

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO
FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA
DIPARTIMENTO DI MEDICINA INTERNA

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN
FISIOPATOLOGIA DELL'INVECCHIAMENTO
MED/09 - CICLO XXIII



**VALUTAZIONE DELLA RISPOSTA AL TRATTAMENTO CON
ANTICOLINESTERASICI NELLA MALATTIA DI ALZHEIMER MEDIANTE
STATISTICA SU CASO SINGOLO (N=1)**

Tesi di dottorato di ricerca di:
STEFANO ZAGO
Matricola R07591

Coordinatore: Chiar.mo Prof. Carlo Vergani

Tutor: Chiar.mo Prof. Elio Scarpini

Anno-Accademico: 2009-2010

INDICE

Sommario e abstract	pag. 3
Parte I	
1. Invecchiamento e demenza: un'emergenza sanitaria	pag. 5
2. Costi socio-sanitari della demenza	pag. 7
3. Demenza, malattia di Alzheimer e demenze correlate	pag. 9
4. Il Mild Cognitive Impairment (MCI)	pag. 14
5. Terapia farmacologica dell'AD	pag. 17
Parte II	
1. Significatività statistica e significatività clinica	pag. 21
2. Valutazione personalizzata dell'efficacia del trattamento: i modelli statistici 'time series' e la metodologia N = 1	pag. 22
3. 'Good Responder' o 'Bad Responder'agli anticolinesterasici	pag. 28
3.1 Materiali e Metodi	pag. 29
3.2 Materiale stimolo per la valutazione mnemonica	pag. 30
4. Verifica psicométrica e titolazione del farmaco	pag. 32
5. Disegno sperimentale	pag. 33
6. Risultati	pag. 34
7. Discussione e conclusioni	pag. 50
Riferimenti Bibliografici	pag. 53

SOMMARIO

Nell'ambito dell'intervento farmacologico nella malattia di Alzheimer (AD) la verifica di un guadagno cognitivo o l'estinguersi di alcune alterazioni comportamentali viene effettuata prima e dopo la somministrazione del farmaco mediante appositi test, scale e/o questionari (es. MMSE, ADAS-cog, NPI, etc). Tuttavia un incremento di pochi punti in un test, scala o subtest ha di per se scarso valore statistico. Piccole modificazioni nelle procedure di somministrazione, o nello stato cognitivo e umorale del paziente possono render conto di tale scarto. Alcuni clinici inoltre si limitano ad impressioni soggettive piuttosto che ad una reale constatazione di miglioramento, stabilità o peggioramento del quadro dopo il trattamento. Paradigmatiche sono a questo proposito le cosiddette *Clinicians's Interview based impression of change*, in cui elevato risulta il rischio di soggettività. Il presente lavoro si propone di sviluppare un metodo più efficace per valutare l'effetto della terapia con gli inibitori della colinesterasi sulla prestazione mnemonica in soggetti affetti da AD attraverso un disegno sperimentale su caso singolo (N=1) che utilizzi il *test statistico C*. Questa statistica consente di calcolare la probabilità che i punti di una serie temporale siano disposti a caso oppure secondo un ordine statisticamente significativo, fornendo indicazioni riguardanti il trend di un certo intervento.

SUMMARY

In the pharmacological treatment of Alzheimer's Disease (AD), evaluation of a cognitive gain or the extinction of some behavioral abnormalities is carried out before and after the pharmacological treatment by means of special tests, scales and/or questionnaires (eg, MMSE, ADAS-cog, NPI, etc.). However, an increase of only a few points in a test or subtest scale has little statistical value *per se*. Minimal changes in the procedures of carrying out the test or the mood and cognitive state of the patient may account for these differences. Some clinicians also have limited their examinations to subjective impressions rather than real findings of improvement, stability or worsening after treatment. The so-called Clinicians's Interview Based Impression of Change proves to be the a paradigm with a high risk of subjectivity. This work aims to develop a more effective method for evaluating, in AD patients, the effect of therapy cholinesterase inhibitors on mnemonic performance through a single case experimental design (N = 1) using the *statistical test C*. This statistic calculates the probability that the points of a time series are arranged at random or in a statistically significant order, so providing information about the trend of a certain treatment.

Parte Prima

1. INVECCHIAMENTO E DEMENZA: UN'EMERGENZA SANITARIA

La *rivoluzione silenziosa*, così Kofi Annan, segretario delle Nazioni Unite, nel corso della Seconda assemblea mondiale sull'invecchiamento tenutasi, a Madrid nel 2002, definì il progressivo e inarrestabile invecchiamento della popolazione mondiale, destinato ad estendersi oltre che nei paesi industrializzati anche quelli in via di sviluppo. Uno sconvolgimento silente destinato a portare ad una inversione demografica, senza precedenti nella storia dell'uomo.

Oltre ad un aumento di incidenza delle malattie cronicoinvalidanti tipiche della senilità la comparsa di pazienti con patologie dementigene costituirà una delle più importanti emergenze che i sistemi sociosanitari dovranno affrontare nel prossimo futuro. La relazione temporale tra invecchiamento e demenza è apparsa macroscopicamente stretta nell'ultimo secolo, in particolare nei paesi in cui la vita media si è allungata significativamente e l'incidenza delle malattie dementigene ha subito un notevole aumento. Il *Delphy consensus study*, grande studio mondiale sull'epidemiologia della demenza pubblicato nel 2005, stimava che circa 24.3 milioni di persone tra i 60 e gli 85 anni erano affette nel mondo da demenza (6 milioni in Cina, 4.8 milioni in Europa Occidentale, 3.4 milioni in Nord America (Ferri, Prince, Brayne et al. 2005). Nel mondo sarebbero previsti ben 4.6 milioni di nuovi casi per anno con una stima che nel 2040 raggiungerà 81.1 milioni di dementi, uno ogni 7 secondi (Ferri, Prince, Brayne et al., 2005). La Fig. 1 rende l'idea dell'incremento della demenza nel mondo nei prossimi decenni.

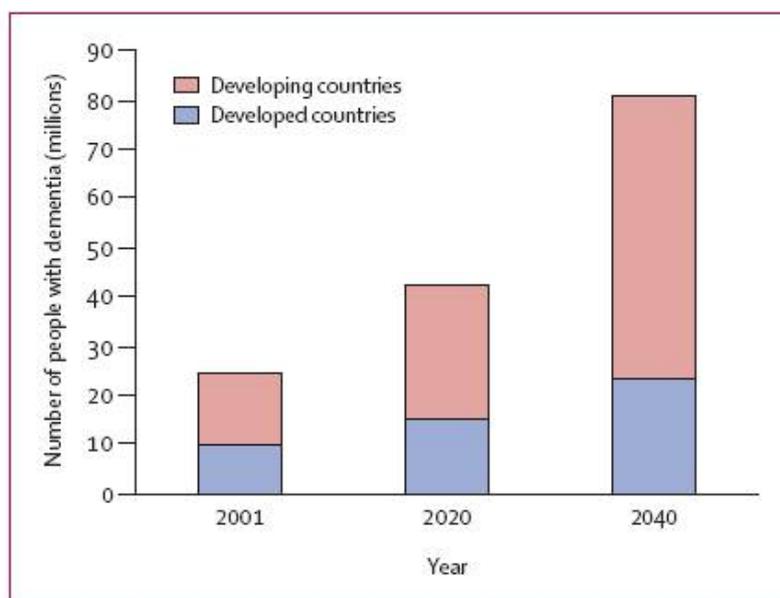


Figura. 1. Milioni di persone affette demenza nei paesi sviluppati e in paesi in via di sviluppo. *Fonte:* Ferri, Prince, Brayne et al. (2005).

In una recente lavoro Querfurth e LaFerla (2010) stimano che circa 35 milioni di persone siano affette da malattia di Alzheimer (AD) nel mondo, 5.5 milioni negli soli Stati Uniti. Le cose non vanno certamente meglio in Europa, continente più vecchio dove si stima che i malati di Alzheimer ed altre forme di demenza siano più di 7 milioni (Scafato, Galluzzo, Farchi e Gandin, 2010).

Da studi epidemiologici internazionali, confermati anche da ricercatori italiani, si è osservato che la prevalenza della demenza, di qualsiasi natura essa sia, aumenta con l'età in maniera quasi esponenziale a partire dalla fascia di età tra i 65 e gli 85 anni, raddoppiando approssimativamente ogni cinque anni. Partendo quindi dalla prima fascia d'età di riferimento, tra i 65 e i 69 anni la prevalenza di tale condizione è pari circa all'1%, raggiungendo il 30%-40% nella fascia tra gli 85 e gli 89 anni (The ILSA Group, 1997; Lobo et al., 1995; Bachman et al., 1992).

In Italia numerosi studi hanno cercato di conferire una dimensione precisa alla diffusione ed alla prevalenza della malattia. Dai primi lavori condotti su popolazioni campione che già per la fine del secolo scorso stimavano una prevalenza della 'Demenza', di qualsiasi tipo in circa 650.000 unità (Rocca *et al.*, 1990), si è cercato di dare una visione più fedele alla realtà allargando i centri di raccolta dei campioni (The ILSA Group, 1997). Gli studi più ampi hanno portato a proiezioni non perfettamente sovrapponibili, ma che comunque rendono l'idea della grave situazione che il sistema socio-sanitario dovrà affrontare. Secondo lo studio ILSA (The Italian Longitudinal Study On Aging - 1997), la demenza interessa il 5,3% degli uomini e il 7,8% delle donne oltre i 65 anni, e la stima delle persone affette da Alzheimer entro il 2000 si aggira intorno alle 430.000 - 450.000 unità; previsioni fatte nell'ambito di questa ricerca hanno inoltre stimato un raddoppio delle cifre entro il 2020. Un altro dato è quello del CNR-PFInvecchiamento (aggiornato al 1999) che stima la prevalenza della demenza in circa 660000 casi: di questi circa 250.000 unità rappresenterebbero pazienti affetti da AD (40%), ossia il 2,5 % degli abitanti al di sopra dei 65 anni, 38.000 dei quali nella sola Lombardia. Nell'ambito del recente 4° Convegno sul ruolo delle Unità di Valutazione Alzheimer promosso dall'Istituto Superiore della Sanità veniva stimato che in Italia sono presenti circa 1.000.000 di casi di demenza e che 3.000.000 di familiari sono coinvolti nell'assistenza. Tale cifra probabilmente raddoppierà nei prossimi trent'anni (Ruggeri e Vanacore, 2010).

Un recente studio longitudinale italiano denominato IPREA (Italian Project on the Epidemiology of Alzheimer Disease) ha cercato di calcolare la prevalenza e l'incidenza della demenza in fase preclinica, in quella fase cioè di transizione tra disturbo cognitivo lieve, connotato da lieve disabilità, e demenza conclamata, caratterizzata da una situazione altamente e progressivamente disabilitante. Il termine che viene maggiormente impiegato per indicare tale condizione intermedia tra normalità

e demenza e quello di mild cognitive impairment (MCI), introdotto poco più di dieci anni fa da Petersen (1999). Dai risultati ottenuti dallo studio IPREA è stato possibile stimare una prevalenza di deficit cognitivo lieve che oscilla tra il 28% ed il 45% della popolazione compresa tra il 65 e gli 84 anni (Scafato, Galluzzo, Ghirini e Gandin, 2010).

2. COSTI SOCIO-SANTARI DELLA DEMENZA

L'incremento dell'età media della popolazione con un netto incremento della proporzione di anziani si ripercuote sui costi che il sistema economico-sanitario deve affrontare. La demenza costituisce uno dei modelli di cronicità e disabilità progressiva nell'ambito delle affezioni mediche, ed è sicuramente tra quelle malattie che rappresentano un maggior costo economico e sociale. In più sedi è stato sottolineato che il nostro Sistema Sanitario si trova ad affrontare, con risorse limitate, il problema di far invecchiare dignitosamente una popolazione malata per la quale sta progressivamente aumentando l'aspettativa di vita. Le spese da affrontare per i malati non sono solo di ordine farmacologico, diagnostico o riabilitativo. Nella gestione dei pazienti AD ogni intervento effettuato, ogni ora utilizzata per la cura e la sorveglianza, rappresenta un crescendo di costi, che possono essere in parte riassunti in due grandi categorie:

(a) costi diretti: sono quelli sostenuti per l'acquisto di beni e servizi direttamente monetizzabili: utilizzo dei sistemi socio-sanitari (ospedali, diagnostica, assistenza sociale, *nursing*, istituzionalizzazione, assistenza domiciliare integrata), consumo di prodotti sanitari (farmaci, parafarmaci, ausili) ed in generale di prodotti per i quali viene effettuata una spesa da parte del paziente o della famiglia (es. adattare abitazioni, con discensori ecc.). È qui compreso, quindi, il supporto formale (istituti per anziani nelle fasi più avanzate e gravi);

(b) costi indiretti: sono sostanzialmente la conseguenza di una perdita di risorse, vale a dire di una perdita di produttività; tra questi si annoverano l'assistenza informale, cioè quella fornita dalla famiglia in proporzione alle esigenze ed alle richieste del malato. L'attività assistenziale, il *caregiving*, è di fatto un consumo di risorse e costituisce un costo sociale in quanto incide sul numero di ore di produttività perse (a seconda del tipo di analisi economico/sanitaria si può stimare il valore dell'ora impiegata come pari a quello del professionista sanitario necessario allo svolgimento di quel dato compito assistenziale, infermiere, fisioterapista ecc., oppure come pari al valore dell'ora relativa alla professione del *caregiver*). Non sono rari i casi di prepensionamento e di perdita dell'autonomia dei familiari.

Tra gli studi compiuti in Italia su questo tema di rilievo è quello condotto da Cavallo e Fattore (1997) che ha stimato il costo complessivo annuale per la cura del paziente demente in 44.550 Euro, dei quali l'86% come costi indiretti. È inoltre ancor più rappresentativo lo studio Co.Dem condotto dal 1994 al 1999 per la valutazione dei costi dell'assistenza informale, su un campione di pazienti residenti a domicilio e bilanciati sui diversi livelli di gravità di malattia (Bianchetti, Geroldi, Trabucchi, 1998). I dati ottenuti indicano che i costi informali rappresentano la componente maggiore e crescono con la gravità del decadimento cognitivo e dello scadimento del livello funzionale.

Una stima dei costi indiretti per anno di vita, riporta una cifra che va da circa 38.000 Euro sino a circa 48.500 Euro (di questi l'assistenza formale ammonta a 3000-6000 Euro mentre quella informale a 35.600-42.300 Euro) e aumenta in rapporto alle BADL; i costi sembrano inoltre correlare maggiormente con lo stato funzionale che con quello cognitivo, e nei pazienti più gravi non solo questi tendono a raddoppiare rispetto alle forme lievi, ma anche il numero di ore dedicato dai familiari/*caregiver* al paziente aumenta sino a raggiungere e superare le 120-130 ore settimanali. Relativamente allo stadio della malattia, gli ultimi studi indicano che il 75 % dei costi totali sono relativi alla gestione della demenza di grado severo. Oltre alle ore spese ad ovviare alla progressiva perdita di autonomia personale, è necessario considerare che i pazienti AD assistiti a casa (tra il 60 e l'80%) sviluppano fasi di malattia caratterizzate da disturbi psico-comportamentali (deliri, agitazione, irritabilità *wandering* notturno) che incrementano sensibilmente i costi in termini di ore di assistenza aggiuntive e di cure da elargire.

Ulteriori determinanti sono anche la struttura familiare, il suo livello economico, lo stress del *caregiver* ed il supporto di una rete di servizi. Oltre ai fattori citati, uno dei principali determinanti l'istituzionalizzazione dell'individuo con demenza è la crescita del costo completamente a carico della famiglia; il SSN si assume infatti una parte del costo economico di istituzionalizzazione (sino alla metà circa) ma poco o per nulla quello per l'assistenza informale. Il panorama delle altre nazioni occidentali è sovrapponibile a quello italiano, seppur con diversa ripartizione tra spese sostenute dai familiari e quelle assistenziali statali; ad esempio negli Stati Uniti alcuni ricercatori, stimano il costo annuo per la cura del paziente demente in 22.500 dollari (Langa *et al.*, 2001). Negli Stati Uniti, e più frequentemente nei paesi Nord Europei, però, la spesa per le cure informali rappresenta una percentuale minore; da uno studio analitico in Inghilterra e Galles del 1991 meno del 10% era legato alla cura informale, ai medicinali ed ai trattamenti (90% tra Ospedali, ricoveri, ecc.). Tipicamente nell'età avanzata, quindi, le demenze rappresentano uno dei problemi sanitari principali, indipendentemente dai differenti meccanismi patogenetici sottostanti; nel corso dei prossimi anni, la forma di demenza quest'oggi prevalente, l'AD, rappresenterà una delle maggiori

emergenze socio-sanitarie cui andranno incontro i paesi occidentali, proprio a causa del progressivo invecchiamento della popolazione e della manifestazione di un'inaspettata fragilità e vulnerabilità cerebrale nei confronti dei meccanismi patogenetici degenerativi.

Per concludere, la demenza ha un impatto rilevante sulla vita sociale, sull'autonomia personale e sulle condizioni di salute e rappresenta un importante costo socio-economico destinato ad aumentare sempre più.

