehilangan memori serta gangguan memori yang bersifat progresif. Penyakit ini menyerang pada lebih dari 35 juta penduduk di dunia dan 5,5 juta penduduk di USA serta merupakan penyebab kematian terbesar ke-4 di wilayah tersebut. Risiko terjadinya AD meningkat sejalan dengan pertambahan umur dan prevalensinya meningkat dua kali setiap pertambahan umur 5 tahun pada umur di atas 65 tahun (Hirtz *et al.*, 2007). Bentuk paling umum dari penyakit ini adalah demensia sedangkan perubahan patologis yang dapat diamati berupa penurunan memori dalam waktu yang singkat (Grabowski dan Damasio, 2004).

Hormon testosteron merupakan salah satu hormon yang penting dalam pengaturan organ reproduksi dan

tingkah laku seksual pada laki-laki (Campbell dan Reece, 2002). Sejalan dengan pertambahan umur pada laki-laki akan terjadi penurunan level testosteron yang signifikan. Penurunan testosteron dimulai pada dekade ketiga antara 0,2-1% per tahun, termasuk dihidrotestosteron dan androstenedion sejalan dengan bertambahnya umur pada laki-laki (Feldman *et al.*, 2002). Hal ini sejalan dengan faktor lain yang dapat meningkatkan resistensi terhadap androgen, seperti peningkatan *sex hormone binding globulin* (SHBG) terhadap ketuaan dan dapat menyebabkan terjadinya gejala defisiensi androgen yang dikenal dengan andropouse (Haren *et al.*, 2002). Penurunan ini menyebabkan gangguan fungsi pada organ yang responsif terhadap androgen seperti tulang, otot, dan jantung (Ferrando *et al.*, 2002) dan otak (Gooren, 2003). Berdasarkan pengamatan gejala klinis, level testosteron juga berhubungan dengan AD. Beberapa studi telah melaporkan bahwa terjadi perubahan pada

keadaan hati, libido, dan aspek kognisi akibat penurunan level androgen (Morley, 2001; Gooren, 2003; Kaufman dan Vermeulen, 2005).

Sel glia pada otak terdiri atas oligodendroglia, astroglia, dan mikroglia. Mikroglia merupakan makrofag dalam sistem susunan saraf pusat. Sel ini berasal dari mesodermal/mesenkimal dan bermigrasi ke seluruh sistem susunan saraf pusat, kemudian menyebar ke daerah parenkim otak. Melalui *signaling pathways* sel mikroglia berkomunikasi dengan neuron dan sistem kekebalan tubuh. Astrofit merupakan sel glial utama pada sistem saraf pusat dan berperan penting dalam fungsi fisiologis otak. Neuron astrofit berperan dalam mempertahankan homeostasis pada sistem saraf pusat melalui pelepasan faktor neurotropik dan kemungkinan bertindak sebagai sel imunokompeten pada otak (Dong dan Benveniste, 2001). Astrofit terlibat aktif dalam transmisi sinaps antar neuron. Pada respons terhadap kerusakan otak dan neurodegenerasi, astrofit mengalami perubahan secara morfologi dan fungsi. Proses ini disebut astrogliosis. Astrogliosis juga ditemukan di sekitar plak pada otak yang mengalami AD. Perubahan pada astrofit berperan dalam penurunan transmisi sinaps pada AD. Astrofit bereaksi terhadap berbagai proses neurogeneratif dan memicu astrogliosis (Eng *et al.*, 1992). Aktivasi astrofit terlibat pada patogenesis berbagai penyakit neurodegeneratif, seperti AD, penyakit keradangan pada mielin, *human immunodeficiency virus* (HIV) yang berhubungan dengan demensia, trauma akut pada otak dan spongiform encephalopathies. Sel glia dan astrofit serta mikroglia berperan penting dalam pembentukan *senile* plak (Griffin *et al.*, 1997). Astrofit menghasilkan substansi neurotoksik setelah teraktivasi dan meningkatkan level *glial fibrillary acidic protein* (GFAP) sebagai *marker* protein untuk astrogliosis (Eng *et al.*, 1994). Aktivitas astrofit atau astrogliosis dipicu oleh hambatan proteosom dari peptida β amiloid. Peptida ini merupakan komponen utama plak ekstraseluler pada otak penderita AD.

