View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk

brought to you by CORE

provided by Electronic Thesis and Dissertation Archive - Università di Pisa



DIPARTIMENTO DI MEDICINA CLINICA E SPERIMENTALE

CORSO DI LAUREA SPECIALISTICA IN MEDICINA E CHIRURGIA

TESI DI LAUREA

" RUOLO DIAGNOSTICO DEI BIOMARCATORI LIQUORALI NELLA MALATTIA DI ALZHEIMER "

Relatore:
Prof. Ubaldo Bonuccelli

Candidato:
Alessio Novelli

Anno Accademico 2012/2013

Indice

Riassunto..... 5

1. Le demenze..... 8

- Cenni storici 8
- Definizione 9
- Epidemiologia 9
- Classificazione 10

2. Malattia di Alzheimer..... 12

- Informazioni generali 12
- Neuropatologia 13
- Eziopatogenesi 15
- Aspetti clinici 21
- Varianti della Malattia di Alzheimer 22
- Diagnosi 24

3. Biomarcatori liquorali..... 32

- Il liquido cefalo-rachidiano 32
- Relazioni tra il liquor e il liquido extra-cellulare 33
- I biomarcatori liquorali nella diagnosi delle demenze 33

4. Obiettivi..... 36

5. Materiali e Metodi..... 37

- Caratteristiche dei pazienti 37
- Determinazione delle proteine nel liquor 38
- Interpretazione dei valori dei tre parametri 40
- Analisi statistica 41

6. Risultati..... 42

- Dati demografici 42
- Risultati dell'analisi del liquor 44
- Confronto tra i macro-gruppi "Alzheimer" e "Non-Alzheimer" 47
- Confronto tra le singole categorie diagnostiche 49
- Interpretazione grafica dei risultati 49
- Accordo tra il profilo dei biomarcatori liquorali e la diagnosi clinica 52
- Rivalutazione della diagnosi 55
- Correlazione con età, durata e gravità di malattia 57

7. Discussione..... 58

- Proteina β-amiloide 58
- Proteina t-tau 59
- Proteina p-tau 61
- Combinazione dei biomarcatori 62
- Conclusioni 63

Bibliografia..... 66

Appendice..... 80

- Mini-Mental State Examination (MMSE) 80
- Activities of Daily Living (ADL) 82
- Instrumental Activities of Daily Living (IADL) 83
- Neuro-Psichiatric Inventory (NPI) 84

Ringraziamenti..... 98

Riassunto

La Malattia di Alzheimer (MA) rappresenta un grande problema personale, sociale ed economico, destinato ad aggravarsi, in parallelo con l'incremento dell'aspettativa di vita e dell'età media della popolazione.

Attualmente, la diagnosi della malattia di Alzheimer (come degli altri tipi di demenze) è basata sulla clinica e sul follow-up, con l'importante ausilio delle tecniche di neuro-imaging.

Tuttavia, demenze di diversa origine possono manifestarsi con quadri clinici ampiamente sovrapponibili; inoltre, l'insorgenza di sintomi e segni clinici rappresenta un evento piuttosto tardivo nella storia naturale della malattia, dal momento che il processo patologico resta per molti anni a livello subclinico. Gli esami strumentali ad oggi disponibili sono molto utili, ma non dotati di assoluta specificità.

Per queste ragioni, la diagnosi di queste patologie è spesso posta con un certo ritardo, e non sono infrequenti gli errori diagnostici, soprattutto nelle fasi iniziali della malattia; particolarmente difficile è la diagnosi differenziale tra demenze che si presentano con quadro clinico simile (ad esempio, malattia di Alzheimer e variante comportamentale della demenza frontotemporale). Questo problema assume importanza ancora maggiore in relazione alla possibile introduzione di terapie eziologiche per la malattia di Alzheimer, per cui diventerebbe essenziale raggiungere una diagnosi quanto più possibile accurata e precoce.

È in quest'ottica che si pone lo studio dei biomarcatori liquorali nella diagnosi delle demenze. I biomarcatori liquorali sono proteine presenti nel liquido cefalo-rachidiano, dotate dell'importante caratteristica di essere correlate con il substrato patologico della malattia. Variazioni nei livelli di queste proteine nel

liquor, quindi, possono indicare il processo neurodegenerativo in atto, di conseguenza il loro dosaggio può essere utilizzato a fini diagnostici.

La proteina amiloide-β42 (Aβ42), la proteina tau (total tau, t-tau) e la proteina tau fosforilata (phosphorilated tau, p-tau) sono i tre biomarcatori liquorali più largamente studiati. È stato dimostrato che, grazie al dosaggio di queste proteine, è possibile distinguere, anche precocemente, la MA da altre forme di demenza. Gli studi fino ad oggi condotti hanno chiarito che alla MA si associa un profilo tipico dei biomarcatori liquorali, vale a dire Aβ42 ridotta, t-tau aumentata e p-tau aumentata. Tuttavia, non è nota con precisione l'accuratezza diagnostica di detti marcatori, motivo per cui non è possibile, ad oggi, attribuire loro una precisa funzione nella diagnosi delle demenze.

Partendo da questi presupposti, la presente tesi mira ad indagare il ruolo diagnostico dei biomarcatori liquorali nella diagnosi della MA, soprattutto in relazione all'applicazione nella pratica clinica, attraverso uno studio condotto su una coorte di pazienti con decadimento cognitivo.

Sono stati retrospettivamente valutati i livelli di Aβ42, t-tau and p-tau di 47 pazienti, che avevano ricevuto, sulla base del quadro clinico, psicometrico, neuroradiologico e funzionale (mediante esecuzione di PET con FdG), una diagnosi clinica di Malattia di Alzheimer (AD, 17 casi), Atrofia Corticale Posteriore (PCA, 2 casi), Afasia Logopenica (LPA, 3 casi), Afasia Progressiva Non Fluente o Demenza Semantica (PNFA o SD, 5 casi), Demenza Fronto-Temporale (FTD, 12 casi), Demenza da corpi di Lewy (DLB, 4 casi), Degenerazione Corticobasale (CBD, 1 caso) e Disturbo Cognitivo Funzionale (FCD, 3 casi). I pazienti con diagnosi clinica di AD, PCA e LPA, sono stati riuniti nella macro-categoria "Alzheimer", ed i pazienti con diagnosi clinica di PNFA/SD, FTD, DLB, CBD e FCD, nella macro-categoria "Non-Alzheimer".

I risultati dello studio confermano che il profilo dei biomarcatori liquorali è in grado di distinguere demenze Alzhiemer-correlate (ossia demenze il cui substrato neuropatologico è quello caratteristico della malattia di Alzheimer) rispetto a demenze di altra origine. Il profilo dei biomarcatori liquorali è risultato in accordo con la diagnosi clinica nel 74% dei casi (35 pazienti su 47). Nel macro-gruppo Alzheimer, la concordanza tra diagnosi clinica e profilo liquorale si è osservata in 19 pazienti su 22 (86%). Nel macro-gruppo Non-Alzheimer, in 16 casi su 25 (64%) il profilo dei marcatori liquorali è risultato in accordo con la diagnosi clinica, mentre in 9 casi su 25 (36%) è risultato in disaccordo. Per i casi non concordanti (12 pazienti), è stata effettuata una rivalutazione della diagnosi, anche in base al follow-up, e tale rivalutazione ha portato al cambiamento della diagnosi iniziale in 6 casi (1 del macro-gruppo Alzheimer e 5 del macro-gruppo Non-Alzheimer).

In conclusione, i biomarcatori liquorali si sono dimostrati un importante ausilio diagnostico, in particolare nei pazienti con diagnosi iniziale di demenze non-Alzheimer, dove sono più frequenti le misdiagnosi.

1. Le demenze

Cenni storici

Il termine "Demenza" è stato utilizzato per la prima volta in ambito medico da Aulo Cornelio Celso, nel *De Medicina* (I secolo d.C.), ad indicare una generica alterazione dell'intelligenza e del comportamento.

Nel 1814, lo psichiatra francese Esquirol avvicinò la definizione di demenza a quella attuale, identificando con essa un quadro clinico caratterizzato da perdita della memoria, della capacità di giudizio e dell'attenzione.

Grazie ai contributi di numerosi studiosi (Huntington, Pick, Alzheimer, Perusini, Jakob e Creutzfeld) e alla scoperta delle alterazioni anatomo-patologiche tipiche della maggior parte delle demenze, si iniziò a considerare le demenze come disturbi cognitivi su base organica (ossia correlati ad un processo neuropatologico primario).

L'interesse scientifico per le demenze, comunque, è rimasto a lungo limitato, in quanto erano considerate in modo aspecifico, come un processo legato all'invecchiamento, o come una "via finale comune" di svariate patologie.

A partire dalla fine degli anni Settanta del secolo scorso, lo studio delle demenze ha subìto un notevole impulso, sotto la spinta di molteplici fattori: l'aumento della vita media, che ha progressivamente incrementato il numero dei pazienti affetti, la migliore conoscenza dei processi neuropatologici e neurobiologici, la messa a punto di strumenti di valutazione psicometrica, lo sviluppo di tecniche di *brain imaging*.

Tutti questi elementi di studio hanno portato ad una definizione sempre più precisa delle demenze, sia come categoria nosologica generale, sia in relazione ai differenti e specifici quadri clinico-patologici.

Definizione

Attualmente, con il termine "Demenza" si intende una sindrome clinica caratterizzata da deterioramento acquisito delle funzioni cognitive, tra le quali invariabilmente la memoria, di entità tale da alterare il funzionamento del soggetto nelle usuali attività sociali e lavorative (Geldmacher e Whitehouse, 1996). Oltre ai sintomi cognitivi, sono presenti sintomi non cognitivi, inerenti la sfera della personalità, l'affettività, l'ideazione e la percezione, le funzioni vegetative, il comportamento (Trabucchi, 2000).

Secondo il DSM-IV-TR (2000), l'elemento essenziale di una demenza è lo sviluppo di molteplici deficit cognitivi, che comprendono la compromissione della memoria, e almeno una delle seguenti alterazioni cognitive: afasia, aprassia, agnosia, o un'alterazione del funzionamento esecutivo. I deficit cognitivi devono essere sufficientemente gravi da provocare una menomazione del funzionamento lavorativo o sociale, e devono rappresentare un deterioramento rispetto ad un precedente livello di funzionamento.

Il termine di "Disturbo cognitivo lieve", o "Mild Cognitive Impairment" (MCI), invece, è usato per descrivere un disordine in cui compaiono sintomi soggettivi e/o segni obiettivi di alterazione cognitiva o della memoria, in assenza di evidenti alterazioni nello svolgimento delle attività della vita quotidiana (Petersen et al., 1999; Dubois et al., 2007).

Epidemiologia

La demenza, in generale, colpisce circa 8,5 milioni di persone in Europa.

Un quadro demenziale può insorgere in qualsiasi età, tuttavia la maggior parte delle demenze sono appannaggio dell'anziano, soprattutto per quanto riguarda le demenze degenerative. La demenza interessa il 5-6% dei soggetti di età superiore a 65 anni. La prevalenza aumenta progressivamente con l'età, raddoppiando ogni 4-5 anni, fino a raggiungere il 30% circa all'età di 80 anni. Con il

costante incremento della vita media, il numero di soggetti affetti da demenza è destinato ad aumentare rapidamente.

Per quanto riguarda il genere, nel complesso le demenze sono più diffuse nel sesso femminile (fino al 66% di tutti i pazienti dementi sono donne), tuttavia ci sono importanti variazioni a seconda dell'intervallo di età considerata (ad esempio, tra 65 e 69 anni il 63% dei soggetti affetti da demenza è di sesso maschile) e del tipo di demenza (la malattia di Alzheimer prevale tra le femmine, mentre la demenza vascolare è più frequente nei maschi). Non è chiaro, comunque, se queste variazioni epidemiologiche di genere siano correlate a differenze biologiche, allo stile di vita, o semplicemente al fatto che le donne sono più longeve.

In ogni caso, le dimensioni del problema sono notevoli, per cui appare chiaro come le demenze rappresentino, e rappresenteranno sempre più in futuro, un imponente costo economico e sociale.

(Ferri et al., 2005; Dementia in Europe Yearbook, 2008)

Classificazione

Diversi processi patologici possono portare ad un progressivo decadimento cognitivo; i corrispondenti quadri clinici possono ampiamente differire gli uni dagli altri, per esordio e/o evoluzione, tuttavia nessun quadro clinico implica una specifica causa.

La malattia di Alzheimer è la più frequente causa di demenza (50-70% dei casi), seguita da altre demenze neuro-degenerative (10-30%), demenze vascolari (10-20%), demenze secondarie a patologie potenzialmente reversibili (10-20%) (Trabucchi, 2000).

Le demenze possono essere schematicamente classificate in:

- Demenze neuro-degenerative, o primarie
- Demenze secondarie

Le Demenze neuro-degenerative comprendono la Malattia di Alzheimer, la Demenza da corpi di Lewy diffusi e le Demenze fronto-temporali, queste ultime, a loro volta, comprendenti diverse entità clinico-patologiche; altre forme di demenza neuro-degenerativa sono parte di un quadro clinico dominato da disturbi motori: è il caso, per esempio, della Paralisi sopranucleare progressiva, della Malattia di Parkinson con demenza e della Malattia di Huntington.

Nell'ambito delle Demenze secondarie, invece, la maggior parte dei casi è rappresentata dalle Demenze vascolari: sotto tale denominazione sono descritti diversi quadri clinici caratterizzati da un danno anatomico e/o funzionale del parenchima cerebrale su base vascolare; è più frequente nel sesso maschile, e si accompagna generalmente a significativi fattori di rischio cardiovascolare (Cassano, 2006). Esistono poi numerose demenze secondarie ad altre cause: carenziali, metaboliche, endocrine, tossiche, infettive e/o trasmissibili, infiammatorie, traumatiche, tumorali, da idrocefalo normoteso.

In molti casi, infine, più di una patologia concorre alla determinazione del quadro demenziale, soprattutto nel paziente anziano. In particolare, è frequente la coesistenza di malattia di Alzheimer e lesioni vascolari, condizione nota come "Demenza mista", la cui prevalenza, difficile da valutare con precisione, è sicuramente in aumento per l'invecchiamento della popolazione (Langa et al., 2004; Schneider et al., 2007).

2. Malattia di Alzheimer

Informazioni generali

La Malattia di Alzheimer (MA) è un disordine neuro-degenerativo progressivo e fatale, che si manifesta con un deterioramento delle funzioni cognitive, in particolare della memoria, una progressiva incapacità a svolgere le normali attività della vita quotidiana, e vari sintomi neuro-psichiatrici e alterazioni del comportamento (Cummings, 2004).

È una malattia a eziologia ancora in gran parte ignota, caratterizzata dalla perdita di neuroni e di sinapsi in molte aree della corteccia cerebrale e in alcune regioni sottocorticali, con conseguente atrofia cerebrale di grado variabile. Alla base di questo fenomeno, ci sono alcune alterazioni neuropatologiche tipiche, sebbene non specifiche (principalmente, la formazione di placche amiloidi e la degenerazione neurofibrillare) (Wenk, 2003).

La MA è la prima causa di demenza in assoluto, rappresenta la quarta causa di morte tra gli anziani nei Paesi occidentali, e riduce significativamente la sopravvivenza. La sopravvivenza dopo la diagnosi dipende sostanzialmente dall'età del paziente, mediamente è di 9 anni per le persone a cui la diagnosi è stata effettuata a 65 anni, mentre è di 3 anni per le persone a cui la diagnosi è stata posta a 90 anni (Brookmeye et al., 2002).

Colpisce con larga prevalenza soggetti anziani, di età superiore a 65 anni (forme "late-onset"), con carattere sporadico; l'età media di esordio è circa 80 anni (Helmer et al., 2001). Le casistiche riportano una maggiore frequenza nel sesso femminile (Andersen, 1999).

Inoltre, esistono forme ad esordio precoce ("early-onset"), definite arbitrariamente da un'età di comparsa inferiore ai 65 anni, e stimate attorno al 6-7% del totale. Il 7% circa di questi casi ad esordio precoce è a carattere familiare, con un modello di trasmissione autosomica dominante ad alta penetranza. È anche

noto che, in generale, l'incidenza di MA è aumentata nei parenti dei pazienti affetti, fenomeno evidentemente dovuto a complesse interazioni tra più geni predisponenti e altri fattori, tra cui contributi ambientali e casi fortuiti (Campion et al., 1999; Nussbaum ed Ellis, 2003)

Detto che età senile, sesso femminile e familiarità sono i principali fattori di rischio, numerose condizioni sono state studiate al fine di individuare possibili relazioni di aumento o riduzione del rischio di sviluppare la MA, tuttavia spesso con risultati controversi, non conclusivi o poco significativi.

È stata dimostrata con certezza l'esistenza di un rapporto tra la MA e i fattori di rischio cardiovascolari, in particolare in relazione allo sviluppo di patologia cerebro-vascolare (Snowdon et al., 1997; Rosendorff et al., 2007); analogamente, diversi studi hanno accertato un aumentato rischio di sviluppare la MA in presenza di un basso livello educazionale e un ridotto volume cerebrale (Mortimer et al., 2003; Stern, 2006).

Ulteriori ricerche si rendono comunque necessarie per stabilire l'effettivo peso che alcuni fattori (vitamine, dieta, attività fisica e attività cognitiva) potrebbero avere nella prevenzione della MA (Szekely et al., 2007).

Neuropatologia

Da un punto di vista della morfologia macroscopica, la caratteristica più rilevante della malattia di Alzheimer è l'atrofia corticale. L'encefalo di un soggetto affetto da MA mostra un grado variabile e progressivo di atrofia, solitamente simmetrica, con perdita di sostanza parenchimale, assottigliamento delle circonvoluzioni, ingrandimento dei solchi e dilatazione del sistema ventricolare (idrocefalo ex-vacuo). L'atrofia si riscontra prevalentemente a livello dei lobi temporali e parietali, e in regioni ristrette all'interno della corteccia frontale e il giro cingolato; piuttosto specifica è l'atrofia dell'ippocampo, con una dilatazione selettiva associata del corno temporale adiacente del ventricolo laterale.

Altre strutture sotto-corticali coinvolte sono l'amigdala, il locus coeruleus, il nucleo del rafe e le strutture colinergiche del tronco encefalico (nucleo basale di Meynert, nucleo del setto mediale, nucleo della banda diagonale di Broca).
Per quanto riguarda, invece, gli aspetti istologici e citologici della malattia, le più importanti alterazioni che si osservano sono: le placche neuritiche, i grovigli neurofibrillari e l'angiopatia amiloide cerebrale.
Le placche amiloidi, o neuritiche, o senili (*amyloid plaques*), sono raccolte extracellulari sferiche, focali, composte da processi neuronali dilatati, tortuosi, distrofici, disposti attorno ad un "core" centrale di amiloide; alla periferia sono riconoscibili cellule della microglia e astrociti reattivi. Il nucleo interno dell'amiloide contiene varie proteine alterate, ma il principale componente è la proteina β-amiloide, un peptide che deriva da un precursore di maggiori dimensioni, noto come APP (Amyloid Precursor Protein). Le placche amiloidi sono considerate l'alterazione temporalmente più precoce del processo neurodegenerativo della MA.
I grovigli neurofibrillari (*neurofibrillary tangles*) sono fasci di filamenti localizzati nel citoplasma dei neuroni (agglomerati intraneuronali), in modo tale da circondare (e talvolta dislocare) il nucleo. Tali ammassi sono costituiti soprattutto da filamenti a doppia elica, a loro volta composti da un'isoforma iperfosforilata della proteina tau, una proteina espressa principalmente negli assoni corticali, dove si trova associata ai microtubuli, con la funzione di facilitarne l'assemblaggio, stabilizzando il citoscheletro. Esiste una correlazione tra l'estensione della degenerazione neurofibrillare e il deterioramento cognitivo; la formazione dei *tangles* progredisce in maniera sistematica dalla corteccia entorinale verso l'ippocampo, l'amigdala e la neocorteccia temporale, e in seguito alla corteccia parietale associativa e frontale, rispettando le aree primarie.
L'angiopatia amiloide cerebrale (*cerebral amyloid angiopathy*) consiste in depositi di β-amiloide nella parete dei vasi della leptomeninge e della corteccia; è un

reperto alquanto aspecifico, frequentemente riscontrabile anche in soggetti anziani non dementi.

In alcuni casi, sono riscontrabili anche altre alterazioni microscopiche, non specifiche della MA, ossia la degenerazione granulo-vacuolare e i corpi di Hirano. (Wenk, 2003; Kumar et al., 2006; Cambier et al., 2009; Perl, 2010)

Eziopatogenesi

Forme sporadiche e forme familiari

Come già precedentemente accennato, nella larga maggioranza dei casi la malattia di Alzheimer ha carattere sporadico ed esordio tardivo (dopo i 65 anni): l'eziologia di queste forme resta ancora ignota e la patogenesi deve essere ancora definita con esattezza. Di sicuro, si tratta di una malattia a patogenesi multifattoriale, dove concorrono molteplici fattori, sia di ordine genetico che ambientale, dalla cui interazione originano i meccanismi di amplificazione del danno iniziale, con progressiva perdita funzionale e strutturale delle cellule nervose. La ricerca ha messo in luce di volta in volta diversi aspetti patogenetici, chiamando in causa fattori genetici, infiammatori, ormonali, stress ossidativo, che sembrano costituire i vari tasselli di un complesso quadro unitario, ma rimangono da comprendere il *primum movens* e l'esatta sequenza fisiopatologica.

Per quanto riguarda le forme familiari, che hanno trasmissione autosomica dominante ed esordio precoce (prima dei 65 anni), sono disponibili maggiori informazioni. Sono stati individuati da tempo tre geni direttamente responsabili dell'insorgenza di queste forme: il gene della Proteina Precursore dell'Amiloide (APP), il gene della Presenilina-1 (PS1) e il gene della Presenilina-2 (PS2).

La "cascata del'amiloide"

La deposizione della proteina β-amiloide (Aβ) riveste sicuramente un ruolo centrale nella patogenesi della malattia (Hardy e Allsop, 1991).

La proteina β-amiloide è un peptide di 39-43 amminoacidi che si forma dal clivaggio proteolitico di una proteina trans-membrana, denominata Proteina Precursore dell'Amiloide (Amyloid Precursor Protein, APP). Questa proteina può essere processata in diversi modi, a seconda degli enzimi (le cosiddette secretasi) che agiscono su di essa, operando clivaggi in siti differenti. Se APP è sottoposta all'azione delle α-secretasi, si generano peptidi solubili (via non-amiloidogenetica). In alternativa, APP di superficie può essere internalizzata, e subire processi da cui originano peptidi poco solubili, che si aggregano in fibrille (via amiloidogenetica): ciò avviene attraverso operazioni di clivaggio in sede N-terminale prima dell'inizio del dominio trans-membrana per azione dell'enzima β-secretasi (BACE-1), e all'interno del dominio trans-membrana per opera di γ-secretasi (Kumar et al., 2006; Mattson et al., 2009).

Il sito di taglio della γ-secretasi è di primaria importanza per la formazione di peptidi di differente lunghezza: il peptide Aβ di 39 o 40 aminoacidi è la forma più comune, prodotta attraverso il clivaggio dei residui 712-713, e non è amiloidogenico. Il peptide di 42 o 43 aminoacidi (Aβ42-43), generato dal clivaggio dopo il residuo aminoacidico 714, è invece neurotossico, perché capace di formare fibrille insolubili e di accumularsi nelle placche senili (Koo e Squazzo, 1994).