3. DEMENZA, MALATTIA DI ALZHEIMER E DEMENZE CORRELATE

Con il termine demenza si intende una sindrome clinica, non necessariamente senile, caratterizzata da deficit a carico non solo della memoria, ma anche di altri aspetti cognitivi come orientamento, linguaggio, attenzione, etc. Oltre ai sintomi cognitivi sono presenti sintomi non cognitivi che riguardano la sfera della personalità, l'affettività, le funzioni vegetative, etc. La compromissione deve essere di gravità tale da condizionare negativamente il benessere bio-psico-sociale della persona e di assumere un carattere ingravescente continuo o secondo gradi distinti (Trabucchi, 2002).

Tale condizione viene abitualmente identificata con la malattia di Alzheimer (AD), ossia con la forma neurodegenerativa che con maggior frequenza determina una perdita progressiva delle funzioni cognitive. Non va tuttavia dimenticato che esistono diverse forme di demenza in grado di agire a livello del sistema nervoso centrale con diversi meccanismi patogenetici (anomalie dell'apporto ematico, infiammazioni ed infezioni, deficit metabolici o di ossigenazione, traumi cranici ripetuti, etc). Infine, ancor più raramente e con caratteristiche di ereditarietà, alcune malattie degenerative possono condurre verso i disturbi cognitivi ancor prima dei 50 anni di età. Il coinvolgimento delle funzioni cognitive avviene diversamente per ogni entità nosologica, in termini di modalità di presentazione, di combinazione dei deficit esibiti nonché di grado di compromissione e di tipo di evolutività degli stessi. Inoltre, a seconda della condizione patologica codificata nosologicamente, si associano altri disturbi neurologici che coinvolgono i sistemi piramidale, extra-piramidale, quello vegetativo e le funzioni complesse non cognitive (asse affettivo e psico-comportamentale), oppure una combinazione degli stessi.

I sintomi cognitivi e gli altri deficit neurologici possono presentarsi in rapporto alle fasi più gravi del decadimento cognitivo oppure possono comparire in tempi definiti e caratteristici per una data patologia (ad esempio le anomalie psico-comportamentali precedono la fase conclamata della variante di Pick della FTD e le stesse anomalie caratterizzano invece fasi già conclamate e medio-avanzate dell'AD).

Come ulteriore elemento di complessità, in diverse forme di demenza si verificano condizioni molto simili a quelle tipiche delle patologie psichiatriche, anche se a tempi diversi, con le quali condividono l'alterazione della personalità, del comportamento, delle capacità di una corretta percezione ed ideazione. Il paziente demente si trova perciò ad affrontare deficit di differente natura e grado, che invariabilmente si ripercuotono sulla sua capacità di far fronte alle richieste della vita di ogni giorno, di svolgere le prestazioni già acquisite in precedenza, di conservare comportamenti sociali adeguati e di controllare le proprie reazioni emotive. Il quadro è, in realtà, più complesso e presenta numerose sfaccettature.

Come precedentemente osservato, infatti, i deficit delle funzioni cognitive con impatto ecologico negativo possono esistere a più livelli di presentazione, gravità, andamento ed associazione; ancor più precisamente, essi sono legati a numerosi e differenti processi patologici primitivi o secondari, sia funzionali sia organici, e come questi possono essere transitori o persistenti, stabili o progressivamente ingravescenti.

Tra tutte le forme di demenza, la malattia di Alzheimer è quella sicuramente prevalente delle patologie primitive e secondarie che causano decadimento cognitivo; di seguito si presenta la forma Corpy di Lewy (LBD), la demenza mista (AD/VD), la forma vascolare (VaD) ed altre forme meno frequenti che interessano caratteristicamente fasce d'età inferiori, generalmente meno coinvolte nel fenomeno del decadimento cognitivo.

Malattia di Alzheimer	50-80%
Demenza a corpi di Lewy	20%
Demenza mista (Alzheimer/vascolare)	10%
Pseudodemenza depressiva	5-10%
Demenza vascolare	5%
Disturbi metabolici	< 5%
Intossicazione da sostanze	< 5%
Infezioni	< 5%
Lesioni strutturali	< 5%
Demenza alcolica	< 5%
Idrocefalo	< 5%
Parkinson-demenza	< 5%
Demenze fronto-temporali e malattia di Pick	< 1%

Tabella 1 . Le principali cause di demenza. *Fonte:* Corey-Bloom (2004).

Nonostante l'esistenza di un così ampio numero di patologie dementigene l'interesse della comunità scientifica si è focalizzato sulle forme più comuni nella nostra società e cioè sulle demenze degenerative; tra queste, quella considerevolmente più frequente come risulta dalla Tab. 1, è sicuramente la malattia di Alzheimer. La nostra attenzione è quindi principalmente rivolta allo studio delle fasi precliniche e conclamate delle demenze di natura degenerativa primaria, e tra queste l'AD.

La diagnosi della demenza di Alzheimer risulta certa, ad oggi, solo attraverso l'identificazione delle placche amiloidi nel tessuto cerebrale all'analisi *post mortem* del paziente (analisi istopatologica). Nel corso degli ultimi anni, grazie al miglioramento delle indagini strumentali e di laboratorio, è stato comunque possibile identificare *intra vitam* la malattia in un numero sempre maggiore di pazienti affetti da decadimento cognitivo, con sempre più elevati livelli di sensibilità e di specificità. La formulazione della diagnosi ha raggiunto conferme nel 90-93% oppure nel 50-55% dei casi studiati, in base all'accuratezza delle indagini effettuate, alla presentazione clinica ed all'identificazione di patologie concomitanti. Nel corso degli anni sono state formulate delle linee guida per poter giungere ad una diagnosi sempre più efficace e precoce. I primi criteri sono stati definiti nel 1984 grazie al gruppo NINCDS-ADRDA (McKahn et al., 1984) e adottati dalla APA, DSM-IV-TR, ancora oggi adottati, che consentono di formulare una diagnosi probabile, possibile o certa.

La diagnosi di AD 'probabile' poggia sul riscontro di un declino cognitivo stabilito clinicamente e mediante test neuropsicologici, deficit in due o più aree cognitive tra cui la memoria, assenza di alterazione della coscienza, inizio dei sintomi dopo i 40 anni, esordio insidioso, decorso progressivo, esclusione di altre patologie capaci di compromettere le funzioni cognitive.

La diagnosi di AD 'possibile' è riservata alle forme con caratteristiche cliniche atipiche (insorgenza brusca, segni neurologici focali, incoordinazione motoria precoce, crisi epilettiche precoci) o con malattie sistemiche o cerebrali coesistenti, che tuttavia non si ritiene possano essere la causa della demenza. Oggi si tende a formulare diagnosi di AD in tutti quei casi in cui, nonostante le sovrapposizioni, i criteri per la malattia di AD siano sufficienti a giustificare la clinica.

La diagnosi di AD 'certa' può essere posta solo dopo accertamento neuropatologico eseguito post-mortem o dopo biopsia cerebrale.

Considerato che l'accuratezza e la precocità della diagnosi di AD sono cruciali sia per il paziente che per la famiglia la comunità scientifica ha cercato in questi ultimi anni di individuare dei criteri diagnostici in grado di riconoscere la malattia in fase preclinica o prodromica. Recentemente è stata presentata una revisione dei criteri diagnostici che mira a giungere ad una diagnosi precoce di AD

(Dubois, Feldman, Jacova et al., 2007, 2010). Il processo neurodegenerativo che caratterizza la AD inizia molti anni (20-30) prima dell'esordio dei segni clinici e da qui la necessità di individuare dei marker clinici, biologici e neuroradiologici in grado di identificare l'AD nelle sue fasi precliniche. Solo in questa fase sembra possibile mettere in atto tempestivamente presidi terapeutici e gestionali più efficaci per la malattia, nonché di identificare in epoca pre-terapeutica soggetti ancora autonomi con condizioni di danno cognitivo lieve (MCI) non riconducibili ad una demenza conclamata ma a rischio di svilupparla, consentendo così di intervenire con terapie mirate sia di tipo farmacologico che non farmacologico.

La Fig. 2 illustra come l'AD presenti nel corso della sua evoluzione 'incrementi' o 'decrementi' a livello di plurimi parametri clinici, fisiologici, biologici e neuroradiologici.

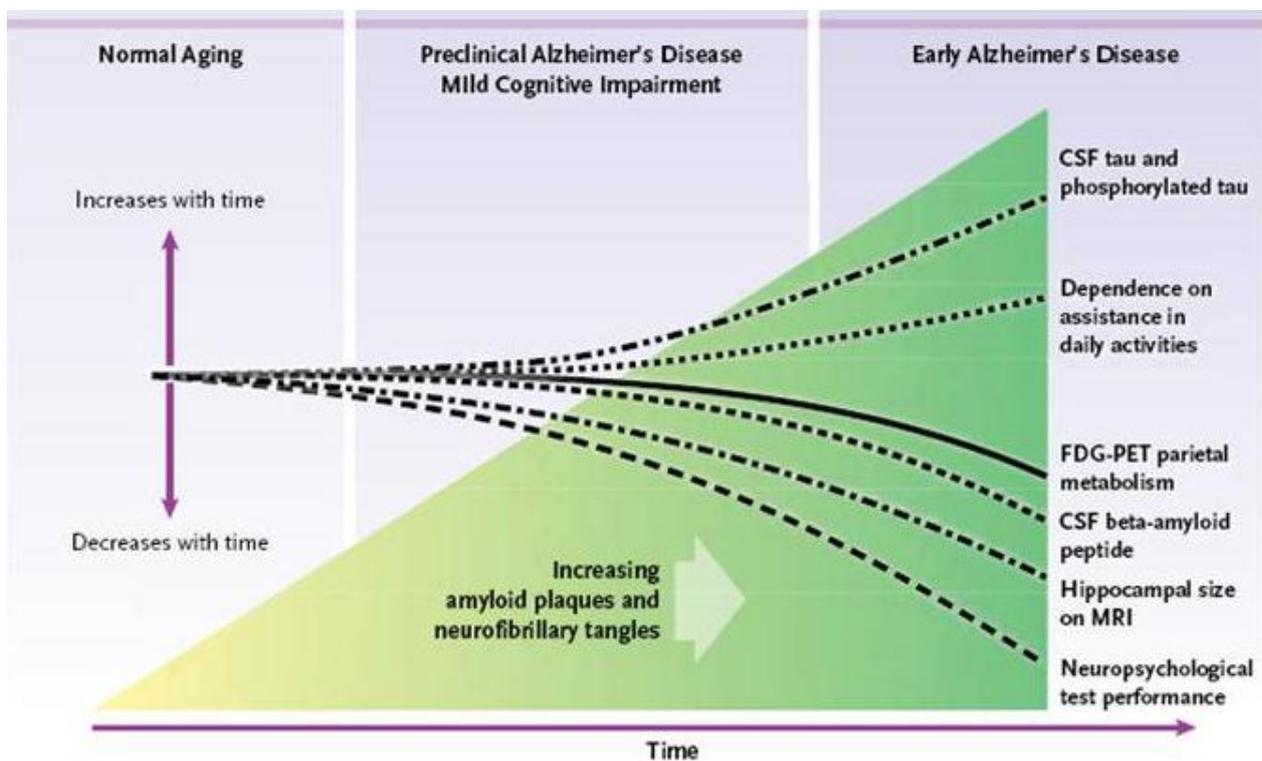


Figura 2. Evoluzione delle modificazioni patologiche, cliniche, fisiologiche e radiologiche a partire da un normale invecchiamento alla malattia di Alzheimer. *Fonte:* Mayeux (2010).

I criteri diagnostici di Dubois, Feldman, Jacova et al. (2007, 2010) prevedono che la diagnosi sia fondata sulla presenza di una serie di aspetti clinici di base e di una serie di caratteristiche di supportive di tipo biologico, radiologico e genetico che devono essere al momento ancora verificate sperimentalmente. I primi dati suggeriscono che tali marker necessitano di ulteriori verifiche e aggiustamenti soprattutto a livello dei parametri di riferimento (cut-off) per definire la presenza dell'instaurarsi di una sindrome demenziale (Oksengard, Cavallin, Axelsson et al., 2010). Non

mancono comunque dati a supporto di una validità dei nuovi marker (Galluzzi, Geroldi, Ghidoni et al., 2010).

La Tab. 2 riporta i criteri di Dubois et al., (2007, 2010). Secondo tali criteri per fare diagnosi di malattia di Alzheimer è necessario soddisfare un criterio natura clinica (criterio A) e uno o più criteri di natura strumentale (Criteri B, C, D, E), come sottoesposto.

Criterio A: presenza di un precoce e significativo indebolimento mnesico che include le seguenti caratteristiche
<ol style="list-style-type: none">1. Evidenza di una significativa perdita di memoria ai test neuropsicologici: questa generalmente consiste nel in un deficit di recupero che non migliora significativamente o che comunque non si normalizza con suggerimenti o test di riconoscimento e dopo che la codifica dell'informazione è stata precedentemente verificata.2. Il deficit di memoria episodica può essere isolato o associato con altre modificazioni cognitive sia all'inizio della malattia d'Alzheimer sia nel suo progredire
Criterio B: Presenza di atrofia al lobo temporale mediale:
<ul style="list-style-type: none">• Danno volumetrico degli ippocampi, della corteccia entorinale, dell'amigdala evidenziate alla RMN con scoring di valutazione qualitativi di tipo visivo (riferite ad una determinata popolazione con norme per l'età) o di volumetria quantitativa delle regioni di interesse(riferite ad una determinata popolazione con norme per l'età);
Criterio C: Livelli anormali di marker rilevabili da prelievo di liquor cerebrospinale
<ul style="list-style-type: none">• Basse concentrazioni di beta amiloide, incremento della proteina tau, o incremento delle concentrazioni della fosfo-tau, o combinazioni delle tre
Criterio D: specifici pattern di neuroimmagine funzionale attraverso la metodica PET
<ul style="list-style-type: none">• Ridotto metabolismo di glucosio nelle regione temporo-parietali bilateralmente• Altri ben validati ligandi, inclusi quelli che prevedibilmente emergeranno come il Pittsburg compound B o FDDNP
Criterio E: dimostrata familiarità per mutazioni autosomiche dominanti della malattia di Alzheimer.

Tabella. 2. Nuovi criteri diagnostici proposti da Dubois et al. *Fonte:* Dubois, Feldman, Jacova et al. (2007).

Va osservato che è stata documentata una certa eterogeneità nella risposta alle modificazioni neuropatologiche imposte dall'AD. Inoltre, sono stati riportati alcuni fattori quali un'elevata educazione, buone capacità linguistiche o particolari meccanismi neuroprotettivi (es. volume cerebrale, ipertrofia cellulare) che sembrano ridurre l'impatto delle modificazioni cerebrali

dell'AD sulla performance mnesico-cognitiva (Perneczky, Wagnpfeil, Lunetta et al., 2009; Erten-Lyons, Woltjer, Dodge et al., 2009; Price, McKeel, Buckles et al., 2009).

4. IL MILD COGNITIVE IMPAIRMENT (MCI)

Come è possibile rilevare dai criteri postulati da Dubois et al. (2007), anche il solo deficit isolato di memoria episodica anterograda, persistente per almeno sei mesi e documentato ai test neuropsicologici, può costituire una condizione di AD conclamata. Tale diagnosi è comunque limitata a quei casi in cui il disturbo abbia raggiunto un livello di gravità tale da interferire con le normali attività sociali e occupazionali.

Vi sono tuttavia condizioni in cui il disturbo mnesico o di altre funzioni cognitive si presenta nel contesto di una preservata autonomia funzionale nella vita quotidiana o di minimi disturbi delle autonomie funzionali extradomestiche nelle attività della vita quotidiana. Notevoli passi avanti sono stati compiuti nell'identificare condizioni intermedie tra normalità e demenza, nella loro categorizzazione, nel calcolo del rischio e del possibile tipo di evoluzione. Come già ribadito la diagnosi precoce è molto importante sia perché offre la possibilità di trattare alcuni sintomi della malattia, sia perché permette al paziente di pianificare il suo futuro, quando ancora è in grado di prendere delle decisioni e di conseguenza mettere in atto tutte quelle misure necessarie per affrontare i problemi connessi alla progressione della malattia.

Sin dalla fine degli anni Cinquanta si era sentita l'esigenza di caratterizzare una fascia di pazienti che presentavano un deficit cognitivo che andava al di là del fisiologico decadimento età-dipendente ma per i quali, vista la lieve entità del deficit e la sua invariabilità nel tempo, non si poteva affermare di essere di fronte ad un processo dementigeno ma tutt'al più ad un anomalo invecchiamento neuropsicologico naturale. Tale deficit cognitivo subclinico è stato inquadrato in passato attraverso numerose definizioni nosologiche (*Benign Senile Forgetfulness, BSF, Aging Associated Cognitive Decline, AACD, Age Associated Memory Impairment, AAMI, Cognitive Impairment No Dementia, CIND*) accomunate da una interpretazione 'non evolutiva' del deficit stesso.

