

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DEL PIEMONTE ORIENTALE
“AMEDEO AVOGADRO”**

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

Corso di Laurea Magistrale in Farmacia

TESI DI LAUREA

***BIOCHIMICA DELL'ALZHEIMER: IL RUOLO DELLA PROTEINA TAU NELLA
FISIOPATOLOGIA DELLA MALATTIA***

Relatore

Prof.ssa Silvia Garavaglia

Candidato

Federica Resta

Anno Accademico 2022-23

Sessione straordinaria (aprile)

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DEL PIEMONTE ORIENTALE
“AMEDEO AVOGADRO”**

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

Corso di Laurea Magistrale in Farmacia

TESI DI LAUREA

***BIOCHIMICA DELL'ALZHEIMER: IL RUOLO DELLA PROTEINA TAU NELLA
FISIOPATOLOGIA DELLA MALATTIA***

Relatore

Prof.ssa Silvia Garavaglia

Candidato

Federica Resta

Anno Accademico 2022-23

Sessione straordinaria (aprile)

INDICE

LISTA DELLE ABBREVIAZIONI.....	
INTRODUZIONE.....	1
CAPITOLO 1: LA MALATTIA DI ALZHEIMER.....	3
1.1 DEFINIZIONE	3
1.2 EPIDEMIOLOGIA.....	3
1.3 SINTOMI E MANIFESTAZIONI DELLA MALATTIA.....	4
1.3.1 Sintomi cognitivi.....	5
1.3.2 Sintomi comportamentali	6
1.4 EVOLUZIONE DELLA MALATTIA.....	6
1.5 FATTORI DI RISCHIO	8
1.6 FATTORI PROTETTIVI.....	9
1.7 EZIOPATOGENESI.....	10
1.7.1 Ipotesi colinergica.....	10
1.7.2 Ipotesi amiloide.....	10
1.7.3 Ipotesi della cascata mitocondriale.....	13
1.7.4 Ipotesi della neuroinfiammazione.....	14
1.7.5 Ipotesi dello squilibrio del calcio	15
1.7.6 Ipotesi dell'asse cervello-intestino-microbiota.....	16
1.7.7 Ipotesi dell'alterazione del metabolismo del glucosio.....	18
CAPITOLO 2: BIOCHIMICA DELLA PROTEINA TAU.....	21
2.1 STRUTTURA.....	21
2.2 FUNZIONE FISIOLOGICA	24
2.3 IPERFOSFORILAZIONE E ALTRE MODIFICHE POST-TRADUZIONALI.....	26
2.4 FORMAZIONE DI GROVIGLI NEUROFIBRILLARI E DEGENERAZIONE NEURONALE	30
2.5 PROTEINA TAU COME BIOMARCATORE NELLA DIAGNOSI PRECOCE.....	34
CAPITOLO 3: TRATTAMENTI FARMACOLOGICI ATTUALI E NUOVE FRONTIERE TERAPEUTICHE PER LA MALATTIA DI ALZHEIMER	39
3.1 I FARMACI INIBITORI DELL'ACETILCOLINESTERASI E LA MEMANTINA.....	39
3.2 APPROCCI TERAPEUTICI COMPLEMENTARI E INNOVATIVI	43
3.3 PROTEINA TAU COME BERSAGLIO FARMACOLOGICO: SVILUPPI CLINICI E PROSPETTIVE FUTURE	48
CONCLUSIONI	55
BIBLIOGRAFIA	57

LISTA DELLE ABBREVIAZIONI

5-HT ₃	Recettore della serotonina di tipo 3
A-syn	α -sinucleina
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterasi
AChEI	Inibitore dell'acetilcolinesterasi
ADL	Activities of Daily Living
Akt	Proteina chinasi B
ApoE	Apolipoproteina E
APP	Amyloid Precursor Protein
AQP4	Acquaporina 4
ARIA	Amyloid-related imaging abnormalities
ASO	Oligonucleotidi antisenso
ATP	Adenosina trifosfato
A β	Proteina beta-amiloide
BACE-1	β -site amyloid precursor protein cleaving enzyme-1
BChE	Butirilcolinesterasi
BDNF	Fattore neurotrofico cerebrale
BBB	Barriera Emato-Encefalica
BPSD	Behavioral and Psychological Symptoms of Dementia
CCL2	Chemokine (C-C motif) Ligand 2
Cdk5	Chinasi ciclina-dipendente 5
ChAT	Colina acetiltransferasi
CK1	Casein Kinase 1
CREB	cAMP response element-binding protein
CSF	Cerebrospinal Fluid
CTR	Regione carbossi- terminale
DMD	Disease modifying drug
DNA	Acido desossiribonucleico
DOPEGAL	3,4-diidrossifenilglicolaldeide
DPP-4	Dipeptidil-peptidasi 4
EOAD	Early-Onset Alzheimer's Disease
FDA	Food and Drug Administration
FRS	Framingham Risk Score
GLP-1	Glucagon-Like Peptide 1
GLUT	Trasportatore del glucosio
GSK3	Glicogeno sintasi chinasi 3
HDAC	Istone deacetilasi
Hsc70	Heat Shock Cognate protein 70
HspB1	Heat Shock Protein B1
IC ₅₀	Concentrazione inibente
IDP	Proteina intrinsecamente disordinata
IDR	Regione intrinsecamente disordinata
Ig	Immunoglobulina
IL-1 β	Interleuchina-1 beta
IL-6	Interleuchina-6
InsP ₃ R	Recettore dell'Inositolo Trisfosfato
IRS-1	Substrato del recettore dell'insulina 1
IRS2	Substrato 2 del recettore dell'insulina

ISS	Istituto Superiore di Sanità
LOAD	Late-Onset Alzheimer's Disease
LPS	Lipopolisaccaride
LRP1	Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1
LTD	Long-Term Depression
LTP	Long-Term Potentiation
MA	Malattia di Alzheimer
mAb	Anticorpo monoclonale
MAP	Proteina associata ai microtubuli
MAPT	Microtubule Associated Protein Tau
MBP	Proteina basica della mielina
MBR	Microtubule-Binding Region
MCI	Mild Cognitive Impairment
MLKL	Mixed Lineage Kinase Domain-Like protein
MRI	Imaging a risonanza magnetica
mRNA	RNA messaggero
MTDL	Multi-Target Directed Ligands
Mtor	Bersaglio meccanicistico della rapamicina
Nec-1	Necrostatin-1
NFT	Neurofibrillary tangles
NF-κB	Fattore di trascrizione nucleare kappa-B
NGF	Nerve growth factor
NMDA	N-Metil-D-Aspartato
NMDAR	Recettore dell'N-Metil-D-Aspartato
NTR	N-Terminal Region
OMS	Organizzazione Mondiale della Sanità
OSF	Oligosaccaril transferasi
PET	Tomografia a emissione di positroni
PHF	Filamenti elicoidali accoppiati
PIN1	Protil isomerasi 1
PKA	Proteina chinasi cAMP-dipendente
PKC	Proteina chinasi C
PRP ^c	Proteina prionica cellulare
PRR	Regione ricca di prolina
PSEN1	Presenilina di tipo 1
PSEN2	Presenilina di tipo 2
RIPK	Receptor-Interacting Protein Kinase
ROC	Receiver Operating Characteristic
RyR	Recettore rianodinico
SCFA	Acidi grassi a catena corta
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SERCA	Reticolo sarco-endoplasmatico Ca ²⁺ ATPasi
SGLT2	Co-trasportatore sodio-glucosio di tipo 2
SNC	Sistema Nervoso Centrale
SNE	Sistema Nervoso Enterico
SSRI	Selective Serotonin Reuptake Inhibitors
TAC	Tomografia assiale computerizzata
TCA	Antidepressivi triciclici
TNF-α	Tumor Necrosis Factor alfa

TREM2	Triggering receptor expressed on myeloid cells 2
TRIM21	Tripartite Motif Containing 21
UPR	Unfolded protein response

INTRODUZIONE

Questo mio elaborato di tesi si propone di approfondire la malattia di Alzheimer, una patologia neurodegenerativa caratterizzata da un progressivo declino delle funzioni cognitive e, dal punto di vista anatomico-patologico, dalla formazione di placche di β -amiloide ($A\beta$) e grovigli neurofibrillari costituiti dalla proteina Tau iperfosforilata (NFT). La malattia di Alzheimer colpisce milioni di persone in tutto il mondo e rappresenta un problema di salute pubblica molto importante e attuale che impatta notevolmente sulla qualità della vita dei pazienti che ne sono affetti.

Nella parte iniziale della tesi verrà analizzata la definizione, l'epidemiologia, le manifestazioni cliniche e l'evoluzione della malattia di Alzheimer nel tempo. Inoltre, verranno presentati i fattori di rischio e protettivi associati alla malattia, al fine di fornire una panoramica completa della sua eziopatogenesi astrusa e multifattoriale. Il corpo dell'elaborato è incentrato sulla biochimica della proteina Tau, in particolare sulla sua struttura, la sua funzione fisiologica e sulle modifiche post-traduzionali che causano l'accumulo di grovigli neurofibrillari nel cervello. Viene poi esaminato il ruolo della proteina Tau come biomarcatore nella diagnosi precoce della malattia di Alzheimer, sottolineando i progressi più recenti in questo campo.

Infine, si discuterà dei farmaci sintomatici attualmente disponibili per il trattamento della malattia di Alzheimer, dei progressi della ricerca nello sviluppo di nuovi farmaci modificanti la malattia e delle nuove strategie di cura che mirano alla proteina Tau come bersaglio farmacologico.

CAPITOLO 1

LA MALATTIA DI ALZHEIMER

1.1 Definizione

La malattia di Alzheimer è una malattia neurodegenerativa ed è la forma più comune di demenza¹. Nel 1906 il medico tedesco Alois Alzheimer descrisse per la prima volta il caso di una paziente di 51 anni, Auguste Deter, affetta da perdita di memoria a breve termine, deliri e allucinazioni. A seguito della sua morte fu disposta l'autorizzazione per l'autopsia e Alzheimer delineò le caratteristiche istologiche della malattia: atrofia della corteccia cerebrale, e “ammassi” nel tessuto nervoso, successivamente identificati come placche amiloidi e grovigli neurofibrillari, ancora oggi segni peculiari della patologia. Nel 1910 Emil Kraepelin, noto come il padre della psichiatria, coniò il termine della malattia: *malattia di Alzheimer* (MA). In quegli anni la malattia di Alzheimer si riferiva ad una popolazione “presenile”, cioè di età inferiore ai 65 anni; si parlava invece di “demenza senile” con riferimento ai pazienti di età superiore ai 65 anni. Attualmente la MA non si differenzia in base all'età del paziente e si riferisce, prevalentemente, ad individui anziani².

1.2 Epidemiologia

La demenza senile e di conseguenza la malattia di Alzheimer è in crescente aumento. Secondo l'OMS, nel mondo più di 55 milioni di persone soffrono di demenza e ogni anno si registrano quasi 10 milioni di nuovi casi e si prevedono 78 milioni di casi entro il 2030 [1]. La malattia di Alzheimer, rappresentando la forma più comune di demenza, costituisce il 60-70% dei casi [2]. L'OMS afferma inoltre che, la malattia di Alzheimer e altre forme di demenza rappresentano la settima causa di morte a livello globale [2]. Questi dati fanno sì che l'Alzheimer assuma un ruolo di massima priorità di salute pubblica. Secondo il rapporto della Lancet Commission del 2020, il numero di persone affette da demenza nei Paesi a basso e medio reddito aumenta più rapidamente rispetto ai Paesi ad alto reddito, a causa della presenza di maggiori fattori di rischio e all'aumento dell'aspettativa di vita [3]. In Italia, secondo l'Osservatorio demenze

¹Demenza, dal latino *dementia* (privo di mente), indica una compromissione globale delle funzioni cerebrali superiori, in assenza di disturbi della vigilanza (Treccani)

²OMS: si considerano anziani coloro che superano i 65 anni di età.

dell'Istituto Superiore di Sanità, "circa 1.100.000 persone soffrono di demenza e circa 600.000 persone sono malate di Alzheimer" [4]. La prevalenza della malattia aumenta con l'età ed è maggiore nelle donne [5]. Dal rapporto mondiale sull' Alzheimer del 2021 emerge che il 75% dei 55 milioni di casi non sono adeguatamente diagnosticati, poiché ostacolati dalla difficoltà di accesso a medici qualificati, dalla paura della diagnosi e dai costi [1]. Inoltre, a causa delle restrizioni imposte dalla pandemia di COVID-19 nel corso del 2020-2021, gran parte dei servizi sanitari sono stati interrotti e ciò ha portato ad un ritardo nella diagnosi di demenza [1]. Lo stigma sociale rappresenta un importante ostacolo alla diagnosi. In alcuni Paesi infatti, come l'Africa, persiste la convinzione che la demenza sia una maledizione divina o del diavolo [1]. Nella Cina rurale prevalgono i valori dell'indipendenza, della forza dell'uomo, di conseguenza i pazienti cercano aiuto molto più tardi rispetto a quando dovrebbero farlo [1]. Secondo l'Osservatorio demenze dell'Istituto Superiore di Sanità (ISS), *"in Italia le demenze, ogni anno, hanno un costo di 23 miliardi di euro e la maggior parte di questi costi ricade sulle famiglie dei malati"* [6]. I costi possono essere classificati in:

- costi medici diretti che riguardano i farmaci, le visite, i test diagnostici e le cure ospedaliere [7];
- costi sociali diretti quali assistenza domiciliare, assistenza in case di cura, fornitura di cibo e trasporti [7];
- costi indiretti come assistenza informale da parte di familiari, amici, caregiver i quali supportano e assistono il paziente nelle attività di vita quotidiana (ADL) [7].

L'assistenza informale rappresenta circa il 50% dei costi totali [7]. Tutto ciò evidenzia l'importanza della figura del caregiver; secondo uno studio in cui sono stati analizzati 176 coppie pazienti-caregiver, è emerso che una peggiore salute mentale del caregiver porta ad un aumento della mortalità del paziente [8]. È importante quindi intervenire anche sulla salute mentale di coloro che assistono i pazienti.

1.3 Sintomi e manifestazioni della malattia

Riconoscere i sintomi tempestivamente consente di affrontare la malattia quanto prima, ridurre i rischi che essa comporta e rallentare la sua progressione. Spesso è difficile distinguere i sintomi della MA, dal naturale e progressivo declino cognitivo dovuto all'età avanzata o da altre patologie. La sintomatologia può essere suddivisa in due categorie: sintomi cognitivi e sintomi comportamentali.

1.3.1 Sintomi cognitivi

- 1) Disturbi della memoria: rientrano tra i primi sintomi e rappresentano un criterio diagnostico importante. Il paziente presenta disturbi della memoria sia a breve termine, e sia a lungo termine. In particolare, spesso l'individuo dimentica informazioni in maniera improvvisa e frequente, riportando dei "vuoti di memoria". Spesso però il paziente tende a ricordare eventi passati, ma è incapace di ricordare fatti recenti, si parla infatti di amnesia anterograda. Il soggetto con MA presenta una disfunzione della memoria procedurale, cioè quel tipo di memoria a lungo termine che è necessaria per svolgere attività come guidare un'auto, suonare uno strumento, vale a dire tutte quelle procedure che sono state apprese in passato e che negli anni sono state "automatizzate". Vi è inoltre una compromissione della memoria semantica³, infatti il soggetto dimentica il nome di un oggetto ed è incapace di descriverne le sue caratteristiche. Negli stadi più avanzati della malattia, il paziente non ricorda più i propri familiari e dimentica le informazioni legate al sé.
- 2) Aprassia⁴ ed in particolare l'aprassia ideativa. Il soggetto è incapace di svolgere un compito nella giusta sequenza temporale, di conseguenza non riesce a compiere movimenti volontari già appresi precedentemente, come vestirsi.
- 3) Anomia e afasia, il paziente presenta disturbi del linguaggio, in particolare non è in grado di ricordare nomi, luoghi, oggetti e di reperire le giuste parole per esprimersi. Tipicamente presenta povertà nel linguaggio e durante la comunicazione verbale procede con pause frequenti. Negli stadi più avanzati della malattia il paziente subisce una perdita quasi totale della capacità verbale.
- 4) Compromissione del riconoscimento fisionomico; infatti, i soggetti affetti da MA non riconoscono i volti familiari; si parla di *prosopagnosia*. Nelle fasi più avanzate il soggetto non riconosce neanche il proprio volto.
- 5) Perdita della capacità di giudizio e difficoltà nel ragionamento e ciò si può notare, ad esempio, in ambito lavorativo e di amministrazione del denaro.
- 6) Disorientamento spazio-temporale quando il soggetto non riconosce i luoghi, compresi quelli a lui familiari; è confuso riguardo al mese, all'anno in cui si trova.

³ La memoria semantica è una memoria a lungo termine, in particolare fa parte della memoria dichiarativa (memoria esplicita). Riguarda la conoscenza del mondo, degli oggetti, del linguaggio e il priming concettuale.

⁴ Aprassia: disturbo nell'esecuzione di un movimento finalizzato a uno scopo, Treccani.

1.3.2 Sintomi comportamentali

I sintomi comportamentali, psicologici e psichiatrici dell'Alzheimer e di altri tipi di demenza prendono il nome di BPSD e tra questi rientrano l'aggressività, la depressione, l'ansia, l'apatia, i deliri, le allucinazioni negli stadi più avanzati della malattia e l'agitazione. Quest'ultima è molto frequente ed aumenta con l'aumentare della gravità della malattia. È associata ad anomalie strutturali e funzionali di regioni cerebrali associate alle emozioni, come la corteccia frontale, cingolata anteriore e posteriore, amigdala e ippocampo [9]. I BPSD rendono molto difficile il lavoro dei caregiver, incidendo negativamente sulla qualità della loro vita.

1.4 Evoluzione della malattia

Barry Reisberg, direttore clinico del Dementia Research Center della New York University School of Medicine, nel 1987 identificò sette fasi della MA con gravità crescente come illustrato in Figura 1.

- 1) Nessuna disabilità: il paziente non presenta deficit di memoria, né sintomi tipici della MA [10].
- 2) Declino molto lieve delle funzioni cognitive: il paziente ha deficit di memoria, dimentica i nomi, la posizione degli oggetti, ma ciò può anche essere dovuto all'invecchiamento. Il paziente non presenta difficoltà sul lavoro, né in generale nella società. La visita effettuata dal medico non rileva un'oggettiva perdita di memoria [10].
- 3) Declino lieve delle funzioni cognitive: il paziente ha problemi di memoria, identificabili dal medico tramite test cognitivi; ha difficoltà nei contesti sociali e nel lavoro, può manifestare problemi di concentrazione e difficoltà nell'organizzazione e pianificazione delle attività. Il termine MCI, in italiano "compromissione cognitiva lieve", fu descritto per la prima volta da Reisberg e rappresenta uno stato intermedio tra l'invecchiamento e la demenza [11]. È importante sottolineare che non tutti gli individui con MCI svilupperanno in seguito la MA, infatti, è possibile che questa condizione si stabilizzi nel tempo. Si stima che il 5-10% degli individui con MCI sviluppa la MA nel corso del tempo [12].
- 4) Declino cognitivo moderato. Questo stadio rappresenta la MA in fase precoce, dunque si ritrovano i sintomi tipici della MA [10]. Il paziente inizia a non ricordare

i dettagli significativi della sua vita, ha deficit di concentrazione, la memoria a breve termine inizia ad essere compromessa; non riesce a svolgere compiti complessi come la gestione del denaro e inizia ad isolarsi dalle situazioni di socialità [10].

- 5) Declino cognitivo moderatamente grave. Si tratta di una fase intermedia della MA, oltre al progressivo declino della memoria e del pensiero, il paziente non è più completamente indipendente e comincia ad aver bisogno di assistenza per alcune attività come vestirsi. Inoltre, è disorientato e confuso, riconosce ancora i suoi familiari e ricorda qualche particolare della sua vita [10].
- 6) Declino cognitivo grave dove il paziente necessita di assistenza anche per attività quotidiane come andare in bagno. Presenta un disorientamento spazio-temporale, vagabondaggio, ha disturbi della minzione insieme a cambiamenti emotivi e psichici. È incapace di prendere decisioni e di eseguire compiti semplici come contare.
- 7) Declino cognitivo molto grave ossia la fase terminale della malattia; il paziente presenta afasia ed incontinenza; è incapace di camminare, di mangiare, necessita di assistenza costante, perde la capacità di connessione con l'ambiente [10]. È allettato e può andare incontro a morte per malattie infettive, disidratazione, malnutrizione, infarto del miocardio, polmonite *ab ingestis* [10].