Secondo la teoria della "cascata dell'amiloide", a causa di un'aumentata produzione o di un diminuito smaltimento, l'accumulo di β-amiloide progredisce fino a raggiungere un livello critico di polimerizzazione, tale da innescare una serie di eventi successivi: formazione di aggregati neurofibrillari, stress ossidativo, disfunzioni mitocondriali e, in ultimo, degenerazione e morte neuronale (Hardy e Allsop, 1991; Selkoe, 2000).

Tuttavia, non è stato ancora spiegato con precisione il meccanismo mediante il quale la Aβ dà il via a questa catena di eventi. Sembra che la forma fibrillare insolubile, interagendo con la membrana neuronale, determini un'alterazione dei processi di trasduzione del segnale e porti la cellula all'apoptosi. L'innesco di tali meccanismi potrebbe essere facilitato dalla produzione di radicali liberi e di citochine infiammatorie, tramite attivazione delle cellule microgliali, e dall'aumentata sensibilità agli aminoacidi eccitatori. I danni alla membrana neuronale potrebbero poi contribuire ad una disregolazione nei meccanismi che controllano il flusso intraneuronale di calcio, con conseguente iperattivazione delle chinasi intracellulari ed iperfosforilazione della proteina tau (Swerdlow, 2007). Gli effetti finali di distruzione neuronale sono con tutta probabilità legati in gran parte allo stress ossidativo e a fenomeni di infiammazione cronica (McGeer e McGeer, 2001; Butterfield et al., 2002; Zhu et al., 2005).
Nuove ricerche hanno poi ipotizzato che un "parente stretto" della proteina Aβ, e non la Aβ stessa, possa essere responsabile dell'innesco del processo patogenetico. Il peptide N-APP, un frammento N-terminale di APP, simile alla Aβ e ottenuto tramite clivaggio di APP da parte degli stessi enzimi che operano sulla Aβ, potrebbe attivare il percorso di morte neuronale, legandosi ad un recettore neuronale chiamato DR6 (Death Receptor 6), altamente espresso nelle regioni cerebrali più colpite dalla MA (Nikolaev et al., 2009).

Formazione dei grovigli neurofibrillari

Accanto alle placche amiloidi, l'altro reperto neuropatologico principale della MA è rappresentato dai grovigli neurofibrillari (tangles). Essi sono composti in prevalenza da forme iperfosforilate della proteina tau e sono collegati a sofferenza e morte neuronale. La fosforilazione di tau riduce la capacità di questa proteina di stabilizzare i microtubuli, rendendo il citoscheletro più flessibile e comportando, in ultima analisi, la perdita dell'integrità assonale.

L'iperfosforilazione della proteina tau e la formazione di tangles rappresentano un evento temporalmente secondario alla formazione delle placche amiloidi, ma la relazione causale tra i due fenomeni è ancora in parte ignota. La β-amiloide può legarsi a tau, formando complessi in grado di favorirne l'iperfosforilazione. Probabilmente, la Aβ può guidare la patologia tau-correlata, e tau può a sua volta mediare la tossicità dovuta alla Aβ, implicando una cooperazione tra Aβ e tau nella patogenesi della MA.
(Iqbal et al., 2005; Chun e Johnson, 2007; Duan et al., 2012)

Alterazioni neurotrasmettitoriali

I pazienti affetti da MA sviluppano alterazioni di diversi sistemi neurotrasmettitoriali, per questo la modulazione di tali sistemi è un obiettivo della terapia farmacologica. Queste alterazioni sono in gran parte la conseguenza della perdita neuronale che si sviluppa progressivamente nella malattia, ma possono essere, almeno in parte, anche causa e/o concausa di danno neuronale.
È noto che nel cervello dei soggetti affetti da MA esiste una riduzione dell'acetilcolina. L'acetilcolina è presente nelle regioni cerebrali coinvolte nella memoria, e la perdita di neuroni colinergici correla con diversi aspetti dei deficit cognitivi presenti nella MA, tra cui appunto la memoria; inoltre i recettori pre-sinaptici dell'acetilcolina regolano il rilascio di altri neurotrasmettitori, moltiplicando gli effetti del deficit colinergico (Francis et al., 1999; Wenk, 2003).
Altre alterazioni neurotrasmettitoriali riguardano i recettori NMDA (N-metil-D-aspartato) del glutammato, che sembrano essere sottoposti ad una attivazione lenta ma costante. Questa disregolazione potrebbe perpetuare il danno neuronale, in quanto l'attivazione recettoriale continuativa porta un afflusso di calcio costante all'interno del neurone, con alterazione dei sistemi di trasduzione del segnale ed effetto citotossico (Danysz et al., 2000; Francis, 2003).

Anche il sistema della serotonina subisce delle modificazioni nella MA, e ciò potrebbe essere correlato con la sintomatologia affettiva della malattia, in particolare depressione ed ansia (Mössner et al., 2000; Lai et al., 2005).
Infine, il riscontro di una riduzione dei livelli di noradrenalina può essere responsabile di alcuni sintomi comportamentali e psichiatrici, come agitazione, aggressività e psicosi (Heneka et al., 2002; Herrman et al., 2004).

Genetica della malattia di Alzheimer

Tre differenti geni sono stati identificati come causa diretta delle forme familiari di MA: il gene della Proteina Precursore dell'Amiloide (Amyloid Precursor Protein, APP), che mappa sul cromosoma 21, e i geni della Presenilina-1 (PS1) e Presenilina-2 (PS2), che mappano rispettivamente sul cromosoma 14 e sul cromosoma 1 (Selkoe, 2001; Bertram et al., 2010; Bettens et al., 2010). Le mutazioni di APP, PS1 e PS2 spiegano circa il 50% delle forme familiari di MA (Chen e Schubert, 2002).
Le mutazioni del gene APP sono responsabili di un'aumentata produzione dei peptidi insolubili di β-amiloide, i quali, come si è visto, si aggregano in fibrille e danno vita alle placche, con successivo sviluppo della catena di eventi che portano alla neurodegenerazione (Bertram e Tanzi, 2004).
Gli altri due geni identificati (PS1 e PS2) codificano per due proteine transmembrana dotate di un'altissima omologia, chiamate presenilina-1 e presenilina-2, localizzate principalmente a livello del reticolo endoplasmatico, dell'apparato di Golgi e della membrana nucleare (Kovacs et al., 1996). Le preseniline sono componenti delle γ-secretasi, e probabilmente fanno parte del complesso multiproteico che contiene il sito proteolitico attivo (Selkoe, 2001).
Diversamente dai geni precedenti, le cui mutazioni sono causa diretta della malattia, un allele (ε4) del gene dell'Apolipoproteina E (ApoE), localizzato sul

cromosoma 19, si associa ad un aumentato rischio (fattore di suscettibilità) di sviluppare la malattia di Alzheimer. A tutt'oggi, l'allele ε4 di ApoE è l'unico fattore di rischio genetico noto per la MA ad esordio tardivo. L'apolipoproteina E è una glicoproteina plasmatica sintetizzata principalmente dal fegato, dai neuroni e dagli astrociti, ma anche da altri tipi di cellule, inclusi macrofagi e monociti; è presente nei chilomicroni, nelle VLDL e nelle HDL, ed è coinvolta nella mobilizzazione e nella ridistribuzione del colesterolo a livello del sistema nervoso centrale. Svolge inoltre molte altre funzioni, risultando coinvolta nei meccanismi di rigenerazione dei nervi, nella immunoregolazione e nell'attivazione di una serie di enzimi lipolitici. Esistono tre isoforme maggiori della proteina, denominate con le sigle ApoE2, ApoE3 e ApoE4, codificate da tre diversi alleli (ε2, ε3, ε4) dello stesso gene, localizzato sul braccio lungo dl cromosoma 19. La frequenza degli alleli nella popolazione è rispettivamente pari al 10%, al 75% e al 15%. Nella popolazione colpita da MA, l'allele ε4 è sovra-rappresentato, cioè si presenta con maggiore frequenza, suggerendo un ruolo di suscettibilità nel determinismo della malattia; al contrario, l'allele ε2 è sotto-rappresentato, indicando un possibile ruolo "protettivo". ApoE4 interverrebbe legandosi alla proteina β-amiloide e favorendone il deposito, mentre ApoE2 potrebbe sfavorire la fosforilazione anomala della proteina tau (Strittmatter et al., 1993; Polvikoski et al., 1995; Kim et al., 2009).

Allo stato attuale delle conoscenze, comunque, gran parte dell'ereditarietà della malattia di Alzheimer deve ancora essere spiegata, e molti geni sono oggetto di studi in corso (Williamson et al., 2009; Bertram et al., 2010; Bettens et al., 2010).

Aspetti clinici

L'esordio è solitamente subdolo ed insidioso, con deficit cognitivi più o meno sfumati e lievi alterazioni della personalità e del comportamento che inizialmente possono essere attribuiti alle "normali" modificazioni che si determinano con l'età, per cui spesso a posteriori le prime manifestazioni di malattia vengono fatte risalire anche a tre-quattro anni prima (Loeb e Favale, 2003).

Infatti, spesso esiste una fase molto precoce di "pre-demenza", in cui il paziente manifesta i primi disturbi cognitivi, ma non ha ancora oltrepassato la "soglia" della demenza, nel senso che non ci sono evidenti alterazioni nel funzionamento quotidiano. Questa fase può essere indicata genericamente con il termine di MCI (Mild Cognitive Impairment, o disturbo cognitivo lieve), oppure più specificamente come "fase prodromica della MA" (Prodromal AD), nel caso in cui ci siano sufficienti elementi diagnostici per supporre che questo lieve deficit cognitivo sia l'inizio della MA (Dubois et al., 2007; Dubois et al., 2010).

Nella maggior parte dei casi, l'elemento clinico principale della malattia è un precoce e progressivo deficit della memoria, a cui seguono o si associano altri disturbi cognitivi, psichiatrici e comportamentali; questa situazione, chiamata "malattia di Alzheimer tipica", è la presentazione clinica percentualmente preponderante (Dubois et al., 2010; Warren et al., 2012).

Il deficit della memoria si presenta come difficoltà a ricordare fatti appresi di recente e incapacità di acquisire nuove informazioni; inizialmente, prevalgono i disturbi a carico della memoria episodica, mentre la memoria semantica e quella autobiografica sono meno compromesse, almeno fino alle fasi avanzate della malattia (Cambier et al., 2009).

Accanto al deficit mnestico, si accompagnano o seguono disturbi di molte altre sfere cognitive. È tipico un progressivo deterioramento del linguaggio, con impoverimento del vocabolario, riduzione della fluenza verbale, comparsa di

anomie, parafasie e circonlocuzioni, fino alla perdita completa della parola. Si manifestano disorientamento temporo-spaziale (talvolta con improvvisi "black-out", anche in fasi precoci di malattia), deficit di tipo visuo-spaziale, aprassia costruttiva e ideo-motoria. Inoltre, il paziente va incontro ad un inesorabile decadimento delle funzioni esecutive, perdendo dapprima la capacità di svolgere le attività della vita quotidiana di più alto livello, ad esempio la scrittura, l'uso del denaro o del trasporto pubblico, per poi evolvere verso un'incapacità di eseguire anche le attività più semplici, come mangiare o usare il bagno. Si osservano precocemente anche cambiamenti dell'umore e del comportamento, sotto forma di apatia o aggressività, e in fasi più avanzate si manifestano anche psicosi, allucinazioni e agitazione psico-motoria. Alterazioni motorie e sensoriali, anomalie della deambulazione e convulsioni sono poco comuni fino alle fasi tardive della malattia (Förstl e Kurz, 1999; Cummings, 2004).

Varianti della Malattia di Alzheimer

La malattia di Alzheimer può presentarsi con sindromi cliniche atipiche, note come "MA atipica" o "varianti della MA". Si tratta di fenotipi clinici meno frequenti rispetto alla "MA tipica", in cui l'aspetto iniziale e centrale del quadro clinico è rappresentato non dal deficit della memoria, ma da altri segni di decadimento cognitivo; tuttavia, il substrato neuropatologico è, in molti di questi casi, quello caratteristico della MA (Galton et al., 2000; Dubois et al., 2010). Le principali sindromi atipiche, o varianti, della MA sono (Warren et al., 2012):

- Atrofia corticale posteriore (Posterior Cortical Atrophy, PCA)
- Afasia progressiva primaria (Primary Progressive Aphasia, PPA), ed in particolare la variante nota come "PPA logopenica"
- Variante frontale della malattia di Alzheimer (Frontal AD)

Come una singola entità patologica (la malattia di Alzheimer) possa dare origine a diversi fenotipi clinici, resta ancora da precisare, ma si ritiene che il substrato fisiopatologico comune sia la vulnerabilità delle reti neuronali, mentre i differenti quadri clinici dipendano dalle diverse e specifiche reti neuronali che vanno incontro a degenerazione. In altre parole, la differente modulazione di un network temporo-parieto-frontale, a causa di fattori genetici, ambientali e fisiologici, potrebbe sottendere la variabilità fenotipica della malattia di Alzheimer (Greicius et al., 2003; Pievani et al., 2011; Zhou et al., 2012).

La frequenza delle sindromi atipiche nella MA è nell'ordine del 5% per quanto riguarda i soggetti con esordio di malattia oltre i 65 anni ("late-onset"), e addirittura oltre il 30% dei soggetti con MA "early-onset", cioè prima dei 65 anni. Questi dati, comunque, sono difficili da interpretare, dal momento che riflettono la difficoltà di definizione e diagnosi delle sindromi atipiche della MA. D'altra parte, queste sindromi sono associate a profili clinici, neuroanatomici, molecolari e patologici distinti, ma in parte sovrapponibili (Warren et al., 2012).

Verranno di seguito brevemente descritte le caratteristiche essenziali delle sindromi atipiche della MA.

L'Atrofia corticale posteriore è un disordine neurodegenerativo caratterizzato da un progressivo declino nelle abilità visuo-spaziali, visuo-percettive, linguistiche e prassiche. La memoria e le abilità linguistiche sono relativamente mantenute, per lo meno fino alle fasi avanzate della malattia. Le regioni corticali colpite dal processo atrofico comprendono aree parietali, occipitali e occipito-temporali (Crutch et al., 2012; Warren et al., 2012). La patologia che più frequentemente sottende questa sindrome è la malattia di Alzheimer (Galton et al., 2000; Alladi et al., 2007); la PCA, del resto, costituisce la più comune forma atipica di MA (Snowden et al., 2007).

L'Afasia progressiva primaria ha come caratteristica centrale un deficit isolato e progressivo del linguaggio, associato a neurodegenerazione. La presentazione clinica è tuttavia molto variabile, in quanto ci sono diversi pattern di atrofia cerebrale associati alla PPA. Per questa ragione, sono state definite tre sottocategorie di PPA: Afasia Progressiva Non-Fluente (Progressive Non-Fluent Aphasia, PNFA), Demenza Semantica (Semantic Dementia, SD), e Afasia Progressiva Logopenica (Logopenic Progressive Aphasia, LPA) (Gorno-Tempini et al., 2008; Gorno-Tempini et al., 2011). Per quanto riguarda le varianti PNFA e SD, la prima causa che le sottende è la Degenerazione lobare fronto-temporale (FTLD), mentre per la variante LPA la principale causa è la malattia di Alzheimer (Josephs et al., 2006; Deramecourt et al., 2010; Gorno-Tempini et al., 2011).

La Variante frontale della malattia di Alzheimer descrive un sottogruppo di pazienti con MA che accusano disturbi prevalentemente nel comportamento e nelle funzioni esecutive; tali pazienti hanno spesso precoci e importanti sintomi psichiatrici, una grave menomazione ai test di funzione frontali e una maggiore compromissione nello svolgimento delle attività quotidiane, rispetto a coloro che sono affetti da MA tipica, a parità di stadio della malattia (Johnson et al., 1999; Woodward et al., 2010; Warren et al., 2012).

Diagnosi

Criteri diagnostici

La diagnosi di malattia di Alzheimer è ancora oggi da porre in termini di probabilità, in quanto la certezza si avrebbe soltanto con l'esame istopatologico, che è ovviamente inattuabile in vivo, poiché richiederebbe la biopsia cerebrale. Il follow-up del paziente resta fondamentale nel confermare o riconsiderare la diagnosi inizialmente posta.

Grande importanza storica hanno rappresentato i criteri diagnostici pubblicati nel 1984 dal NINCDS-ADRDA Work Group (NINCDS: National Institute of Neurological and Comunicative Disorders and Stroke; ADRDA: Alzheimer's Disease and Related Disorders Association): essi hanno segnato una svolta importante, poiché per la prima volta sono stati definiti con precisione gli aspetti clinici e strumentali determinanti per la diagnosi. La diagnosi di MA era distinta in tre categorie: diagnosi possibile, diagnosi probabile, e diagnosi certa (esame istopatologico) (McKhann et al., 1984). Questi criteri hanno dimostrato una sensibilità nell'ordine dell'81% e una specificità del 70% (Knopman et al., 2001).

Recentemente, il progresso nelle conoscenze relative alla MA ha reso necessaria una rivisitazione dei criteri NINCDS-ADRDA del 1984.

Attualmente, la MA è inquadrata come un processo fisiopatologico continuo, che parte da una condizione preclinica, per poi passare ad una iniziale predemenza (MCI o "MA prodromica"), fino al quadro di demenza, conclamato ed evolutivo. Inoltre, sono stati fatti importanti passi avanti nella diagnostica laboratoristica e strumentale, in particolare per quanto riguarda la PET, l'analisi del liquor e la genetica (Dubois et al., 2010; Sperling et al., 2011).

Per tutte le suddette ragioni, diversi studiosi hanno lavorato ad un aggiornamento dei criteri per la diagnosi della malattia di Alzheimer.

Dubois e coll. (2007) hanno affermato che, accanto al criterio clinico centrale (deficit precoce e significativo nella memoria episodica), deve esserci l'evidenza dell'alterazione di almeno uno dei biomarcatori, cioè RM strutturale, analisi del liquor e/o PET.

McKhann e coll. (2011) hanno stabilito innanzitutto i criteri per la diagnosi di demenza in generale, a cui si aggiungono poi gli elementi suggestivi di MA. In questo caso, i ricercatori hanno ritenuto necessario distinguere una "MA probabile", definita sulla base dei soli criteri clinici, e una "MA probabile con evi-

denza del processo fisiopatologico della MA", in cui la positività dei biomarcatori liquorali o della PET incrementa il livello di certezza che, alla base dei sintomi clinici rilevati, ci sia il processo fisiopatologico tipico della MA. Se la presentazione clinica è atipica, la categoria diagnostica è "MA possibile", eventualmente "con evidenza del processo fisiopatologico della MA" in caso di positività del liquor e/o della PET.

Linee-guida per la diagnosi della malattia di Alzheimer

La EFNS (European Federation of Neurological Societies) aggiorna periodicamente le linee-guida per la diagnosi della MA (Hort et al., 2010).
Schematicamente, tali linee-guida raccomandano un percorso diagnostico così strutturato:

- Anamnesi, esame obiettivo ed esami ematici
- Valutazione delle funzioni cognitive
- Valutazione del funzionamento nelle attività quotidiane
- Valutazione del comportamento e dei sintomi psichiatrici
- Valutazione delle comorbidità
- Neuroimaging
- Elettroencefalogramma (EEG)
- Analisi del liquido cefalo-rachidiano (LCR)
- Test genetici

Valutazione clinica e neuro-psicologica

La storia clinica del paziente deve essere accuratamente ricostruita, con il contributo del paziente stesso e dei *caregivers*. L'esame obiettivo, generale e neurologico, mira soprattutto ad individuare eventuali segni di demenze secondarie e di demenze neurodegenerative diverse dalla MA. Gli esami di laboratorio sono utili per escludere altre cause di demenza, in particolare l'esecuzione della

batteria di esami ematici (inclusi il dosaggio della vitamina B12 e la funzionalità tiroidea) è importante per identificare condizioni patologiche talora difficilmente rilevate con la valutazione clinica (VanCrevel et al., 1999; Hort et al., 2010).

Va tenuto presente che i pazienti affetti da MA, essendo di solito anziani, hanno frequentemente patologie concomitanti (ad esempio, depressione, malattie cardiovascolari, altre malattie neurologiche, disturbi del sonno, incontinenza): l'identificazione e la cura di queste patologie può aiutare la diagnosi e anche migliorare la sintomatologia cognitiva (Doraiswamy et al., 2002).

Il paziente deve poi essere sottoposto a test neuropsicologici. Il più conosciuto ed impiegato è il Mini-Mental State Examination (MMSE; Folstein et al., 1977). Il MMSE è costituito da trenta quesiti (items) che fanno riferimento a diverse aree cognitive: orientamento spaziale e temporale, registrazione, attenzione e calcolo, rievocazione, linguaggio, prassia costruttiva. È considerato diagnostico un punteggio inferiore a 24, ma è stato osservato che, in individui con elevato livello educativo, è più accurato un livello-soglia di 27 punti (O'Bryant et al., 2008).

Numerosi altri test neuropsicologici sono disponibili, sia per una valutazione generale, sia per indagare specifici domini cognitivi (memoria episodica, memoria semantica, abilità visuo-spaziali, funzioni esecutive) (Strauss et al., 2006).

Il declino nel funzionamento quotidiano è un segno necessario nella diagnosi delle demenze, ed è valutato attraverso la scala ADL (Activities of Daily Living; Katz, 1963) e la scala IADL (Instrumental Activities of Dailiy Living; Lawton e Brody, 1969), due indici del livello di dipendenza del paziente nelle attività della vita quotidiana.

Devono essere altresì indagati i sintomi comportamentali e psichiatrici, ossia i sintomi non-cognitivi, presenti nella MA, spesso anche negli stadi precoci di

malattia. A questo scopo, è possibile utilizzare l'indice NPI (Neuro-Psichiatric Inventory; Cummings et al., 1994), in cui si attribuisce un punteggio in base a frequenza e gravità dei principali sintomi neuro-psichiatrici (deliri, allucinazioni, agitazione, depressione, ansia, euforia, apatia, disinibizione, irritabilità, attività motoria, sonno, disturbi comportamentali).
Per informazioni più dettagliate a proposito dei principali indici di valutazione clinica e neuropsicologica, si rimanda all'Appendice.

Neuroimaging

Le tecniche di imaging disponibili si possono suddividere in due categorie:

- metodiche di imaging strutturale: Tomografia Computerizzata (TC) e Risonanza Magnetica (RM)
- metodiche di imaging funzionale: Tomografia a Emissione di Fotone Singolo (SPECT) e Tomografia a Emissione di Positroni (PET).

Le tecniche di imaging strutturale hanno diversi scopi: escludere altre cause di demenza potenzialmente trattabili, e confermare la diagnosi di MA attraverso specifici rilievi (o eventualmente suggerire una diagnosi alternativa). È raccomandata l'esecuzione di una TC o una RM almeno una volta in ogni paziente con sospetta demenza. Se la diagnosi è dubbia, può essere utile ricorrere alle tecniche di imaging funzionale, per distinguere le diverse forme di demenza.
La RM strutturale è superiore alla TC nella dimostrazione dei markers delle specifiche malattie, per questo motivo la RM deve essere considerata come l'esame di imaging preferito per la diagnosi precoce in un soggetto con demenza. Nella MA tipica, ad esordio tardivo, il segno più precoce di malattia evidenziato con la RM è di solito l'atrofia dei lobi temporali mediali (Medial-Temporal Lobes, MTL), in particolate dell'ippocampo e della corteccia entorinale. L'atrofia dell'ippocampo è considerato il miglior marker strutturale di MA. Altre regioni cerebrali frequentemente colpite sono: sulla superficie me-

diale, il giro cingolato posteriore e il precuneo; sulla superficie laterale, le regioni parietali, temporali postero-superiori e frontali. Se, come si è detto, la RM è l'esame più accurato, oggi anche la TC, grazie agli strumenti più moderni (TC multistrato), permette una valida visualizzazione dell'atrofia cerebrale.