Nel 1999 Petersen, Smith, Waring et al., hanno introdotto il termine di *Mild Cognitive Impairment (MCI)* per indicare una popolazione di soggetti non compromessi nelle attività della vita di tutti i giorni ma accomunati dalla presenza di un soggettivo deficit di memoria e segnalando che questi soggetti erano a rischio di sviluppare nel corso degli anni una demenza di tipo alzheimeriano (Petersen *et al.*, 1999). Il termine di MCI è andato incontro a nel tempo a delle modifiche sia di tipo operativo che nosologico comprendendo anche altri domini cognitivi oltre alla memoria e includendo anche individui con minime difettualità delle autonomie funzionali nella vita quotidiana

(Petersen, 2010; Marra, 2010). L'espansione del concetto di MCI ad altri domini cognitivi ha di fatto determinato la necessità di definire dei sottotipi di MCI sulla base delle caratteristiche neuropsicologiche basilari. Petersen e colleghi (2004, 2008, 2010) sono giunti così a definire quattro sottotipi di MCI: (1) una forma pura di tipo amnesico (aMCI); (2) una forma in cui al disturbo mnesico si associa il disturbo di un'altra funzione cognitiva, MCI a dominio multiplo (md-MCI) (3) una forma non amnesica in cui è presente una compromissione isolata di una funzione cognitiva non mnesica (snm-MCI) e (4) una forma in cui sono presenti deficit di più funzioni cognitive non mnesiche (mdnm-MCI). Tale suddivisione è riportata nella Fig. 3.

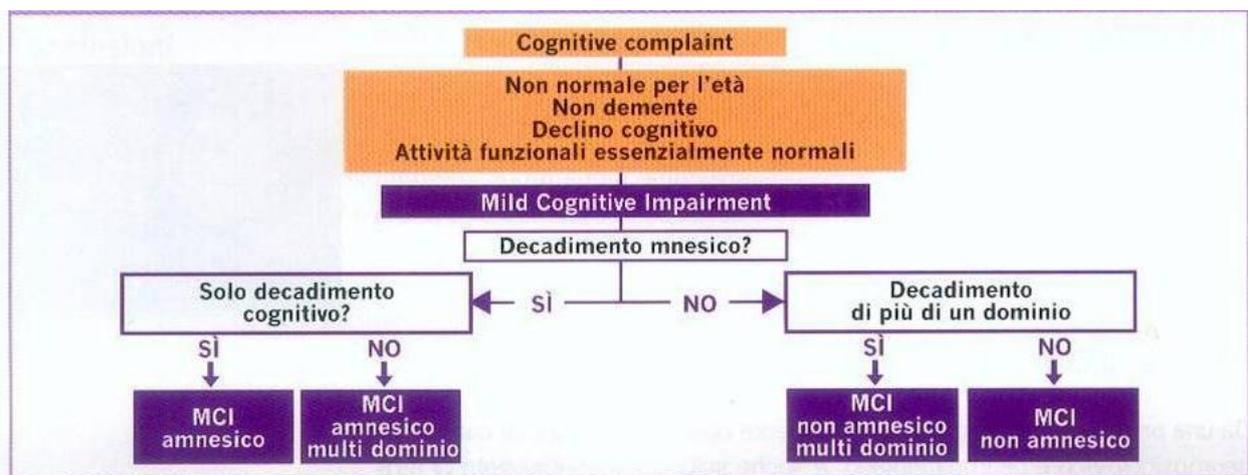


Figura. 3. I vari sottotipi di MCI postulati da Petersen e collaboratori. *Fonte:* Marra (2010).

E' stato ipotizzato che i vari tipi di MCI avranno un differenti evoluzioni verso forme dementigene diverse. Inoltre, oltre che su base neuropsicologica il concetto di MCI è stato concepito anche sulla base di una differente eziologia a carattere evolutivo o non evolutivo (es. patologie psichiatriche, metaboliche, associate a patologia internistica, iatrogenica, etc). La Tab. 2 riporta il possibile *outcome* del MCI verso diverse forme dementigene tenendo in considerazione l'eziologia di base.

Il concetto di MCI ha ampliato e reso enormemente difforme il numero di pazienti classificabili come MCI, e inoltre ha anche reso complicato il modo di individuare i soggetti a rischio di convertire verso forme conclamate di demenza. Non è un caso che i ricercatori che hanno indagato il tasso di conversione dei soggetti MCI in AD mediante valutazioni longitudinali o retrospettive ed hanno evidenziato percentuali annue di conversione estremamente disperse, raggiungendo spesso conclusioni non univoche e contraddittorie.

Classificazione clinica	Eziologia				
		Degenerativa	Vascolare	Psichiatrica	Condizione medica
MCI amnesico	Singolo dominio	AD		Depressione	Alcolismo, ipovitaminosi
	Multiplo dominio	AD	VD	Depressione	Post-traumatica, BPCO, ipotiroidismo
MCI non amnesico	Singolo dominio	FTD		Depressione	Patologia renale o epatica
	Multiplo dominio	DLB	VD		OSAS

Tabella. 3. Possibile outcome del MCI e varie forme eziologiche sotto. *Fonte:* Marra (2010).

Le ampie differenze rilevate negli studi che hanno effettuato stime sulla percentuale con cui si verifica la conversione in demenza del MCI sono legate all'ampia variabilità metodologica di base. I principali problemi nel confrontare i lavori derivano infatti da differenze nei campioni di MCI esaminati (più o meno puliti con presenza di *early AD*), dai test neuropsicologici adottati e dai cut-off scelti, dal numero di anni di follow-up e dalla tipologia del campione studiato (es. studio clinico, studio di comunità).

I primi dati forniti dal *Centro di Ricerca sulla malattia di Alzheimer di Mayo, Rochester, Minnesota*, che ha osservato un gruppo di questi soggetti per più di 10 anni, hanno dimostrato una conversione ad Alzheimer dell'80%, nei primi 6 anni (Petersen et al., 2001). Approssimativamente, l'80% dei soggetti con MCI converte in AD entro i cinque anni successivi alla diagnosi. Studi successivi hanno rilevato un tasso di conversione del 3.8%-15% per anno (Ritchie et al., 2001; Larrieu, 2002; Busse et al, 2003, Solfrizzi, 2003) o del 20%-50% in 2-3 anni (Black et al, 1999; McKevelly et al., 1999; Amieva et al., 2004) con una media di conversione che si aggira intorno al 10% annuo (Marra, 2010).

Al di là dei risultati contrastanti, la condizione MCI ha acquisito il valore di entità diagnostica e rappresenta un valore prognostico fondamentale per formulare un'ipotesi sul rischio di progressione e sul probabile tipo di demenza futura.

La stretta relazione clinica esistente tra MCI ed AD di grado lieve (in termini di possibile transizione tempo-dipendente e di parziale sovrapposizione dei sintomi), oltre alla generale buona tollerabilità del trattamento con AchE-i nei pazienti affetti da demenza, suggeriscono un potenziale ruolo degli inibitori delle colinesterasi nei pazienti con deficit cognitivo minimo/isolato. A tale proposito, sono in corso diversi studi clinici su ampie popolazioni a livello internazionale, su ampie popolazioni, finalizzati a verificare la capacità degli AchE-i di ridurre il rischio di progressione dei pazienti MCI in AD. Alcune di queste ricerche hanno fornito, peraltro, dati preliminari contrastanti o, almeno, eterogenei, in prima ipotesi a causa di una selezione dei pazienti poco accurata; l'importanza di una

corretta categorizzazione dei differenti tipi preclinici di demenza è comunque già emersa nell'arco di ampi studi osservazionali di semplice conversione da MCI a demenza, condotti su popolazioni a rischio, tra i quali il più noto è lo studio CENA-Index. E' da tutti riconosciuta la necessità di definire correttamente il tipo di demenza come requisito per intervenire con trattamenti e con ricerche mirate e selettive. Ma anche nella progettazione di studi clinici condotti su soggetti che non presentano una demenza conclamata è molto rilevante suddividere, per classi di probabilità, gli stadi prodromici di una demenza: pena, il rischio di osservare o trattare condizioni che non andranno incontro a conversione in AD o che procederanno verso altre forme di demenza non suscettibili ai medesimi trattamenti dell'AD. Nel paziente MCI, o nella più precisa e moderna connotazione a-MCI in accordo con i criteri clinici di Petersen, la perdita di memoria costituisce il disturbo cognitivo cardine. Nella pratica clinica vengono utilizzati diversi test per saggiare la memoria, fra cui la somministrazione di brevi racconti, liste e coppie di parole. In questi soggetti quindi è possibile ottenere una misura quantitativa/semi-quantitativa della funzione mnemonica; il ricercatore può trattare tale misura quale variabile dipendente da correlare agli interventi che si intendono testare, siano essi farmacologici o riabilitativi (variabili indipendenti).

5. LA TERAPIA FARMACOLOGICA DELL'AD

Nell'attualità, gli inibitori delle colinesterasi restano il solo trattamento farmacologico indicato e rimborsato dal Servizio Sanitario Nazionale per il controllo dei disturbi cognitivi dei pazienti affetti da AD. In analogia con il trattamento del morbo di Parkinson con L-Dopa, nell'AD si è affermata la *terapia neurotrasmettitoriale sostitutiva* e lo sviluppo da parte dell'industria farmaceutica degli inibitori dell'acetilcolinesterasi (AChE-i) con l'affermarsi dell'ipotesi colinergica della malattia nel corso degli anni '80. Tale ipotesi prevede che, almeno parzialmente, il deficit psico-cognitivo del paziente sia secondario alla riduzione dei livelli corticali di acetilcolina (ACh), conseguenza del progressivo depauperamento neuronale a livello del nucleo basale del Meynert o di altre strutture colinergiche a proiezione corticale. L'acetilcolina è uno dei principali neurotrasmettitori del sistema nervoso, sia di quello centrale, dove svolge un ruolo fondamentale nello svolgimento delle funzioni cognitive superiori, sia di quelli periferico e vegetativo.

L'ACh, prodotta a partire dalla colina tramite l'enzima colinoacetiltransferasi (ChAT) e liberata nello spazio sinaptico, si lega, a livello post-sinaptico, a due diversi recettori: nicotinici e muscarinici. La degradazione avviene grazie a due tipi di colinesterasi codificate da due geni differenti, con la liberazione di colina che viene riassorbita e quindi riutilizzata per sintetizzare nuova ACh. Nel corpo umano esistono: l'acetilcolinesterasi, diffusa nel SNC per l'80-90% e la butirrilcolinesterasi, che è

diffusa per il 10-20%; quest'ultima è presente soltanto in alcune aree cerebrali, quali la corteccia temporale (aree limbiche) e frontale. Si è osservato che, con il progredire della malattia, si realizza una lenta e progressiva riduzione dell'acetilcolina e dell'acetilcolinesterasi (AChE). Questa modificazione neurochimica determina una riduzione di permanenza dell'Ach nello spazio sinaptico, associata a perdita di recettori colinergici nell'ippocampo, lobo temporale e parietale. Gli AchE-i si legano al sito catalitico delle colinesterasi e ne inibiscono l'attività; impedendo in tal modo la degradazione dell'Ach, queste molecole aumentano la disponibilità sinaptica del neurotrasmettitore, come quantità e durata, e potenziano quindi la trasmissione colinergica centrale, sostenendo verosimilmente la performance cognitiva del paziente. Nel corso degli ultimi anni numerosi studi hanno confermato l'efficacia degli AchE-i nel produrre un piccolo ma significativo miglioramento cognitivo e funzionale dei pazienti trattati e le linee guida pubblicate nel 2001 dall'American Academy of Neurology indicano negli AchE-i la prima opzione terapeutica per il trattamento dell'AD (Doody et al., 2001).

In controtendenza parrebbero, però, le più recenti considerazioni espresse da numerosi ricercatori in base a valutazioni di efficacia nel tempo; analogamente è mutata la posizione di Organizzazioni Sanitarie di alcune nazioni (ad es. quella Inglese) che considerano, ad oggi, non efficaci gli anticolinesterasici come trattamento della malattia conclamata, ed indicano gli eventuali effetti come transitori e limitati alle fasi iniziali del processo (Bozze delle Linee Guida per il trattamento dell'AD del 'National Institute for Clinical Excellence', 2005).

Il tema del trattamento delle patologie dementigene, in particolare dell'AD, che è la patologia degenerativa più frequente, rimane comunque sempre di grande attualità, ma alla luce delle nuove tendenze sembra vivere di un nuovo sentimento teso a non disperdere le proprie forze nel cercare cure comunque tardive, di scarsa efficacia e non durature; i nuovi obiettivi sono quelli di prevenire la malattia e di trattare le fasi pre-cliniche. Ricordiamo che sino ad ora non è stata introdotta una terapia in grado di modificare l'esito della malattia degenerativa conclamata, nonostante le iniziali speranze riposte nella sperimentazione del 'vaccino'. I trattamenti proposti sembrano unicamente modificare temporaneamente l'andamento di alcuni sintomi, in maniera spesso però non riproducibile né costante; anche dopo una terapia di lunga durata non sembrerebbe sussistere neppure una sensibile variazione dei reperti anatomico-patologici micro- e macroscopici. Attualmente, in Europa, sono disponibili tre differenti AchE-i: *donepezil*, *rivastigmina* e *galantamina*. I rischi associati alla terapia con AchE-i sono correlati al manifestarsi di eventi avversi, prevalentemente gastrointestinali, dose e titolazione-dipendenti. La maggior parte di questi eventi sono di grado lieve-moderato, non richiedono alcun intervento terapeutico e scompaiono alla sospensione della terapia (Hogan et al., 2002).

Parte Seconda

1. SIGNIFICATIVITA' STATISTICA E SIGNIFICATIVITA' CLINICA

Al medico che imposta un trattamento farmacologico in un paziente con AD vengono spesso posti quesiti del genere: '*. . . ma migliorerà con questo farmaco?*' oppure durante la somministrazione del farmaco: '*Come sta andando . . . L'avete trovato migliorato?*'. Due sono le risposte a disposizione del medico. Da un lato potrà rispondere che l'adozione di un certo trattamento farmacologico viene sostenuta da studi effettuati su ampi campioni di pazienti con malattia di Alzheimer, che dimostrano statisticamente l'efficacia del farmaco. Dall'altro potrà affermare che un guadagno cognitivo verrà valutato, prima e durante la terapia, con apposite scale di valutazione (es. MMSE, ADAS-cog, etc.), oppure che è stato effettivamente riscontrato uno scostamento in termini di punteggio alle varie scale durante la somministrazione del farmaco. Per quanto attiene al primo punto, è opportuno sottolineare che benché le sperimentazioni che utilizzano gruppi di pazienti hanno la loro efficacia nell'isolare relazioni causa ed effetto, esse presentano alcuni problemi. Nelle ampie casistiche di pazienti si determina un mascheramento degli effetti individuali. La significatività statistica, nelle ricerche sui gruppi in relazione alla variabilità interna del gruppo (che rappresenta l'incidenza delle variabili di errore). Tuttavia i risultati medi del gruppo offuscano le situazioni individuali e non consentono di valutare il vero impatto terapeutico sul singolo paziente. Alcuni pazienti in trattamento evidenziano dei miglioramenti, mentre in altri non si evidenziano progressi o addirittura tendono a regredire; in pratica un paziente che migliora molto e uno che peggiora risultano tutti e due aver guadagnato qualcosa. La variabilità individuale è pertanto tale da determinare risposte diverse al trattamento implementato. Quanto detto porta alla frustrante constatazione (spesso avvertita dal medico) tra significatività statistica e significatività clinica, cioè l'osservazione che quel tanto decantato farmaco funziona solo nel tanto decantato articolo scientifico ma non nella pratica ambulatoriale con il singolo paziente.

Il problema fondamentale è che la significatività statistica dipende dal numero di pazienti impiegati nella ricerca. Con gruppi molto numerosi è possibile far risaltare effetti di poco conto, significativi cioè dal punto di vista statistico ma clinicamente senza importanza. Per fare un esempio, supponiamo che un trattamento farmacologico condotto con un numero molto elevato di pazienti produca un miglioramento nel 55% dei pazienti contro il 50% dei soggetti di controllo che migliora spontaneamente. E' chiaro che in relazione all'elevato numero di pazienti impiegati si potrebbe avere una significatività statistica, ma una bassa significatività clinica. Appare azzardato adottare un trattamento farmacologico il cui effetto benefico corrisponda ad una differenza così marginale.

Per quanto attiene al punto 2, cioè all'applicazione di test e scale di uso corrente, va osservato che strumenti quali il MMSE, l'ADAS-cog e simili si presta male ad una verifica statisticamente provata dell'efficacia di un farmaco. Lo scostamento di pochi punti al minimal o dei 4 punti tanto decantati all'ADAS-cog possono avere scarso valore statistico.

Per i suesposti motivi può essere utile adottare una metodologia che privilegi l'osservazione sul singolo soggetto, in grado di cogliere anche sottili miglioramenti dopo una terapia farmacologica.

