

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO

Dipartimento di Scienze Cliniche e di Comunità

Corso di Dottorato in Scienze Fisiopatologiche
Neuropsicobiologiche e Assistenziali del Ciclo della Vita

- *CICLO XXVI* -



IL RECETTORE ADENOSINICO A_{2A} COME POSSIBILE BIOMARCATORE NELLA DIAGNOSI DIFFERENZIALE DELLE DEMENZE NELL'ANZIANO

Tesi di Dottorato di Ricerca di:
GUSSAGO CRISTINA
Matricola n° R09081

Tutor: Prof.ssa Daniela Mari

Coordinatore del Dottorato: Prof. Roberto Weinstein

Anno Accademico 2012/2013

INDICE

• RIASSUNTO.....	2
• INTRODUZIONE.....	5
La malattia di Alzheimer.....	5
Il decadimento cognitivo lieve.....	32
La demenza vascolare.....	36
La demenza mista.....	49
La ricerca di marcatori periferici.....	51
Il recettore adenosinico A_{2A}	53
• SCOPO DEL LAVORO.....	68
• MATERIALI E METODI.....	70
Disegno dello studio.....	70
Isolamento di cellule mononucleate periferiche.....	72
Espressione genica dell' $A_{2A}R$	73
Espressione proteica dell' $A_{2A}R$	77
Estrazione del DNA genomico.....	80
Analisi del genotipo dell'Apolipoproteina E.....	82
Analisi statistica.....	84
• RISULTATI.....	85
Caratteristiche dei soggetti arruolati nello studio.....	85
Espressione del recettore A_{2A} nei PBMCs.....	86
Genotipo dell'Apolipoproteina E.....	88
• DISCUSSIONE.....	90
• BIBLIOGRAFIA.....	97

RIASSUNTO

Il termine demenza definisce un disturbo delle funzioni intellettive, acquisito e di natura organica, cronico e progressivo, caratterizzato da una compromissione della memoria e da almeno una delle seguenti alterazioni cognitive: afasia, aprassia e agnosia. Per poter parlare di demenza questi deficit devono essere sufficientemente gravi da provocare un'interferenza significativa nell'attività lavorativa e nelle relazioni interpersonali e devono rappresentare un declino rispetto alla condizione di vita precedente all'insorgere della malattia.

La malattia di Alzheimer (AD) è una tra le più comuni malattie neurodegenerative e rappresenta circa il 55% di tutti i casi di demenza. Ha un esordio prevalentemente senile e prognosi infausta. La prevalenza dei casi raddoppia ogni 5 anni dopo i 65 anni, fino a raggiungere valori di oltre il 20% al di sopra degli 85 anni. L'allungarsi dell'aspettativa di vita, soprattutto nei paesi industrializzati, incrementa l'incidenza di AD, richiedendo un investimento sempre maggiore di risorse economiche. La diagnosi di AD necessita di un approccio multidisciplinare che utilizza una combinazione di criteri clinici diagnostici sensibili e specifici e di marcatori biochimici che permettano il riconoscimento della malattia fin dal suo esordio. Il continuo e drammatico aumento dell'incidenza dell'AD e la mancanza di terapie efficaci stanno sempre più stimolando la ricerca verso strategie che ne prevengano/ritardino l'esordio e la progressione.

La Demenza Vascolare (VaD) è la seconda causa di demenza, dopo l'AD, soprattutto nella popolazione anziana. Con il termine VaD si intendono tutte le forme di deterioramento mentale secondarie ad un'encefalopatia su base ischemica o emorragica. La possibilità di una concomitante presenza di AD e componenti vascolari spesso confonde la relazione fra le malattie cerebrovascolari e la VaD. Ad oggi, ancora

non si è data risposta alla domanda se l'AD e la VaD siano patologie coesistenti ma non correlate, o se siano, invece, il risultato di meccanismi patologici sinergici.

L'intento del nostro studio è individuare la presenza di un marcatore in cellule periferiche facilmente reperibili quali ad esempio le cellule periferiche del sangue (*Peripheral Blood Mononuclear Cells* - PBMCs) per ottenere informazioni con valenza diagnostica e prognostica.

Tali cellule si sono mostrate candidati ideali per lo studio periferico della neurodegenerazione cerebrale: i dati finora ottenuti evidenziano infatti come esse subiscano modificazioni peculiari nei pazienti con AD, VaD e con decadimento cognitivo lieve (MCI).

Nei PBMCs di AD, VaD, MCI e soggetti controllo (CT) sono state analizzate l'espressione genica e la densità recettoriale del recettore adenosinico A_{2A} (A_{2A}R) in quanto tale recettore è in grado di modulare la risposta infiammatoria sia a livello periferico che centrale e sembra essere implicato, a livello del sistema nervoso centrale, nella neuroprotezione e nella regolazione della trasmissione sinaptica.

Dal nostro studio emerge come nei PBMCs alcuni meccanismi siano alterati fin dalle fasi prodromiche della malattia, in particolare negli MCI di tipo amnesico (aMCI). Abbiamo infatti evidenziato una maggiore espressione dell'A_{2A}R nei PBMCs di pazienti con aMCI rispetto a soggetti con AD, VaD e ai CT.

Tali dati confermerebbero l'ipotesi secondo cui l'attivazione dell'infiammazione preceda gli eventi neurodegenerativi.

Abbiamo inoltre riscontrato una differente espressione del recettore nei PBMCs degli AD e dei VaD, a dimostrazione di un diverso ma ugualmente importante ruolo dell'A_{2A}R in queste due forme di demenza.

Questi dati supportano l'ipotesi di poter utilizzare i PBMCs come laboratorio periferico per lo studio di meccanismi patogenetici finora ritenuti confinati al sistema nervoso centrale e la possibilità di

utilizzare l'A_{2A}R come biomarcatore periferico nella diagnosi differenziale fra AD e VaD.

INTRODUZIONE

LA MALATTIA DI ALZHEIMER

Definizione

La malattia di Alzheimer (Alzheimer's disease, AD) è un disordine neurodegenerativo che si manifesta con un progressivo decadimento cognitivo associato a perdita dell'autonomia funzionale.

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

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

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

L'AD autosomica dominante colpisce almeno tre individui di una stessa famiglia in due o più generazioni, con due dei soggetti malati parenti di primo grado del terzo (per esempio, nonno, padre e figlio); questa forma, che rappresenta meno del 5% dei casi di AD, è quasi

sempre ad esordio precoce. Inoltre, in più del 50% dei casi sono presenti difetti genetici (mutazione della presenilina 1 e 2 e dell'*Amyloid Precursor Protein* - APP).

La variante di AD familiare colpisce più di un individuo di una stessa famiglia e almeno due dei soggetti malati sono parenti al massimo di terzo grado; essa rappresenta il 15-25% dei casi di AD. Nella metà dei casi, si manifesta come LOAD (25% dei casi di AD ad esordio tardivo), mentre nell'altra metà come EOAD.

La variante di AD sporadica è caratterizzata dalla presenza di un caso isolato all'interno di una famiglia o di casi separati da più di tre gradi di parentela; rappresenta il 75% dei casi di AD e nella maggior parte dei casi è ad esordio tardivo [1].

Epidemiologia

L'AD è la più frequente causa di demenza oltre i 65 anni e si ritiene che rappresenti il 55% circa di tutti i casi di demenza. La prevalenza della malattia varia dall'1 al 6% e raddoppia ogni 5 anni oltre i 60 anni, passando dall'1% nei soggetti tra i 60 e 64 anni fino a raggiungere valori del 20% nei soggetti ultraottantacinquenni [2, 3]; si calcola che attualmente ne siano affette circa 400000 persone in Italia e 5,1 milioni di soggetti nel mondo [4].

In Italia il tasso medio d'incidenza annuale tra i soggetti ultrasessantacinquenni è dell'1% per gli uomini e dell'1,3% per le donne; il tasso d'incidenza raddoppia ogni 5 anni circa con un andamento logaritmico fino agli 80 anni, dopo i quali tende a diminuire. Nel mondo vi sono 4,6 milioni di nuovi casi l'anno, in Italia 80.000 nuovi casi/anno [4].

Come conseguenza dell'invecchiamento della popolazione mondiale, è previsto un aumento della prevalenza di questa malattia di circa quattro volte nelle prossime decadi. Recenti stime prevedono che più di ottanta milioni di individui saranno affetti da questo tipo di demenza

entro il 2040, il che costituisce una conseguenza naturale dell'aumento età-dipendente dell'incidenza dei casi di malattia di Alzheimer [5, 6]. Pertanto l'AD è destinata a diventare una tra le più importanti emergenze sociosanitarie mondiali, con un aumento vertiginoso a livello mondiale dei costi della demenza.

Quadro clinico

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

Sintomi cognitivi

La malattia esordisce nella maggioranza dei casi con un deficit della memoria dichiarativa insieme ad un disorientamento spazio/temporale lentamente ingravescente, associato ad un declino di almeno un'altra area cognitiva, quali ad esempio le funzioni esecutive e le competenze linguistiche.

Il deficit mnesico colpisce sia la memoria di lavoro (*working memory*) che la memoria a lungo termine, configurando il quadro di una sindrome amnesico-disesecutiva. Essa è caratterizzata da difficoltà non solo nell'apprendimento e nel consolidamento di eventi recenti riferiti o vissuti in prima persona, ma anche nel recupero di informazioni apprese molto tempo prima che siano autobiografiche, pubbliche o semantiche. Oltre alla memoria retrospettiva, anche la memoria prospettica ("il ricordare di ricordare") risulta precocemente difettosa, soprattutto quando il ricordo, non potendo essere indotto da supporti esterni, deve essere attivato da un processo di richiamo

autogenerato (ad esempio, ricordare di fare un'azione programmata in un preciso momento a venire).

L'amnesia episodica anterograda e retrograda e i disturbi della memoria semantica si accompagnano quasi sempre ad un'alterazione di uno o più sistemi delle funzioni esecutive. Esse rappresentano un insieme di capacità cognitive coscienti, strategiche e finalistiche che controllano e coordinano le funzioni cognitive strumentali (memoria, linguaggio, prassia e gnosis) permettendo di reagire a nuove situazioni, pianificare e applicare strategie, controllare prestazioni e inibire stimoli irrilevanti. La loro precoce compromissione spiega la facile distraibilità dell'ammalato con problemi di memoria incidentale (capacità di ricordare in modo conscio informazioni apprese non su richiesta), la sua difficoltà nell'eseguire correttamente attività prima per lui usuali richiedenti programmazione, attenzione divisa, autocontrollo, astrazione (per esempio, operazioni matematiche) o giudizio critico (abbigliamento inadeguato al clima o alla situazione sociale).

Nella fase iniziale della malattia, i problemi del linguaggio riguardano prevalentemente il contenuto del discorso, e, più specificatamente, la conversione del pensiero in linguaggio e la scelta delle parole. Il discorso iniziale appare all'interlocutore a tratti confuso. Quest'incoerenza nasce dalla difficoltà di tenere a mente quello che il soggetto intende comunicare mentre il suo pensiero conscio lo elabora linguisticamente e si estrinseca con false partenze, con omissioni di unità di informazioni importanti, con intrusioni caratterizzate da enunciati irrilevanti o addirittura incongrui e con perseverazioni ideative. Al tempo stesso, il discorso presenta anche meno coesione dovuta a difficoltà nel trovare la parola giusta al momento giusto (anomia) e all'uso di una parola per un'altra (parafasia verbale) in base alla somiglianza formale, semantica o entrambe. Il paziente, essendo in questa fase della malattia ancora, seppur parzialmente, consapevole

dei suoi difetti, ricorre a parole "*passé-partout*" (coso, roba, aggeggio), a termini di incertezza ("credo che", "secondo me"), a circonluzioni e giri di frasi a volte anche lunghe, creando la falsa impressione di essere diventato più loquace rispetto a prima. Sul versante recettivo, le difficoltà si limitano nel seguire dialoghi veloci e complessi tra più persone, soprattutto se svolti in ambienti con rumori di sottofondo.

Sintomi non cognitivi

I sintomi non cognitivi rappresentano un insieme molto eterogeneo di sintomi psicologici, comportamentali e psicotici che insorgono invariabilmente nel corso di AD fino al 90% dei casi. Nonostante la loro frequenza e rilevanza sia dal punto di vista diagnostico che della gestione del caso, non esistono ad oggi specifici criteri diagnostici per la definizione dei sintomi non cognitivi, eccetto quelli per la psicosi. I sintomi non cognitivi provocano sofferenza psicologica nel malato e stress nel caregiver, inducono alla contenzione fisica e chimica con una accentuazione della disabilità, incrementano il tasso di ospedalizzazione e anticipano l'istituzionalizzazione con una considerevole lievitazione degli oneri finanziari.

I cambiamenti di personalità tendono a peggiorare con l'avanzare della malattia e sono tra i sintomi non cognitivi quelli più difficilmente accettati dai familiari, innescando conseguentemente meccanismi di difesa e rifiuto, fonte di ulteriori problemi comportamentali da parte del malato.

I sintomi comportamentali si manifestano come "comportamento agitato", che comprende vari tipi di attività motoria, vocale e verbale non accidentali e non adeguati alle richieste socio-ambientali. L'aggressività può essere di tipo fisico verso persone o oggetti. L'aggressività non fisica può essere di tipo motorio (gestualità minacciosa, comportamento esigente, impaziente) o verbale (produttivo, incluso il turpiloquio oppure negativo, sotto forma di

mutismo intenzionale). Oltre all'affacendamento motorio afinalistico e all'irrequietezza psico-motoria, è frequente anche la deambulazione impropria (wandering notturno, fughe). Caratteristiche sono le stereotipie verbali, con richieste o domande incessanti, logorrea e impulsività verbale compreso il canto, i monologhi borbottati ad alta voce, le vocalizzazioni, soprattutto nelle fasi avanzate di malattia.

I comportamenti sessuali abnormi possono manifestarsi sia come un'ipersessualità rara, che come una diminuzione dell'interesse sessuale, più frequente.

I disturbi alimentari possono presentarsi come alterazioni sia dell'appetito che delle abitudini o delle preferenze alimentari, con perdita in genere di appetito e conseguente aumentato rischio di malnutrizione.

I sintomi psichici includono stati d'ansia, ideazione delirante di tipo paranoide (delirio di persecuzione, gelosia, abbandono), disturbi del sonno con riduzione di frequenza e densità della fase REM, labilità emotiva con euforia o depressione, quest'ultima notevole fonte di disagio per pazienti e caregiver.

Fattori di rischio

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

- età avanzata: l'età è il fattore di rischio più rilevante per le demenze, inclusa l'AD. E' da rilevare tuttavia che, in assenza di conferme biologiche, la diagnosi di demenza dipende da test cognitivi e di comportamento i cui errori standard aumentano marcatamente con l'età;
- fattori genetici: nelle forme familiari a esordio precoce sono coinvolte mutazioni a carico di geni situati sui cromosomi 1, 14, 21, responsabili rispettivamente della produzione di presenilina

2, presenilina 1 e precursore dell'amiloide (APP). Per quanto riguarda le forme a esordio tardivo la presenza del genotipo ϵ_4 dell'apolipoproteina E (ApoE) determinerebbe un aumento di circa 3 volte del rischio di sviluppare la malattia [7];

- basso livello d'istruzione: Katzmann [8] già nel 1993 ha proposto l'ipotesi secondo cui un'elevata scolarità potrebbe posticipare l'espressione clinica dei sintomi della demenza, aumentando il numero di sinapsi nella neocorteccia (ipotesi di riserva cerebrale). Stern [9] ipotizzò in seguito che un alto livello d'istruzione consentiva ai pazienti di mascherare più a lungo i sintomi della malattia (ipotesi riserva cognitiva). Altri autori hanno suggerito poi che gli individui con più alto livello d'istruzione, e con un conseguente livello socio-economico più elevato, conducono stili di vita più sani accumulando quindi un minor numero di lesioni cerebrali (ipotesi *brain battering*) [10];
- fumo, alcolismo e abitudini alimentari;
- esposizioni ambientali e occupazionali: ad esempio, recenti studi hanno evidenziato come l'esercizio fisico non incida positivamente soltanto sul rischio di sviluppare AD, ma anche sul decorso e la durata di malattia [11];
- fattori di rischio cardiovascolari.

Criteri diagnostici

Attualmente, la diagnosi di demenza è posta in base ai criteri clinici del *Diagnostic and Statistical Manual Mental Disorders* (DSM IV TR) redatto dall'*American Psychiatric Association* (APA).

La differenziazione delle diverse tipologie di demenza è affidata invece ai criteri introdotti nel 1984 dal *National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke* e dall'*Alzheimer's Disease and Related Disorders Association* (criteri NINCDS-ADRDA)[12]; secondo questi criteri, la diagnosi clinica di AD viene definita probabile in

presenza di decadimento cognitivo confermato dai test neuropsicologici. La diagnosi di certezza è possibile solo attraverso l'esame istopatologico cerebrale. La sensibilità di tali criteri varia tra il 65 e il 95%, mentre la specificità oscilla tra il 23 e l'88%.

Dagli anni '80 ad oggi sono stati introdotti nuovi criteri diagnostici per altre forme di demenza prima misconosciute; inoltre, la ricerca ha reso disponibili marcatori biologici sierici e liquorali, indagini genetiche approfondite e avanzate tecniche di neuroimaging. Nel 2007 Dubois et al [13] hanno proposto una revisione dei criteri NINCDS-ADRDA, suggerendo un'integrazione delle caratteristiche cliniche della malattia (presenza del disturbo di memoria) con i parametri biologici sierici (mutazioni dell'APP, della presenilina 1 e 2, allele ϵ_4 dell'ApoE) e liquorali (β -amiloide1-42, proteina tau) e con dati di neuroimaging strutturale (atrofia delle strutture del lobo temporale mediale rilevate con tecniche di RMN) e funzionale (alterazioni del metabolismo cerebrale rilevato con PET). L'insieme di questi fattori aumenterebbe la specificità e la sensibilità dei criteri diagnostici dell'AD e permetterebbe di individuare i soggetti affetti da tale patologia già agli stadi più precoci di malattia.

Alterazioni anatomo-patologiche

Nella malattia di Alzheimer, le prime alterazioni a carico della corteccia cerebrale si riscontrano soprattutto nella regione entorinale, localizzata nelle porzioni anteriori del giro ippocampale del lobo temporale [14]; queste modificazioni interessano successivamente altre aree della corteccia cerebrale e specifici gruppi di nuclei sottocorticali. All'esame macroscopico, l'encefalo di un paziente affetto da AD mostra un grado variabile di atrofia corticale, riscontrabile in sede autoptica sia con la diminuzione del peso e del volume dell'organo, che con l'assottigliamento degli strati neocorticali e delle circonvoluzioni, che coinvolge regioni implicate nei processi di memoria e apprendimento,

come la corteccia temporale, parietale, frontale, l'ippocampo e l'amigdala.

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

A livello istologico, è possibile dimostrare l'accumulo di due diverse proteine: la proteina β -amiloide (A β) che si deposita a livello extracellulare, e la proteina τ fosforilata che costituisce ammassi neurofibrillari intracellulari (*"neurofibrillary tangles"*).

La A β si organizza in diverse forme, le placche neuritiche (placche senili), le placche diffuse e la cosiddetta angiopatia amiloidea (o congofila).

Le placche senili sono costituite da una parte centrale compatta di fibrille insolubili della proteina A β , circondata da un agglomerato flogistico con neuriti in degenerazione (assoni e dendriti), astrociti reattivi e microglia attivata (monociti o macrofagi attivati derivati dal sistema reticolo-endoteliale residente nel Sistema Nervoso Centrale - SNC); esse si trovano soprattutto a livello dell'ippocampo e strutture limbiche, dell'amigdala, del subiculum e della corteccia entorinale.

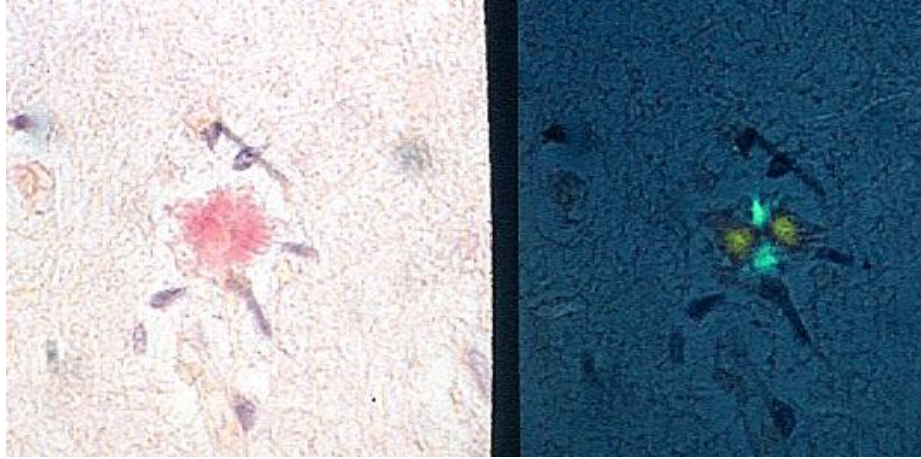


Fig.1: Placche neuritiche costituite da una porzione centrale costituita dall'amiloide circondata da processi neuritici distrofici.

Le placche diffuse sono composte invece da materiale scarsamente strutturato e mancano della componente neuritica.



Fig. 2: Placche diffuse.

L'angiopatia amiloidea è causata dal deposito della A β a livello delle pareti delle arterie cerebrali e meninee.

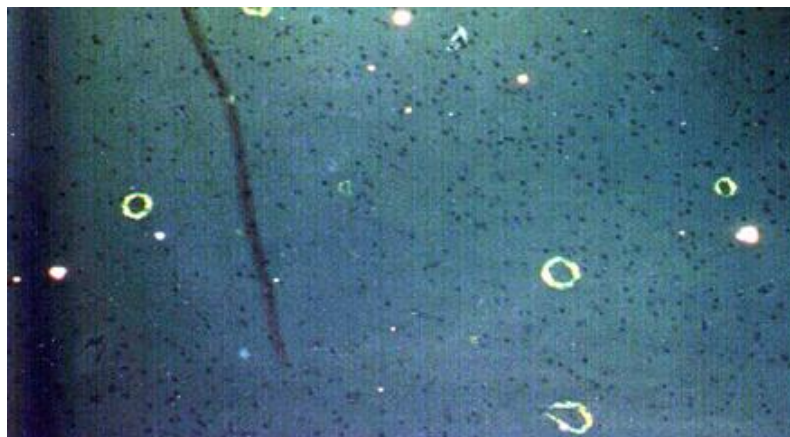


Fig. 3: Angiopatia amiloidea.

Gli ammassi neurofibrillari sono costituiti da fasci compatti di filamenti anomali (filamenti elicoidali appaiati) costituiti principalmente dalla proteina τ ; essi interessano principalmente il soma, ma possono estendersi anche ai dendriti. Tali filamenti fanno assumere alle cellule un aspetto “a fiamma”. I “*tangles*” si trovano soprattutto a livello dei neuroni piramidali di medie dimensioni della corteccia entorinale, della corteccia limbica, dell'ippocampo, dell'amigdala, negli strati neocorticali dei lobi frontali e temporali e dei sistemi colinergici dei nuclei della base.

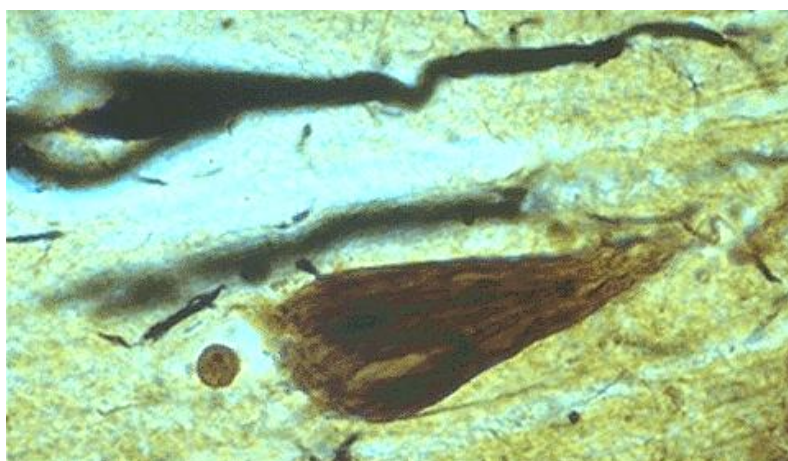


Fig. 4: Grovigli neurofibrillari.

Diagnosi precoce e marcatori

Appare evidente come, nella pratica clinica, la diagnosi di AD necessiti dell'integrazione di varie informazioni al fine di raggiungere la

migliore accuratezza possibile. Fondamentali nel processo diagnostico risultano essere l'anamnesi che, accompagnata da un accurato esame obiettivo neurologico, deve indagare i fattori di rischio, la modalità di insorgenza dei sintomi, le aree cognitive interessate, la presenza o meno di cerebrovasculopatia; l'esecuzione di analisi di laboratorio, volte a escludere demenze a genesi endocrina, metabolica, infiammatoria, carenziale, da encefalopatia tossica e da farmaci, da malattie cerebrali (incluse encefalopatie da AIDS); la valutazione dello stato mentale, attraverso la somministrazione di test cognitivi, quali il *Mini Mental State Examination* (MMSE) [15] e test neuropsicologici, la valutazione dell'autonomia funzionale del soggetto, attraverso l'utilizzo di scale che valutano le attività di base e strumentali del vivere quotidiano, quali ADL (*Activities of Daily Living*, indice di Katz) [16] e IADL (*Instrumental Activities of Daily Living*, indice di Lawton) [17]. Gli aspetti riguardanti il quadro clinico vanno quindi integrati con il neuroimaging strutturale e funzionale e lo studio di marcatori genetici e biochimici.

Come già sopra accennato, sono tre le categorie principali di marcatori biologici attualmente individuate per la diagnosi di malattia di Alzheimer: genetica, biochimica e di neuroimaging.

Marcatori genetici

La maggior parte dei casi di AD è di tipo sporadico e causata quindi da complesse interazioni tra suscettibilità genetica e diversi fattori ambientali. Tra i numerosi geni di suscettibilità studiati in questo specifico contesto, soltanto quello dell'allele ϵ_4 dell'apolipoproteina E è stato associato in modo indiscusso alla malattia. Tuttavia, solo il 50% dei casi di AD a insorgenza tardiva risulta omo o eterozigote per tale carattere: l'ApoE ϵ_4 va pertanto considerato fattore predisponente piuttosto che deterministico di malattia.

Tecniche di neuroimaging

La risonanza magnetica nucleare permette di predire l'evoluzione in AD attraverso la valutazione volumetrica dell'atrofia della corteccia entorinale e trans-entorinale, dell'ippocampo e della neocorteccia, regioni in cui sono dimostrabili alterazioni istopatologiche in presenza di AD .

Per quanto riguarda l'imaging funzionale, particolare importanza riveste la tomografia a emissioni di positroni (PET) che, attraverso un tracciante a base di glucosio (18-F-fluorodesossiglucosio-FDG), misura quantitativamente il consumo regionale cerebrale di glucosio, valutando quindi il metabolismo e la funzione neuronale; è stato dimostrato che nell'AD si verifica un ipometabolismo a livello della corteccia temporale, parietale e del giro cingolato posteriore [18]. Recentemente si sono sviluppate nuove tecniche PET in grado di valutare i depositi di A β "in vivo" attraverso una molecola in grado di legare l'A β ([11C]2-(40-methylaminophenyl)-6-hydroxybenzothiazol, Pittsburgh Compound B o PIB): tramite la valutazione della presenza, della quantità e della distribuzione dell'A β è possibile quindi individuare pazienti a rischio di sviluppo di AD [19].

Marcatori biochimici

I biomarcatori sono suddivisi a loro volta in due categorie:

- specifici: dei processi neurodegenerativi dell'AD;
- non specifici: che misurano epifenomeni associati al processo patologico primario, ad esempio gli indici infiammatori e lo stress ossidativo [20].