Per quanto concerne, invece, gli esami di imaging funzionale, i principali sistemi in uso sono la SPECT di perfusione, che mette in luce le aree ipoperfuse, utilizzando come tracciante il ^{99m}Tc-esametilpropilene (HMPAO), e la PET con fluorodeossiglucosio (FDG-PET), che evidenzia le regioni con ridotto utilizzo di glucosio (marker di ipometabolismo). Entrambe le tecniche dimostrano, nella MA, un'ipoperfusione o un ipometabolismo nelle regioni temporo-parietali, inclusi il precuneo e la corteccia cingolata posteriore. Spesso è coinvolto anche il lobo frontale, ma in maniera solitamente meno grave. La PET ha maggiore sensibilità e maggiore specificità rispetto alla SPECT, ma ha costi più elevati e minore diffusione nel territorio.

Le alterazioni individuate con gli esami di imaging funzionale sono più precoci rispetto a quelle riportate con la RM o la TC.

La PET con traccianti per l'amiloide è uno strumento attualmente di uso non routinario, ma che in futuro potrebbe assumere un ruolo importante nella diagnostica della MA. È basata su traccianti che si legano specificamente alla β-amiloide, come il tracciante ^{11}C-Pittsburgh Compound B (^{11}C-PiB-PET), e ha dimostrato un'elevata sensibilità (superiore al 90%) per la MA. I reperti evidenziati nei pazienti affetti da MA consistono in una simmetrica e diffusa captazione del tracciante, maggiormente nella corteccia prefrontale, nel precuneo e nella corteccia cingolata posteriore, e in misura minore nella corteccia parietale laterale, nella corteccia temporale laterale e nello striato.

(Hort et al., 2010; Filippi et al., 2012)

Elettroencefalografia

L'elettroencefalogramma può aiutare nella diagnosi differenziale tra MA, disturbi soggettivi e patologie psichiatriche, inoltre è utile nel sospetto di Morbo di Creutzfeld-Jacob, disordini tossico-metabolici e amnesie transitorie nel corso di epilessie. In particolare, è raccomandata l'esecuzione dell'EEG in pazienti con presentazioni atipiche di MA. Di frequente riscontro, nei pazienti con MA, sono ridotta ampiezza delle onde alfa, aumentata ampiezza delle onde teta e ridotta frequenza media, tuttavia può anche essere normale (Jelic e Kowalski, 2009; Liedorp et al., 2009).

Analisi genetica

I test genetici possono diagnosticare le forme familiari di MA legate a mutazioni dei geni APP, PS1 e PS2; il riscontro dell'allele ε4 di ApoE implica soltanto un'aumentata suscettibilità per la MA ad esordio tardivo, e la sua determinazione non è utile nell'iter diagnostico (Hort et al., 2010).

Analisi del liquido cefalo-rachidiano

Importanza sempre maggiore sta assumendo, nell'ambito della diagnosi di malattia di Alzheimer e delle demenze in generale, l'analisi del liquido cefalo-rachidiano, o liquor.

L'analisi del liquor ha, innanzitutto, lo scopo di escludere patologie infettivo-infiammatorie come possibile causa del decadimento cognitivo. Ma l'aspetto su cui si stanno concentrando gli studi, e che promette di diventare preponderante nei prossimi anni, è la ricerca nel liquor di proteine che possano fungere da marcatori di malattia.

Per la malattia di Alzheimer, i marcatori studiati sono le proteine amiloide β42, tau e tau fosforilata, ed è stato osservato che il liquor dei pazienti con MA

tende a presentare un pattern tipico (ridotti livelli di amiloide β42 e aumentati livelli di tau e tau fosforilata) (Mattson et al., 2009; de Souza et al., 2011). Questo argomento e le relative implicazioni diagnostiche saranno dettagliatamente trattate nel prossimo capitolo.

3. Biomarcatori liquorali

Il liquido cefalo-rachidiano

Il Liquido Cefalo-Rachidiano (LCR), o cerebro-spinale (Cerebro-Spinal Fluid, CSF), anche detto semplicemente "liquor", è un fluido incolore che riempie i ventricoli cerebrali e lo spazio subaracnoideo, formando un sottile strato che circonda il cervello e il midollo spinale. Circola liberamente tra i due settori, ventricolare (115 mL) e subaracnoideo (25 mL), i quali sono in comunicazione a livello della cisterna magna, attraverso i forami di Lusckha e Magendie, aperti nel tetto del quarto ventricolo.

La formazione del liquor avviene per la maggior parte nei plessi corioidei, strutture vascolari localizzate all'interno delle cavità ventricolari, in grado di secernere attivamente il liquor, mentre una parte minore origina da un processo di diffusione a partire dagli spazi extra-cellulari del Sistema Nervoso Centrale. La produzione di liquor è continua, in quantità di circa 500-700 mL al giorno, e continuo è anche il suo riassorbimento nel sistema venoso, presso le cosiddette granulazioni aracnoidee del Pacchioni. In questo modo, la quantità circolante di liquor è mantenuta costante (circa 140 mL). Il riassorbimento è anche correlato con la pressione intracranica, ossia la velocità di riassorbimento aumenta linearmente all'aumentare della pressione intracranica.

Le funzioni del sistema liquorale sono molteplici: funge da "cuscinetto idraulico" per il cervello, lo protegge dagli urti, inoltre contribuisce al mantenimento dell'omeostasi biochimica dell'ambiente cerebrale, e regola la pressione intracerebrale, fornendo anche una protezione contro l'ischemia.

La composizione del liquor è decisamente diversa rispetto a quella del plasma, ed è finemente regolata, in modo da mantenersi rigidamente costante. Contiene solo lo 0,3% delle proteine plasmatiche, e ha una concentrazione minore di potassio e aminoacidi, sempre rispetto al plasma.

Misurando con la puntura lombare la pressione, si ottengono valori di 8-15 mmHg (10-18 cmH_2O) in clinostatismo e di 16-24 mmHg (20-30 cmH_2O) in ortostatismo.
(Martin, 2005; Conti, 2008; Cambier et al., 2009)

Relazioni tra il liquor e il liquido extra-cellulare

Il liquido extra-cellulare (LEC) costituisce in senso stretto il cosiddetto "microambiente neuronale". Il LEC è in comunicazione con il liquor cefalo-rachidiano, più precisamente è in equilibrio con il LCR, al punto che la composizione chimica dei due fluidi è simile. Gli scambi tra LEC e LCR possono avvenire attraverso la pia madre e le cellule ependimali. Queste ultime sono cellule epiteliali unite da gap junction che ricoprono le pareti dei ventricoli e formano, nel complesso, un epitelio monostrato ricco di passaggi paracellulari, attraverso cui possono passare ioni e numerose macromolecole (Conti, 2008).
Da quanto detto sopra deriva che i cambiamenti molecolari che avvengono a livello cerebrale si riflettono nel liquido cefalo-rachidiano, perciò modificazioni patologiche che interessano le cellule cerebrali (neuroni e/o glia) possono riflettersi in variazioni della composizione del liquor. Questo concetto costituisce la base teorica della ricerca di sostanze nel liquor che possano fungere da marcatori biologici (biomarcatori) del processo patologico in atto all'interno del tessuto cerebrale (Blennow e Hampel, 2003; Mattson et al., 2009).

I biomarcatori liquorali nella diagnosi delle demenze

Il dosaggio di determinate proteine nel LCR può essere applicato nella diagnosi delle demenze neurodegenerative.
La diagnosi delle demenze neurodegenerative è ancora oggi una diagnosi di tipo probabilistico, basata prevalentemente sulla clinica, ma in questo modo er-

rori ed incertezze diagnostiche sono tutt'altro che infrequenti (Bibl et al., 2012).

In particolare, è di importanza cruciale distinguere, fin dagli stadi iniziali, la malattia di Alzheimer da altre forme di demenza (diagnosi differenziale), soprattutto nella prospettiva di sviluppo di terapie eziologiche, che agiscano interrompendo il processo neuropatologico alla base della malattia. L'efficacia di una eventuale terapia eziologica per l'Alzheimer, infatti, è correlata alla precocità e alla accuratezza della diagnosi (de Souza et al., 2011; Sperling et al., 2011).

Allo stato attuale, tre sono i principali biomarcatori liquorali studiati a fini diagnostici per la malattia di Alzheimer:

- Proteina β-amiloide-42 (Aβ42)
- Proteina tau (total tau, t-tau)
- Proteina tau fosforilata (phosphorilated tau, p-tau)

Detti marcatori possiedono la caratteristica di essere chiaramente correlati con il substrato neuropatologico della malattia di Alzheimer, come si evince dalla conoscenza dei principali elementi eziopatogenetici e neuropatologici della malattia stessa; ciò significa che il loro dosaggio può consentire di accertare se alla base di un determinato quadro clinico di demenza ci sia proprio il processo patologico tipico della MA, oppure no.

È noto che i marcatori Aβ42, t-tau e p-tau consentono di distinguere i soggetti affetti da MA dai controlli, anche in stadi precoci di malattia (Hansson et al., 2006; Visser et al., 2009).

La determinazione del profilo dei biomarcatori liquorali, nell'ambito delle demenze, è utile per i seguenti scopi (de Souza et al., 2011):

1) migliorare la distinzione tra MA e demenze di diversa origine, particolarmente in quei casi in cui il quadro clinico è ampiamente sovrapponibile, come nel caso della variante comportamentale di demenza fronto-

temporale (bv-FTD), della demenza semantica (SD) o anche dei cosiddetti "disturbi cognitivi funzionali" (cioè quelle demenze legate a disturbi psichiatrici, ad esempio depressione maggiore e disturbo bipolare);

2) identificare il substrato patologico della MA in pazienti con presentazioni fenotipiche atipiche della malattia di Alzheimer, come atrofia corticale posteriore, variante frontale della MA e forme di afasia progressiva primaria (in particolare, afasia logopenica).

L'accuratezza diagnostica di tali marcatori, in termini di specificità e sensibilità, per la diagnosi differenziale tra MA e altre demenze, deve essere ancora stabilita con esattezza, nonostante numerosi studi siano già stati condotti a questo scopo. Tuttavia, è fondamentale definire con precisione l'affidabilità diagnostica dei biomarcatori liquorali, al fine di validarne definitivamente l'uso nell'ambito della ricerca scientifica e, potenzialmente, anche in ambito clinico.

4. Obiettivi

Lo scopo del presente studio sperimentale è la valutazione del ruolo che i biomarcatori liquorali (proteina amiloide β42, proteina tau e proteina tau fosforilata 181) possono rivestire nell'ambito della diagnostica differenziale delle demenze.

Più precisamente, gli obiettivi dello studio sono:

1) indagare le differenze nei livelli dei biomarcatori liquorali in pazienti con diversa diagnosi clinica;
2) determinare la concordanza tra la diagnosi clinica iniziale e il profilo dei biomarcatori liquorali;
3) riconsiderare la diagnosi iniziale alla luce del profilo dei biomarcatori liquorali;
4) valutare la possibile correlazione tra il profilo dei biomarcatori liquorali e l'età del paziente, la durata della malattia e la gravità della malattia stessa.

5. Materiali e Metodi

Caratteristiche dei pazienti

Sono stati presi in considerazione 47 pazienti con decadimento cognitivo, 19 maschi e 28 femmine, afferenti al Centro per i Disturbi Cognitivi della Clinica Neurologica dell'Università di Pisa, presso l'Ospedale Santa Chiara; tutti i pazienti avevano effettuato un prelievo del liquor tramite puntura lombare.

I pazienti inclusi nello studio erano già stati sottoposti ad una completa valutazione clinica e strumentale, attraverso:

- accurata osservazione clinica e determinazione degli indici Mini-Mental State Examination (MMSE), Activity of Daily Living (ADL), Instrumental Activity of Daily Living (IADL) e Neuro-Psichiatric Inventory (NPI); per informazioni più dettagliate a proposito dei suddetti indici, si rimanda all'Appendice;
- valutazione neuro-psicologica approfondita, mediante la somministrazione di una batteria di test specifici;
- esami di neuro-imaging: Tomografia Computerizzata (TC), Risonanza Magnetica (RM), Tomografia ad Emissione di Positroni con 18-fluorodeossiglucosio (FDG-PET).

Al termine di questo percorso diagnostico, ogni paziente ha ricevuto una diagnosi clinica probabile (diagnosi iniziale). La diagnosi è stata posta senza che fossero noti i risultati dell'analisi del liquor.

In base alla diagnosi clinica, i pazienti sono stati quindi suddivisi nelle seguenti categorie diagnostiche:

- Malattia di Alzheimer (Alzheimer's Disease, AD);
- Atrofia corticale posteriore (Posterior Cortical Atrophy, PCA);
- Afasia progressiva logopenica (Logopenic Progressive Aphasia, LPA);

- Afasia progressiva primaria non-logopenica: Afasia progressiva non-fluente (Progressive Non-Fluent Aphasia, PNFA) e Demenza semantica (Semantic Dementia, SD);
- Demenza fronto-temporale (Fronto-Temporal Dementia, FTD);
- Demenza da corpi di Lewy (Dementia with Lewy Bodies, DLB);
- Degenerazione cortico-basale (Cortico-Basal Degeneration, CBD);
- Disturbi cognitivi funzionali (Functional Cognitive Disorders, FCD): questa categoria comprende pazienti con patologie psichiatriche (come il disturbo bipolare) e pazienti con disturbi soggettivi di memoria.

Determinazione delle proteine nel liquor

Il campione di liquido cerebrospinale (LCR), di almeno 1 mL, è ottenuto dai pazienti mediante puntura lombare, ed è raccolto in provette di polipropilene. Le provette contenenti il LCR sono state centrifugate a 3000 rpm per 10', per rimuovere le cellule. Dal sovranatante sono state ottenute almeno 3 aliquote di 250 μL in vials di polipropilene, conservate a -80°C fino all'esecuzione dei test. Una prima aliquota è stata utilizzata per il dosaggio della Aβ42, una seconda per la determinazione di t-tau e p-tau(181) ed una terza archiviata a -80°C per eventuale ripetizione dei test. Sono stati esclusi dall'analisi campioni fortemente emolizzati.

La determinazione quantitativa di tau totale, tau fosforilata e amiloide β42 è stata effettuata mediante test Elisa (INNOTEST® hTAU Ag, INNOTEST® PHOSPHO-TAU$_{(181P)}$, e INNOTEST® ß-AMYLOID$_{(1-42)}$, Innogenetics, Gent, Belgium), in accordo con le istruzioni dei kit. Ciascun kit prevede l'utilizzo di relativi standard e misure in doppio di standard e campioni.

INNOTEST® hTAU Ag è un test immunoenzimatico in fase solida in cui la proteina umana tau contenuta nel campione di liquor (25 μL in ciascun pozzetto) viene dapprima catturata da un primo anticorpo monoclonale (AT120)

legato nella fase solida. I campioni di LCR vengono in seguito incubati con due anticorpi monoclonali tau-specifici biotinilati (HT7 e BT2). I tre anticorpi monoclonali riconoscono i diversi epitopi sulla proteina tau. I complessi antigene-anticorpo così formati vengono a loro volta rilevati da una streptavidina legata a perossidasi. Infatti, all'aggiunta della soluzione del substrato, avviene una reazione enzimatica a seguito della quale il campione positivo sviluppa una colorazione azzurra; tale reazione viene in seguito arrestata dall'aggiunta di acido solforico che produce un colore giallo. L'assorbanza viene quindi misurata a 450 nm, tramite lettore di piastra. La concentrazione della proteina presente in ciascun campione è stata quindi determinata confrontandone il valore di assorbanza media con quella estrapolabile da una curva standard contenente sull'asse verticale (Y) i valori di assorbanza ottenuti per ciascuna soluzione standard e sull'asse orizzontale (X) le corrispondenti concentrazioni della proteina.

Il kit INNOTEST® PHOSPHO-TAU$_{(181P)}$ è un test immunoenzimatico in fase solida nel quale la proteina tau fosforilata presente nel campione di LCR (75 µL in ciascun pozzetto) è catturata da un primo anticorpo monoclonale, HT7. I campioni di LCR vengono quindi incubati con un anticorpo biotinilato, l'AT270bio. Questo complesso antigene-anticorpo viene poi rilevato da una streptavidina legata a perossidasi. Dopo l'aggiunta della soluzione di lavoro del substrato, il campione positivo svilupperà una colorazione azzurra. La reazione viene arrestata dall'aggiunta di acido solforico che produce un colore giallo. L'assorbanza viene quindi misurata a 450 nm e la concentrazione della proteina contenuta in ciascun campione viene calcolata come precedentemente descritto per la proteina tau totale.

INNOTEST® ß-AMYLOID$_{(1-42)}$ è un test immunoenzimatico in fase solida in cui il peptide amiloide contenuto nel campione di liquor (25 µL in ciascun pozzetto) viene catturato da un primo anticorpo monoclonale (21F12) legato

nella fase solida. I campioni di LCR vengono successivamente incubati con un anticorpo biotinilato (3D6). Questo anticorpo viene quindi rilevato da una streptavidina legata a perossidasi. Dopo l'aggiunta della soluzione del substrato, il campione positivo svilupperà una colorazione azzurra. La reazione viene arrestata dall'aggiunta di acido solforico che produce un colore giallo. L'assorbanza viene quindi misurata a 450 nm e la concentrazione della proteina contenuta in ciascun campione è calcolata come precedentemente descritto per la proteina tau totale.

Interpretazione dei valori dei tre parametri

Le misure dei tre parametri effettuate per ciascun campione sono state riportate in un foglio di lavoro Excel, che permette di calcolare un parametro detto IATI (INNOTEST® Amyloid-Tau Index). Il parametro IATI è definito dalla seguente formula: Aβ42 / (240 + 1,18 × t-tau).

Sample ID	t-tau	Aβ42	p-tau	IATI
Paziente A	367	349	67	0.5
Paziente B	1100	123	142	0.1
Paziente C	241	568	55	1.1

Tabella 1. Esempio di foglio di lavoro Excel utilizzato per il calcolo del parametro IATI.

L'utilizzo del parametro IATI, il quale rappresenta la concentrazione sia di Aβ42 che di t-tau, consente di combinare in un unico grafico le concentrazioni di t-tau e Aβ42 con la concentrazione di p-tau-181. L'analisi grafica risultante permette di differenziare i campioni in tre categorie diagnostiche:

- valori normali;
- valori suggestivi per malattia di Alzheimer;
- valori indicativi per demenza non-Alzheimer.

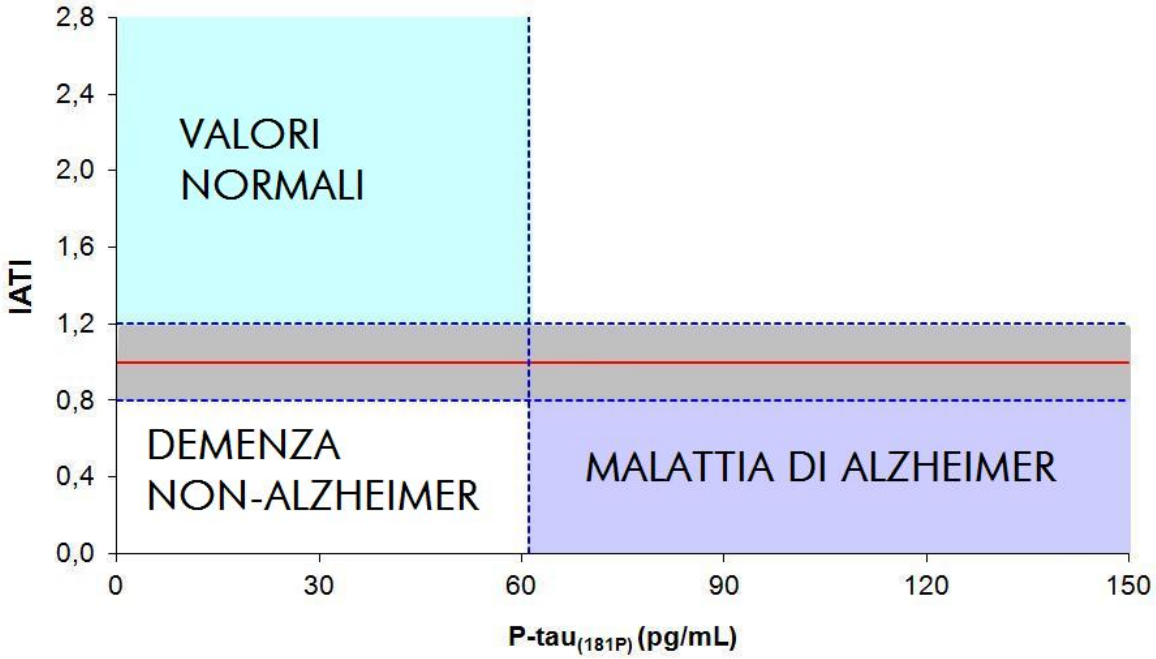


Figura 1. Esempio di grafico utilizzato per la rappresentazione dei valori dei marcatori liquorali in ogni paziente. In ascissa c'è il valore di p-tau, in ordinata lo IATI. La linea rossa corrisponde a IATI=1.

Analisi statistica

I campioni sono stati valutati per la normalità con il test di Shapiro-Wilk, il quale ha rivelato che i biomarcatori liquorali non seguono una distribuzione normale.

Di conseguenza, per studiare le differenze tra i valori dei biomarcatori liquorali nei diversi gruppi di pazienti, è stato utilizzato un metodo non parametrico, il test U di Mann-Whitney.

Il test del chi quadro è stato impiegato per indagare la comparazione tra diagnosi clinica iniziale e il profilo dei biomarcatori liquorali.

È stato scelto come livello di significatività (p-value) un valore di $\alpha<0,05$.

Gli studi di correlazione tra due parametri sono stati condotti tramite la valutazione del coefficiente di correlazione di Pearson.

Le analisi statistiche sono state condotte con il software SPSS®.

6. Risultati

Dati demografici

I 47 pazienti inclusi nello studio (19 maschi e 28 femmine, con età media al prelievo del liquor 62,8 ± 7,9 anni) sono stati suddivisi in 8 categorie, a seconda della diagnosi clinica. Nel dettaglio:

- 17 pazienti (36,6%, 7 maschi e 11 femmine, età media al prelievo 64,2 ± 7,3 anni) hanno ricevuto diagnosi di AD;
- 2 pazienti (4,2%, tutte femmine, età media a al prelievo 63,0 ± 7,1 anni) hanno ricevuto diagnosi di PCA
- 3 pazienti (6,4%, 1 maschio e 2 femmine, età media al prelievo 68,3 ± 7,2 anni) hanno ricevuto diagnosi di LPA
- 5 pazienti (10,5%, 3 maschi e 2 femmine, età media al prelievo 59,4 ± 11,6 anni) hanno ricevuto diagnosi di PNFA o SD
- 12 pazienti (25,4%, 4 maschi e 8 femmine, età media al prelievo 62,3 ± 6,7 anni) di FTD
- 4 pazienti (8,4%, 3 maschi e 1 femmina, età media al prelievo 63,8 ± 8,5 anni) hanno ricevuto diagnosi di DLB
- 1 paziente (2,1%, maschio, età al prelievo 71 anni) ha ricevuto diagnosi di CBD
- 3 pazienti (6,4%, tutte femmine, età media al prelievo 52,3 ± 2,9 anni) hanno ricevuto diagnosi di FCD.