2. VALUTAZIONE PERSONALIZZATA DELL'EFFICACIA DEL TRATTAMENTO: I MODELLI STATISTICI 'TIME SERIES' E LA METODOLOGIA N = 1

Disegni sperimentali su caso singolo (o metodi N=1) sono stati ampiamente utilizzati in passato nell'ambito delle scienze mediche, biologiche e sociali allo scopo di valutare nel tempo la risposta a condizioni terapeutiche di varia natura (farmacologica, psicologica, riabilitativa, etc) (Kazdin, 1982). Tale metodologia è andata incontro a periodi di alternata fortuna e considerazione nell'ambito della ricerca. A partire dagli anni venti del secolo scorso però, è in particolare dopo la pubblicazione del famoso testo di R.A. Fisher dal titolo '*Statistical Methods for Research Workers*' del 1925, la sperimentazione clinico-sperimentale ha vissuto un lungo periodo di modifica metodologica, fondato sull'osservazione di campioni numerosi di individui, per tempi spesso limitati, e sull'analisi statistica dei dati così ottenuti tramite metodi statistico-matematici complessi (Kazdin, 1982). Fra gli anni '20 e gli anni '70 del novecento, tale posizione si è andata affermando al punto da essere considerata l'unico approccio idoneo per condurre le ricerche. In tal modo si è provveduto ad isolare efficacemente relazioni di causa ed effetto tra stimolo e risposta, consentendo la generalizzazione dei risultati e la determinazione della loro significatività statistica; la significatività di una risposta, ricordiamo, è ottenuta generalmente confrontando le differenze delle risposte dei diversi gruppi, sottoposti ad uno o più stimoli, in relazione alla variabilità interna del gruppo (incidenza delle variabili d'errore).

Dunque, sperimentazioni su gruppi di individui ed analisi statistica dei risultati (es. sperimentazioni caso-controllo) hanno focalizzato l'attenzione sulla relazione tra variabili; l'utilizzo di grandi numeri di elementi/dati/soggetti, una loro corretta selezione (solitamente casuale) e l'uso delle complesse procedure statistiche hanno consentito di studiare il comportamento di una variabile dipendente, in presenza di uno stimolo (variabile indipendente), a prescindere spesso dalla presenza di altri elementi non noti; questa metodologia ha permesso l'identificazione di differenze significative tra gruppi di individui sottoposti a precise procedure sperimentali e soprattutto la generalizzazione dei risultati finali. L'impiego di un ampio numero di soggetti ha sicuramente lo scopo di aumentare la

validità delle differenze osservate, pur senza poter controllare strettamente le condizioni sperimentali; lo stesso Pearson confidava nella significatività di conclusioni ottenute dall'analisi statistica dei dati provenienti da un consistente numero di soggetti, anche se raccolti con accuratezza parziale. Ricapitolando, le sperimentazioni che analizzano gruppi di soggetti sono in grado di isolare relazioni di causa ed effetto tra variabili con un'elevata accuratezza e soprattutto di generalizzarne i risultati e le conclusioni

L'indiscussa rilevanza dei risultati delle suddette ricerche non le pone al riparo da alcune critiche, in modo particolare quando si procede all'esame degli effetti di trattamento sul singolo paziente durante la pratica clinica. Alcuni limiti osservati in tale ambito sono difatti:

- di natura etica, quando non è corretto procedere con studi randomizzati di efficacia caso/controllo con farmaci salvavita;
- di natura pratica, nella selezione di gruppi, cioè quando la selezione di un numero significativo di casi si scontra con la bassa prevalenza di una malattia o la rapida modificazione della stessa;
- di mascheramento degli effetti sull'individuo, facendo riferimento ai valori medi del gruppo, quando un paziente viene sottoposto al medesimo stimolo in virtù della risposta media del gruppo, nonostante effetti nulli o negativi;
- di differenza tra significatività statistica e clinica, ossia quando miglioramenti statisticamente significativi di una risposta non lo sono realmente nella pratica quotidiana (es. riduzione della cefalea da moderata a lieve nel 60% degli individui sottoposti a farmacoterapia rispetto al 50% di quelli sottoposti a placebo con un farmaco particolarmente costoso e con effetti collaterali consistenti e frequenti).

Per superare questi limiti, soprattutto in ambito riabilitativo con portatori di handicap o psicoterapico, è stata mantenuta la metodologia dello studio di uno/pochi pazienti sottoposti ad un determinato intervento, per lunghi periodi di tempo. Si tratta di un'osservazione prolungata di un individuo in condizioni controllate, in fasi sperimentali differenti, iniziando dalla 'baseline', sempre utilizzata per operare un controllo continuativo della variabile dipendente emessa dall'individuo in maniera spontanea; quindi si utilizzano una o più variabili indipendenti consecutivamente, per inserzione od eliminazione, registrando i risultati.

Si tratta di disegni sperimentali, anche sofisticati, che privilegiano misurazioni in fasi successive delle variabili da modificare mediante il trattamento; si procede quindi con un'analisi su serie temporali, in quanto i dati che si ottengono nelle diverse osservazioni sul soggetto vengono collocati in sequenze temporalmente distinte. Pertanto, queste serie cronologiche sono sequenze di osservazioni

di una certa variabile, ordinate nel tempo e distribuite a intervalli regolari; la variabile numericamente esprime in modo quantitativo l'andamento cronologico di un fenomeno specifico. Per usare le parole di Campbell e Stanley (1996) una ricerca sulle serie temporali è: *‘ . . . caratterizzata da un processo periodico di misurazione sul singolo o pochi individui e dall'introduzione di inversioni sperimentali. I risultati vengono indicati attraverso una discontinuità nelle misurazioni registrate in serie temporali’*.

Le serie cronologiche sono sempre state utilizzate anche nelle osservazioni temporali su gruppi di individui. L'elaborazione statistica dei dati avviene sempre attraverso complessi procedimenti matematici. Tuttavia, come precedentemente osservato, le serie analizzate con gruppi di individui possono offrire una ragionevole fiducia solo se il numero delle osservazioni considerate risulta relativamente elevato. Ciò che tali osservazioni sequenziali ci permettono, è che possono essere effettuate sia su un soggetto singolo, sia su un piccolo aggregato di soggetti considerato come unità funzionale. Oggi la metodologia N=1 è considerata ampiamente un'alternativa alle sperimentazioni con gruppi, una modalità altrettanto potente e valida per esaminare le relazioni di causa ed effetto fra variabili. Questa modalità di ricerca si articola su disegni sperimentali di vario tipo, che vanno da quelli di tipo ABA e ABAB, dove la fase sperimentale A rappresenta le condizioni basali e la B il momento dell'applicazione di una variabile-stimolo indipendente. Nella pratica clinica e nella ricerca sono già stati approntati disegni molto più sofisticati che prevedono linee di base multiple, verifiche multiple, criteri multipli, trattamenti alternati. Tali procedure consentono di confermare la diretta dipendenza tra effetto osservato e stimolo imposto, minimizzando gli effetti di meccanismi (es. l'apprendimento, il carry over, etc.) od elementi interni ed esterni che solitamente mascherano il risultato; si tratta di quella variabilità di risultato osservata tra individui di un medesimo gruppo. Inoltre, queste strutture sperimentali complesse permettono talora di poter generalizzare i risultati ottenuti.

Dopo la prima fase di costituzione dello studio, si procede alle fasi consecutive di condizione ed osservazione, campionando ripetutamente, nel tempo, la variabile dipendente, oggetto di studio.

In seguito, l'analisi dei risultati può essere condotta facendo inizialmente esclusivo riferimento alla modalità visiva, esaminando cioè gli effetti di un trattamento mediante l'ispezione e valutazione di un grafico, il quale riporta i dati delle osservazioni effettuate nelle diverse fasi del trattamento stesso. Questa è una modalità rapida di verifica, e ci permette di avere un'idea dell'andamento degli effetti rilevati. L'ispezione visiva va però incontro al rischio di soggettività valutativa. Per questo motivo sono state sviluppate alcune modalità di verifica statistica che possono essere impiegate congiuntamente all'analisi visiva. Tali metodi di verifica sono necessari per la valutazione della significatività degli interventi e del problema della generalizzazione (Di Nuovo, 1992).

Tra questi il ‘test C’ o ‘statistica C’ rappresenta un buon esempio di verifica statistica nello studio su caso singolo con un numero limitato di osservazioni. Inizialmente introdotto da von Neumann (1941) e da Young (1941), il *test C* è stato recentemente ripreso da Tyron (1982) e divulgato in Italia da Caracciolo, Larcan e Cammà (1986) e Cottini (1998) nell’ambito della riabilitazioni di individui portatori di handicap mentali. Questo procedimento statistico presenta un certo numero di pregi: (1) è relativamente semplice e di facile applicazione, in quanto permette di analizzare molti tipi di dati in serie temporale senza dover ricorrere a complessi calcoli matematici; (2) non pretende un numero elevato di osservazioni: per ogni fase, si eseguono solo 8 osservazioni; (3) può essere applicato anche ai dati relativi a un solo soggetto, o a più soggetti che ricevano il medesimo trattamento terapeutico; (4) permette anche di evidenziare quando un certo tipo di condotta desiderata si sia stabilizzata, e quindi possa essere generalizzata o trasferita in altri contesti o compiti; oppure rende esplicito il momento in cui, raggiunto un risultato, si può far intervenire un altro gruppo di variabili indipendenti previste dal piano del trattamento terapeutico; (5) permette di associare all’analisi statistica anche il criterio grafico, e quindi di verificare, attraverso continui confronti, se l’andamento delle curve presenti una significatività statistica.

Attraverso il *test C* viene calcolata la probabilità che i punti di una serie temporale siano disposti a caso oppure secondo un ordine statisticamente significativo, fornendo indicazioni riguardanti il trend di un certo intervento. Se la probabilità che i punti di tale serie sono disposti a caso è limitata, si può concludere che esiste un trend significativo. Per effettuare il calcolo della significatività con il test C è necessario ricavare il valore della serie temporale con la seguente formula:

$$C = 1 - \frac{[\sum^{N-1} (X_i - X_{i+1})^2]}{[2 [\sum^N (X_i - \bar{X})^2]}$$

dove X_i rappresenta una osservazione, X_{i+1} rappresenta il valore dell’osservazione successiva e \bar{X} rappresenta la media delle osservazioni.

La formula tende a confrontare lo scarto di un punto da quello successivo in relazione alla varianza. Nel caso in cui si sta valutando l’efficacia di un trattamento farmacologico si può avere la conferma o meno che in seguito al trattamento la variabile indipendente si sia modificata. Per determinare il livello di significatività, bisogna calcolare il valore della statistica Z, la quale è distribuita normalmente fino ad un numero minimo di 8 punti. Ciò ha come conseguenza il fatto che non può essere utilizzato il “test C” quando non ci sono almeno 8 osservazioni per ogni serie di cui si vuole esaminare il *trend*. Il valore di Z si ottiene calcolando prima l’errore di C (S_c) con la formula:

$$SC = \sqrt{(N-2)/[(N-1)(N+1)]}$$

Dove N rappresenta il numero delle osservazioni e poi dividendo C per il suo errore standard

$$Z = C/Sc$$

In questo modo si arriva a determinare un valore in grado di informarci circa il livello di significatività del trend. Dalle tavole predisposte da Young (1941) si può constatare che ai valori critici del 5% il valore di Z è sempre 1.64, per l'ampiezza di campioni la cui ampiezza (N) varia da valori di 8 a 30. Per valori critici dell'1% il valore di Z varia da 2.17 (per N= 8) sino a 2.25 (per N=30).

E' necessario tenere a mente che l'ipotesi nulla non prevede la presenza di un trend significativo. L'ipotesi sperimentale è giustificata quando la serie relativa al baseline rimane stazionaria, mentre quella dell'intervento si modifica in maniera significativa. Il valore di Sc dipende interamente dalla dimensione del campione, cioè dal numero di osservazioni che caratterizza la serie temporale considerata. Più elevato sarà il valore di N, è maggiore risulterà il valore di Sc. Poiché Sc dipende da N, anche se il valore di C è molto piccolo ed il valore di N molto grande, si possono ugualmente evidenziare valori critici di Z significativi. Quindi, nonostante sia consigliabile avere un numero di osservazioni relativamente numeroso, è possibile evidenziare delle differenze anche in quelle serie temporali che, magari solo apparentemente, non sembrerebbero averne.

Il test C può anche essere applicato per la verifica dell'efficacia di un trattamento farmacologico effettuato prima con un farmaco e poi di questo in associazione con un altro (è il caso del disegno sperimentale A-B-A-BC-B). Per la sua flessibilità interna, e per la sua semplicità di calcolo, il test C può essere usato anche come test statistico inferenziale che mette a confronto una o più serie temporali fra loro, per stabilire se fra di esse si evidenziano differenze significative (Caracciolo, Larcán e Cammà, 1986).

In buona sostanza la metodologia N=1 mediante il *test C* rappresenta un'analisi matematica dell'andamento delle risposte a stimoli controllati, anche in combinazioni sofisticate; quindi è possibile sapere in ogni fase se l'andamento è sostanzialmente stabile, anche se i dati mantengono un'ampia variabilità attorno a valori medi costanti. E' possibile inoltre calcolare se ci troviamo di fronte ad un trend della serie di dati che può avere andamento positivo o negativo. L'analisi può essere condotta, inoltre, aggregando i dati delle differenti fasi/condizioni di stimolo; ciò mi permette

di evidenziare differenze significative tra i valori medi del dato osservato nelle rispettive sessioni sperimentali. Ad esempio uno studio di somministrazione farmacologica potrebbe essere condotto su un paziente AD, con anomalie comportamentali, con l'intento di osservare la variazione della frequenza dell'aggressività eterodiretta; nel caso in questione il numero di comportamenti aggressivi potrebbe risultare stabile durante l'analisi di ogni singola fase sperimentale, compreso la baseline. In questo caso l'intervento non sembrerebbe dunque efficace. Analizzando i dati in fasi aggregate tra loro, però, si potrebbe evidenziare una differenza molto significativa tra l'osservazione della frequenza media dei comportamenti aggressivi tra il basale e la fase di trattamento, a conferma di un'efficacia terapeutica. Quindi, pur nei suoi limiti, questo approccio sperimentale visivo-statistico, diviene molto potente nel corso della valutazione del singolo individuo, soprattutto se protratta nel tempo e tramite l'elaborazione di disegni sperimentali complessi. La Fig. 4 espone graficamente il concetto di N=1 e la statistica C.

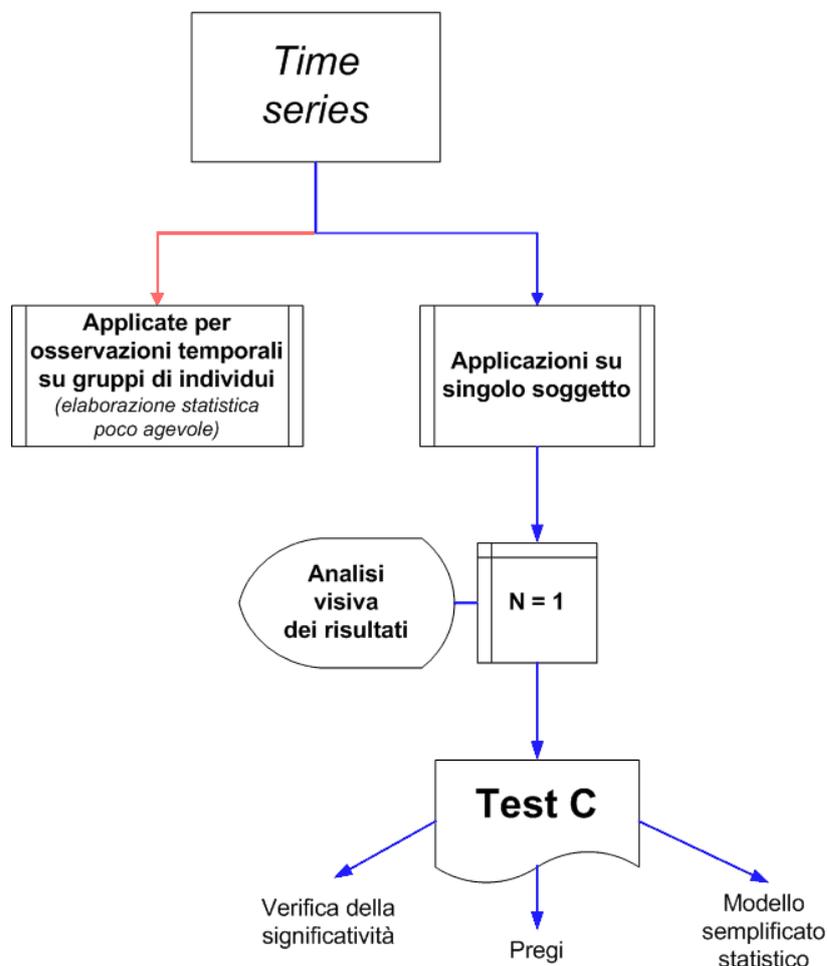


Figura. 4. Rappresentazione grafica del concetto di N=1 e di statistica C.