Al momento attuale, i biomarcatori individuati per la diagnosi precoce sono stati rintracciati nel liquido cefalorachidiano e sarebbero la diretta espressione delle lesioni istopatologiche che caratterizzano la neurodegenerazione in corso di AD: essi sono la β -amiloide 1-42, la proteina τ (total-Tau) e la τ -fosforilata (p-Tau). Diversi studi hanno

mostrato che la combinazione dei tre biomarkers può essere utilizzata per individuare i pazienti con decadimento clinico lieve che potrebbero sviluppare AD con un valore predittivo positivo e negativo superiore all'80% [21-24].

Il liquor può essere considerato una fonte ideale per i biomarcatori in quanto è in diretto contatto col tessuto cerebrale e subisce modificazioni nel corso di svariati processi patologici a carico del SNC. I pazienti con AD presentano basse concentrazioni nel liquor di $A\beta_{1-42}$ e alte concentrazioni di p-Tau e di T-Tau. I più specifici per l'AD risultano essere i primi due; infatti, la T-Tau è un marcatore di danno assonale che può essere riscontrato anche nelle demenze vascolari e in altri tipi di demenze (per esempio, demenza fronto-temporale e malattia da prioni). In ogni caso, quest'ultima possiede una correlazione positiva con la velocità e la gravità del processo neurodegenerativo.

Le concentrazioni diminuite di $A\beta$ riflettono probabilmente la sua deposizione nella placche senili, mentre la p-Tau mostra le modificazioni del citoscheletro dovute all'alterazione dei microtubuli, che causano in ultima analisi disfunzione assonale e morte neuronale.

Eziopatogenesi

L'eziopatogenesi dell'AD è tuttora sconosciuta, nonostante gli sforzi attuati dalla comunità scientifica negli ultimi decenni. La teoria attualmente più accreditata è quella amiloidea, supportata dalla dimostrazione in sede autoptica di placche contenenti tale molecola a livello cerebrale di pazienti con AD. Tuttavia, la loro presenza non può giustificare da sola l'insorgenza dell'AD, in quanto le placche di amiloide sono di comune riscontro nel tessuto cerebrale di soggetti anziani, anche cognitivamente integri, facendo supporre che la deposizione delle placche sia in realtà un fenomeno parafisiologico e che discriminante per l'insorgenza dell'AD possa essere la sede in cui

esse si depositano, nonché l'interazione con altri co-fattori, altrettanto importanti per lo sviluppo della malattia. Molti di questi sono stati approfonditamente studiati, al fine di poter definire con maggior precisione il loro ruolo nell'eziopatogenesi dell'AD; allo stato attuale, i più importanti co-fattori coinvolti risultano essere la proteina τ iperfosforilata, l'apolipoproteina E (ApoE) e diversi mediatori dell'infiammazione.

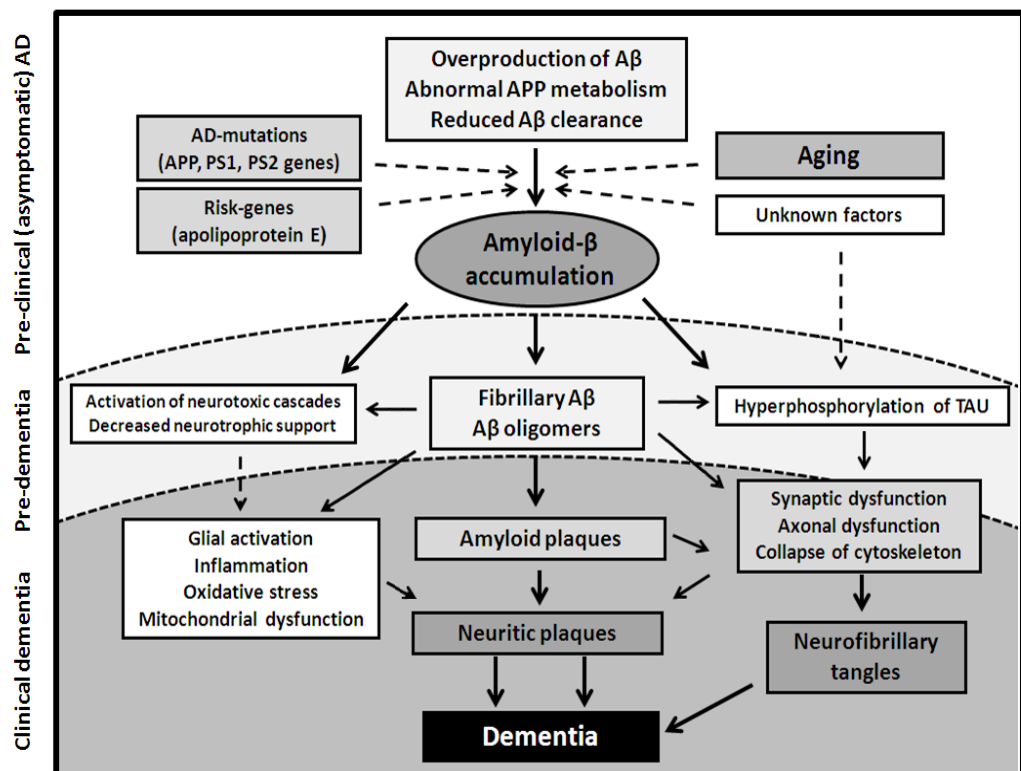


Fig.5: Modello eziopatogenetico ipotetico della malattia di Alzheimer [25].

L'ipotesi amiloidea

Le placche senili cerebrali contengono A β , un peptide di 40-42 amminoacidi, che deriva da un precursore maggiore, l'APP (*amyloid precursor protein*) per mezzo di un processo proteolitico [26]. L'APP è una proteina integrale transmembrana presente in numerose isoforme, tutte codificate da un singolo gene localizzato sul cromosoma umano 21.

L'APP è espressa nel SNC, ma è anche ubiquitariamente espressa in diverse varianti nei tessuti periferici, come le cellule muscolari, epiteliali e le cellule circolanti (soprattutto le piastrine) [27]. Ha funzioni di adesione alla matrice extracellulare, recettoriali (media particolari meccanismi intra-cellulari) e di modulazione dell'espressione genica. Inoltre, le molecole di APP secrete partecipano alla formazione delle sinapsi e giocano probabilmente un ruolo nell'integrità del processo mnemonico.

Questa proteina possiede una porzione N-terminale molto voluminosa (4/5 totali del peso della molecola), che si affaccia nello spazio extracellulare e una porzione C-terminale di circa 100 amminoacidi che costituisce il dominio intracitoplasmatico della proteina. Essa presenta in prossimità dell'estremità C-terminale una sequenza amminoacidica denominata A β , a livello della quale agiscono i tre principali enzimi coinvolti nel metabolismo dell'APP: α -secretasi, β -secretasi e γ -secretasi. In relazione all'attività di questi enzimi, l'APP può seguire due diverse vie di processazione.

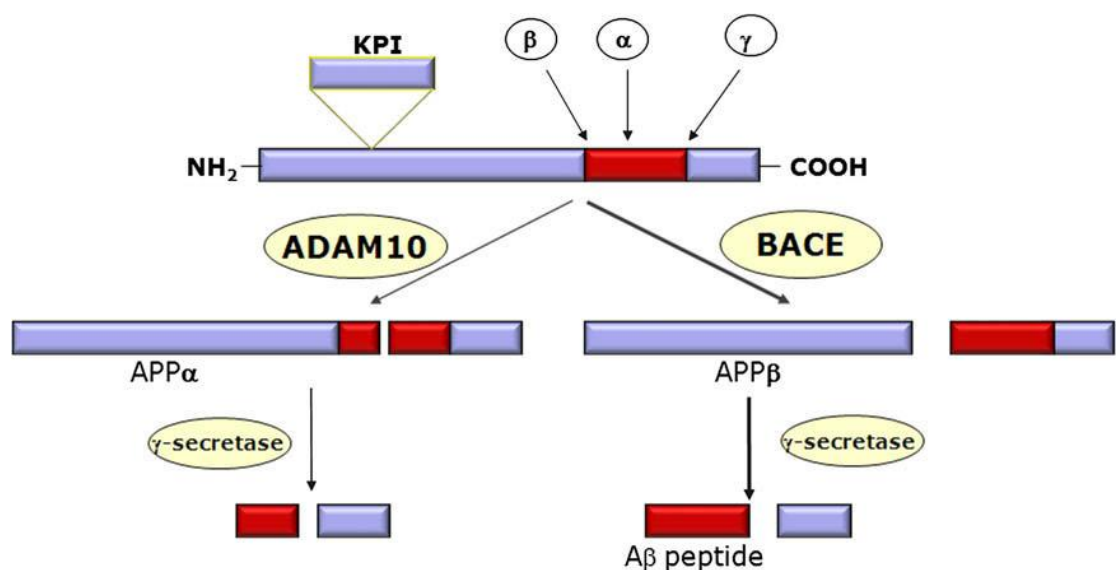


Fig. 6: Processazione dell'APP [28].

La via non amiloidogena prevede la processazione da parte dell' α -secretasi (ADAM10), che cliva l'APP all'altezza del residuo 16 della sequenza A β e dà origine a un grande frammento solubile N-terminale di 83 amminoacidi, chiamato sAPP α , che viene rilasciato in circolo, e ad un altro frammento di 83 amminoacidi, a livello dell'estremità C-terminale (CTF83), che rimane attaccato alla membrana cellulare dove, in seguito, andrà incontro a clivaggio da parte della γ -secretasi.

La via amiloidogena prevede l'azione della β -secretasi (BACE) e successivamente un secondo taglio da parte della γ -secretasi, con rilascio del peptide A β . La β -secretasi effettua il clivaggio a livello dell'estremità N-terminale della sequenza A β , rilasciando nello spazio extracellulare un frammento solubile, detto sAPP β , e lasciando attaccato alla membrana cellulare un frammento C-terminale di 99 amminoacidi (CTF99), che viene quindi clivato dalla γ -secretasi esattamente a livello del residuo 40 o 42 del CTF99 [28]. Pertanto, quest'azione combinata della β e γ -secretasi determina il rilascio di frammenti amiloidogenici A β di 40 e 42 amminoacidi nello spazio extracellulare, dove essi si possono accumulare; l'A β ₄₀ rappresenta la forma maggiormente prodotta, mentre l'A β ₄₂ è la principale componente delle placche senili essendo dotata di un elevato potenziale fibrillogeno e neurotossico [29]. I frammenti di A β ₄₀₋₄₂ si aggregano spontaneamente a formare una struttura a foglietti β tossica per i neuroni e per le sinapsi, sia nella sua forma precoce (monomera, dimerica o oligomera), sia come deposito in aggregati, le placche senili. Si ritiene che gli effetti tossici della A β possano causare lo sviluppo della demenza [30].

Nel soggetto sano le due vie di processazione dell'APP sono in equilibrio tra loro, mentre si ritiene che nell'individuo con malattia di Alzheimer si crei una condizione di disequilibrio, con prevalenza della via amiloidogena rispetto alla via non amiloidogena. Ciò determina una maggior produzione di A β e una conseguente sovrasaturazione

delle strutture addette allo smaltimento della stessa, che di per sé sono già compromesse a causa dell'invecchiamento.

Alcuni studi hanno recentemente proposto che la deposizione di A β potrebbe non costituire la causa primaria della demenza. Sia il declino cognitivo che la deposizione di A β potrebbero essere determinati da un declino nell'attività metabolica cerebrale, che è strettamente correlata all'attività sinaptica; l'A β potrebbe ulteriormente esacerbare il declino metabolico e determinare un progressivo decadimento della funzione cognitiva, conducendo alla demenza. Infatti un'attività metabolica cerebrale diminuita misurata sia attraverso la PET o fMRI, si è dimostrata essere associata con la malattia [31]. Inoltre, si è visto che un declino metabolico è correlato con declino cognitivo in roditori anziani che non producono aggregati di A β per formare placche senili. Questa interpretazione permetterebbe di riunire i diversi fattori di rischio per la demenza in un'unica ipotesi e indirizzerebbe la ricerca sull'identificazione dei fattori che determinano una diminuzione dell'attività metabolica cerebrale, al fine di mantenerla adeguata e prevenire l'insorgenza della malattia [30].

In particolare non supporterebbe l'ipotesi amiloidea il fatto che:

- l'A β è normalmente presente a livello cerebrale e la concentrazione di A β solubile è maggiore nel cervello dei giovani che in quello degli anziani non dementi [32].
- il 20-30% dei soggetti sani dal punto di vista cognitivo sono portatori di un significativo numero di placche di amiloide riscontrate pre o post-mortem [33, 34].
- l'immunoterapia può rimuovere le placche di A β , ma non incide sulla progressione della demenza, suggerendo che l'A β da sola potrebbe non essere sufficiente a causare la malattia [35, 36].
- gli individui con mutazioni completamente penetranti sia di APP che della γ -secretasi non sviluppano la demenza fino a 30-40 anni di età, suggerendo quindi che l'effetto tossico sia da

ricondere all'accumulo e deposizione dell'amiloide a livello cerebrale [37].

Numerose evidenze mostrano quanti siano i fattori coinvolti nella patogenesi dell'AD e la necessità di individuare la causa primitiva di questa demenza, che possa spiegare i meccanismi patogenetici a valle.

Alzheimer e infiammazione

Cruciale nell'eziopatogenesi dell'AD sembra poi essere il ruolo svolto dall'infiammazione. La reazione infiammatoria che caratterizza la maggior parte dei disordini neurodegenerativi, incluso l'AD, viene spesso chiamata "neuroinfiammazione" e coinvolge prevalentemente componenti dell'immunità innata. La microglia attivata (macrofagi residenti nel SNC) e gli astrociti sono le principali cellule che prendono parte a questa risposta nell'AD, mentre cellule quali i linfociti e i polimorfonucleati sembrano giocare un ruolo meno importante. La "neuroinfiammazione" potrebbe costituire la causa primaria dell'AD oppure essere una conseguenza della stessa.

Nell'AD si osserva un'attivazione cronica della risposta immunitaria, la quale probabilmente svolge un ruolo dannoso e contribuisce alla progressione della malattia. D'altra parte, il coinvolgimento del sistema immunitario potrebbe giocare un ruolo positivo in acuto, per esempio attraverso processi di fagocitosi e produzione di fattori trofici e di riparazione, contribuendo a limitare la progressione della malattia stessa. Sia l'infiammazione cronica che quella acuta potrebbero essere regolate geneticamente o da meccanismi epigenetici, o dipendere da insulti cerebrali, infezioni o altre malattie [38].

Molti studi neuropatologici hanno mostrato una stretta associazione tra le placche senili e la risposta infiammatoria locale [39]. In particolare, a livello dei depositi cerebrali di A β in soggetti con AD, è stata dimostrata la presenza di molteplici elementi flogistici, tra cui componenti della cascata del complemento, fattori della coagulazione,

proteine flogistiche come PCR, citochine, proteasi e loro inibitori, quali antichimotripsina e apolipoproteine, molecole di adesione e radicali liberi dell'ossigeno [40].

Studi effettuati con la PET hanno dimostrato la presenza di microglia attivata nel cervello di pazienti con AD suggerendo un suo possibile ruolo nel mediare la tossicità dell'amiloide. La presenza delle placche di A β potrebbe mantenere la microglia costantemente attivata, conducendo ad una condizione di infiammazione cronica a livello del SNC; vari studi effettuati su colture di cellule gliali e su macrofagi hanno mostrato che l'A β stimola la sintesi ed il rilascio di citochine pro-infiammatorie come IL-1- β , IL-6 e TNF- α [41] e un'iperespressione delle stesse citochine è stata dimostrata nel cervello di pazienti con AD [42, 43].

Inoltre, nonostante non sia ancora nota la causa dell'accumulo extracellulare di A β , vi è un numero sempre maggiore di evidenze che dimostrano come essa sia coinvolta nel meccanismo della morte neuronale, sia per il suo effetto tossico diretto sulle sinapsi, generando stress ossidativo, che per la capacità di scatenare una robusta reazione infiammatoria locale.

La presenza di mediatori dell'infiammazione associati all'amiloide e di microglia attivata secernente citochine in genere precede le modificazioni neurodegenerative dell'AD; inoltre, i polimorfismi presenti nei geni di alcune citochine (IL-1, IL-6, TNF- α) e di proteine di fase acuta (α 1-antichimotripsina) sono associati ad un aumentato rischio di AD [39].

L'accumulo di A β potrebbe essere inizialmente determinato da difetti nei meccanismi fisiologici della sua clearance e degradazione a livello cerebrale. La clearance fisiologica dell'A β potrebbe avvenire grazie al drenaggio verso gli spazi perivascolari, oppure attivamente attraverso l'uptake e la processazione della stessa da parte degli astrociti, della microglia o dei macrofagi derivati dai monociti: questi ultimi

sembrerebbero gli unici in grado di accedere ai depositi fibrillari di A β [44].

Attualmente, vi è pertanto un consenso uniforme nell'accettare l'infiammazione quale caratteristica fondamentale nella patogenesi di AD [39, 45].

La dimostrazione di un'attivazione di processi infiammatori negli stadi precoci di malattia supporterebbe l'ipotesi dell'infiammazione come "*primum movens*", sebbene l'infiammazione potrebbe svolgere un ruolo chiave nell'eziopatogenesi della malattia anche se intervenisse più tardivamente.

Tra i vari mediatori dell'infiammazione, le citochine rivestono un ruolo di grande interesse: studi condotti su cellule della microglia estratte da embrione umano hanno dimostrato la presenza di mRNA di una serie di citochine pro-infiammatorie (IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α) e di citochine anti-infiammatorie come IL-10 e dei loro recettori, il che dimostra come il cervello sia in grado di rispondere ad insulti esterni. Il SNC non può più essere considerato un organo isolato e protetto dall'azione del sistema immunitario; è oggi noto che le cellule T sono in grado di attraversare la barriera ematoencefalica (BEE) e di liberare mediatori dell'infiammazione nel corso di patologie neurodegenerative. Inoltre, la microglia esprime diverse molecole coinvolte nella risposta immunitaria tra cui gli antigeni di istocompatibilità maggiore di tipo I e II che facilitano l'interazione coi linfociti T, i quali, a loro volta, determinano la produzione di citochine infiammatorie [46, 47].

Le placche di A β inducono anche la proliferazione degli astrociti, anch'essi cellule gliali, i quali parteciperebbero alla clearance e degradazione di A β formando una barriera protettiva tra i depositi di A β e i neuroni. Tuttavia, la presenza di astrociti attivati potrebbe essere anche giustificata per l'attività neurotrofica delle sostanze da essi prodotte.

I neuroni stessi, reagendo agli stimoli tossici, potrebbero direttamente contribuire al mantenimento della risposta infiammatoria: tradizionalmente creduti passivi bersagli dell'infiammazione, recenti evidenze suggeriscono che essi stessi sono fonte di fattori del complemento, di prostanoidei e di diverse citochine tra cui IL-1 β , IL-6, TNF- α e M-CSF. Molti di questi fattori possono promuovere meccanismi neurodegenerativi, mentre altri possono contrastare la propagazione della flogosi o avere effetti neurotrofici benefici.

E' opportuno sottolineare che molte proteine infiammatorie svolgono sia effetti pro- che anti-infiammatori e pertanto la loro presenza non consente di per sé di stabilire se il loro ruolo è protettivo o dannoso. Pertanto, non un singolo mediatore ma piuttosto l'intero spettro degli agenti infiammatori determina il prevalere di effetti benefici o dannosi con un chiaro disequilibrio nell'AD a favore dei secondi.

Il ruolo della proteina Tau

I grovigli neurofibrillari, contenenti proteina τ iperfosforilata, costituiscono, insieme alle placche senili, un riscontro anatomico-patologico tipico nei pazienti con AD e rendono pertanto altamente probabile il coinvolgimento di questa proteina nell'eziopatogenesi della malattia; tuttavia, essi non sono specifici per l'AD, essendo dimostrabili in molte altre patologie neurodegenerative, al punto che è stato coniato il termine generico di "taupatie". La proteina τ è la principale proteina neuronale associata ai microtubuli (MAP), la cui funzione è quella di assemblare la tubulina in microtubuli nella struttura portante del citoscheletro. E' codificata da un gene presente sul cromosoma 17 ed è espressa in 6 diverse isoforme generate da un meccanismo di splicing alternativo del suo mRNA. La disfunzione della proteina τ nell'AD è dovuta alla sua iperfosforilazione, mediata dall'attivazione di una serie di protein-chinasi, le più importanti delle quali sono GSK-3 e Cdk5 [48]. Questa anomalia ha due importanti

ripercussioni: da un lato, la τ iperfosforilata sequestra quella normale e le altre proteine associate ai microtubuli, causando disassemblaggio dei microtubuli e alterazioni nel trasporto assonale, dall'altro essa è incline all'aggregazione con la formazione di fibrille insolubili (filamenti ad elica appaiati, PHF) e di grossi grovigli neurofibrillari (*tangles*), che compromettono il neurone e la funzione sinaptica. Inoltre, la proteina τ presente negli ammassi intracellulari viene ubiquitinata al fine di indirizzarla verso la degradazione intracellulare, ma questo processo è inefficiente e i grovigli neurofibrillari soffocano fino alla morte i neuroni [18]. L'ipotesi ad oggi più accreditata interpreta la formazione di grovigli intraneuronali di proteina τ insolubile come fattore conseguente la deposizione dell'A β e, in particolare, come una risposta citologica dei neuroni colpiti dall'accumulo di A β o peptidi β -amiloide correlati.

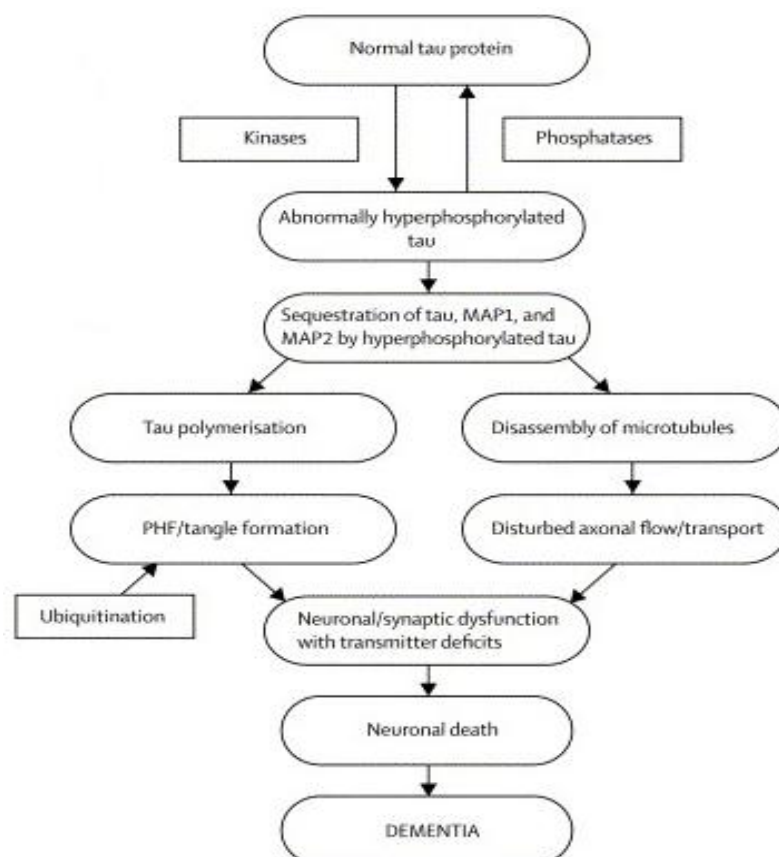


Fig. 7: Processazione della proteina tau [18].

L'apolipoproteina E (ApoE)

L'ApoE è una lipoproteina di 299 amminoacidi espressa in molti organi, con la più alta espressione rispettivamente a livello epatico e cerebrale. Esistono tre principali isoforme di ApoE, codificate da un gene presente sul cromosoma 19: ApoE2 (Cys112, Cys158), ApoE3 (Cys 112, Arg 158), e ApoE4 (Arg112, Arg158). La composizione diversa di amminoacidi in queste posizioni è cruciale poiché modifica le proprietà strutturali della proteina, che possono influenzare in ultima misura le proprietà funzionali delle isoforme di ApoE.

L'apolipoproteina E è una delle proteine chiave dei complessi lipoproteici che regolano il metabolismo dei lipidi, coordinando il loro trasporto da una cellula all'altra attraverso i recettori dell'ApoE e le proteine associate al trasporto lipidico e alla lipolisi [49, 50]. Il legame tra le isoforme specifiche di ApoE e i complessi lipoproteici nel plasma e la captazione di complessi lipoproteici contenenti ApoE da parte dei recettori LDL hanno un effetto sostanziale sul metabolismo lipidico periferico, determinando importanti implicazioni in malattie come l'iperlipoproteinemia di tipo III e l'aterosclerosi.

Nel cervello, l'ApoE è prodotta soprattutto dagli astrociti, in minor misura dalla microglia e in talune condizioni dai neuroni [51]. Nel liquor, essa è associata prevalentemente al colesterolo e a complessi ricchi di fosfolipidi, simili alle HDL. A differenza del plasma, il liquor contiene lipoproteine simili alle HDL, ma non contiene LDL o VLDL. Il legame tra l'apolipoproteina E e le particelle simili alle HDL avviene senza che ci sia una nota affinità per un'isoforma [52, 53].

A differenza della periferia, dove le varie isoforme di Apo E modificano in maniera diversa il metabolismo lipidico, non esiste attualmente un'evidenza convincente relativamente al fatto che esse influenzino il metabolismo del colesterolo o dei fosfolipidi a livello del SNC, suggerendo che le differenze strutturali tra le isoforme di ApoE potrebbero influenzare i disordini neurologici attraverso meccanismi

non direttamente correlati agli effetti isoforma-specifici sul metabolismo lipidico.

Il gene dell'ApoE è uno dei geni di suscettibilità implicati nell'insorgenza dell'AD; in particolare, esso aumenta il rischio di insorgenza tardiva della malattia (oltre i 60 anni) ed è inoltre collegato alla forma familiare autosomica dominante della malattia [7].

L'allele $\epsilon 3$ dell'ApoE risulta essere il più comune in tutte le popolazioni, con una prevalenza del 50-90%, mentre l'allele $\epsilon 4$ è presente nel 5-35% e l' $\epsilon 2$ nell'1-5% delle persone [49]. Il rischio di sviluppare AD è maggiormente legato all'allele $\epsilon 4$ rispetto a $\epsilon 3$, a sua volta più fortemente associato di $\epsilon 2$. L'allele $\epsilon 4$ è presente in circa il 50% dei pazienti con malattia ad insorgenza tardiva, rispetto al 20-25% dei controlli [7, 54]. L'eterozigosi per $\epsilon 4$ aumenta il rischio di AD di circa tre volte e l'omozigosi di dodici volte. Inoltre, si è visto che in pazienti con malattia ad insorgenza tardiva, la presenza di una o due copie dell'allele $\epsilon 4$ comporta un esordio più precoce della malattia, circa 15 anni prima dei soggetti non portatori di $\epsilon 4$. Al contrario, i soggetti $\epsilon 2$ hanno un rischio minore di sviluppare LOAD [7, 54, 55].

Il genotipo di ApoE non costituisce un fattore necessario né sufficiente per lo sviluppo dell'AD, perciò la sua analisi non può essere utilizzata singolarmente per la diagnosi [56, 57].

Il ruolo di ApoE per quanto riguarda la predisposizione allo sviluppo dell'AD è chiaro, tuttavia sono necessari ulteriori studi per poter comprendere i meccanismi alla base della associazione tra l'Apo E e la progressione della malattia [58].

Sebbene il meccanismo con cui le diverse isoforme di ApoE modificano il rischio di AD non sia completamente noto, molte evidenze suggeriscono un loro ruolo nella modulazione del metabolismo e dell'accumulo di A β . Studi in vitro e su animali mostrano che l'ApoE contribuisce a determinare la conversione della A β dalla sua forma monomerică, non tossica, a forme con più alto peso molecolare come gli

oligomeri e le fibrille, i quali probabilmente mediano gli effetti tossici. Inoltre, potrebbe influenzare anche la clearance dell'A β attraverso i vasi [59].