Penelitian ini bertujuan mengkaraktisasi marmut sebagai hewan model untuk AD dengan mengamati histopatologis otak dan aktivitas seluler GFAP pada otak yang diakibatkan oleh deplesi hormon testosteron. Penelitian ini dilakukan dengan mempelajari gambaran histopatologi otak marmut bagian korteks, lobus parietalis, temporalis dan hipokampus dengan teknik pewarnaan hematoxilin dan eosin dan imunohistokimia menggunakan monoklonal antibodi GFAP pada otak marmut.

MATERI DAN METODE

Penelitian ini dilakukan di tiga tempat yaitu fasilitas hewan kecil PT. Indoanilab Taman Kencana Bogor untuk prosedur observasi hewan percobaan, Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Hewan IPB untuk pemeriksaan histopatologis otak, dan Laboratorium Patologi dan Laboratorium

Mikrobiologi Pusat Studi Satwa Primata IPB untuk nekropsis hewan dan pengambilan sampel otak. Dua belas marmut jantan (*Cavia porcellus*) dibagi berdasarkan umur yaitu paruh baya (16-32 bulan) sebanyak 6 ekor sebagai kelompok I dan umur tua (32-48 bulan) sebanyak 6 ekor sebagai kelompok II. Hewan ditempatkan pada kandang individu, pemberian minum ad libitum dengan penambahan vitamin C, pakan berupa pelet produksi PT. Indofeed, Jakarta, Indonesia. Hewan coba dikastrasi untuk menurunkan level hormon testosteron. Pengamatan dilakukan secara bertahap dengan cara melakukan eutanasia dari setiap kelompok pada periode satu, tiga, dan lima bulan setelah kastrasi masing-masing sebanyak 2 ekor.

Intervensi pada Hewan Coba

Kastrasi dilakukan dengan mengangkat testis (orkidektomi) untuk menurunkan level testosteron dalam tubuh agar terjadi kondisi deplesi testosteron. Teknik operasi kastrasi dilakukan menurut Anderson and Froimovitch (1974), yaitu hewan dipuasakan 2-4 jam sebelum pembedahan, air minum tetap disediakan. Hewan coba dianestesi menggunakan ketamin (50 mg/kg bobot badan IP) dan *xylazine* (5 mg/kg bobot badan IM/IP). Penelitian ini dilakukan atas persetujuan dan pengawasan komisi etik hewan *Animal Care and Use Committee* (ACUC) No. 12-IA-ACUC-001, PT. Indoanilab Taman Kencana, Bogor.

Koleksi Sampel

Sampel otak diambil dan dimasukkan dalam *buffer normal formalin* (BNF) 10% selama 24 jam. Organ otak dipotong pada 1/3 bagian belakang setebal 3-5 mm sehingga diperoleh korteks, lobus parietalis, lobus temporalis, dan hipokampus untuk analisis histopatologi dengan pewarnaan hematoxilin dan eosin (HE) dan imunohistokimia.

Pengecatan Hematoxilin dan Eosin

Jaringan otak yang dipotong setebal 3-5 mm, dimasukkan ke dalam larutan etanol secara bertingkat: etanol 80% 1 kali, etanol 95% 2 kali dan etanol 100% 3 kali masing-masing selama 60 menit dan dicetak dengan parafin. Sediaan dalam parafin dipotong setebal 4-5 μ m dengan mikrotom dan ditempatkan pada gelas obyek dan dibiarkan kering untuk pewarnaan HE. Selanjutnya tahapan dehidrasi yaitu preparat dimasukkan larutan *xylene* 2x selama 5 menit, dimasukkan ke alkohol bertingkat etanol 100%, etanol 95%, etanol 80%, etanol 70% masing-masing 3 menit. *Slide* dimasukkan dalam larutan hematoxilin selama 10 menit, dibilas dengan air, dimasukkan *acid alcohol* 3-10 kali, dibilas air mengalir selama 15 menit. Kemudian dimasukkan dalam larutan eosin 3 menit, dilanjutkan etanol 70%, etanol 80%, etanol 95%, larutan etanol absolut masing-masing 3 menit dan direndam dalam *xylene* 3 kali masing-masing 3 menit dan ditutup dengan *entellan*.