I pazienti con diagnosi clinica di AD, PCA e LPA sono stati riuniti in un macro-gruppo denominato "Alzheimer", in quanto nella maggior parte dei casi LPA e PCA sono correlati con il substrato neuropatologico della malattia di Alzheimer. Il macro-gruppo Alzheimer comprende 22 pazienti (46,8%, 8 maschi e 14 femmine, età media al prelievo 62,3 ± 6,7 anni).

I pazienti con diagnosi clinica di PNFA/SD, FTD, DLB, CBD e FCD sono stati riuniti in un macro-gruppo denominato "Non-Alzheimer", categoria che raccoglie tutti i pazienti nei quali probabilmente il substrato neuropatologico della malattia differisce da quello della malattia di Alzheimer. Il macro-gruppo Non-Alzheimer comprende 25 pazienti (53,2%, 11 maschi e 14 femmine, età media al prelievo 52,3 ± 2,9 anni).
Tutti i dati demografici sono riassunti nelle seguenti tabelle.

	AD	**PCA**	**LPA**	**PNFA o SD**
No. di pazienti	17	2	3	5
Rapporto M:F	7:11	0:2	1:2	3:2
Età esordio	61,2 ± 8,0	61,0 ± 7,0	66,3 ± 7,2	56,8 ± 11,4
Età prelievo liq.	64,2 ± 7,3	63,0 ± 7,1	68,3 ± 7,2	59,4 ± 11,6
Durata malattia*	35,5 ± 39,3	24,0 ± 0,0	26,3 ± 15,6	29,2 ± 20,9
MMSE	18,1 ± 5,1	10,5 ± 3,5	24,3 ± 3,8	13,5 ± 5,9

	FTD	**DLB**	**CBD**	**FCD**
No. di pazienti	12	4	1	3
Rapporto M:F	4:8	3:1	1:0	0:3
Età esordio	60,6 ± 6,4	62,0 ± 7,4	69	48,3 ± 4,5
Età prelievo liq.	62,3 ± 6,7	63,8 ± 8,5	71	52,3 ± 2,9
Durata malattia*	20,7 ± 14,0	25,25 ± 20,0	21	48,0 ± 31,8
MMSE	20,5 ± 5,2	18,8 ± 8,30	22	13,0 ± 1,4

Tabella 2. Dati demografici dei pazienti inclusi nello studio, divisi per categoria diagnostica. La durata di malattia (*) è il tempo trascorso, espresso in mesi, tra l'esordio di malattia e il prelievo di liquor. Età d'esordio, età al prelievo, durata di malattia e MMSE sono indicati con i valori medi (con la deviazione standard).

	Tutti i pazienti	Macro-gruppo Alzheimer	Macro-gruppo Non-Alzheimer
No. di pazienti	47	22	25
Rapporto M:F	19:28	8:14	11:14
Età esordio	60,3 ± 8,2	61,9 ± 7,7	58,9 ± 8,4
Età prelievo liquor	60,7 ± 8,2	64,6 ± 7,1	61,1 ± 8,3
Durata malattia*	29,6 ± 27,6	33,2 ± 34,9	26,4 ± 19,4
MMSE	18,3 ± 5,9	18,3 ± 5,8	18,4 ± 6,1

Tabella 3. Dati demografici dei pazienti inclusi nello studio, suddivisi nelle macro-categorie "Alzheimer" e "Non-Alzheimer". La durata di malattia (*) è il tempo trascorso, espresso in mesi, tra l'esordio di malattia e il prelievo di liquor. Età d'esordio, età al prelievo, durata di malattia e MMSE sono indicati con i valori medi (con la deviazione standard).

Risultati dell'analisi del liquor

Il LCR, ottenuto mediante puntura lombare, è stato analizzato in laboratorio, dove è stato effettuato il dosaggio quantitativo delle proteine liquorali, t-tau, p-tau e Aβ42. Sono stati quindi calcolati i valori medi per ogni singola categoria diagnostica:

- I pazienti AD hanno riportato un valore medio di t-tau pari a 796,2 ± 346,4 pg/mL, un valore medio di p-tau pari a 94,8 ± 29,8 pg/mL, e un valore medio di Aβ42 pari a 216,8 ± 95,6 pg/mL
- I pazienti PCA hanno riportato un valore medio di t-tau pari a 741,6 ± 164,8 pg/mL, un valore medio di p-tau pari a 96,0 ± 35,4 pg/mL, e un valore medio di Aβ42 pari a 177,5 ± 51,6 pg/mL
- I pazienti LPA hanno riportato un valore medio di t-tau pari a 477,7 ± 256,1 pg/mL, un valore medio di p-tau pari a 73,7 ± 25,8 pg/mL, e un valore medio di Aβ42 pari a 161,7 ± 39,6 pg/mL

- I pazienti PNFA o SD hanno riportato un valore medio di t-tau pari a 647,6 ± 577,9 pg/mL, un valore medio di p-tau pari a 81,8 ± 60,1 pg/mL, e un valore medio di Aβ42 pari a 167,0 ± 52,7 pg/mL
- I pazienti FTD hanno riportato un valore medio di t-tau pari a 500,4 ± 391,6 pg/mL, un valore medio di p-tau pari a 82,7 ± 60,3 pg/mL, e un valore medio di Aβ42 pari a 310,4 ± 106,0 pg/mL
- I pazienti DLB hanno riportato un valore medio di t-tau pari a 763,3 ± 501,5 pg/mL, un valore medio di p-tau pari a 85,8 ± 41,2 pg/mL, e un valore medio di Aβ42 pari a 305,0 ± 165,3 pg/mL
- Il paziente con CBD ha riportato un valore di t-tau pari a 363 pg/mL, un valore di p-tau pari a 73 pg/mL, e un valore di Aβ42 pari a 698 pg/mL
- I pazienti FCD hanno riportato un valore medio di t-tau pari a 172,0 ± 75,1 pg/mL, un valore medio di p-tau pari a 41,0 ± 17,1 pg/mL, e un valore medio di Aβ42 pari a 437,7 ± 130,5 pg/mL

Prendendo in considerazione le due macro-categorie diagnostiche "Alzheimer" e "Non-Alzheimer", i risultati dell'analisi del liquor sono i seguenti:

- I pazienti Alzheimer hanno riportato un valore medio di t-tau pari a 747,8 ± 333,6 pg/mL, un valore medio di p-tau pari a 92,0 ± 29,2 pg/mL, e un valore medio di Aβ42 pari a 205,7 ± 87,7 pg/mL
- I pazienti Non-Alzheimer hanno riportato un valore medio di t-tau pari a 527,0 ± 432,9 pg/mL, un valore medio di p-tau pari a 77,6 ± 52,0 pg/mL, e un valore medio di Aβ42 pari a 311,6 ± 151,7 pg/mL

In tutti i casi, sono stati calcolati anche: il rapporto t-tau/Aβ42, il rapporto p-tau/Aβ42, e il parametro IATI [Aβ42/(240+1,18×t-tau)].

Tutti i risultati dell'analisi del liquor sono riportati nelle tabelle alla pagina seguente.

	AD	PCA	LPA	PNFA o SD
t-tau (pg/mL)	796,2 ± 346,4	741,6 ± 164,8	477,7 ± 256,1	647,6 ± 577,9
p-tau (pg/mL)	94,8 ± 29,8	96,0 ± 35,4	73,7 ± 25,8	81,8 ± 60,1
Aβ42 (pg/mL)	216,8 ± 95,6	177,5 ± 51,6	161,7 ± 39,6	167,0 ± 52,7
t-tau/Aβ42	4,11 ± 2,30	1,15 ± 0,30	3,21 ± 2,01	3,81 ± 2,39
p-tau/Aβ42	0,51 ± 0,27	2,15 ± 0,04	0,49 ± 0,24	0,48 ± 0,22
IATI	0,21 ± 0,09	0,15 ± 0,07	0,23 ± 0,15	0,22 ± 0,16

	FTD	DLB	CBD	FCD
t-tau (pg/mL)	500,4 ± 391,6	763,3 ± 501,5	363	172,0 ± 75,1
p-tau (pg/mL)	82,7 ± 60,3	85,8 ± 41,2	73	41,0 ± 17,1
Aβ42 (pg/mL)	310,4 ± 106,0	305,0 ± 165,3	698	437,7 ± 130,5
t-tau/Aβ42	1,86 ± 1,77	5,60 ± 8,35	0,52	0,38 ± 0,07
p-tau/Aβ42	0,29 ± 0,23	0,60 ± 0,85	0,10	0,09 ± 0,02
IATI	0,50 ± 0,33	0,38 ± 0,22	1,00	1,00 ± 0,10

Tabella 4. Dati relativi al dosaggio dei biomarcatori nel liquor dei pazienti inclusi nello studio, divisi per categoria diagnostica. Tutti i dati sono indicati con i valori medi (con la deviazione standard).

	Tutti i pazienti	Macro-gruppo Alzheimer	Macro-gruppo Non-Alzheimer
t-tau (pg/mL)	630,4 ± 401,2	747,8 ± 333,6	527,0 ± 432,9
p-tau (pg/mL)	84,3 ± 43,0	92,0 ± 29,2	77,6 ± 52,0
Aβ42 (pg/mL)	262,0 ± 135,6	205,7 ± 87,7	311,6 ± 151,7
t-tau / Aβ42	3,26 ± 3,14	4,00 ± 2,12	2,62 ± 3,74
p-tau / Aβ42	0,42 ± 0,33	0,51 ± 0,25	0,35 ± 0,39
IATI	0,37 ± 0,30	0,21 ± 0,10	0,50 ± 0,35

Tabella 5. Dati relativi al dosaggio dei biomarcatori nel liquor dei pazienti inclusi nello studio, suddivisi nelle macro-categorie "Alzheimer" e "Non-Alzheimer". Tutti i dati sono indicati con i valori medi (con la deviazione standard).

Confronto tra i macro-gruppi "Alzheimer" e "Non-Alzheimer"

Sono stati confrontati i valori dei biomarcatori liquorali nei due macro-gruppi Alzheimer e Non-Alzheimer. I risultati ottenuti sono i seguenti:

- La proteina t-tau è significativamente più elevata nei pazienti Alzheimer rispetto ai pazienti Non-Alzheimer (p=0,017);
- La proteina p-tau è significativamente più elevata nei pazienti Alzheimer rispetto ai pazienti Non-Alzheimer (p=0,037);
- La proteina Aβ42 è significativamente più bassa nei pazienti Alzheimer rispetto ai pazienti Non-Alzheimer (p=0,007);
- Il rapporto t-tau/Aβ42 è significativamente più elevato nei pazienti Alzheimer rispetto ai pazienti Non-Alzheimer (p=0,002);
- Il rapporto p-tau/Aβ42 è significativamente più elevato nei pazienti Alzheimer rispetto ai pazienti non-Alzheimer (p=0,003);
- Il parametro IATI è significativamente più basso nei pazienti Alzheimer rispetto ai pazienti Non-Alzheimer (p=0,004).

Nella pagina seguente sono riportati i grafici che illustrano quanto descritto in questo paragrafo.

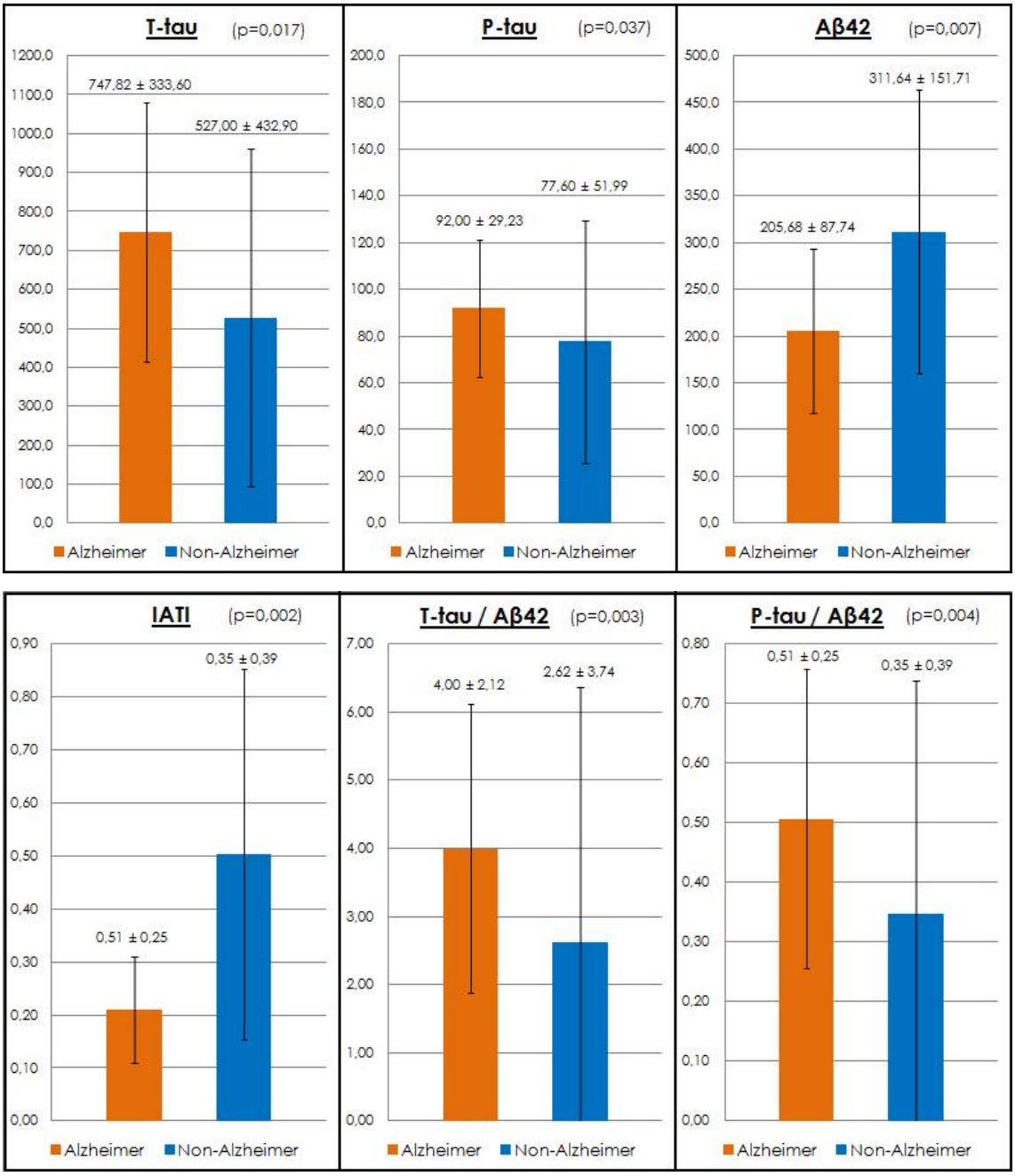


Figura 2. Grafici che illustrano il confronto tra i valori medi dei biomarcatori liquorali (t-tau, p-tau e Aβ42), e delle loro combinazioni (IATI, t-tau/Aβ42, p-tau/Aβ42), nei due macro-gruppi Alzheimer (colore arancio) e Non-Alzheimer (colore blu). I valori delle proteine sono espressi in pg/mL.

Confronto tra le singole categorie diagnostiche

Sono stati confrontati anche i valori dei biomarcatori liquorali tra i singoli sottogruppi di pazienti (ciascuno corrispondente ad una specifica diagnosi clinica); più precisamente, è stato confrontato il sottogruppo AD con ciascuno degli altri sottogruppi. Il sottogruppo CBD è stato escluso da questi confronti, in quanto costituito da un unico paziente.

- Tutti i parametri considerati (t-tau, p-tau, Aβ42, IATI, t-tau/Aβ42, p-tau/Aβ42) hanno rivelato livelli significativamente differenti nel confronto tra i pazienti AD e i pazienti FCD. In particolare, i pazienti AD presentano, rispetto ai pazienti FCD, livelli significativamente più elevati di t-tau ($p=0,007$), p-tau ($p=0,017$), t-tau/Aβ42 ($p=0,007$) e p-tau/Aβ42 ($p=0,007$), e livelli significativamente più bassi di Aβ42 ($p=0,013$) e IATI ($p=0,005$).
- Tutti i parametri considerati, eccetto p-tau, hanno rivelato livelli significativamente differenti nel confronto tra i pazienti AD e i pazienti FTD. In particolare, i pazienti AD presentano, rispetto ai pazienti FTD, livelli significativamente più elevati di t-tau ($p=0,041$), t-tau/Aβ42 ($p=0,006$) e p-tau/Aβ42 ($p=0,015$), e livelli significativamente più bassi di Aβ42 ($p=0,013$) e IATI ($p=0,003$).
- Nessuno dei parametri considerati ha rivelato livelli significativamente differenti ($p >0,05$) nel confronto tra i pazienti AD e i pazienti PCA, LPA, PNFA/SD e DLB .

Interpretazione grafica dei risultati

I singoli pazienti sono stati riportati in un grafico che presenta p-tau in ascissa e IATI in ordinata, in modo tale da prendere in considerazione tutti e tre i biomarcatori liquorali (infatti, IATI comprende sia t-tau che Aβ42).

Il grafico permette un'analisi visiva immediata, da cui si può facilmente osservare che i pazienti del macro-gruppo Alzheimer (AD+PCA+LPA) si distribuiscono quasi tutti nell'area dei valori tipici della malattia di Alzheimer (area lilla in basso a destra nel grafico), mentre i pazienti del macro-gruppo Non-Alzheimer (PNFA/SD+FTD+DLB+FCD+CBD) presentano una maggiore dispersione, tendendo ad occupare prevalentemente aree del grafico diverse da quella dei valori tipici della malattia di Alzheimer.

Di seguito, sono riportati i grafici costruiti con le suddette modalità.

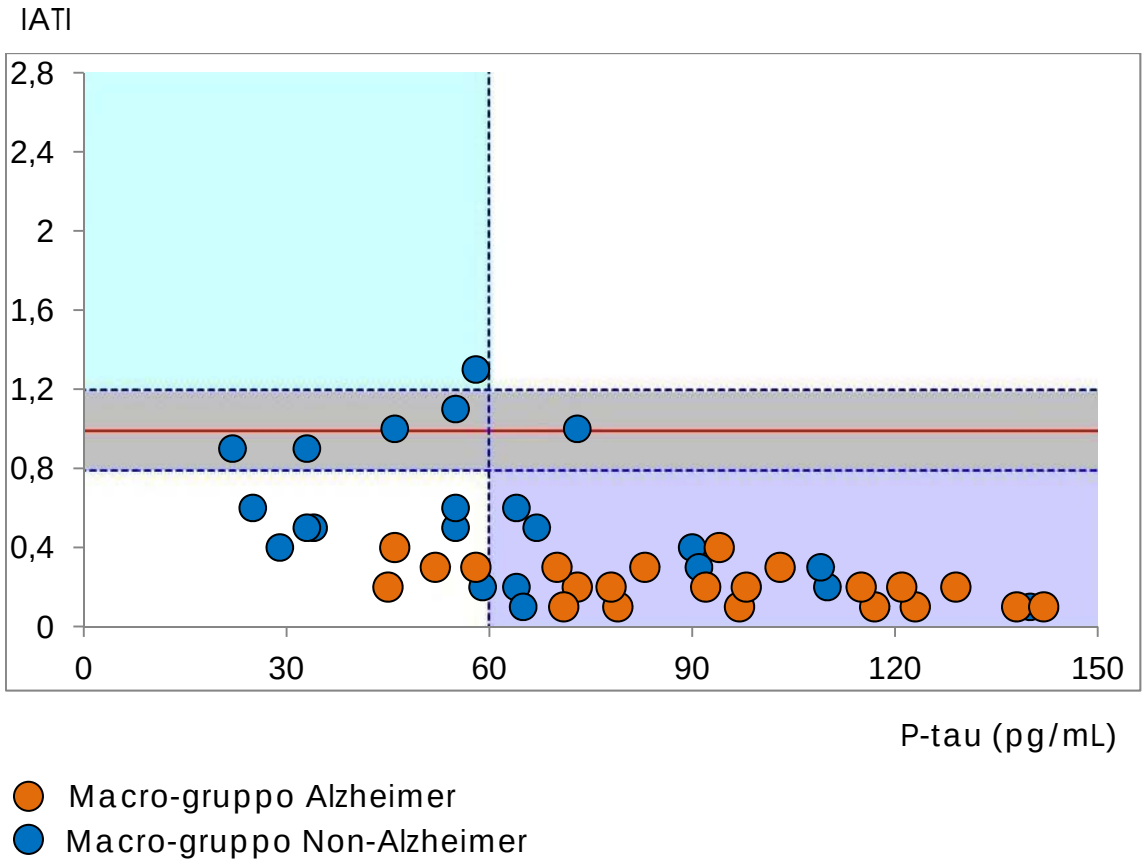


Figura 3. In questo grafico, che riporta in ascissa p-tau e in ordinata IATI, ogni pallino rappresenta un paziente; i pazienti sono suddivisi nei due macro-gruppi Alzheimer (colore arancio) e Non-Alzheimer (colore blu). L'area lilla in basso a destra è quella dei valori tipici della malattia di Alzheimer, l'area bianca in basso a sinistra è quella dei valori tipici delle demenze non-Alzheimer, l'area celeste in alto a sinistra è l'area dei valori normali.

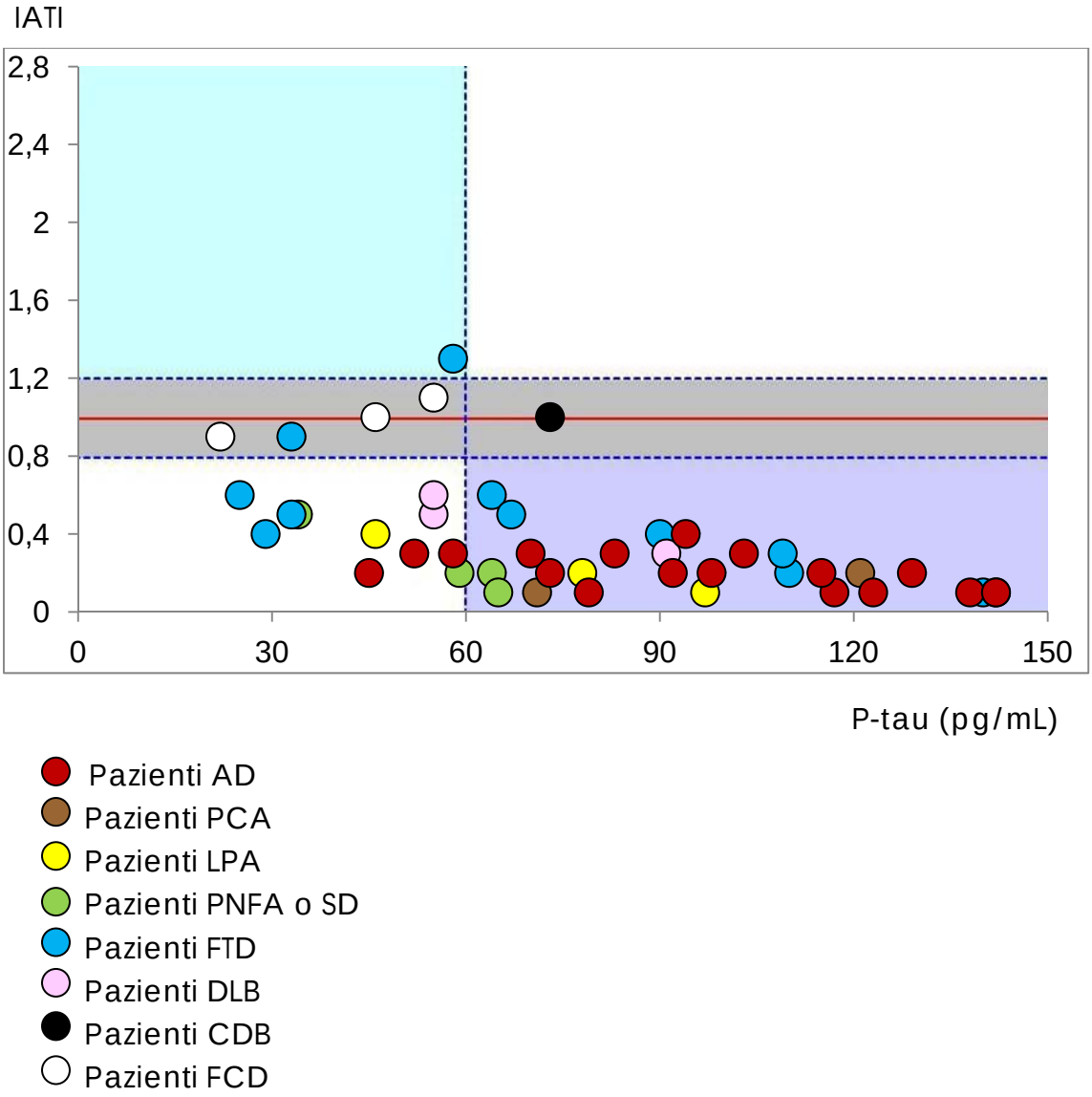


Figura 4. In questo grafico, che riporta in ascissa p-tau e in ordinata IATI, ogni pallino rappresenta un paziente; i pazienti sono suddivisi per singoli gruppi diagnostici (a ciascun colore corrisponde una diversa diagnosi, come riportato sopra nella legenda). L'area lilla in basso a destra è quella dei valori tipici della malattia di Alzheimer, l'area bianca in basso a sinistra è quella dei valori tipici delle demenze non-Alzheimer, l'area celeste in alto a sinistra è l'area dei valori normali.