Il riscontro diagnostico di pazienti con AD ha inoltre documentato la presenza di apolipoproteina E all'interno delle placche senili [60].

Come già ampiamente discusso, si ritiene che la deposizione di A β a livello cerebrale costituisca la caratteristica patologica iniziale dell'AD e che questo processo possa iniziare circa 15 anni prima dell'insorgenza dei segni e dei sintomi del declino cognitivo [61]; la formazione dei grovigli neurofibrillari, la neuroinfiammazione e la perdita neuronale e sinaptica sembrerebbero essere eventi successivi. Se il genotipo di ApoE fosse collegato al rischio di malattia e influenzasse realmente la probabilità di deposizione di A β , i soggetti sani dal punto di vista cognitivo dovrebbero avere, ad una data età, una quantità di A β che corrisponda all'allele di ApoE che esprimono ($\epsilon 4 > \epsilon 3 > \epsilon 2$). Sia i marcatori liquorali che gli studi di imaging sull'amiloide hanno mostrato livelli di A β isoforma-dipendenti in quest'ordine in soggetti cognitivamente sani tra i 45 e 90 anni. Questi dati suggeriscono che il genotipo di ApoE modula il rischio di sviluppare l'AD [58].

L'ApoE inoltre, sembrerebbe possedere degli effetti neurotossici che, indipendentemente dalle interazioni con la A β , potrebbero avere implicazioni nei meccanismi di neurodegenerazione dell'AD [62]. Gli effetti neurotossici sembrerebbero essere correlati alla generazione di frammenti di ApoE anomali per clivaggio proteolitico da parte di una serina simile alla chimotripsina che agisce sui portatori dell'allele $\epsilon 4$, ma non di $\epsilon 3$; questi frammenti sembrerebbero condurre alla neurodegenerazione, attraverso effetti sulla fosforilazione della proteina τ e sulla distruzione del citoscheletro [63].

In conclusione, varie evidenze suggeriscono un ruolo centrale di ApoE nella modulazione dei processi di neurodegenerazione. L'ApoE4 risulta

essere un fattore di aumentata suscettibilità per l'insorgenza di AD, mentre l'ApoE2 sembra essere un fattore protettivo. L'ApoE4 è attualmente considerato come un fattore di rischio generico e non come una causa diretta di AD; tuttavia, una recente metanalisi condotta su larga scala ha dimostrato come l'effetto di ApoE sull'AD sia simile a quello dei "geni maggiori" nelle malattie mendeliane (per esempio, BRCA1 nel cancro della mammella). Ad esempio, le donne portatrici di BRCA1 all'età di 70 anni avrebbero un rischio di carcinoma mammario del 57%, valore simile a quello stimato per i portatori di ApoE4 all'età di 85 anni [64]. Ulteriori studi sono però necessari e pertanto il genotipo dell'ApoE non deve mai essere utilizzato da solo, ma esclusivamente come elemento aggiuntivo agli altri criteri clinici nella diagnosi di AD.

IL DECADIMENTO COGNITIVO LIEVE

La diagnosi clinica di AD è possibile solo quando i sintomi sono di entità tale da compromettere le capacità di relazione dell'individuo con l'ambiente che lo circonda ed avviene quindi in uno stadio già avanzato di malattia. E' tuttavia noto come il danno biologico preceda di alcune decadi la comparsa di sintomi clinici. Recentemente sono stati introdotti quindi i concetti di fase preclinica, nella quale la malattia è caratterizzata dal solo danno biologico senza manifestazioni cliniche, e fase prodromica nella quale i sintomi sono sfumati e non compromettono l'autonomia funzionale del soggetto: quest'ultima condizione è stata finora definita come decadimento cognitivo lieve (*Mild Cognitive Impairment* - MCI) [65].

L'identificazione di nuovi strumenti diagnostici per predire la possibile evoluzione della demenza in individui anziani con alterazioni cognitive molto lievi o addirittura asintomatici rappresenta un'importante sfida dei nostri giorni in quanto consentirebbe una migliore gestione della demenza.

L'AD presenta delle alterazioni patologiche ben definite, la maggior parte delle quali interessa il lobo temporale mediale e le strutture associative neocorticali; tra queste, le placche neuritiche formate dai depositi di A β e i grovigli neurofibrillari dovuti all'iperfosforilazione della proteina τ ne costituiscono le lesioni istopatologiche tipiche [66]. Ci sono evidenze che dimostrano l'esistenza di una lunga fase preclinica nell'AD, in cui le anormalità sopra menzionate si accumulano gradualmente a livello cerebrale prima che si manifesti il declino cognitivo e l'insorgenza della malattia. Studi autoptici hanno mostrato che la presenza di placche di amiloide a livello cerebrale può essere osservata in alcuni soggetti già nella terza o quarta decade di vita, con

maggior frequenza nella tarda mezza età e a livelli ancora maggiori nell'età anziana [67-69].

I livelli di amiloide cerebrale nei soggetti adulti ancora cognitivamente integri che svilupperanno l'AD non è ancora nota e dipende dall'età e dalle caratteristiche genetiche della coorte; tuttavia, un carico corticale di amiloide in adulti anziani cognitivamente sani, misurato attraverso la PET, sembra essere associato ad un maggior indice di progressione verso un'AD sintomatica a lungo termine [70].

Risulta difficile differenziare clinicamente l'AD nelle sue fasi iniziali da un fisiologico invecchiamento cognitivo e dalle sottostanti modificazioni del quadro cognitivo che insorgono in altre forme di demenza nelle fasi prodromiche. Negli stadi iniziali, i pazienti con AD possono presentare lievi, ma persistenti (e spesso progressivi) deficit cognitivi, anche se spesso non così gravi da giustificare la diagnosi di demenza. L'espressione MCI è stata coniata verso la fine degli anni Novanta da Ronald J. Petersen e i suoi collaboratori per identificare soggetti che presentavano un disturbo isolato di memoria (MCI amnesico), con conservazione globale della funzione intellettuale e senza compromissione nella vita lavorativa, di relazione e familiare, ma potenzialmente a rischio di sviluppare l'AD [71]; nel tempo si è compreso che il deficit cognitivo non riguarda esclusivamente la sfera mnemonica, ma che i soggetti affetti da MCI possono presentare anche alterazioni di altre funzioni cognitive, ad esempio alterazioni del linguaggio, delle funzioni esecutive, dell'orientamento visuo-spaziale o del ragionamento.

Inoltre, si è osservato che non tutti i pazienti con MCI evolvono verso un quadro di demenza conclamato col passare del tempo; anche le caratteristiche anatomo-patologiche dei pochi casi con diagnosi clinica di MCI, studiati post-mortem, sono risultate essere disomogenee. Infatti un gruppo di soggetti presentava placche senili e degenerazioni neuro-fibrillari nella neocorteccia, in quantità insufficiente per la

diagnosi istologica di AD, mentre un altro gruppo mostrava unicamente degenerazioni neurofibrillari limitate alle aree limbiche. E' quindi possibile che il quadro clinico possa essere espressione sia di un accentuato fisiologico invecchiamento cerebrale sia di una fase precoce di AD scarsamente aggressiva.

Il termine MCI identifica pertanto una condizione eterogenea dal punto di vista clinico, prognostico e fisio-patogenetico, che può essere considerata un'entità subclinica a sé stante [72].

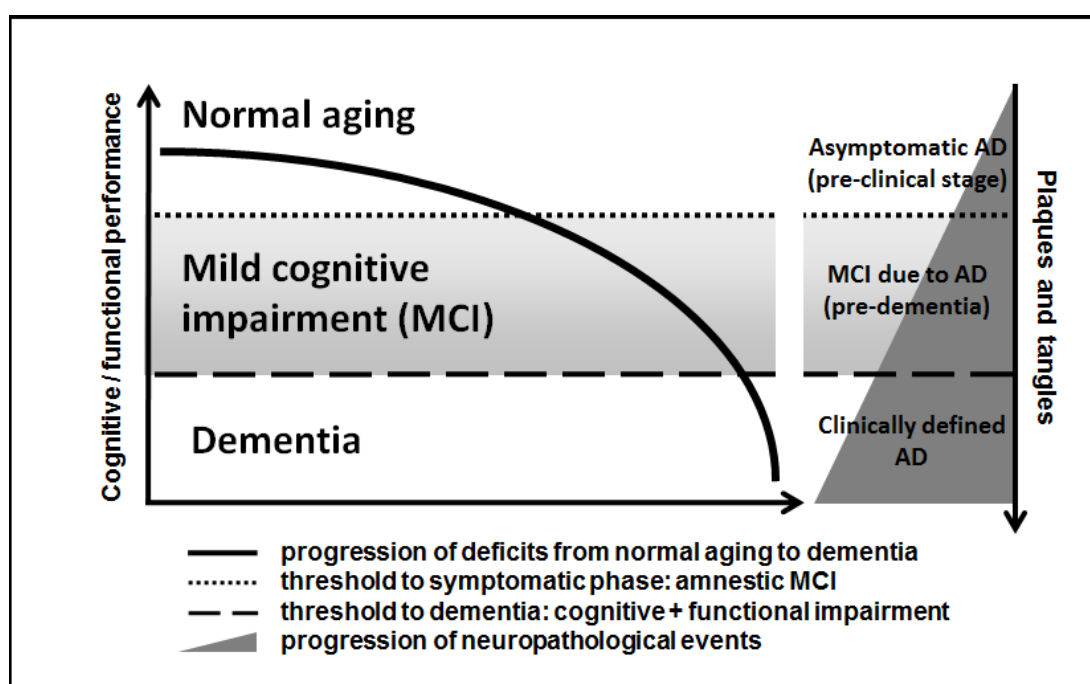


Fig. 8: Correlazione tra la progressione dei sintomi cognitivi e funzionali e gli eventi neuropatologici nella transizione dalla fase pre-clinica a quella prodromica alla malattia di Alzheimer conclamata [25].

Esistono varie tipologie di MCI oltre a quello amnesico puro, differenziate in base alle funzioni cognitive compromesse:

- MCI amnesico (aMCI): presenza di un deficit isolato della memoria;
- MCI amnesico e a multipli domini (a-mcdMCI): deficit di memoria accompagnato da lieve compromissione di altre

funzioni cognitive;

- MCI a deficit cognitivi multipli (mcdMCI): presenza di deficit lievi in più ambiti, diversi da quello della memoria;
- MCI a singolo dominio, non amnesico (MCI single domain): compromissione di una singola funzione cognitiva, non mnesica.

Differenti studi hanno stimato che il tasso di conversione da MCI a demenza si aggira intorno al 10-15% annui [73-75]. Il tasso di conversione nei diversi tipi di demenza è variabile secondo il sottotipo: l'aMCI è in assoluto il sottotipo che più frequentemente progredisce verso una situazione di AD conclamata. Le forme a multiplo dominio sono invece ritenute a più probabile conversione in demenza degenerativa di tipo non Alzheimer (come una FTD o LBD) e in demenza vascolare [76, 77].

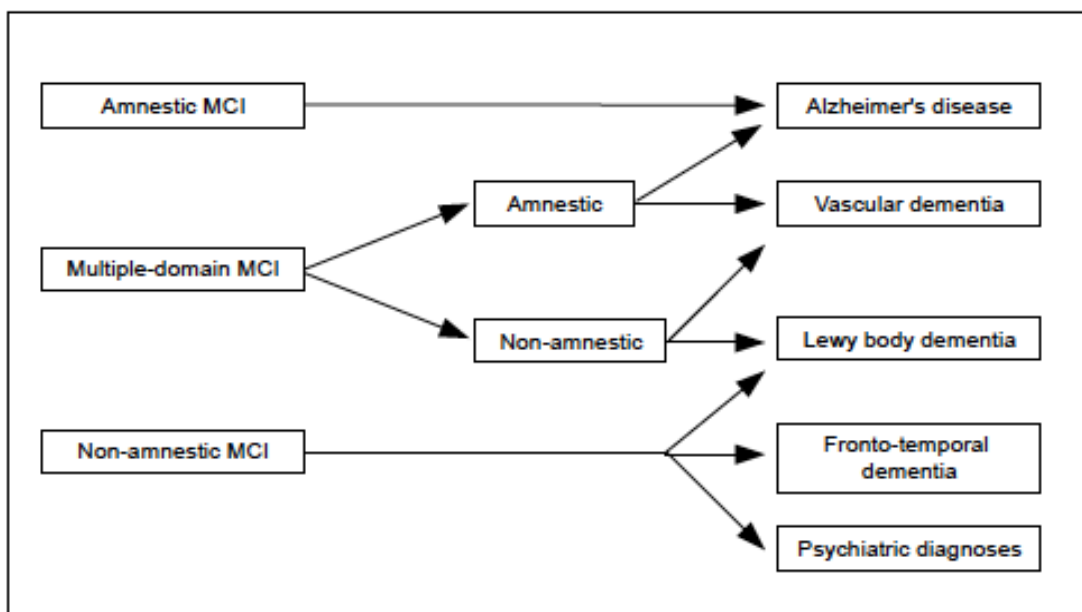


Fig. 9: Ipotetiche evoluzioni dipendentemente dal sottotipo di MCI [25].

LA DEMENZA VASCOLARE

Definizione

La demenza vascolare (Vascular Dementia, VaD) comprende tutte le forme di deterioramento mentale secondarie ad una encefalopatia su base ischemica o emorragica. Nonostante la sua grande diffusione e il crescente interesse verso questa malattia ad oggi vi è confusione per quanto riguarda la terminologia, la classificazione ed i criteri diagnostici.

Fino agli anni '60 la demenza nei soggetti anziani era solitamente definita "demenza arteriosclerotica", una definizione introdotta da Binswanger alla fine del XIX secolo per identificare una condizione di declino cognitivo causata da una ridotta perfusione cerebrale secondaria ad una aterosclerosi dei vasi cerebrali [78]. Nel 1974 Hachinski criticò questo termine per la sua imprecisione e inaccuratezza proponendo il termine "demenza multi-infartuale" (multi-infarct dementia MID). Veniva così introdotto il concetto per cui per lo sviluppo di un declino cognitivo fosse necessario l'accumularsi di aree di infarto cerebrale, con un coinvolgimento preferenzialmente corticale, fino al superamento di una soglia di criticità [79].

La presenza di soggetti i cui deficit cognitivi erano causati da una patologia dei vasi cerebrali con lesioni vascolari nei gangli basali, nel mesencefalo e nella materia bianca portò all'identificazione di un ulteriore sottotipo di demenza chiamato "demenza vascolare sottocorticale" (subcortical vascular dementia sVD).

Il termine generale VaD è stato usato per descrivere la MID, la sVD e tutte quelle demenze dovute a encefalopatie ipossiche o emorragiche. Recentemente è stato inoltre proposto il termine "disordini cognitivi vascolari" per indicare un ampio gruppo di sindromi e malattie caratterizzate dalla demenza o da un lieve decadimento cognitivo

dovuti a lesioni cerebrovascolari [80, 81]. Questo decadimento cognitivo lieve di origine vascolare (Vascular Cognitive Impairment - VCI) è considerato, al pari dell'aMCI per quanto riguarda l'AD, uno stadio iniziale della VaD conclamata [82]. Diversamente dall'aMCI, il VCI è caratterizzato da isolati deficit esecutivi, senza perdita di memoria o demenza [83].

I criteri del NINDS-AIREN hanno permesso di classificare con precisione le sottoforme di VaD, facendo ordine nel campo delle demenze di origine vascolare:

- Demenza multi-infartuale - MID. È caratterizzata dalla ricorrenza di attacchi ischemici transitori (TIA) o episodi ictali seguiti, a breve tempo, dall'insorgenza della demenza. Gli infarti sono multipli, completi, spesso estesi e derivano solitamente dall'occlusione di grossi rami arteriosi. Sono localizzati prevalentemente a livello corticale, anche se possono essere presenti e talora prevalere infarti sottocorticali o lacunari.
- Demenza da singoli infarti strategici (Strategic Infartual Dementia, SID). In questo caso la demenza può derivare da singoli infarti corticali o sottocorticali, localizzati in strutture cerebrali ben definite (giro angolare, ippocampo bilaterale o talamo).
- Demenza da patologia dei piccoli vasi - sVD. Comprende due diverse entità che condividono come meccanismo fisiopatologico comune un danno della sostanza bianca sottocorticale per alterazioni del circolo cerebrale profondo: la malattia di Binswanger e lo stato lacunare.
 - o La malattia di Binswanger è caratterizzata dalla comparsa di demenza e alterazioni motorie in pazienti che presentano uno stato ischemico cronico della sostanza bianca sottocorticale. I primi segni della

malattia si manifestano tra i 55 e i 75 anni e la sua incidenza non differisce tra i due sessi. I reperti neuroradiologici caratteristici sono rappresentati da aree ipodense e irregolari della sostanza bianca periventricolare accompagnate da aumento del volume dei ventricoli laterali.

- Lo stato lacunare viene definito dalla presenza di piccoli infarti cerebrali di diametro inferiore al centimetro e mezzo. Il quadro clinico è caratterizzato da disturbi motori extrapiramidali, modificazioni dell'umore e della personalità, segni di liberazione frontale, aprassia, riso e pianto spastico, disfagia e disartria.

Esistono inoltre delle condizioni che, soprattutto nell'anziano, possono essere causa di VaD. Le demenze post-emorragiche possono essere causate da lesioni emorragiche, compresi l'ematoma subdurale cronico, le sequele di un'emorragia sub-aracnoidea e l'ematoma cerebrale; una demenza ipoperfusionale può realizzarsi in condizioni di ischemia cerebrale globale, secondaria ad arresto cardiaco o a profonda ipotensione; oppure può conseguire ad un'ischemia localizzata in territori spartiacque, che comprendono la sostanza bianca periventricolare ma anche i gangli della base e l'ippocampo. Anche le vasculiti (immunitarie, paraneoplastiche), anche se meno frequentemente, possono essere causa di demenza [78].

Secondo una recente classificazione clinico-patologica della VaD si possono distinguere le seguenti forme:

- La demenza vascolare da patologia dei grandi vasi. Comprende la demenza multi-infartuale e la demenza da singoli infarti strategici.

- La demenza vascolare da patologia dei piccoli vasi. Viene essenzialmente suddivisa in due gruppi: la Demenza Vascolare Ischemica Sottocorticale SIVD (la malattia di Binswanger, lo stato lacunare e la CADASIL, un disturbo con ereditarietà autosomica dominante) e la demenza cortico-sottocorticale.
- La demenza vascolare da ischemia-ipoperfusione. Riguarda alcune forme encefalopatiche causate da anossia diffusa, danno limitato da vulnerabilità selettiva e da infarto incompleto della sostanza bianca. I
- La demenza vascolare emorragica. Raggruppa le forme di demenza legate a ematoma subdurale traumatico, emorragia subaracnoidea ed emorragia cerebrale [80].

Epidemiologia

Nei paesi occidentali la VaD è, dopo la malattia di Alzheimer (AD), la seconda causa più comune di demenza, soprattutto negli individui anziani. Una meta-analisi, basata su diversi studi europei che indagavano l'incidenza della demenza, ha mostrato che la VaD costituisce il 17.6% di tutti i casi di demenza [84]. In Europa e nel nord America, l'AD è molto più comune rispetto alla VaD con un rapporto di 2:1; al contrario in Cina e Giappone essa rappresenta quasi il 50% delle demenze [84]. Studi epidemiologici hanno inoltre evidenziato che la demenza associata a malattia cerebrovascolare aumenta con l'età passando dall'1.5% fra i 75 e 79 anni a oltre il 16% dopo gli 80 anni [85].

In Italia la prevalenza della VaD varia dal 22 al 45% mentre l'incidenza è del 27% rispetto a tutti i tipi di demenza. Sulla base dello studio ILSA si suppone che ogni anno, in Italia, ci saranno 40.000 nuovi casi di VaD e 150.000 di demenze in generale [86]. Come conseguenza dell'invecchiamento della popolazione mondiale, è previsto un aumento della prevalenza di questa malattia che quindi, al

pari dell'AD, è destinata a diventare un'importante emergenza socio-sanitaria mondiale.

Quadro clinico

La sintomatologia è eterogenea a causa della qualità e della localizzazione delle lesioni vascolari che possono essere dovute a diversi meccanismi come embolie, trombosi, malattia dei piccoli vasi, lacune e alterazioni della sostanza bianca. Le vie canoniche per una diagnosi di VaD, prevedono, oltre alle manifestazioni classiche della demenza, l'evidenza di una malattia cerebrovascolare dimostrata dall'esame clinico e dalle immagini radiologiche cerebrali, che soddisfino i requisiti minimi di manifestazione di lesioni ed una correlazione temporale con i disturbi.

I sintomi che possono manifestarsi in presenza di VaD possono comprendere manifestazioni cognitive/comportamentali e disturbi motori di varia natura e gravità. La loro insorgenza può essere improvvisa (come avviene dopo un ictus) oppure lenta e caratterizzata da peggioramento progressivo (ad es., in caso di micro-ictus ripetuti o in presenza di aterosclerosi diffusa). Nella MID invece il decorso non è costantemente progressivo ma "a scalini" cioè con l'alternarsi di lunghe stabilizzazioni della sintomatologia e con fluttuazioni della gravità da un giorno all'altro. Verosimilmente ogni scalino rappresenta un nuovo evento ischemico o emorragico che produce un peggioramento del quadro clinico.

Dal punto di vista cognitivo, la memoria non è gravemente compromessa, mentre prevalgono le alterazioni delle funzioni esecutive, come il rallentamento psicomotorio, il deficit nella formulazione di obiettivi (iniziare, pianificare, organizzare) e nel pensiero astratto. Sono comuni anche depressione, cambiamenti della personalità e labilità emotiva.

La MID e la SID si presentano con un quadro prevalentemente di demenza corticale. Come già detto, nella MID il deterioramento cognitivo si manifesta a scalini piuttosto che con lenta progressione. In occasione di nuovi eventi vascolari i pazienti improvvisamente peggiorano per migliorare poi parzialmente o del tutto. Con il progredire della malattia si accentuano i sintomi neurologici, quali asimmetria dei riflessi, sindrome pseudobulbare (presenza di disartria, disfagia, incontinenza emotiva, riso e pianto spastico), comparsa di riflessi patologici (riflesso di Babinski) e disturbi sensitivi. Nella SID, caratterizzata da molti piccoli infarti corticali e sottocorticali, ad ogni evento infartuale, oltre ai sintomi neurologici, si verifica una accentuazione del deterioramento cognitivo e dell'abilità funzionale. Gli infarti del giro angolare si presentano con esordio acuto di afasia fluente, alessia, agrafia, disturbi della memoria, disorientamento spaziale e disturbi dell'abilità costruttiva. Una profonda amnesia a insorgenza improvvisa fa orientare verso un'ischemia ippocampale bilaterale. Gli infarti dell'arteria cerebrale posteriore provocano amnesia, agitazione psicomotoria, allucinazioni visive, confusione e deficit visivi. Gli infarti dell'arteria cerebrale anteriore determinano abulia, afasia motoria, deficit mnesici e aprassia. Le lesioni dei territori irrorati dall'arteria cerebrale media sono responsabili di grave afasia, disturbi motori e sintomi confusionali. Gli infarti del lobo parietale si manifestano con marcate anomalie cognitive e comportamentali e disturbi della percezione spaziale. Le lesioni vascolari a carico del talamo si manifestano con apatia, riduzione dell'attenzione, rallentamento del pensiero, afasia, amnesia e anosognosia.

Le demenze da alterazioni dei piccoli vasi e alcune forme di MID in cui le lesioni ischemiche si estendono in profondità nella sostanza bianca si presentano con un quadro clinico di demenza sottocorticale. Tale condizione è caratterizzata da rallentamento dei processi mentali

(bradifrenia), indecisione, scarsa capacità organizzativa, difficoltà di adattamento ai cambiamenti ambientali, difficoltà di attenzione e comparsa di apatia.

La SIVD presenta lesioni che sono prevalentemente localizzate a livello dei gangli della base, della sostanza bianca del cervello e del mesencefalo. La SIVD è generalmente associata a ipometabolismo e ipoperfusione corticale e secondariamente ad atrofia corticale ed ippocampale. Il quadro clinico è piuttosto complesso e rappresentato da sintomi neurologici e cognitivi. I sintomi neurologici comprendono generalmente disturbi piramidali e del linguaggio, disturbi pseudobulbari e deambulazione a piccoli passi. Inoltre, sintomi cerebellari (atassia) ed extrapiramidali (peggioramento della deambulazione, rallentamento e compromissione dei movimenti complessi, compromissione della postura, rigidità del tronco e degli arti). Si registrano anche frequenti cadute, crisi epilettiche ed incontinenza urinaria. Dal punto di vista cognitivo, sono importanti un rallentamento psicomotorio relativo alla perdita del controllo delle funzioni esecutive, smemoratezza, alterazioni del linguaggio, delle emozioni e dell'umore.

Fattori di rischio

I fattori di rischio per lo sviluppo della VaD corrispondono ai fattori di rischio per lo stroke anche se vi sono alcuni elementi che sono esclusivi di questa condizione.

- Fattori demografici: età avanzata, etnia (asiatici), sesso (maschi).
- Fattori aterogenici: fumo, ipertensione, malattie cardiache, diabete, iperlipemia, l'ipercolesterolemia, l'iperomocisteinemia, l'iperfibrinogenemia.
- Fattori non-aterogenici: consumo di alcol, uso dell'aspirina, stress psicologici, esposizione a pesticidi, erbicidi...

- Fattori genetici: esistono una serie di mutazioni associate al vascular cognitive impairment (VCI). La più comune di queste è una mutazione di frame shift sul gene Notch-3 che causa la CADASIL [87]. Altre vasculopatie ereditarie includono la CAAs familiare, dovuta a mutazioni dell'APP e la CARASIL dovuta a mutazione di HTRA1. La presenza dell'allele $\epsilon 4$ dell'apolipoproteina E è associata ad un aumentato rischio di CAA mentre sia l'allele $\epsilon 4$ che l' $\epsilon 2$ sembrerebbero essere associati ad un aumento del rischio di emorragie lobari. Ancora non è chiara l'associazione fra tra l'apolipoproteina E e la VaD sporadica [88].
- Fattori socio-economici: provenienza da aree rurali, basso grado di istruzione [89].

Nella maggior parte dei casi il rischio maggiore per possibili lesioni vascolari, declino cognitivo e demenza è rappresentato dall'ipertensione: un'elevata pressione sanguinea misurata in soggetti di mezza età aumenta il rischio di demenza e accelera il declino cognitivo età correlato. Un'adeguata terapia antipertensiva può ridurre l'incidenza di stroke ed il declino cognitivo conseguente [86].

Criteri diagnostici

Per la diagnosi di VaD sono stati proposti vari criteri: il *California Alzheimer's Disease Diagnostic and Treatment Centres* (ADDTC, Chui et al., 1992), il *National Institute of Neurological Disorders and Stroke and the Association Internationale pour la Recherche et l'Enseignement en Neurosciences* (NINDS-AIREN, Román et al., 1993), l'*International Classification of Diseases* (ICD-10, World Health Organization, 1993) e il *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th ed, Text Revision* (DSM-IV-TR, American Psychiatric Association, 2000). La sensibilità e la specificità di questi criteri è diversa, anche in relazione alle finalità che si propongono.

Nella pratica clinica viene comunemente utilizzata l'*Hachinski ischemic score* (HIS), una scala diagnostica che guida l'anamnesi e l'esame obiettivo del paziente con demenza.

Hachinski Ischemic Score (HIS)

Caratteristiche cliniche	Punteggio
Esordio acuto	2
Progressione a gradini	1
Decorso fluttuante	2
Confusione notturna	1
Relativa conservazione della personalità	1
Depressione	1
Manifestazioni somatiche	1
Labilità emotiva	1
Ipertensione	1
Pregresso infarto cerebrale	2
Sintomi focali	2
Segni focali	2
Segni di aterosclerosi	1

L'HIS permette di distinguere con buona sensibilità e specificità la VaD dall'AD. Vengono assegnati da 1 a 2 punti per ogni elemento presente all'anamnesi o all'esame obiettivo del paziente. Un totale maggiore di 7 è indicativo di VaD, mentre un punteggio inferiore a 4 di demenza degenerativa.