3. 'GOOD RESPONDER' O 'BAD RESPONDER' AL TRATTAMENTO CON ACHEI: VERIFICA N = 1

Il primo obiettivo del presente lavoro è consistito nel proporre uno strumento in grado di valutare l'effetto personalizzato delle attuali terapie sintomatiche per il deficit di memoria in soggetti con difettualità cognitiva isolata o minima (a-MCI od a+md-MCI), considerata una fase preclinica della demenza, e in pazienti AD. Un ulteriore obiettivo è quello di trasferire questo strumento di valutazione nello studio dell'efficacia individuale delle attuali terapie sintomatiche cognitive e comportamentali nel soggetto AD, considerata la sfiducia nei confronti delle attuali terapie e nell'ottica di un'ottimizzazione degli interventi proposti. Come ultimo scopo si vuole fornire un criterio diagnostico *ex-adjvantibus* per quei soggetti MCI che convertiranno verso una forma conclamata di malattia degenerativa primaria, e ciò tramite l'osservazione di una progressiva riduzione della risposta alla terapia sostitutiva per i pazienti a-MCI degenerativi, inizialmente 'good responders'

Ci si attende quindi una differenza statisticamente significativa, innanzitutto nello stesso soggetto, tra fasi differenti di trattamento; in secondo luogo, al raggiungimento di un numero adeguato di pazienti in studio, affidandoci anche alla conferma di una statistica di popolazione N= 1, ci si attende la conferma dell'efficacia anche nei confronti dei controlli sani e nei confronti di persone con un deficit soggettivo di memoria non causato da un sottostante processo degenerativo primario DAT (vascolare, psichiatrico, metabolico, degenerativo non AD e non LBD).

Dunque, in considerazione della registrazione da parte della FDA e dell'EMA degli AchE-i come farmaci per il trattamento della malattia di Alzheimer di grado lieve-moderato e dei recenti dati di letteratura sulla stretta relazione esistente tra MCI e malattia di Alzheimer ci si è proposti di valutare l'effetto di *Rivastigmina*, *Donepezil* e *Galantamina* sulla performance mnemonica di soggetti a-MCI o con AD seguiti presso l'Unità Valutativa Alzheimer dell'U.O.C. di Neurologia della Fondazione Ca' Granda Ospedale Policlinico di Milano, secondo lo schema più avanti riportato.

3.1. MATERIALI E METODI

I pazienti affetti da MCI sono stati reclutati in accordo con i criteri postulati da Petersen e collaboratori negli anni 2001-2005. I pazienti con un disturbo cognitivo isolato sono stati ulteriormente classificati in base alla possibile sottostante patologia ed in base ai domini cognitivi interessati, in modo da risultare inclusi in sottotipi pre-clinici di malattia, con una propria 'direzione' ed entità di conversione; alcune di queste categorie rappresentano un'entità diagnostica riconosciuta,

come nel caso dell'a-MCI- degenerativo. Proprio facendo riferimento alla parte dello studio riservata all'utilizzo di farmaci in fase pre-clinica di malattia, sono stati prediletti i pazienti affetti da disturbo isolato di memoria, senza un'evidente causa organica sottostante, a-MCI degenerativo, che meglio rappresentano la popolazione di persone che in minima percentuale sarebbero già affette da danno degenerativo e che con maggior probabilità convertiranno in AD nell'arco degli anni successivi. I soggetti precedentemente classificati come aMCI, sono stati ulteriormente sottoposti a una visita di screening se non effettuata entro il mese dall'inizio della terapia proposta; in tale occasione si è proceduto ad eseguire anamnesi generale e farmacologica, esame clinico e neurologico completi, TAC/RMN encefalo (se non già effettuati entro i 12 mesi precedenti l'inclusione), ECG e routine ematochimica, valutazione neuropsicologica (se non già effettuata entro i 6 mesi precedenti l'inclusione) al fine di confermare la diagnosi di MCI.

Oltre agli MCI sono stati sottoposti a verifica con N=1, un soggetto affetto da depressione, con deficit attentivo e di memoria episodica poco al di sopra dei limiti inferiori di norma (terapia serotoninergica), un paziente AD senza BPSD (trattato con terapia anticolinesterasica) e un paziente AD con BPSD (trattato con terapia neurolettica).

Per riassumere: (A) soggetti a-MCI sono stati selezionati con l'obiettivo di valutare l'effetto delle note terapie anticolinesterasiche sulla memoria verbale anterograda a lungo termine; (B) i pazienti con altre forme di MCI, disturbo soggettivo di memoria in distimia od affetti da pseudodemenza sono stati sottoposti a terapia anticolinesterasica per valutare l'effetto sulla memoria od nella modificazione dei domini affettivi; (C) i pazienti AD sono stati identificati con lo scopo di verificare l'effetto delle terapie anticolinesterasiche e neurolettiche a carico delle variabili cognitive, affettive e comportamentali.

3.2. MATERIALE STIMOLO PER LA VALUTAZIONE MNESICA

La perdita di memoria episodica anterograda costituisce solitamente il disturbo cognitivo più precoce e più grave dell'AD. I circuiti cerebrali responsabili dell'apprendimento sono relativamente colpiti in fase precoce della patologia. In particolare i due principali circuiti compromessi sono: (1) le vie nervose che collegano l'ippocampo e la regione entorinale con la rimanente corteccia, cioè vie che appartengono al tipo di circuiti con funzioni di incanalamento delle informazioni; (2) il sistema colinergico del proencefalo basale che appartiene alle regioni sottocorticali a proiezione corticale diffusa.

La valutazione neuropsicologica in accordo con il dato anatomo-funzionale documenta in fase precoce di malattia una perdita delle capacità di apprendere nuovo materiale verbale e non verbale.

In particolare la memoria episodica anterograda verbale viene testata in clinica con diversi test che si basano sulla somministrazione di brevi racconti, liste di parole o di coppie di parole.

Tenendo conto di questo deficit specifico si è pensato di utilizzare la rievocazione di liste di parole per valutare l'efficacia del trattamento farmacologico. Tali liste sono state appositamente create mediante la selezione di sostantivi presenti nel VdB (Vocabolario di Base della Lingua Italiana), in modo da formare delle liste di 15 parole diverse, bilanciate per lunghezza, categoria e frequenza d'uso. Le liste sono state create in modo da evitare che il compito di memoria risultasse per il paziente o troppo semplice (effetto soffitto) o troppo complesso (effetto pavimento). Difatti il campionario di parole preso in esame (circa 7000) si ritiene costituisca il nucleo essenziale della lingua, e non prevede le forme flesse; i termini risultano quindi essere i più frequenti od i più disponibili per il parlante la lingua italiana, che abbia completato la scuola dell'obbligo (De Mauro, 1991). Il lavoro di selezione è stato volto anche a distribuire i lemmi per frequenza d'uso in modo equilibrato e sovrapponibile per tutte le liste approntate; per suddividere quindi i 7000 termini citati sono state tratte le indicazioni sulla loro frequenza d'uso dal '*Lessico di Frequenza della Lingua Italiana Contemporanea*' (Bartolini, Tavaglini e Zampolli, 1971). Sono stati selezionati i lemmi con indice d'uso pari o superiore a 2, verificati ulteriormente tramite somministrazione ad adulti e giovani con licenza media, e quindi ulteriormente raggruppati in base al calcolo delle loro frequenze e diffusione d'uso in tre classi o Vocabolari: un Vocabolario Fondamentale (VdB1) ed un Vocabolario ad alto uso (VdB2) quest'ultimo con rango d'uso tra 2001 e 5001; i restanti lemmi del VdB costituiscono il Vocabolario ad alta disponibilità (parole pensate con grande frequenza ma dette o scritte raramente). Sono state impiegate le prime due classi del VdB: ogni lista è composta di item appartenenti al gruppo VdB1 e VdB2 (6 parole appartengono al gruppo VdB1 e 9 al VdB2). Un'altra variabile considerata è la lunghezza delle parole, così da distribuire i termini omogeneamente tra le liste e sceglierli tra classi di lunghezza breve, media (6-7 lettere) e lunga. Infine, per formare liste bilanciate per lunghezza, categoria e frequenza d'uso si è tenuto conto anche della distribuzione in 3 gruppi semantici o categorie: persone, vari ed una comprensiva di animali, natura e parti del corpo. Sono quindi state adottate 24 liste di rievocazione, costituite come precedentemente descritto, da suddividere in 3 sessioni di somministrazione. La Fig. 5 illustra l'intero paradigma.

Per quanto riguarda la valutazione delle anomalie psico-comportamentali è stata utilizzata la UCLA Neuropsychiatric Inventory (NPI. Cummings *et al.*, 1994), considerandone il punteggio complessivo con somministrazione "telefonica" trisettimanale a due differenti *caregiver* del paziente AD.

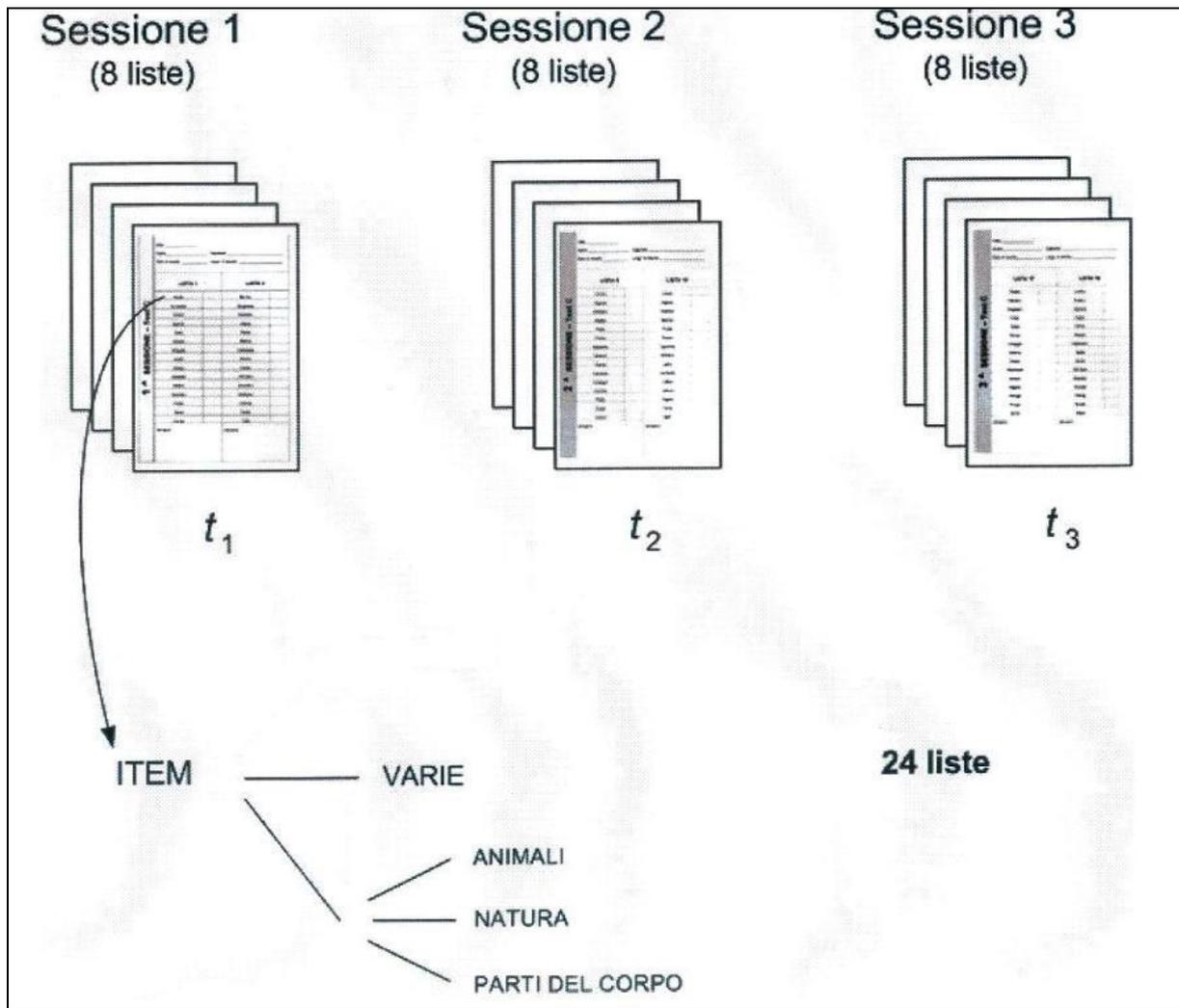


Figura. 5. Rappresentazione grafica del concetto di N=1 e di statistica C.

4. VALUTAZIONE NEUROPSICOLOGICA E TITOLAZIONE DEL FARMACO

Sono state effettuate 3 visite di valutazione e di somministrazione del test: visita *baseline* (entro 1 mese dalla visita di *screening*) in cui ai soggetti 1) erano somministrate 8 liste di parole con registrazione del numero di rievocazioni (FASE A); 2) sarà somministrata Rivastigmina in compresse da 1.5 a 6 mg (se non tollerata allora Donepezil 5 e 10 mg). I soggetti saranno trattati alla dose di farmaco più alta tollerata fino a 6 mg x 2/die, con dose iniziale di 1.5 mg x 2/die e una titolazione con incrementi di 1.5 mg/settimana. Dopo la visita di *baseline* il paziente sarà contattato settimanalmente per via telefonica allo scopo di valutare la tollerabilità del farmaco.

- Alla 8^a settimana di trattamento i soggetti venivano sottoposti ad una visita di fine trattamento (sospensione della terapia). In tale occasione ai pazienti veniva somministrata la seconda serie di 8 liste di parole (FASE B).

- Alla 10^a settimana (2 settimane di *wash out* farmacologico) i soggetti venivano sottoposti alla terza serie di 8 liste di parole (FASE A')

Nel caso della somministrazione delle terapie neurolettica e serotoninergica, queste hanno seguito lo schema di dosaggio e di posologia adottato abitualmente nella pratica clinica del nostro ambulatorio (con riferimento all'età geriatrica). Non è stata fatta selezione a priori del farmaco perché in questo caso si tratta di uno studio osservazionale.

5. DISEGNO SPERIMENTALE

Il disegno A-B-A è la forma più semplice di analisi sperimentale includente una fase di inversione. Questa metodologia si fonda su un paragone stabilito a partire dalle risposte del soggetto e, più in particolare a partire da quelle che egli emette rispettivamente prima e dopo l'introduzione della variabile indipendente. Le misurazioni ripetute costituiscono la caratteristica principale di tale metodica. In questa metodologia vi è l'accertamento del livello di base, infatti, nella maggior parte dei disegni, c'è un periodo iniziale di osservazione (detto *baseline*) in cui si osserva la naturale frequenza di comparsa del comportamento preso in esame. L'introduzione della variabile indipendente o del trattamento rappresenta e dà inizio alla fase B del disegno sperimentale. Un'altra caratteristica fondamentale della metodologia N=1 è la cosiddetta fase di inversione (fase A'). Tale fase è caratterizzata da periodi di interruzione del trattamento durante i quali si continua a monitorare il comportamento. L'ispezione visiva va incontro anche al rischio di soggettività valutativa. Per questo motivo sono state sviluppate alcune modalità di verifica statistica che possono essere impiegate congiuntamente all'analisi visiva.

La risposta al trattamento farmacologico del paziente, oltre che sull'analisi visiva dei dati disposti su un grafico, è stata valutata statisticamente attraverso l'applicazione del Test C, che consente come abbiamo detto di analizzare l'andamento di una certa caratteristica del paziente nel tempo (time series analysis). Per stabilire se tra le medie delle diverse fasi del trattamento vi sono differenze significative, o se tali differenze sono dovute al caso, si è aggregata la serie temporale di dati relativa al *baseline* con quella relativa al trattamento (B), quella relativa alla fase B con quella della fase A' e, infine la serie temporale della fase A con quella della fase A'. Si riportano infine nella tabella seguente i valori calcolati per tutte le fasi aggregate e non. Si è proceduto al calcolo dei valori C e Z come se l'insieme dei dati risultanti fosse una nuova sequenza formata da 16 valori, anziché 8.