Accordo tra profilo dei biomarcatori liquorali e diagnosi clinica

Per ognuno dei pazienti inclusi nello studio, il profilo dei biomarcatori liquorali è stato confrontato con la diagnosi iniziale, per stabilire se erano concordi, oppure no.

Per operare questo confronto, è stato dapprima valutato se il profilo dei biomarcatori liquorali di ogni paziente orientava verso una malattia Alzheimer-correlata oppure verso una malattia Non-Alzheimer-correlata, utilizzando il seguente criterio classificativo (Kester et al., 2010):

- "Concorde con Malattia di Alzheimer": tutte e tre le proteine hanno valori alterati;
- "Probabilmente concorde con Malattia di Alzheimer": t-tau e p-tau sono alterate, ma Aβ42 è normale;
- "Probabilmente non concorde con Malattia di Alzheimer": Aβ42 è alterata, ma t-tau e p-tau sono normali;
- "Non concorde con Malattia di Alzheimer": tutte e tre le proteine sono normali.

Sono stati considerati come alterati, indicativamente, valori di t-tau <275 pg/mL, valori di p-tau >60 pg/mL e valori di Aβ42 <600 pg/mL.

Per i pazienti del macro-gruppo Alzheimer, è stato considerato in accordo con la diagnosi clinica un profilo liquorale "concorde" o "probabilmente concorde" con MA.

Per i pazienti del macro-gruppo Non-Alzheimer, è stato considerato in accordo con la diagnosi clinica un profilo liquorale "non concorde" o "probabilmente non concorde" con MA.

Complessivamente, prendendo in considerazione tutti i pazienti inclusi nello studio, il profilo dei biomarcatori liquorali è risultato in accordo con la diagnosi clinica nel 74% dei casi (35 pazienti su 47), e in disaccordo nel 26% dei casi (12 pazienti su 47).

La proporzione di diagnosi concordi (ossia i casi in cui clinica e profilo liquorale orientano verso la stessa patologia) è significativamente superiore ($p<0,001$) alla proporzione di diagnosi non concordi (ossia i casi in cui clinica e profilo liquorale orientano verso differenti patologie).

Nel macro-gruppo Alzheimer, in 19 casi su 22 (86%), i valori dei biomarcatori liquorali sono in accordo con la diagnosi clinica; in soli 3 casi su 22 (14%; 2 pazienti con diagnosi di AD e 1 paziente con diagnosi di LPA) il profilo liquorale non è in accordo la diagnosi clinica. In dettaglio, 18 pazienti (82%) hanno un mostrato un profilo dei biomarcatori liquorali "concorde con MA", 1 paziente (5%) ha mostrato un profilo "probabilmente concorde con MA", 3 pazienti (14%) hanno mostrato un profilo "probabilmente non concorde con MA", e nessun paziente ha mostrato un profilo "non concorde con MA".

Nel macro-gruppo Non-Alzheimer, la concordanza è risultata minore, essendo i valori del liquor in accordo con la diagnosi clinica in 16 casi su 25 (64%), e in disaccordo in 9 casi su 25 (36%; 5 pazienti con diagnosi di FTD, 2 pazienti con diagnosi di DLB, 2 pazienti con diagnosi di PNFA/SD). In dettaglio, 9 pazienti (36%) hanno mostrato un profilo dei biomarcatori liquorali "concorde con MA", nessun paziente ha mostrato un profilo "probabilmente concorde con MA", 13 pazienti (52%) hanno mostrato un profilo "probabilmente non concorde con MA", e 3 pazienti (12%) hanno mostrato un profilo "non concorde con MA".

I grafici alle pagine seguenti illustrano questi risultati.

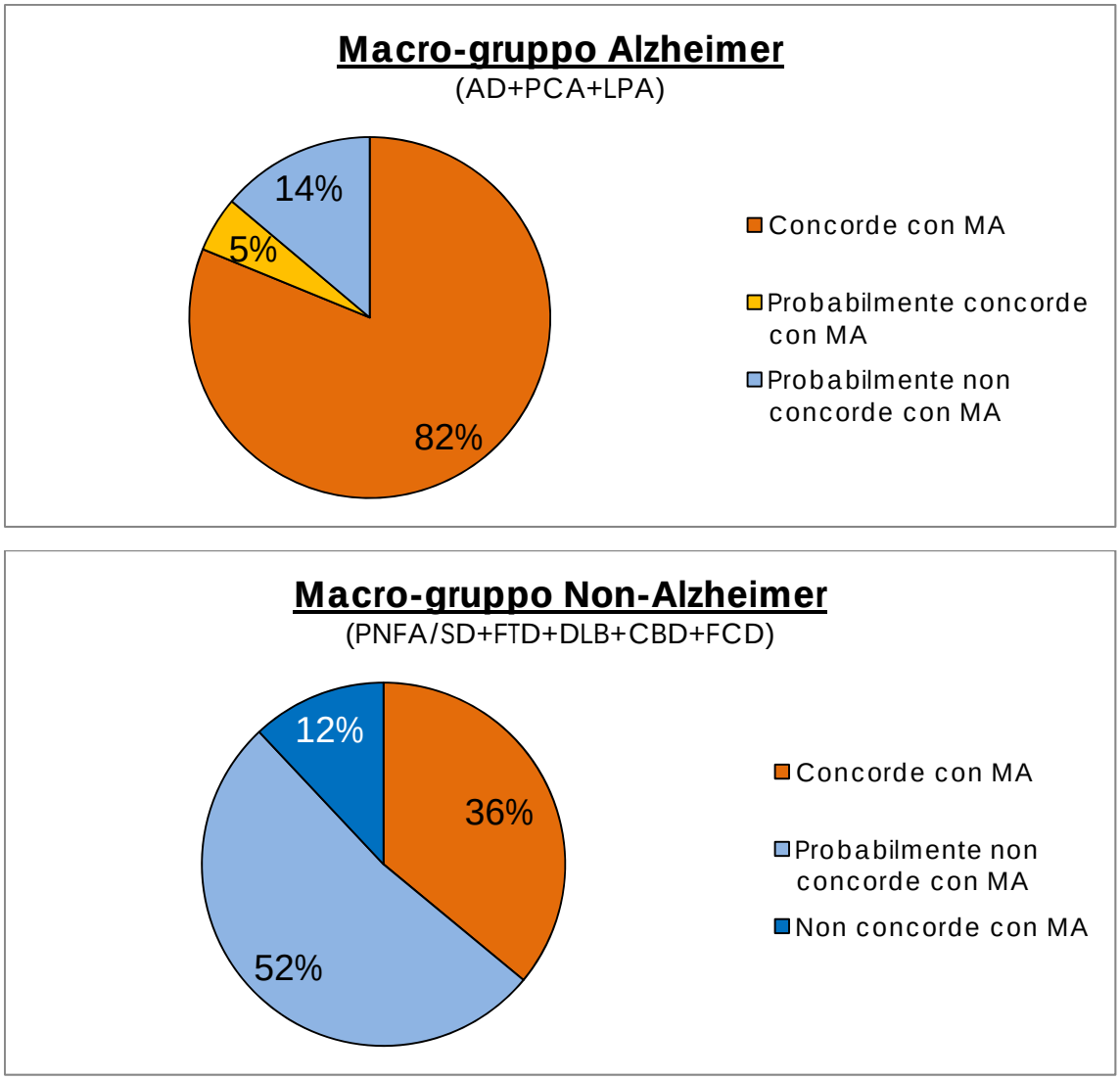


Figura 5. Grafici che illustrano la distribuzione del profilo dei biomarcatori liquorali nei pazienti dei due macro-gruppi Alzheimer e Non-Alzheimer.

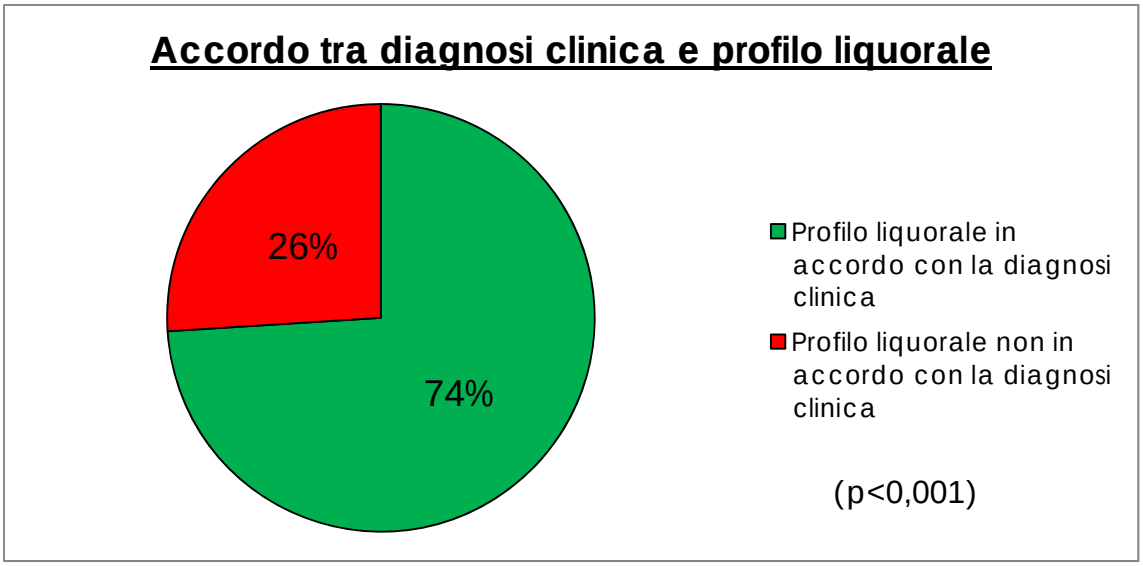


Figura 6. Grafico che mostra la concordanza tra diagnosi clinica e profilo dei biomarcatori liquorali.

Rivalutazione della diagnosi iniziale

Nei casi in cui la diagnosi clinica e il profilo dei biomarcatori liquorali sono risultati in disaccordo (12 pazienti su 47), la diagnosi iniziale è stata revisionata e rivalutata, tenendo in considerazione i risultati dell'analisi del liquor, così da porre una seconda diagnosi. Tale rivalutazione diagnostica è stata effettuata anche esaminando il follow-up del paziente e la sua evoluzione clinica nel tempo. I risultati della rivalutazione diagnostica sono i seguenti:

- in 6 casi (13% sul totale dei pazienti; 1 caso nel macro-gruppo Alzheimer e 5 casi nel macro-gruppo Non-Alzheimer), la diagnosi iniziale è stata cambiata; in particolare, in 1 caso la diagnosi è passata da LPA a PNFA, in 1 caso da PNFA a LPA, in 1 caso da DLB a PCA, in 1 caso da DLB a AD (variante a corpi di Lewy), in 2 casi da FTD a AD (variante frontale);

- ❖ in 2 casi (4% sul totale dei pazienti), entrambi con diagnosi di FTD, è stata mantenuta la diagnosi iniziale, nonostante il profilo dei biomarcatori liquorali fosse discordante.
- ❖ in 4 casi (9% sul totale dei pazienti; 2 casi nel macro-gruppo Alzheimer e 2 casi nel macro-gruppo Non-Alzheimer), la prima diagnosi è stata rivalutata, senza però porre un secondo sospetto diagnostico, anche per l'assenza di un follow-up, per cui la diagnosi post-liquor è stata definita "incerta".

Nei 35 pazienti in cui la diagnosi clinica e il profilo liquorale erano in accordo, la diagnosi iniziale è stata confermata in tutti i casi.

Alla luce di ciò, prendendo in considerazione tutti i pazienti inclusi nello studio, la seconda diagnosi risulta in accordo con i risultati del liquor in 41 casi su 47 (87%).

Di seguito sono riportati i grafici che illustrano questi risultati.

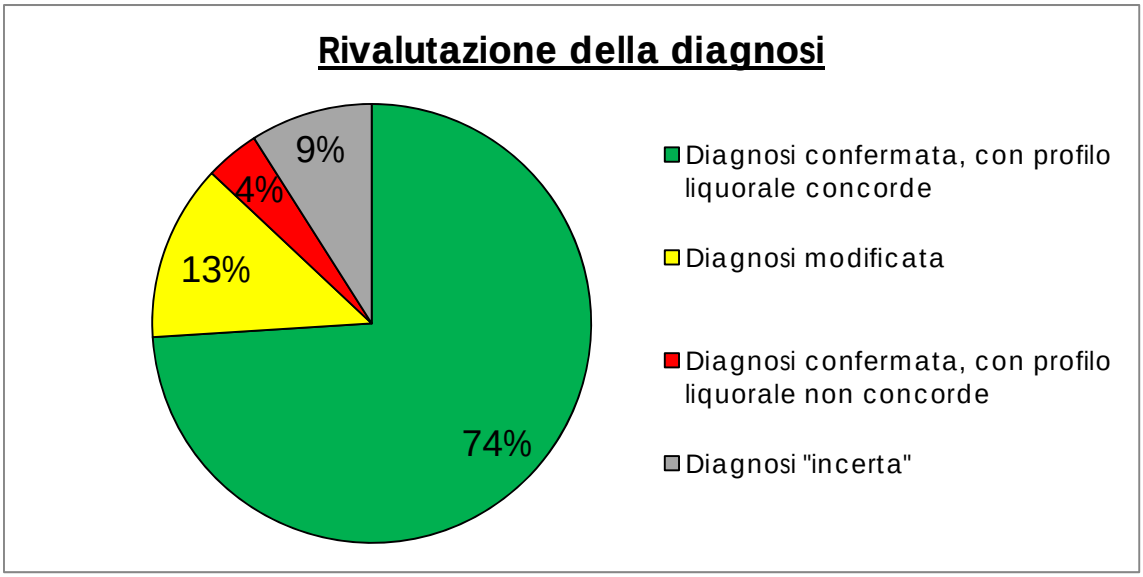


Figura 7. Grafico che mostra i risultati della rivalutazione diagnostica dopo la considerazione dei risultati dell'analisi del liquor.

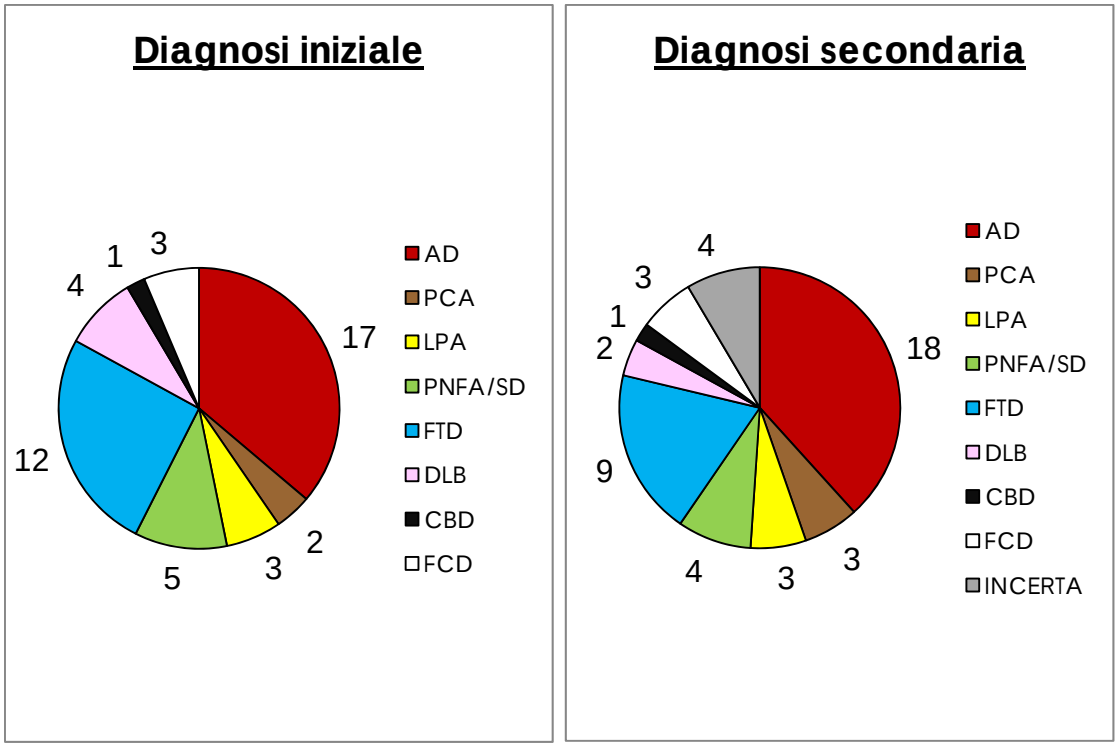


Figura 8. Distribuzione dei pazienti nelle categorie diagnostiche prima (diagnosi iniziale, a destra) e dopo (diagnosi secondaria, a sinistra) la valutazione dei risultati dell'analisi del liquor. La diagnosi iniziale è basata sulla clinica e sugli esami strumentali; la diagnosi secondaria tiene conto del profilo dei biomarcatori liquorali e del follow-up del paziente.

Correlazione con età, durata e gravità della malattia

Per ultimo, è stata studiata una possibile correlazione tra i valori dei biomarcatori liquorali e i seguenti elementi: età del paziente all'esordio della malattia; età del paziente al prelievo del liquor; durata di malattia (espressa come tempo trascorso, in mesi, tra l'esordio della malattia e il prelievo di liquor); gravità di malattia (espressa come risultato del MMSE al momento del prelievo).

In nessuno di questi casi è stata trovata una correlazione con significato statistico.

7. Discussione

Abbiamo indagato il ruolo dei biomarcatori liquorali nell'ambito della diagnosi delle demenze, analizzando la loro capacità di distinguere la MA da altre forme di demenza e la concordanza con la diagnosi clinico-strumentale.
La capacità dei biomarcatori liquorali di discernere tra demenze il cui substrato fa riferimento alla neuropatologia dell'Alzheimer, in opposizione a demenze con altra origine, è confermata dai risultati di questo studio.
Abbiamo interpretato i risultati dello studio tenendo conto delle basi neurobiologiche che stanno alla base dell'indagine dei biomarcatori liquorali, e confrontando, inoltre, i nostri risultati con i dati presenti in letteratura.

Proteina β-amiloide

La deposizione della proteina β-amiloide in placche è un evento chiave nello sviluppo della MA, in accordo con la cosiddetta "teoria della cascata dell'amiloide". Questo fenomeno è responsabile di una diminuzione dei livelli di β-amiloide nel liquor, ed in particolare questo è vero per quanto riguarda l'isoforma a 42 residui amminoacidici (Aβ42), che è la forma maggiormente implicata nell'aggregazione in placche. Per questo motivo, i livelli di Aβ42 nel liquor sono diminuiti in corso di MA rispetto a soggetti sani, come dimostrato per la prima volta da Motter e coll. (1995) e riaffermato da numerosi studi in seguito. È riscontrabile una correlazione piuttosto forte tra ridotti livelli di Aβ42 nel liquor ed elevato numero di placche amiloidi nella neocortex e nell'ippocampo (Strozyk et al., 2003); tali risultati sono confermati anche studi condotti con PET con traccianti per amiloide (Fagan et al., 2006).
Tuttavia, è doveroso sottolineare come la MA non sia l'unica situazione in cui si possono ritrovare livelli ridotti di Aβ42 nel liquor: altre malattie neurodegenerative presentano la medesima alterazione (è il caso, per esempio, della de-

menza a corpi di Lewy, delle demenze fronto-temporali e della malattia di Creutzfeld-Jacob), e benché la riduzione di β-amiloide nelle demenze non-Alzheimer sia di solito meno pronunciata rispetto alla MA, ciò rende minore la specificità di Aβ42 nella diagnosi di MA (Bibl et al., 2012).

I risultati di questo studio non solo confermano che i valori di Aβ42 sono sensibilmente inferiori nella MA, e nelle sue varianti, rispetto a demenze di altra origine, ma sembrano anche indicare che Aβ42 sia un buon parametro nella diagnosi differenziale.

Bisogna notare che i valori di Aβ42 sono alterati in quasi tutti i pazienti dello studio, cosa che depone verso una scarsa specificità diagnostica di questa proteina, tuttavia nei pazienti con MA i valori sono decisamente ridotti (tutti i pazienti del macro-gruppo Alzheimer, eccetto uno, hanno Aβ42 < 300 pg/mL), mentre nei pazienti con altre demenze i valori sono, in linea generale, meno marcatamente alterati.

Soprattutto in una prospettiva futura, è opportuno considerare che, dal momento che i valori della isoforma di β-amiloide a 40 amminoacidi (Aβ40) sono inalterati o leggermente aumentati nella MA (Wiltfang et al., 2002), la misurazione del rapporto tra Aβ42 e Aβ40 (Aβ42/Aβ40 ratio) potrebbe essere più appropriata, a fini diagnostici, della misurazione della sola Aβ42 (Hansson et al., 2007). In più, le recenti scoperte di più brevi isoforme di Aβ nel cervello e nel LCR hanno chiarito che la β-amiloide deve essere considerata come una complessa famiglia di peptidi di variabile lunghezza, e questo potrebbe aprire nuove possibilità nell'ambito della diagnosi sul liquor.

Proteina tau totale

La proteina tau totale misurata nel liquor riflette l'entità della perdita neuronale. La proteina tau, infatti, si trova principalmente associata ai microtubuli degli assoni corticali; di conseguenza, il valore di t-tau nel LCR è tanto più eleva-

to quanto maggiore è il danno assonale, risultando perciò aumentato nelle malattie caratterizzate da danno, degenerazione e perdita dei neuroni corticali. L'aumento dei livelli di t-tau nel liquor di pazienti affetti da MA è stato inizialmente misurato nel 1995 e replicato molte volte (Jensen et al., 1995; Vigo-Pelfrey et al., 1995).