I criteri ADDCT combinati con l'HIS sono molto sensibili mentre i NINDS-AIREN associati all'HIS risultano essere i criteri più specifici [90].

Criteri NINDS-AIREN per la diagnosi di VaD

La definizione di VaD prevede la presenza di demenza, l'evidenza di una malattia cerebrovascolare confermata dalla storia del paziente o dall'esame clinico o dalle immagini radiologiche cerebrali e un'associazione temporale tra i due disturbi (insorgenza della demenza entro 3 mesi dallo stroke).

Le caratteristiche cliniche che supportano la diagnosi di VaD sono:

- improvviso deterioramento dello stato cognitivo, entro 3 mesi da uno stroke e un peggioramento progressivo con decorso fluttuante o a gradini;
- storia di disturbo della marcia e di cadute frequenti;
- incontinenza urinaria precoce rispetto all'esordio della malattia;
- all'esame neurologico le caratteristiche tipiche includono: a) presenza di reperti focali come emiparesi o deficit del facciale inferiore; b) perdita sensoriale (soprattutto alterazioni del campo visivo); c) sindrome pseudo-bulbare con incontinenza emotiva; d) segni extrapiramidali (rigidità e acinesia), soprattutto nella malattia di Binswanger e, molto più raramente, anche nella VaD; e) depressione, variazione del tono dell'umore e altri sintomi psichiatrici.

Per fare diagnosi è importante valutare i soggetti che hanno subito uno stroke nella fase acuta sottoponendoli al *Mini Mental State Evaluation* (MMSE) così da indagare un possibile deterioramento cognitivo. Più tardi i pazienti possono essere sottoposti ad altri test neuropsicologici quali per esempio le scale IADL e ADL, la scala di Cornell e le matrici di Raven, così da meglio definire le disfunzioni cognitive in questi pazienti [15].

Tecniche di neuroimaging

Non esistono immagini TAC o RMN patognomoniche per la VaD, ovvero non esistono immagini TAC o RMN talmente caratteristiche della VaD da permettere da sole di formulare tale diagnosi. Nei casi di forme molto iniziali, casi dubbi o per una migliore diagnosi differenziale con l'AD, si fa ricorso a tecniche con migliore accuratezza diagnostica come la tomografia ad emissione di positroni (PET), e la tomografia computerizzata a emissione di fotoni singoli (SPECT). La PET ha dimostrato un'affidabilità del 90% nella differenziazione dei soggetti dementi dai non dementi e può essere utile nella diagnosi

differenziale fra AD e VaD in quanto in quest'ultima si rilevano anormalità focali ed asimmetriche. La SPECT, più economica della PET misura il flusso ematico nel cervello (legato alle variazioni del metabolismo del glucosio), che nei malati di Alzheimer è minore rispetto ai soggetti sani quindi può essere utilizzata per differenziare le varie forme di demenza ed identificare i soggetti non dementi. L'uso estensivo della PET e della SPECT trova un limite dalla scarsa disponibilità delle metodiche e dal loro costo elevato. Inoltre, non migliorando la diagnosi quando il paziente è già stato valutato correttamente dal punto di vista clinico ed è già stato sottoposto a TAC o RMN. PET e SPET vengono utilizzate prevalentemente a fini di ricerca. Dagli esami TAC e RMN devono essere presi in considerazione il volume, la localizzazione e il numero degli infarti per effettuare le correlazioni clinicopatologiche. Infarti multipli suggeriscono una causa tromboembolica, uno stato lacunare potrebbe essere dovuto a uno stato ipertensivo non controllato, mentre infarti nelle zone di perfusione terminale orientano verso uno stato ischemico da stenosi carotidea.

Eziopatogenesi

Un ictus, una malattia dei piccoli vasi o una combinazione di entrambi, possono portare alla VaD. Il blocco dei piccoli vasi può essere causato dalla formazione di coaguli sanguigni conseguenti ad un accumulo di placche sulle pareti interne delle arterie. Si stima, infatti, che circa il 50% dei casi di VaD sia dovuta all'ipertensione, mentre cause meno comuni sono associate a malattie infiammatorie autoimmuni delle arterie. Il ruolo fondamentale giocato dai vasi sanguigni cerebrali, in numerose patologie caratterizzate da decadimento cognitivo, sottolinea l'importanza delle strutture vascolari in un cervello sano. Data l'elevata richiesta di energia e la mancanza di una propria riserva energetica, il cervello necessita di un continuo e ben regolato apporto di sangue [89, 91]. Il SNC è dotato di un sofisticato sistema di

regolazione della circolazione sanguigna per cui, ad un'aumentata richiesta di energia da parte dei neuroni, degli astrociti o delle cellule vascolari, risponde attraverso una serie di meccanismi biologici che coinvolgono ioni, metaboliti dell'acido arachidonico, ossido nitrico, adenosina, neurotrasmettitori e neuropeptidi [92].

Un'eventuale riduzione della perfusione cerebrale può provocare un decadimento cognitivo, che può essere transiente o permanente. Conseguenze di una disfunzione endoteliale sono: lo stress ossidativo, che è probabilmente un evento precoce che può portare danni nella sostanza bianca; la riduzione del flusso sanguigno cerebrale e alterazioni nella permeabilità della BEE. A sua volta, l'ipoperfusione e l'alterazione della BEE possono causare un ulteriore stress ossidativo inducendo ipossia tissutale e lo stravasamento di proteine plasmatiche, quali il fibrinogeno. L'edema tissutale conseguente alla maggiore permeabilità della BEE può esacerbare queste alterazioni comprimendo i vasi sanguigni e riducendo ulteriormente il flusso cerebrovascolare. L'ipossia tissutale e lo stress ossidativo possono attivare una risposta infiammatoria mediante la trascrizione di fattori NF κ B-dipendenti capaci di produrre citochine e molecole di adesione nelle cellule vascolari, negli astrociti e nella microglia. L'ipossia, l'infiammazione e il danno ossidativo portano alla demielinizzazione e l'aumentato fabbisogno energetico degli assoni, privati della mielina, aggrava lo stress ipossico del tessuto, portando ad un circolo vizioso che esacerba il danno ai tessuti.

La VaD risulta come conseguenza di un insulto ischemico come un'emorragia o un'ipoperfusione che, privando le cellule neuronali del normale apporto energetico, porta alla neurodegenerazione [93-95]. Questa deprivazione risulta in una riduzione della fornitura di ossigeno e di glucosio ai neuroni e in una depolarizzazione della membrana con conseguente aumento del rilascio di glutammato. Questo va ad attivare il complesso N-metil-D-aspartato (NMDA) [96,

97] provocando un afflusso di Ca^{2+} fino a raggiungere livelli di tossicità dovuti all'attivazione di enzimi calcio-dipendenti [98].

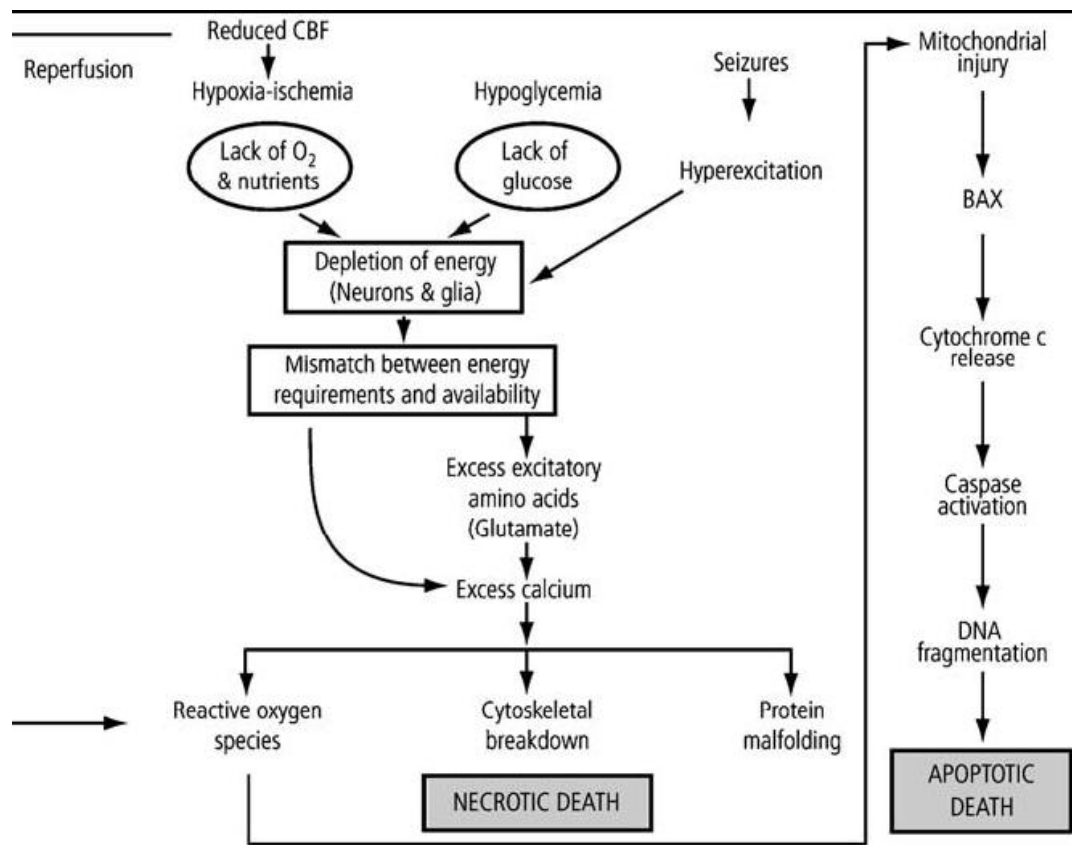


Fig. 10: Meccanismo di necrosi nella VaD [94].

Nei soggetti con VaD la morte delle cellule neuronali è dovuta a numerosi fattori. Sicuramente un ruolo centrale è giocato dall'excitotossicità e dalla riduzione dell'apporto energetico, soprattutto nel cuore della regione ischemica. Non è però da sottovalutare il ruolo svolto dall'infiammazione.

LA DEMENZA MISTA

Meccanismi neurodegenerativi e vascolari possono coesistere in soggetti con decadimento cognitivo, in particolare in individui anziani [99, 100]. Vi è una sovrapposizione fra le patologie cerebrovascolari e neurodegenerative nei pazienti con AD e con VaD; esiste, infatti, uno spettro di pazienti con caratteristiche comuni ad entrambe le demenze che rientrano della definizione di demenza mista [101]. Il 40% dei pazienti con VaD presenta in concomitanza anche l'AD, mentre infarti, patologie microvascolari ed emorragie sono spesso osservate nei pazienti con AD. Queste osservazioni hanno reso, negli ultimi anni, il confine fra l'AD e la VaD sempre più sfocato.

Danni vascolari possono peggiorare la demenza in presenza di placche di amiloide o grovigli neurofibrillari, andando ad aggravare il quadro neurodegenerativo. Inoltre, è ormai noto come fattori di rischio cardiovascolari aumentino la probabilità di sviluppare AD [102, 103]. Studi recenti hanno evidenziato il ruolo delle malattie cerebrovascolari non solo come causa primaria di decadimento cognitivo, ma anche come coadiuvanti nel peggioramento di una demenza causata da altri fattori, come ad esempio l'AD [99, 104, 105]. Ad oggi, ancora non si è data risposta alla domanda se l'AD e la VaD siano patologie coesistenti ma non correlate, o se siano, invece, il risultato di meccanismi patologici sinergici.

In numerosi pazienti i marcatori di danno vascolare coesistono con i tradizionali marcatori di AD [106]. In alcuni casi le alterazioni tipiche dell'AD possono essere indotte da specifiche forme di danno vascolare; per esempio, le disfunzioni della BEE possono incidere sul trasporto dell'A β dal cervello alla periferia e viceversa, contribuendo così al deposito di questa proteina. D'altra parte l'AD può causare danno

vascolare nella misura in cui lo stato infiammatorio indotto dall' A β danneggia l'endotelio [107].

LA RICERCA DI MARCATORI PERIFERICI

Fare diagnosi nei diversi casi di demenza risulta molto difficoltoso. Un biomarcatore è una caratteristica che può essere misurata e valutata in modo obiettivo ed è indicativa di un normale processo biologico, di un processo patologico o della risposta ad un determinato trattamento terapeutico [108]. Grossi sforzi sono stati fatti nelle ultime decadi per cercare di trovare marcatori rilevanti; il razionale risiede nel fatto che un marcatore biologico fornisce per lo meno un collegamento indiretto col processo di malattia o idealmente correla direttamente col meccanismo primario della malattia. Dato che marcatori dei meccanismi patogenetici sono stati visti nei liquidi biologici e nei tessuti periferici, molti di loro sono stati proposti come strumenti diagnostici “in vivo”. La loro importanza è sottolineata dalla necessità di discriminare tra i vari tipi di demenza e dall'evidenza che le terapie, per essere efficaci, devono essere intraprese nelle prime fasi di malattia o addirittura negli stadi preclinici. A parte le mutazioni genetiche finora nessun singolo test biologico ha raggiunto un grado affidabile di sensibilità e specificità per una diagnosi di certezza “in vivo” sia per quanto riguarda l'AD che la VaD [109]. Più recentemente, tuttavia, combinazioni di diversi marcatori biologici hanno mostrato maggior affidabilità; pertanto, la ricerca su di essi è attualmente in evoluzione. Un marcatore biologico ideale potrebbe identificare la malattia ad uno stadio molto precoce, prima che i sintomi cognitivi vengano evidenziati dai test neuropsicologici e prima che ci siano alterazioni al neuroimaging: questi soggetti potrebbero trarre beneficio da una terapia preventiva. Un biomarcatore può essere misurato, per esempio, nella saliva, nel sudore, nel sangue, nelle urine o nel liquido cefalorachidiano.

Data la necessità di avere un marcatore facilmente reperibile, minimamente invasivo, poco costoso ma comunque utile, un materiale molto utilizzato è il sangue. Circa 500 ml di liquido cefalorachidiano vengono assorbiti ogni giorno nel sangue e numerose evidenze suggeriscono che disfunzioni della BEE, tipiche di svariate malattie neurodegenerative, possono alterare lo scambio proteico fra i fluidi [110]. Di conseguenza, la diffusione dei metaboliti, presenti nel liquor, nel sistema periferico potrebbe riflettere una neurodegenerazione e quindi offrire una fonte adatta per la ricerca di biomarcatori. Infatti sono state viste alterazioni a livello di cellule periferiche, quali i PBMCs (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*) in soggetti con AD [111] e con la demenza da infarti multipli [112]. Individuando le modificazioni biochimiche nei componenti sanguigni dei pazienti potrebbe essere possibile identificare delle “impronte” periferiche che riflettano processi degenerativi nel SNC [113]. I dati finora ottenuti evidenziano come i PBMC subiscano importanti modificazioni nei pazienti con MCI e AD, supportando così il loro possibile utilizzo come marcatori, in quanto cellule periferiche che rispecchiano alterazioni che si verificano a livello del SNC. Essi possiedono un proprio nucleo e permettono quindi di studiare sia l'espressione genica che proteica di una data molecola. Inoltre, sono cellule appartenenti al sistema immunitario (combattono l'infezione e regolano la risposta adattativa) che sembra essere più implicato nella patogenesi di numerose malattie neurodegenerative. Le modificazioni riscontrate nei PBMCs, in quanto mediatori infiammatori, potrebbero rispecchiare un'alterata risposta infiammatoria a livello centrale.

IL RECETTORE ADENOSINICO A_{2A}

L'adenosina e i suoi recettori

L'adenosina è un nucleoside purinico ubiquitario che si forma dalla defosforilazione sequenziale dell'ATP extracellulare ad opera di un'idrolasi e di una nucleotidasi. In seguito a deaminazioni successive viene poi catabolizzata ed eliminata attraverso il ciclo dell'acido urico.

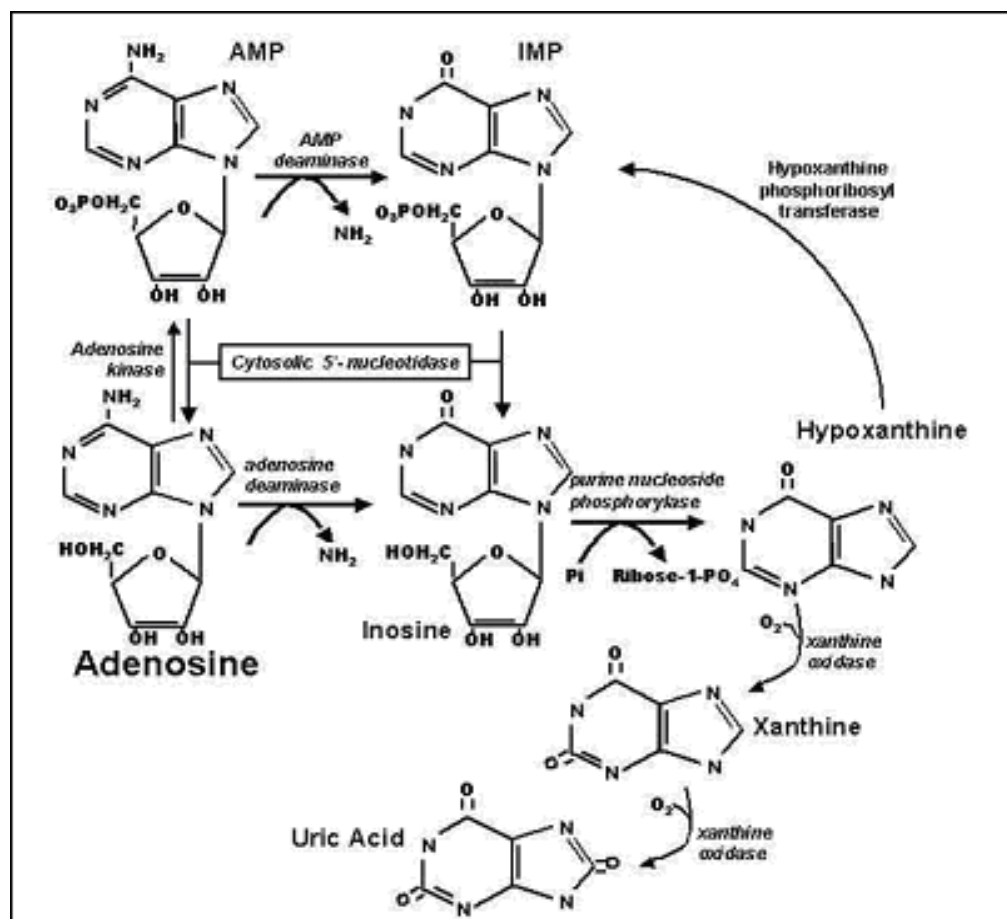


Fig. 11: Il catabolismo dell'adenosina.

È prodotta principalmente da fibroblasti, linfociti, cellule endoteliali, cellule epiteliali, miociti cardiaci, cellule muscolari e piastrine. Oltre ad avere un ruolo strutturale a livello del DNA, l'adenosina è un regolatore chiave di diverse funzioni biochimiche. L'aumento di adenosina in circolo è correlato al metabolismo dell'ATP e all'inibizione

dei meccanismi di riciclo che prevederebbero la ri-fosforilazione del nucleoside ad AMP per mezzo di una chinasi.

I suoi livelli extracellulari aumentano localmente in seguito a stress causato da eventi di ipossia, ischemia, infiammazione e aterosclerosi. Ad esempio, nel cuore isolato, l'ipossia incrementa la concentrazione extracellulare di adenosina di 20 volte, raggiungendo concentrazioni maggiori di 1 μM [114]. L'adenosina è coinvolta nella chemotassi, nell'aderenza dei neutrofilo all'endotelio e nella regolazione dei segnali colinergici a livello neuronale. Può essere rilasciata dalle cellule endoteliali per ridurre l'attivazione e la migrazione di neutrofilo ed il conseguente "burst respiratorio" (ossidazione) [115]. Inoltre, sembra che l'adenosina sia in grado di prevenire le reazioni autoimmuni perché coinvolta nell'apoptosi delle cellule T durante la selezione intratimica. Durante i processi infiammatori, l'adenosina modula la differenziazione di alcune cellule del sistema immunitario: in particolare, sembra stimolare la conversione dei monociti a macrofagi. Nel SNC svolge un importante ruolo come neuromodulatore nel controllare il flusso delle informazioni attraverso i circuiti neuronali e come regolatore dell'omeostasi cellulare. È in grado di modificare l'eccitabilità neuronale, indurre il rilascio di neurotrasmettitori quali il glutammato, l'acetilcolina, il GABA e la dopamina ed agire sulla plasticità sinaptica [116]. I livelli extracellulari di adenosina aumentano con l'attività neuronale e raggiungono livelli altissimi in caso di danno cerebrale.

Le molteplici funzioni dell'adenosina vengono mediate dal legame della molecola ai suoi recettori; ne esistono quattro tipi differenti (A_1 , A_{2A} , A_{2B} , A_3). I recettori adenosinici sono tutti recettori a sette domini transmembrana accoppiati a proteine G, costituiti da 21-28 aa per ciascuna regione transmembrana. Queste regioni sono sottoposte a fosforilazioni che sembrano essere coinvolte nel processo di desensitizzazione dei recettori.

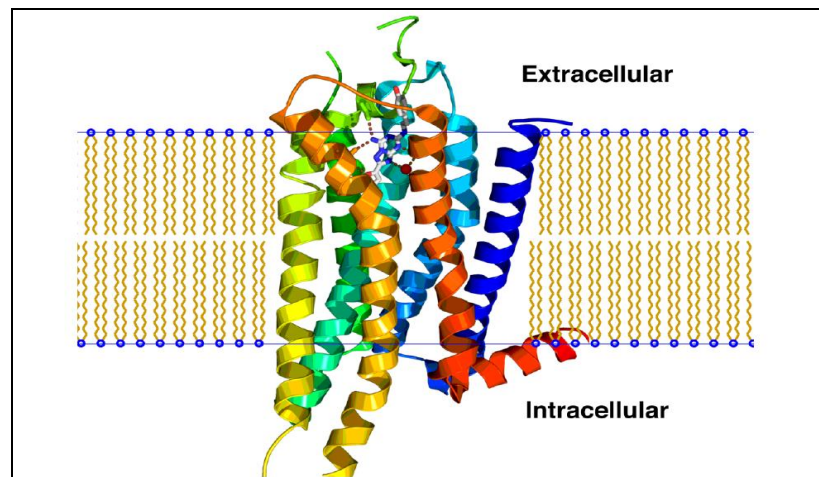


Fig. 12: Struttura dei recettori dell'adenosina.

I diversi sottotipi recettoriali sono codificati da geni differenti, che sembrano avere una struttura genomica simile; presentano, infatti, una singola regione intronica all'interno della regione codificante. Al contrario, nella struttura aminoacidica vi sono notevoli differenze sia all'interno dei quattro sottotipi recettoriali, sia, tra sottotipi uguali, nelle diverse specie animali.

Originariamente i recettori vennero classificati in base alla loro affinità per gli analoghi dell'adenosina e per l'antagonista metilxantina: A_1 e A_{2A} sono recettori ad alta affinità, mentre A_{2B} e A_3 presentano un'affinità minore [117]. Un'ulteriore suddivisione dei recettori è stata concepita in base ai loro meccanismi d'azione preferenziali, poiché A_1 e A_3 sono accoppiati a proteine G inibitorie (G_i), mentre A_{2A} e A_{2B} a proteine G stimolatorie (G_s). I due gruppi rispettivamente inibiscono e stimolano la produzione di AMP ciclico (cAMP) da parte dell'adenilato ciclasi.

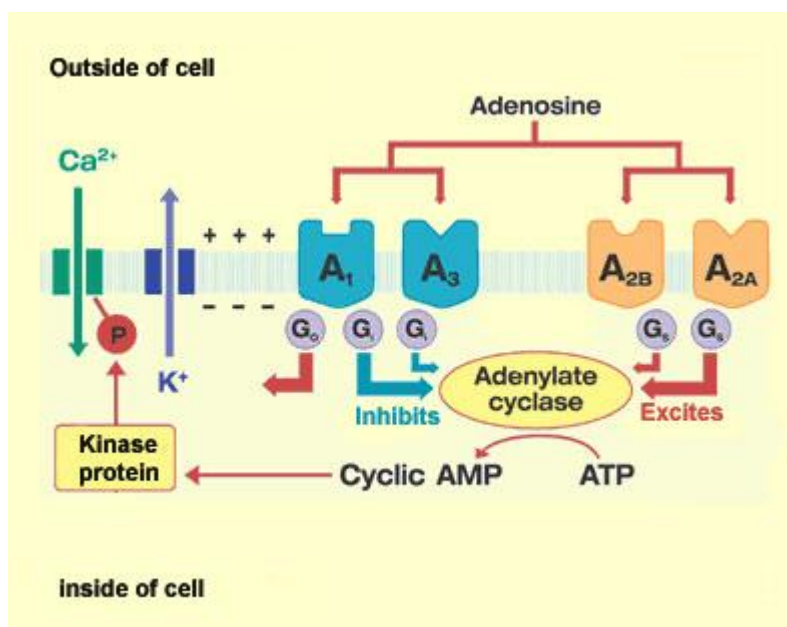


Fig. 13: Attività dei recettori dell'adenosina.

Oltre a regolare l'attività di questo enzima, i recettori adenosinici presentano altri meccanismi effettori, come i canali del calcio e del potassio, diversi tipi di fosfolipasi (C, D, A₂), il cGMP, la fosfodiesterasi e le proteinchinasi mitogene che modulano diverse funzioni cellulari.

I recettori adenosinici sono espressi sulla superficie di leucociti polimorfonucleati, monociti, macrofagi, cellule dendritiche, linfociti, piastrine e cellule endoteliali; tutte queste cellule rivestono un ruolo importante nelle risposte immunitarie ed infiammatorie e su di esse i recettori sembrano essere espressi in modo costitutivo. Studi recenti suggeriscono che le molecole infiammatorie sono in grado di regolare l'espressione di questi recettori che a loro volta, se attivati, inducono l'espressione di altre molecole pro- o antinfiammatorie a seconda del tipo recettoriale stimolato [118].

Frequentemente si trova espresso su di una singola cellula più di un tipo recettoriale suggerendo possibili interazioni tra i recettori stessi: la coesistenza di recettori adenosinici con effetti opposti sull'attività dell'adenilato ciclasi, infatti, è stata descritta in diverse cellule. Ad esempio, le cellule muscolari lisce, come anche le cellule glomerulari,

esprimono sia i recettori A_1 che A_2 [119]. La diversa affinità dei recettori per il ligando e la concentrazione extracellulare di adenosina sembrano essere di notevole importanza nel discriminare tra l'attivazione dell'uno o dell'altro recettore su di una determinata cellula.

Il recettore adenosinico A_{2A} ($A_{2A}R$)

Il gene dell' $A_{2A}R$ è localizzato sul cromosoma 22q11.23 e codifica per una proteina di 410 aa, la più grande dei quattro sottotipi recettoriali. Possiede una lunga porzione C-terminale, che pare possa avere un ruolo nell'interazione con proteine *helper* e regolatorie, che, a loro volta, interagiscono con il recettore per promuoverne le funzioni o per provocarne cambiamenti conformazionali (ad esempio la deubiquitinizzazione) indispensabili per la sua espressione e corretta attività sulla superficie cellulare [120, 121].