Pewarnaan Immunohistokimia

Antibodi primer yang digunakan adalah antibodi monoklonal tikus untuk GFAP (Santa Cruz Technology Inc., USA). Potongan jaringan dilakukan *blocking* dengan endogenus peroksidase yang diaktivasi dengan 0,3% H₂O₂ pada metanol selama 30 menit pada suhu ruang. Ikatan reagen non-spesifik diblok dengan 1% *fetal bovine serum* pada PBS selama 30 menit dengan suhu ruangan. Potongan jaringan diinkubasi dengan antibodi primer GFAP (1:50) semalam pada suhu 4° C. Setelah dicuci PBS 3x, *slide* diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruangan dengan *biotinylated secondary antibody* (LSAB, Dako) selama 30 menit, ditambahkan streptavidin-HRP selama 30 menit pada suhu ruang dan diberikan substrat kromogen 3,3-diaminobenzidine (DAB) (Dako LSAB+System-HRP, USA). *Slide* dicuci pada air mengalir dan diberikan *background staining* dengan hematoxilin, dan dilakukan rehidrasi serta ditutup dengan *entellan*. Jaringan diamati di bawah mikroskop cahaya dengan perbesaran obyektif 40x pada lima lapang pandang. Reaksi positif GFAP ditandai dengan reaksi warna kecoklatan.

Analisis Data

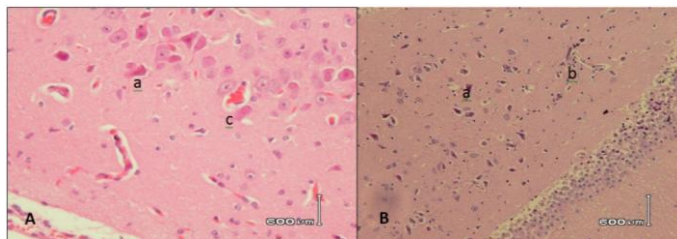
Hasil pemeriksaan terhadap perubahan patologis otak baik secara makroskopis dan dengan menggunakan teknik pewarnaan HE dan imunohistokimia dianalisis secara deskriptif semi

kuantitatif. Perhitungan jumlah sel glia dilakukan pada lima bidang pandang masing-masing bagian otak menggunakan program Image J.

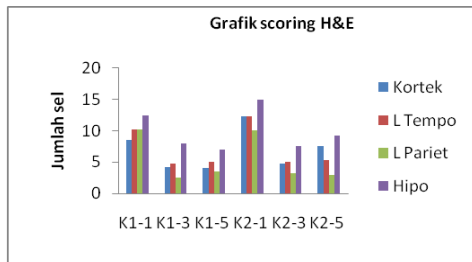
HASIL DAN PEMBAHASAN

Berdasarkan pengamatan secara makroskopis, otak tidak menunjukkan adanya perubahan patologis yang spesifik akibat deplesi hormon testosteron yang dilakukan dengan kastrasi pada marmut selama 1, 3, dan 5 bulan. Otak tampak utuh, simetris bagian kanan dan kiri, tidak tampak adanya atrofi, infark, dan lesi yang lain. Menurut Esiri dan Morris (2004), gambaran makroskopis otak pada kasus AD akan menunjukkan perubahan berupa fokal atrofi dan lesi pada beberapa bagian otak dengan pelebaran dari sulkus terutama pada lobus frontalis dan temporalis. Namun demikian, pengamatan beberapa bagian otak secara mikroskopis dengan pewarnaan HE menunjukkan adanya perubahan pada sel neuron otak. Perubahan histopatologis otak dengan pewarnaan HE disajikan pada Gambar 1. Grafik perhitungan jumlah kematian sel neuron dari masing-masing kelompok perlakuan disajikan pada Gambar 2.