D'altra parte, il danno assonale, in generale, è un evento comune a tutte le patologie neurodegenerative, infatti incrementi di t-tau sono rilevabili anche in demenze vascolari, demenza a corpi di Lewy, demenze fronto-temporali e malattia di Creutzfeld-Jacob, però la proteina tau è espressa soprattutto negli assoni dei neuroni corticali, cosicché un suo aumento nel liquor riflette un danno neuronale prevalentemente a carico dei neuroni corticali, come è il caso della MA (Blennow e Hampel, 2003).

Nonostante questo, l'incremento dei valori di t-tau nel LCR rimane un reperto alquanto aspecifico, poiché altre patologie, oltre alla MA, sono responsabili di danno neuronale principalmente corticale, ad esempio la malattia di Creutzfeld-Jacob (Otto et al., 1997).

I valori liquorali di t-tau correlano con l'entità e la dinamica della perdita neuronale. La concentrazione di t-tau nel LCR è correlata a fattori quali: vicinanza dei processi di danno neuronale al sistema ventricolare, quantità assoluta di sinapsi distrutte, rapidità con cui procede il processo di neurodegenerazione (vale a dire numero di neuroni/sinapsi degenerate per unità di tempo). Sulla base di ciò, t-tau è particolarmente utile per identificare processi neurodegenerativi a rapida progressione, come la malattia di Creutzfeld-Jacob, dove infatti i livelli di t-tau che si riscontrano nel LCR sono estremamente elevati, molto più alti rispetto ai valori che si trovano nelle demenze a lenta insorgenza, come la MA (Bibl et al., 2012).

Nel nostro studio, i livelli di t-tau riscontrati sono mediamente più elevati nelle demenze di tipo Alzheimer in confronto alle altre demenze, tuttavia abbiamo

riscontrato una marcata variabilità individuale nei valori di t-tau, anche tra pazienti con identica diagnosi.

Proteina tau fosforilata

La proteina tau fosforilata è un indicatore della presenza nei neuroni di ammassi neurofibrillari (tangles), i quali sono per lo più composti, appunto, dalla forma iperfosforilata della proteina tau; i tangles sono l'elemento principale del processo patologico noto come tau-patia.

In contrasto con t-tau, i livelli liquorali di p-tau sono più strettamente correlati alla neuropatologia specifica dell'Alzheimer.

Sono stati identificati molti siti di fosforilazione della proteina tau, i più studiati sono i siti a livello della treonina-181 (p-tau 181) e della treonina-231 (p-tau 231), ed è stata trovata una significativa associazione tra i livelli di tau fosforilata nei suddetti siti e la patologia neurofibrillare nella neocortex (Hu et al., 2002; Buerger et al., 2006).

In letteratura, la proteina p-tau risulta dotata di accuratezza maggiore rispetto ad Aβ42 e t-tau per la diagnosi differenziale tra MA e altre demenze (Mattson et al., 2009; Bibl et al., 2012). Pazienti con demenza a corpi di Lewy, demenze fronto-temporali e Parkinson-demenza possono mostrare livelli aumentati di p-tau nel LCR, tuttavia tali valori sono sensibilmente inferiori rispetto alla MA; nella degenerazione corticobasale, invece, i livelli di p-tau sono sovrapponibili a quelli della MA (Vanmechelen et al., 2001).

Nella nostra casistica, è riaffermato che i valori di p-tau-181 sono più elevati, mediamente, nei pazienti con MA e varianti, rispetto agli altri pazienti, tuttavia p-tau non si è dimostrata superiore alle altre proteine liquorali per distinguere demenze di diversa origine.

Tuttavia, è importante notare che, in questo studio, p-tau è la proteina che più frequentemente si ritrova non alterata (ossia assume valori normali) nei pa-

zienti con patologia diversa dalla MA, e ciò, in effetti, orienta verso una maggiore specificità di p-tau, rispetto agli altri biomarcatori, nella diagnosi differenziale.

Combinazione dei biomarcatori

Diverse sono le possibilità di combinare i valori dei biomarcatori liquorali, al fine di migliorarne la funzione diagnostica. Il rapporto t-tau/Aβ42 ha accuratezza diagnostica maggiore rispetto ai singoli parametri da soli (Blennow, 2004), e questo è vero anche per il rapporto p-tau/Aβ42; quest'ultimo, in alcuni studi, è definito il miglior indicatore nel differenziare le lesioni istopatologiche associate alla MA da quelle associate ad altre demenze (de Souza et al., 2011; Bibl et al., 2012).

La maggior validità nella diagnosi differenziale degli indici di combinazione rispetto ai singoli biomarcatori è confermata dal nostro studio. In particolare, abbiamo riscontrato che il parametro IATI, che combina t-tau e Aβ42, si caratterizza come un ottimo indice nella distinzione tra demenza Alzheimer-correlata e demenze di altra origine, in quanto i pazienti del macro-gruppo Alzheimer presentano tutti un indice IATI ridotto, con scarsa variabilità individuale (nessun paziente con MA e varianti ha IATI>0,4), mentre pazienti del macro-gruppo Non-Alzheimer presentano un indice IATI mediamente più elevato.

La rappresentazione grafica che combina IATI e p-tau sembra essere uno strumento molto utile per l'interpretazione dei valori liquorali, sia perché tiene conto di tutti e tre i biomarcatori, sia perché risulta di facile lettura.

Conclusioni

I risultati dello studio confermano che il profilo dei biomarcatori liquorali nella MA è tipicamente caratterizzato da alti livelli di t-tau , alti livelli di p-tau e bassi livelli di Aβ42.

Tutti i biomarcatori si sono dimostrati efficaci nel differenziare demenze la cui neuropatologia è quella tipica della MA, da demenze di altra origine. La combinazione di più parametri liquorali incrementa l'efficacia diagnostica.

Abbiamo trovato che i biomarcatori liquorali sono efficaci nel distinguere la MA da FTD e FCD. L'assenza di differenze significative tra i pazienti con MA rispetto ai pazienti con PCA e LPA conferma che la neuropatologia che sottende questi quadri è la medesima della MA (Warren et al., 2012).

In ogni caso, nell'interpretazione dei risultati, dobbiamo tener conto della non elevata numerosità del campione a nostra disposizione.

I risultati più importanti, comunque, sono quelli che riguardano l'applicazione nella pratica clinica dei biomarcatori liquorali, vero scopo di questo lavoro.

Le difficoltà diagnostiche nascono dalla notevole variabilità di manifestazioni cliniche associate alla sottostante alterazione neuropatologica; i sintomi clinici dipendono più spesso dalle regioni cerebrali colpite nel singolo paziente, piuttosto che dalla specifica neuropatologia sottostante (Irwin et al., 2013). Ecco perché i biomarcatori liquorali, essendo correlati con la neuropatologia, possono essere d'aiuto nella diagnosi differenziale.

Nella nostra casistica, la diagnosi clinica è stata confermata dall'analisi del liquor in circa tre quarti dei casi. Nei casi di non concordanza tra profilo liquorale e diagnosi clinica (12 pazienti), la diagnosi è stata riconsiderata, e ciò ha portato, in 6 casi, ad un cambiamento della diagnosi iniziale.

In questo modo, i biomarcatori liquorali si configurano come un importante ausilio diagnostico, per la conferma, o viceversa la riconsiderazione, di una diagnosi clinico-strumentale dubbia, soprattutto nelle demenze non-Alzheimer,

che risultano caratterizzate, in accordo con i dati di letteratura, da frequenti misdiagnosi, particolarmente nelle fasi iniziali di malattia.

Tuttavia, bisogna considerare anche che i biomarcatori liquorali sono dotati di una elevata sensibilità per la MA, ma di una moderata specificità. In altre parole, in diversi casi è possibile trovare un profilo dei biomarcatori suggestivo di MA anche in pazienti con una patologia di diversa origine. I motivi di questa sovrapposizione sono molteplici: variabilità inter-individuale nei livelli dei marcatori, mancanza di cut-off certi, scarsa specificità dei quadri neuropatologici che sottendono le alterazioni dei marcatori (la patologia da amiloide e la taupatia si possono riscontrare in diverse malattie), frequente presenza di quadri di demenza mista (Schoonenboom et al., 2012).

Per tutte queste ragioni, affinché il profilo dei biomarcatori liquorali sia uno strumento utile a fini diagnostici, è di fondamentale importanza la capacità del clinico di interpretare i valori dei marcatori in ogni singolo paziente, unitamente ai dati clinici e agli esami strumentali e al follow-up.

Ciò è ancora più vero in relazione al miglioramento degli altri strumenti diagnostici. Grande attenzione deve essere posta verso lo sviluppo delle metodiche PET con traccianti per amiloide (^{11}C-PiB-PET): il tracciante PiB (^{11}C-Pittsburgh Compound B), infatti, è inversamente correlato con i livelli di β-amiloide nel liquor (Rabinovici e Jagust, 2009), perciò l'uso combinato delle due tecniche diagnostiche (PET e dosaggio liquorale di Aβ42) può incrementare l'accuratezza diagnostica per la malattia di Alzheimer e può migliorare la predizione della conversione da MCI a MA (Herholz e Ebmeier, 2011; Ishii, 2013). Ulteriori scenari potrebbero essere aperti dall'introduzione di tecniche PET con traccianti per la proteina tau, tecniche ad oggi in fase di sperimentazione (Ishii, 2013).

In conclusione, i biomarcatori liquorali, insieme agli altri elementi diagnostici, possono dare un contributo importante per porre una diagnosi differenziale il

più possibile accurata e precoce tra MA e altre demenze; questo rappresenta, del resto, un aspetto cruciale, per impostare una corretta terapia ai pazienti affetti da MA, soprattutto in relazione alla possibile introduzione di terapie eziologiche specifiche per la MA.

Bibliografia

- Alladi S, Xuereb J, Bak T, Nestor P, Knibb J, Patterson K, Hodges JR. Focal cortical presentations of Alzheimer's disease. Brain. 2007 Oct;130(Pt 10):2636-45.

- Andersen K, Launer LJ, Dewey ME, Letenneur L, Ott A, Copeland JR, Dartigues JF, Kragh-Sorensen P, Baldereschi M, Brayne C, Lobo A, Martinez-Lage JM, Stijnen T, Hofman A. Gender differences in the incidence of AD and vascular dementia: The EURODEM Studies. EURODEM Incidence Research Group. Neurology. 1999 Dec 10;53(9):1992-7.

- Bertram L, Lill CM, Tanzi RE. The genetics of Alzheimer disease: back to the future. Neuron. 2010 Oct 21;68(2):270-81.

- Bertram L, Tanzi RE. The current status of Alzheimer's disease genetics: what do we tell the patients? Pharmacol Res. 2004 Oct;50(4):385-96.

- Bettens K, Sleegers K, Van Broeckhoven C. Current status on Alzheimer disease molecular genetics: from past, to present, to future. Hum Mol Genet. 2010 Apr 15;19(R1):R4-R11.

- Bibl M, Esselmann H, Wiltfang J. Neurochemical biomarkers in Alzheimer's disease and related disorders. Ther Adv Neurol Disord. 2012 Nov;5(6):335-48

- Blennow K, Hampel H. CSF markers for incipient Alzheimer's disease. Lancet Neurol. 2003 Oct;2(10):605-13.

- Blennow K. Cerebrospinal fluid protein biomarkers for Alzheimer's disease. NeuroRx. 2004 Apr;1(2):213-25.

- Brookmeyer R, Corrada MM, Curriero FC, Kawas C. Survival following a diagnosis of Alzheimer disease. Arch Neurol. 2002 Nov;59(11):1764-7.

- Buerger K, Ewers M, Pirttilä T, Zinkowski R, Alafuzoff I, Teipel SJ, DeBernardis J, Kerkman D, McCulloch C, Soininen H, Hampel H. CSF phosphorylated tau protein correlates with neocortical neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease. Brain. 2006 Nov;129(Pt 11):3035-41.

- Butterfield DA, Griffin S, Munch G, Pasinetti GM. Amyloid beta-peptide and amyloid pathology are central to the oxidative stress and inflammatory cascades under which Alzheimer's disease brain exists. J Alzheimers Dis. 2002 Jun;4(3):193-201.

- Cambier J, Masson M, Dehen H, Masson C. Abreges de Neurologie. Elsevier Masson, 2008. (Ed. It. Neurologia, Elsevier Masson, 2009).

- Campion D, Dumanchin C, Hannequin D, Dubois B, Belliard S, Puel M, Thomas-Anterion C, Michon A, Martin C, Charbonnier F, Raux G, Camuzat A, Penet C, Mesnage V, Martinez M, Clerget-Darpoux F, Brice A, Frebourg T. Early-onset autosomal dominant Alzheimer disease: prevalence, genetic heterogeneity, and mutation spectrum. Am J Hum Genet. 1999 Sep;65(3):664-70.

- Cassano GB (a cura di). Psicopatologia e clinica psichiatrica. UTET, 2006.

- Chen Q, Schubert D. Presenilin-interacting proteins. Expert Rev Mol Med. 2002 Aug 22;4(19):1-18.

- Chun W, Johnson GV. The role of tau phosphorylation and cleavage in neuronal cell death. Front Biosci. 2007 Jan 1;12:733-56.

- Conti F (a cura di). Fisiologia medica. Edi.Ermes, 1995.

- Crutch SJ, Lehmann M, Schott JM, Rabinovici GD, Rossor MN, Fox NC. Posterior cortical atrophy. Lancet Neurol. 2012 Feb;11(2):170-8.

- Cummings JL, Mega M, Gray K, Rosenberg-Thompson S, Carusi DA, Gornbein J. The Neuropsychiatric Inventory: comprehensive assessment of psychopathology in dementia. Neurology. 1994 Dec;44(12):2308-14.

- Cummings JL. Alzheimer's disease. N Engl J Med. 2004 Jul 1;351(1):56-67.

- Danysz W, Parsons CG, Mobius HJ, Stoffler A, Quack G. Neuroprotective and symptomatological action of memantine relevant for Alzheimer's disease--a unified glutamatergic hypothesis on the mechanism of action. Neurotox Res. 2000;2(2-3):85-97.

- de Souza LC, Lamari F, Belliard S, Jardel C, Houillier C, De Paz R, Dubois B, Sarazin M. Cerebrospinal fluid biomarkers in the differential diagnosis of Alzheimer's disease from other cortical dementias. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2011 Mar;82(3):240-6.

- Dementia in Europe Yearbook 2008, Luxembourg, Alzheimer Europe, 2008

- Deramecourt V, Lebert F, Debachy B, Mackowiak-Cordoliani MA, Bombois S, Kerdraon O, Buée L, Maurage CA, Pasquier F. Prediction of pathology in primary progressive language and speech disorders. Neurology. 2010 Jan 5;74(1):42-9.

- Doraiswamy PM, Leon J, Cummings JL, Marin D, Neumann PJ. Prevalence and impact of medical comorbidity in Alzheimer's disease. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2002 Mar;57(3):M173-7.

- DSM-IV-TR: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th Edition, Text Revision. American Psychiatric Association, 2000.

- Duan Y, Dong S, Gu F, Hu Y, Zhao Z. Advances in the pathogenesis of Alzheimer's disease: focusing on tau-mediated neurodegeneration. Transl Neurodegener. 2012 Dec 15;1(1):24.

- Dubois B, Feldman HH, Jacova C, Cummings JL, Dekosky ST, Barberger-Gateau P, Delacourte A, Frisoni G, Fox NC, Galasko D, Gauthier S, Hampel H, Jicha GA, Meguro K, O'Brien J, Pasquier F, Robert P, Rossor M, Salloway S, Sarazin M, de Souza LC, Stern Y, Visser PJ, Scheltens P. Revising the definition of Alzheimer's disease: a new lexicon. Lancet Neurol. 2010 Nov;9(11):1118-27.

- Dubois B, Feldman HH, Jacova C, Dekosky ST, Barberger-Gateau P, Cummings J, Delacourte A, Galasko D, Gauthier S, Jicha G, Meguro K, O'brien J, Pasquier F, Robert P, Rossor M, Salloway S, Stern Y, Visser PJ, Scheltens P. Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria. Lancet Neurol. 2007 Aug;6(8):734-46.

- Fagan AM, Mintun MA, Mach RH, Lee SY, Dence CS, Shah AR, LaRossa GN, Spinner ML, Klunk WE, Mathis CA, DeKosky ST, Morris JC, Holtzman DM. Inverse relation between in vivo amyloid imaging load and cerebrospinal fluid Abeta42 in humans. Ann Neurol. 2006 Mar;59(3):512-9.

- Ferri CP, Prince M, Brayne C, Brodaty H, Fratiglioni L, Ganguli M, Hall K, Hasegawa K, Hendrie H, Huang Y, Jorm A, Mathers C, Menezes PR, Rimmer E, Scazufca M; Alzheimer's Disease International. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. Lancet. 2005 Dec 17;366(9503):2112-7.

- Filippi M, Agosta F, Barkhof F, Dubois B, Fox NC, Frisoni GB, Jack CR, Johannsen P, Miller BL, Nestor PJ, Scheltens P, Sorbi S, Teipel S, Thompson PM, Wahlund LO; European Federation of the Neurologic Societies. EFNS task force: the use of neuroimaging in the diagnosis of dementia. Eur J Neurol. 2012 Dec;19(12):e131-40, 1487-501.

- Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. J Psychiatr Res. 1975 Nov;12(3):189-98.

- Förstl H, Kurz A. Clinical features of Alzheimer's disease. Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci. 1999;249(6):288-90.

- Francis PT, Palmer AM, Snape M, Wilcock GK. The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 1999 Feb;66(2):137-47.

- Francis PT. Glutamatergic systems in Alzheimer's disease. Int J Geriatr Psychiatry. 2003 Sep;18(Suppl 1):S15-21.

- Galton CJ, Patterson K, Xuereb JH, Hodges JR. Atypical and typical presentations of Alzheimer's disease: a clinical, neuropsychological, neuroimaging and pathological study of 13 cases. Brain. 2000 Mar;123 Pt 3:484-98.

- Geldmacher DS, Whitehouse PJ. Evaluation of dementia. N Engl J Med. 1996 Aug 1;335(5):330-6.

- Gorno-Tempini ML, Brambati SM, Ginex V, Ogar J, Dronkers NF, Marcone A, Perani D, Garibotto V, Cappa SF, Miller BL. The logopenic/phonological variant of primary progressive aphasia. Neurology. 2008 Oct 14;71(16):1227-34.

- Gorno-Tempini ML, Hillis AE, Weintraub S, Kertesz A, Mendez M, Cappa SF, Ogar JM, Rohrer JD, Black S, Boeve BF, Manes F, Dronkers NF, Vandenberghe R, Rascovsky K, Patterson K, Miller BL, Knopman DS, Hodges JR, Mesulam MM, Grossman M. Classification of primary progressive aphasia and its variants. Neurology. 2011 Mar 15;76(11):1006-14.

- Greicius MD, Krasnow B, Reiss AL, Menon V. Functional connectivity in the resting brain: a network analysis of the default mode hypothesis. Proc Natl Acad Sci USA. 2003 Jan 7;100(1):253-8.

- Hansson O, Zetterberg H, Buchhave P, Andreasson U, Londos E, Minthon L, Blennow K. Prediction of Alzheimer's disease using the CSF Abeta42/Abeta40 ratio in

patients with mild cognitive impairment. Dement Geriatr Cogn Disord. 2007;23(5):316-20.

- Hansson O, Zetterberg H, Buchhave P, Londos E, Blennow K, Minthon L. Association between CSF biomarkers and incipient Alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment: a follow-up study. Lancet Neurol. 2006 Mar;5(3):228-34. Erratum in: Lancet Neurol. 2006 Apr;5(4):293.

- Hardy J, Allsop D. Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. Trends Pharmacol Sci. 1991 Oct;12(10):383-8.

- Helmer C, Joly P, Letenneur L, Commenges D, Dartigues JF. Mortality with dementia: results from a French prospective community-based cohort. Am J Epidemiol. 2001 Oct 1;154(7):642-8.

- Heneka MT, Galea E, Gavriluyk V, Dumitrescu-Ozimek L, Daeschner J, O'Banion MK, Weinberg G, Klockgether T, Feinstein DL. Noradrenergic depletion potentiates beta-amyloid-induced cortical inflammation: implications for Alzheimer's disease. J Neurosci. 2002 Apr 1;22(7):2434-42.

- Herholz K, Ebmeier K. Clinical amyloid imaging in Alzheimer's disease. Lancet Neurol. 2011 Jul;10(7):667-70.

- Herrmann N, Lanctôt KL, Khan LR. The role of norepinephrine in the behavioral and psychological symptoms of dementia. J Neuropsychiatry Clin Neurosci. 2004 Summer;16(3):261-76.

- Hort J, O'Brien JT, Gainotti G, Pirttila T, Popescu BO, Rektorova I, Sorbi S, Scheltens P; EFNS Scientist Panel on Dementia. EFNS guidelines for the diagnosis and management of Alzheimer's disease. Eur J Neurol. 2010 Oct;17(10):1236-48.

- Hu YY, He SS, Wang X, Duan QH, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Wang J. Levels of nonphosphorylated and phosphorylated tau in cerebrospinal fluid of Alzheimer's

disease patients: an ultrasensitive bienzyme-substrate-recycle enzyme-linked immunosorbent assay. Am J Pathol. 2002 Apr;160(4):1269-78.

- Iqbal K, Alonso Adel C, Chen S, Chohan MO, El-Akkad E, Gong CX, Khatoon S, Li B, Liu F, Rahman A, Tanimukai H, Grundke-Iqbal I. Tau pathology in Alzheimer's disease and other tauopathies. Biochim Biophys Acta. 2005 Jan 3;1739(2-3):198-210.

- Irwin DJ, Trojanowski JQ, Grossman M. Cerebrospinal fluid biomarkers for differentiation of frontotemporal lobar degeneration from Alzheimer's disease. Front Aging Neurosci. 2013;5:6.

- Ishii K. PET Approaches for Diagnosis of Dementia. AJNR Am J Neuroradiol. 2013 Aug 14.

- Jelic V, Kowalski J. Evidence-based evaluation of diagnostic accuracy of resting EEG in dementia and mild cognitive impairment. Clin EEG Neurosci. 2009 Apr;40(2):129-42.

- Jensen M, Basun H, Lannfelt L. Increased cerebrospinal fluid tau in patients with Alzheimer's disease. Neurosci Lett. 1995 Feb 17;186(2-3):189-91.

- Johnson JK, Head E, Kim R, Starr A, Cotman CW. Clinical and pathological evidence for a frontal variant of Alzheimer disease. Arch Neurol. 1999 Oct;56(10):1233-9.

- Josephs KA, Duffy JR, Strand EA, Whitwell JL, Layton KF, Parisi JE, Hauser MF, Witte RJ, Boeve BF, Knopman DS, Dickson DW, Jack CR Jr, Petersen RC. Clinicopathological and imaging correlates of progressive aphasia and apraxia of speech. Brain. 2006 Jun;129(Pt 6):1385-98.

- Katz TF. A.D.L. Activities of Daily Living. JAMA 1963;185:914

- Kester MI, Boelaarts L, Bouwman FH, Vogels RL, Groot ER, van Elk EJ, Blankenstein MA, van der Flier WM, Scheltens P. Diagnostic impact of CSF

biomarkers in a local hospital memory clinic. Dement Geriatr Cogn Disord. 2010;29(6):491-7.

- Kim J, Basak JM, Holtzman DM. The role of apolipoprotein E in Alzheimer's disease. Neuron. 2009 Aug 13;63(3):287-303.

- Knopman DS, DeKosky ST, Cummings JL, Chui H, Corey-Bloom J, Relkin N, Small GW, Miller B, Stevens JC. Practice parameter: diagnosis of dementia (an evidence-based review). Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. Neurology. 2001 May 8;56(9):1143-53.