Questo sottotipo recettoriale è espresso ad alti livelli nel SNC, nella milza, nel timo, nei leucociti e nelle piastrine, mentre è espresso a livelli intermedi nel cuore, nei polmoni e nei vasi sanguigni. A livello del SNC, $A_{2A}R$ è presente in alte concentrazioni nello striato, mentre livelli più bassi sono stati trovati nell'ippocampo e nella corteccia [122]. Essendo l' $A_{2A}R$ accoppiato a proteine G_s , la sua attivazione provoca un aumento dell'attività dell'adenilato ciclasi, un enzima in grado di generare cAMP a partire dall'ATP [119]. L'aumento dei livelli di cAMP stimola l'attivazione del pathway della protein-chinasi A (PKA) che determina la fosforilazione e l'attivazione del cAMP *responsive element-binding protein* (CREB), un fattore di trascrizione in grado di mediare l'espressione dei geni che contengono cAMP *responsive elements* (CRE *site*), interagendo direttamente con i loro promotori. È stato dimostrato che l'attivazione di CREB è anche in grado di inibire, attraverso un meccanismo di competizione, l'attività del *nuclear factor- κ B* (NF- κ B), il principale fattore di trascrizione delle molecole pro-

infiammatorie [122]. In alcune cellule l'attivazione del recettore A_{2A} è in grado di innescare altre cascate tra cui quella delle *mitogen-activated protein chinasi* (MAPK) e anche quella di CEBP β , un fattore trascrizionale in grado di mediare la produzione di IL-10 da parte dei macrofagi [123].

L' $A_{2A}R$ agisce anche indipendentemente dal legame con le proteine G_s : l'interazione tra la sua porzione C-terminale e l' α -actinina, per esempio, comporta l'internalizzazione del recettore stesso, contribuendo in questo modo alla sua desensitizzazione [124]. Inoltre l' $A_{2A}R$ è in grado di formare eterodimeri e/o interazioni funzionali con altri recettori quali l' A_1 , il recettore della dopamina D2, i recettori metabotropici del glutammato, il recettore N-metil-aspartato (NMDAR) e i recettori dei cannabinoidi [125, 126].

L' $A_{2A}R$ è implicato nella regolazione di numerosi processi antinfiammatori quali l'inibizione dell'aggregazione piastrinica [127], la soppressione della generazione di intermediari reattivi dell'ossigeno [128, 129] e la regolazione della produzione di citochine [130].

Tutti i processi infiammatori inibiti dall' $A_{2A}R$ sono, al contrario, stimolati dall'attivazione del recettore A_1 , che ha un'affinità maggiore per il ligando; l'azione regolatoria dell'adenosina, quindi, è strettamente dipendente dalla sua concentrazione tissutale. A concentrazioni fisiologiche, l'adenosina è in grado di promuovere, attraverso il legame con il recettore A_1 , la chemotassi dei neutrofilo diretti al sito d'infezione. Al contrario, se presente ad elevate concentrazioni, come accade durante un evento infiammatorio prolungato, il nucleoside, attraverso il legame con il recettore A_{2A} , inibisce l'attivazione di ulteriori neutrofilo e modula la produzione delle citochine e delle chemochine coinvolte, in modo da limitare il processo lesivo [131].

In topi *knockout* per il gene dell' $A_{2A}R$, la somministrazione sia acuta che prolungata di stimoli infiammatori, produce danni tissutali molto

più estesi e aumenta i livelli di citochine pro-infiammatorie in circolo, rispetto ai topi *wild-type*, evidenziando il ruolo critico dell'A_{2A}R nell'attenuazione dell'evento infiammatorio [132, 133].

Numerose evidenze suggeriscono che l'espressione e l'attività di questo recettore sono regolati da diversi fattori infiammatori endogeni, come IFN- γ , IL-1 e TNF- α . Per questo motivo si è ipotizzato che il recettore rientri in un vero e proprio meccanismo di *feed-back*, in quanto le citochine infiammatorie in circolo ne aumentano l'espressione sulla superficie cellulare e, una volta attivato, esso è in grado di stimolare la produzione di citochine antinfiammatorie come IL-10, inibendo così il processo in corso ed evitando il cronicizzarsi dell'evento lesivo [134]. Questi risultati avvalorano la teoria dell'esistenza di un'attenta regolazione e di un delicato equilibrio tra l'attività delle molecole pro- ed antinfiammatorie; qualora questo equilibrio venga meno e prevalgano gli eventi infiammatori, potrebbe instaurarsi un meccanismo cronico alla base di molte patologie. Il recettore adenosinico A_{2A} potrebbe quindi svolgere il ruolo di ponte tra gli stimoli pro- ed antinfiammatori, contribuendo, una volta attivato, all'inibizione del processo infiammatorio in corso.

A_{2A}R e SNC

L'A_{2A}R è coinvolto nel mantenimento dell'omeostasi del SNC, dove gioca un ruolo di fondamentale importanza. Al di là del fisiologico processo di invecchiamento, il SNC va incontro ad alterazioni fisiche e funzionali non ancora del tutto chiare che stanno probabilmente alla base di numerose patologie correlate all'età.

Alcuni studi hanno evidenziato che anche l'espressione e la funzionalità del recettore adenosinico A_{2A} potrebbero subire variazioni nel corso dell'invecchiamento: nei ratti anziani, in particolare, sembra esservi una ridotta densità di legame del recettore A_{2A}, accompagnata da una riduzione dell'espressione del suo mRNA a livello dello striato.

Al contrario, a livello ippocampale e corticale, si assiste ad un aumento della densità recettoriale, con un incremento della trasmissione glutammatergica, probabilmente per compensare le alterazioni della trasmissione sinaptica [135]. Gli studi condotti su animali sono stati convalidati da risultati ottenuti nell'uomo mediante radioligandi [136, 137]. Studi condotti tramite PET utilizzando il ligando [¹¹C]TMSX, hanno mostrato una localizzazione dei recettori adenosinici a livello della corteccia temporale piuttosto che a livello di quella frontale e una maggiore espressione del recettore A_{2A} nell'uomo rispetto agli altri mammiferi nel talamo e nel cervelletto [138]. A livello striatale e ippocampale è stata osservata un'elevata espressione anche del recettore A₁. In queste aree l'adenosina gioca quindi un duplice ruolo, a seconda del recettore che attiva: il legame con A₁R ha un effetto inibitorio sulla trasmissione sinaptica, mentre il legame con A_{2A}R facilita il rilascio di neurotrasmettitori.

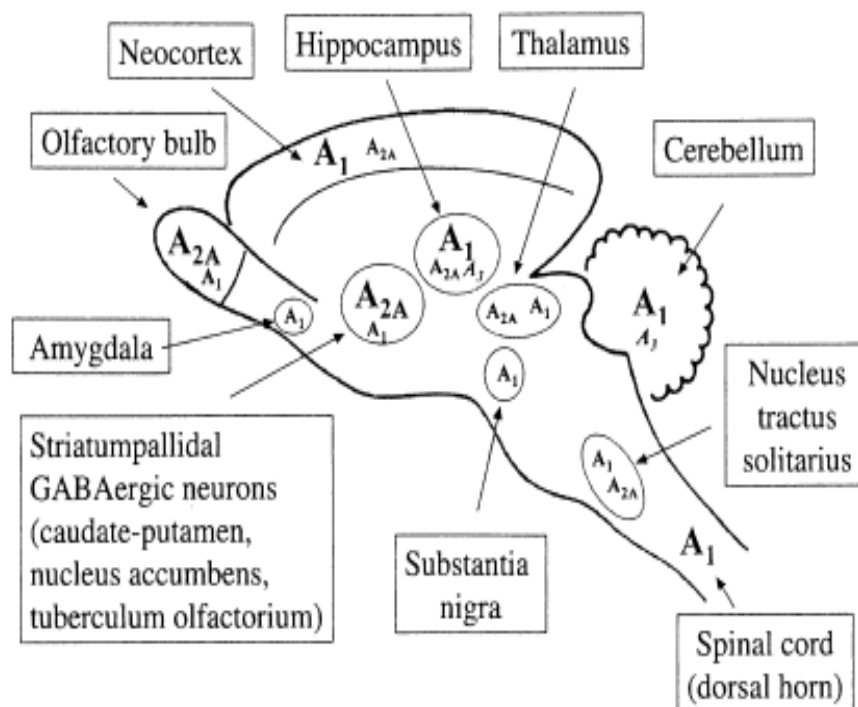


Fig. 14: Distribuzione dei recettori dell'adenosina nel SNC.

A livello del SNC, il recettore A_{2A} è espresso nei neuroni e nelle cellule gliali, ed è localizzato principalmente a livello delle sinapsi [139]. L'attivazione del recettore su una cellula piuttosto che su un'altra potrebbe essere diversa a seconda che ci si trovi in condizioni fisiologiche o patologiche. Il quadro è ulteriormente complicato dalla capacità del recettore A_{2A} di formare eterodimeri. È stato infatti dimostrato che i recettori adenosinici A_{2A} sono coespressi con i recettori dopaminergici D_2 sulla superficie delle cellule dello striato [119] e che l'eterodimerizzazione tra le due specie recettoriali inibisce la funzione del recettore D_2 [140]. In cellule di neuroblastoma umano (SH-SY5Y), ad esempio, i complessi eterodimerici A_{2A} - D_2 vanno incontro ad aggregazione ed internalizzazione se esposti in modo prolungato ad uno dei due agonisti [141]. Questi risultati avvalorano la tesi secondo cui si verifica un'interazione antagonista intramembrana delle due specie recettoriali; altri lavori dimostrano invece un'attivazione indipendente dei due recettori con effetti opposti uno dall'altro [142]. Inoltre, recenti studi hanno evidenziato una possibile interazione tra $A_{2A}R$ e i recettori per i fattori neurotrofici (Tropomyosin-related kinase Trk), caratterizzati da un dominio catalitico intracellulare in grado di attivare una cascata di fosforilazioni che coinvolge il *pathway* delle MAPK [143, 144]. L'aumento di cAMP, modulato dall'adenosina a livello neuronale, e la conseguente depolarizzazione, sono in grado di facilitare l'espressione ed il funzionamento di una molecola neurotrofica di origine cerebrale, il Brain-derived neurotrophic factor (BDNF). Il BDNF favorisce la differenziazione neuronale e la modulazione della plasticità sinaptica e regola eventi sia pre-sinaptici, con l'aumento delle vescicole attive, che post-sinaptici [145-147]. Inoltre, è noto che l' $A_{2A}R$, in presenza prolungata dei suoi agonisti, è in grado di attivare il recettore specifico per BDNF (TrkB) anche in assenza della neurotrofina. Dati recenti mostrano, quindi, che l'attivazione del recettore A_{2A} rappresenta una prerogativa

indispensabile per la funzionalità dei recettori neurotrofici a livello sinaptico [148]; i due recettori, $A_{2A}R$ e TrkB coesistono, infatti, nelle medesime terminazioni nervose. Attraverso l'attivazione del recettore TrkB, BDNF è in grado di facilitare la trasmissione sinaptica, ma questo effetto viene completamente soppresso nei topi knockout per $A_{2A}R$ o in presenza di antagonisti specifici per $A_{2A}R$ [149]. L'attivazione dell' $A_{2A}R$ è necessaria per mantenere normali i livelli di BDNF nell'ippocampo e per facilitare la *long term potentiation* (LTP) indotta dal BDNF nella sinapsi [149]. Al contrario, l'inibizione di TrkB non sembra compromettere la stimolazione della trasmissione sinaptica mediata dall' $A_{2A}R$ [150]. Inoltre, mentre il blocco di $A_{2A}R$ non sembra avere alcun effetto sull'inibizione da parte di BDNF dei trasportatori GABAergici (GAT) nei neuroni ippocampali [151], alcune evidenze confermerebbero, invece, l'azione stimolante di $A_{2A}R$ nel rilascio di GABA a livello corticale [152]. Per questi motivi, negli ultimi anni, è stato attribuito alle neurotrofine un ruolo fondamentale nella protezione dei neuroni dall'atrofia tipica dell'invecchiamento: BDNF sembra, infatti, essere coinvolto anche nella defosforilazione di τ tramite l'attivazione del pathway della fosfotidil-3-inositolo chinasi (PI3K). Bassi livelli di questa neurotrofina sono stati infatti trovati nell'ippocampo e nelle aree corticali di pazienti affetti da AD, evidenziando che una diminuzione di BDNF potrebbe quindi essere coinvolta nella patogenesi di diverse malattie neurodegenerative come l'AD, il Morbo di Parkinson e la Malattia di Huntington. Negli ultimi anni sono stati individuati diversi agonisti del recettore A_{2A} in grado di attraversare la BEE; in particolare, la somministrazione quotidiana di CGS21680 ha bloccato il progressivo deterioramento delle performance motorie in un modello murino transgenico di Malattia di Huntington [153].

Al tempo stesso anche gli antagonisti del recettore A_{2A} possono avere importanti effetti neuroprotettivi, almeno in parte indipendenti

dall'infiammazione: si sono dimostrati efficaci anche nelle colture neuronali dove non c'è nessun reclutamento microgliale. In particolare, molti studi hanno analizzato il ruolo della caffeina, antagonista selettivo dell'A_{2A}R e molecola di largo consumo che potrebbe aprire nuove strade terapeutiche. Alcuni studi comportamentali in vivo evidenziano come questa sia in grado di migliorare il declino cognitivo [154].

Il coinvolgimento dell'A_{2A}R nella regolazione della risposta infiammatoria ha portato ad ipotizzare un suo ruolo anche nella neuroinfiammazione, evento comune a numerose malattie neurodegenerative caratterizzato dall'attivazione delle cellule della microglia e da un aumento dei livelli dei mediatori dell'infiammazione. In questo caso gli antagonisti dell' A_{2A}R sembrerebbero essere in grado di prevenire la neuroinfiammazione a supporto dell'ipotesi di una capacità dell'A_{2A}R di controllare alcune malattie neurodegenerative nella cui patogenesi è coinvolta la neuroinfiammazione come l'epilessia, l'AD e la malattia di Parkinson [155].

A_{2A}R e AD

Numerose evidenze suggeriscono che l'A_{2A}R gioca un ruolo di fondamentale importanza nell'apprendimento e nella memoria [156]. Infatti, l'adenosina, attraverso l'A_{2A}R, controlla il rilascio di neurotrasmettitori quali il glutammato e l'acetilcolina che sono coinvolti nella memoria e nei processi cognitivi.

Inoltre, sempre più evidenze suggeriscono che i recettori dell'adenosina hanno una localizzazione e una densità diversa nel cervello di soggetti con AD, anche se il ruolo di questi recettori nella patogenesi di questa malattia rimane tuttora sconosciuto [157]. Infatti i pazienti affetti da AD mostrano livelli più alti dell'A_{2A}R nelle cellule gliali dell'ippocampo e della corteccia cerebrale rispetto a soggetti controllo [158]. Una modulazione dell'A_{2A}R potrebbe avere un effetto positivo nei pazienti

con AD. Gli antagonisti dell'A_{2A}R prevengono infatti la perdita di sinapsi legata alla morte neuronale dovuta alla presenza dei peptidi dell'A β [159, 160].

Un possibile meccanismo d'azione degli antagonisti dell'A_{2A}R sembra essere l'attenuazione del danno causato dai depositi di A β : la somministrazione di caffeina in topi transgenici TGR(NSEhA_{2A}), infatti, ha determinato una diminuzione dei depositi di A β a livello ippocampale, probabilmente a seguito della riduzione sia della β -secretasi, sia della PS₁, necessaria per la corretta funzionalità della γ -secretasi. La caffeina potrebbe inoltre modulare la capacità dell' α -secretasi di produrre un metabolita solubile dell'APP (sAPP α), ma i dati non sono stati ancora confermati [154].

Mentre questo meccanismo di neuroprotezione non è ancora del tutto chiaro, è invece evidente il ruolo dell'A_{2A}R nel controllo delle conseguenze neurochimiche dell'aumentata produzione di radicali liberi [161, 162] e dell'excitotossicità del glutammato [163] e che i recettori dell'adenosina possono agire sul metabolismo primario dei neuroni [164]. Queste abilità aprono la via ad un possibile uso degli antagonisti dell'A_{2A}R nel controllo delle disfunzioni sinaptiche come eventuale strategia per trattare le malattie neurodegenerative negli stadi precoci, prima che il danno neuronale sia irreversibile [165].

È noto che l'azione della caffeina sulle terminazioni colinergiche determina un significativo aumento extracellulare di acetilcolina [166], un neurotrasmettitore presente a livelli particolarmente bassi nel cervello di pazienti con AD. Studi in vitro hanno mostrato anche la capacità della caffeina di modificare la morfologia dendritica, allungando le spine dendritiche già esistenti e formandone di nuove [167]. Infine, studi condotti su topi transgenici dimostrerebbero la capacità della caffeina di aumentare in maniera significativa i livelli di adenosina extracellulare a livello ippocampale [154]. Sembrerebbe che

l'incidenza dell'AD sia inversamente associata al consumo di caffè [157].

Al contrario, studi condotti su topi *knock-out* (KO) per A_{2A}R hanno mostrato una diminuita attività esploratoria, un'aumentata aggressività, ipoalgesia e attenuate risposte psicostimolatorie [168, 169].

A_{2A}R e VaD

Condizioni di ipossia o ischemia causano un aumento dei livelli extracellulari di adenosina nel parenchima cerebrale [147]. Molti studi hanno mostrato l'importanza dell'A_{2A}R nell'ischemia; il blocco dell'A_{2A}R sembrerebbe proteggere dal danno ischemico cerebrale; infatti, il blocco farmacologico o genetico di questo recettore in seguito a ischemia coincide con una diminuita area dell'infarto e un migliore *outcome* [139, 163, 170].

Gli antagonisti dell'A_{2A}R mostrano un'azione neuroprotettiva in modelli animali di ischemia cerebrale [171-173]; la pentofillina, noto antagonista dell'A_{2A}R, sembrerebbe anche migliorare le prestazioni cognitive in pazienti con VaD [174].

Risultati controversi sono stati riscontrati in animali con età differenti: la stimolazione dell'A_{2A}R gioca un ruolo protettivo nel danno cerebrale legato ad un ischemia neonatale mentre negli animali adulti la delezione dell'A_{2A}R sembrerebbe proteggere dal danno acuto corticale mediante una soppressione dei livelli del glutammato e delle citochine infiammatorie [175, 176].

In modelli animali di ischemia globale, specifici agonisti dell'A_{2A}R hanno un effetto protettivo se somministrati a livello periferico ma nessun effetto se somministrati direttamente nell'ippocampo. In tal caso è invece neuroprotettivo antagonizzare l'A_{2A}R [139, 177]. Questo suggerisce che le proprietà neuroprotettive degli agonisti in caso di danno ischemico siano dovute ad effetti periferici mentre la

neuroprotezione degli antagonisti potrebbe essere legata ad effetti centrali [139].

In questo caso molto probabilmente gli effetti benefici degli antagonisti dell'A_{2A}R sono dovuti principalmente alla riduzione del flusso del glutammato [178, 179]. L'adenosina, mediante l'A_{2A}R, promuove il rilascio di glutammato in condizioni normali ma soprattutto in caso di ischemia e l'aumento del flusso di glutammato porta ad una cascata citotossica che induce a morte neuronale [180]. Il meccanismo è però poco chiaro in quanto il blocco dell'A_{2A}R sembrerebbe agire sul flusso del glutammato diversamente a seconda delle condizioni patofisiologiche. La stessa dose dello stesso antagonista riduce il flusso del glutammato in ratti giovani ma lo aumenta in ratti anziani e nel modello animale di malattia di Parkinson [181]. Un recente studio ha mostrato che l'effetto dell'A_{2A}R nel controllo del danno cerebrale dipende dalla concentrazione locale del glutammato. Quando i livelli di glutammato sono bassi, gli agonisti dell'A_{2A}R sembrano attenuare i cambiamenti morfologici e cellulari e dei livelli di citochine dovuti al trauma cerebrale. Al contrario, quando i livelli di glutammato sono alti, sono gli antagonisti ad avere un simile risultato positivo [182]. Se quindi si volesse puntare ad un possibile impiego degli antagonisti dell'A_{2A}R in caso di trauma cerebrale è necessario considerare i livelli di glutammato presenti.

Numerosi studi effettuati su animali *knockout* per l'A_{2A}R mostrano che la risposta infiammatoria cerebrale e/o il danno risultante da diversi modelli di insulto (ischemia/ipossia, trauma cerebrale) risulta meno grave in assenza di questo recettore e perciò l'utilizzo degli antagonisti dell'A_{2A}R potrebbe essere una strategia terapeutica utilizzabile per trattare le malattie del SNC. Inoltre, dato che l'A_{2A}R è espresso, non solo nei neuroni, ma anche nelle cellule dell'infiammazione e nelle cellule della glia, non è da trascurare la possibilità che il contributo dell'adenosina in condizioni di danno cerebrale possa essere legato ad

un'azione delle cellule infiammatorie. È interessante notare che numerosi effetti anti-infiammatori legati all'inattivazione dell'A_{2A}R nel cervello sono apparentemente in contrasto con l'effetto anti-infiammatorio dovuto all'attivazione del recettore negli organi periferici [133, 183]. Questo potrebbe essere spiegato basandosi sui livelli di glutammato presenti nei neuroni che si è visto essere in grado di modificare l'effetto dell'A_{2A}R da neuroprotettivo e anti-infiammatorio a citotossico e pro-infiammatorio [182].

Paradosso dell'A_{2A}R

Gli effetti positivi che, in modo apparentemente paradossale, interessano a volte gli agonisti e altre volte gli antagonisti dell'A_{2A}R riflettono la complessità dei meccanismi d'azione di questo recettore sulle varie componenti neuronali, gliali e vascolari, ciascuna delle quali può avere un ruolo nel danno cerebrale [184]. Il ruolo, a volte dannoso e a volte protettivo, dell'attivazione dell'A_{2A}R suggerisce che l'effetto possa dipendere dal tipo di danno, dalle condizioni patologiche associate e dal “*timing*” di attivazione del recettore. L'effetto complessivo dell'azione del recettore A_{2A} sarebbe dunque il risultato del bilanciamento dei diversi sistemi attivati dal recettore. L'A_{2A}R sarebbe in grado di regolare finemente le funzioni neuronali e gliali andando a bilanciare le azioni a livello pre- e post-sinaptico nei diversi elementi cellulari [136].

SCOPO DEL LAVORO

La malattia di Alzheimer (AD) è la più comune affezione degenerativa e rappresenta l'80-85% di tutti i casi di demenza conosciuti. La seconda causa di demenza, nei paesi occidentali, è invece la demenza vascolare (VaD). La diagnosi di demenza necessita di un approccio multidisciplinare che utilizzi una combinazione di criteri clinico-diagnostici sensibili e specifici e di marcatori biochimici che permettano il riconoscimento della malattia fin dal suo esordio. La possibilità di una coesistenza di meccanismi neurodegenerativi e vascolari in soggetti con decadimento cognitivo, in particolare in individui anziani, rende il confine fra AD e VaD molto sfocato.

Questa evidenza palesa la necessità di individuare una combinazione di marcatori biologici precoci che possano essere considerati predittivi della malattia e che sappiano discriminare fra le diverse forme di demenza. Nuove linee di ricerca si stanno concentrando sulla possibilità di individuare marcatori in modelli periferici facilmente reperibili.

Il recettore dell'adenosina A_{2A} ($A_{2A}R$) è un recettore ubiquitario in grado di modulare la risposta infiammatoria sia a livello periferico che a livello del sistema nervoso centrale; sembra inoltre essere implicato nella neuroprotezione e nella regolazione della trasmissione sinaptica.

Con questo lavoro, abbiamo voluto analizzare l'espressione genica e la densità recettoriale dell' $A_{2A}R$ nelle cellule mononucleate periferiche del sangue (PBMCs) di pazienti con AD, VaD e MCI, confrontati con soggetti sani. Lo scopo è quello di comprendere meglio l'interessamento dei tessuti periferici nei processi neurodegenerativi e identificare un potenziale biomarcatore facilmente dosabile e valutabile che permetta una diagnosi differenziale fra AD e VaD. L'acquisizione di nuove

informazioni sul ruolo dell'A_{2A}R nella neurodegenerazione potrebbe rappresentare un importante punto di partenza per futuri studi sul suo ruolo nell'insorgenza e nella progressione di diversi tipi di demenza.

MATERIALI E METODI

DISEGNO DELLO STUDIO

Sono stati reclutati 85 pazienti con AD (età media 78.3 ± 0.6 anni), 40 pazienti con VaD (età media 82.6 ± 0.9 anni), 71 pazienti con MCI, di cui 13 con diagnosi di aMCI (età media 78.9 ± 2.2 anni) e 58 affetti da mcdMCI (età media 78.6 ± 0.8 anni) e 76 soggetti di controllo (CT) che non mostrano deficit cognitivi (età media 80.8 ± 0.8 anni); tutti i soggetti sono paragonabili per sesso e per età. I soggetti sono stati selezionati da un più vasto gruppo di pazienti seguiti presso l'Unità Operativa di Geriatria della Fondazione IRCCS Ca' Granda, Ospedale Maggiore Policlinico, Dipartimento di Scienze Cliniche e di Comunità dell'Università degli Studi di Milano.

La diagnosi clinica di AD è stata ottenuta applicando i criteri DSM-IV e NINCDS-ADRDA [12], la diagnosi di MCI è stata posta secondo i criteri di Petersen [71] mentre la diagnosi di VaD applicando i criteri NINCDS-AIREN [86]. Lo stato funzionale dei soggetti è stato valutato per mezzo degli indici di Katz e di Lawton (ADL e IADL), le funzioni cognitive sono state accertate attraverso il Mini-Mental State Examination (MMSE) e un'estesa valutazione neuropsicologica. A supporto della diagnosi, ogni paziente è stato sottoposto a un esame di neuroimaging (risonanza magnetica nucleare o tomografia computerizzata). Sono stati reclutati solo i soggetti che non presentavano segni clinici o subclinici di infiammazione in atto; sono stati quindi esclusi i pazienti con alterati valori di velocità di eritrosedimentazione, globuli bianchi e formula leucocitaria, albumina, proteina C reattiva, transferrina.

Per la selezione dei soggetti controllo sono stati utilizzati i seguenti criteri per la diagnosi di stato cognitivo normale:

- assenza di disturbi neurologici o psichiatrici in atto,
- assenza di patologia o trattamento farmacologico che potessero influenzare la funzione cognitiva,
- esame neurologico normale,
- assenza di terapia psicoattiva,
- capacità di vivere e di svolgere le attività quotidiane in maniera indipendente.

I prelievi di sangue venoso sono stati effettuati tutti alla stessa ora, al mattino, a digiuno. Il consumo di caffeina giornaliero per ogni individuo è risultato pari o inferiore a 80mg (circa una tazza di caffè).

Da tutti i soggetti o dai loro parenti è stato ottenuto il consenso informato allo studio, preventivamente approvato dal comitato etico della Fondazione.

ISOLAMENTO DI CELLULE MONONUCLEATE PERIFERICHE (PBMCs)

Le cellule mononucleate periferiche sono state isolate a partire da tre provette Vacutainer contenenti EDTA come anticoagulante (Becton Dickinson Co., Rutherford, NJ). Dopo una centrifugazione a 4000 rpm per 15', il plasma è stato eliminato mentre la parte corpuscolata del sangue, raccolta in una provetta Falcon, è stata stratificata su 15 ml di Ficoll (Lympholyte, Cedarlane) e centrifugata per 25' a 2300 rpm. Al termine della centrifugazione si osserva la presenza di un anello di cellule (PBMCs) che viene prelevato e trasferito in una nuova falcon, diluito in PBS e centrifugato per 15' a 1900 rpm ottenendo così il pellet cellulare. Il pellet è stato quindi diviso a seconda delle necessità sperimentali: una parte per l'estrazione di proteine (pellet congelato secco a -80 °C) ed una parte per l'estrazione dell'RNA (pellet risospeso in 1ml di Guanidina Isotiocianato (GITC) e congelato a -80 °C).