Gambar 1 dan Gambar 2 menunjukkan bahwa gambaran histopatologis otak terutama di daerah hipokampus dari marmut yang dikastrasi mengalami degenerasi dan kematian sel neuron serta terlihat peningkatan aktivitas sel-sel glia (gliosis). Kematian neuron ditandai dengan sel yang berwarna merah,



Gambar 1. Histopatologis otak pada bagian korteks dan hipokampus marmut yang dikastrasi. A= Terlihat adanya sel neuron yang mengalami nekrosis (a), kromatolisis (c) pada otak bagian korteks. B= Kematian sel neuron (a) dan gliosis pada hipokampus (b) (HE, 20x).



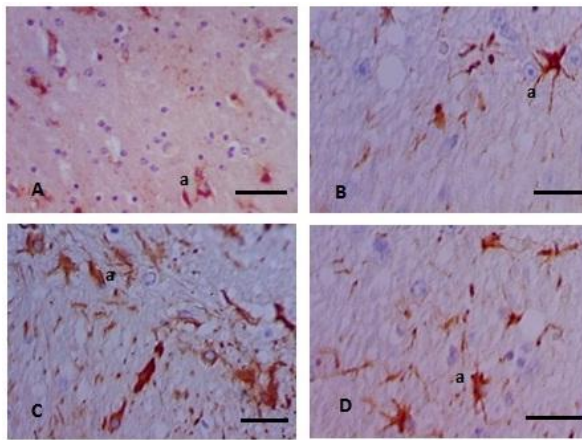
Gambar 2. Jumlah sel neuron yang mengalami kematian sel (nekrosis) pada masing-masing bagian otak dari dua kelompok perlakuan

angular, inti padat, dan sitoplasma berwarna eosinofilik. Hal ini menunjukkan bahwa penurunan level testosteron pada sirkulasi dan otak memengaruhi viabilitas sel neuron. Berdasarkan penelitian yang dilakukan Yuli *et al.* (2013), hasil pengukuran level testosteron tersebut membuktikan bahwa kastrasi yang dilakukan pada marmut menyebabkan penurunan hormon testosteron pada hewan sebesar 70-80% dalam plasma darah. Hal ini disebabkan bahwa hormon ini dihasilkan 95% oleh sel Leydig di dalam testis, selain itu dihasilkan oleh korteks adrenal dari kelenjar adrenal. Testosteron dapat memengaruhi fungsi dan struktur sistem saraf pusat. Aksi neuronal dari androgen adalah mengatur viabilitas neuron selama perkembangan apoptosis (Lund *et al.*, 2000). Testosteron diubah menjadi estradiol oleh enzim aromatase melalui proses aromatisasi (Norman dan Litwack, 1987). Hormon testosteron mempunyai efek seluler melalui tiga jalur yaitu aksi langsung melalui aktivasi *androgen reseptor dependent pathways*, secara tidak langsung melalui jalur estrogen melalui aromatisasi estradiol, dan aksi secara tidak langsung melalui jalur gonadotropin dengan memodulasi testosteron dari *axis gonad hypothalamic-pituitary*. Testosteron merupakan hormon androgen yang merupakan senyawa steroid yang mengikat dan mengaktifkan inti *androgen receptor* (AR) dan memengaruhi fungsi neuron melalui transkripsi gen

(McPhaul dan Young, 2001). Morfologi neuron pada daerah hipokampus sangat sensitif terhadap perubahan level androgen. *Androgen receptor* diekspresikan pada level tinggi dari area otak yang penting pada fungsi kognisi seperti hipokampus, amigdala dan korteks serebrum pada rodensia (Simerly *et al.*, 1990) dan level AR pada otak dimodulasi oleh androgen (Lu *et al.*, 1998). Densitas dari sinaps dendritik pada CA1 hipokampus meningkat oleh pemberian *dihydrotestosteron* (DHT) pada tikus betina ovariectomi (Leranth *et al.*, 2004) dan pemberian androgen pada tikus neonatal betina meningkatkan volume dentatus girus hipokampus dewasa (Isgor dan Sengelaub, 1998).