- Koo EH, Squazzo SL. Evidence that production and release of amyloid beta-protein involves the endocytic pathway. J Biol Chem. 1994 Jul 1;269(26):17386-9.

- Kovacs DM, Fausett HJ, Page KJ, Kim TW, Moir RD, Merriam DE, Hollister RD, Hallmark OG, Mancini R, Felsenstein KM, Hyman BT, Tanzi RE, Wasco W. Alzheimer-associated presenilins 1 and 2: neuronal expression in brain and localization to intracellular membranes in mammalian cells. Nat Med. 1996 Feb;2(2):224-9.

- Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Robbins and Cotran – Pathologic Basis of Disease, 7th edition. Elsevier-Masson, 2005. (Ed. It. a cura di Eusebi V. Robbins e Cotran – Le basi patologiche delle malattie, 7a edizione. Elsevier-Masson, 2006).

- Lai MK, Tsang SW, Alder JT, Keene J, Hope T, Esiri MM, Francis PT, Chen CP. Loss of serotonin 5-HT2A receptors in the postmortem temporal cortex correlates with rate of cognitive decline in Alzheimer's disease. Psychopharmacology (Berl). 2005 May;179(3):673-7.

- Langa KM, Foster NL, Larson EB. Mixed dementia: emerging concepts and therapeutic implications. JAMA. 2004 Dec 15;292(23):2901-8.

- Lawton MP, Brody EM. Assessment of older people: self-maintaining and instrumental activities of daily living. Gerontologist. 1969 Autumn;9(3):179-86.

- Liedorp M, van der Flier WM, Hoogervorst EL, Scheltens P, Stam CJ. Associations between patterns of EEG abnormalities and diagnosis in a large memory clinic cohort. Dement Geriatr Cogn Disord. 2009;27(1):18-23.

- Loeb C, Favale E. Neurologia di Fazio-Loeb, 4a edizione. Società Editrice Universo, 2003.

- Martin JH. Neuroanatomy: Text and Atlas, 3rd edition. McGraw-Hill, 2003. (Ed. it. a cura di Giannessi F, Gulisano M. Neuroanatomia. McGraw-Hill, 2005).

- Mattsson N, Blennow K, Zetterberg H. CSF biomarkers: pinpointing Alzheimer pathogenesis. Ann N Y Acad Sci. 2009 Oct;1180:28-35.

- McGeer PL, McGeer EG. Inflammation, autotoxicity and Alzheimer disease. Neurobiol Aging. 2001 Nov-Dec;22(6):799-809.

- McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM. 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 Jul;34(7):939-44.

- McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, Hyman BT, Jack CR Jr, Kawas CH, Klunk WE, Koroshetz WJ, Manly JJ, Mayeux R, Mohs RC, Morris JC, Rossor MN, Scheltens P, Carrillo MC, Thies B, Weintraub S, Phelps CH. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. Alzheimers Dement. 2011 May;7(3):263-9.

- Mortimer JA, Snowdon DA, Markesbery WR. Head circumference, education and risk of dementia: findings from the Nun Study. J Clin Exp Neuropsychol. 2003 Aug;25(5):671-9.

- Mössner R, Schmitt A, Syagailo Y, Gerlach M, Riederer P, Lesch KP. The serotonin transporter in Alzheimer's and Parkinson's disease. J Neural Transm Suppl. 2000;(60):345-50.

- Motter R, Vigo-Pelfrey C, Kholodenko D, Barbour R, Johnson-Wood K, Galasko D, Chang L, Miller B, Clark C, Green R, et al. Reduction of beta-amyloid peptide42 in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. Ann Neurol. 1995 Oct;38(4):643-8.

- Nikolaev A, McLaughlin T, O'Leary DD, Tessier-Lavigne M. APP binds DR6 to trigger axon pruning and neuron death via distinct caspases. Nature. 2009 Feb 19;457(7232):981-9.

- Nussbaum RL, Ellis CE. Alzheimer's disease and Parkinson's disease. N Engl J Med. 2003 Apr 3;348(14):1356-64. Review. Erratum in: N Engl J Med. 2003 Jun 19;348(25):2588.

- O'Bryant SE, Humphreys JD, Smith GE, Ivnik RJ, Graff-Radford NR, Petersen RC, Lucas JA. Detecting dementia with the mini-mental state examination in highly educated individuals. Arch Neurol. 2008 Jul;65(7):963-7.

- Otto M, Wiltfang J, Tumani H, Zerr I, Lantsch M, Kornhuber J, Weber T, Kretzschmar HA, Poser S. Elevated levels of tau-protein in cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jakob disease. Neurosci Lett. 1997 Apr 11;225(3):210-2.

- Perl DP. Neuropathology of Alzheimer's disease. Mt Sinai J Med. 2010 Jan-Feb;77(1):32-42.

- Petersen RC, Smith GE, Waring SC, Ivnik RJ, Tangalos EG, Kokmen E. Mild cognitive impairment: clinical characterization and outcome. Arch Neurol. 1999 Mar;56(3):303-8.

- Pievani M, de Haan W, Wu T, Seeley WW, Frisoni GB. Functional network disruption in the degenerative dementias. Lancet Neurol. 2011 Sep;10(9):829-43.

- Polvikoski T, Sulkava R, Haltia M, Kainulainen K, Vuorio A, Verkkoniemi A, Niinistö L, Halonen P, Kontula K. Apolipoprotein E, dementia, and cortical deposition of beta-amyloid protein. N Engl J Med. 1995 Nov 9;333(19):1242-7.

- Rabinovici GD, Jagust WJ. Amyloid imaging in aging and dementia: testing the amyloid hypothesis in vivo. Behav Neurol. 2009;21(1):117-28.

- Rosendorff C, Beeri MS, Silverman JM. Cardiovascular risk factors for Alzheimer's disease. Am J Geriatr Cardiol. 2007 May-Jun;16(3):143-9.

- Schneider JA, Arvanitakis Z, Bang W, Bennett DA. Mixed brain pathologies account for most dementia cases in community-dwelling older persons. Neurology. 2007 Dec 11;69(24):2197-204.

- Schoonenboom NS, Reesink FE, Verwey NA, Kester MI, Teunissen CE, van de Ven PM, Pijnenburg YA, Blankenstein MA, Rozemuller AJ, Scheltens P, van der Flier WM. Cerebrospinal fluid markers for differential dementia diagnosis in a large memory clinic cohort. Neurology. 2012 Jan 3;78(1):47-54.

- Selkoe DJ. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. Physiol Rev. 2001 Apr;81(2):741-66.

- Selkoe DJ. The pathophysiology of Alzheimer's disease. In: Early diagnosis of Alzheimer's disease. Scinto FM, Daffner KR (eds). Humana Press, Totowa NJ, 2000.

- Snowden JS, Stopford CL, Julien CL, Thompson JC, Davidson Y, Gibbons L, Pritchard A, Lendon CL, Richardson AM, Varma A, Neary D, Mann D. Cognitive phenotypes in Alzheimer's disease and genetic risk. Cortex. 2007 Oct;43(7):835-45.

- Snowdon DA, Greiner LH, Mortimer JA, Riley KP, Greiner PA, Markesbery WR. Brain infarction and the clinical expression of Alzheimer disease. The Nun Study. JAMA. 1997 Mar 12;277(10):813-7.

- Sperling RA, Aisen PS, Beckett LA, Bennett DA, Craft S, Fagan AM, Iwatsubo T, Jack CR Jr, Kaye J, Montine TJ, Park DC, Reiman EM, Rowe CC, Siemers E, Stern Y, Yaffe K, Carrillo MC, Thies B, Morrison-Bogorad M, Wagster MV, Phelps CH. Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. Alzheimers Dement. 2011 May;7(3):280-92.

- Stern Y. Cognitive reserve and Alzheimer disease. Alzheimer Dis Assoc Disord. 2006 Apr-Jun;20(2):112-7.

- Strauss E, Sherman EMS, Spreen O. A Compendium of Neuropsychological Tests: Administration, Norms, and Commentary, 3rd edition. Oxford University Press, 2006.

- Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvesen GS, Roses AD. Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993 Mar 1;90(5):1977-81.

- Strozyk D, Blennow K, White LR, Launer LJ. CSF Abeta 42 levels correlate with amyloid-neuropathology in a population-based autopsy study. Neurology. 2003 Feb 25;60(4):652-6.

- Swerdlow RH. Pathogenesis of Alzheimer's disease. Clin Interv Aging. 2007;2(3):347-59.

- Szekely CA, Breitner JC, Zandi PP. Prevention of Alzheimer's disease. Int Rev Psychiatry. 2007 Dec;19(6):693-706.

- Trabucchi M. Le demenze, 2a edizione. UTET, 2000.

- van Crevel H, van Gool WA, Walstra GJ. Early diagnosis of dementia: which tests are indicated? What are their costs? J Neurol. 1999 Feb;246(2):73-8.

- Vanmechelen, E., Van Kerschaver, E., Blennow, K., De Deyn, P., Gartner, F., Parnetti, L. et al.. CSF-Phospho-tau (181P) as a promising marker for discriminating Alzheimer's disease from dementia with Lewy bodies. In: Iqbal, K., Sisodia, S. and Winblad, B. (eds), Alzheimer's Disease: Advances in Etiology, Pathogenesis and Therapeutics. Chichester: John Wiley and Sons, 2001.

- Vigo-Pelfrey C, Seubert P, Barbour R, Blomquist C, Lee M, Lee D, Coria F, Chang L, Miller B, Lieberburg I, et al. Elevation of microtubule-associated protein tau in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. Neurology. 1995 Apr;45(4):788-93.

- Visser PJ, Verhey F, Knol DL, Scheltens P, Wahlund LO, Freund-Levi Y, Tsolaki M, Minthon L, Wallin AK, Hampel H, Bürger K, Pirttila T, Soininen H, Rikkert MO, Verbeek MM, Spiru L, Blennow K. Prevalence and prognostic value of CSF markers of Alzheimer's disease pathology in patients with subjective cognitive impairment or mild cognitive impairment in the DESCRIPA study: a prospective cohort study. Lancet Neurol. 2009 Jul;8(7):619-27.

- Warren JD, Fletcher PD, Golden HL. The paradox of syndromic diversity in Alzheimer's disease. Nat Rev Neurol. 2012 Aug;8(8):451-64.

- Wenk GL. Neuropathologic changes in Alzheimer's disease. J Clin Psychiatry. 2003;64 Suppl 9:7-10.

- Williamson J, Goldman J, Marder KS. Genetic aspects of Alzheimer disease. Neurologist. 2009 Mar;15(2):80-6.

- Wiltfang J, Esselmann H, Bibl M, Smirnov A, Otto M, Paul S, Schmidt B, Klafki HW, Maler M, Dyrks T, Bienert M, Beyermann M, Rüther E, Kornhuber J. Highly conserved and disease-specific patterns of carboxyterminally truncated Abeta peptides

1-37/38/39 in addition to 1-40/42 in Alzheimer's disease and in patients with chronic neuroinflammation. J Neurochem. 2002 May;81(3):481-96.

- Woodward M, Jacova C, Black SE, Kertesz A, Mackenzie IR, Feldman H; ACCORD investigator group. Differentiating the frontal variant of Alzheimer's disease. Int J Geriatr Psychiatry. 2010 Jul;25(7):732-8.

- Zhou J, Gennatas ED, Kramer JH, Miller BL, Seeley WW. Predicting regional neurodegeneration from the healthy brain functional connectome. Neuron. 2012 Mar 22;73(6):1216-27.

- Zhu X, Lee HG, Casadesus G, Avila J, Drew K, Perry G, Smith MA. Oxidative imbalance in Alzheimer's disease. Mol Neurobiol. 2005;31(1-3):205-17.

Appendici

Mini Mental State Evaluation (M.M.S.E.)

Test somministrabile ..... ⌊_⌋ si ⌊_⌋ no

In che anno siamo? (0-1)	|
In che stagione siamo? (0-1)	|
In che mese siamo? (0-1)	|
Mi dica la data di oggi? (0-1)	|
Che giorno della settimana è oggi? (0-1)	|
Mi dica in che nazione siamo? (0-1)	|
In quale Regione italiana siamo? (0-1)	|
In quale città ci troviamo? (0-1)	|
A che piano siamo? (0-1)	|
Far ripetere: "pane, casa, gatto". La prima ripetizione dà adito al punteggio. Ripetere finché il soggetto esegue correttamente, max 6 volte (0-3)	|
Far contare a ritroso da 100 togliendo 7 per cinque volte: **O - 93 O - 86 O - 72 O - 65.** **Se non completa questa prova, allora far sillabare all'indietro la parola:** **MONDO: O - O D - O N - O O - O M - O (0-5)**	|
Chiedere la ripetizione dei tre soggetti precedenti (0-3)	|
Mostrare un orologio ed una matita chiedendo di dirne il nome (0-2)	|
Ripeta questa frase: "tigre contro tigre" (0-1)	|

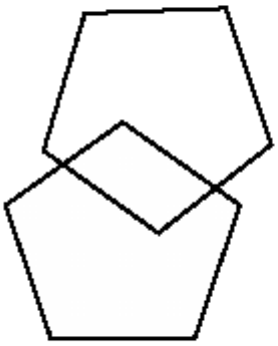
Prenda questo foglio con la mano destra, lo pieghi e lo metta sul tavolo (0-3)	
Legga ed esegua quanto scritto su questo foglio (chiuda gli occhi) (0-1)	
Scriva una frase (deve ottenere soggetto e verbo) (0-1)	
Copi questo disegno (pentagoni intrecciati)* (0-1)	

Punteggio Totale ..... _____

Punteggio totale corretto per età e scolarità... _____**

Punteggio massimo totale = 30

* Disegno:



****Coefficienti di aggiustamento del MMSE per classi di età ed educazione nella popolazione italiana.**

Intervallo di età	**65 - 69**	**70 -74**	**75 – 79**	**80 – 84**	**85 – 89**
Anni di Scolarizzazione					
0 – 4 anni	**+0,4**	**+0,7**	**+1,0**	**+1,5**	**+2,2**
5 – 7 anni	-1,1	-0,7	-0,3	+0,4	+1,4
8 – 12 anni	**-2,0**	**-1,6**	**-1,0**	**-0,3**	**+0,8**
13 – 17 anni	-2,8	-2,3	-1,7	-0,9	+0,3

Il coefficiente va aggiunto (o sottratto) al punteggio grezzo del MMSE per ottenere il punteggio aggiustato.

ADL

(ACTIVITIES OF DAILY LIVING)

A) FARE IL BAGNO (vasca, doccia, spugnature)	**Punteggio**
1) Fa il bagno da solo (entra ed esce dalla vasca da solo).	1
2) Ha bisogno di assistenza soltanto nella pulizia di una parte del corpo (es. dorso).	1
3) Ha bisogno di assistenza per più di una parte del corpo.	0
B) VESTIRSI (prendere i vestiti dall'armadio e/o cassetti, inclusa biancheria intima, vestiti, uso delle allacciature e delle bretelle se utilizzate)	
1) Prende i vestiti e si veste completamente senza bisogno di assistenza.	1
2) Prende i vestiti e si veste senza bisogno di assistenza eccetto che per allacciare le scarpe.	1
3) Ha bisogno di assistenza nel prendere i vestiti o nel vestirsi oppure rimane parzialmente o completamente svestito.	0
C) TOILETTE (andare nella stanza da bagno per la minzione e l'evacuazione, pulirsi, rivestirsi)	
1) Va in bagno, si pulisce e si riveste senza bisogno di assistenza (può utilizzare mezzi di supporto come bastone, deambulatore o seggiola a rotelle, può usare vaso da notte o comoda svuotandoli al mattino).	1
2) Ha bisogno di assistenza nell'andare in bagno o nel pulirsi o nel rivestirsi o nell'uso del vaso da notte o della comoda.	0
3) Non si reca in bagno per l'evacuazione	0
D) SPOSTARSI	
1) Si sposta dentro e fuori dal letto e in poltrona senza assistenza (eventualmente con canadesi o deambulatore).	1
2) Compie questi trasferimenti se aiutato.	0
3) Allettato, non esce dal letto.	0
E) CONTINENZA DI FECI ED URINE	
1) Controlla completamente feci e urine.	1
2) "Incidenti" occasionali.	0
3) Necessità di supervisione per il controllo di feci e urine, usa il catetere, è incontinente	0
F) ALIMENTAZIONE	
1) Senza assistenza.	1
2) Assistenza solo per tagliare la carne o imburrare il pane.	1
3) Richiede assistenza per portare il cibo alla bocca o viene nutrito parzialmente o completamente per via parenterale.	0
PUNTEGGIO TOTALE (A+B+C+D+E+F)	**/6**

IADL

(INSTRUMENTAL ACTIVITIES OF DAILY LIVING)

A) USARE IL TELEFONO	1) Usa il telefono di propria iniziativa: cerca il numero e lo compone	**1**
	2) Compone solo alcuni numeri ben conosciuti	**1**
	3) E' in grado di rispondere al telefono, ma non compone i numeri	**1**
	4) Non è capace di usare il telefono	**0**
B) FARE LA SPESA	1) Si prende autonomamente cura di tutte le necessità di acquisti nei negozi	**1**
	2) E' in grado di effettuare piccoli acquisti nei negozi	**0**
	3) Necessita di essere accompagnato per qualsiasi acquisto nei negozi	**0**
	4) E' del tutto incapace di fare acquisti nei negozi	**0**
C) PREPARARE IL CIBO	1) Organizza, prepara e serve pasti adeguatamente preparati	**1**
	2) Prepara pasti adeguati solo se sono procurati gli ingredienti	**0**
	3) Scalda pasti preparati o prepara cibi ma non mantiene dieta adeguata	**0**
	4) Ha bisogno di avere cibi preparati e serviti	**0**
D) GOVERNO della CASA	1) Mantiene la casa da solo o con occasionale aiuto (ad es. lavori pesanti)	**1**
	2) Esegue solo compiti quotidiani leggeri ma livello di pulizia non suffic.	**1**
	3) Ha bisogno di aiuto in ogni operazione di governo della casa	**0**
	4) Non partecipa a nessuna operazione di governo della casa	**0**
E) FARE IL BUCATO	1) Fa il bucato personalmente e completamente	**1**
	2) Lava le piccole cose (calze, fazzoletti)	**1**
	3) Tutta la biancheria deve essere lavata da altri	**0**
F) MEZZI di TRASPORTO	1) Si sposta da solo sui mezzi pubblici o guida la propria auto	**1**
	2) Si sposta in taxi ma non usa mezzi di trasporto pubblici	**1**
	3) Usa i mezzi di trasporto se assistito o accompagnato	**1**
	4) Può spostarsi solo con taxi o auto e solo con assistenza	**0**
	5) Non si sposta per niente	**0**
G) ASSUNZIONE FARMACI	1) Prende le medicine che gli sono state prescritte	**1**
	2) Prende le medicine se sono preparate in anticipo e in dosi separate	**0**
	3) Non è in grado di prendere le medicine da solo	**0**
H) USO DEL DENARO	1) Maneggia le proprie finanze in modo indipendente	**1**
	2) E' in grado di fare piccoli acquisti	**1**
	3) E' incapace di maneggiare i soldi	**0**
	PUNTEGGIO TOTALE (A+B+C+D+E+F+G+H)	**/8**

Neuropsychiatric Inventory (NPI)

(Cummings JL, Mega M, Gray K, Rosemberg-Thompson S, Carusi DA, Gornbei J: Neurology 1994;44:2308-2314)

	N.A.	Frequenza (a)	Gravità (b)	a x b	Distress
Deliri	[ ]	[0] [1] [2] [3] [4]	[1] [2] [3]	_____	[0] [1] [2] [3] [4] [5]
Allucinazioni	[ ]	[0] [1] [2] [3] [4]	[1] [2] [3]	_____	[0] [1] [2] [3] [4] [5]
Agitazione	[ ]	[0] [1] [2] [3] [4]	[1] [2] [3]	_____	[0] [1] [2] [3] [4] [5]
Depressione/disforia	[ ]	[0] [1] [2] [3] [4]	[1] [2] [3]	_____	[0] [1] [2] [3] [4] [5]
Ansia	[ ]	[0] [1] [2] [3] [4]	[1] [2] [3]	_____	[0] [1] [2] [3] [4] [5]
Euforia/esaltazione	[ ]	[0] [1] [2] [3] [4]	[1] [2] [3]	_____	[0] [1] [2] [3] [4] [5]
Apatia/indifferenza	[ ]	[0] [1] [2] [3] [4]	[1] [2] [3]	_____	[0] [1] [2] [3] [4] [5]
Disinibizione	[ ]	[0] [1] [2] [3] [4]	[1] [2] [3]	_____	[0] [1] [2] [3] [4] [5]
Irritabilità/labilità	[ ]	[0] [1] [2] [3] [4]	[1] [2] [3]	_____	[0] [1] [2] [3] [4] [5]
Attività motoria	[ ]	[0] [1] [2] [3] [4]	[1] [2] [3]	_____	[0] [1] [2] [3] [4] [5]
Sonno	[ ]	[0] [1] [2] [3] [4]	[1] [2] [3]	_____	[0] [1] [2] [3] [4] [5]
Disturbi dell'appetito e dell'alimentazione	[ ]	[0] [1] [2] [3] [4]	[1] [2] [3]	_____	[0] [1] [2] [3] [4] [5]

Frequenza
0=mai
1=raramente
2=talvolta
3=frequentemente
4=quasi costantemente

Gravità
1=lievi (non producono disturbo al paziente).
2=moderati (comportano disturbo per il paziente).
3=severi (richiedono la somministrazione di farmaci; sono molto disturbanti per il paziente).

Stress emotivo o psicologico
0= Nessuno
1= Minimo
2= Lieve
3= Moderato
4= Severo
5= Grave

A. Deliri **(NA)**

Il paziente crede cose che non sono vere? Per esempio, insiste sul fatto che qualcuno sta cercando di fargli del male o di rubargli qualcosa. Dice che i componenti della famiglia non sono chi dicono di essere, o che la casa non è la sua? Non mi riferisco a semplice sospettosità; siamo interessati a sapere se il paziente sia convinto che queste cose gli stiano realmente accadendo.

NO (se no, procedere con la successiva domanda di screening)
SÌ (procedere con le seguenti domande)

1. Il paziente crede di essere in pericolo o che qualcuno voglia fargli del male ? _____
2. Il paziente crede che qualcuno lo stia derubando? _____
3. Il paziente crede che il/la proprio/a marito/moglie lo tradisca? _____
4. Il paziente crede che ospiti indesiderati vivano nella sua casa? _____
5. Il paziente crede che il/la proprio/a marito/moglie od altre persone non siano in realtà chi dicono di essere? _____
6. Il paziente crede che la propria abitazione non sia casa propria? _____
7. Il paziente crede che i familiari vogliano abbandonarlo? _____
8. Il paziente crede che le immagini della televisione o le fotografie delle riviste siano realmente presenti in casa? [Cerca di interagire con esse?] _____
9. Il paziente crede altre cose insolite di cui non le ho chiesto? _____

Frequenza:
1. Raramente - meno di una volta alla settimana
2. Talvolta - circa una volta alla settimana
3. Frequentemente - diverse volte alla settimana ma non tutti i giorni
4. Molto frequentemente - una o più volte al giorno

Gravità:
1. Lievi: deliri presenti ma sembrano innocui e producono poco disturbo al paziente
2. Moderati: i deliri sono disturbanti e dirompenti
3. Marcati: i deliri sono molto distruttivi e rappresentano una delle principali cause dei disturbi comportamentali. [Se sono prescritti farmaci sedativi ciò costituisce un indice di marcata gravità dei deliri].