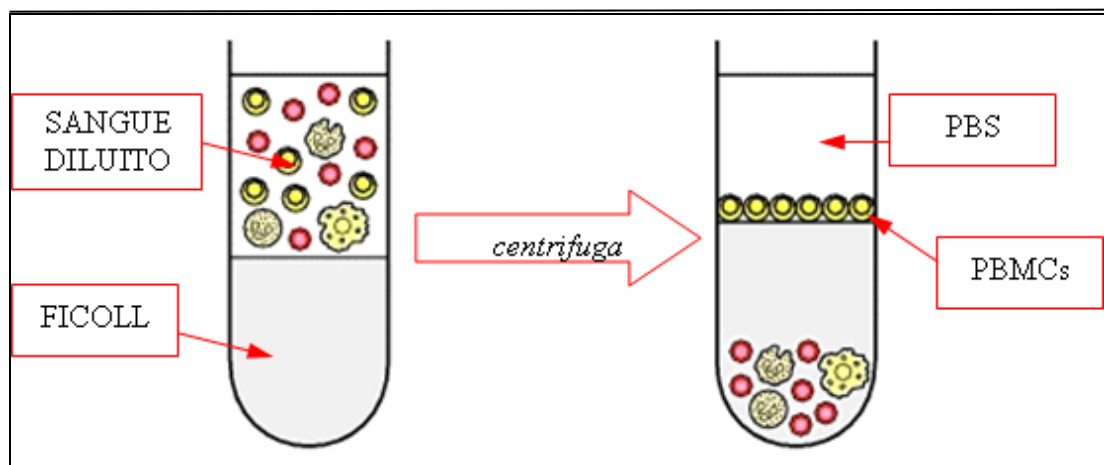


Fig. 16: Separazione PBMCs.

ESPRESSIONE GENICA DELL'A_{2A}R

Estrazione dell'RNA

Il pellet di PBMCs risospeso in 1 ml di GITC viene addizionato di:

- 100 µl di Na-acetato 2M pH 4
- 1 ml di fenolo saturato in acqua
- 1 ml di cloroformio/alcol isoamilico (CHCl₃/IAA – 49/1)

Il preparato è stato incubato 20' in ghiaccio e successivamente centrifugata a 4°C ad una velocità di 11000 rpm per 1 h. Al sovrantante sono state aggiunte quantità stechiometriche di isopropanolo e i campioni sono stati miscelati per inversione. Dopo un'ulteriore incubazione a –20°C per 1 h, i campioni sono stati nuovamente centrifugati a 4°C a 10000 rpm per 1 h. Dopo aver eliminato tutta la fase liquida, il pellet è stato risospeso in 300 µl di GITC. Sono stati quindi aggiunti 2.5 volumi (750 µl) di etanolo assoluto e la preparazione è stata messa in incubazione over-night a –20°C e il giorno seguente centrifugata a 4°C a 15000 rpm per 1 h.

Il pellet è stato quindi lavato con etanolo ed asciugato in stufa a vuoto. Infine, è stato risospeso in 20 µl di H₂O sterile e congelato a –80°C. Anche in questo caso, come per il DNA, si effettua una lettura allo spettrofotometro a 260 nm per determinare la quantità di RNA presente nel campione. Nel caso dell'RNA il valore unitario della densità ottica corrisponde a 40 µg. Quindi la concentrazione del campione sarà uguale all'assorbanza moltiplicata per 40. È stato poi calcolato il rapporto tra l'assorbanza a 260 nm e quella a 280 nm per stimare il grado di purezza dell'estratto; in questo caso è ottimale un rapporto pari a 2.

Retrotrascrizione

Dopo l'estrazione è stata eseguita, a partire da 2µg di RNA la reazione di RT-PCR che permette di sintetizzare, a partire da molecole di RNA a singolo filamento, le corrispondenti molecole di cDNA a doppio filamento così che possano venire analizzate mediante Real Time PCR. Per ogni campione da retrotrascrivere è stata preparata la seguente miscela:

- 2µg di RNA
- 1µl di oligodT 10pM
- 1µl di dNTP 10pM
- 4µl di buffer
- 1µl di MMLV 1U
- 0.5µl di RNAsi Inhibitor

Dopo la preparazione la miscela è stata sottoposta ai seguenti step:

- 2 minuti a 70°C
- 1h a 42 °C
- 5 minuti a 94°C

Real Time PCR

La metodica di Real Time Polymerase Chain Reaction (Real Time PCR) consente una rapida quantificazione assoluta o relativa di copie di un gene o messaggero presenti in un determinato campione. La Real Time è una PCR in cinetica in cui il rilevamento dell'amplificato avviene grazie all'utilizzo di sonde marcate o agenti intercalanti che emettono un segnale di fluorescenza, misurabile dallo strumento stesso, proporzionale alla quantità di acidi nucleici amplificati.

Il "treshhold cycle" (CT) è il ciclo di PCR in cui lo strumento incomincia a misurare un segnale dovuto al prodotto di amplificazione; è una misura temporale perché indica il ciclo al quale si è raggiunta una quantità di amplificato sufficiente da essere misurata ed è indicato

dall'intersezione della curva di amplificazione con la linea soglia ("threshold line").

Il CT è correlato alla quantità iniziale di DNA o cDNA: maggiore è la quantità iniziale di DNA o cDNA, più sarà basso il CT, ovvero minore sarà il numero di cicli impiegato dal campione per raggiungere la quantità di amplificato sufficiente per essere misurata dallo strumento. Per i nostri protocolli è stato utilizzato il SYBR Green, un agente intercalante che ha la caratteristica di inserirsi tra le basi dei doppi filamenti neo-formati e di staccarsi non appena avviene la denaturazione.

Il cDNA ottenuto dalla retrotrascrizione è stato sottoposto al seguente protocollo:

- iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Italy)
- Primers 300 nM ciascuno:
 - A_{2A}R Forward: GGCTGCCCCTACACATCATC
 - A_{2A}R Reverse: GCCAGGTACATGAGCCAGAGA
 - GAPDH Forward: GATTCACCCATGGCAAATTC
 - GAPDH Reverse: TGGGATTTCCATTGATGACAAG
- Acqua sterile fino a raggiungere un volume finale di 50 µl

Dopo la preparazione, ciascuna miscela è stata sottoposta alla seguente reazione nello strumento Chromo 4 (Celbio, Italy): incubazione per 10' a 95°C e successive incubazioni di 15" a 95°C , 40" a 56°C, 30" a 72°C per 40 cicli totali. La reazione è seguita dalla fase di Melting durante la quale vi è un aumento della temperatura di 0.5° C al secondo da 56°C a 95°C per valutare l'attendibilità del nostro risultato. I risultati sono stati analizzati tramite Opticon Monitor 2 (Celbio, Italy). I valori ottenuti per ogni campione sono stati normalizzati con i valori della Gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GAPDH), un gene "housekeeping", costitutivamente espresso nelle cellule. Per questo studio è stato scelto il metodo della quantificazione

relativa poiché è particolarmente indicativo in studi di espressione genica fra due popolazioni e decisamente più semplice del metodo della quantificazione assoluta. Il modello matematico utilizzato, metodo del $2^{-\Delta\Delta CT}$, è stato descritto da et al. nel 2001 [185].

ESPRESSIONE PROTEICA DELL'A_{2A}R

Estrazione proteica

Le proteine totali sono state estratte partendo da circa 20 milioni di PBMCs. Le cellule sono state risospese ed incubate per un'ora a 4°C in agitazione con un tampone di lisi (Tris-HCl 10 mM pH 7.4, NaCl 0.15 M, EDTA 1 mM e Triton X-114 1%) contenente inibitori delle fosfatasi e delle proteasi. In seguito sono state centrifugate (12000 rpm a 4°C) ed è stato raccolto il surnatante dove sono sospese le proteine.

Dosaggio delle proteine totali

Il dosaggio della concentrazione proteica è stato effettuato con un kit commerciale (Sigma-Aldrich, Italia). Questa metodica prevede l'utilizzo di Sodio-Dodecil Solfato (SDS), presente nel Lowry Reagent, per facilitare la dissoluzione delle lipoproteine insolubili. In particolare, la procedura si basa su due reazioni chimiche: nella prima reazione il *Lowry Reagent* si lega ai peptidi delle proteine, mentre nella seconda reazione avviene la riduzione del *Folin & Ciocalteu's phenol Reagent*, con lo sviluppo di un prodotto colorato, la cui assorbanza viene letta alla spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 750 nm.

Per ricavare la concentrazione di ciascun estratto proteico (espressa in mg/ml) è stata costruita una curva di taratura utilizzando una soluzione standard di albumina sierica bovina (BSA) a concentrazione nota.

Western blot

Il Western blot o immunorilevazione è una tecnica immunochimica che permette di rilevare la presenza di una determinata proteina, in una

miscela di proteine separate elettroforeticamente, mediante il suo riconoscimento da parte di anticorpi specifici.

Per l'analisi dell'espressione della proteina di nostro interesse è stato necessario caricare 20 ug di estratto proteico.

Il tampone di caricamento (SDS 8%, Tris-HCl 0.2M pH 6.8, Glicerolo 40%, Blu di Bromofenolo 0.4%, β -mercaptoetanololo 4%) è stato aggiunto ai campioni ad un volume tale da essere diluito 4 volte nel volume finale caricato nel pozzetto. I campioni così preparati sono stati bolliti a 100°C per 5 minuti.

I gel utilizzati per la separazione elettroforetica delle proteine sono composti da una porzione di separazione (Stacking Solution) ed una porzione di corsa (Running Solution).

Per i livelli dell'A_{2A}R la Stacking Solution è al 4% di Bis-acrilamide (Bis-acrilamide 4%, Tris-HCl 1.5M pH 6.8, SDS 0.1%, APS 0.1%, TEMED 0.05%) mentre la Running Solution è al 10% di bis-acrilamide (Bis-acrilamide 10% doppio sale, Tris-HCl 1,5 M pH 8.8, SDS 10%, APS 0.1%, TEMED 0.05%). La corsa elettroforetica è stata effettuata in una camera verticale Biorad per circa 2 h e 30' con una differenza di potenziale di 24mA quando le proteine erano nella porzione di separazione e di 36mA quando erano nella porzione di corsa del gel, in presenza del tampone di corsa (Tris 25mM, Glicina 0,22mM pH 8.3, SDS 1%).

Al termine dell'elettroforesi le proteine sono state trasferite per elettroblotting su membrane di nitrocellulosa 0,45 micron (Millipore, Italia). Il trasferimento è avvenuto a 4°C in presenza di un tampone di trasferimento (Tris-Glicina 1x pH 8.3, Metanolo 28,5%) per 1h e 30' a 90V. Terminato il trasferimento, la membrana è stata incubata 60 minuti in PBS-Tween (PBS, 0.1% Tween 20) contenente latte in polvere al 5% per la fase di blocco dei siti aspecifici di legame. La membrana è stata quindi incubata over-night a 4°C con un anticorpo

primario (0.33 μ g/ml) rabbit α -Human A_{2A}R (Calbiochem) diluito 1:1000 in PBS-Tween con latte 1%.

Il giorno successivo, la membrana è stata lavata con PBS-Tween e incubata per 90' a temperatura ambiente con un anticorpo secondario perossidato α -Rabbit IgG (Chemicon International) diluito 1:2000 in PBS-Tween con latte 1%. Dopo ulteriori lavaggi con PBS-Tween, la reazione antigene-anticorpo è stata rivelata con un substrato chemiluminescente (ECL, Millipore Italia), quindi esposta alla lastra fotografica (Kodak).

La stessa membrana è stata poi fatta seccare per essere sottoposta a stripping e reprobing con un anticorpo α -GAPDH per la normalizzazione dei risultati. La membrana è stata quindi riprobata con anticorpo primario α -GAPDH (Chemicon International) diluito 1:8000 in PBS-Tween con latte 1% e successivamente incubata con un anticorpo secondario perossidato α -mouse (SIGMA) diluito 1:6000 in PBS-Tween con latte 1%. Anche in questo caso la reazione antigene-anticorpo è stata rivelata con un substrato chemiluminescente (ECL, Millipore Italia), ed esposta alla lastra fotografica (Kodak).

I quanti di luce prodotti e rilevati dalla macchina sono proporzionali alla quantità di HRP presente e, di conseguenza, alla quantità di proteina d'interesse a cui l'anticorpo si è legato. L'espressione proteica è stata determinata mediante analisi densitometrica delle bande ottenute (Kodak Molecular Imaging Station 2000R).

ESTRAZIONE DEL DNA GENOMICO

Il DNA genomico è stato ottenuto da un prelievo di sangue venoso mediante il metodo del salting out. Ai soggetti arruolati sono stati prelevati 10 ml di sangue periferico in provette Vacutainer contenenti Na-Citrato come anticoagulante (Becton Dickinson Co., Rutherford, NJ). Previa centrifugazione a 4000 rpm per 15', il plasma è stato separato dalla parte corpuscolata del sangue e quest'ultima trasferita in provette Falcon. Dopo l'aggiunta di 20 ml di Buffer A (Saccarosio 0.32 M, MgCl₂ 5 mM, Triton X-100, Tris-HCl 1 mM pH 7.5), ogni campione è stato centrifugato a 3000 rpm per 40' a 4°C per isolare selettivamente le cellule. Una volta eliminato il surnatante, il pellet è stato lavato con altri 10 ml di Buffer A e nuovamente centrifugato a 3000 rpm per 40'. Il pellet è stato quindi risospeso in 2.25 ml di Buffer B (NaCl 400 mM, EDTA 2mM pH 8, Tris-HCl 10 mM pH 8) e successivamente sono stati aggiunti 250 µl di Buffer C (SDS 5%, Proteinasi K 5 mg/ml) per lisare le cellule. La soluzione è stata incubata over-night a 37°C per permettere alla Proteinasi K di agire. Il giorno dopo ad ogni campione sono stati aggiunti 0.675 ml di una soluzione satura di NaCl 4M prima di procedere ad un'ulteriore centrifugazione a 3000 rpm per 45' a 4°C. Il surnatante, trasferito in una nuova provetta, è stato precipitato con due volumi di etanolo freddo al 100%. Mescolando per inversione si forma un flocculo di DNA che è stato prelevato, lavato con etanolo, asciugato in stufa a vuoto e risospeso in 400 µl di TE 1X (Tris-HCl 10 mM, EDTA 0.1 mM, pH 8). La concentrazione del DNA è stata valutata mediante lettura dell'assorbanza con spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 260 nm. Poiché 50 µg di DNA corrispondono a una densità ottica pari a 1, la concentrazione del campione sarà uguale all'assorbanza moltiplicata per 50. Per stimare il grado di purezza dell'acido nucleico estratto, la

misura dell'assorbanza per ogni campione è stata valutata anche a 280 nm, lunghezza d'onda alla quale solitamente si legge la frazione proteica. Il rapporto tra la lettura a 260 nm e quella a 280 nm permette di determinare l'eventuale quantità di proteine contaminanti presenti nel campione in esame. Una preparazione pura deve avere un rapporto che si avvicini a 1.8, anche se rapporti a partire da 1.5 vengono considerati sufficientemente puri da poter essere utilizzati nelle successive reazioni.

ANALISI DEL GENOTIPO DELL'APOLIPOPROTEINA E

La genotipizzazione dell'Apolipoproteina E (ApoE) è stata effettuata tramite Polymerase Chain Reaction (PCR) e successiva reazione di digestione con enzima di restrizione.

La reazione è stata allestita per l'amplificazione di un frammento di 234 bp dell'esone 4 del gene dell'ApoE. Le tre diverse forme alleliche del gene ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$ e $\epsilon 4$) sono state determinate dopo digestione con l'enzima di restrizione Cfo I e successiva corsa elettroforetica su gel d'agarosio al 4% che permette di discriminare sei diverse combinazioni alleliche:

- $\epsilon 2/\epsilon 2$: 3 frammenti rispettivamente a 33, 83 e 91 bp
- $\epsilon 3/\epsilon 3$: 4 frammenti rispettivamente a 33, 35, 48 e 91 bp
- $\epsilon 4/\epsilon 4$: 4 frammenti rispettivamente a 33, 35, 48 e 72 bp
- $\epsilon 2/\epsilon 3$: 5 frammenti rispettivamente a 33, 35, 48, 83 e 91 bp
- $\epsilon 2/\epsilon 4$: 6 frammenti rispettivamente a 33, 35, 48, 72, 83 e 91 bp
- $\epsilon 3/\epsilon 4$: 5 frammenti rispettivamente a 33, 35, 48, 72 e 91 bp

La reazione è stata allestita secondo il seguente protocollo:

- 2 μ g DNA genomico stampo
- primers 1 pM ciascuno:
 - F₄: ACAGAATTCGCCCCGGCCTGGTACAC
 - F₆: TAAGCTTGGCACGGCTGTCCAAGGA
- buffer 1x (Promega, Milano, Italia)
- MgCl₂ 1.5 mM (Promega, Milano, Italia)
- dNTPs 0,2 mM (Sigma, Milano, Italia)
- Taq DNA polimerasi 1.25 U (Promega, Milano, Italia),

- Acqua sterile fino a raggiungere un volume finale di 50 μ l

Dopo la preparazione, ciascuna miscela è stata sottoposta alla seguente sequenza di reazioni:

- 5 minuti a 96°C
- 30 cicli:
 - 1 minuto a 95°C (denaturazione)
 - 1 minuto e 10 secondi a 60°C (ibridazione)
 - 2 minuti a 70°C (estensione)
- 10 minuti a 70°C

L'amplificato è stato digerito con 1 μ l di enzima di restrizione Cfo I, incubato over-night a 37°C e caricato su gel d'agarosio al 4% (2% agarosio e 2% agarosio high resolution) per l'analisi del restriction pattern (2 h a 100 V).

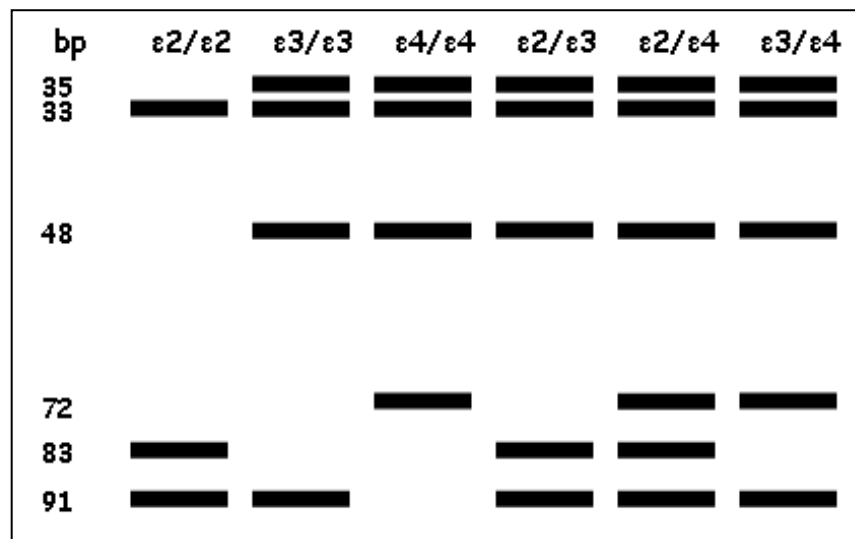


Fig. 15: Polimorfismi dell'ApoE.

ANALISI STATISTICA

I dati sono stati analizzati mediante il programma statistico SPSS/PC (SPSS versione 20, Chicago, IL).

Le differenze nei parametri, espresse come valore medio \pm errore standard, sono state calcolate utilizzando un'analisi della varianza a una via (one-way ANOVA) seguita dal test post-hoc di Bonferroni nel caso di confronti multipli. Nel caso di confronto tra due gruppi è stato utilizzato il T-test.

Le frequenze geniche ed alleliche dell'Apolipoproteina E sono state confrontate utilizzando il test del χ^2 . È stato considerato statisticamente significativo un valore di $p < 0.05$.

Per valutare l'efficacia predittiva dell'A_{2A}R come biomarcatore abbiamo utilizzato l'area sottesa alla curva (AUC) generata dalla ROC (Receiver Operator Characteristic) analisi.

RISULTATI

CARATTERISTICHE DEI SOGGETTI ARRUOLATI NELLO STUDIO

In tabella 1 sono riportati i dati anagrafici (età e sesso) e la valutazione MMSE al momento del prelievo. I risultati sono espressi come valore medio \pm errore standard per l'età e per la valutazione MMSE; mentre, per il sesso è riportata la distribuzione dei soggetti.

	AD	VaD	aMCI	mcdMCI	CT
N°partecipanti	85	40	13	58	76
Età	78.3 \pm 0.6	82.6 \pm 0.9	78.9 \pm 2.2	78.6 \pm 0.8	80.8 \pm 0.8
Sesso (M/F)	22/63	17/23	5/8	28/30	26/50
MMSE	18.6 \pm 0.9	18.3 \pm 1.2	26.0 \pm 1.4	24.8 \pm 0.6	27.9 \pm 0.2

Tabella 1: Caratteristiche dei partecipanti allo studio

Tutti i gruppi sono bilanciati per sesso e per età.

Il valore medio della valutazione MMSE, come atteso, è più basso nei pazienti con demenza conclamata rispetto agli altri gruppi ed è più alto nei controlli.

ESPRESSIONE DEL RECETTORE A_{2A} NEI PBMC_S

Nella seguente tabella (tabella 2) sono riportati i dati relativi all'espressione genica e ai livelli proteici del recettore adenosinico A_{2A}, valutati rispettivamente mediante Real-Time PCR e Western blot, nei PBMCs di pazienti con malattia di Alzheimer, demenza vascolare, aMCI, mcdMCI e soggetti controllo cognitivamente integri.

I risultati sono espressi come media \pm errore standard.

	Espressione genica	Livelli proteici
VaD	1,04 \pm 0,14	0,44 \pm 0,03
mcdMCI	1,42 \pm 0,12	0,47 \pm 0,04
CT	1,66 \pm 0,16	0,59 \pm 0,04
AD	1,92 \pm 0,17	0,49 \pm 0,04
aMCI	3,05 \pm 0,92	0,59 \pm 0,09

Tabella 2: Espressione dell'A_{2A}R

Per quanto riguarda l'espressione genica del recettore adenosinico A_{2A}, si osserva un incremento lineare statisticamente significativo ($p < 0.001$) dei livelli dell'A_{2A}R a partire da valori minori rilevati nei soggetti VaD fino a valori più elevati negli aMCI, attraverso i valori intermedi dei soggetti mcdMCI, AD e controlli (fig.17). Non è stata trovata alcuna differenza significativa tra i vari gruppi e i controlli. L'analisi statistica *post-hoc* ha, invece, evidenziato una differenza significativa ($p < 0.001$) tra i pazienti VaD verso gli AD. È inoltre interessante notare come la ROC analisi mostra che l'espressione genica dell'A_{2A}R sia in grado di identificare i soggetti con VaD in un

eterogeneo gruppo di pazienti con VaD e AD con una AUC pari a 0.73 (95% CI, 0.63-0.83).

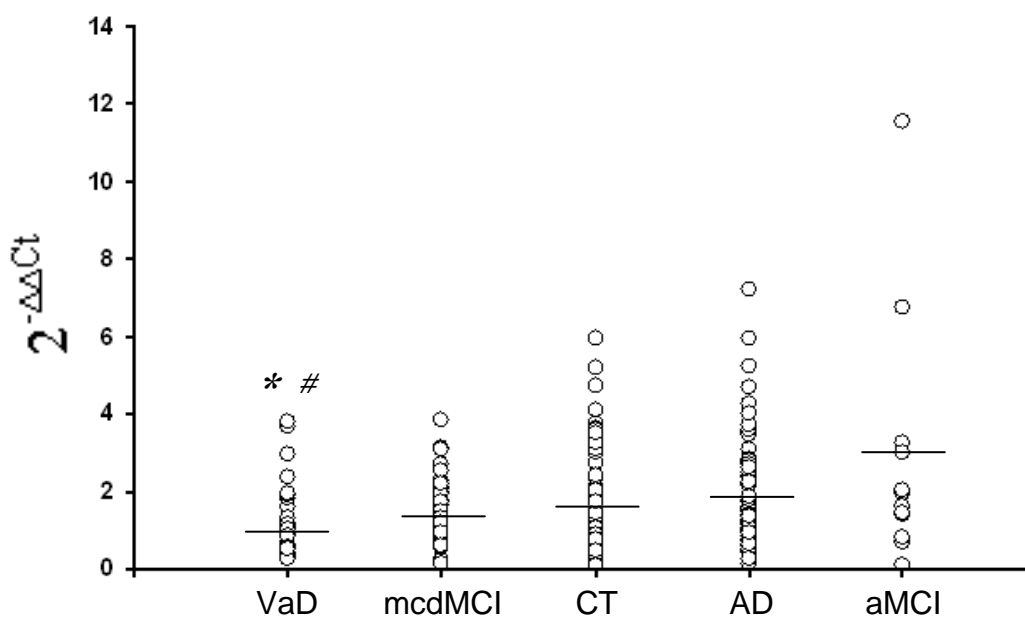


Fig. 17: Espressione genica dell'A_{2A}R analizzata mediante Real Time PCR.
* $p < 0,001$ verso il gruppo degli AD # $p < 0,05$ verso il gruppo degli aMCI

Si può inoltre notare che i livelli proteici del recettore adenosinico A_{2A}, presentano lo stesso *trend* riscontrato per l'espressione genica. I pazienti con VaD mostrano, infatti, la più bassa densità recettoriale mentre gli aMCI la più alta (fig. 18).

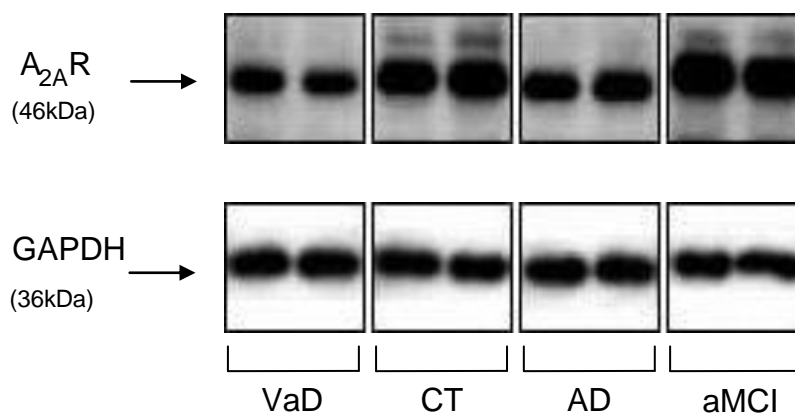


Fig. 18: Densità recettoriale dell'A_{2A}R analizzata mediante Western Blot.

GENOTIPO DELL'APOLIPOPROTEINA E

Nelle tabelle seguenti è riportata la distribuzione genotipica (tabella 3) e allelica (tabella 4) dell'Apo E.

	$\epsilon 2/\epsilon 3$	$\epsilon 3/\epsilon 3$	$\epsilon 3/\epsilon 4$	$\epsilon 4/\epsilon 4$	$\epsilon 2/\epsilon 4$	$\epsilon 2/\epsilon 2$
VaD	1 (2.5%)	28 (70%)	9 (22.5%)	2 (5%)	0	0
mcdMCI	2 (3.5%)	35(61.4%)	16(28.1%)	0	2 (3.5%)	2 (3.5%)
CT	3 (3.9%)	61(80.3%)	7 (9.2%)	0	1 (1.3%)	4 (5.3%)
AD	1 (1.2%)	40(47.6%)	38(45.2%)	2 (2.4%)	3 (3.6%)	0
aMCI	1 (7.7%)	8 (61.5%)	3 (23.1%)	1 (7.7%)	0	0

Tabella 3: Distribuzione genotipica Apo E.

	$\epsilon 4^-$	$\epsilon 4^+$	TOT
VaD	29 (72.5%)	11 (27.5%)	40
mcdMCI	37 (64.9%)	20 (35.1%)	57
CT	64 (84.2%)	12 (15.8%)	76
AD	41(48.8%)	43 (51.2%)	84
aMCI	9 (69.2%)	4 (30.8%)	13

Tabella 4: Distribuzione allelica Apo E.

I dati ottenuti sono perfettamente in linea con quanto riportato in letteratura sia per quanto riguarda AD, VaD e MCI che per i CT [88, 186, 187].

Come atteso, risulta evidente una maggiore presenza dell'allele $\epsilon 4$ negli AD rispetto agli altri gruppi ($p < 0.001$).