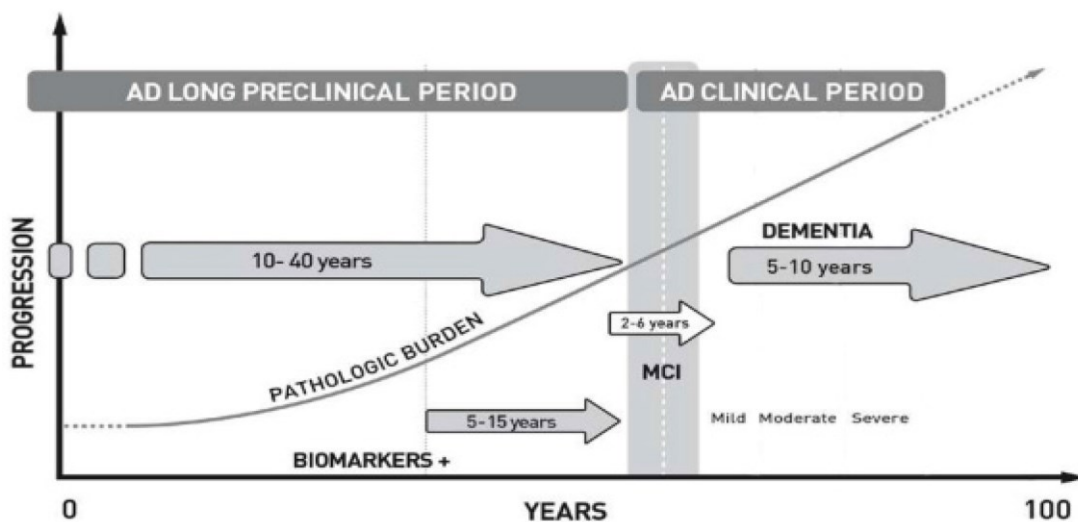


Figura 1. Rappresentazione grafica dell'evoluzione della MA nel corso della vita. Nella fase precoce della malattia si verificano i cambiamenti patologici nel cervello, senza sintomi evidenti. Segue poi una fase preclinica in cui i biomarcatori risultano positivi (+), poi MCI e infine demenza [13].

È importante ricordare che il decorso della malattia è strettamente individuale, così come la durata delle varie fasi, le quali possono anche sovrapporsi. Inoltre, sono stati osservati pazienti con MA che non hanno mai manifestato i sintomi tipici della demenza, tanto che sono andati incontro alla morte mantenendo funzioni cognitive nella norma [13]. Per quanto concerne l'aspettativa di vita di un individuo con diagnosi di MA, essa è in media compresa tra 4 e 8 anni, tuttavia alcuni vivono fino a 20 anni dopo la diagnosi iniziale [2].

1.5 Fattori di rischio

La MA presenta un'eziologia multifattoriale. I principali fattori di rischio non modificabili sono l'età, la genetica e la familiarità.

- L'età è il principale fattore di rischio, infatti la percentuale di persone con MA aumenta con l'età. Questo è un dato molto critico, poiché la società sta invecchiando. In Italia, “secondo le proiezioni demografiche, nel 2051 ci saranno 280 anziani ogni 100 giovani”, di conseguenza si prevede un aumento delle demenze, e quindi della MA [14]. Purtroppo, però, non esiste soltanto la MA ad esordio tardivo (*LOAD*), ma anche la MA ad esordio precoce (*EOAD*), che colpisce individui tra i trenta e i sessantacinque anni. Infatti, un gruppo di scienziati cinesi ha descritto il caso clinico di un giovane di diciannove anni con disturbi della memoria a cui, tramite vari esami clinici, è stata diagnosticata una probabile malattia di Alzheimer, in assenza di mutazioni genetiche note [15].
- Per quanto riguarda l'Alzheimer ad esordio tardivo, un altro fattore di rischio non modificabile è rappresentato dalla genetica, in particolare dall'allele $\epsilon 4$ del gene per l'Apolipoproteina E (*APOE $\epsilon 4$*) [16]. L'ApoE è il principale trasportatore del colesterolo nel SNC. Secondo il report del 2023 “*Alzheimer's disease facts and figures*”, “gli individui che ereditano una copia dell'allele $\epsilon 4$ hanno circa tre volte il rischio di sviluppare la MA rispetto a quelli con due copie della forma $\epsilon 3$; inoltre, chi eredita due copie della forma $\epsilon 4$ ha un rischio di otto-dodici volte superiore” [2]. In aggiunta, la forma $\epsilon 4$ è associata al rischio di avere una MA ad esordio giovanile. Infatti, il test del gene *APOE* è il più comune biomarcatore di rischio, tramite cui viene valutata la suscettibilità o il rischio di sviluppare la malattia [17].
- Mutazioni genetiche a livello del gene codificante la proteina precursore di beta-amiloide (*APP*) sul cromosoma 21 e dei geni codificanti la presenilina 1 e

presenilina 2, rispettivamente sul cromosoma 14 e 1. Le forme sporadiche di MA sono le più frequenti anche se ci sono poi anche delle forme familiari che colpiscono più persone nella stessa famiglia. Le mutazioni di questi geni sono associate a forme familiari di Alzheimer con insorgenza precoce. L'EOAD rappresenta l'1-5% di tutti i casi di MA e le mutazioni nei geni codificanti per APP, PSEN1 e PSEN2 si trasmettono con ereditarietà autosomica dominante. Individui con sindrome di Down detta anche trisomia 21, hanno un rischio maggiore di sviluppare la MA, poiché avere una copia in più del cromosoma 21 può aumentare la produzione di frammenti della proteina β -amiloide a partire dall'APP, la quale si accumula nel cervello [18].

- Malattie cardiovascolari. Infatti, secondo uno studio pubblicato su *Neurology*, il rischio di sviluppare CVD entro un periodo di dieci anni è stato misurato attraverso il *Framingham Risk Score* (FRS), i soggetti con alto rischio di sviluppare malattie cardiovascolari hanno una probabilità da 3 a 6 volte superiore di sviluppare MA, rispetto ai soggetti con un rischio più basso [19].

Secondo il report della *Lancet Commission* del 2020, i fattori di rischio potenzialmente modificabili sono dodici e sono rappresentati da: un basso livello di istruzione, ipoacusia, traumi cerebrali, ipertensione, scarsa attività fisica, diabete, eccessivo consumo di alcol, obesità, fumo di sigaretta, depressione, isolamento sociale e inquinamento atmosferico [3]. Modificando questi fattori di rischio, si può prevenire o ritardare fino al 40% delle varie forme di demenza, tra cui la MA [3].

1.6 Fattori protettivi

La prevenzione primaria è fondamentale per poter arginare i fattori di rischio della MA. È molto importante adottare un corretto stile di vita, fare regolarmente esercizio fisico, in particolare svolgendo l'attività aerobica. Quest'ultima, infatti migliora la funzionalità vascolare, il metabolismo del glucosio cerebrale, la capacità cardiorespiratoria [20]. Inoltre, porta ad un aumento della capacità antiossidante e del livello di emoglobina, un miglioramento delle risposte immunitarie e infiammatorie con una modulazione della concentrazione delle neurotrofine circolanti e peptidi e diminuzione della concentrazione della proteina Tau e del livello di cortisolo [20]. Un altro fattore di prevenzione è la dieta mediterranea; quest'ultima infatti agisce soprattutto sulla memoria, uno dei sintomi primari della MA [21]. In aggiunta, avere livelli più elevati

di istruzione, impegnarsi in attività cognitivamente e socialmente stimolanti e circondarsi di una ricca rete sociale riduce il rischio di MA [22].

1.7 Eziopatogenesi

La MA è il risultato di interazioni sinergiche e complesse di fattori biologici, genetici e ambientali.

1.7.1 Ipotesi colinergica

L'acetilcolina è un neurotrasmettitore molto importante nel SNC. La sinapsi colinergica coinvolge il talamo, il corpo striato, la neocorteccia, il sistema limbico, di conseguenza la trasmissione colinergica è molto importante nelle funzioni cerebrali superiori, quali la memoria, l'apprendimento, l'attenzione e più in generale per la capacità cognitiva di un individuo. È stato dimostrato che nei soggetti con MA vi è una carenza di acetilcolina. La lesione colinergica emerge già negli stadi asintomatici o prodromici della malattia e si basa sulla degenerazione dei neuroni colinergici e degli assoni a livello del sistema limbico e neocorticale. Inoltre, si osserva una diminuzione dei recettori nicotinici nella corteccia cerebrale [23].

1.7.2 Ipotesi amiloide

La MA è definita come una proteinopatia, a causa del mal ripiegamento e accumulo di proteine, come la β -amiloide. Quest'ultima causerebbe così una disfunzione sinaptica e di conseguenza neurodegenerazione. A livello microscopico i pazienti affetti da MA presentano delle placche amiloidi, dette anche placche senili, costituite da peptidi A β . È stato dimostrato che l'accumulo di placche inizia 10-20 anni prima della comparsa dei sintomi clinici della MA [24]. Questa fase preclinica è cruciale per la ricerca di biomarcatori e per lo sviluppo di strategie di prevenzione. La β amiloide è il risultato della proteolisi della proteina transmembrana precursore dell'amiloide (APP) espressa nei neuroni. Il gene codificante APP è localizzato sul cromosoma 21 ed è coinvolto nello sviluppo dei neuroni, nella plasticità sinaptica, nella formazione e riparazione delle sinapsi. L'APP viene tagliata, da proteasi chiamate secretasi, in molecole più piccole. Sono state osservate due vie di processamento dell'APP: una via **non amiloidogenica** e una via **amiloidogenica** (Figura 2). La via non amiloidogenica prevede che l'APP venga processata in modo regolato dalle secretasi, in particolare alfa-secretasi, con la

produzione di APP solubile, la quale viene rilasciata nello spazio extracellulare. In contrapposizione a ciò, vi è la via amiloidogena: l'APP viene scisso dalle β - e γ -secretasi, rispettivamente sulle estremità N- e C-terminali, con conseguente formazione di peptidi monomerici $A\beta$ solubili.

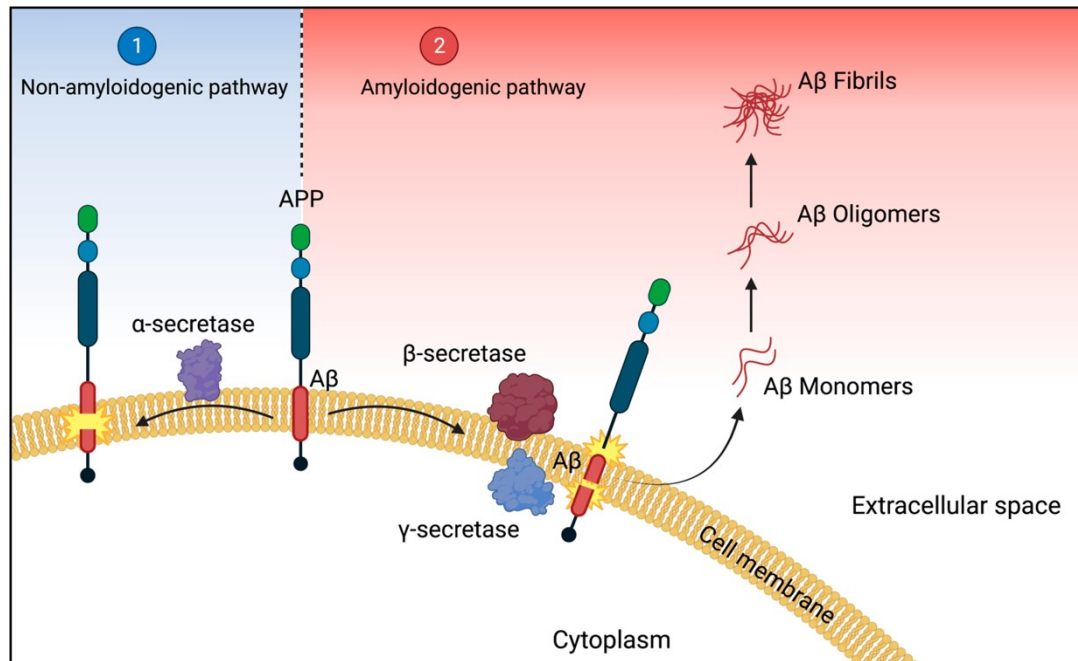


Figura 2. 1) Via non amiloidogena: l'APP viene scissa dall' α -secretasi; viene prodotta APP solubile; 2) Via amiloidogena: l'APP diventa substrato prima della β -secretasi, successivamente della γ -secretasi, con formazione di monomeri, oligomeri e fibrille $A\beta$ insolubili. [25]

Questi ultimi vanno incontro a cambiamenti conformazionali e formano strutture stabili a foglietto β , tramite legami a idrogeno, causando aggregati tossici nel cervello. Il BACE1 è il principale enzima β -secretasi coinvolto nella generazione di peptidi β -amiloide [26]. BACE-1 è stato identificato come possibile bersaglio farmacologico, poiché la sua inibizione può ridurre la produzione di β -amiloide (Figura 2). Sono stati sviluppati infatti diversi composti inibitori di BACE1, tuttavia molte delle sperimentazioni sono state interrotte o hanno apportato risultati deludenti, per motivi legati all'efficacia e alla sicurezza. A seguito della scissione dell' APP da parte di BACE1, viene generato un frammento di 99 residui C-terminale di APP (C99) che viene successivamente scisso dalla γ -secretasi [27]. Le preseniline 1 β e 2 (PSEN1/PSEN2) costituiscono le subunità catalitiche del complesso γ -secretasi e mutazioni ereditarie dei geni codificanti queste due proteine possono accelerare la produzione di β -amiloide, aumentando il rischio di sviluppare la MA. La γ -secretasi taglia l'APP in siti variabili all'interno del dominio

transmembrana, generando peptidi A β di lunghezza compresa tra 38 e 43 residui [28]. A β 42 e A β 40 sono le specie A β più abbondanti nel cervello umano. A β 42 si aggrega rapidamente in oligomeri neurotossici, formando fibrille e placche. È stato osservato che gli oligomeri A β che risultano essere gli aggregati più piccoli, sono più tossici rispetto alla fibrille e quindi possono svolgere un ruolo più significativo nella progressione della malattia [27]. Nel cervello di individui sani l'A β si può ritrovare nel liquido cerebrospinale, come molecola normalmente prodotta dal metabolismo dell'APP e ciò suggerisce che la sintesi e la degradazione di A β sono in equilibrio dinamico [29]. Quando questo stato stazionario viene alterato, i meccanismi di clearance vengono compromessi e l'A β si accumula in maniera eccessiva. Nelle prime fasi della MA, l'accumulo di A β porta all'attivazione delle cellule della microglia che eliminano l'A β attraverso la fagocitosi, innescando una risposta neuroprotettiva [30]. Un altro meccanismo di eliminazione è rappresentato dalla Barriera Emato Encefalica (BBB), la quale regola il passaggio di sostanze tra il sangue e il tessuto cerebrale. Tuttavia, con il progredire della MA, questi meccanismi di eliminazione risultano compromessi [31]. Vi è inoltre una via di drenaggio perivascolare, nota anche come via glio-linfatica, una rete di percorsi perivascolari a livello cerebrale che facilita lo scambio del liquido cerebrospinale e interstiziale cerebrale. Attraverso questa rete, il liquido cerebrospinale e i soluti come l'A β possono essere drenati verso i vasi linfatici. L'acquaporina-4 (AQP4) contribuisce alla modulazione della via glio-linfatica, infatti è stato dimostrato che la delezione di AQP4 nei topi compromette la clearance dell'A β , promuovendo la formazione di placche senili [32]. L'A β può causare danni ai nervi colinergici promuovendo il rilascio di colina dai neuroni nella cellula, impoverendo la colina intracellulare e riducendo così la sintesi di ACh [33]. Inoltre, la presenza dell'allele APOE ϵ 4 è stata associata ad un aumento dell'accumulo intraneuronale di β -amiloide, con conseguente accumulo e formazione di placche [34]. In aggiunta, l'accumulo di β -amiloide è associato ad una disfunzione del meccanismo di autofagia. In particolare, si verifica un ostacolo alla maturazione degli autofagolisosomi con conseguente accumulo dei vacuoli autofagici. In aggiunta, vi è una compromissione del trasporto retrogrado degli autofagolisosomi, cioè il loro spostamento in direzione opposta verso il corpo cellulare neuronale, dove i lisosomi sono più concentrati. Tutto ciò porta ad una mancata degradazione e quindi ad un accumulo di A β [35]. I depositi di β -amiloide nel cervello vengono rivelati mediante tomografia a emissione di positroni (PET). I radiofarmaci più comunemente utilizzati per la PET sono:

fluorodesossiglucosio (18F-FDG), flutemetamol, florbetaben e florbetapir. L'esame si esegue iniettando al paziente il radiofarmaco per via endovenosa, successivamente il tracciante si lega alle placche di β -amiloide nelle regioni cerebrali coinvolte, emette i positroni, i quali si combinano con gli elettroni nell'organismo e producono fotoni gamma. Questi ultimi vengono rilevati dallo scanner e trasformati in immagini. I risultati dell'esame vengono poi interpretati da medici specialisti. È stato osservato che "il valore predittivo positivo della PET amiloide diminuisce con l'aumentare dell'età" [24]: ciò significa che, soprattutto negli anziani, è possibile che l'esame mostri un accumulo di β -amiloide non associato alla MA, ma ad altre condizioni patologiche o fisiologiche, come l'invecchiamento. La PET cerebrale, quindi, non è sufficiente per confermare la diagnosi di MA, ma sono necessari ulteriori esami come test cognitivi, risonanza magnetica, TAC e ricerca di biomarcatori nel liquido cerebrospinale e nel plasma. La misurazione della concentrazione di A β nel liquido cerebrospinale può essere utilizzata come biomarcatore diagnostico e prognostico di MA. In particolare, l'A β presenta due isoforme, in base al numero di amminoacidi che compongono il peptide: A β 40 e A β 42. L'A β 42 si accumula nel cervello e contribuisce alla formazione di placche senili, mentre la produzione di A β 40 e la sua eliminazione sono in equilibrio dinamico. In soggetti affetti da MA, nel liquor cerebrospinale ci sarà una riduzione della concentrazione di β -amiloide, in particolare A β 42 [33]. Individui sani, invece, presenteranno livelli di β -amiloide (1-42) > 500ng/L, indipendentemente dalla loro età [36]. Inoltre, nonostante la misurazione del rapporto A β 42/A β 40 sia più accurata nel liquido cerebrospinale, la misurazione nel plasma è possibile e si è dimostrata efficace. Infatti, secondo uno studio di Schindler, Suzanne E et al. pubblicato su Neurology nel 2019, *"i livelli plasmatici di A β 42/A β 40, soprattutto se considerati insieme all'età e alla presenza o meno dell'allele APOE ϵ 4, possono fornire una diagnosi accurata dell'amiloidosi cerebrale e possono essere impiegati come screening in individui che presentano una funzione cognitiva nella norma"* [37].

1.7.3 Ipotesi della cascata mitocondriale

I mitocondri sono organelli cellulari, deputati alla produzione di energia sottoforma di ATP, da cui i neuroni dipendono per poter svolgere le loro funzioni, come la trasmissione sinaptica. Secondo quest'ipotesi, individui con MA presenterebbero una ridotta funzione bioenergetica mitocondriale, a causa di una ridotta attività enzimatica del

ciclo di Krebs e della catena respiratoria, ridotta produzione di ATP e aumento di radicali liberi con conseguente stress ossidativo cellulare [38]. La carenza di ATP porta ad un blocco di tutte le attività cellulari che richiedono energia e la cellula, entrata in una fase irreversibile di riparazione del danno, va incontro ad apoptosi⁵. L'aumento anomalo dell'apoptosi è associato a malattie neurodegenerative; la disfunzione neuronale, caratteristica principale dei disturbi neurodegenerativi, è quindi strettamente collegata alla disfunzione mitocondriale. Inoltre, il malfunzionamento mitocondriale interagisce con la formazione di placche senili e l'aggregazione della proteina Tau, tramite interazioni bidirezionali [39]. Sono necessarie, tuttavia, ulteriori ricerche per comprendere la sequenza e la relazione dei vari eventi.