Hasil pewarnaan imunohistokimia terhadap ekspresi dan kepadatan sel glia pada daerah otak diamati dengan menggunakan antibodi GFAP. Protein GFAP menunjukkan bahwa terdapat adanya perbedaan kepadatan sel glia pada masing-masing daerah otak yaitu lobus temporalis, parietalis, dan hipokampus. Otak marmut yang dikastrasi mengalami peningkatan aktivitas sel-sel glia. Hasil pewarnaan imunohistokimia dengan antibodi GFAP otak dapat disajikan pada Gambar 3 sedangkan jumlah sel-sel glia pada masing-masing bagian otak disajikan pada Tabel 1.

Gambar 3 menunjukkan bahwa otak marmut yang dikastrasi mengalami peningkatan aktivitas sel-sel glia yang diamati menggunakan antibodi GFAP. Hasil pewarnaan imunohistokimia menunjukkan bahwa



Gambar 3. Aktivitas sel-sel glia pada berbagai potongan otak dengan pewarnaan imunohistokimia dengan antibodi GFAP. A= Lobus parietalis normal; B= Lobus temporalis normal; C= Lobus parietalis pada otak kastrasi; D= Lobus temporalis pada otak kastrasi, terlihat adanya peningkatan jumlah sel-sel glia (a), GFAP, 40x, Bar= 500 µm

Tabel 1. Rata-rata jumlah sel-sel glia pada bagian otak

Kode hewan	Rata-rata jumlah sel glia tiap potongan otak			
	Hipokampus	Lobus parietalis	Lobus temporalis	Korteks
Normal	5	20,6	31,0	8,6
Kastrasi	16,9	34,2	44,5	14,8