Stress emotivo o psicologico:
0. Nessuno
1. Minimo
2. Lieve
3. Moderato
4. Severo
5. Grave

B. Allucinazioni **(NA)**

Il paziente ha allucinazioni, cioè vede o sente cose che non esistono? Sembra vedere, sentire o provare cose non presenti? Con questa domanda non intendiamo solamente convinzioni sbagliate, cioè affermare che una persona morta sia ancora viva; piuttosto vogliamo sapere se il paziente presenta la percezione non normale di suoni o di visioni.

NO (se no, procedere con la successiva domanda di screening)
SÌ (procedere con le seguenti domande)

1. Il paziente dice di sentire delle voci o si comporta come se le sentisse? _____
2. Il paziente parla con persone che non sono presenti? _____
3. Il paziente riferisce di vedere cose che gli altri non vedono o si comporta come se vedesse cose che gli altri non vedono (come persone, animali, luci..)? _____
4. Il paziente dice di sentire odori che gli altri non sentono? _____
5. Il paziente riferisce di sentire cose che strisciano o lo toccano sulla pelle? _____
6. Il paziente riferisce di percepire sapori senza una causa nota? _____
7. Il paziente riferisce altre esperienze sensoriali insolite? _____

Frequenza:
1. Raramente - meno di una volta alla settimana
2. Talvolta - circa una volta alla settimana
3. Frequentemente - diverse volte alla settimana ma non tutti i giorni
4. Molto frequentemente - una o più volte al giorno

Gravità:
1. Lievi: allucinazioni presenti ma sembrano innocue e producono poco disturbo al paziente
2. Moderate: le allucinazioni sono disturbanti e dirompenti.
3. Marcate: le allucinazioni sono molto distruttive e rappresentano una delle principali cause dei disturbi comportamentali. Farmaci sedativi potrebbero essere necessari per controllare le allucinazioni.

Stress emotivo o psicologico:
0. Nessuno
1. Minimo
2. Lieve
3. Moderato
4. Severo
5. Grave

C. Agitazione/Aggressività (NA)

Il paziente ha periodi durante i quali rifiuta di collaborare o durante i quali non si lascia aiutare dagli altri? È difficile da gestire?

NO (se no, procedere con la successiva domanda di screening)
SÌ (procedere con le seguenti domande)

1. Il paziente diviene irritato con chi cerca di assisterlo o resiste ad attività come il bagno od il cambio dei vestiti? _____
2. Il paziente è ostinato, volendo le cose fatte a modo suo? _____
3. Il paziente non collabora, resiste se aiutato da altri? _____
4. Il paziente presenta altri comportamenti che rendono difficoltosa la sua gestione? _____
5. Il paziente grida o bestemmia in modo arrabbiato? _____
6. Il paziente sbatte le porte, da calci ai mobili, lancia gli oggetti? _____
7. Il paziente tenta di far male o di colpire gli altri? _____
8. Il paziente presenta altri comportamenti aggressivi o altre forme di agitazione? _____

Frequenza:
1. Raramente - meno di una volta alla settimana
2. Talvolta - circa una volta alla settimana
3. Frequentemente - diverse volte alla settimana ma non tutti i giorni
4. Molto frequentemente - una o più volte al giorno

Gravità:
1. Lieve: il comportamento è disturbante ma può essere controllato con supervisione o rassicurazioni.
2. Moderata: comportamento disturbante e difficile da sviare o controllare.
3. Marcata: l'agitazione è molto disturbante e rappresenta uno dei problemi principali; può esserci pericolo per la sicurezza personale. I farmaci sono spesso necessari.

Stress emotivo o psicologico:
0. Nessuno
1. Minimo
2. Lieve
3. Moderato
4. Severo
5. Grave

D. Depressione/Disforia **(NA)**

Il paziente sembra essere triste o depresso? Dice di sentirsi triste o depresso?

NO (se no, procedere con la successiva domanda di screening)
SÌ (procedere con le seguenti domande)

1. Il paziente ha dei periodi di malinconia o di pianto che sembrano indicare tristezza? _____
2. Il paziente parla o si comporta come se fosse triste o giù di corda? _____
3. Il paziente si abbatte o dice di sentirsi un fallito? _____
4. Il paziente dice di essere una persona cattiva o si aspetta di essere punito? _____
5. Il paziente sembra molto scoraggiato o dice di non avere speranze per il futuro? _____
6. Il paziente dice di essere un peso per la propria famiglia o che la propria famiglia starebbe meglio senza di lui? _____
7. Il paziente dice di desiderare la morte o dice di volersi uccidere? _____
8. Il paziente presenta altri segni di depressione o di tristezza? _____

Frequenza:
1. Raramente - meno di una volta alla settimana
2. Talvolta - circa una volta alla settimana
3. Frequentemente - diverse volte alla settimana ma non tutti i giorni
4. Molto frequentemente - praticamente sempre presente

Gravità:
1. Lieve: la depressione è disturbante ma può essere controllata con supervisione o rassicurazioni.
2. Moderata: la depressione è disturbante, i sintomi depressivi sono espressi spontaneamente dal paziente e sono difficili da alleviare.
3. Marcato: la depressione è molto disturbante e rappresenta uno delle principali cause di sofferenza per il paziente.

Stress emotivo o psicologico:
0. Nessuno
1. Minimo
2. Lieve
3. Moderato
4. Severo
5. Grave

E. Ansia **(NA)**

Il paziente è molto nervoso, allarmato, spaventato senza veri motivi? Sembra molto teso o agitato? È impaurito dal rimanere lontano da voi?

NO (se no, procedere con la successiva domanda di screening)
SÌ (procedere con le seguenti domande)

1. Il paziente dice di essere allarmato per le cose che succederanno nel futuro? _____
2. Il paziente ha dei momenti in cui si sente debole, incapace di rilassarsi oppure si sente eccessivamente teso? _____
3. Il paziente ha momenti (o si lamenta) di respiro corto, è ansimante, sospirante senza apparente ragione se non nervosismo? _____
4. Il paziente si lamenta di avere le "rane" nello stomaco, di batticuore quando è nervoso (Sintomi non spiegabili da malattie)? _____
5. Il paziente evita certi posti o situazioni che lo rendono più nervoso, quali viaggiare in automobile, incontrare amici oppure stare tra la folla? _____
6. Il paziente diventa nervoso e disturbato se viene separato da voi (o da chi lo assiste)? [Vi sta accanto per evitare la separazione?] _____
7. Il paziente manifesta altri segni di ansia? _____

Se alla domanda di screening viene risposto affermativamente, determinare la frequenza e la gravità dell'ansia.

Frequenza:
1. Raramente - meno di una volta alla settimana
2. Talvolta - circa una volta alla settimana
3. Frequentemente - diverse volte alla settimana ma non tutti i giorni
4. Molto frequentemente - praticamente sempre presente

Gravità
1. Lieve: l' ansia è disturbante ma può essere controllata con supervisione o rassicurazioni.
2. Moderata: l' ansia è disturbante, i sintomi ansiosi sono espressi spontaneamente dal paziente e sono difficili da alleviare.
3. Marcato: l'ansia è molto disturbante e rappresenta una delle principali cause di sofferenza per il paziente.

Stress emotivo o psicologico:
0. Nessuno
1. Minimo
2. Lieve
3. Moderato
4. Severo
5. Grave

F. Esaltazione/Euforia **(NA)**

Il paziente è eccessivamente felice o allegro senza motivo? Non si intende la normale felicità mostrata alla vista di amici, quando si ricevono regali, o quando si sta coi parenti. Vi sto chiedendo se il paziente ha un persistente ed anormale stato di euforia o se trova ridicole cose che gli altri non trovano divertenti.

NO (se no, procedere con la successiva domanda di screening)
SÌ (procedere con le seguenti domande).

1. Il paziente sembra sentirsi eccessivamente bene o essere troppo felice, in modo differente dal solito? _____
2. Il paziente trova ridicole e ride per cose che altri non ritengono spiritose? _____
3. Il paziente ha un senso dell'umorismo da bambino con la tendenza a ridacchiare o ridere quando non è il caso (come per esempio quando qualche contrattempo colpisce altre persone)? _____
4. Il paziente fa degli scherzi o compie osservazioni che sono poco spiritose ma che lui pensa divertenti? _____
5. Il paziente compie scherzi come dare pizzicotti oppure fa dei giochetti solo per divertimento? _____
6. Si vanta o dice di essere molto più bravo o più ricco di quanto sia veramente? _____
7. Il paziente mostra altri segni che indicano che si sente troppo bene o troppo felice? _____

Se alla domanda di screening viene risposto affermativamente, determinare la frequenza e la gravità dell'esaltazione/euforia.

Frequenza:
1. Raramente - meno di una volta alla settimana
2. Talvolta - circa una volta alla settimana
3. Frequentemente - diverse volte alla settimana ma non tutti i giorni
4. Molto frequentemente - praticamente sempre presente

Gravità:
1. Lieve: l' esaltazione è evidente ma non dirompente
2. Moderata: l' esaltazione è evidentemente anormale.
3. Marcato: l'esaltazione è molto pronunciata; il paziente è euforico e trova quasi tutto ridicolo.

Stress emotivo o psicologico:
0. Nessuno
1. Minimo
2. Lieve
3. Moderato
4. Severo
5. Grave

G. Apatia/Indifferenza **(NA)**

Il paziente ha interesse verso il mondo che lo circonda? Ha perso interesse nel fare le cose o è meno motivato ad iniziare cose nuove? Il paziente ha difficoltà nell'introdursi in conversazioni o nelle faccende di casa? Il paziente è apatico o indifferente?

NO (se no, procedere con la successiva domanda di screening)
SÌ (procedere con le seguenti domande).

1. Il paziente è meno spontaneo o meno attivo del solito? _____
2. Il paziente è meno disponibile ad iniziare conversazioni? _____
3. il paziente si comporta meno affettuosamente o mostra perdita delle emozioni rispetto al solito? _____
4. Il paziente contribuisce meno alle faccende di casa? _____
5. Il paziente sembra meno interessato alle attività ed ai progetti degli altri? _____
6. Il paziente ha perso interesse verso gli amici ed i parenti? _____
7. Il paziente è meno entusiasta dei suoi interessi? _____
8. Il paziente mostra altri segni di noncuranza nel fare cose nuove? _____

Frequenza:
1. Raramente - meno di una volta alla settimana
2. Talvolta - circa una volta alla settimana
3. Frequentemente - diverse volte alla settimana ma non tutti i giorni
4. Molto frequentemente - praticamente sempre presente

Gravità:
1. Lieve: l' apatia è evidente ma produce poca interferenza con la routine di tutti i giorni; solo lievemente differente dal comportamento abituale del paziente; il paziente risponde a stimolazioni ed è coinvolto in attività.
2. Moderata: l' apatia è molto evidente; può essere superata con l'incoraggiamento e la persuasione del caregiver; risponde spontaneamente solo ad eventi importanti quali visite di parenti o di famigliari.
3. Marcato: l'apatia è molto evidente ed usualmente non risponde ad alcun incoraggiamento od evento esterno.

Stress emotivo o psicologico:
0. Nessuno
1. Minimo
2. Lieve
3. Moderato
4. Severo
5. Grave

H. Disinibizione (NA)

Il paziente sembra agire impulsivamente senza pensarci? Fa o dice cose che di solito non dice o non fa in pubblico? Fa cose imbarazzanti per voi o per altri?

NO (se no, procedere con la successiva domanda di screening)
SÌ (procedere con le seguenti domande).

1. Il paziente agisce impulsivamente senza apparentemente considerare le conseguenze? _____
2. Il paziente parla ad estranei come se li conoscesse? _____
3. Il paziente dice delle cose offensive od irrispettose? _____
4. Il paziente dice cose volgari o fa apprezzamenti sessuali che di solito non faceva? _____
5. Il paziente parla apertamente di cose private che di solito non discuteva in pubblico? _____
6. Il paziente si prende delle libertà o tocca oppure abbraccia altre persone in modo diverso dal solito comportamento? _____
7. Il paziente mostra altri segni di disinibizione? _____

Frequenza:
1. Raramente - meno di una volta alla settimana
2. Talvolta - circa una volta alla settimana
3. Frequentemente - diverse volte alla settimana ma non tutti i giorni
4. Molto frequentemente - praticamente sempre presente

Gravità:
1. Lieve: la disinibizione è evidente ma usualmente risponde alle correzioni.
2. Moderata: la disinibizione è molto evidente e difficile da superare da parte del caregiver.
3. Marcato: la disinibizione solitamente non risponde ad interventi da parte del caregiver ed è fonte di imbarazzo o di difficoltà sociali.

Stress emotivo o psicologico:
0. Nessuno
1. Minimo
2. Lieve
3. Moderato
4. Severo
5. Grave

I. Irritabilità/Labilità (NA)

Il paziente si irrita o si arrabbia con facilità? Il suo umore è molto variabile? È impaziente in modo anormale? Non intendiamo frustrazione per le difficoltà di memoria o l'incapacità di compiere semplici operazioni; vogliamo sapere se il paziente presenta un'irritabilità anomala, impazienza o rapidi cambiamenti di umore che si differenziano dal solito.

NO (se no, procedere con la successiva domanda di screening)
SÌ (procedere con le seguenti domande).

1. Il paziente ha un brutto carattere, "perde le staffe" per piccole cose? _____
2. Il paziente presenta rapidi cambiamenti di umore, passando dalla serenità alla rabbia? _____
3. Il paziente presenta improvvisi momenti di rabbia? _____
4. Il paziente è insofferente, si innervosisce per i ritardi o attende ansiosamente di portare a termine le cose che aveva programmato? _____
5. Il paziente è irritabile e nervoso? _____
6. Il paziente borbotta frequentemente e risulta difficile sopportarlo? _____
7. Il paziente presenta altri segni di irritabilità? _____

Frequenza:
1. Raramente - meno di una volta alla settimana
2. Talvolta - circa una volta alla settimana
3. Frequentemente - diverse volte alla settimana ma non tutti i giorni
4. Molto frequentemente - praticamente sempre presente

Gravità:
1. Lieve: la irritabilità o la labilità è evidente ma usualmente risponde alle correzioni ed alle rassicurazioni.
2. Moderata: la irritabilità o la labilità è molto evidente e difficile da controllare da parte del caregiver.
3. Marcato: la irritabilità o la labilità sono molto evidenti; solitamente non rispondono ad interventi da parte del caregiver e sono uno dei principali problemi.

Stress emotivo o psicologico:
0. Nessuno
1. Minimo
2. Lieve
3. Moderato
4. Severo
5. Grave

J. Comportamento motorio aberrante (NA)

Il paziente continua a camminare, continua a fare e rifare le stesse cose come aprire gli armadi o i cassetti, oppure sposta in continuazione gli oggetti o attorciglia le stringhe od i lacci?

NO (se no, procedere con la successiva domanda di screening)
SÌ (procedere con le seguenti domande).

1. Il paziente cammina per la casa senza un preciso scopo? _____
2. Il paziente si aggira per la casa aprendo e rovistando cassetti ed armadi? _____
3. Il paziente continua a mettere e togliersi i vestiti? _____
4. Il paziente fa azioni o particolari movimenti che continua a ripetere? _____
5. Il paziente tende a ripetere continuamente determinati gesti quali abbottonarsi, afferrare, slacciarsi le stringhe ecc.? _____
6. Il paziente si agita eccessivamente, sembra incapace di star seduto, o fa saltellare in modo eccessivo i piedi o le dita? _____
7. Il paziente presenta altre attività ripetitive? _____

Frequenza:
1. Raramente - meno di una volta alla settimana
2. Talvolta - circa una volta alla settimana
3. Frequentemente - diverse volte alla settimana ma non tutti i giorni
4. Molto frequentemente - praticamente sempre presente

Gravità:
1. Lieve: l'attività motoria anomala è evidente ma interferisce poco con le attività quotidiane.
2. Moderata: l'attività motoria anomala è molto evidente; può essere controllato da parte del caregiver.
3. Marcata: l'attività motoria anomala è molto evidente, di solito non risponde a nessun intervento da parte del caregiver e rappresenta uno dei problemi principali.

Stress emotivo o psicologico:
0. Nessuno
1. Minimo
2. Lieve
3. Moderato
4. Severo
5. Grave

K. Sonno **(NA)**

Il paziente presenta disturbi del sonno? Sta alzato, vaga per la casa durante la notte, si veste e si sveste, disturba il sonno dei familiari? [Non è da considerare se il paziente si alza due o tre volte per notte, per andare in bagno e poi torna a letto e si addormenta immediatamente]

NO (se no, procedere con la successiva domanda di screening)
SÌ (procedere con le seguenti domande).

1. Presenta difficoltà ad addormentarsi? _____
2. Si alza spesse volte durante la notte? [Non è da considerare se il paziente si alza due o tre volte per notte per andare in bagno e poi torna a letto e si addormenta immediatamente]
_____
3. Vaga per la casa o svolge attività inopportune? _____
4. Disturba i familiari e li tiene svegli? _____
5. Si veste e vuole uscire di casa credendo che sia mattina? _____
6. Si sveglia molto presto al mattino [rispetto alle sue abitudini]? _____
7. Dorme eccessivamente durante il giorno? _____
8. Il Paziente presenta altri disturbi notturni che le provocano fastidio e che non le ho nominato? _____

Frequenza:
1. Raramente - meno di una volta alla settimana
2. Talvolta - circa una volta alla settimana
3. Frequentemente - diverse volte alla settimana ma non tutti i giorni
4. Molto frequentemente - praticamente sempre presente

Gravità:
1. Lieve: le alterazioni del sonno sono presenti ma non particolarmente disturbanti.
2. Moderata: le alterazioni del sonno sono disturbanti per il paziente e per il sonno dei suoi familiari, può essere presente più di un tipo di disturbo.
3. Marcata: le alterazioni del sonno sono particolarmente disturbanti sia per il paziente che per il sonno dei suoi familiari, numerosi tipi di disturbi notturni possono essere presenti.

Stress emotivo o psicologico:
0. Nessuno
1. Minimo
2. Lieve
3. Moderato
4. Severo
5. Grave

L. Disturbi dell'appetito e dell'alimentazione (NA)

Il paziente presenta disturbi dell'alimentazione come alterazioni dell'appetito, alterazioni delle abitudini o delle preferenze alimentari. Ha subito variazioni di peso? [Se è incapace ad alimentarsi rispondere NA]

NO (se no, procedere con la successiva domanda di screening)
SÌ (procedere con le seguenti domande).

1. Presenta perdita dell'appetito? _____
2. Presenta aumento dell'appetito? _____
3. Presenta diminuzione di peso? _____
4. Presenta aumento di peso? _____
5. Ha cambiato le sue abitudini alimentari (per esempio, mangia voracemente).? _____
6. Presenta cambiamenti di gusto riguardo ai tipi di cibo che gli/le piacevano (per esempio, mangia molti alimenti dolci o preferisce un cibo particolare)? _____
7. Ha sviluppato specifiche abitudini, come mangiare sempre le stesse cose ogni giorno o sempre nello stesso ordine?

_____

8. Il paziente presenta altri disturbi dell'appetito o dell'alimentazione che non le ho nominato? _____

Frequenza:
1. Raramente - meno di una volta alla settimana
2. Talvolta - circa una volta alla settimana
3. Frequentemente - diverse volte alla settimana ma non tutti i giorni
4. Molto frequentemente - praticamente sempre presente

Gravità:
1. Lieve: i disturbi dell'appetito sono presenti ma non hanno causato alterazioni del peso del paziente.
2. Moderata: i disturbi dell'appetito sono presenti ed hanno causato lievi fluttuazioni del peso del paziente.
3. Marcata: i disturbi dell'appetito sono presenti, hanno causato importanti variazioni di peso del paziente e sono disturbanti.

Stress emotivo o psicologico:
0. Nessuno
1. Minimo
2. Lieve
3. Moderato
4. Severo
5. Grave

UCLA NEUROPSYCHIATRIC INVENTORY

1. Il questionario è applicabile ai pazienti con demenza di diversa origine
2. Le informazioni vanno raccolte con la persona che vive vicino al paziente (familiare o personale se degente in casa di riposo o istituti da vari mesi) e possono essere verificate interrogando od osservando il paziente stesso.
3. Le domande vanno poste esattamente come sono scritte, solo se il caregiver non le capisce si possono fornire delucidazioni.
4. Le domande si riferiscono sempre a modificazioni insorte dopo l'esordio della malattia. Non vanno registrate quelle caratteristiche legate alla situazione premorbosa del paziente (depressione, ansietà) che non si sono modificate dopo l'esordio della demenza. Bisogna ricordare periodicamente durante l'intervista che ci riferiamo ai cambiamenti insorti con la demenza.
5. Le domande devono riferirsi alla situazione del paziente nelle 6 settimane precedenti all'intervista.
6. Se alla domanda di screening viene risposto di no non bisogna procedere con le altre domande pertinenti alla stessa sezione. Se la risposata è invece positiva si proceda con le altre domande che vanno registrate solo se confermano la domanda di screening. In alcune circostanze specifiche potrebbe verificarsi il fatto che alcune delle sezioni non siano applicabili al paziente per la presenza di condizioni mediche interferenti con le risposte. Per esempio i pazienti allettati potrebbero presentare deliri e allucinazioni ma non presentare comportamenti motori aberranti per via delle limitazioni fisiche. In questi casi speciali l'intervistatore deve segnalare la non applicabilità della scala (N.A.). Lo stesso vale se esistano evidenti discrepanze tra quanto osservabile e quanto segnalato dal caregiver o se le risposte fornite alla sezione non vengano ritenute valide.
7. Per la determinazione della frequenza e durata dei problemi comportamentali si deve far riferimento alla legenda del questionario. Si faccia riferimento, aggiuntivamente, come paragone di frequenza e gravità al più aberrante comportamento del paziente che sia risultato dalle domande successive a quella di screening per ogni sezione del questionario.
8. Se dovesse capitare che il caregiver, dopo aver dato risposta affermativa alla domanda di screening, fornisca a tutte le successive domande della sezione una risposta negativa bisogna chiedere al caregiver di spiegare in che cosa consista il problema comportamentale. Se si tratta di una erronea interpretazione della domanda (cioè non esistono rilevanti disturbi pertinenti al tipo di problema neuropsichiatrico investigato dalla sezione) si segni NO alla domanda di screening. Se invece il problema comportamentale è presente ma viene espresso con termini diversi da quelli delle domande si deve attribuire il punteggio come di solito, cercando di far rientrare i problemi espressi nelle domande formulate nel questionario.
9. Per la valutazione della frequenza delle manifestazioni si chieda, alla fine delle domande di ciascuna sezione: "Ora vorrei sapere con quale frequenza sono presenti questi problemi (riferendosi inizialmente alla manifestazione neuropsichiatrica più grave rilevata per ogni sezione)".
10. Per la valutazione della gravità delle manifestazioni si chieda, alla fine delle domande di ciascuna sezione: "Ora vorrei sapere questi comportamenti quanto sono gravi, vorrei che mi riferisse la gravità riferendosi al grado di coinvolgimento e di disabilità sperimentato dal suo congiunto (od assistito)".
11. Per lo stress emotivo o psicologico del caregiver si chiede "Ora mi indichi quale stress o disagio le hanno provocato questi comportamenti descritti"

Ringraziamenti

Desidero ringraziare le persone che hanno reso possibile la realizzazione di questo lavoro: il Prof. Ubaldo Bonuccelli, la Dott.ssa Gloria Tognoni, la Dott.ssa Cecilia Carlesi e la Dott.ssa Cristina Pagni.