1.7.4 Ipotesi della neuroinfiammazione

L'ipotesi della neuroinfiammazione nella MA è legata strettamente all'attivazione microgliale. Le cellule microgliali sono caratterizzate da macrofagi "residenti", ossia cellule immunitarie del sistema nervoso centrale con un ruolo centrale nella neuroinfiammazione. TREM2, un recettore espresso dalle cellule microgliali, regola la produzione di citochine infiammatorie, modula la risposta immunitaria e facilita la fagocitosi, di conseguenza l'attivazione di questo recettore è strettamente legata alla patogenesi della MA [40]. In alcuni casi di MA sono state riscontrate mutazioni nel gene TREM2, con conseguente compromissione della capacità delle microglia di svolgere correttamente la funzione di difesa immunitaria [40]. Le cellule della microglia possono assumere due fenotipi: M1 ed M2. Il fenotipo M1 è pro-infiammatorio, si attiva in risposta a danni del SNC e rilascia citochine pro-infiammatorie come IL-1 β , TNF- α e IL-6 [41]. È stato osservato che nella MA la funzione di fagocitosi delle microglia è compromessa e vi è una prevalenza del fenotipo M1, contribuendo alla progressione e alla gravità della malattia [41]. Questo meccanismo è strettamente legato all'ipotesi amiloide, poiché le cellule della microglia possono essere attivate da placche di A β ; in risposta a ciò secernono citochine pro-infiammatorie e ligandi come CCL2, CCL4 e CCL11, che promuovono il reclutamento di ulteriore microglia e astrociti attorno all'area del danno [41]. Tuttavia, l'attivazione persistente delle microglia e la produzione continua di

⁵ A differenza della morte per necrosi, la morte per apoptosi è identificata come un programma di "suicidio" della cellula, regolato da meccanismi molecolari specifici. L'apoptosi può avvenire per via estrinseca, oppure intrinseca (mitocondriale).

sostanze pro-infiammatorie causano cambiamenti strutturali e funzionali che portano alla degenerazione neuronale [41]. Un'altra tipologia di cellule coinvolta nella neuroinfiammazione e quindi nell'eziopatogenesi della MA, è rappresentata dagli astrociti. Quest'ultimi, reattivi e ipertrofici, si attivano e si accumulano attorno alle placche senili, rilasciando citochine, interleuchine, ossido nitrico e altre molecole citotossiche [41].

1.7.5 Ipotesi dello squilibrio del calcio

L'ingresso di ioni calcio è indispensabile per il funzionamento delle cellule ed è fondamentale per la plasticità neuronale. Tuttavia, mentre la concentrazione di calcio all'esterno della cellula è molare (M), la concentrazione di calcio libero intracellulare è di 10-100 nM e deve essere mantenuta bassa, poiché il calcio può essere tossico per le cellule, soprattutto per i neuroni, contribuendo alla neurodegenerazione. Ciò presuppone che i neuroni siano dotati di meccanismi che regolano finemente l'omeostasi del calcio. Nella MA si assiste ad un malfunzionamento della regolazione del calcio, tramite vari meccanismi. Gli aggregati di β -amiloide possono condizionare i processi coinvolti nella regolazione del calcio; in particolare, possono attivare canali specifici, come il recettore per l'inositolo trisfosfato (InsP_3R) e il recettore per la rianodina (RyR), presenti nel reticolo endoplasmatico [42]. L'attivazione di questi canali porta al rilascio di calcio nel citoplasma. La β -amiloide interagisce con i recettori ionotropici NMDA, per aumentare l'afflusso di calcio NMDAR-dipendente [42]. Inoltre, la β -amiloide può formare dei pori sulla membrana plasmatica delle cellule, tramite cui passano ioni calcio, di conseguenza ci sarà un aumento di afflusso degli ioni nel citoplasma [43]. Un malfunzionamento della regolazione del calcio può regolare la sintesi di $A\beta$, infatti elevati livelli di calcio intracellulare, causati dall'inibizione della pompa SERCA o dalla liberazione di calcio attraverso il recettore RyR, aumentano la formazione di β -amiloide [43]. La mutazione PS1 L286V, associata a forme ereditarie di Alzheimer, può danneggiare i mitocondri, compromettendone le funzioni, tra cui la regolazione dell'omeostasi del calcio intracellulare [42]. In aggiunta, l'alterazione dell'omeostasi del calcio porta ad un aumento dell'attività delle chinasi, di conseguenza ad un aumento della fosforilazione di Tau [43].

1.7.6 Ipotesi dell'asse cervello-intestino-microbiota

L'asse cervello-intestino-microbiota mette in comunicazione, tramite una relazione bidirezionale, il SNC e il Sistema Nervoso Enterico (SNE), definito "secondo cervello". Le alterazioni quali-quantitative del microbiota intestinale, denominate con il termine *disbiosi* e causate da stress, dieta, farmaci come antibiotici, giocano un ruolo importante nella patogenesi di malattie neurodegenerative, tra cui la MA. Inoltre, la disbiosi intestinale può portare ad un aumento della permeabilità intestinale, permettendo il passaggio di patogeni e sostanze nocive nel circolo sanguigno che attivando il sistema immunitario, causa un'inflammatione sistemica, con aumento del rilascio di citochine infiammatorie. L'inflammatione sistemica porta ad una compromissione della BBB, innescando neuroinflammatione e quindi attivazione della microglia, astrociti reattivi e sistema del complemento [44]. Molti batteri intestinali secernono lipopolisaccaridi (LPS), i principali costituenti della membrana cellulare esterna dei batteri Gram negativi. Questi composti sono in grado di innescare risposte infiammatorie quando raggiungono il SNC a causa di un aumento della permeabilità della BBB, processo che si verifica nelle malattie neurodegenerative. A prova di ciò, un'analisi tramite tecniche immunoistochimiche, ha rivelato un aumento di LPS sette volte maggiore nella neocorteccia di pazienti con MA, rispetto al gruppo di controllo. L'aumento è ancora più significativo nell'ippocampo, dove l'LPS è risultato essere in media 21 volte più abbondante rispetto al gruppo di controllo [45]. Il microbioma intestinale è in grado di produrre acidi grassi a corta catena o SCFA, composti prodotti soprattutto durante la fermentazione delle fibre alimentari. Complessivamente gli SCFA svolgono un ruolo positivo e protettivo nello sviluppo della MA, poiché modulano la neuroinflammatione, regolano il metabolismo cerebrale, contribuiscono a mantenere l'integrità della BBB, agiscono come substrati energetici per il metabolismo cerebrale [46]. Inoltre, il butirrato, attraverso l'inibizione di istone deacetilasi (HDAC), condiziona la regolazione epigenetica modulando e aumentando l'espressione di geni legati alla plasticità sinaptica e alla memoria [46]. È stato osservato che gli SCFA interferiscono con l'assemblaggio dei peptidi A β 1-40 e A β 1-42 in aggregati A β neurotossici solubili [46]. In particolare, uno studio condotto da Ho, Lap et al. ha analizzato sei SCFA quali acido valerico, acido isovalerico, acido butirrico, acido isobutirrico, acido propionico e acido acetico e la loro interazione con le proteine A β [46]. Per separare le proteine A β , è stata utilizzata la tecnica di separazione elettroforetica "SDS-PAGE" e, dopo l'elettroforesi, i peptidi e le forme multimeriche sono stati colorati

con silver staining per essere visualizzati [46]. I risultati ottenuti indicano che l'aggiunta di SCFA in diverse proporzioni modifica le interazioni proteina-proteina dei peptidi A β [46]. Inoltre, studi sul microbioma orale dei pazienti affetti da MA hanno rilevato la presenza di diversi batteri associati al biofilm, tra cui *Porphyromonas gingivalis*, patogeno orale coinvolto nella parodontite; ciò indica una possibile connessione tra la salute gengivale e la MA [47]. In un modello murino è stato dimostrato che i cambiamenti del microbiota intestinale, indotti dagli antibiotici, influenzano la neuroinfiammazione e la deposizione di placche di beta-amiloide nella MA [48]. Inoltre, uno studio ha evidenziato che il trapianto di microbiota fecale dai topi sani ai topi transgenici, cioè topi modificati geneticamente per acquisire una patologia simile alla MA, ha portato ad un miglioramento delle caratteristiche principali della malattia: accumulo di A β , grovigli neurofibrillari e deterioramento cognitivo [49]. Sulla base dell'ipotesi dell'"asse cervello-intestino-microbiota", sono state evidenziate delle strategie che possono essere attuate per mantenere l'equilibrio del microbiota:

- dieta equilibrata, come la dieta mediterranea, considerata fattore protettivo per la MA;
- probiotici ossia microorganismi che vivono normalmente nell'intestino; assumere alimenti/integratori con probiotici contribuisce a mantenere in equilibrio il microbiota intestinale;
- prebiotici, definiti come "sostanze non digeribili che favoriscono più o meno selettivamente la crescita e l'attività dei probiotici" [50]. Uno studio longitudinale condotto su anziani ha dimostrato che una maggiore assunzione di fruttano è associata a un ridotto rischio di malattia di Alzheimer [51];
- trapianto di microbiota fecale i cui risultati di uno studio condotto in Italia hanno rivelato che i sintomi della MA possono essere trasferiti, tramite il trapianto di microbiota fecale, in un pool di ratti [52]. In particolare, i campioni fecali trasferiti provenivano da soggetti cognitivamente sani e da pazienti affetti da MA. Il trapianto da individui con MA ha provocato, nei ratti, deficit cognitivi di comportamenti dipendenti dalla neurogenesi dell'ippocampo [52]. Nonostante i risultati incoraggianti, sono necessari ulteriori studi sul possibile beneficio del trapianto di microbiota fecale per il trattamento della MA.

1.7.7 Ipotesi dell'alterazione del metabolismo del glucosio

Il cervello utilizza il glucosio come principale fonte di energia e ne consuma circa 100g al giorno essendo essenziale per sostenere l'attività neuronale, per il mantenimento del potenziale di membrana e per il corretto funzionamento delle attività cognitive. Il ridotto metabolismo di glucosio nel cervello si verifica oltre dieci anni prima dell'insorgenza dei sintomi della MA [53]. Il glucosio penetra la BBB per diffusione facilitata, attraverso il trasportatore GLUT1, mentre nei neuroni è espresso il trasportatore GLUT3. Quando il glucosio entra nella cellula viene fosforilato da una esochinasi formando glucosio 6-fosfato. Da quest'ultimo, grazie all'enzima della glicolisi fosfofruttochinasi, viene prodotto fruttosio 1-6 difosfato e quindi viene dunque prodotta ATP tramite glicolisi e ciclo di Krebs. Inoltre, dagli intermedi del ciclo di Krebs vengono prodotti neurotrasmettitori come acetilcolina, glutammato, aspartato. I trasportatori del glucosio presenti a livello del cervello non sono sensibili all'insulina, ma è stata descritta una forma di diabete denominata di tipo 3 che rappresenta un importante fattore di rischio per la MA. Quest'ultima è stata definita come "diabete di tipo 3", poiché i pazienti che ne sono affetti sviluppano una resistenza all'insulina a livello cerebrale, in modo analogo a quanto accade ai pazienti con diabete di tipo 2. L'insulina è un ormone pancreatico ipoglicemizzante e la resistenza all'insulina indica una condizione in cui l'insulina viene prodotta dal pancreas, ma presenta un'attività ridotta a livello degli organi e tessuti su cui agisce. Le principali conseguenze della resistenza insulinica a livello cerebrale sono [54]:

- aumento della permeabilità della BBB. Infatti, l'insulina agisce sulle cellule endoteliali vascolari per regolare la vasocostrizione e il rilassamento dei capillari, pertanto la resistenza all'insulina può aumentare la permeabilità della BBB, consentendo l'aumento di A β intracerebrale;
- aumento della fosforilazione della proteina Tau;
- deterioramento della memoria a lungo termine, dovuto alla resistenza all'insulina nell'ippocampo;
- aumento dell'espressione di ApoE;
- ridotto afflusso di glucosio nel cervello per ridotta espressione di GLUT1, di conseguenza riduzione del suo metabolismo e della produzione di ATP.

Inoltre, il legame dell'insulina al suo recettore tirosin-chinasico porta, a valle, all'attivazione della chinasi mTOR con conseguente inibizione dell'autofagia e quindi accumulo di proteine mal ripiegate e organelli danneggiati. Tutto ciò contribuisce al

danno neuronale [53]. In aggiunta, l'attivazione della chinasi mTOR porta, indirettamente, alla fosforilazione di IRS-1 rendendolo inattivo e ciò contribuisce alla resistenza all'insulina [53]. L'ipotesi di un alterato metabolismo del glucosio e della resistenza all'insulina ha portato all'idea che farmaci antidiabetici possano essere usati come terapia delle demenze, inclusa la MA. In particolare, è stata proposta la somministrazione di insulina per via intranasale come terapia del diabete di tipo III, poiché in grado di raggiungere facilmente il SNC tramite la via olfattiva. Farmaci antidiabetici, quali gli agonisti del recettore del GLP-1, inibitori della DPP-4 e inibitori di SGLT2, sono in fase di sperimentazione come possibili terapie per l'Alzheimer.

CAPITOLO 2

BIOCHIMICA DELLA PROTEINA TAU

La proteina Tau è stata scoperta per la prima volta nel 1975 e negli anni ha suscitato un interesse significativo nell'ambito della ricerca per il suo ruolo cruciale nell'ambito delle malattie neurodegenerative, come la malattia di Alzheimer e altre forme di demenza [55]. La proteina Tau ha la funzione di stabilizzare i microtubuli presenti negli assoni dei neuroni, ma in condizioni patologiche forma dei depositi cerebrali, denominati “grovigli neurofibrillari”, costituiti dalle proteine Tau iperfosforilate. In questo capitolo viene analizzata nel dettaglio la biochimica della proteina Tau, con un focus sulla sua struttura, sulle modifiche post-traduzionali e il suo ruolo come biomarcatore nella diagnosi della MA.

2.1 Struttura

La proteina Tau è una proteina IDP, cioè una “proteina intrinsecamente disordinata”, costituita dalla mancanza di una struttura tridimensionale ben definita e da una flessibilità strutturale guidata dall'entropia [56]. Molte IDP subiscono transizioni da uno stato disordinato ad uno ordinato nel momento in cui interagiscono con partner di legame specifici e per questi motivi sono state definite *dancing proteins* ossia proteine danzanti [56]. La proteina Tau si trova nel citoplasma ed è codificata dal gene MAPT, situato sul cromosoma 17q21. Rappresenta una proteina associata ai microtubuli (MAP) nei neuroni del SNC e periferico dei vertebrati. La struttura primaria è costituita da quattro porzioni diverse:

- 1) il dominio N-terminale (NTR) che si trova all'inizio della sequenza amminoacidica; è un dominio acido carico negativamente a pH fisiologico, per la presenza di amminoacidi come glutammato e aspartato. I primi 200 amminoacidi di questo dominio, insieme con gli ultimi 80 amminoacidi del dominio C-terminale, costituiscono regioni della proteina intrinsecamente “disordinate” (IDR), cioè dinamiche e flessibili, in parte grazie anche alla presenza di numerose serine e treonine. La mancanza di una struttura tridimensionale ben definita di queste regioni influisce sulle numerose interazioni proteina-proteina, rendendo la funzione della proteina Tau estremamente flessibile. Il dominio NTR si lega ad una serie di proteine cellulari, tra cui l'eparina e le annessine. Queste ultime sono

- proteine che, tramite il legame con Tau, contribuiscono alla sua localizzazione a livello dell'assone [57]. L'NTR è coinvolto nella regolazione dell'apoptosi e nell' "organizzazione della membrana cellulare" [58];
- 2) il dominio ricco in prolina (PRR) caratterizzato come dice la definizione dalla presenza di numerosi residui di prolina, che conferiscono rigidità e basicità; infatti, a pH fisiologico ha carica positiva ed essendo un dominio ricco di serina e treonina, può andare incontro a fosforilazione interagendo con proteine chinasi e fosfatasi. Il dominio PRR interagisce con la proteina peptidil-prolil *cis/trans* isomerasi NIMA-interagente 1 (Pin1), un enzima che catalizza la reazione di isomerizzazione dei residui di prolina della pT231 dalla forma *cis* alla forma *trans*. È stato osservato che bassi livelli di Pin1 possono portare ad un aumento dei livelli di *cis* pT231-Tau, la quale contribuisce alla progressione della MA [59];
 - 3) il dominio legante i microtubuli (MBR) il quale svolge un ruolo centrale nell'interazione con i microtubuli; è costituito da numerosi residui di lisina, quindi a pH fisiologico presenta una carica positiva. Le lisine della MBR formano delle interazioni ioniche con la superficie dei microtubuli. Inoltre, la MBR interagisce con altre proteine come l'actina e le "heat shock proteins" o proteine da shock termico. È stato osservato che due chaperoni, HspB1, appartenente alla famiglia delle small heat shock proteins - sHSP e Hsc70, membro della famiglia Hsp70 costitutivamente espresso, interagiscono con la proteina Tau, attraverso due meccanismi differenti. HspB1 ritarda, ma non impedisce, la formazione di fibrille legandosi alla proteina tal quale mentre Hsc70, mostra maggiore affinità per la proteina Tau sottoforma di oligomero impedendone l'aggregazione in fibrille [60];
 - 4) il dominio carbossi-terminale (CTR) che a pH fisiologico è carico negativamente. Inoltre, "la parte carbossiterminale della Tau, che comprende MBR e CTR, è altamente conservata nei mammiferi, uccelli, rettili e pesci ossei; la stessa regione è presente anche in altri membri della famiglia di proteine MAP, come MAPT, MAP2 e MAP4 [58]". La regione C-terminale interagisce con la NTR, assumendo una conformazione "a graffetta", in cui i due domini si avvicinano reciprocamente [61]. La capacità di assumere questa conformazione mantiene la solubilità della proteina Tau e contribuisce a proteggerla dall'aggregazione anomala e dannosa[61].

Il gene MAPT, che codifica per la proteina Tau, è organizzato in 16 esoni. Lo splicing alternativo regola sei esoni di MAPT (2, 3, 4a, 6, 8 e 10), determinando la produzione di circa dodici diverse isoforme della proteina Tau [61]. Nel SNC dell'adulto vengono espresse sei isoforme Tau dallo splicing alternativo dell'mRNA di MAPT, in particolare degli esoni 2, 3 e 10. Le sei isoforme hanno una lunghezza di 352-441 amminoacidi ed una massa molecolare compresa tra 37 e 46 kDa (Figura 3) [61].