terdapat perbedaan kepadatan sel glia pada masing-masing daerah otak yaitu lobus temporalis, parietalis, dan hipokampus. Jumlah sel glia pada hewan yang dikastrasi dengan normal juga terdapat perbedaan. Hal ini terjadi disebabkan karena pada otak hewan yang dikastrasi sel neuron banyak mengalami kematian sel. Astrogliosis meningkatkan ekspresi dari GFAP dan filamen pembentuk sitoskeleton dari astrosit (Kamphuis, 2013). Protein GFAP merupakan protein utama dari sel glia dan struktur sitoskeleton utama pada astrosit. *Entorhinal cortex* sebagai fungsi utama memori dan salah satu area utama pada otak yang mengalami AD dan merupakan jaringan yang ideal untuk mengamati perubahan degeneratif. Protein GFAP dan vimentin meningkat pada umur tua dan AD. Pada pemeriksaan imunohistokimia menunjukkan bahwa reaktif astrosit terutama berhubungan dengan *neurofibrillary tangles* dan *senile* plak pada bagian dalam *entorhinal cortex* (Porchet *et al.*, 2003). Peningkatan ekspresi GFAP menunjukkan aktivitas astrogliosis dan gliosis selama proses neurodegenerasi. Peningkatan GFAP juga dapat terjadi di bagian perifer lesi iskemia setelah neurodegenerasi. *Senile* plak sebagai tanda patologis dari AD berhubungan dengan GFAP dan aktivitas astrosit (Nagele *et al.*, 2004). Namun demikian mekanisme peningkatan ekspresi GFAP secara molekuler pada neurodegeneratif sistem saraf pusat belum begitu banyak diketahui. Berdasarkan perhitungan rata-rata sel glia pada masing-masing bagian otak marmut normal dan dikastrasi terdapat peningkatan jumlah sel glia. Analisis statistik dengan uji analisis varian menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan pada otak normal dan kastrasi ($P < 0,05$). Hal tersebut menunjukkan bahwa penurunan level hormon testosteron dapat meningkatkan aktivitas dari sel glia. Penurunan level testosteron dengan kastrasi menyebabkan viabilitas sel neuron, sehingga neuron mengalami kematian sel (nekrosis). Nekrosis sel neuron menimbulkan peningkatan aktivitas dari sel-sel glia. Sel glia pada otak terdiri atas oligodendroglia, astrogliosis dan mikroglia. Mikroglia merupakan makrofag dalam sistem susunan saraf pusat. Sel ini berasal dari mesodermal/ mesenkimal dan bermigrasi ke seluruh sistem susunan saraf pusat, kemudian menyebar ke daerah parenkim otak. Melalui *signaling pathways* sel mikroglia berkomunikasi dengan neuron dan sistem kekebalan tubuh. Adanya lesi pada daerah otak atau disfungsi sistem saraf, mikroglia mengalami proses aktivasi kompleks dan mikroglia berubah menjadi mikroglia yang diaktifkan. Mikroglia yang telah diaktifkan dapat bermigrasi pada daerah otak yang mengalami kerusakan, berproliferasi dan menfagosit sel serta kompartemen seluler (Ketteman *et al.* 2011). Astrosit merupakan sel glial utama pada sistem saraf pusat dan berperan penting dalam fungsi fisiologis otak. Neuron astrosit berperan dalam mempertahankan homeostasis pada sistem saraf pusat melalui pelepasan faktor neurotropik dan kemungkinan bertindak sebagai sel imunokompeten pada otak (Dong dan Benveniste 2001). Astrosit terlibat aktif dalam transmisi sinap antar neuron. Pada respons terhadap kerusakan otak dan

neurodegenerasi, astrosit mengalami perubahan secara morfologi dan fungsi.

KESIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa penurunan kadar testosteron dalam plasma darah menyebabkan terjadinya kematian sel neuron (nekrosis), peningkatan aktivitas sel-sel glia dan ekspresi terhadap GFAP pada jaringan otak.