Per quanto riguarda l'espressione genica e i livelli proteici dell' A_{2A}R, i dati ottenuti non sembrano essere correlati alla presenza dell'allele ε4 indipendentemente dalla diagnosi (tabella 5). Le variazioni descritte a carico dell'espressione dell'A_{2A}R risultano infatti indipendenti dalla presenza o meno dell'allele ε4 di ApoE.

	Media dell'espressione genica			Media dell'espressione proteica		
	ε4-	ε4+	t-test	ε4-	ε4+	t-test
VaD	1,09	0,93	0,636	0.45	0.40	0.574
mcdMCI	1,35	1,50	0,147	0.48	0.44	0.751
CT	1,61	1,91	0,517	0.58	1.08	0.517
AD	1,89	1,88	0,990	0.39	0.57	0.230
aMCI	3,37	2,73	0,777	0.51	0.66	0.639
TOT	1.61	1.71	0.618	0.47	0.54	0.138

Tabella 5: Espressione genica e proteica dell'A_{2A}R nei portatori/non-portatori dell'allele ε4.

DISCUSSIONE

I successi della ricerca, della tecnologia e dello sviluppo sociale hanno determinato un allungamento della vita media, inducendo il personale medico ad affrontare i molteplici problemi legati alla gestione di un numero sempre crescente di soggetti affetti da patologie complesse e, nella maggior parte dei casi, invalidanti. Tra queste, un ruolo di notevole importanza spetta alla demenza, in forte crescita nei paesi più sviluppati e di grande impatto per le sue ricadute economiche e sociali.

La prevalenza della demenza nei paesi industrializzati oscilla intorno al 5% nei soggetti di età superiore ai 65 anni; questi tassi raddoppiano, approssimativamente, ogni 5 anni di età fra i 65 e gli 85 anni [2]. Particolare attenzione viene oggi rivolta alla malattia di Alzheimer (AD) e alla Demenza Vascolare (VaD), che sono le forme di demenza più comuni.

L'AD è una malattia neurodegenerativa eziologicamente eterogenea in cui l'accumulo di $A\beta_{42}$, dovuto ad alterazioni del metabolismo dell'*amyloid precursor protein* (APP), l'iperfosforilazione della proteina Tau [188, 189], e la cronicizzazione della risposta infiammatoria [38, 39, 41] risultano essere elementi cardine del processo patologico. Con il termine VaD si intendono, invece, tutte le forme di deterioramento mentale secondarie ad un'encefalopatia su base ischemica o emorragica.

Il continuo e drammatico aumento dell'incidenza della demenza e la mancanza di terapie adeguate hanno stimolato la ricerca di strategie che ne prevenano o ritardino l'esordio e/o la progressione. L'impatto epidemiologico della demenza può essere ridotto con la prevenzione e il trattamento dei classici fattori di rischio cardiovascolari; infatti,

diversi studi hanno riportato evidenze in favore di una coesistenza di meccanismi vascolari e degenerativi nella patogenesi della demenza. Patologie vascolari, come l'aterosclerosi, la proliferazione endoteliale e la neovascolarizzazione, sono spesso associate alle tipiche caratteristiche della neurodegenerazione quali le placche senili e i grovigli neurofibrillari. Studi autoptici hanno confermato che tra i casi di demenza, l'AD è concomitante a lesioni vascolari in circa un terzo dei casi [190]. Ancora non è chiaro se l'AD e la VaD siano patologie coesistenti ma non correlate, o se siano, invece, il risultato di meccanismi patologici sinergici. È stato ipotizzato che un'alterazione nell'unità neurovascolare, che è l'unità funzionale che comprende le cellule vascolari, gli astrociti e i neuroni, sia un evento precoce nella patogenesi dell'AD [91]. Disfunzioni dell'unità neurovascolare risultano in alterazioni della barriera ematoencefalica, disregolazione del flusso cerebrale e della clearance dell'A β con un conseguente aumento delle sue forme citotossiche [191]. Lo stress ossidativo e l'infiammazione sono alla base di molti di questi effetti deleteri e sono potenziali target terapeutici. Ad oggi, non esiste una cura definitiva né per l'AD né per la VaD, esistono solo farmaci in grado di rallentare la perdita di memoria e i sintomi clinici, con limitati benefici.

In malattie multifattoriali, quali l'AD e la VaD risulta molto utile avere a disposizione dei marcatori biologici che permettano una diagnosi precoce e la possibilità di distinguere tra le diverse forme di demenza. Lo studio di biomarcatori consente, infatti, di aggiungere conoscenze sulla determinazione e predisposizione alla malattia e di individuare sottogruppi di pazienti omogenei, per presentazioni e caratteristiche biologiche, nell'ottica della scelta di una terapia mirata ed efficace. Per quanto riguarda il nostro studio, la possibilità di identificare a livello periferico un marcatore per AD e/o VaD potrebbe essere utile per effettuare diagnosi precoce di malattia e soprattutto

per un'efficace diagnosi differenziale dato che queste due patologie spesso si sovrappongono e sfumano verso una demenza mista.

Il recettore adenosinico A_{2A} sembrerebbe essere coinvolto nella modulazione della risposta infiammatoria e, a livello del SNC, nella neuroprotezione e nella regolazione della trasmissione sinaptica. Dati contrastanti riportano sia effetti positivi che negativi dell'attivazione dell' $A_{2A}R$ nel SNC. Da un lato il blocco del recettore sembrerebbe ridurre il danno cerebrale legato a ischemia, epilessia, malattia di Parkinson e AD [139, 156, 163]; altri lavori riportano, invece, un effetto favorevole dell'attivazione dell' $A_{2A}R$ in casi di ischemia e ex citotossicità [177, 192].

L'effetto neuroprotettivo della caffeina, noto antagonista dell' $A_{2A}R$, è stato riscontrato sia nei pazienti con AD [193, 194] che nell'invecchiamento e nei pazienti con altre forme di demenze [195-197]. È stato dimostrato che il blocco dell' $A_{2A}R$ è in grado di prevenire la sinaptotossicità indotta dall' $A\beta$ sia in colture cellulari che in modelli animali [159]. Inoltre si è visto un ruolo di questo recettore nella modulazione della corrente NMDA e del flusso di glutammato nell'ippocampo [163].

Uno studio condotto su una particolare varietà di ratto transgenico per $A_{2A}R$ denominata TGR (NSEh A_{2A}) ha dimostrato che questi ratti presentano deficit di memoria correlati all'aumento dei livelli di mRNA e proteine di $A_{2A}R$, soprattutto nelle regioni corticali [198]. Inoltre, un trattamento prolungato sui topi transgenici affetti da AD con dosi non tossiche di antagonisti specifici di A_{2A} , porta ad un miglioramento della *reference* e della *working memory* oltre a prevenire deficit cognitivi indotti dall' $A\beta$ [199].

Nel presente studio, è stata valutata, a livello di cellule mononucleate periferiche del sangue (PBMCs), l'espressione genica e proteica del recettore adenosinico A_{2A} , per caratterizzare meglio il processo

degenerativo dell'AD e della VaD fin dalle fasi precoci della malattia (aMCI e mcdMCI).

Lo scopo è studiare $A_{2A}R$ come possibile biomarcatore in PBMCs, suggerendo la possibilità di studiare in cellule periferiche, facilmente reperibili, processi ritenuti confinati al SNC. Va evidenziato, infatti, che un buon marcatore dovrebbe essere facilmente reperibile oltre che sensibile e specifico.

I risultati di questo studio dimostrano un aumento dell'espressione dell' $A_{2A}R$ nei PBMCs dei soggetti con aMCI rispetto ai pazienti con AD, supportando l'ipotesi di un coinvolgimento dell' $A_{2A}R$ negli stadi precoci della malattia.

L' $A_{2A}R$ rappresenta il principale recettore dell'adenosina coinvolto nel processo infiammatorio.

Recenti lavori hanno mostrato che gli eventi infiammatori precedono lo sviluppo clinico di AD e che un'alterazione nella regolazione delle citochine è riscontrabile anche nei pazienti con MCI [200]. In particolare, alti livelli della *monocyte chemotactic protein-1* (MCP_1) sono stati trovati nei pazienti con MCI e con forme lievi di AD, ma non nei pazienti con una malattia severa [201]. L'aumentata espressione di MCP_1 e di altre molecole proinfiammatorie è stata riscontrata anche a livello del liquido cerebrospinale di soggetti con AD [202], confermando, quindi, che l'espressione di una molecola infiammatoria a livello periferico potrebbe essere correlata con la progressione della malattia.

I nostri risultati non permetterebbero di formulare alcuna ipotesi sulle relazioni tra modulazione dell' $A_{2A}R$ in periferia e modulazione del metabolismo dell'adenosina a livello cerebrale, anche se l'aumento dell'espressione dell' $A_{2A}R$ nei PBMCs di soggetti con aMCI sembra essere in accordo con precedenti studi che descrivono un aumento d'espressione nella corteccia cerebrale frontale sia di A_1R che di $A_{2A}R$ solo nelle fasi precoci dell'AD [203] e un aumento della produzione di

citochine infiammatorie nei PBMCs di soggetti con aMCI, ma non con AD [200, 204], suggerendo che la risposta infiammatoria a livello periferico sia coinvolta prevalentemente nelle fasi precoci della malattia.

I nostri dati mostrano inoltre una bassa espressione dell'A_{2A}R nei soggetti con mcdMCI; ciò potrebbe essere dovuto al fatto che probabilmente l'mcdMCI non rappresenta lo stadio preclinico dell'AD, ma è più probabile una sua evoluzione verso una demenza di tipo vascolare. I nostri risultati indicano, infatti, una minore espressione dell'A_{2A}R nei PBMCs di pazienti con VaD rispetto a tutti gli altri gruppi in studio.

In particolare i più bassi livelli di A_{2A}R riscontrati nei VaD rispetto agli AD sembrerebbero suggerire un differente ruolo di questo recettore in queste due demenze. È interessante notare come anche i livelli di altri biomarcatori dell'infiammazione sono risultati diversi nei pazienti con VaD rispetto agli AD. Per esempio, i livelli di alfa1-globulina e alfa2-globulina sono stati trovati significativamente più alti nel siero di pazienti con AD rispetto a soggetti con VaD [205], allo stesso modo si sono riscontrati più alti livelli di C3a e C4a nel liquido cefalorachidiano [206].

La riduzione dell'A_{2A}R nei VaD potrebbe essere un meccanismo di difesa in quanto è stato dimostrato che l'inattivazione genetica o farmacologica dell'A_{2A}R riduce il danno dovuto ad ischemia cerebrale in numerosi modelli animali [173, 176, 207]. Numerosi studi hanno indicato come i recettori dell'adenosina giochino un ruolo di grande importanza nel controllo della circolazione cerebro-vascolare.

In maiali neonati gli antagonisti dell'A_{2A}R proteggono i neuroni a seguito di un'ischemia/ipossia neonatale [207]; diverso è invece il meccanismo in periferia dove l'A_{2A}R è coinvolto nella regolazione e protezione della vascolatura a seguito di uno shock emorragico. La sua attivazione sembrerebbe portare beneficio inibendo l'apoptosi

endoteliale [208] e migliorando la reattività vascolare, i parametri emodinamici e la sopravvivenza a seguito di shock emorragico nei ratti [209]. I topi knockout per il recettore A_{2A} presentano alti valori di pressione sanguigna, elemento che suggerisce un ruolo dell' $A_{2A}R$ nella regolazione della vasodilatazione. Questa considerazione è ulteriormente avvalorata dal fatto che l'azione vasodilatatrice dell' $A_{2A}R$ si è vista correlare con il vasospasmo cerebrale [210].

I diversi livelli di questo recettore riscontrati nei pazienti con AD e VaD potrebbero essere legati anche all'azione dell' $A_{2A}R$ sulla conduttanza del recettore NMDA e sul controllo del flusso del glutammato. Questo è un meccanismo chiave sia nella patogenesi dell'AD che della VaD.

Infatti, mentre nella VaD l'ischemia sembrerebbe condurre ad un aumento del glutammato e dell'attività dell'NMDA [98], nell'AD è riscontrata una diminuzione delle sinapsi glutamatergiche e una riduzione dell'uptake del glutammato da parte degli astrociti dovuta all'Abeta [211] [212].

Si è visto che l'attivazione dell' $A_{2A}R$ da un lato è essenziale nella trasmissione della LTP (*Long-Term Potentiation*) dipendente dall'NMDA nelle sinapsi di fibre muscolari dell'ippocampo di topi [213] e ratti [214], ma d'altra parte inibisce la conduttanza del canale del recettore NMDA in neuroni dello striato di ratto [215]. Inoltre, nei pazienti con AD la distruzione delle sinapsi glutamatergiche può essere limitata dal blocco dell' $A_{2A}R$ suggerendo un ruolo chiave del recettore in questo meccanismo e quindi nella disfunzione sinaptica presente nei pazienti con AD [216].

In conclusione, l'utilizzo dei PBMCs ha permesso di studiare in cellule periferiche processi ritenuti confinati a livello del SNC. L'uso di tessuti periferici è basato sull'ipotesi che l'AD e VaD siano malattie sistemiche che colpiscono anche organi diversi dall'encefalo ed è stato dimostrato

che i PBMCs possono rappresentare lo specchio di quel che avviene a livello centrale [113].

I risultati di questo lavoro indicano un'alterazione nei PBMCs di alcuni meccanismi fin dalle fasi prodromiche della malattia; abbiamo infatti visto una differenza significativa tra l'espressione di A_{2A}R nei PBMCs di pazienti con aMCI rispetto all'espressione nei soggetti con AD confermando l'ipotesi secondo cui l'attivazione dell'infiammazione precede gli eventi neurodegenerativi; d'altra parte abbiamo inoltre visto un diverso coinvolgimento di questo recettore in due tipologie di demenza. L'A_{2A}R sembrerebbe giocare un ruolo importante ma diverso nell'AD e nella VaD.

La sua up-regolazione negli stadi precoci dell'AD potrebbe controbilanciare un meccanismo infiammatorio in atto mentre la sua down-regolazione nei soggetti con VaD potrebbe dipendere dall'effetto dell'A_{2A}R sulla vascolatura cerebrale.

L'aver riscontrato più bassi livelli di questo recettore nelle cellule periferiche di pazienti con VaD rispetto a soggetti con AD sottolinea la sua possibile rilevanza come biomarcatore, facilmente reperibile, utile nella diagnosi differenziale fra queste due forme di demenza che sono spesso associate.

La ROC analisi ha, infatti, mostrato che la misurazione dell'espressione genica dell'A_{2A}R nei PBMCs possiede un moderato grado di sensibilità e specificità nel riconoscere pazienti con VaD in un gruppo eterogeneo di soggetti con VaD e AD.

Numerose evidenze sottolineano la complessità dei meccanismi legati all'A_{2A}R e suggeriscono che l'effetto dell'adenosina su questo recettore è il risultato dell'interazione di numerosi sistemi molecolari. I nostri dati hanno evidenziato che alcuni tra i meccanismi regolati dall'A_{2A}R possono essere coinvolti nella patogenesi di demenze quali l'AD e la VaD fin dalle loro fasi precliniche.

BIBLIOGRAFIA

1. Goldman, J.S., et al., *Genetic counseling and testing for Alzheimer disease: joint practice guidelines of the American College of Medical Genetics and the National Society of Genetic Counselors*. Genet Med, 2011. **13**(6): p. 597-605.
2. Di Carlo, A., et al., *Incidence of dementia, Alzheimer's disease, and vascular dementia in Italy. The ILSA Study*. J Am Geriatr Soc, 2002. **50**(1): p. 41-8.
3. von Strauss, E., et al., *Aging and the occurrence of dementia: findings from a population-based cohort with a large sample of nonagenarians*. Arch Neurol, 1999. **56**(5): p. 587-92.
4. Ferri, C.P., et al., *Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study*. Lancet, 2005. **366**(9503): p. 2112-7.
5. Brookmeyer, R., et al., *Forecasting the global burden of Alzheimer's disease*. Alzheimers Dement, 2007. **3**(3): p. 186-91.
6. Ziegler-Graham, K., et al., *Worldwide variation in the doubling time of Alzheimer's disease incidence rates*. Alzheimers Dement, 2008. **4**(5): p. 316-23.
7. Corder, E.H., et al., *Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families*. Science, 1993. **261**(5123): p. 921-3.
8. Katzman, R., *Education and the prevalence of dementia and Alzheimer's disease*. Neurology, 1993. **43**(1): p. 13-20.
9. Stern, Y., et al., *Relationship between lifetime occupation and parietal flow: implications for a reserve against Alzheimer's disease pathology*. Neurology, 1995. **45**(1): p. 55-60.
10. Del Ser, T., et al., *An autopsy-verified study of the effect of education on degenerative dementia*. Brain, 1999. **122** (Pt 12): p. 2309-19.
11. Scarmeas, N., et al., *Physical activity and Alzheimer disease course*. Am J Geriatr Psychiatry, 2011. **19**(5): p. 471-81.
12. McKhann, G., et al., *Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease*. Neurology, 1984. **34**(7): p. 939-44.
13. Dubois, B., et al., *Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria*. Lancet Neurol, 2007. **6**(8): p. 734-46.
14. Haroutunian, V., et al., *Neurofibrillary tangles in nondemented elderly subjects and mild Alzheimer disease*. Arch Neurol, 1999. **56**(6): p. 713-8.
15. Folstein, M.F., S.E. Folstein, and P.R. McHugh, *"Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician*. J Psychiatr Res, 1975. **12**(3): p. 189-98.

16. Katz, S., et al., *Studies of Illness in the Aged. The Index of Adl: A Standardized Measure of Biological and Psychosocial Function*. JAMA, 1963. **185**: p. 914-9.
17. Lawton, M.P. and E.M. Brody, *Assessment of older people: self-maintaining and instrumental activities of daily living*. Gerontologist, 1969. **9**(3): p. 179-86.
18. Blennow, K., M.J. de Leon, and H. Zetterberg, *Alzheimer's disease*. Lancet, 2006. **368**(9533): p. 387-403.
19. Jack, C.R., Jr., et al., *11C PiB and structural MRI provide complementary information in imaging of Alzheimer's disease and amnesic mild cognitive impairment*. Brain, 2008. **131**(Pt 3): p. 665-80.
20. Morinaga, A., et al., *A comparison of the diagnostic sensitivity of MRI, CBF-SPECT, FDG-PET and cerebrospinal fluid biomarkers for detecting Alzheimer's disease in a memory clinic*. Dement Geriatr Cogn Disord, 2010. **30**(4): p. 285-92.
21. Mattsson, N., et al., *CSF biomarkers and incipient Alzheimer disease in patients with mild cognitive impairment*. JAMA, 2009. **302**(4): p. 385-93.
22. Parnetti, L., et al., *Diagnosing prodromal Alzheimer's disease: role of CSF biochemical markers*. Mech Ageing Dev, 2006. **127**(2): p. 129-32.
23. Lanari, A. and L. Parnetti, *Cerebrospinal fluid biomarkers and prediction of conversion in patients with mild cognitive impairment: 4-year follow-up in a routine clinical setting*. ScientificWorldJournal, 2009. **9**: p. 961-6.
24. Wallin, A.K., et al., *CSF biomarkers predict a more malignant outcome in Alzheimer disease*. Neurology, 2010. **74**(19): p. 1531-7.
25. Forlenza, O.V., B.S. Diniz, and W.F. Gattaz, *Diagnosis and biomarkers of predementia in Alzheimer's disease*. BMC Med, 2010. **8**: p. 89.
26. Tanzi, R.E., et al., *Amyloid beta protein gene: cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus*. Science, 1987. **235**(4791): p. 880-4.
27. Bush, A.I., et al., *The amyloid precursor protein of Alzheimer's disease is released by human platelets*. J Biol Chem, 1990. **265**(26): p. 15977-83.
28. Borroni, B., et al., *Blood cell markers in Alzheimer Disease: Amyloid Precursor Protein form ratio in platelets*. Exp Gerontol, 2010. **45**(1): p. 53-6.
29. Small, S.A. and K. Duff, *Linking Abeta and tau in late-onset Alzheimer's disease: a dual pathway hypothesis*. Neuron, 2008. **60**(4): p. 534-42.
30. Struble, R.G., et al., *Is brain amyloid production a cause or a result of dementia of the Alzheimer's type?* J Alzheimers Dis, 2010. **22**(2): p. 393-9.

31. Blass, J.P., G.E. Gibson, and S. Hoyer, *The role of the metabolic lesion in Alzheimer's disease*. J Alzheimers Dis, 2002. **4**(3): p. 225-32.
32. van Helmond, Z., et al., *Higher soluble amyloid beta concentration in frontal cortex of young adults than in normal elderly or Alzheimer's disease*. Brain Pathol, 2010. **20**(4): p. 787-93.
33. Bennett, D.A., et al., *Neuropathology of older persons without cognitive impairment from two community-based studies*. Neurology, 2006. **66**(12): p. 1837-44.
34. Aizenstein, H.J., et al., *Frequent amyloid deposition without significant cognitive impairment among the elderly*. Arch Neurol, 2008. **65**(11): p. 1509-17.
35. Holmes, C., et al., *Long-term effects of Abeta42 immunisation in Alzheimer's disease: follow-up of a randomised, placebo-controlled phase I trial*. Lancet, 2008. **372**(9634): p. 216-23.
36. Salloway, S., et al., *A phase 2 multiple ascending dose trial of bapineuzumab in mild to moderate Alzheimer disease*. Neurology, 2009. **73**(24): p. 2061-70.
37. Bird, T.D., *Genetic aspects of Alzheimer disease*. Genet Med, 2008. **10**(4): p. 231-9.
38. Wyss-Coray, T., *Inflammation in Alzheimer disease: driving force, bystander or beneficial response?* Nat Med, 2006. **12**(9): p. 1005-15.
39. Akiyama, H., et al., *Cell mediators of inflammation in the Alzheimer disease brain*. Alzheimer Dis Assoc Disord, 2000. **14** Suppl 1: p. S47-53.
40. Eikelenboom, P. and R. Veerhuis, *The role of complement and activated microglia in the pathogenesis of Alzheimer's disease*. Neurobiol Aging, 1996. **17**(5): p. 673-80.
41. Sala, G., et al., *Peripheral cytokine release in Alzheimer patients: correlation with disease severity*. Neurobiol Aging, 2003. **24**(7): p. 909-14.
42. Bauer, J., et al., *Interleukin-6 and alpha-2-macroglobulin indicate an acute-phase state in Alzheimer's disease cortices*. FEBS Lett, 1991. **285**(1): p. 111-4.
43. Griffin, W.S., et al., *Brain interleukin 1 and S-100 immunoreactivity are elevated in Down syndrome and Alzheimer disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(19): p. 7611-5.
44. Fiala, M. and R. Veerhuis, *Biomarkers of inflammation and amyloid-beta phagocytosis in patients at risk of Alzheimer disease*. Exp Gerontol, 2010. **45**(1): p. 57-63.
45. Fassbender, K., C. Masters, and K. Beyreuther, *Alzheimer's disease: an inflammatory disease?* Neurobiol Aging, 2000. **21**(3): p. 433-6; discussion 451-3.
46. Chabot, S., et al., *Cytokine production consequent to T cell-microglia interaction: the PMA/IFN gamma-treated U937 cells display similarities to human microglia*. J Neurosci Methods, 2001. **105**(2): p. 111-20.

47. Block, M.L. and J.S. Hong, *Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism*. Prog Neurobiol, 2005. **76**(2): p. 77-98.
48. Mandelkow, E.M., et al., *Tau domains, phosphorylation, and interactions with microtubules*. Neurobiol Aging, 1995. **16**(3): p. 355-62; discussion 362-3.
49. Mahley, R.W. and S.C. Rall, Jr., *Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein*. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2000. **1**: p. 507-37.
50. Mahley, R.W., *Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology*. Science, 1988. **240**(4852): p. 622-30.
51. Kim, J., J.M. Basak, and D.M. Holtzman, *The role of apolipoprotein E in Alzheimer's disease*. Neuron, 2009. **63**(3): p. 287-303.
52. Pitas, R.E., et al., *Lipoproteins and their receptors in the central nervous system. Characterization of the lipoproteins in cerebrospinal fluid and identification of apolipoprotein B,E(LDL) receptors in the brain*. J Biol Chem, 1987. **262**(29): p. 14352-60.
53. LaDu, M.J., et al., *Nascent astrocyte particles differ from lipoproteins in CSF*. J Neurochem, 1998. **70**(5): p. 2070-81.
54. Saunders, A.M., *Apolipoprotein E and Alzheimer disease: an update on genetic and functional analyses*. J Neuropathol Exp Neurol, 2000. **59**(9): p. 751-8.
55. West, H.L., G.W. Rebeck, and B.T. Hyman, *Frequency of the apolipoprotein E epsilon 2 allele is diminished in sporadic Alzheimer disease*. Neurosci Lett, 1994. **175**(1-2): p. 46-8.
56. Meyer, M.R., et al., *APOE genotype predicts when--not whether--one is predisposed to develop Alzheimer disease*. Nat Genet, 1998. **19**(4): p. 321-2.
57. Tiraboschi, P., et al., *Impact of APOE genotype on neuropathologic and neurochemical markers of Alzheimer disease*. Neurology, 2004. **62**(11): p. 1977-83.
58. Vergheze, P.B., J.M. Castellano, and D.M. Holtzman, *Apolipoprotein E in Alzheimer's disease and other neurological disorders*. Lancet Neurol, 2011. **10**(3): p. 241-52.
59. Thal, D.R., et al., *Occurrence and co-localization of amyloid beta-protein and apolipoprotein E in perivascular drainage channels of wild-type and APP-transgenic mice*. Neurobiol Aging, 2007. **28**(8): p. 1221-30.
60. Strittmatter, W.J. and A.D. Roses, *Apolipoprotein E and Alzheimer's disease*. Annu Rev Neurosci, 1996. **19**: p. 53-77.
61. Perrin, R.J., A.M. Fagan, and D.M. Holtzman, *Multimodal techniques for diagnosis and prognosis of Alzheimer's disease*. Nature, 2009. **461**(7266): p. 916-22.
62. Hatters, D.M., C.A. Peters-Libeu, and K.H. Weisgraber, *Apolipoprotein E structure: insights into function*. Trends Biochem Sci, 2006. **31**(8): p. 445-54.

63. Huang, Y., *Abeta-independent roles of apolipoprotein E4 in the pathogenesis of Alzheimer's disease*. Trends Mol Med, 2010. **16**(6): p. 287-94.
64. Genin, E., et al., *APOE and Alzheimer disease: a major gene with semi-dominant inheritance*. Mol Psychiatry, 2011. **16**(9): p. 903-7.
65. Dubois, B., et al., *Revising the definition of Alzheimer's disease: a new lexicon*. Lancet Neurol, 2010. **9**(11): p. 1118-27.
66. Blass, J.P., *Alzheimer's disease and Alzheimer's dementia: distinct but overlapping entities*. Neurobiol Aging, 2002. **23**(6): p. 1077-84.
67. Thal, D.R., et al., *Sequence of Abeta-protein deposition in the human medial temporal lobe*. J Neuropathol Exp Neurol, 2000. **59**(8): p. 733-48.
68. Thal, D.R., et al., *Phases of A beta-deposition in the human brain and its relevance for the development of AD*. Neurology, 2002. **58**(12): p. 1791-800.
69. Knopman, D.S., et al., *Neuropathology of cognitively normal elderly*. J Neuropathol Exp Neurol, 2003. **62**(11): p. 1087-95.
70. Morris, J.C., et al., *Pittsburgh compound B imaging and prediction of progression from cognitive normality to symptomatic Alzheimer disease*. Arch Neurol, 2009. **66**(12): p. 1469-75.
71. Petersen, R.C., et al., *Mild cognitive impairment: clinical characterization and outcome*. Arch Neurol, 1999. **56**(3): p. 303-8.
72. Petersen, R.C., *Mild cognitive impairment as a diagnostic entity*. J Intern Med, 2004. **256**(3): p. 183-94.
73. Fisk, J.D., H.R. Merry, and K. Rockwood, *Variations in case definition affect prevalence but not outcomes of mild cognitive impairment*. Neurology, 2003. **61**(9): p. 1179-84.
74. Frisoni, G.B., A. Padovani, and L.O. Wahlund, *The prodementia diagnosis of Alzheimer disease*. Alzheimer Dis Assoc Disord, 2004. **18**(2): p. 51-3.
75. Bennett, D.A., *Mild cognitive impairment*. Clin Geriatr Med, 2004. **20**(1): p. 15-25.
76. Zanetti, M., et al., *Mild cognitive impairment subtypes and vascular dementia in community-dwelling elderly people: a 3-year follow-up study*. J Am Geriatr Soc, 2006. **54**(4): p. 580-6.
77. Jelic, V., M. Kivipelto, and B. Winblad, *Clinical trials in mild cognitive impairment: lessons for the future*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2006. **77**(4): p. 429-38.
78. Battistin, L. and A. Cagnin, *Vascular cognitive disorder. A biological and clinical overview*. Neurochem Res, 2010. **35**(12): p. 1933-8.
79. Hachinski, V.C., N.A. Lassen, and J. Marshall, *Multi-infarct dementia. A cause of mental deterioration in the elderly*. Lancet, 1974. **2**(7874): p. 207-10.
80. Roman, G.C., et al., *Vascular cognitive disorder: a new diagnostic category updating vascular cognitive impairment and vascular dementia*. J Neurol Sci, 2004. **226**(1-2): p. 81-7.