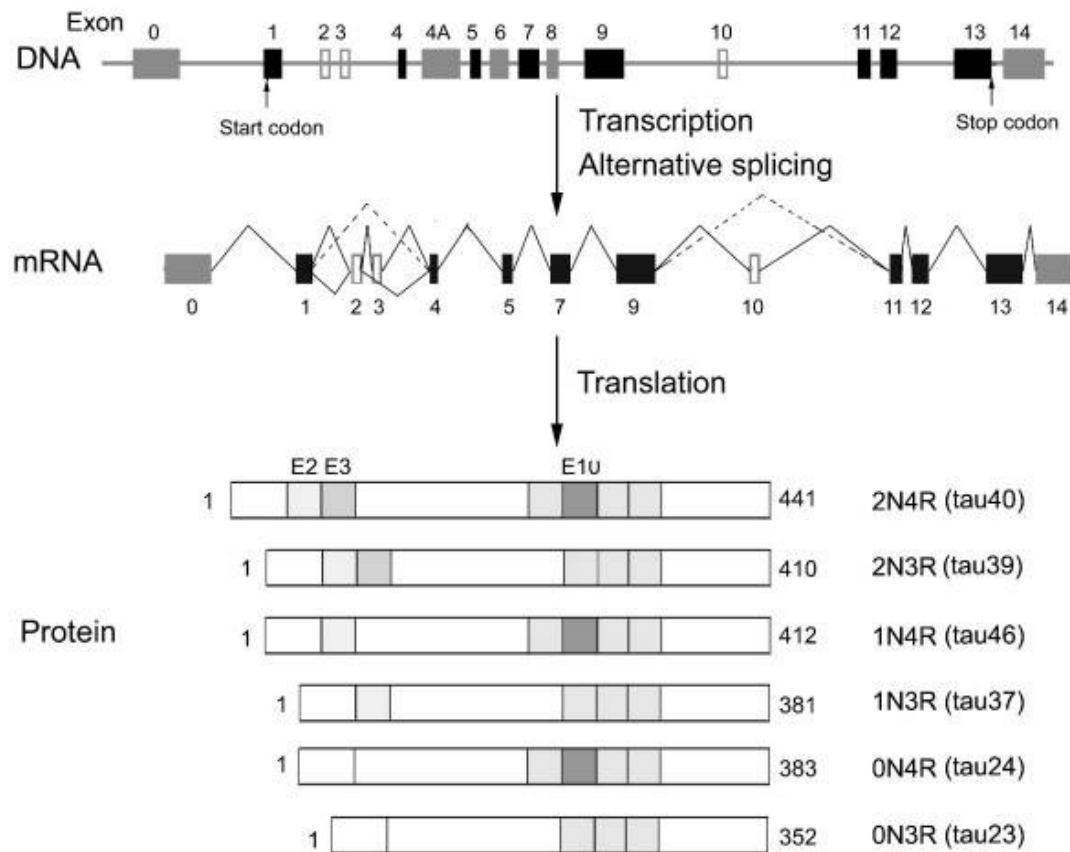


Figura 3. Rappresentazione del gene, mRNA e isoforme della proteina Tau: in alto i riquadri neri rappresentano gli esoni costitutivi, quelli vuoti e grigi rappresentano gli esoni che vanno incontro a splicing alternativo cioè 2,3 e 10; si ottengono così, tramite trascrizione e splicing alternativo, sei molecole di mRNA. In basso vengono rappresentate le sei isoforme della proteina Tau presenti nel cervello umano adulto [62].

Le isoforme contenenti l'eson 10 sono denominate "4R", mentre quelle senza sono denominate "3R"[61]. L'inclusione o l'esclusione degli esoni 2 e 3 determina la presenza di segmenti N1 e N2 e viene indicata nella seconda metà del nome dell'isoforma con "0N" -assenza di entrambi gli esoni-, "1N" -inclusione solo dell'eson 2- o "2N" -inclusione di entrambi gli esoni 2 e 3- [61]. In condizioni fisiologiche, nel cervello umano adulto le isoforme 4R e 3R sono presenti in quantità approssimativamente uguali e quest'equilibrio è fondamentale per la corretta funzionalità cerebrale. Infatti, alterazioni del rapporto 3R-

Tau/4R-Tau sono associate a diverse taupatie [61]. Durante lo sviluppo fetale e il periodo perinatale, le isoforme Tau hanno una composizione diversa ed in particolare, vi è una prevalenza dell'isoforma iperfosforilata 3R0N [61]. García-Escudero, Vega *et al.* hanno scoperto una nuova isoforma di Tau chiamata W-Tau; essa deriva dal TIR-MAPT mRNA, il quale conserva l'introne 12 [63]. W-Tau è un'isoforma espressa specificatamente nell'uomo e livelli bassi sono stati riscontrati nel cervello di pazienti affetti da MA, suggerendo un possibile ruolo nella malattia [63].

2.2 Funzione fisiologica

La proteina Tau è una proteina associata ai microtubuli (MAP), strutture intracellulari costituiti da più eterodimeri di tubulina. Il concatenarsi dei dimeri forma un protofilamento: sono necessari circa 12-13 protofilamenti associati in maniera latero-laterale a delimitare uno spazio cavo che vanno poi a formare una struttura cilindrica cava, detta appunto microtubulo. Durante la fase di crescita, nuovi eterodimeri di tubulina si aggiungono all'estremità più dinamica del microtubulo, conosciuta come estremità "*plus end*". I microtubuli vanno incontro in maniera ripetuta, ma organizzata, a round di polimerizzazione-*rescue* o fase di pausa - depolimerizzazione o catastrofe, in rapporto agli eventi a cui partecipa il microtubulo; questa caratteristica è definita "instabilità dinamica". I microtubuli sono essenziali per varie funzioni della cellula e svolgono una funzione esclusiva durante la fase M, consentendo la formazione del fuso mitotico e quindi la corretta separazione dei cromatidi nelle cellule figlie e nella separazione delle cellule figlie, cioè la citodieresi; nelle cellule in interfase o cellule quiescenti e cellule non in fase M, i microtubuli vengono assemblati e utilizzati come "rotaie" lungo le quali si muovono complessi proteici e organuli, quindi sono essenziali anche per fenomeni di endocitosi, esocitosi tra cui il rilascio di neurotrasmettitori, motilità cellulare di organuli come lisosomi, mitocondri, vescicole. La proteina Tau è una proteina multifunzionale, il cui ruolo dipende dalla sua localizzazione all'interno della cellula; è presente nel sistema nervoso centrale e periferico ed è una proteina sia intracellulare, e sia extracellulare ed infatti la si ritrova nel liquido interstiziale e nel liquido cerebrospinale (CSF). È localizzata principalmente negli assoni e, una delle tante funzioni, è quella di stabilizzare i microtubuli all'interno delle cellule nervose. Attraverso i domini C-terminali, la proteina Tau si lega agli eterodimeri di tubulina dei microtubuli. In aggiunta, la proteina Tau ha diversi effetti sull'instabilità dinamica dei microtubuli. Infatti, studi *in vitro* hanno

dimostrato che Tau contribuisce all'elongazione dei filamenti dei microtubuli, rallenta la velocità di depolimerizzazione e riduce la fase di catastrofe [64]. Tuttavia, come evidenziato nello studio di Qiang, Liang *et al.*, il modo in cui Tau opera sulle funzioni dei microtubuli può essere più complesso di quanto previsto, poiché Tau potrebbe non agire semplicemente come una proteina statica con una capacità di stabilizzazione, ma potrebbe facilitare la formazione di lunghi domini labili all'interno dei microtubuli, consentendo loro una maggiore flessibilità dinamica [65]. La proteina Tau compete con le proteine motrici, come la dineina e la chinesina, per il legame ai microtubuli [66]. Chinesina e dineina sono proteine motrici che si muovono lungo i microtubuli ed in particolare le dineine si spostano sui microtubuli in direzione retrograda verso il corpo cellulare. Le chinesine invece, si muovono verso l'estremità positiva del microtubulo, cioè dal centro della cellula verso la periferia con le terminazioni assoniche. La proteina Tau compete maggiormente con la chinesina, di conseguenza si può verificare un accumulo del materiale cellulare trasportato, come i mitocondri, a livello dei corpi cellulari [66]. La proteina Tau, quindi, agisce sulla velocità di trasporto assonale all'interno delle cellule nervose ma per confermare queste ipotesi sono necessari ulteriori studi *in vivo* [66]. La proteina Tau forma legami con diverse strutture intracellulari: ciò significa che può legare gli elementi del citoscheletro, membrane cellulari e altre componenti strutturali. Infatti, la è in grado di stabilire legami tra i microtubuli e i microfilamenti di actina e ciò avviene tramite il dominio PRR di Tau [66]; inoltre, può interagire con la membrana dell'apparato del Golgi, facilitando il legame di questa ai microtubuli e contribuendo così al trasporto intracellulare. La proteina Tau interagisce con le membrane cellulari anioniche. In particolare, l'MBR carico positivamente, forma interazioni elettrostatiche con i lipidi e le proteine di membrana, specificatamente con LRP1, una proteina-recettore che svolge un ruolo importante nel metabolismo dei lipidi come il colesterolo, nell'endocitosi e internalizzazione di molecole come ApoE ed è coinvolta nella regolazione della concentrazione di A β nel cervello e quindi della sua *clearance*. Uno studio condotto da Rauch, Jennifer N *et al.* ha dimostrato che LRP1 agisce sull'endocitosi della proteina Tau e ne controlla la diffusione nel cervello, nello specifico una down-regolazione di *LRP1* in un modello murino *in vivo* ha ridotto la diffusione di Tau nei neuroni [67]. La proteina Tau è presente anche nella lamina nucleare dove interagisce, sottoforma di oligomero, con il recettore della lamina B e con le proteine della lamina e regola il complesso dei pori nucleari, contribuendo così all'integrità del nucleo [68]. È stato osservato, in vivo,

che la proteina Tau nucleare svolge un ruolo di protezione dell'integrità del DNA neuronale, poiché protegge quest'ultimo in condizioni fisiologiche e di stress termico, "heat stress" o HS, responsabile dei danni al DNA [69] ed inoltre, potrebbe svolgere un ruolo protettivo anche nei confronti dell'RNA [69]. È stato dimostrato che la proteina Tau modula l'espressione genica, agendo sull'eterocromatina e quindi modificando la disponibilità della trascrizione dei geni. Inoltre, la proteina Tau contribuisce a preservare l'integrità strutturale dei cromosomi e agisce come *silencer* dell'RNA ribosomiale: ciò indica un coinvolgimento anche nelle funzioni cellulari legate alla sintesi delle proteine [68]. Nelle sinapsi, in condizioni fisiologiche, è stata rilevata una piccola quantità di Tau, suggerendo un possibile ruolo anche nella plasticità sinaptica. Il potenziamento a lungo termine (LTP) e la depressione a lungo termine (LTD) sono forme di plasticità sinaptica fondamentali per l'immagazzinamento della memoria e la proteina Tau dendritica sembra essere coinvolta nella modulazione di questi meccanismi. Uno studio condotto da Biundo, F., Del Prete, D., Zhang, H. *et al.* ha analizzato topi con delezione del gene MAPT (*Mapt*^{-/-}); questi topi mostrano disturbi della memoria e dell'apprendimento dipendenti dall'invecchiamento [70]. L'analisi ha rivelato che i topi *Mapt*^{-/-} presentano deficit dell'LTP mentre i topi con una singola copia del gene *Mapt*, *Mapt*^{+/-}, hanno mostrato un lieve deficit della memoria a breve termine [70]. Inoltre, la proteina Tau svolge un ruolo chiave nella modulazione delle vie di segnalazione coinvolte nella mielinizzazione, attraverso l'interazione con la Fyn chinasi e il citoscheletro dei microtubuli [71]. A valle viene attivata una cascata di segnali che culmina con il trasporto dell'mRNA codificante la proteina basilica della mielina (MBP) ai siti di mielinizzazione che si trovano all'interfaccia assone-neuroglia [71].

2.3 Iperfosforilazione e altre modifiche post-traduzionali

La proteina Tau è coinvolta in diverse malattie neurodegenerative, note come taupatie, caratterizzate dalla deposizione anomala della proteina Tau nel cervello. Le taupatie possono essere classificate in familiari o sporadiche; la causa principale delle taupatie familiari è rappresentata da mutazioni del gene *MAPT*, le quali generano cambiamenti conformazionali della proteina Tau e portano ad un'aggregazione patologica [66]. Al contrario, nelle taupatie sporadiche, come la MA, il meccanismo che innesca l'aggregazione della proteina Tau non è del tutto chiaro [66]. Inoltre, le taupatie possono essere distinte in primarie o secondarie, in base alla causa principale che porta

all'aggregazione di Tau [72]. Le taupatie primarie, come la malattia di Pick, la paralisi sopranucleare progressiva, degenerazione corticobasale e la malattia dei grani argirofilari, sono di origine genetica e la proteina Tau rappresenta la causa predominante [72]. Nelle taupatie secondarie, come la MA, l'accumulo della proteina Tau rappresenta una conseguenza di altri eventi patologici [72]. Inoltre, le taupatie possono essere classificate in base alle isoforme della proteina Tau in 3R+4R, 3R e 4R [72]. La MA è un esempio di tauopatia 3R+4R, poiché presenta grovigli neurofibrillari costituiti da entrambe le isoforme di Tau [72]. La proteina Tau è soggetta a diverse modifiche post-traduzionali, che possono influire sulla sua funzione e contribuire alle varie patologie associate. Le principali modifiche post-traduzionali della Tau sono: fosforilazione, acetilazione, metilazione, ubiquitinazione e proteolisi [73]. Le modifiche post-traduzionali sono successive al processo di traduzione e sono in grado di modificare la struttura, la funzione e la localizzazione della proteina nella cellula. I residui di amminoacidi che vanno incontro a modifiche post-traduzionali sono serina (S), treonina (T), tirosina (Y), lisina (K), arginina (R), asparagina (N), istidina (H) e cisteina (C) [74]. La fosforilazione della proteina Tau è una delle modifiche post-traduzionali più studiate e consiste nell'aggiunta di gruppi fosfato carichi negativamente su residui di serina, treonina o tirosina rendendo la proteina complessivamente più idrofila [74]. La fosforilazione delle proteine può attivare o disattivare le vie di segnalazione fondamentali all'interno della cellula, può regolare le interazioni proteina-proteina, può indurre dei cambiamenti conformazionali che possono modificare la sua struttura tridimensionale e, di conseguenza, la sua funzione biologica e può regolare la degradazione delle proteine attraverso il proteasoma [74]. Alcuni siti fosforilati della proteina Tau sono presenti nel cervello sano, mentre altri sono iperfosforilati nei pazienti con taupatie. Inoltre, alcuni siti fosforilati in condizioni fisiologiche si ritrovano anche nella Tau iperfosforilata e quindi associata a patologie. Il processo di fosforilazione richiede due tipologie di enzimi: chinasi e fosfatasi. Le chinasi sono enzimi in grado di trasferire gruppi fosfato da molecole che ne sono ricche, come l'ATP, a specifici substrati. Tra queste, svolgono un ruolo chiave le serina/treonina chinasi come GSK3 β , la cdk5, la CK1, la PKA, le MAPK p42/p44 (ERK 1/2), la PKC, la proteina chinasi II calmodulina-dipendente (CaMKII), le chinasi 1 e 2 specifiche del cervello, le chinasi Tau-tubulina 1 e 2 e alcune chinasi che regolano l'affinità dei microtubuli (MARK; note anche come chinasi PAR1)[74]; in aggiunta anche i membri della famiglia SRC (LCK, SYK, FYN) e i membri della famiglia ABL (ARG e ABL1)

possono avere un ruolo nella fosforilazione della proteina Tau. In questo contesto, i residui di tirosina fosforilati, come Y18, Y197 e Y394, sono stati spesso associati alla manifestazione di MA [74]. La fosforilazione della proteina Tau in alcuni siti può essere condizionata da modifiche post-traduzionali in altri siti della stessa; ad esempio, la fosforilazione di Tau da parte di GSK3 β richiede la fosforilazione in altri siti da parte di chinasi come PKA [64]. Nei gel SDS-PAGE, la proteina Tau presente nel liquido cerebrospinale di pazienti affetti da MA mostra una marcata fosforilazione, evidenziata dalla corsa delle bande proteiche verso un peso molecolare più elevato; invece, la proteina tau presente nel liquor di un cervello adulto sano mostra uno stato di fosforilazione più basso [75]. Negli animali in letargo e durante il sonno, è stata osservata un'iperfosforilazione reversibile della proteina Tau: ciò indica che la fosforilazione della proteina Tau è parte del normale funzionamento del sistema nervoso, in determinati stati fisiologici [66]. In particolare, nei topi, tramite elettroforesi su SDS-PAGE e Western blot, è stata rilevata un'iperfosforilazione della Tau durante il sonno; inoltre, le condizioni ambientali, come la temperatura, possono influire sulla regolazione circadiana della fosforilazione della proteina Tau [76]. La fosforilazione della proteina Tau all'estremità carbossilica è considerata uno dei primi eventi associati alle taupatie e si verifica prima della formazione dei grovigli neurofibrillari (NFT). La fosforilazione nei siti Ser³⁹⁶⁻⁴⁰⁴ costituisce il 50% degli aggregati di proteina Tau precoci nei pazienti con MA e sindrome di Down; questa specifica fosforilazione riduce la solubilità di Tau e ne promuove l'aggregazione [77]. Inoltre, la proteina Tau fosforilata interagisce con la proteina α -sinucleina (α -syn), una proteina che, se mutata, forma aggregati insolubili detti *corpi di Lewy*, presenti nei neuroni nel morbo di Parkinson [78]. In particolare il C-terminale dell' α Syn può interagire direttamente con l'MBR della proteina Tau e ciò può portare all'inibizione del legame tra la proteina Tau e i microtubuli, aumentando così le concentrazioni libere della proteina Tau e contribuendo così alla formazione di aggregati [79]. La glicosilazione è una modifica post-traduzionale che consiste nell'aggiunta di una o più molecole di zucchero. Esistono due tipologie di glicosilazione: N-glicosilazione, in cui gli zuccheri vengono aggiunti ad un residuo di asparagina (N) della proteina; O-glicosilazione, in cui gli zuccheri si legano ad un residuo di serina (S) o treonina (T) nella proteina attraverso un legame O-glicosidico. Nel cervello di pazienti affetti da MA, la proteina Tau è iperglicosilata [74]. La glicosilazione delle proteine è coinvolta nei processi immunitari e infiammatori nel cervello, entrambi coinvolti nell'eziopatogenesi

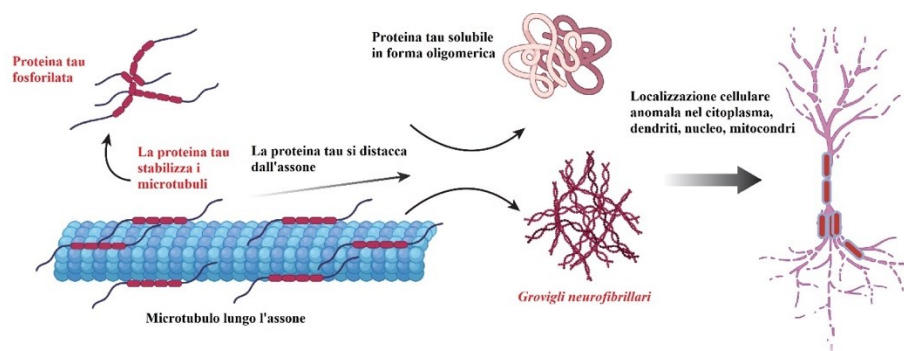
della MA. Molti studi indicano che la maggior parte delle glicosilazioni associate alla fase iniziale della MA sono N-glicosilazioni e quest'ultime possono regolare positivamente, e quindi favorire, l'iperfosforilazione anomala della proteina Tau che si verifica nelle fasi successive [80]. Nei grovigli neurofibrillari formati dalla Tau iperfosforilata, si osservano livelli più elevati di O-glicosilazione rispetto al cervello umano sano: questo potrebbe indicare che, nelle diverse fasi della malattia che coinvolgono le modifiche della proteina Tau, ci possono essere cambiamenti delle tipologie di glicosilazione [80]. Inoltre, la glicosilazione potrebbe influire direttamente sulla conformazione e sulla stabilità dei PHF o coppie di filamenti elicoidali [80]. La comprensione dei meccanismi che portano alla glicosilazione anomala della Tau non è del tutto chiara e si ipotizza che i cambiamenti della posizione cellulare della proteina Tau nella MA possano influenzare la sua interazione con le glicosilasi [80]. Inoltre, si ipotizza un'iperattività dell'oligosaccariltransferasi (OST) e un'ipofunzionalità di una N-glicosidasi citoplasmatica nei pazienti affetti da MA [80]. Un'altra modifica post-traduzionale è rappresentata dall'acetilazione, che consiste nell'aggiunta di un gruppo acetile ai residui amminoacidici delle proteine ad opera di enzimi acetiltransferasi. L'acetilazione del residuo di lisina (K) 174 della proteina Tau è considerata come una possibile modifica post-traduzionale associata alla MA, in particolare alle fasi iniziali della malattia [81]. Infatti, è stato osservato che la proteina Tau acetilata sui residui K274 e K281 ha effetti dannosi a livello dei mitocondri e induce deficit cognitivi nella memoria e nell'apprendimento [82]. L'acetilazione di siti specifici della proteina Tau, come K311 e K340, riduce la velocità di polimerizzazione dei microtubuli, favorendo la formazione di NFT[83]. In un modello murino l'acetilazione inibisce l'autofagia mediata da chaperone, un importante meccanismo di clearance della proteina Tau a livello neuronale [84] e ne consegue che la proteina Tau acetilata viene dirottata verso altre vie autofagiche che portano al rilascio extracellulare della proteina. Tutto ciò indica che l'inibizione dell'autofagia mediata da chaperone potrebbe aggravare la progressione della MA [84]. Un'altra modifica post-traduzionale è rappresentata dall'ubiquitinazione. Essa consiste nell'aggiunta di una molecola di ubiquitina, un peptide costituito da 76 amminoacidi. L'ubiquitina si lega al substrato attraverso un legame isopeptidico che impegna, ad esempio, la Gly C-terminale dell'ubiquitina con il gruppo amminico presente nella catena R di un residuo di lisina sul substrato. L'ubiquitinazione prevede l'intervento di tre famiglie differenti di proteine: ubiquitin ligasi di tipo E1 che servono ad attivare

l'ubiquitina per il successivo legame alla proteina substrato, successivamente interviene una ubiquitina-ligasi o enzima coniugante della famiglia delle E2 che serve per esercitare l'azione di coniugazione sulla proteina substrato. E2 viene poi riconosciuta da una terza famiglia di ubiquitina-ligasi che sono le E3 con attività ubiquitina-transferasi, che fungono da "adattatori" e hanno la funzione di accoppiare E2 con la proteina substrato. Una volta che le proteine sono state ubiquitinate con una catena di poliubiquitine, possono essere indirizzate al proteasoma dove avverrà l'idrolisi delle proteine in singoli amminoacidi o oligopeptidi. La proteina Tau è una proteina ricca di residui di lisina e quindi può andare incontro a ubiquitinazione diminuendone la sua solubilità. Nei campioni di pazienti affetti da MA sono stati identificati 28 siti di ubiquitinazione della proteina Tau [85]. Tuttavia, nella MA il processo di degradazione tramite proteasoma è compromesso e ciò porta ad un accumulo di proteine ubiquitinate. Molti studi immunologici hanno confermato l'elevata presenza di ubiquitina in molte aree del cervello colpite da MA e la presenza di ubiquitina nei grovigli neurofibrillari rappresenta un tentativo di compensazione delle cellule nel degradare le proteine Tau aggregate [85]. Nella MA, la proteina Tau subisce tagli proteolitici anomali da parte di proteasi. I frammenti proteolitici che ne derivano sono stati associati a effetti neurotossici mostrando una maggiore propensione alla fosforilazione, contribuendo così alla patogenesi della MA. Inoltre, la proteolisi della proteina Tau può provocare il distacco della proteina dai microtubuli con compromissione delle loro funzioni. La proteina Tau può subire dei tagli proteolitici da parte della calpaina, una proteina calcio-dipendente associata a diverse malattie neurodegenerative, tra cui la MA [86]. Infatti, è stato dimostrato che la calpaina scinde la proteina Tau in frammenti più piccoli, i quali possono autoaggregarsi e formare grovigli [86].