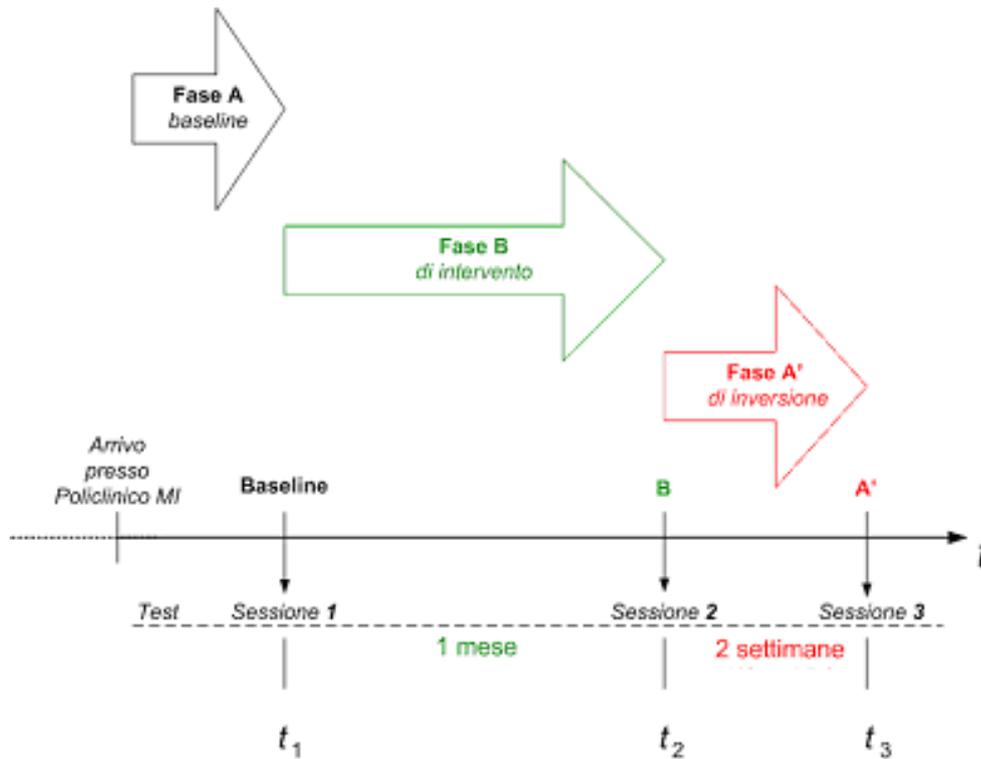


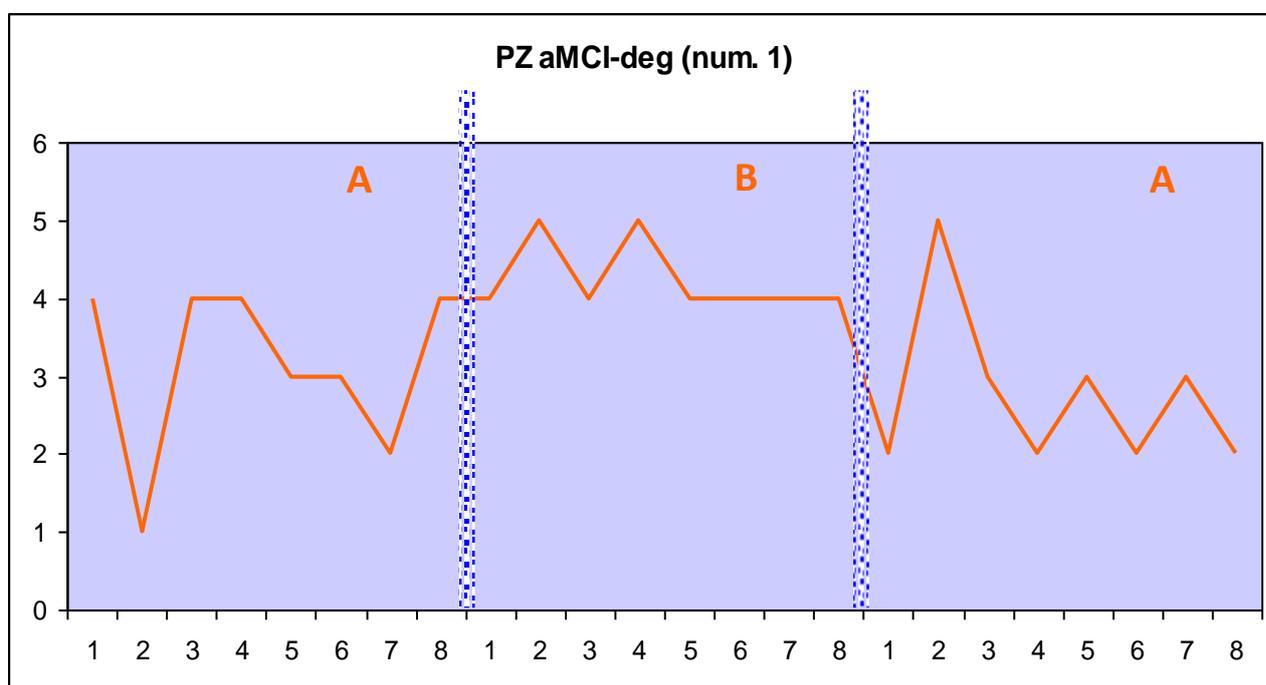
Figura. 5. Le varie fasi della sperimentazione ABA'

6. RISULTATI

Nelle pagine che seguono vengono riportati i risultati della valutazione $N=1$, mediante statistica C , nelle differenti categorie di pazienti esaminati. La risposta al trattamento farmacologico di ogni singolo paziente, oltre che sull'analisi visiva dei dati disposti su un grafico, viene valutata statisticamente. Per stabilire se tra le medie delle diverse fasi del trattamento vi fossero differenze significative, o se tali differenze fossero dovute al caso, è stata aggregata la serie temporale di dati relativa al baseline con quella relativa al trattamento (B), quella relativa alla fase B con quella della fase A' e, infine la serie temporale della fase A con quella della fase A'. Si è proceduto poi al calcolo dei valori C e Z come l'insieme dei dati risultanti fosse un'ANOVA sequenza formata da 16 valori, anziché 8.

I Paziente a-MCI degenerativo = Bad Responder (in poss. conversione)

Fase di somministrazione	Numero di parole rievocate
A	4,1,4,4,3,3,2,4
B	4,5,4,5,4,4,4,4
A'	2,5,3,2,3,2,3,2



Rappresentazione grafica delle risposte al test di rievocazione delle liste di parole.

Fase A=Baseline Fase B=Trattamento

Fase	Media	C	S _c	Z
A	3,125	0,352	0,308	1,14
B	4,25	-0,333	0,308	-1,08
A'	2,75	-0,2	0,308	0,648
AB	3,687	0,093	0,234	0,397
BA'	3,5	0,277	0,234	1,185
AA'	2,937	-0,357	0,234	-1,527

Serie temporali e loro aggregazioni: commento dell'analisi statistica dei risultati

- a. Trend fase A non significativo ($Z < Z_{critico}$) - sostanziale stabilità
- b. Trend fase B non significativo ($Z < Z_{critico}$) - sostanziale stabilità con media $>$
- c. Trend fase A' non significativo ($Z < Z_{critico}$) - sostanziale stabilità con media $<$

Confronti fra fasi aggregate

- d. Valori medi A - B: non sussistono differenze significative
- e. Valori medi B - A': non sussistono differenze significative
- f. Valori medi A - A': differenze significative al limite di significatività per casualità

Dall'analisi statistica dei risultati è emerso che:

- a) il *trend* relativo al primo *baseline* non è significativo, in quanto il valore di Z non è uguale o superiore a quello critico (1.64 per $p < 0.05$ e 2.17 per $p < 0.01$);
- b) l'introduzione del farmaco (fase B) non determina una tendenza significativamente migliore rispetto al basale della prestazione mnestica del paziente (il valore di Z trovato è infatti superiore a quello critico);

c) nella fase A' o post-trattamento il *trend* non è significativo. Il valore Z trovato è inferiore a quello critico, così come il valore medio delle risposte.

Importante al fine delle nostre conclusioni sono invece i confronti fra le serie aggregate.

I valori di C e Z, calcolati sulle serie aggregate AB e BA', non dimostrano un andamento in aumento od in salita, pertanto le differenze osservate tra le medie delle fasi considerate, risultano casuali e non significative.

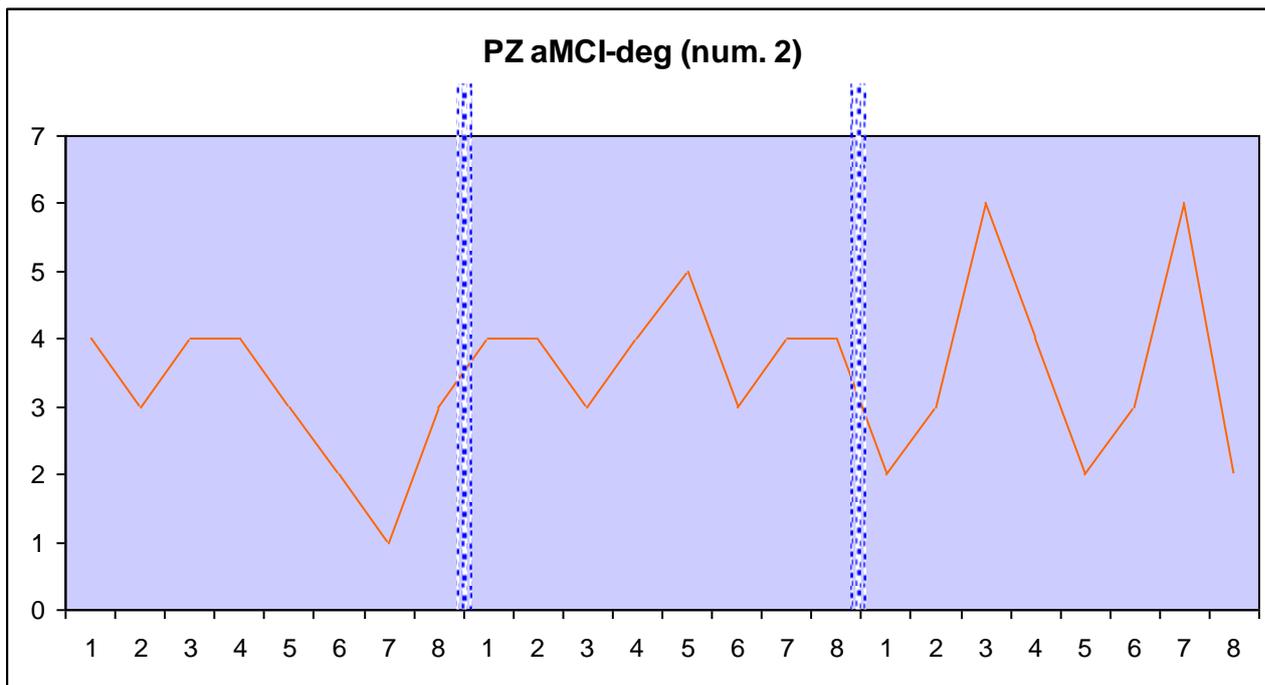
Tra la media del primo *baseline* e quella della fase di sospensione del farmaco esistono però delle differenze che raggiungono quasi il livello di significatività, come dimostra il trend delle serie aggregate A-A', con il calcolo del valore di Z (1,57 vs 1.64 per $p < 0.05$).

Tale modificazione è addebitabile, con molta probabilità, all'azione del farmaco.

Il peggioramento al limite della significatività osservato alla sospensione del farmaco può essere legato alla presenza di una sua presente ma modesta efficacia. Questo risultato, così come l'andamento di tutto il periodo di osservazione del paziente ha indotto il sospetto di una possibile fase di transizione verso una demenza di grado lieve-iniziale e pertanto ha sostenuto la decisione di procedere nuovamente ad una rivalutazione neuropsicologica completa.

II Paziente a-MCI degenerativo = Bad Responder

Fase di somministrazione	Numero di parole rievocate
A	4,3,4,4,3,2,1,3
B	4,4,3,4,5,3,4,4
A'	2,3,6,4,2,3,6,2



Rappresentazione grafica delle risposte al test di rievocazione delle liste di parole.

Fase A=Baseline Fase B=Trattamento

Fase	Media	C	S _c	Z
A	3	0,437	0,308	1,417
B	3,875	-0,391	0,308	-1,267
A'	3,5	-0,1	0,308	0,324
AB	3,437	0,354	0,234	1,511
BA'	3,687	0,194	0,234	-0,83
AA'	3.25	0,069	0,234	0,294

Serie temporali e loro aggregazioni: commento dell'analisi statistica dei risultati

- a. Trend fase A non significativo, seppur con andamento decrescente ($Z < Z_{\text{critico}}$)
- b. Trend fase B non significativo ($Z < Z_{\text{critico}}$) - sostanziale stabilità
- c. Trend fase A' non significativo ($Z < Z_{\text{critico}}$)

Confronti fra fasi aggregate

- d. Valori medi A - B: differenze significative al limite di significatività per casualità
- e. Valori medi B - A': non sussistono differenze significative
- f. Valori medi A - A': non sussistono differenze significative

Dall'analisi statistica dei risultati è emerso che:

- a) il *trend* relativo al primo *baseline* non è significativo, in quanto il valore di Z non è uguale o superiore a quello critico (1.64 per $p < 0.05$ e 2.17 per $p < 0.01$), pur presentando un andamento non completamente stabile, con tendenza al decremento;
- b) l'introduzione del farmaco (fase B) non comporta il manifestarsi di una tendenza rilevante (il valore di Z trovato è infatti inferiore a quello critico);
- c) nella fase A' o post-trattamento il *trend* non è significativo. Il valore Z trovato è inferiore a quello critico.

Importante al fine delle nostre conclusioni sono invece i confronti fra le serie aggregate.

I valori di C e Z , calcolati sulla serie aggregata AB, dimostra un *trend* di poco inferiore alla significatività ($p < 0.05$); pertanto le differenze osservate tra le medie delle fasi considerate sono anch'esse al limite della significatività.

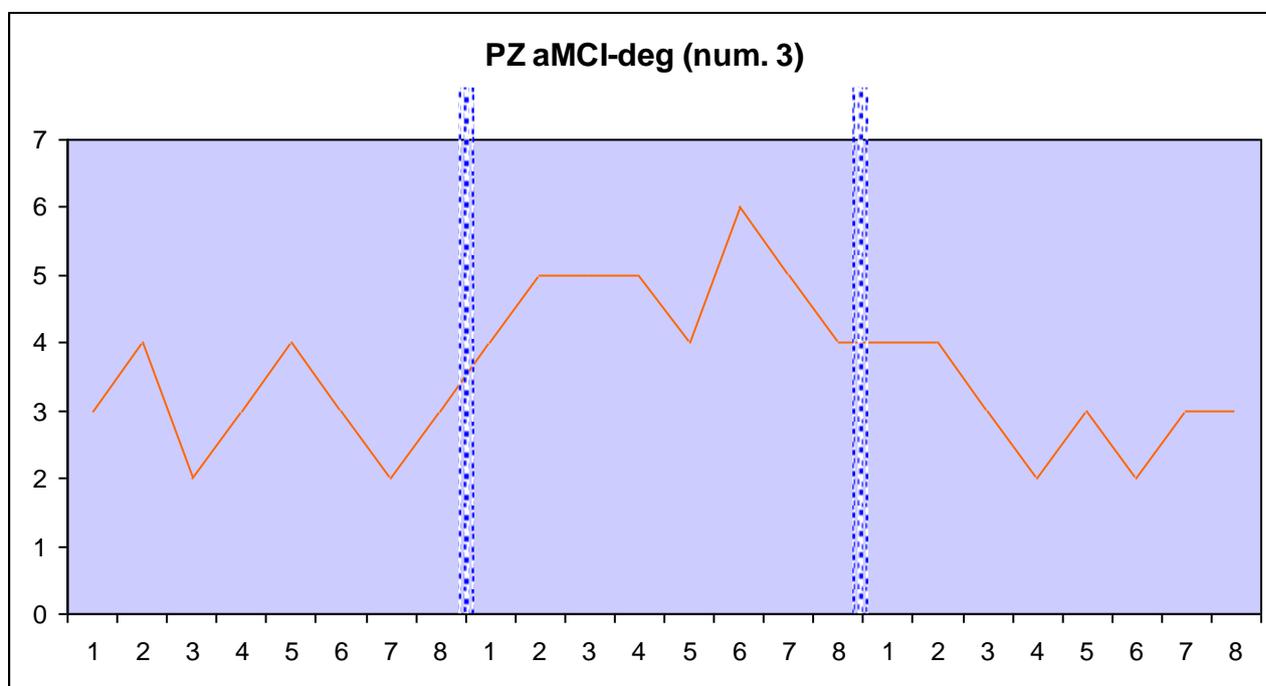
I valori di C e Z , calcolati sulle serie aggregate BA' ed AA', non dimostrano un *trend* significativo, pertanto le differenze osservate tra le medie delle fasi considerate, risultano casuali e non significative.

Tra la media del *baseline* e quella della fase di trattamento esistono quindi delle differenze che raggiungono quasi il livello di significatività, come dimostra il trend delle serie aggregate AB, con il calcolo del valore di Z (1,511 vs 1.64 per $p < 0.05$).

Tale modificazione potrebbe quindi essere imputabile all'azione del farmaco; effetto che non viene confermato dal valore medio delle prestazioni, né dall'andamento delle fasi aggregate, relativi al periodo di sospensione.

III Paziente a-MCI degenerativo = Good Responder

Fase di somministrazione	Numero di parole rievocate
A	3,4,2,3,4,3,2,3
B	4,5,5,5,4,6,5,4
A'	4,4,3,2,3,2,3,3



Fase A=Baseline Fase B=Trattamento

Fase	Media	C	S.	Z
A	3	-0,25	0,308	-0,810
B	4,75	-0,142	0,308	-0,462
A'	3	0,375	0,308	1,215
AB	3,875	0,518	0,234	2,214
BA'	3,875	0,67	0,234	2,863
AA'	3	0	0,234	0

Serie temporali e loro aggregazioni: commento dell'analisi statistica dei risultati

- a. Trend fase A non significativo ($Z < Z_{critico}$)
- b. Trend fase B non significativo ($Z < Z_{critico}$)
- c. Trend fase A' non significativo, seppur con andamento decrescente ($Z < Z_{critico}$)

Confronti fra fasi aggregate

- d. Valori medi A - B: differenze significative ($Z > Z_{critico}$)
- e. Valori medi B - A': differenze significative ($Z > Z_{critico}$)
- f. Valori medi A - A': non sussistono differenze significative

Dall'analisi statistica dei risultati è emerso che:

- a) il *trend* relativo al primo *baseline* non è significativo, in quanto il valore di Z non è uguale o superiore a quello critico (1.64 per $p < 0.05$ e 2.17 per $p < 0.01$)

b) l'introduzione del farmaco (fase B) non comporta il manifestarsi di una tendenza rilevante (il valore di Z trovato è infatti inferiore a quello critico);

c) nella fase A' o post-trattamento il *trend* non è significativo, pur presentando un andamento non completamente stabile, con tendenza al decremento;

Importante al fine delle nostre conclusioni sono invece i confronti fra le serie aggregate.