DAFTAR PUSTAKA

- Anderson, M. and P. Froimovitch. 1974. Simplified method of guinea pig castration. *Can. Vet. J.* 15(4):126-127.
- Campbell, N.A. and J.B. Reece. 2002. *Biology*. 6th ed. Benjamin Cummings Publisher, San Francisco.
- Dong, Y. and E.N. Benveniste. 200. Immune function of astrocytes. *Glia*. 36:180-190.
- Eng, L.F. and R.S. Ghimikar. 1994. GFAP and astrogliosis. *Brain Pathol.* 4:229-237.
- Eng, L.F., A.C. Yu, and Y.L. Lee. 1992. Astrocytic response to injury. *Prog. Brain Res.* 94:353-365.
- Esiri, M.M. and J.H. Morris. 2004. *Practical Approach to Pathological Diagnosis in the Neuropathology of Dementia*. 2nd ed. Cambridge University Press, USA.
- Feldman, H.A., C. Longcope, C.A. Derby, C.B. Johannes, A.B. Araujo, A.D. Coviello, W.J. Bremner, and J.B. McKinlay. 2002. Age trends in the level of serum testosterone and other hormones in middle-aged men: Longitudinal results from the Massachusetts male aging study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87:589-598.
- Ferrando, A.A., M. Sheffield-Moore, C.W. Yeeckel, C. Gilkison, J. Jiang, A. Achacosa, S.A. Lieberman, K.Tipton, R.R. Wolfe, and R.J. Urban. 2002. Testosterone administration to older men improves muscle function: molecular and physiological mechanisms. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 282:E601-607.
- Gooren, L. 2003. Androgen deficiency in the aging male: benefits and risks of androgen supplementation. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 85:349-355.
- Grabowski, T.J. and A.R. Damasio. 2004. Definition, Clinical Features and Neuroanatomical Basis of Dementia. In *The Neuropathology of Dementia*. Esiri, M.M., M. Virginia, Y. Lee, and J.Q. Trojanowski (Eds.). 2nd ed. Cambridge University Press, USA.
- Griffin, W.S.T., J.G. Sheng, and R.E. Mark. 1997. Inflammatory Pathways: Implications in Alzheimer's Disease. In *Molecular Mechanisms of Dementia*. Wasco, W. and R.E. Tanzi (Eds.). Human Press, Totowa NJ, USA.
- Haren, M.T., J.E. Morley, I.M. Chapman, O'Loughlin, and G.A. Witter. 200 2. Defining 'relative' androgen deficiency in aging men: how should testosterone be measured and what are the relationship between androgen and physical, sexual and emotional health?. *Climacteric*:15-25.
- Hirtz, D., D.J. Thurman, K. Gwinn-Hardy, M. Mohamed, A.R. Chaudhuri, and R. Zalutsky. 2007. How common are the "common" neurologic disorders? *Neurology*. 68:326-337.
- Isgor, C. and D.R. Sengelaub. 1998. Prenatal gonadal steroids affect adult spatial behavior, CA1 and CA3 pyramidal cell morphology in rats. *Horm. Behav.* 34:183-198.
- Kamphuis, W. 2013. Astrocytes and Alzheimer's disease. www.nin.knaw.nl.
- Kaufman, J.M. and A. Vermeulen, A. 2005. The decline of androgen levels in elderly men and its clinical and therapeutic implications. *Endocr. Rev.* 26:833-876.
- Ketteman, H., U.K. Harnisch, M. Noda, and A. Verkhratsky. 2011. Physiology of microglia. *Physiol. Rev.* 91:461-553.
- Leranth, C., J. Prange-Kiel, K.M. Frick, and T.L. Horvath. 2004. Low CA1 spine synapse density is further reduced by castration in male non-human primates. *Cereb. Cortex*. 14:503-510.
- Lu, S.F., S.E. McKenna, A. Cologer-Clifford, E.A. Nau, and N.G. Simon. 1998. Androgen receptor in mouse brain: Sex differences and similarities in autoregulation. *Endocrinol.* 139:1594-1601.

- Lund, T.D., L.R. Hinds, and R.J. Handa. 2000. The androgen 5 α -dihydrotestosterone and its metabolite 5 α -androstane-3 β , 17 β -diol inhibit the hypothalamo-pituitary-adrenal response to stress by acting through estrogen receptor beta-expressing neurons in the hypothalamus. *J. Neurosci.* 26:1448-1456.
- McPhaul, M. and M. Young. 2001. Complexities of androgen action. *J. Am. Acad. Dermatol.* 45:S87-94.
- Morley, J.E. 2001. Androgens and aging. *Maturitas.* 38:61-71.
- Nagele, R.G., J. Wegiel, V. Venkataraman, H. Imaki, K.C.Wang. 2004. Contribution of glial cells to the development of amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging.* 25:663-674.
- Norman, A.W. and G. Litwack. 1987. *Hormones.* Academic Press, London.
- Porchet, R., A. Probst, C. Bouras, E. Draberova, P. Draber, and B.M. Riederer. 2003. Analysis of glial acidic fibrillary protein in the human entorhinal cortex during aging and in Alzheimer's disease. *Proteomics.* 3:1476-1485.
- Simerly, R.B., C. Chang, M. Muramatsu, and L.W. Swanson. 1990. Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: An in situ hybridization study. *J. Comp. Neurol.* 294:76-95.
- Yuli, P.K., E. Handharyani, D. Sajuthi, and E. Sulistiawati. 2013. Beta amyloid cellular expression in guinea pig (*Cavia cobaya*) brain with steroid hormone depletion in the Alzheimer's disease study. *G.J.B.A.H.S.* 2(4):155-159.