2.4 Formazione di grovigli neurofibrillari e degenerazione neuronale

Nel 1991 Heiko Braak ed Eva Braak, due neuropatologi tedeschi, proposero una classificazione dei diversi stadi della progressione dei NFT nel cervello di pazienti con MA *post mortem*, basandosi sulla distribuzione anatomica degli aggregati. Nella fase iniziale la patologia può essere presente solo sotto forma di fili del neuropilo a livello del locus coeruleus [78]; negli stadi successivi si formano dei "pre-grovigli" che si estendono ad altri nuclei sottocorticali e successivamente alle regioni corticali, come ippocampo, corteccia temporale, neocorteccia [78]. Lo stadio finale o stadio VI prevede un esteso

coinvolgimento neocorticale [78]. Secondo uno studio condotto da Meisl, Georg *et al.*, dallo stadio III di Braak si assisterebbe ad una replicazione *in loco*, piuttosto che una diffusione nelle diverse zone del cervello e ciò costituirebbe il processo principale che guida l'accumulo di Tau nelle aree neocorticali [87]. Come riportato in una revisione pubblicata da Wiley Periodicals LLC per conto dell'Alzheimer's Association, la formazione di grovigli neurofibrillari (NFT) può essere suddivisa in tre fasi: pregrovigli, grovigli maturi, grovigli fantasma (*ghost tangles*) [88]. I pregrovigli rappresentano il primo stadio di maturazione dei NFT, sono costituiti da residui fosforilati e generalmente non mostrano immunocolorazione con ubiquitina. Essi si trovano in neuroni sani dal punto di vista morfologico e sono costituiti da filamenti elicoidali accoppiati (PHF), filamenti dritti (SF) e piccoli fasci di filamenti aggregati [88]. È stato osservato che i pregrovigli si accumulano nei nuclei del tronco cerebrale in individui di età inferiore ai 30 anni [88]. Le proteine Tau iperfosforilate si aggregano ulteriormente, formando strutture più complesse e insolubili all'interno delle cellule nervose: i grovigli maturi, descritti da Alzheimer nel 1907. Essi assumono la forma dei neuroni nei quali si trovano, ad esempio nei neuroni piramidali hanno una forma “simile ad una fiamma” e sono positivi all'ubiquitina [88]. Gli NFT sono stati associati a disfunzione sinaptica e declino cognitivo nei pazienti con MA [89] (Figura 4). I pregrovigli e i grovigli maturi sono localizzati a livello intracellulare, tuttavia i grovigli fantasma sono extracellulari e si formano in seguito all'apoptosi [88]. I grovigli fantasma rappresentano lo stadio avanzato e sono caratterizzati dall'assenza di un nucleo e citoplasma distinguibili, inoltre hanno struttura filamentosa e sono positivi all'ubiquitina [88].



Hyman B, 2023
Annu. Rev. Med. 74:503-14

Figura 4. Rappresentazione del processo di localizzazione errata della proteina Tau. Trad. [90].

In seguito all'accumulo di proteine Tau mal ripiegate, viene attivato un meccanismo denominato UPR, *unfolded protein response* o risposta a proteine malripiegate, attraverso il quale le cellule cercano di mantenere l'equilibrio intracellulare [88]. In situazioni di stress del reticolo endoplasmatico, l'UPR può attivare meccanismi di riparazione delle proteine e, nel caso in cui questi falliscano, indurre una cascata di eventi che portano all'apoptosi [91]. Nelle fasi iniziali di formazione dei pre-grovigli viene attivato l'UPR come meccanismo di autoprotezione, tuttavia nelle fasi avanzate vi è una diminuzione dei marcatori dell'UPR, ad indicare una compromissione di tale processo [88]. Inoltre, vi è una diminuzione del meccanismo di iperfosforilazione man mano che il neurone si avvia verso l'apoptosi e ciò è dimostrato dal fatto che è stata rilevata un'immunoreattività elevata di GSK-3 β a livello dei pre-grovigli, ma assente nei grovigli fantasma [88]. Secondo alcuni studi, il meccanismo di morte cellulare che si attiva nei neuroni a seguito della formazione di NFT è rappresentato dalla necroptosi, una forma di morte cellulare regolata che, dal punto di vista morfologico e funzionale, è simile alla necrosi, cioè provoca dissoluzione delle membrane. A seguito di segnali pro-infiammatori come il TNF, vengono attivati i recettori RIPK1 e RIPK3, i quali formano un complesso proteico noto come "necrosoma"; RIPK3 attiva, tramite fosforilazione, MLKL che trasloca sulla membrana plasmatica causandone la rottura e la fuoriuscita del contenuto cellulare. La proteina Tau iperfosforilata potrebbe attivare il complesso multiproteico RIPK1/RIPK3/MLKL, portando alla necroptosi delle cellule neuronali [92]; contemporaneamente, la proteina Tau iperfosforilata attiva la via NF- κ B, portando all'attivazione microgliale M1 e alla neuroinfiammazione [93]. La somministrazione di Necrostatin-1 (Nec-1), un inibitore di RIPK1, ha mostrato effetti positivi in modello murino di malattia di Alzheimer, migliorando la neuroinfiammazione e riducendo la morte delle cellule neuronali [92]; tuttavia, sono necessari ulteriori studi per valutare la potenziale utilità terapeutica nella pratica clinica. La fosforilazione anomala della proteina Tau in siti specifici diminuisce l'affinità che essa ha con i microtubuli, di conseguenza si sposta dall'assone al citoplasma e ai dendriti. L'errata localizzazione della proteina Tau provoca alterazioni funzionali, tra cui la perdita della capacità di stabilizzare i microtubuli e l'interazione anomala con costituenti citoplasmatici [90]. La formazione di oligomeri solubili e poi di fibrille insolubili è un'ulteriore conseguenza, dovuta all'errata localizzazione della proteina Tau [90] (Figura 4). Oltre alle fibrille, ci sono diverse forme assunte dalla proteina Tau in grado di contribuire in modo rilevante alla

MA. Infatti, le forme solubili della proteina Tau che non si aggregano in NFT possono comunque contribuire in modo significativo alla tossicità neuronale [90]. Queste forme della proteina Tau hanno dimensioni submicroscopiche e non evidenti tramite metodi convenzionali, come la colorazione con argento o la microscopia elettronica, di conseguenza sono necessarie tecniche più avanzate per comprendere dettagliatamente le alterazioni molecolari associate a tali forme di Tau [90]. Uno studio condotto da Kang, SS, Meng, L., Zhang, X. *et al* ha dimostrato che il DOPEGAL svolge un ruolo importante nella MA a livello del *locus coeruleus*; esso è un metabolita aldeidico che si forma a partire da adrenalina e noradrenalina per azione delle MAO-A [88]. L'interazione del metabolita DOPEGAL con il residuo Lys353 della proteina Tau contribuisce all'aggregazione e propagazione di quest'ultima attraverso i neuroni del *locus coeruleus* [94]. Inoltre, è stato osservato che gli aggregati solubili di A β possono accelerare i processi patologici che coinvolgono la proteina Tau, anche in assenza di placche A β , da ciò si deduce che le lesioni della proteina Tau precoci potrebbero interagire altresì con gli aggregati solubili di A β [78]. Quest'interazione patologica tra A β e Tau è ben documentata in modelli murini; un ruolo importante è svolto dalla PrP^C, la quale lega entrambe le proteine nei topi e nel cervello umano affetto da MA [78]. Le forme oligomeriche della proteina Tau hanno la capacità di diffondersi da un neurone all'altro e, a livello intracellulare, innescano un'ulteriore accumulo della proteina Tau, influenzando negativamente sul trasporto assonale e quindi sulla funzione neuronale [95]. Le forme oligomeriche, infatti, possono agire con un meccanismo "simile ai prioni". Secondo il meccanismo "simile ai prioni", la proteina Tau in forma oligomerica funge da "seme" e diffonde nelle altre cellule, innescando la conversione nelle forme patologiche di altre proteine Tau monomeriche, dunque si formano ulteriori "semi" [95]. In questo processo gli esosomi svolgono un ruolo importante. Infatti questi ultimi sono piccole vescicole rilasciate dalle cellule nello spazio extracellulare, in risposta a diversi stimoli e sono in grado di trasferire materiale genetico e proteico e possono fungere da trasportatori trans-sinaptici delle forme tossiche della proteina Tau [95]. In modelli murini, che esprimono la proteina Tau mutata associata a malattie neurodegenerative, è stato osservato che gli esosomi liberati dal cervello contengono forme patologiche della proteina Tau [96]. Inoltre, gli esosomi estratti dai fluidi corporei contengono biomarcatori importanti per la diagnosi precoce della MA [96]. Gli esosomi, dunque, potrebbero rappresentare un importante strumento diagnostico per la MA, offrendo nuove opportunità nella gestione

e nella ricerca della malattia [96]. Ad oggi però è necessario studiare ancora approfonditamente i metodi di isolamento e di standardizzazione di questi ultimi [96].

2.5 Proteina Tau come biomarcatore nella diagnosi precoce

Nella pratica clinica, la diagnosi “probabile” o “possibile” della MA viene effettuata sulla base dei sintomi del paziente, per esclusione di altre possibili cause e grazie all'uso di test di imaging cerebrale come la tomografia computerizzata o la risonanza magnetica e la misurazione di biomarcatori. Tuttavia, la diagnosi certa e definitiva della MA si ottiene con l'esame istologico del cervello durante l'autopsia *post mortem*, attraverso l'identificazione delle placche amiloidi e dei grovigli neurofibrillari [97]. In questo contesto, diventa di cruciale importanza la possibilità di identificare biomarcatori più specifici e sensibili per migliorare la precisione della diagnosi e per monitorare efficacemente la progressione della malattia. Secondo l'FDA il biomarcatore è una molecola ben definita che viene misurata come indicatore di normali processi biologici, processi patogeni o risposte a un'esposizione o a un intervento, compresi gli interventi terapeutici [98]. Il biomarcatore ideale possiede una specificità del 100%, cioè è in grado di discriminare chiaramente gli individui sani e quelli affetti dalla malattia di interesse e una sensibilità pari al 100%, dunque in grado di rilevare anche piccole variazioni della condizione biologica di interesse. Un'elevata sensibilità è fondamentale per una diagnosi precoce. Inoltre, il biomarcatore ideale deve avere un elevato valore predittivo positivo, un parametro statistico espresso in percentuale che indica la probabilità che il paziente risultato positivo al test sia effettivamente malato. I biomarcatori possono essere proteine, metaboliti, acidi nucleici, lipidi e altre sostanze chimiche; possono essere rilevati sia nei tessuti, che nei liquidi dell'organismo, tra cui sangue e liquido cerebrospinale. Il liquido cerebrospinale, chiamato anche liquido cefalorachidiano, si trova nel SNC a livello delle cavità encefaliche e nel midollo spinale ed è prodotto dai plessi corioidei. Dal punto di vista clinico e diagnostico, il prelievo di CSF tramite puntura lombare può essere utile nella valutazione di determinate condizioni o malattie del SNC (Figura 5). Infatti, rappresenta una fonte di biomarcatori classici per la diagnosi di MA: proteina Tau totale (t-tau), la proteina Tau fosforilata (P-tau181 e P-tau231) e i peptidi A β -amiloidi A β 1-40 e A β 1-42. La misurazione nel CSF dei livelli di A β 42, t-tau e p-tau ha mostrato una sensibilità del 95% e una specificità dell'83% [97] (Figura 5).

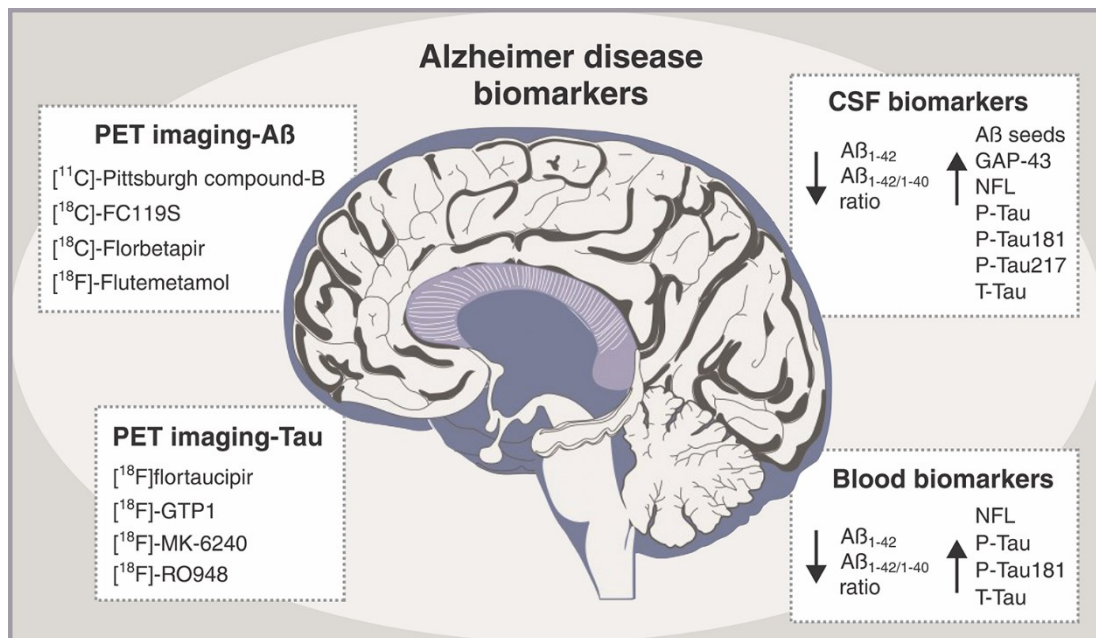


Figura 5. Rappresentazione dei biomarcatori per la diagnosi precoce di MA. Fonte: [99]

I livelli di t-tau riflettono l'intensità della degenerazione neuronale, mentre i livelli di p-tau indicano la diffusione della proteina Tau fosforilata nel cervello [33]. Per quanto riguarda la p-tau, aumenti delle concentrazioni di p-tau nel cervello sono stati associati a una progressiva riduzione della funzione cognitiva nei pazienti con MA [33]. È stato dimostrato che le concentrazioni di p-tau nel liquido cerebrospinale sono 3, 4 volte maggiori nei pazienti con MA [33]. L'aumento delle concentrazioni di p-tau (181) si può verificare anche in altre condizioni neurologiche, come la paralisi sopranucleare progressiva e la degenerazione lobare frontotemporale e ciò ne riduce la specificità per la MA [100]. È stato osservato che le placche di Aβ possono essere presenti molti anni prima dello sviluppo degli NFT [101]; inoltre, la fosforilazione della proteina Tau in posizione 231 è generalmente associata alla formazione di grovigli più maturi, indicando quindi uno stadio più avanzato della MA [33]; tuttavia, è stato osservato un aumento delle concentrazioni nella fase preclinica della MA: ciò indica che p-tau231 potrebbe fungere da biomarcatore predittivo precoce [101]. È stato osservato che p-tau(217) nel CSF potrebbe fornire una maggiore accuratezza diagnostica per l'MA rispetto a p-tau(181) e p-tau(231) [100], poiché, rispetto a p-tau231, mostra maggiori variazioni nei pazienti con malattia di Alzheimer, rispetto alle demenze non-MA e agli individui cognitivamente sani [101]. Per quanto riguarda la t-tau, gli aumenti delle concentrazioni indicano una buona sensibilità e specificità utili nella distinzione tra la MA e il normale invecchiamento

rispettivamente 93% e 86% [97]. Tuttavia, livelli elevati di t-tau sono stati osservati anche in altre taupatie e in seguito all'ictus ischemico e a traumi cranici [97]. L'importanza di identificare e quantificare l'accumulo della proteina Tau *in vivo* nel cervello ha portato allo sviluppo della tau-PET, effettuata utilizzando dei marcatori diagnostici radioattivi come [¹⁸F]flortaucipir, il quale si lega principalmente alle isoforme della proteina Tau 3R-4R, rilevando così gli NFT [102]. Nel 2020 flortaucipir è stato approvato per l'uso clinico dall'FDA [103]. Rispetto all'Aβ-PET, la distribuzione dei grovigli neurofibrillari della proteina Tau nel cervello ha dimostrato una correlazione migliore con la progressione della MA e il declino cognitivo [103]. La possibilità di valutare direttamente l'accumulo della proteina Tau nel cervello può contribuire a individuare i pazienti a rischio di sviluppare la MA prima della comparsa dei sintomi clinici, consentendo di anticipare i trattamenti e mettendo in atto strategie di prevenzione. I biomarcatori possono essere misurati anche nel sangue. Infatti, negli ultimi anni i biomarcatori ematici per la MA hanno suscitato un notevole interesse, in quanto vengono rilevati attraverso un prelievo meno invasivo rispetto ai biomarcatori liquorali. Un altro vantaggio dei biomarcatori plasmatici è rappresentato dal costo, infatti l'analisi è più economica rispetto alle procedure di imaging cerebrale come la PET e la raccolta dei campioni ematici risulta più accessibile rispetto alla raccolta del CSF, in quanto non sono necessarie strutture altamente specializzate. Inoltre, il prelievo ematico può essere ripetuto più facilmente, consentendo un follow-up dei pazienti nel tempo. È stato osservato che la p-tau181 plasmatica rappresenta un biomarcatore specifico per la MA [104] ed inoltre, potrebbe essere un biomarcatore utile per identificare quei pazienti con MCI che presentano un rischio maggiore di sviluppare MA, in quanto ha mostrato un'elevata precisione [104]. Per di più, i risultati che sono stati ottenuti misurando p-tau181 nel plasma sono in gran parte simili a quelli ottenuti attraverso il prelievo di CSF e hanno mostrato un'associazione con quelli ottenuti attraverso l'imaging Tau PET [105]. Tutti questi dati indicano che la p-tau181 plasmatica può rispecchiare l'accumulo della proteina Tau nel cervello di pazienti con MA [105]. Uno studio di coorte condotto da Ashton, Nicholas J *et al.* su 786 persone con e senza deterioramento cognitivo, ha rilevato che la misurazione plasmatica di ptau-217 è in grado di identificare accuratamente la MA, differenziandola da altri disturbi neurodegenerativi [106]. Lo studio ha esaminato i dati di tre coorti (TRIAD, WRAP, SPIN) e i partecipanti sono stati suddivisi in base alle concentrazioni di proteina Tau e beta-amiloide rilevate tramite PET o prelievo di CSF [106]. I risultati

degli esami ematici hanno fornito una diagnosi definitiva nell'80% dei partecipanti [106]. Il biomarcatore ptau-217 è stato confrontato sia con i biomarcatori del CSF, che con tecniche di imaging come la PET e ha dimostrato una parità in termini di accuratezza [106] (Figura 6). Per valutare l'efficacia diagnostica di ptau-217 come biomarcatore, è stato fatto un confronto oggettivo anche con p-tau181 e p-tau231 e ptau-217 è risultato più sensibile rispetto alle altre due isoforme. Inoltre, l'AUC della curva ROC è risultato superiore al 90%: ciò significa che ptau-217 è in grado di discriminare efficacemente i pazienti con MA dai non malati (Figura 6)[106].