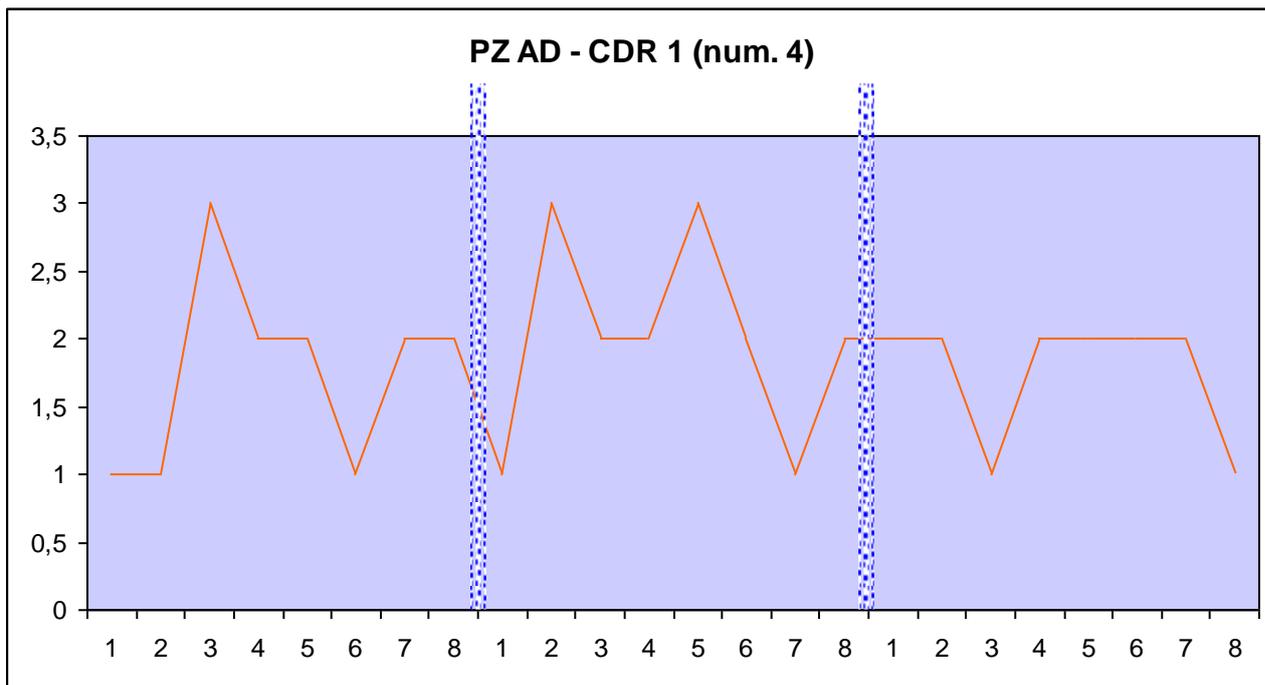
I valori di C e Z, calcolati sulle serie aggregate AB e BA', dimostrano un *trend* altamente significativo ($p < 0.01$); pertanto le differenze osservate tra le medie delle fasi considerate sono anch'esse altamente significative.

I valori di C e Z, calcolati sulla serie aggregata AA', non dimostrano un *trend* significativo, pertanto le differenze osservate tra le medie delle fasi considerate, risultano casuali e non significative.

Tra la media del *baseline* e quella della fase di trattamento esistono quindi delle differenze che raggiungono il livello di significatività $p < 0.01$, a dimostrazione di una verosimile azione positiva del farmaco a carico delle prestazioni mnestiche; la conferma giunge anche dal confronto con la terza fase sperimentale, di washout della terapia, durante il quale la media delle prestazioni torna ad abbassarsi significativamente.

IV Paziente AD (CDR1) = Bad Responder

Fase di somministrazione	Numero di parole rievocate
A	1,1,3,2,2,1,2,2
B	1,3,2,2,3,2,1,2
A'	2,2,1,2,2,2,1



Rappresentazione grafica delle risposte al test di rievocazione delle liste di parole.

Fase A=Baseline Fase B=Trattamento

Fase	Media	C	S _c	Z
A	1,75	0	0,308	0
B	2	-0,125	0,308	-0,405
A'	1,75	0	0,308	0
AB	1,875	-0,096	0,234	-0,413
BA'	1,875	-0,043	0,234	-0,185
AA'	1,75	0	0,234	0

Serie temporali e loro aggregazioni: commento dell'analisi statistica dei risultati

- a. Trend fase A non significativo ($Z < Z_{critico}$)
- b. Trend fase B non significativo ($Z < Z_{critico}$)
- c. Trend fase A' non significativo ($Z < Z_{critico}$)

Confronti fra fasi aggregate

- d. Valori medi A - B: differenze non significative ($Z > Z_{critico}$)
- e. Valori medi B - A': differenze non significative ($Z > Z_{critico}$)
- f. Valori medi A - A': differenze non significative ($Z > Z_{critico}$)

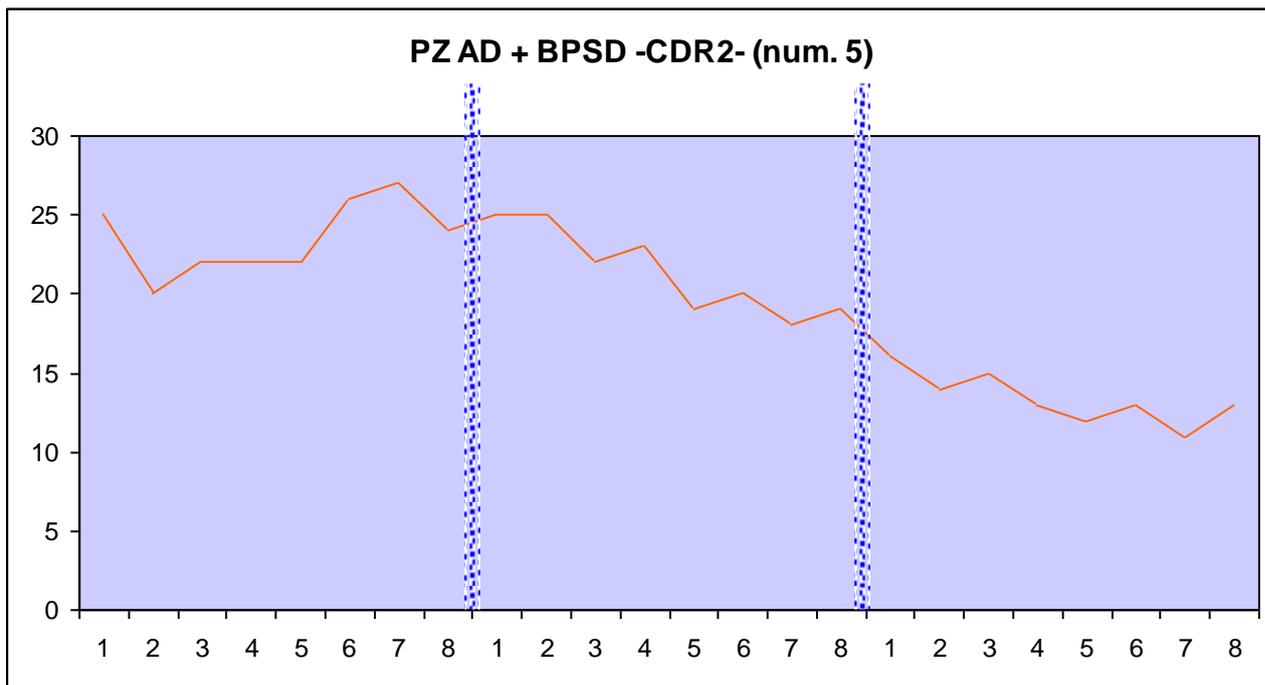
Dall'analisi statistica dei risultati è emerso che:

- il *trend* relativo a tutte le fasi di osservazione così come quello delle fasi aggregate è risultato non significativo, in quanto il valore di Z è sempre stato ampiamente inferiore a quello critico, talora pari a 0, indice di stabilità (1.64 per $p < 0.05$ e 2.17 per $p < 0.01$); pertanto anche le differenze riscontrate tra le medie non sono significative.

- in considerazione della costante stabilità l'effetto terapeutico in un paziente con malattia degenerativa progressiva potrebbe comunque risultare accettabile; una tale conclusione deve essere correlata al tempo di osservazione che nel nostro caso è discutibilmente limitato (8 settimane).

V Paziente AD + BPSD = Good Responder

Fase di somministrazione	Numero di parole rievocate
A	25,20,22,22,22,26,27,24
B	25,25,22,23,19,20,18,19
A'	16,14,15,13,12,13,11,13



Rappresentazione grafica delle risposte al test di rievocazione delle liste di parole.

Fase A=Baseline Fase B=Trattamento

Fase	Media	C	S.	Z
A	23,5	0,312	0,308	1,012
B	21,375	0,703	0,308	2,278
A'	13,375	0,468	0,308	1,518
AB	22,437	0,606	0,234	2,59
BA'	17,375	0,908	0,234	3,877
AA'	18,437	0,852	0,234	3,638

Serie temporali e loro aggregazioni: commento dell'analisi statistica dei risultati

- a. Trend fase A non significativo ($Z < Z_{\text{critico}}$)
- b. Trend fase B significativo ($Z > Z_{\text{critico}}$)
- c. Trend fase A' non significativo ($Z < Z_{\text{critico}}$)

Confronti fra fasi aggregate

- d. Valori medi A - B: differenze significative ($Z > Z_{\text{critico}}$)
- e. Valori medi B - A': differenze molto significative ($Z > Z_{\text{critico}}$)
- f. Valori medi A - A': differenze molto significative ($Z > Z_{\text{critico}}$)

In questo paziente, al contrario dei precedenti, durante la fase A' è stata continuata la somministrazione della terapia, in quanto indicata ed efficace per i disturbi dell'asse affettivo.

Dall'analisi statistica dei risultati è emerso che:

- il trend relativo alla fase B esiste ed è significativo, in quanto il valore di Z è inferiore a quello critico (2.17 per $p < 0.01$); nelle restanti fasi l'andamento della variabile appare sostanzialmente stabile.

Importante al fine delle nostre conclusioni sono invece i confronti fra le serie aggregate.

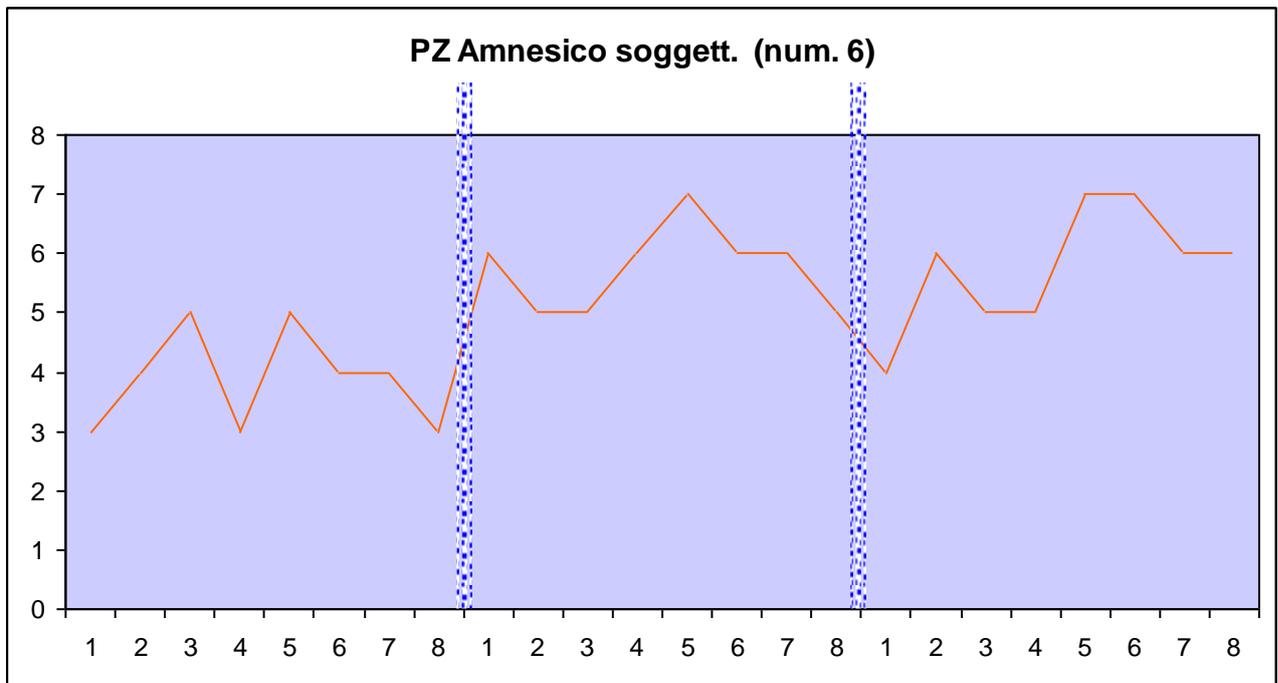
I valori di C e Z , calcolati sulle serie aggregate AB, BA' ed AA' dimostrano tutte un trend altamente significativo ($p < 0.01$); ciò indica che le differenze osservate tra le medie delle fasi considerate sono anch'esse altamente significative.

In questo caso la variabile indipendente (farmaco) ha mostrato, quando introdotta, di modificare il trend della fase corrispondente e di mantenere un effetto significativo e costante nel modificare le medie delle osservazioni. L'analisi della fase A' suggerisce una stabilizzazione dei valori osservati.

A conferma dell'effetto sintomatico o potenzialmente non-sintomatico del farmaco ulteriori osservazioni verranno condotte alla riduzione o sospensione dello stesso.

VI Paziente Deficit soggettivo Memoria in distmia = Good Responder

Fase di somministrazione	Numero di parole rievocate
A	3,4,5,3,5,4,4,3
B	6,5,5,5,7,6,6,5
A'	4,6,5,5,7,7,6,6



Rappresentazione grafica delle risposte al test di rievocazione delle liste di parole.

Fase A=Baseline Fase B=Trattamento

Fase	Media	C	S.	Z
A	3,875	-0,23	0,308	-0,747
B	5,75	0,285	0,308	0,925
A'	5,75	0,333	0,308	1,080
AB	4,812	0,420	0,234	1,795
BA'	5,75	0,272	0,234	1,163
AA'	4,812	0,565	0,234	2,411

Serie temporali e loro aggregazioni: commento dell'analisi statistica dei risultati

- g. Trend fase A non significativo ($Z < Z_{critico}$)
- h. Trend fase B non significativo ($Z < Z_{critico}$)
- i. Trend fase A' non significativo ($Z < Z_{critico}$)

Confronti fra fasi aggregate

- j. Valori medi A - B: differenze significative ($Z > Z_{critico}$)
- k. Valori medi B - A': differenze non significative ($Z < Z_{critico}$)
- l. Valori medi A - A': differenze significative ($Z > Z_{critico}$)

Anche in questo paziente durante la fase A' è stata continuata la somministrazione della terapia, in quanto indicata ed efficace per i disturbi dell'asse affettivo.

Dall'analisi statistica dei risultati è emerso che:

- il *trend* relativo alle tre fasi osservazionali non è risultato significativo, in quanto il valore di Z non è uguale o superiore a quello critico (1.64 per $p < 0.05$ e 2.17 per $p < 0.01$)

Importante al fine delle nostre conclusioni sono invece i confronti fra le serie aggregate.

I valori di C e Z , calcolati sulle serie aggregate AB ed AA' , dimostrano un *trend* statisticamente significativo (il primo per $p < 0.05$, il secondo per $p < 0.01$), a dimostrazione dell'effetto dell'intervento operato; le differenze osservate tra le medie delle fasi considerate sono quindi anch'esse altamente significative.

I valori di C e Z , calcolati sulla serie aggregata BA' , non dimostrano un *trend* significativo, pertanto le differenze osservate tra le medie delle fasi considerate, risultano casuali, a dimostrazione della persistenza dell'effetto dell'intervento operato e continuativo.

In questo caso, per ottenere una conferma dell'utilità dell'intervento effettuato a carico della variabile considerata (memoria) e per comprendere le caratteristiche e le condizioni della risposta, il paziente dovrà essere osservato anche in successive fasi di incremento della posologia e fisiologica sospensione dell'intervento (dopo un periodo di tempo sufficiente al trattamento del quadro affettivo).

7. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

In questo lavoro ci si è proposti di valutare l'efficacia di un trattamento farmacologico nella fase preclinica e nell'AD conclamato, utilizzando un procedimento statistico sul caso singolo, e non solo una valutazione empirica basata sull'impressione visiva su dati ottenuti in diversi momenti. Il modello statistico scelto, il test C, può essere applicato a tutti i possibili dati delle serie temporali che si riferiscano a risultati clinici o sperimentali relativi ad un solo soggetto, e rappresenta un modello semplice di disegno con $N=1$.