81. Sachdev, P., *Vascular cognitive disorder*. Int J Geriatr Psychiatry, 1999. **14**(5): p. 402-3.
82. Rincon, F. and C.B. Wright, *Vascular cognitive impairment*. Curr Opin Neurol, 2013. **26**(1): p. 29-36.
83. O'Brien, J.T., et al., *Vascular cognitive impairment*. Lancet Neurol, 2003. **2**(2): p. 89-98.
84. Fratiglioni, L., et al., *Incidence of dementia and major subtypes in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. Neurologic Diseases in the Elderly Research Group*. Neurology, 2000. **54**(11 Suppl 5): p. S10-5.
85. Roman, G.C., *Vascular dementia may be the most common form of dementia in the elderly*. J Neurol Sci, 2002. **203-204**: p. 7-10.
86. Micieli, G., *Vascular dementia*. Neurol Sci, 2006. **27 Suppl 1**: p. S37-9.
87. Chabriat, H., et al., *Cadasil*. Lancet Neurol, 2009. **8**(7): p. 643-53.
88. Dwyer, R., et al., *Using Alzgene-like approaches to investigate susceptibility genes for vascular cognitive impairment*. J Alzheimers Dis, 2013. **34**(1): p. 145-54.
89. Iadecola, C., *The pathobiology of vascular dementia*. Neuron, 2013. **80**(4): p. 844-66.
90. Wetterling, T., R.D. Kanitz, and K.J. Borgis, *Comparison of different diagnostic criteria for vascular dementia (ADDTC, DSM-IV, ICD-10, NINDS-AIREN)*. Stroke, 1996. **27**(1): p. 30-6.
91. Iadecola, C., *Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease*. Nat Rev Neurosci, 2004. **5**(5): p. 347-60.
92. Drake, C.T. and C. Iadecola, *The role of neuronal signaling in controlling cerebral blood flow*. Brain Lang, 2007. **102**(2): p. 141-52.
93. Kalaria, R.N., *Comparison between Alzheimer's disease and vascular dementia: implications for treatment*. Neurol Res, 2003. **25**(6): p. 661-4.
94. Francis, P., *Targeting cell death in dementia*. Alzheimer Dis Assoc Disord, 2006. **20**(2 Suppl 1): p. S3-7.
95. Baskys, A. and A.C. Hou, *Vascular dementia: pharmacological treatment approaches and perspectives*. Clin Interv Aging, 2007. **2**(3): p. 327-35.
96. Choi, D.W. and S.M. Rothman, *The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death*. Annu Rev Neurosci, 1990. **13**: p. 171-82.
97. Coyle, J.T. and P. Puttfarcken, *Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders*. Science, 1993. **262**(5134): p. 689-95.
98. Baskys, A. and M. Blaabjerg, *Understanding regulation of nerve cell death by mGluRs as a method for development of successful neuroprotective strategies*. J Neurol Sci, 2005. **229-230**: p. 201-9.
99. Schneider, J.A., et al., *Mixed brain pathologies account for most dementia cases in community-dwelling older persons*. Neurology, 2007. **69**(24): p. 2197-204.
100. Gorelick, P.B. and L. Pantoni, *Advances in vascular cognitive impairment*. Stroke, 2013. **44**(2): p. 307-8.

101. Richard, E., et al., *The Alzheimer myth and biomarker research in dementia*. J Alzheimers Dis, 2012. **31 Suppl 3**: p. S203-9.
102. Wiesmann, M., A.J. Kiliaan, and J.A. Claassen, *Vascular aspects of cognitive impairment and dementia*. J Cereb Blood Flow Metab, 2013. **33**(11): p. 1696-706.
103. Blom, K., M.H. Emmelot-Vonk, and H.D. Koek, *The influence of vascular risk factors on cognitive decline in patients with dementia: a systematic review*. Maturitas, 2013. **76**(2): p. 113-7.
104. Gorelick, P.B., et al., *Vascular contributions to cognitive impairment and dementia: a statement for healthcare professionals from the american heart association/american stroke association*. Stroke, 2011. **42**(9): p. 2672-713.
105. Toledo, J.B., et al., *Contribution of cerebrovascular disease in autopsy confirmed neurodegenerative disease cases in the National Alzheimer's Coordinating Centre*. Brain, 2013. **136**(Pt 9): p. 2697-706.
106. Korczyn, A.D., V. Vakhapova, and L.T. Grinberg, *Vascular dementia*. J Neurol Sci, 2012. **322**(1-2): p. 2-10.
107. Craft, S., *The role of metabolic disorders in Alzheimer disease and vascular dementia: two roads converged*. Arch Neurol, 2009. **66**(3): p. 300-5.
108. Puntmann, V.O., *How-to guide on biomarkers: biomarker definitions, validation and applications with examples from cardiovascular disease*. Postgrad Med J, 2009. **85**(1008): p. 538-45.
109. Ferrarese, C. and M. Di Luca, *Biological markers in Alzheimer disease*. Neurobiol Aging, 2003. **24**(1): p. 191-3.
110. Begley, D.J., *Delivery of therapeutic agents to the central nervous system: the problems and the possibilities*. Pharmacol Ther, 2004. **104**(1): p. 29-45.
111. Arosio, B., et al., *Pin1 contribution to Alzheimer's disease: transcriptional and epigenetic mechanisms in patients with late-onset Alzheimer's disease*. Neurodegener Dis, 2012. **10**(1-4): p. 207-11.
112. Nijhuis, E.W., et al., *Differences in dexamethasone-sensitivity between lymphocytes from patients with Alzheimer's disease and patients with multi-infarct dementia*. Brain Behav Immun, 1996. **10**(2): p. 115-25.
113. Maes, O.C., et al., *Methodology for discovery of Alzheimer's disease blood-based biomarkers*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2009. **64**(6): p. 636-45.
114. Decking, U.K., et al., *Hypoxia-induced inhibition of adenosine kinase potentiates cardiac adenosine release*. Circ Res, 1997. **81**(2): p. 154-64.
115. Hasko, G., et al., *Shaping of monocyte and macrophage function by adenosine receptors*. Pharmacol Ther, 2007. **113**(2): p. 264-75.
116. Sebastiao, A.M. and J.A. Ribeiro, *Adenosine A2 receptor-mediated excitatory actions on the nervous system*. Prog Neurobiol, 1996. **48**(3): p. 167-89.

117. Fredholm, B.B., et al., *Nomenclature and classification of purinoceptors*. Pharmacol Rev, 1994. **46**(2): p. 143-56.
118. Thiel, M., C.C. Caldwell, and M.V. Sitkovsky, *The critical role of adenosine A2A receptors in downregulation of inflammation and immunity in the pathogenesis of infectious diseases*. Microbes Infect, 2003. **5**(6): p. 515-26.
119. Yaar, R., et al., *Animal models for the study of adenosine receptor function*. J Cell Physiol, 2005. **202**(1): p. 9-20.
120. Toews, M.L., *Adenosine receptors find a new partner and move out*. Mol Pharmacol, 2006. **69**(4): p. 1075-8.
121. Sun, C.N., et al., *Rescue of p53 blockage by the A(2A) adenosine receptor via a novel interacting protein, translin-associated protein X*. Mol Pharmacol, 2006. **70**(2): p. 454-66.
122. Fredholm, B.B., et al., *Aspects of the general biology of adenosine A2A signaling*. Prog Neurobiol, 2007. **83**(5): p. 263-76.
123. Hasko, G., et al., *Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases*. Nat Rev Drug Discov, 2008. **7**(9): p. 759-70.
124. Burgueno, J., et al., *The adenosine A2A receptor interacts with the actin-binding protein alpha-actinin*. J Biol Chem, 2003. **278**(39): p. 37545-52.
125. Ciruela, F., et al., *Presynaptic control of striatal glutamatergic neurotransmission by adenosine A1-A2A receptor heteromers*. J Neurosci, 2006. **26**(7): p. 2080-7.
126. Tebano, M.T., et al., *Adenosine A2A receptors enable the synaptic effects of cannabinoid CB1 receptors in the rodent striatum*. J Neurochem, 2009. **110**(6): p. 1921-30.
127. Hourani, S.M., *Purinoceptors and platelet aggregation*. J Auton Pharmacol, 1996. **16**(6): p. 349-52.
128. Ribe, D., et al., *Adenosine A2A receptor signaling regulation of cardiac NADPH oxidase activity*. Free Radic Biol Med, 2008. **44**(7): p. 1433-42.
129. Sun, W.C., et al., *Effects of stimulation of adenosine A2A receptors on lipopolysaccharide-induced production of reactive oxygen species by equine neutrophils*. Am J Vet Res, 2007. **68**(6): p. 649-56.
130. Kreckler, L.M., et al., *Adenosine suppresses lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha production by murine macrophages through a protein kinase A- and exchange protein activated by cAMP-independent signaling pathway*. J Pharmacol Exp Ther, 2009. **331**(3): p. 1051-61.
131. Sitkovsky, M.V. and A. Ohta, *The 'danger' sensors that STOP the immune response: the A2 adenosine receptors?* Trends Immunol, 2005. **26**(6): p. 299-304.
132. Armstrong, J.M., et al., *Gene dose effect reveals no Gs-coupled A2A adenosine receptor reserve in murine T-lymphocytes: studies of cells from A2A-receptor-gene-deficient mice*. Biochem J, 2001. **354**(Pt 1): p. 123-30.

133. Ohta, A. and M. Sitkovsky, *Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage*. Nature, 2001. **414**(6866): p. 916-20.
134. Khoa, N.D., et al., *Inflammatory cytokines regulate function and expression of adenosine A(2A) receptors in human monocytic THP-1 cells*. J Immunol, 2001. **167**(7): p. 4026-32.
135. Rebola, N., et al., *Enhanced adenosine A2A receptor facilitation of synaptic transmission in the hippocampus of aged rats*. J Neurophysiol, 2003. **90**(2): p. 1295-303.
136. Svenningsson, P., et al., *Distribution of adenosine receptors in the postmortem human brain: an extended autoradiographic study*. Synapse, 1997. **27**(4): p. 322-35.
137. Rosin, D.L., et al., *Immunohistochemical localization of adenosine A2A receptors in the rat central nervous system*. J Comp Neurol, 1998. **401**(2): p. 163-86.
138. Mishina, M., et al., *Evaluation of distribution of adenosine A2A receptors in normal human brain measured with [11C]TMSX PET*. Synapse, 2007. **61**(9): p. 778-84.
139. Chen, J.F., et al., *Adenosine A2A receptors and brain injury: broad spectrum of neuroprotection, multifaceted actions and "fine tuning" modulation*. Prog Neurobiol, 2007. **83**(5): p. 310-31.
140. Fuxe, K., et al., *Integrated events in central dopamine transmission as analyzed at multiple levels. Evidence for intramembrane adenosine A2A/dopamine D2 and adenosine A1/dopamine D1 receptor interactions in the basal ganglia*. Brain Res Brain Res Rev, 1998. **26**(2-3): p. 258-73.
141. Hillion, J., et al., *Coaggregation, cointernalization, and codesensitization of adenosine A2A receptors and dopamine D2 receptors*. J Biol Chem, 2002. **277**(20): p. 18091-7.
142. Svenningsson, P., et al., *Regulation of the phosphorylation of the dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein of 32 kDa in vivo by dopamine D1, dopamine D2, and adenosine A2A receptors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(4): p. 1856-60.
143. Kaplan, D.R. and F.D. Miller, *Neurotrophin signal transduction in the nervous system*. Curr Opin Neurobiol, 2000. **10**(3): p. 381-91.
144. Lee, F.S., R. Rajagopal, and M.V. Chao, *Distinctive features of Trk neurotrophin receptor transactivation by G protein-coupled receptors*. Cytokine Growth Factor Rev, 2002. **13**(1): p. 11-7.
145. Boulanger, L. and M.M. Poo, *Gating of BDNF-induced synaptic potentiation by cAMP*. Science, 1999. **284**(5422): p. 1982-4.
146. Boulanger, L.M. and M.M. Poo, *Presynaptic depolarization facilitates neurotrophin-induced synaptic potentiation*. Nat Neurosci, 1999. **2**(4): p. 346-51.
147. Latini, S. and F. Pedata, *Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations*. J Neurochem, 2001. **79**(3): p. 463-84.

148. Sebastiao, A.M. and J.A. Ribeiro, *Triggering neurotrophic factor actions through adenosine A2A receptor activation: implications for neuroprotection*. Br J Pharmacol, 2009. **158**(1): p. 15-22.
149. Tebano, M.T., et al., *Adenosine A(2A) receptors are required for normal BDNF levels and BDNF-induced potentiation of synaptic transmission in the mouse hippocampus*. J Neurochem, 2008. **104**(1): p. 279-86.
150. Pousinha, P.A., et al., *Triggering of BDNF facilitatory action on neuromuscular transmission by adenosine A2A receptors*. Neurosci Lett, 2006. **404**(1-2): p. 143-7.
151. Vaz, S.H., et al., *Brain-derived neurotrophic factor inhibits GABA uptake by the rat hippocampal nerve terminals*. Brain Res, 2008. **1219**: p. 19-25.
152. Cunha, R.A. and J.A. Ribeiro, *Adenosine A2A receptor facilitation of synaptic transmission in the CA1 area of the rat hippocampus requires protein kinase C but not protein kinase A activation*. Neurosci Lett, 2000. **289**(2): p. 127-30.
153. Chou, S.Y., et al., *CGS21680 attenuates symptoms of Huntington's disease in a transgenic mouse model*. J Neurochem, 2005. **93**(2): p. 310-20.
154. Arendash, G.W., et al., *Caffeine protects Alzheimer's mice against cognitive impairment and reduces brain beta-amyloid production*. Neuroscience, 2006. **142**(4): p. 941-52.
155. Rebola, N., et al., *Adenosine A2A receptors control neuroinflammation and consequent hippocampal neuronal dysfunction*. J Neurochem, 2011. **117**(1): p. 100-11.
156. Gomes, C.V., et al., *Adenosine receptors and brain diseases: neuroprotection and neurodegeneration*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1808**(5): p. 1380-99.
157. Maia, L. and A. de Mendonca, *Does caffeine intake protect from Alzheimer's disease?* Eur J Neurol, 2002. **9**(4): p. 377-82.
158. Angulo, E., et al., *A1 adenosine receptors accumulate in neurodegenerative structures in Alzheimer disease and mediate both amyloid precursor protein processing and tau phosphorylation and translocation*. Brain Pathol, 2003. **13**(4): p. 440-51.
159. Canas, P.M., et al., *Adenosine A2A receptor blockade prevents synaptotoxicity and memory dysfunction caused by beta-amyloid peptides via p38 mitogen-activated protein kinase pathway*. J Neurosci, 2009. **29**(47): p. 14741-51.
160. Dall'Igna, O.P., et al., *Neuroprotection by caffeine and adenosine A2A receptor blockade of beta-amyloid neurotoxicity*. Br J Pharmacol, 2003. **138**(7): p. 1207-9.
161. Agostinho, P., et al., *Adenosine modulation of D-[3H]aspartate release in cultured retina cells exposed to oxidative stress*. Neurochem Int, 2000. **36**(3): p. 255-65.
162. Almeida, C.G., et al., *Adenosine promotes neuronal recovery from reactive oxygen species induced lesion in rat hippocampal slices*. Neurosci Lett, 2003. **339**(2): p. 127-30.

163. Cunha, R.A., *Neuroprotection by adenosine in the brain: From A(1) receptor activation to A (2A) receptor blockade*. Purinergic Signal, 2005. **1**(2): p. 111-34.
164. Hammer, J., et al., *In vivo effects of adenosine A(2) receptor agonist and antagonist on neuronal and astrocytic intermediary metabolism studied with ex vivo (13)C MR spectroscopy*. J Neurochem, 2001. **79**(4): p. 885-92.
165. Coleman, M.P. and V.H. Perry, *Axon pathology in neurological disease: a neglected therapeutic target*. Trends Neurosci, 2002. **25**(10): p. 532-7.
166. Acquas, E., G. Tanda, and G. Di Chiara, *Differential effects of caffeine on dopamine and acetylcholine transmission in brain areas of drug-naive and caffeine-pretreated rats*. Neuropsychopharmacology, 2002. **27**(2): p. 182-93.
167. Korkotian, E. and M. Segal, *Release of calcium from stores alters the morphology of dendritic spines in cultured hippocampal neurons*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(21): p. 12068-72.
168. Ledent, C., et al., *Aggressiveness, hypoalgesia and high blood pressure in mice lacking the adenosine A2a receptor*. Nature, 1997. **388**(6643): p. 674-8.
169. Chen, J.F., et al., *The role of the D(2) dopamine receptor (D(2)R) in A(2A) adenosine receptor (A(2A)R)-mediated behavioral and cellular responses as revealed by A(2A) and D(2) receptor knockout mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(4): p. 1970-5.
170. Chen, J.F. and F. Pedata, *Modulation of ischemic brain injury and neuroinflammation by adenosine A2A receptors*. Curr Pharm Des, 2008. **14**(15): p. 1490-9.
171. Gao, Y. and J.W. Phillis, *CGS 15943, an adenosine A2 receptor antagonist, reduces cerebral ischemic injury in the Mongolian gerbil*. Life Sci, 1994. **55**(3): p. PL61-5.
172. Melani, A., et al., *The selective A2A receptor antagonist SCH 58261 protects from neurological deficit, brain damage and activation of p38 MAPK in rat focal cerebral ischemia*. Brain Res, 2006. **1073-1074**: p. 470-80.
173. Phillis, J.W., *The effects of selective A1 and A2a adenosine receptor antagonists on cerebral ischemic injury in the gerbil*. Brain Res, 1995. **705**(1-2): p. 79-84.
174. Kittner, B., *Clinical trials of propentofylline in vascular dementia*. European/Canadian Propentofylline Study Group. Alzheimer Dis Assoc Disord, 1999. **13 Suppl 3**: p. S166-71.
175. Wei, C.J., W. Li, and J.F. Chen, *Normal and abnormal functions of adenosine receptors in the central nervous system revealed by genetic knockout studies*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1808**(5): p. 1358-79.
176. Chen, J.F., et al., *A(2A) adenosine receptor deficiency attenuates brain injury induced by transient focal ischemia in mice*. J Neurosci, 1999. **19**(21): p. 9192-200.

177. Jones, P.A., R.A. Smith, and T.W. Stone, *Protection against kainate-induced excitotoxicity by adenosine A2A receptor agonists and antagonists*. Neuroscience, 1998. **85**(1): p. 229-37.
178. Marcoli, M., et al., *Sensitivity to selective adenosine A1 and A2A receptor antagonists of the release of glutamate induced by ischemia in rat cerebrocortical slices*. Neuropharmacology, 2003. **45**(2): p. 201-10.
179. Pedata, F., et al., *The protective effect of adenosine A2A receptor antagonism in cerebral ischemia*. Neurol Res, 2005. **27**(2): p. 169-74.
180. Bruce-Keller, A.J., *Microglial-neuronal interactions in synaptic damage and recovery*. J Neurosci Res, 1999. **58**(1): p. 191-201.
181. Corsi, C., et al., *Adenosine A2A receptor antagonism increases striatal glutamate outflow in dopamine-denervated rats*. Eur J Pharmacol, 2003. **464**(1): p. 33-8.
182. Dai, S.S., et al., *Local glutamate level dictates adenosine A2A receptor regulation of neuroinflammation and traumatic brain injury*. J Neurosci, 2010. **30**(16): p. 5802-10.
183. Yang, Z., et al., *Myocardial infarct-sparing effect of adenosine A2A receptor activation is due to its action on CD4+ T lymphocytes*. Circulation, 2006. **114**(19): p. 2056-64.
184. Schwarzschild, M.A., et al., *Neuroprotection by caffeine and more specific A2A receptor antagonists in animal models of Parkinson's disease*. Neurology, 2003. **61**(11 Suppl 6): p. S55-61.
185. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.
186. Annoni, G., et al., *Apolipoprotein E genotype in senile dementia and Down's syndrome*. Arch Gerontol Geriatr, 1998. **26**(1): p. 15-21.
187. Singh, P.P., M. Singh, and S.S. Mastana, *APOE distribution in world populations with new data from India and the UK*. Ann Hum Biol, 2006. **33**(3): p. 279-308.
188. Goedert, M., *Tau protein and the neurofibrillary pathology of Alzheimer's disease*. Ann N Y Acad Sci, 1996. **777**: p. 121-31.
189. Koo, E.H. and S.L. Squazzo, *Evidence that production and release of amyloid beta-protein involves the endocytic pathway*. J Biol Chem, 1994. **269**(26): p. 17386-9.
190. Jellinger, K.A., *The enigma of vascular cognitive disorder and vascular dementia*. Acta Neuropathol, 2007. **113**(4): p. 349-88.
191. Zlokovic, B.V., *New therapeutic targets in the neurovascular pathway in Alzheimer's disease*. Neurotherapeutics, 2008. **5**(3): p. 409-14.
192. Stone, T.W., S. Ceruti, and M.P. Abbracchio, *Adenosine receptors and neurological disease: neuroprotection and neurodegeneration*. Handb Exp Pharmacol, 2009(193): p. 535-87.
193. Prasanthi, J.R., et al., *Caffeine protects against oxidative stress and Alzheimer's disease-like pathology in rabbit hippocampus*

- induced by cholesterol-enriched diet.* Free Radic Biol Med, 2010. **49**(7): p. 1212-20.
194. Marques, S., et al., *Modulating Alzheimer's disease through caffeine: a putative link to epigenetics.* J Alzheimers Dis, 2011. **24 Suppl 2**: p. 161-71.
195. Pelligrino, D.A., H.L. Xu, and F. Vetri, *Caffeine and the control of cerebral hemodynamics.* J Alzheimers Dis, 2010. **20 Suppl 1**: p. S51-62.
196. Cao, C., et al., *High Blood caffeine levels in MCI linked to lack of progression to dementia.* J Alzheimers Dis, 2012. **30**(3): p. 559-72.
197. Espinosa, J., et al., *Caffeine consumption prevents memory impairment, neuronal damage, and adenosine A2A receptors upregulation in the hippocampus of a rat model of sporadic dementia.* J Alzheimers Dis, 2013. **34**(2): p. 509-18.
198. Gimenez-Llort, L., et al., *Working memory deficits in transgenic rats overexpressing human adenosine A2A receptors in the brain.* Neurobiol Learn Mem, 2007. **87**(1): p. 42-56.
199. Dall'Igna, O.P., et al., *Caffeine and adenosine A(2a) receptor antagonists prevent beta-amyloid (25-35)-induced cognitive deficits in mice.* Exp Neurol, 2007. **203**(1): p. 241-5.
200. Magaki, S., et al., *Increased production of inflammatory cytokines in mild cognitive impairment.* Exp Gerontol, 2007. **42**(3): p. 233-40.
201. Galimberti, D., et al., *Serum MCP-1 levels are increased in mild cognitive impairment and mild Alzheimer's disease.* Neurobiol Aging, 2006. **27**(12): p. 1763-8.
202. Galimberti, D., et al., *Chemokines in serum and cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients.* Ann Neurol, 2003. **53**(4): p. 547-8.
203. Albasanz, J.L., et al., *Up-regulation of adenosine receptors in the frontal cortex in Alzheimer's disease.* Brain Pathol, 2008. **18**(2): p. 211-9.
204. Bonotis, K., et al., *Systemic immune aberrations in Alzheimer's disease patients.* J Neuroimmunol, 2008. **193**(1-2): p. 183-7.
205. Helmy, A.A., et al., *Role of interleukin 6 and alpha-globulins in differentiating Alzheimer and vascular dementias.* Neurodegener Dis, 2012. **9**(2): p. 81-6.
206. Simonsen, A.H., et al., *Protein markers for the differential diagnosis of vascular dementia and Alzheimer's disease.* Int J Proteomics, 2012. **2012**: p. 824024.
207. Yang, Z.J., et al., *Adenosine A2A receptor contributes to ischemic brain damage in newborn piglet.* J Cereb Blood Flow Metab, 2013. **33**(10): p. 1612-20.
208. Delikouras, A., et al., *Endothelial cell cytoprotection induced in vitro by allo- or xenoreactive antibodies is mediated by signaling through adenosine A2 receptors.* Eur J Immunol, 2003. **33**(11): p. 3127-35.
209. Zhu, Y., et al., *Role of adenosine A2A receptor in organ-specific vascular reactivity following hemorrhagic shock in rats.* J Surg Res, 2013. **184**(2): p. 951-8.

210. Lin, C.L., et al., *Attenuation of experimental subarachnoid hemorrhage-induced increases in circulating intercellular adhesion molecule-1 and cerebral vasospasm by the endothelin-converting enzyme inhibitor CGS 26303*. J Neurosurg, 2007. **106**(3): p. 442-8.
211. Canas, P.M., et al., *Predominant loss of glutamatergic terminal markers in a beta-amyloid peptide model of Alzheimer's disease*. Neuropharmacology, 2014. **76 Pt A**: p. 51-6.
212. Esposito, Z., et al., *Amyloid beta, glutamate, excitotoxicity in Alzheimer's disease: are we on the right track?* CNS Neurosci Ther, 2013. **19**(8): p. 549-55.
213. Rebola, N., et al., *Adenosine A2A receptors are essential for long-term potentiation of NMDA-EPSCs at hippocampal mossy fiber synapses*. Neuron, 2008. **57**(1): p. 121-34.
214. Costenla, A.R., et al., *Enhanced role of adenosine A(2A) receptors in the modulation of LTP in the rat hippocampus upon ageing*. Eur J Neurosci, 2011. **34**(1): p. 12-21.
215. Norenberg, W., K. Wirkner, and P. Illes, *Effect of adenosine and some of its structural analogues on the conductance of NMDA receptor channels in a subset of rat neostriatal neurones*. Br J Pharmacol, 1997. **122**(1): p. 71-80.
216. Matos, M., et al., *Astrocytic adenosine A2A receptors control the amyloid-beta peptide-induced decrease of glutamate uptake*. J Alzheimers Dis, 2012. **31**(3): p. 555-67.

GRAZIE...

Alla Prof.ssa Mari per avermi permesso di svolgere questo Dottorato all'interno del laboratorio da lei diretto.

A Bea per la fiducia e la stima che ha sempre dimostrato nei miei confronti e per le tante possibilità di crescita, sia a livello personale che lavorativo, che mi ha dato.

A Martina e Evelyn perché questa tesi si può dire che l'abbiamo scritta insieme.

A tutti coloro che ho incontrato durante il mio percorso perché chiunque è passato, anche solo per un giorno, da questo laboratorio mi ha insegnato qualcosa.

Alla mia famiglia per l'affetto e la vicinanza.