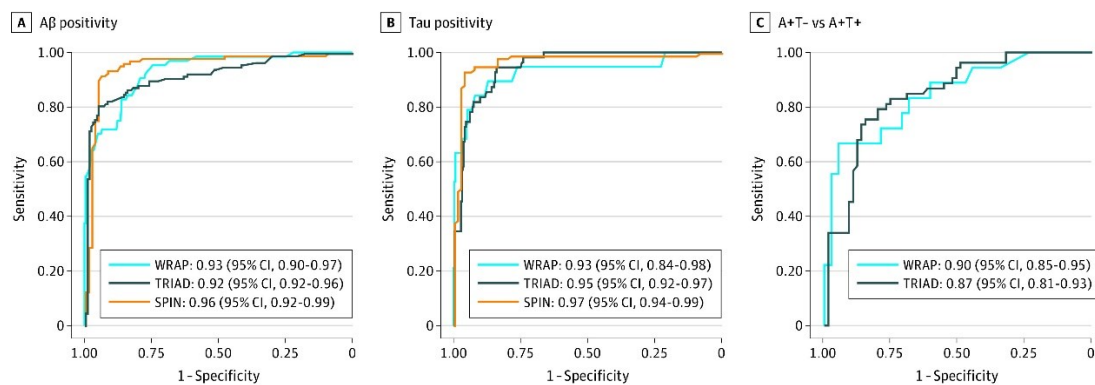


Figura 6. Rappresentazione grafica dell'accuratezza diagnostica della p-tau217 plasmatica tramite curve ROC: Le curve ROC mostrano un'elevata AUC, dunque indicano una buona capacità della p-tau217 plasmatica di discriminare tra individui positivi e negativi per Aβ (fig.2A) e tau (fig.2B). Nelle coorti WRAP e TRIAD le concentrazioni di Aβ e Tau sono state esaminate tramite PET: la p-tau217 plasmatica ha dimostrato un'ottima precisione nel rilevare la presenza della proteina Tau anomala, con AUC tra 0,93 e 0,95. Nel caso della coorte SPIN, Aβ e Tau sono stati valutati nel CSF (Aβ42/40 e p-tau181): la p-tau217 ha mostrato una precisione altrettanto elevata nella rilevazione della Tau anomala nel CSF (AUC 0,97). La p-tau217 plasmatica sembra un biomarcatore promettente nella distinzione tra individui positivi all'amiloide (A+T-) e individui positivi sia all'amiloide che alla tau (A+T+) (fig.2C) tramite tau-PET; nelle coorti WRAP e TRIAD, p-tau217 mostra un'AUCrispettivamente di 0,90 e 0,87. Fonte: [106]

L'aumento delle concentrazioni della proteina Tau nel plasma si verifica negli stadi iniziali di Braak. Ciò potrebbe indicare che le alterazioni plasmatiche precedono la manifestazione dei sintomi clinici della MA [90]. Inoltre, misurare le concentrazioni della proteina Tau nel plasma potrebbe essere un approccio utile negli studi clinici in fase iniziale, includendo e identificando pazienti che presentano maggiori probabilità di sviluppare la MA [90]. Tuttavia, ad oggi, i biomarcatori ematici sono disponibili solo a scopo di ricerca. La misurazione della proteina Tau plasmatica rimane una sfida promettente per la ricerca ed infatti, risulta complesso determinare il dosaggio specifico, quale tipologia di test possa fornire informazioni affidabili e correlare i risultati del test con gli specifici stadi della progressione della MA [90]. È stato osservato che le ghiandole

salivari esprimono le proteine Tau: ciò potrebbe portare, in futuro, all'utilizzo di biomarcatori salivari per la diagnosi precoce della MA, offrendo vantaggi pratici rispetto ai metodi più invasivi e costosi [107]. La secrezione salivare è regolata dal sistema nervoso autonomo e pertanto, alterazioni del sistema nervoso autonomo, come quelle riscontrate nella MA, possono alterare la quantità e composizione della saliva [107]. Rispetto ai livelli riscontrabili nel CSF, i livelli delle proteine Tau nella saliva presentano un andamento diverso ossia le concentrazioni di t-tau sono risultate stabili o in diminuzione ed è stato osservato, invece, un aumento delle concentrazioni di p-tau [107]. Sono necessarie, però, ulteriori ricerche per comprendere pienamente come la proteina Tau possa essere utilizzata come biomarcatore salivare. Uno svantaggio dei biomarcatori fluidi è rappresentato dall'incapacità di localizzare con precisione l'area specifica del cervello in cui si verificano i cambiamenti legati alla MA. Questo è uno dei motivi per cui, nonostante i vantaggi riguardanti l'accessibilità e la ripetibilità, i biomarcatori fluidi sono complementari ad altre metodologie di imaging più specifiche, come la TAC o la MRI. Infatti, le raccomandazioni inter-societarie europee per la diagnosi precoce dei disturbi cognitivi, tra cui la MA, pubblicate nel mese di marzo del 2024, prevedono quattro fasi sequenziali: una prima fase in cui si procede con l'anamnesi, test cognitivi e comportamentali ed esami clinici, in modo da identificare i pazienti con sospetta MCI o demenza lieve [108]. Nella seconda fase si procede con test neuropsicologici, esami del sangue sistemici e neuroimaging (MRI o TAC) [108]. La terza fase prevede la misurazione dei biomarcatori liquorali, p-tau e β -amiloide, e tecniche di imaging avanzate, come la FDG-PET [108]. La quarta fase si concentra ulteriormente sulla misurazione dei biomarcatori, al fine di ottenere complessivamente una diagnosi accurata[108].

CAPITOLO 3

TRATTAMENTI FARMACOLOGICI ATTUALI E NUOVE FRONTIERE TERAPEUTICHE PER LA MALATTIA DI ALZHEIMER

3.1 I farmaci inibitori dell'acetilcolinesterasi e la memantina

Gli inibitori dell'acetilcolinesterasi costituiscono una classe di farmaci usati per migliorare i sintomi associati alla MA. L'obiettivo principale di questi farmaci è quello di compensare la carenza di acetilcolina nel SNC che è responsabile, secondo l'ipotesi colinergica, del rallentamento dei processi di apprendimento e memoria [109]. L'acetilcolina (ACh) si forma per sintesi a partire dall'acetil coA e dalla colina ad opera dell'enzima ChAT. Una volta che si forma acetilcolina, questa si accumula nei granuli di deposito, riserve in cui il neurotrasmettitore viene accumulato per poi essere rilasciato al bisogno. Nella forma intragranulare di deposito, l'acetilcolina, come tutti gli altri neurotrasmettitori, non è attiva e non può essere metabolizzata. I granuli di deposito sono immersi in una rete di microfibrille. Ci sono delle proteine di ancoraggio che progressivamente facilitano, in risposta a stimoli specifici come l'ingresso di Ca^{2+} e l'avvicinamento della vescicola alla membrana terminale pre-sinaptica dove si verifica il processo di esocitosi che avviene nel momento in cui la membrana del granulo si fonde con la membrana terminale e il contenuto fuoriesce. L'acetilcolina rilasciata nello spazio sinaptico agisce su recettori postsinaptici, muscarinici o nicotinici. Ci sono anche recettori presinaptici che fungono da autorecettori. L'acetilcolina viene degradata ad opera di due enzimi: acetilcolinaesterasi (AChE) e butirrilcolinesterasi (BChE). L'acetilcolina ha una scarsa affinità per la BChE, per cui il suo contributo in termini di idrolisi è scarso. In pazienti con MA, è stata osservata una maggiore attività dell'AChE rispetto alla BChE, con una conseguente degradazione dell'ACh sia nell'ippocampo, e sia nella corteccia cerebrale. Ciò si traduce in un progressivo declino delle funzioni cognitive [110]. L'acetilcolinesterasi (Figura 7) si trova sulla membrana postsinaptica delle giunzioni colinergiche [109]. L'AChE è un enzima molto efficiente, infatti una singola molecola di AChE può idrolizzare fino a 6×10^5 molecole di ACh al minuto e ciò significa che l'AChE ha un tempo di turnover di soli 100 μ s per molecola di ACh idrolizzata [109]. L'acetilcolinaesterasi presenta un sito attivo costituito, a sua volta, da due sottositi, un sito anionico e un sito esterasico, ossia la tasca catalitica che porta alla degradazione del

neurotrasmettitore [109]. Ci sono tre amminoacidi specifici che svolgono un ruolo essenziale nell'attività catalitica dell'enzima: Ser²⁰⁰, Glu³²⁷ e His⁴⁴⁰ [109]. La Ser²⁰⁰ agisce come nucleofilo nella reazione di idrolisi dell'acetilcolina. Il sito anionico è importante per il legame e il riconoscimento del substrato ed infatti quando l'enzima si lega all'acetilcolina, si forma un intermedio tetraedrico, in cui l'acetilcolina è legata all'enzima tramite il gruppo nucleofilo Ser²⁰⁰[109]. A seguito dell'attività esterasica, l'enzima rimane per breve tempo acetilato. Nel momento in cui è acetilato non funziona ma tuttavia, in pochi secondi, una molecola d'acqua entra nel sito attivo e rompe il legame tra l'acetilcolina e Ser²⁰⁰, liberando così i due prodotti della reazione: colina e acido acetico [109]. L'acido acetico poi può formare acetilCoA; la colina, essendo una sostanza preziosa per l'organismo, viene riciclata. L'enzima diventa dunque di nuovo attivo, pronto a metabolizzare un'altra molecola di acetilcolina (Figura 7).

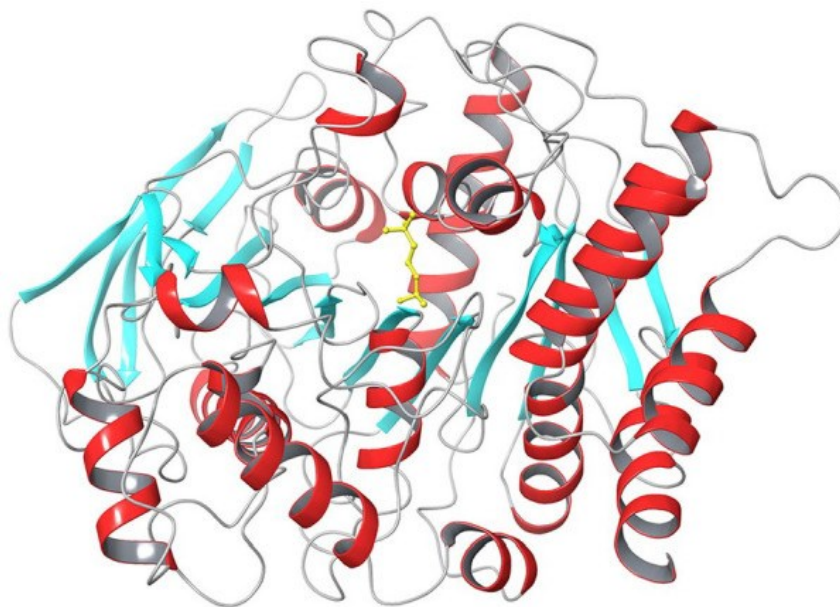


Figura 7. Rappresentazione della struttura cristallina dell'acetilcolinesterasi umana ottenuta attraverso cristallografia ai raggi X. La struttura dell'enzima è colorata in base agli elementi della struttura secondaria: le α eliche sono in rosso, i fogli β in azzurro e le regioni loop in grigio. Inoltre, il ligando ACh, situato nel sito attivo, è rappresentato di colore giallo [109].

Gli inibitori dell'acetilcolinesterasi usati nel trattamento della MA sono agonisti colinergici indiretti, poiché aumentano il tono colinergico impedendo che l'acetilcolina venga catabolizzata e sono inoltre classificati come inibitori ad azione reversibile. Il primo inibitore dell'AchE ad essere entrato in commercio per il trattamento della MA è la tacrina che tuttavia, è stata successivamente ritirata dal mercato nel 2013 a causa della

sua epatotossicità[109]. Ad oggi, la tacrina rappresenta uno standard per i test farmacologici, poiché presenta una potenza notevole come inibitore, con un valore di IC_{50} ossia concentrazione del farmaco in grado di inibire il 50% dell'attività enzimatica, di soli 77 nM [109]. I farmaci di questa classe attualmente disponibili e impiegati nella terapia sintomatica della MA sono: donepezil, galantamina e rivastigmina (Figura 8). Il donepezil e la galantamina sono classificati come farmaci ad azione breve o reversibili, mentre la rivastigmina è un farmaco ad azione intermedia [110]. Il donepezil viene somministrato per via orale una volta al giorno per trattare i sintomi dei pazienti con MA da lieve a moderato. La dose giornaliera corrisponde a 5 mg e può essere aumentata successivamente fino a 10 mg [109]. Per quanto riguarda questo farmaco, sono stati osservati effetti centrali tra cui un aumento della plasticità neuronale e del flusso sanguigno cerebrale e una riduzione delle citochine pro-infiammatorie e della concentrazione dell'APP [110]. Inoltre, è stato ipotizzato che il donepezil sia in grado di ostacolare la progressiva degenerazione neuronale e l'atrofia dell'ippocampo [110]. Sono stati segnalati casi di aritmie cardiache in pazienti in trattamento con donepezil [109].

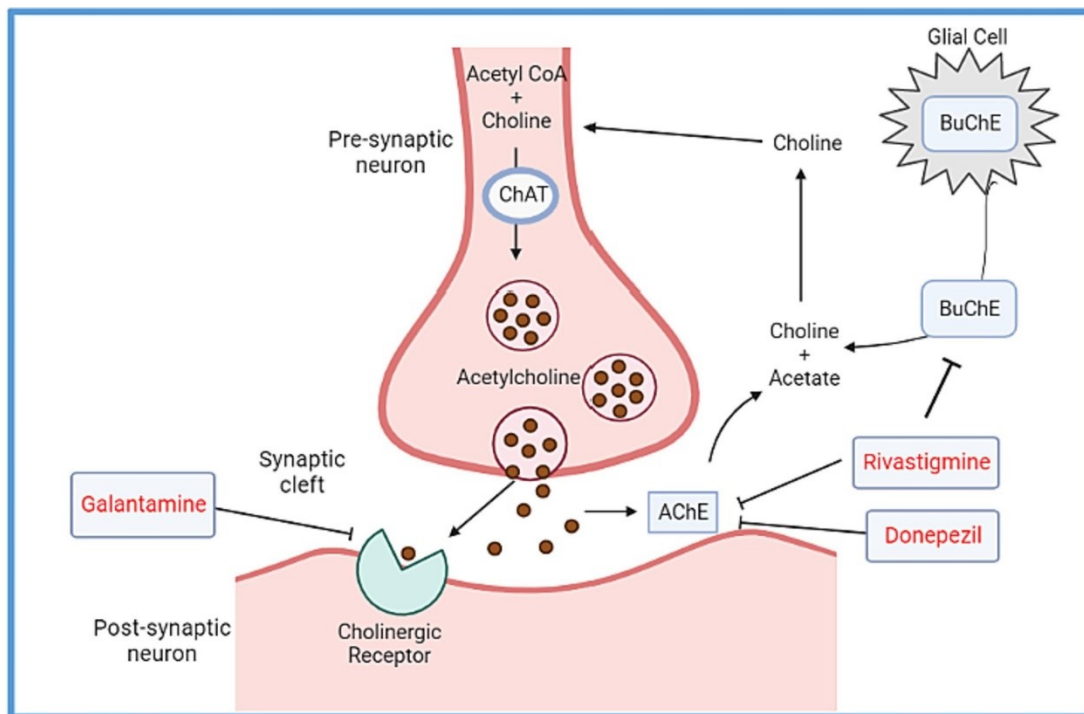


Figura 8: Rappresentazione grafica del funzionamento della sinapsi colinergica e del ruolo degli inibitori dell'AChE. [111].

La galantamina, somministrata per via orale ad una dose compresa tra 8, 16 e 24 mg/die, viene usata per trattare i sintomi della MA da lieve a moderatamente grave [109] [112].

Oltre ad essere un inibitore dell'AChE, ha anche attività di modulazione allosterica positiva per i recettori nicotinici, con un effetto complessivo di aumento del tono colinergico [110]. È stato osservato che la galantamina ha un effetto positivo sulla neurogenesi, in quanto stimola la proliferazione delle cellule progenitrici neurali tramite l'attivazione del recettore muscarinico M1 e contribuisce poi alla sopravvivenza delle cellule neurali nell'ippocampo [110]. Nell'ippocampo dei topi, la galantamina ha mostrato un'attività anti-infiammatoria, poiché inibisce l'attivazione di NF- κ B e l'espressione di citochine pro-infiammatorie [110]. La rivastigmina è un inibitore non competitivo sia dell'AChE, e sia della BuCh. Dal punto di vista strutturale, appartiene alla classe dei carbammati aromatici. Ha un'azione più selettiva rispetto agli altri inibitori e presenta minori effetti collaterali. Il trattamento con rivastigmina porta ad un miglioramento globale delle capacità cognitive e comportamentali in misura maggiore rispetto al donepezil [109]. La via di somministrazione più comune è quella transdermica, tramite cerotti a rilascio prolungato [109] e ogni cerotto rilascia 4,6 mg di farmaco al giorno. Questa dose può essere aumentata, dopo un mese di trattamento, fino a 9,5 mg al giorno [109]. Generalmente i farmaci inibitori dell'AChE sono ben tollerati e sono usati soprattutto nelle prime fasi della MA, quando la loro efficacia è superiore [109]. I più comuni effetti collaterali si presentano a livello gastrointestinale e sono nausea, vomito, diarrea [109]. I vantaggi degli inibitori dell'AChE sono rappresentati non solo da un miglioramento delle funzioni cognitive, come la memoria e l'attenzione, ma anche dei sintomi comportamentali, come l'apatia, l'agitazione e le allucinazioni [109]. È importante considerare che il trattamento con ChE-I non è in grado di arrestare la progressione della MA. La memantina è un antagonista non competitivo del recettore dell'N-metil-D-aspartato (NMDA). Il recettore dell'NMDA è un recettore ionotropico a larga conduttanza in grado di far passare ioni Ca^{2+} . Nel momento in cui il glutammato, il principale neurotrasmettitore eccitatorio, si lega agli NMDAR, si verifica un'apertura dei canali ionici con l'ingresso di ioni calcio all'interno delle cellule neuronali. I recettori dell'NMDA, in particolare gli NMDAR sinaptici, sono stimolati in maniera fasica e sono coinvolti nella plasticità sinaptica, dunque sono fondamentali per l'apprendimento e la memoria [113]. Gli NMDAR extrasinaptici, invece, sono stimolati tonicamente e sono associati all'attivazione delle vie apoptotiche, contribuendo alla neurotossicità e alla patogenesi di malattie neurodegenerative [113]. La memantina blocca la conformazione aperta del recettore dell'NMDA, agendo preferenzialmente sui NMDAR extrasinaptici in

presenza di un'eccessiva esposizione al glutammato [113]. La memantina è un farmaco approvato per il trattamento dei pazienti con MA di grado moderato o grave. La memantina si somministra per via orale sottoforma di compresse o soluzioni; gli effetti collaterali più comuni comprendono allucinazioni, sonnolenza, vertigini, confusione. Può essere usata in monoterapia, oppure in associazione con gli inibitori dell'AChE. La memantina può agire anche su altri sistemi recettoriali, infatti è stato osservato un effetto inibitorio su alcuni recettori nicotinici dell'acetilcolina e sui recettori 5-HT₃ per la serotonina [114]. Può fungere, invece, da agonista a livello dei recettori dopaminergici D₂ presenti nel corpo striato [114]. La funzione neuroprotettiva della memantina è stata associata alla sua capacità di ripristinare l'equilibrio tra LTP e LTD, in presenza di oligomeri A β [114]. Infatti, tramite l'inibizione dei recettori NMDAR, la memantina potrebbe contribuire a preservare la plasticità sinaptica [114]. Inoltre, la memantina limita l'iperfosforilazione della proteina Tau, ad esempio tramite l'inibizione dell'attivazione di GSK3 indotta dalla scissione della calpaina [114]. Un altro vantaggio di questo farmaco è rappresentato dal miglioramento della funzione insulinica sia a livello centrale e sia periferico. Infatti, a livello centrale la memantina aumenta l'espressione di Akt e CREB, due proteine coinvolte nelle vie di segnalazione intracellulari importanti per la plasticità sinaptica. A livello periferico la memantina aumenta l'attività di IRS2, riducendo così la resistenza insulinica a livello epatico [114]. In un modello murino è stato osservato che la somministrazione intermittente di memantina, abbinata all'esercizio fisico, potenzia la neurogenesi[114].