Il metodo è stato applicato a sei soggetti afferenti all'UVA del Centro per la Diagnosi e la Terapia dei Disturbi Cognitivi e della Memoria del Policlinico di Milano, in particolare 3 soggetti aMCI di supposta natura degenerativa, 2 pazienti AD, uno di gravità moderata con BPSD, l'altro senza BPSD e con forma lieve-iniziale di malattia; infine un paziente con disturbo soggettivo di memoria affetto da deflessione del tono dell'umore.

I risultati ottenuti consentono di affermare che una risposta farmacologica è risultata presente in tre dei sei soggetti esaminati:

- una risposta positiva si è osservata in uno dei soggetti aMCI, testimoniata da un miglioramento statisticamente significativo della sua prestazione mnemonica.
- i risultati degli altri due pazienti MCI, con forma amnesica pura, invece, non hanno dimostrato un miglioramento statisticamente significativo della prestazione mnemonica, benché nel primo di questi, la sospensione del farmaco abbia determinato un peggioramento della prestazione poco al di sotto del livello di significatività (per $p < 0.05$).
- non vi sarebbe stata alcuna risposta nel trattamento del paziente AD con la terapia anticolinesterasica, in quanto l'andamento delle risposte è sempre rimasto pressoché stabile nel tempo; si potrebbe allora interpretare tale dato come una risposta positiva al farmaco in quanto il trend atteso per un paziente con demenza degenerativa è negativo (purtroppo il tempo di osservazione è troppo limitato per questa generalizzazione).
- una risposta altamente significativa è stata inoltre osservata nel trattamento continuativo del soggetto AD con BPSD in terapia neurolettica e nel soggetto con deficit soggettivo di memoria, posto in terapia serotoninergica (ciclo di 4-6 mesi); per questi pazienti la fase A' non è stata caratterizzata dalla sospensione del farmaco.

Nel soggetto a-MCI, se ben applicate le più recenti procedure e gli attuali strumenti di classificazione, proprio in considerazione del rischio tempo-correlato di conversione in AD, potrebbe essere giustificato utilizzare farmaci atti a contrastare il disturbo addotto, anche con terapie sintomatiche pure (come gli anticolinesterasici).

Il miglioramento consistente del deficit di memoria episodica in un soggetto che soffre esclusivamente di una forma a-MCI pura, potrebbe già essere un obiettivo da ricercare.

In tal caso l'intento non è quello di creare una nuova indicazione di utilizzo per un farmaco, ma è quello di migliorare il disturbo di uno o più funzioni corticali in quel singolo soggetto, a prescindere dall'effetto non sintomatico a carico della patogenesi, e a prescindere dalla ripetibilità negli altri pazienti.

Ovviamente l'effetto va ricercato tramite un principio attivo di cui sia ben noto l'effetto farmacodinamico a carico delle reti neuronali costituenti il substrato di quelle stesse funzioni cognitive (non si vuole proporre di utilizzare una qualsiasi sostanza a prescindere dal legame della stessa con i meccanismi funzionali da stimolare). Un altro possibile impiego potrebbe anche essere quello di verificare la riproducibilità del dato di efficacia sul deficit mnemonico in tutti i pazienti a-MCI puri degenerativi; in tal caso, con, un numero adeguato di soggetti, sarà sufficiente condurre un'analisi tra gruppi di trattamento, e in tal modo sarà anche possibile creare un'indicazione aggiuntiva per nuove e datate terapie.

Sempre relativamente al quadro MCI, conducendo nel lungo periodo studi N=1 e quindi un'analisi tra gruppi di trattamento, qualora si osservasse una stabilità dei dati di efficacia terapeutica nel tempo, si potrebbe concludere che un determinato principio attivo ha presentato un'attività positiva diretta nei confronti dei meccanismi patogenetici degenerativi. Per quanto riguarda i pazienti AD invece, i risultati ottenuti consentono di affermare che una risposta farmacologica alle terapie anticolinesterasiche potrebbe essere testimoniata anche dalla stabilità della prestazione mnemonica, almeno per un periodo congruo di tempo. Inoltre, la metodica ha confermato il rilevante beneficio osservato nel trattamento neurolettico di un paziente AD con BPSD. La procedura qui presentata, per la sua facile applicabilità, potrebbe costituire una metodica routinaria di facile utilizzo nell'ambito della valutazione del trattamento farmacologico nell'AD; una metodica ripetibile e necessaria per ottimizzare e confermare il trattamento dei disturbi del paziente demente e, aspetto ancor più importante, di quel preciso paziente. I costi di una somministrazione poco selettiva e di scarsa efficacia di un farmaco antidemenza o di un farmaco neurolettico potrebbero risultare intollerabili per il sistema sanitario nazionale, anche in considerazione dell'aumento esponenziale dei casi di AD. Il poter stabilire che un paziente beneficia, e un altro no, di un determinato trattamento farmacologico, può risultare utile al fine di razionalizzare la spesa sanitaria relativa ai

costosissimi farmaci per il deterioramento cognitivo. Sino ad ora è apparso arduo misurare l'efficacia di una terapia anticolinesterasica e la sua durata, tanto quanto verificare la riproducibilità di tale dato. Si tratta di effettuare valutazioni e di intervenire su sistemi funzionali già compromessi, in corso di involuzione progressiva, che possiedono quindi una caratteristica intrinseca di elevata eterogeneità e variabilità. Le malattie dementi sono differenti per meccanismo patogenetico sottostante; la stessa AD possiede gradi e modalità di progressione variabile. Ad esempio ci si aspetterà un vantaggio terapeutico diverso in base al fatto che il danno cerebrale, a parità di gravità, risulti stabile o di carattere progressivamente ingravescente. In considerazione del sovrapporsi delle architetture neuronali e recettoriali funzionali, che possiedono normalmente una distribuzione complessa e specifica, è plausibile osservare risposte differenti od assenti a farmaci che già abitualmente operano in maniera troppo omogenea nel cervello, e con attività limitata. Lo stesso substrato interessato, il SNC, possiede una variabilità di funzionamento connessa alle proprietà di plasticità neuronale ed alle sottili differenze di sistemi analoghi tra individui differenti (variabilità delle combinazioni neuronali). Non dobbiamo meravigliarci, quindi, se si ottengono risultati diversi nell'utilizzo della terapia sostitutiva in questi pazienti ("selezionati" solo in apparenza in base all'identico interessamento cortico-sottocorticale, come grado, numero o patogenesi, delle alterazioni). Un compromesso tra l'uso indiscriminato degli anticolinesterasici ed il completo rifiuto di questa classe di farmaci, potrebbe essere il considerare altre misure di efficacia di tali terapie, ad esempio in termini di miglioramento della qualità di vita del paziente e di quella della sua famiglia, oppure il 'personalizzare la cura' identificando metodi di valutazione dell'effetto ricercato, sia esso anche il beneficio di memoria. In base alle considerazioni precedenti la proposta più utile è quella di studiare gli effetti sul singolo individuo, anche tramite l'ausilio di procedure statistiche, con obiettivi specifici e con la possibilità di variare gli interventi in base alla variabilità intrinseca del sistema in degenerazione. In tal modo i farmaci studiati dimostrerebbero una maggiore utilità a carico di sintomi anche eterogenei nei vari pazienti, piuttosto che un'efficacia a lungo termine a carico di singole e mirate performance cognitive quali il deficit di memoria episodica.

Per concludere, la procedura qui presentata, per la sua facile applicabilità, potrebbe costituire una metodica routinaria di facile utilizzo nell'ambito della valutazione di un trattamento farmacologico dell'AD. I costi di una somministrazione senza beneficio di un farmaco antidemenza potrebbero risultare intollerabili da parte del sistema sanitario nazionale, anche in considerazione dell'aumento esponenziale di casi di AD. Il poter stabilire che un paziente beneficia, e un altro no, di un determinato trattamento farmacologico può risultare utile al fine di razionalizzare la spesa sanitaria relativamente ai costosissimi farmaci per il deterioramento cognitivo e comportamentale.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders (IV ed.) Washington, DC, American Psychiatric Association, 1994.

Andreasen N, et al.. Cerebrospinal fluid tau and abeta42 as predictors of development of Alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment. *Neurosci Lett* 1999;273: 5-8.

Arai H, et al.. CSF phosphorylated tau protein, and mild cognitive impairment: a prospective study. *Exp Neurol* 2000;166:201-203.

Bachman DL, Wolf PA, Linn RT, Knoefel JE, Cobb JL, Belanger AJ, D'Agostino RB, White LR. Prevalence of dementia and probable senile dementia of the Alzheimer type in the Framingham study. *Neurology* 1992;42:115-119.

Bianchetti A, Geroldi C, Trabucchi M. La malattia di Alzheimer in Italia: qualità e costi dell'assistenza. Milano, Science Adv 1998.

Bianchetti A, Govoni S. Aspetti genetici della malattia di Alzheimer. *Alzheimer Update* 1997;5(1): 55-65.

Blomberg M. Cerebrospinal fluid tau levels increase with age in healthy individuals. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2001;12:127-32.

Borchelt DR, et al.. Familial Alzheimer's disease linked presenilin 1 variants elevate A-beta 1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo. *Neuron* 1996;17: 1005 -1013.

Bozze delle Linee Guida per il trattamento dell'AD del "National Institute for Clinical Excellence", 2005.

Caracciolo E, Larcan R, Cammà M. (1986). Il <<test C>> : un modello statistico per l'analisi clinica e sperimentale di dati in serie temporali relativi ad un soggetto singolo (N=1). *Bollettino di Psicologia Applicata*, 175, 41-52.

Trabucchi, M. (2002). *Demenze* (3° ed.). UTET.

Cavallo MC, Fattore G. (1997). The economic and social burden of Alzheimer Disease on Families in the Lombardy Region of Italy. *Alzheimer Disease and Associated Disorders*, 4: 184-190.

Corey-Bloom, J. (2004) Alzheimer's disease, in *Dementia*. Continuum, Lifelong Learning. *Neurology*, 10, 29-51.

Cummings JL, Mega M, Gray K, Rosenberg-Thompson S, Carusi DA, Gornbein J. NPI - UCLA: Neurology 1994;44:2308-2314).

De Mauro T. (1991). Guida all'uso delle parole. (2^a ed.). Editori Riuniti Roma.

DeCarli C. Mild cognitive impairment: prevalence, prognosis, aetiology, and treatment. Lancet Neurol. 2003 Jan;2(1):15-21.

Doody RS, Stevens JC, Beck C et al. Practice parameter: management of dementia (an evidence-based review). Neurology 2001; 56: 1154-66.

Dubois, B., Feldman, H.H., Jacova, C., Dekosky, S.T., Barberger-Gateau, P., Cummings, J.L., Delacourte, A., Galaska, D., Gauthier, S., et al. (2007). Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria. Lancet Neurology, 6, 734-746.

Dubois, B., Feldman, H.H., Jacova, C., Cummings, J.L., Dekosky, S.T., Barberger-Gateau, P., Delacourte, A., Frisoni, G., Fox, N.C. et al. (2010). Revising the definition of Alzheimer's disease: a new lexicon. Lancet Neurology, 9, 118-1127.

Erten-Lyons, D., Woltjer, R.L., Dodge, H., Nixon, R., Vorobik, R., Calvert, J.F., Leahy, M., Montine, T., e Kaye, J. (2009). Factors associated with resistance to dementia despite high Alzheimer disease pathology. Neurology, 72, 354-360.

Ferri, C.P., Prince, M., Brayne, C., Brodaty, H., Fratiglioni, L., Ganguli, M., Hall, K., Hasegawa, K., Hendrie, H., et al. (2005). Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. Lancet, 366, 2112-2117.

Fisher, R.A. (1925). *Statistical methods for research workers*. Oliver & Boyd, Edinburgh.

Galluzzi, S., Geroldi, C., Ghidoni, R., Paghera, B., Amicucci, G., Bonetti, M., Zanetti, O., Cotelli, M., Gennarelli, M., Frisoni, G.B. (2010). The new Alzheimer's criteria in a naturalistic series of patients with mild cognitive impairment. Journal of Neurology, 257, 2004-2014.

Hogan DB, Patterson C. "Progress in clinical neurosciences: Treatment of Alzheimer's disease and other dementias--review and comparison of the cholinesterase inhibitors" Can J Neurol Sci. 2002 Nov;29(4):306-14.

Kazdin, A.E. (1982). *Single-case research designs. Methods for clinical and applied settings*. Oxford University Press.

Langa KM, Chernew ME, Kabeto MU, Herzog AR, Ofstedal MB, Willis RJ, Wallace RB, Mucha LM, Straus WL, Fendrick AM. National estimates of the quantity and cost of informal caregiving for the elderly with dementia. *Journal of General Intern Med* 2001; 16:770-778.

Lobo A, Saz P, Marcos G, Dia JL, De-la-Camara C. (1995). The prevalence of dementia and depression in the elderly community in a southern European population. The Zaragoza Study. *Archives of General Psychiatry*, 52:497-506.

Maggi, S. (1999). CNR-PFInvecchiamento. Congresso Nazionale SIGG, Napoli 11-14 Novembre 1999.

Marra, C. (2010). Predittori neuropsicologici di conversion in demenza nel MCI. *ADnet*, 4, 15-20.

Mayeux, R. (2010). Early Alzheimer's disease. *The New England Journal of Medicine*, 362, 2194-2201.

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 Service Task Force on Alzheimer's disease. *Neurology* 1984;34:939-944.

Morris JC, Storandt M, Miller JP et al.. "Mild cognitive impairment represents early-stage Alzheimer disease" *Arch Neurol*. 2001 Mar;58(3):397-405.

Naruse S, et al.. Effects of PS1 deficiency on membrane protein trafficking in neurons. *Neuron* 1998;21: 1213-1221.

Neary et al.. Frontotemporal lobar degeneration: a consensus on clinical diagnostic criteria. *Neurology* 51: 1546-1554.

Nukina N, Ihara Y. One of the antigenic determinants of paired helical filaments is related to tau protein. *J Biochem* 1986;99: 1541-1544.

Oksengard A.R., L. Cavallin L., Axelsson, R., Andersson C., Nägga, K., Winblad, B., Eriksdotter-Jönhagen M e Wahlund L.O. (2010). Lack of accuracy for the proposed 'Dubois Criteria' in Alzheimer's disease : a validation study from the Swedish brain power initiative. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*, 30, 374-380.

- Perneczky, R., Wagenpfeil, S., Lunetta, K.L., Cupples, A., Green., R.C., DeCarli, C., Farrer, L.A., e Kurz, A. (2009). Education attenuates the effect of medial temporal lobe atrophy on cognitive function in Alzheimer's disease : the MIRAGE study. *Journal of Alzheimer's Disease*, 17, 855-862.
- Petersen, R.C., Doody, R., Kurz., et al. (2001). Current concepts in mild cognitive impairment. *Archives of Neurology*, 58:1985-1992.
- Petersen, R.C., Smith, G.E., Waring, S.C., et al. (1999). Mild cognitive impairment: clinical characterization and outcome. *Archives of Neurology*, 56, 303-308.
- Petersen, R.C. (2004). Mild Cognitive Impairment as a diagnostic entity. *J Int Med*, 256:183-194.
- Polvikoski T, et al.. Apolipoprotein E, dementia, and cortical deposition of β -amyloid protein. *N Engl J Med* 1995;333: 1242-1247.
- Quertful, H.W., e LaFerla, F.M. (2010). Alzheimer's Disease. *The New England Journal of Medicine*, 362, 329-344.
- Rocca WA, Amaducci L. Epidemiology of alzheimer's disease. *neuroepidemiology: a tribute to Bruce Schoenberg*. Crc press Inc, Boca Raton, Florida, 1991.
- Rocca WA, Bonaiuto S, Lippi A, et al.. Prevalence of Clinically Diagnosed Alzheimer's Disease and other Dementing Disorders: a door-to-door. Survey in Appignano, Macerata, Italy. *Neurology* 1990; 40:626-631.
- Scafato, E., Galluzzo, L., Ghirini, S., Farchi, G., e Gandin, C. (2010). Prevalenza del deficit cognitivo in assenza di demenza in Italia: studio IPREA (Italian Project on the Epidemiology of Alzheimer's disease). Atti del 4° Convegno 'Il contributo delle Unità di Valutazione Alzheimer (UVA) nell'assistenza dei pazienti con demenza. Istituto Superiore della Sanità, Roma, 12 novembre 2010.
- The Italian Longitudinal Study on Aging. Prevalence of chronic diseases in older Italians: comparing self-reported and clinical diagnoses. *International Journal of Epidemiology* 1997; 26:995-1002.
- Tyron WW, A simplified time-series analysis for evaluating treatment interventions. *Journal of Applied Behavior Analysis* 1982. 15 :423-429.
- Von Neuman J, Distribution of the ratio of the mean square successive difference to the variance. *Annals of Mathematical Statistics*, 1941;12 :367-395.

Von Neuman J, Kent RH, Bellinson HR, Hart BJ, The mean successive difference. *Annals of Mathematical Statistics*, 1941;12 :153-162.

Whitehouse PJ. Genesis of Alzheimer. *Neurology*, 1997; 48: 2-7.

Wood JG, et al.. Neurofibrillary tangles 1986;83: 4040-4043.

Yamauchi K, et al.. Apolipoprotein E in cerebrospinal fluid: relation to phenotype, and plasma apolipoprotein E concentrations. *Clin Chem* 1999;45:497-504.