3.2 Approcci terapeutici complementari e innovativi

La somministrazione degli inibitori dell'AChE, associata a farmaci antiossidanti, risulta più efficace rispetto all'utilizzo di questi farmaci in monoterapia [115]. Sostanze fondamentali per la produzione di energia come la L-carnitina, il coenzima Q10 e la creatina, sono emerse come potenziali bersagli terapeutici ed infatti, queste sostanze possono contribuire a sostenere il metabolismo energetico cerebrale [115]. Il BDNF è una neurotrofina che promuove la crescita e la sopravvivenza dei neuroni nel SNC e nel sistema nervoso periferico ed è implicata nella plasticità neuronale, nella funzione cognitiva e risulta in grado di migliorare l'apprendimento e la memoria [116]. Gli inibitori dell'AChE agiscono anche sull'aumento della sintesi del BDNF, di conseguenza sono state messe a punto delle strategie terapeutiche che consistono nella sua somministrazione

esogena [116]. Tuttavia, la somministrazione endovenosa è limitata da fattori farmacocinetici, dunque si è ipotizzata una somministrazione intranasale di BDNF combinata con l'utilizzo di nanovettori biodegradabili [116]. L'NGF rappresenta una neurotrofina altrettanto importante per lo sviluppo, la crescita e la sopravvivenza dei neuroni. La somministrazione di NGF negli animali è associata ad un aumento dell'attività colinergica centrale [115] e pertanto, potrebbe rappresentare una potenziale strategia terapeutica per migliorare le funzioni cognitive e motorie [115]. Per quanto concerne il trattamento dei BPSD, solo quando strettamente necessario, possono essere prescritti alcuni farmaci. Infatti, prima di ricorrere alla terapia farmacologica, è consigliabile mettere in atto approcci non farmacologici tra cui attività riabilitative di tipo comportamentale, interventi psicoterapeutici come la terapia della reminiscenza, attività fisica e supporto ai caregiver [117]. Per il trattamento farmacologico dei BPSD, come l'aggressività e i disturbi psicotici, possono essere prescritti gli antipsicotici, tra cui il risperidone. Quest'ultimo è un farmaco antipsicotico di seconda generazione che agisce attraverso l'inibizione dei recettori dopaminergici D2 e dei recettori serotoninergici 5-HT2A nel cervello. Tra le indicazioni terapeutiche riportate viene indicato il trattamento a breve termine fino a 6 settimane, dell'aggressività persistente in pazienti con demenza di Alzheimer di grado da moderato a grave che non rispondono ad approcci non farmacologici [118]. Il brexpiprazolo, un antipsicotico atipico che agisce come agonista parziale dopaminergico, è il primo farmaco approvato dall'FDA a maggio 2023 per il trattamento dell'agitazione associata alla MA [119]. Tuttavia, è stato dimostrato che la prescrizione di antipsicotici nei pazienti anziani affetti da demenza, aumenta il rischio di mortalità. Un'altra classe di farmaci usata per il trattamento complementare della MA è rappresentata dagli antidepressivi. È stato osservato che gli antidepressivi possono essere associati ad un rischio ridotto di sviluppare la MA [120], ma non sono ben chiari, invece, gli effetti degli antidepressivi sulla progressione della MA. A tal proposito, la classe di antidepressivi più prescritta è rappresentata dagli SSRI, probabilmente a causa della minore incidenza di effetti collaterali e minori interazioni farmacologiche [120]. Studi preclinici condotti su animali hanno dimostrato vari effetti positivi della fluoxetina, un SSRI, tra cui: aumento delle dimensioni dell'ippocampo, riduzione della quantità di A β solubile nel CSF, nel tessuto cerebrale e nel sangue, miglioramenti di talune forme di memoria, inibizione della produzione di A β solubile da parte degli astrociti con effetti neuroprotettivi [120]. L'escitalopram ha dimostrato effetti positivi nei neuroni

dell'ippocampo di ratti trattati con A β 42, tra cui una riduzione dell'iperfosforilazione della proteina Tau e ciò è stato attribuito all'azione del farmaco sul recettore serotoninergico 5-HT1A che, quando viene attivato, modula le vie di segnalazione Akt/GSK-3 β coinvolte nella fosforilazione della proteina Tau [120]. Un'altra classe di antidepressivi è rappresentata dai TCA; in un modello murino è stato osservato che l'amitriptilina riduce la morte neuronale dopo l'esposizione all'A β 42 e aumenta l'espressione di geni associati ad un effetto neuroprotettivo[120]. Anche l'imipramina, un altro TCA, ha portato ad un miglioramento della memoria nei topi affetti da MA e alla riduzione dell'accumulo di A β [120]. Lo sviluppo di farmaci ad azione "disease-modifying" (DMD) in grado di arrestare la progressione della MA rappresenta una delle maggiori sfide per la ricerca farmacologica. Nella fattispecie, l'immunoterapia attiva e passiva rappresentano degli approcci innovativi in questo campo (Figura 9).

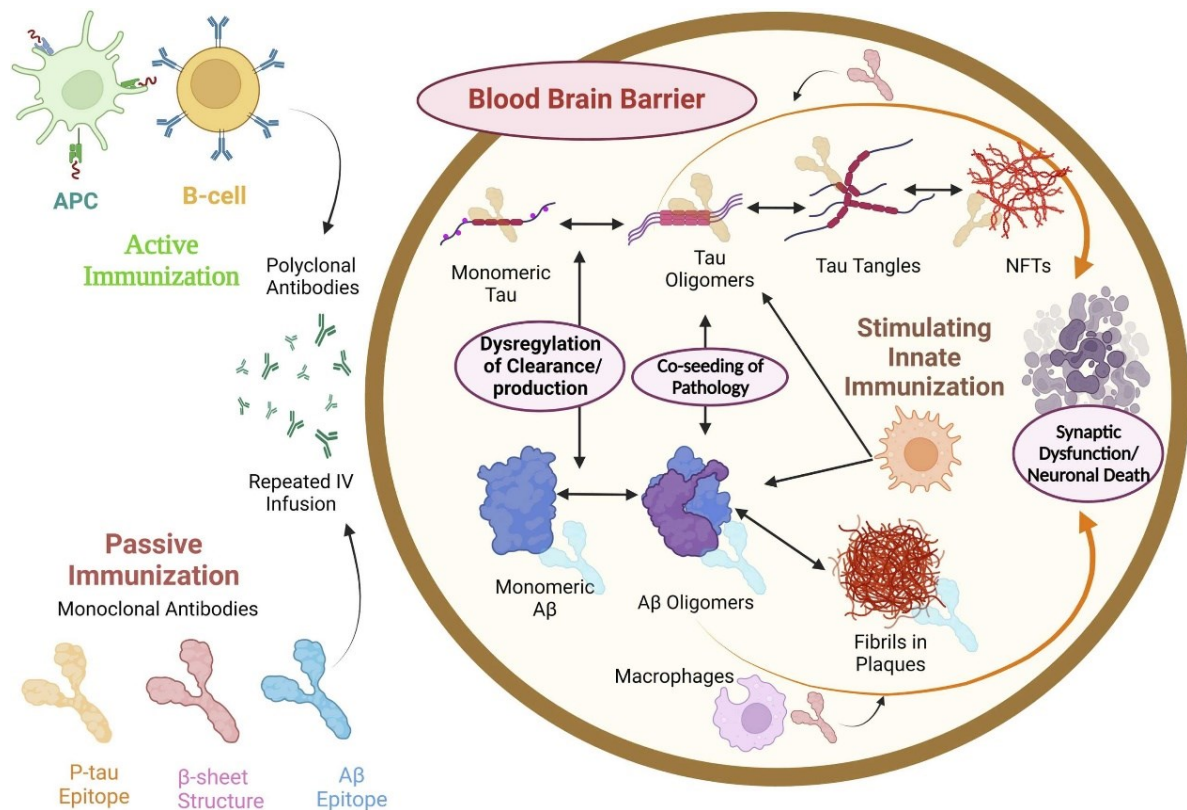


Figura 9. Rappresentazione grafica dei meccanismi d'azione dell'immunoterapia attiva (parte superiore della figura) e immunoterapia passiva (parte inferiore della figura) [121].

Inizialmente gli inibitori di BACE1 e BACE2 sono stati considerati una classe promettente di DMD ed il loro meccanismo d'azione è legato all'inibizione degli enzimi coinvolti nella sintesi di β -amiloide. Tuttavia, molti di questi studi sono stati interrotti

nelle fasi iniziali, a causa di effetti collaterali o mancanza di efficacia. Il target principale è rappresentato dal peptide β -amiloide presente nelle placche amiloidi cerebrali. L'immunoterapia attiva consiste nell'iniezione di vaccini contenenti frammenti di A β o altri antigeni, i quali stimolano il sistema immunitario del paziente a produrre anticorpi endogeni. Il primo tentativo di immunoterapia attiva si ebbe con il vaccino AN1792. Sebbene si sia dimostrato efficace nel rimuovere le placche di A β nei modelli animali, ha purtroppo mostrato effetti collaterali significativi nei pazienti affetti da MA, tra cui una meningoencefalite mediata da cellule T [122]. Successivamente fu sviluppato un vaccino di seconda generazione "CAD106". Si tratta di un vaccino peptidico progettato con il segmento N-terminale di A β , con lo scopo di evitare una risposta infiammatoria di tipo Th-1 e ridurre le reazioni del sistema immunitario derivanti da un'attivazione abnorme dei linfociti T [122]. Durante gli studi clinici di fase II/III, CAD-106 aveva dimostrato una buona tollerabilità e una diminuzione delle placche nei pazienti a cui era stato somministrato il vaccino per 78 settimane [123]. Tuttavia, gli studi furono interrotti a causa degli effetti avversi [123]. In generale, l'immunoterapia attiva presenta dei vantaggi: un costo inferiore rispetto ai trattamenti cronici e la persistenza nel tempo della produzione di anticorpi anti-beta-amiloide [121]. La ricerca sui vaccini contro l'A β è ancora attiva e rappresenta una delle prospettive più promettenti per la terapia della MA. L'immunoterapia passiva prevede la somministrazione di anticorpi monoclonali (mAb) specifici contro l'antigene, in particolare l'A β . L'utilizzo di questo tipo di terapia si basa sull'ipotesi della "clearance del sistema nervoso centrale", secondo cui gli anticorpi anti-A β attraversano parzialmente la BBB e agiscono direttamente sulle placche di A β [124]. Il meccanismo d'azione dei mAb consiste nell'opsonizzazione dell'aggregato patogeno e, di conseguenza, nell'attivazione delle cellule microgliali, le quali fagocitano l'A β fibrillare e lo degradano [125]. Alcuni studi suggeriscono l'ipotesi del "sink periferico", secondo cui gli anticorpi monoclonali facilitano la clearance dell'A β nel sangue periferico, agendo come dei "sink" per l'A β circolante nel sangue e riducendo così le concentrazioni di A β libero nel cervello [126]. I principali anticorpi monoclonali di nuova generazione sono rappresentati da: aducanumab, lecanemab e donanemab. Aducanumab rappresenta il primo farmaco ad azione "*disease-modifying*" approvato dall'FDA nel 2021, attraverso una procedura accelerata che consente di immettere più rapidamente sul mercato determinati farmaci destinati al trattamento di malattie gravi, ma richiede che vengano condotti ulteriori studi clinici per confermarne l'efficacia. Aducanumab è un

anticorpo monoclonale, appartenente alla classe degli anticorpi IgG1 (IgG1-mAb) che si lega all'A β 42 con maggiore affinità per gli aggregati fibrillari rispetto ai monomeri [125]. È indicato per i pazienti con MCI o demenza lieve che presentano un accumulo di beta-amiloide nel cervello, confermata dalla PET o dall'analisi del CSF. La dose raccomandata è di 10 mg/kg, somministrata per infusione endovenosa ogni 4 settimane [125]. Gli effetti avversi associati all'uso di aducanumab consistono in anomalie dell'imaging correlate all'amiloide (ARIA), le quali possono manifestarsi come edema cerebrale (ARIA-E) o emorragie (ARIA-H) e sono spesso osservate tramite imaging cerebrale, come la MRI. Questi effetti si sono riscontrati con maggiore incidenza nei pazienti portatori del gene ApoE4 [127]. Tuttavia, la validità dei risultati ottenuti dagli studi clinici su aducanumab è oggetto di controversie, tanto che gli studi clinici sono stati interrotti e l'FDA ne ha interrotto la commercializzazione a febbraio 2024. Lecanemab è un anticorpo monoclonale IgG1 che mira specificatamente alle protofibrille di β -amiloide [125]. Viene somministrato per via endovenosa ogni due settimane in pazienti con MCI o MA lieve. In uno studio clinico di fase 2b, è stato dimostrato che lecanemab riduce significativamente le concentrazioni di amiloide nel cervello, visibili tramite PET [125]. I risultati dello studio di fase III hanno dimostrato dei benefici cognitivi statisticamente significativi del farmaco e, sulla base di ciò, il farmaco ha ottenuto l'approvazione standard da parte dell'FDA [125]. Tuttavia, è importante notare che l'incidenza di eventi avversi, come le ARIA, è stata maggiore nel gruppo trattato con lecanemab rispetto al gruppo placebo. Donanemab è un altro anticorpo monoclonale IgG1 che è stato sviluppato per riconoscere e legarsi all'epitopo N-terminale piroglutammato A β (A β _{p3-42}), una forma di amiloide particolarmente tossica presente nelle placche stabilizzate; questo specifico target fa sì che l'A β solubile non interferisca con la capacità di donanemab di legarsi alle placche di amiloide nel cervello [126]. Inoltre, il legame di donanemab a questo specifico epitopo stimola la clearance delle cellule microgliali. Quindi, l'obiettivo principale di donanemab è quello di eliminare le placche amiloidi già presenti, anziché impedire soltanto la formazione di nuove placche o arrestarne la progressione. Gli studi dimostrano che donanemab rallenta la progressione della malattia in pazienti che presentano la MA precoce e sintomatica; è efficace anche nei pazienti che presentano livelli di aggregazione della proteina Tau bassi/medi e alti [126]. Come evidenziato nel capitolo 1, l'ipotesi della neuroinfiammazione ha assunto un ruolo critico nell'eziopatogenesi della MA. L'azione delle cellule microgliali è mediata da TREM2, il

quale regola diversi processi microgliali, inclusa la fagocitosi dell' A β [128]. È stato osservato che l'utilizzo di agonisti di TREM2 nei modelli murini può portare a degli effetti positivi nel trattamento della MA [128]. Sulla base di ciò, è stato sviluppato AL002, un mAb umanizzato di classe IgG1, il quale lega la porzione extracellulare di TREM2 umano [128]. In un modello murino, la somministrazione di AL002 ha portato all'attivazione della via di segnalazione di TREM2, al reclutamento delle cellule microgliali nelle placche amiloidi, alla riduzione dell'accumulo di amiloide e ad un miglioramento della funzione cognitiva [128]. È in corso uno studio di fase II per valutare l'efficacia di AL002 nei pazienti con MA precoce [128].

3.3 Proteina Tau come bersaglio farmacologico: sviluppi clinici e prospettive future

Negli anni, la mancanza di attenzione nei confronti della proteina Tau come bersaglio farmacologico nella MA può essere attribuita a diversi motivi [124]. *In primis*, la formazione di NFT è stata considerata per lungo tempo come un evento che si verifica durante la progressione della malattia, anziché come causa primaria della MA ed inoltre, l'accumulo della proteina Tau non è specifico si osserva anche in altre patologie neurologiche [124]. A dimostrazione dell'importanza della proteina Tau nella MA, gli studi hanno rilevato una correlazione tra il declino cognitivo e l'aggregazione della proteina Tau, piuttosto che dell'amiloide [124]. Inoltre, il fatto che la deposizione di Tau possa iniziare prima di quella dell'amiloide nelle regioni cerebrali coinvolte nella degenerazione, come l'ippocampo, indica che la proteina Tau sia coinvolta nelle fasi iniziali della malattia [124]. Questi fattori, insieme ai progressi nell'imaging cerebrale, come la tau-PET, hanno portato all'idea che lo sviluppo di terapie mirate alla Tau possa essere una strategia promettente per il trattamento della MA [124]. Vi è, dunque, un crescente interesse nello sviluppo di terapie volte a ridurre l'accumulo di Tau nel cervello. Come mostrato in Figura 10 e riportato nella Tabella 1, i farmaci anti-Tau hanno vari meccanismi d'azione. Uno degli obiettivi principali è impedire che la proteina Tau subisca un'eccessiva fosforilazione, promuovendo la defosforilazione o inibendo le chinasi. La chinasi GSK-3 β , coinvolta nella fosforilazione della proteina Tau e sovraespressa nella MA, rappresenta un bersaglio promettente; infatti, in modelli murini di MA, l'inibizione della GSK-3 β ha rallentato la progressione della malattia [129].

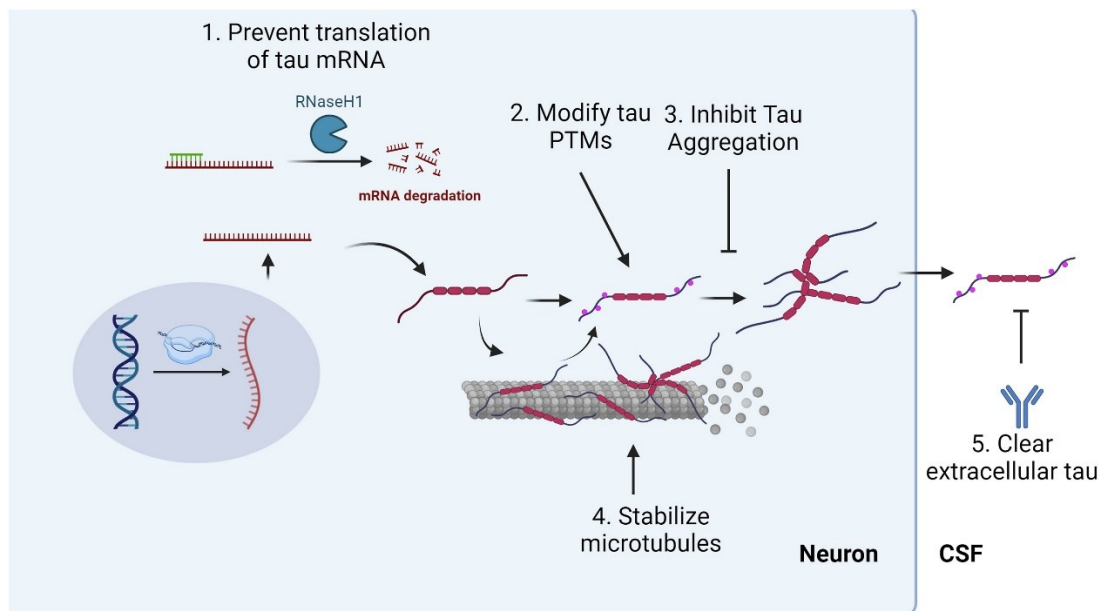


Figura 10. Rappresentazione grafica delle strategie di trattamento anti-Tau: 1) uso degli ASO per impedire la traduzione dell'mRNA Tau; 2) uso di "small molecules" per modulare le modifiche post traduzionali, come la fosforilazione; 3) uso del blu di metilene per inibire l'aggregazione della proteina Tau; 4) uso degli stabilizzatori dei microtubuli; 5) uso dell'immunoterapia attiva o passiva per eliminare la Tau extracellulare [129].

È stato osservato che il litio, usato principalmente per il trattamento del disturbo bipolare, è un inibitore della GSK-3 β ed è in grado di rallentare la progressione della MCI [129]. Inoltre, agisce sulla plasticità neuronale, sulle funzioni mitocondriali, sulla resistenza all'insulina e può aumentare l'assorbimento di glucosio e il tasso glicolitico come osservato nell'ippocampo dei topi con MA [121]. Tuttavia, l'efficacia del carbonato di litio risulta limitata, a causa della sua attività inibitoria debole [130]. Inoltre, il litio provoca gravi effetti collaterali e richiede un monitoraggio costante delle concentrazioni nel sangue. Sulla base di ciò, è stato sviluppato il nanolitio microemulsione A/O, costituito da lipidi specifici e una soluzione acquosa di citrato di litio. La microemulsione lipidica consente un migliore assorbimento e una migliore distribuzione del farmaco [131]. Le dosi terapeutiche richieste per il nanolitio sono molto inferiori rispetto a quelle richieste per i sali di litio comunemente utilizzati [131]. La sua potenziale efficacia nei pazienti affetti da MA ha portato all'avvio di uno studio *proof-of-concept* di fase II [131]. Un altro inibitore della GSK-3 β incluso negli studi clinici sulla MA è il tideglusib. Il trattamento con tideglusib non ha mostrato dei benefici clinici, probabilmente a causa del suo meccanismo di inibizione irreversibile e tempo dipendente [130].

Farmaco	Tipologia di trattamento	Meccanismo d'azione	Effetti
Litio	<i>Small molecule</i>	Inibizione di GSK-3 β	Modulazione della plasticità neuronale, riduzione dell'infiammazione, protezione mitocondriale
Tideglusib	<i>Small molecule</i>	Inibizione di GSK-3 β	Nessun beneficio clinico confermato
Blu di metilene	<i>Small molecule</i>	Inibizione dell'aggregazione Tau	Effetti promettenti nei modelli murini, ma necessità di ulteriori studi clinici
BIIB080	Terapia genica con tecnologia antisenso	Riduzione dell'espressione della proteina Tau	Ben tollerato, riduce le concentrazioni di t-tau e p-tau181 nel CSF, necessità di ulteriori studi per valutare efficacia e sicurezza
AADvac1	Immunoterapia attiva	Vaccino peptidico	Riduzione dell'atrofia cerebrale e del declino cognitivo, ma risultati limitati negli studi di fase II
ACI-35.030	Immunoterapia attiva	Vaccino liposomiale	In fase di sperimentazione clinica per valutare efficacia e sicurezza in pazienti con MA precoce
Bepranemab	Immunoterapia passiva	mAb anti-Tau	Blocco dell'aggregazione e diffusione di Tau patologica
JNJ-63733657	Immunoterapia passiva	mAb anti-Tau	Riduzione dei livelli di p-tau nel CSF
E2814	Immunoterapia passiva	mAb anti-Tau	Riduzione dell'accumulo di Tau insolubile

Tabella 1: Farmaci e trattamenti sperimentali per la MA diretti contro la proteina Tau

La ricerca punta a sviluppare inibitori di GSK-3 β più selettivi e con un meccanismo reversibile. Inoltre, tramite l'unione di due o più farmacofori bioattivi in un'unica molecola, si stanno sperimentando molecole MTDL (*Multi-Target Directed Ligands*), che possano agire su più bersagli terapeutici, ad esempio progettando *lead compound* che inibiscano GSK-3 β e BACE-1, oppure GSK-3 β e acetilcolinesterasi [130]. La progettazione di MTDL offre nuove opportunità per affrontare la complessità della MA, ma è fondamentale valutare l'equilibrio tra le diverse attività delle molecole [130].

Un'altra strategia terapeutica è rappresentata dall'utilizzo degli stabilizzatori dei microtubuli, usati principalmente in ambito oncologico [129]. Il razionale di un potenziale utilizzo di questi farmaci si basa sull'evidenza che la proteina Tau patologica perde la funzione di stabilizzazione dei microtubuli [129]. Il mantenimento dell'integrità dei microtubuli può aiutare a preservare la funzionalità dei neuroni. Ad esempio, tra gli stabilizzatori dei microtubuli, l'epothilone D ha mostrato un miglioramento delle prestazioni cognitive nei modelli murini [129]. Nonostante ciò, gli stabilizzatori dei microtubuli non hanno mostrato un effetto clinico significativo e di conseguenza, l'idea del trattamento della MA con questa classe di composti è stata abbandonata [129]. Un ulteriore approccio consiste nel blocco dell'aggregazione della proteina Tau. È stato osservato che il blu di metilene è in grado di prevenire l'aggregazione della proteina Tau e di ridurre la fosforilazione [132]. Tuttavia, presenta un'emivita breve e uno scarso accumulo cerebrale. In modelli murini è stato osservato che la somministrazione di un idrogel intranasale che rilascia il blu di metilene ha indotto dei miglioramenti cognitivi [132]. Infatti, attraverso la mucosa nasale, il farmaco riesce a oltrepassare la BBB e ad aumentare la biodisponibilità nel cervello [132]. La terapia antisense (AS) rappresenta una potenziale strategia per il trattamento della MA e prevede l'utilizzo di oligonucleotidi antisense (ASO), brevi sequenze di DNA a singolo filamento in grado di legarsi specificatamente a sequenze complementari di mRNA. È stato sviluppato un oligonucleotide antisense, denominato BIIB080 che, tramite il legame all'mRNA del gene MAPT della proteina Tau, ne inibisce la traduzione [133]. In particolare, il legame dell'ASO con il pre-mRNA avviene attraverso l'accoppiamento di basi [133] che porta alla formazione di una struttura a doppio filamento che viene riconosciuta e degradata dalla ribonucleasi H1. Di conseguenza, viene impedita la corretta maturazione dell'mRNA di MAPT [133]. Uno studio di fase 1b ha dimostrato che BIIB080, somministrato per via intratecale in pazienti con MA lieve, risulta ben tollerato ed inoltre, ha portato ad una riduzione delle concentrazioni di t-tau e p-tau181 nel CSF [133]. Tuttavia, sono necessari ulteriori studi per valutare l'efficacia, la sicurezza e la tollerabilità di questa terapia innovativa. È in corso, infatti, uno studio di fase 2 randomizzato, in doppio cieco, controllato con placebo ed è previsto il reclutamento di oltre 700 partecipanti con MCI dovuto a MA o con MA lieve [133]. Il successo limitato delle immunoterapie amiloidi ha portato ad un interesse crescente nei confronti della proteina Tau in questo campo. Infatti, è stato sviluppato un vaccino peptidico, AADvac1,

al fine di indurre una risposta immunitaria specifica contro epitopi specifici della proteina Tau, in particolare la sequenza di aminoacidi 294–305 (KDNIKHVPGGGS) [121]. Il possibile meccanismo d'azione consiste nel legame degli anticorpi sviluppati alle specifiche sequenze della proteina Tau [121]. Gli studi hanno dimostrato che AADvac1 è in grado di indurre la produzione di anticorpi che legano 3 o 4 epitopi conformazionali della proteina Tau, in particolare a livello della MBR [121]. Gli anticorpi prodotti potrebbero portare ridurre l'aggregazione e facilitare l'eliminazione delle forme patologiche della proteina Tau. Negli studi clinici di fase I, il trattamento con AADvac1 ha mostrato dei buoni risultati, che si traducono in una riduzione dell'atrofia cerebrale e del declino cognitivo nei pazienti affetti da MA da grado lieve a moderato [121]. Tuttavia, studi di fase II non hanno riscontrato miglioramenti significativi nella funzione cognitiva nei pazienti trattati con AADvac1, nonostante la tollerabilità e sicurezza del vaccino [121]. Un'analisi *post-hoc* ha indicato che un sottogruppo specifico di pazienti più giovani potrebbe trarre beneficio dal trattamento con AADvac1 e sulla base di questi dati scientifici, l'azienda ha intenzione di condurre degli studi stratificati [129]. È stato sviluppato anche un vaccino liposomiale, ACI-35, in grado di provocare una risposta immunitaria nei confronti della proteina Tau fosforilata patologica e quindi di evitare risposte autoimmuni contro le forme fisiologiche della proteina [121]. Il vaccino è costituito da 16 copie di un frammento sintetico della proteina Tau, fosforilato su residui associati alle forme patologiche della proteina; il veicolo utilizzato è rappresentato dai liposomi, nanoparticelle costituite da un doppio strato lipidico [121]. I vaccini liposomiali rappresentano una formulazione promettente per il trattamento della MA, poiché trasportano l'immunogeno direttamente nel cervello, migliorando così l'efficacia del trattamento. In generale, l'implementazione della tecnologia liposomiale nello sviluppo dei farmaci per trattamento della MA offre una grande opportunità per il futuro. Uno studio di fase 1b ha dimostrato che il vaccino ACI-35 ha prodotto una risposta immunitaria debole e a seguito di ciò, per poter aumentare la risposta immunitaria, è stato sviluppato ACI-35.030, un vaccino di seconda generazione. Questo ha mostrato, in uno studio di fase 1b/2a, dei buoni risultati in termini di risposta anticorpale in pazienti con MA precoce [121]. Si prevede l'avvio di una sperimentazione clinica di fase 2/3 di ACI-35.030, fondamentale per valutare l'efficacia e la sicurezza del vaccino su un ampio campione di pazienti [134]. L'immunoterapia passiva che mira alla proteina Tau sembra essere un'altra strategia promettente per il trattamento della MA. L'obiettivo dei mAb

anti-Tau è bloccare l'aggregazione e la diffusione della proteina Tau [128]. In generale, i mAb possono agire sia all'interno e sia all'esterno delle cellule cerebrali. In particolare, come già descritto nel Cap.2, è stato osservato che la proteina Tau patologica può diffondere da un neurone all'altro e quindi, la proteina Tau extracellulare potrebbe rappresentare un bersaglio promettente per i mAb. Data la discreta quantità di proteina Tau extracellulare presente nel CSF, anche una piccola concentrazione di anticorpo potrebbe essere sufficiente a contrastare la diffusione nel cervello [135]. È importante sottolineare che la Tau svolge anche una funzione fisiologica nel nostro organismo, pertanto sarebbe auspicabile sviluppare mAb in grado di mirare specificamente alle forme patogene di Tau, come gli oligomeri e le fibrille. Il meccanismo coinvolto nell'internalizzazione degli anticorpi da parte dei neuroni è l'endocitosi. È stato osservato che i complessi Tau-mAb, presenti a livello extracellulare, possono essere captati dai neuroni attraverso la via dipendente dalla clatrina ed eliminati tramite il sistema endosoma/autofagosoma/lisosoma [128]. Nei topi, il meccanismo di clearance extracellulare dei complessi Tau-mAb è rappresentato dalla microglia tramite recettori Fc e lisosomi [128] e allo stesso tempo, l'attivazione dei recettori intracellulari, come TRIM21, evidenzia un ulteriore meccanismo di clearance contro la proteina Tau intracellulare [128]. I mAb anti-Tau sono anticorpi biologici umanizzati e la prima sottoclasse di questi anticorpi che è entrata nello sviluppo clinico è rappresentata da quelli che agiscono contro il dominio N-terminale della Tau, tra cui gosuranemab, tilavonemab, zagotenemab e semorinemab [129]. Tuttavia, gli studi di fase II hanno mostrato benefici clinici limitati, nonostante si sia osservata una diminuzione dei livelli del dominio N-terminale di Tau nel CSF [129]. In particolare, uno studio di fase II condotto su pazienti con MA da grado lieve a moderato ha dimostrato che semorinemab non ha mostrato benefici significativi degli *endpoint* cognitivi e funzionali rispetto ai pazienti che avevano ricevuto il placebo [129]. Dati gli effetti limitati dei mAb diretti contro l'N-terminale, la ricerca punta nello sviluppo di mAb che legano la regione centrale della proteina e molti di questi anticorpi sono ancora nelle prime fasi degli studi clinici [128]. Bepranemab è un anticorpo monoclonale umanizzato IgG4 [128]. Il target è rappresentato dagli aminoacidi 235–250 della proteina Tau, situati nella PRR. Inoltre, bepranemab è in grado di riconoscere sia la forma monomerica di Tau, e sia i PHF [128]. Studi condotti su topi geneticamente modificati che esprimono la Tau umana mutata, hanno dimostrato l'efficacia di bepranemab nel contrastare le forme patologiche della proteina Tau e

nell'impedire la loro diffusione nel cervello [128]. Attualmente, è in corso uno studio di fase II per valutare l'efficacia di bepranemab nei pazienti con MCI o MA lieve [128]. L'anticorpo monoclonale JNJ-63733657 presenta come bersaglio il dominio MBR della proteina Tau ed in particolare, ha un'alta affinità per la proteina Tau fosforilata al residuo 217 (pT217) e per i PHF[128]. Studi preclinici condotti su modelli murini hanno dimostrato che JNJ-63733657 inibisce la diffusione della proteina Tau [128]. Uno studio di fase I ha osservato che maggiore è la dose di JNJ-63733657, più si ha una diminuzione dei livelli di p-tau nel CSF dei pazienti sottoposti allo studio [128]. Attualmente, è in corso uno studio di fase II che recluta pazienti con MA nelle fasi iniziali, con la speranza di valutare ulteriormente la sicurezza e l'efficacia del trattamento con JNJ-63733657 [128]. E2814 è un altro anticorpo monoclonale diretto contro la proteina Tau, in particolare è progettato per riconoscere un epitopo specifico situato nella regione MBR [128]. È stato dimostrato che l'E2814 è in grado di inibire l'aggregazione della proteina Tau *in vitro* ed inoltre, l'anticorpo è in grado di favorire la clearance delle proteine Tau che contengono la regione MBR [128]. In uno studio su modelli murini, il trattamento con E2814 ha portato a una riduzione dell'accumulo della proteina Tau insolubile [128]. Attualmente, è in corso uno studio di fase I/II sull'E2814 che coinvolge pazienti con deterioramento cognitivo leggero-moderato causato da MA ereditaria [128].

CONCLUSIONI

La malattia di Alzheimer rappresenta una patologia ad eziologia complessa che ha ancora diverse problematiche da affrontare. Un primo problema è rappresentato dal costo sociale ed economico della malattia. Risulta fondamentale investire nella ricerca, prevenzione e assistenza per migliorare l'accesso ai servizi e garantire una qualità di vita migliore per i pazienti e le loro famiglie. Un'altra sfida da affrontare è rappresentata dalla completa comprensione dell'eziologia della malattia. I progressi in quest'ambito hanno fatto sì che l'ipotesi tradizionale della cascata amiloide sia stata arricchita da nuove componenti molecolari e biochimiche, che dimostrano che la deposizione di amiloide rappresenta una condizione necessaria, ma insufficiente per lo sviluppo della MA [33]. Tuttavia, i meccanismi precisi e il nesso temporale tra i vari eventi devono ancora essere completamente definiti. L'analisi dell'evoluzione della malattia, dei fattori di rischio e protettivi ha sottolineato l'importanza della prevenzione, anche attraverso l'adozione di uno stile di vita sano. L'esordio della MA è insidioso e la diagnosi, mai certa quando il paziente è in vita, avviene soltanto quando i sintomi cominciano a manifestarsi e il declino cognitivo è ormai già presente. Infatti, da un ampio studio longitudinale che ha seguito uomini e donne con età media di 61 anni per due decenni, dal 2000 al 2020, è emerso che i cambiamenti dei biomarcatori del liquor e dell'imaging si verificano fino a 18 anni prima della diagnosi clinica; inoltre, il declino cognitivo è stato osservato fino a sei anni prima della diagnosi [136]. L'obiettivo degli approcci terapeutici innovativi analizzati è iniziare i trattamenti prima della comparsa dei sintomi e dei cambiamenti cerebrali. È evidente, dunque, la necessità di sviluppare delle strategie diagnostiche precoci. Una delle più grandi sfide resta l'identificazione di biomarcatori affidabili, il cui prelievo non sia invasivo; a tal proposito, la ricerca futura dovrà puntare allo sviluppo e all'implementazione clinica dei biomarcatori plasmatici. Grazie a questi ultimi, infatti, è possibile anche identificare e arruolare i pazienti negli studi clinici in una fase molto precoce della malattia. Tuttavia, è importante considerare che il passaggio dai biomarcatori di ricerca ai biomarcatori usati clinicamente è un processo complesso che presenta vari ostacoli, come le variazioni pre-analitiche, la raccolta e la conservazione dei campioni biologici e le interferenze con quadri di comorbidità, i quali possono compromettere l'accuratezza e l'affidabilità dei biomarcatori [100]. È essenziale poi una valutazione completa dell'efficacia analitica dei biomarcatori utilizzati. Come dimostrato da varie evidenze scientifiche, la proteina Tau si inserisce nel contesto della MA, in

particolare nell'eziopatogenesi, nel ruolo come potenziale biomarcatore e nel trattamento farmacologico. Tuttavia, emerge chiaramente che molte domande restano senza una risposta. Infatti, la complessità strutturale della proteina Tau ha portato ad una maggiore difficoltà nel sintetizzare degli agenti terapeutici efficaci. Un altro limite riscontrato riguarda i modelli animali utilizzati negli studi, poiché essi non rappresentano completamente la complessità biologica degli esseri umani. Inoltre, il continuo progresso nell'ambito della ricerca ha permesso di scoprire una serie di altre funzioni biologiche di questa proteina, oltre a quella primaria di MAP. In conclusione, per lo sviluppo di terapie efficaci, è fondamentale comprendere in che modo i cambiamenti delle funzioni della proteina Tau contribuiscono alla neurodegenerazione; inoltre, è importante capire meglio la complessità delle interazioni della Tau con le altre proteine, i meccanismi molecolari alla base trasporto intracellulare e le modifiche post-traduzionali. Infine, con l'introduzione delle analisi genetiche, metabolomiche, proteomiche e ambientali e con il supporto delle tecniche di imaging cerebrale e dei biomarcatori, la ricerca punta all'utilizzo della medicina di precisione, la quale può portare ad un miglioramento dell'accuratezza della diagnosi e allo sviluppo di efficaci terapie personalizzate per i pazienti colpiti da questa complessa malattia.

BIBLIOGRAFIA

- [1] S. Gauthier, P. Rosa-Neto, J. A. Morais, e C. Webster, «World Alzheimer Report 2021: Journey through the diagnosis of dementia», *Alzheimer's Disease International*, vol. 2022, p. 30, 2021.
- [2] «2023 Alzheimer's disease facts and figures», *Alzheimer's & Dementia*, vol. 19, fasc. 4, pp. 1598–1695, apr. 2023, doi: 10.1002/alz.13016.
- [3] G. Livingston *et al.*, «Dementia prevention, intervention, and care: 2020 report of the Lancet Commission», *The Lancet*, vol. 396, fasc. 10248, pp. 413–446, ago. 2020, doi: 10.1016/S0140-6736(20)30367-6.
- [4] M. della Salute, «Giornata Mondiale dell'Alzheimer 2023». Consultato: 19 marzo 2024. [Online]. Disponibile su: https://www.pnes.salute.gov.it/portale/news/p3_2_1_1_1_jsp?id=6350&lingua=italiano&menu=notizie&p=dalministro
- [5] M. della Salute, «Giornata mondiale dell'Alzheimer, 21 settembre 2022». Consultato: 27 febbraio 2024. [Online]. Disponibile su: <https://www.salute.gov.it/portale/demenze/dettaglioNotizieDemenze.jsp?lingua=italiano&menu=notizie&p=dalministro&id=5998>
- [6] EpiCentro, «I risultati del fondo per l'Alzheimer e le demenze 2021-23: il convegno finale». Consultato: 27 febbraio 2024. [Online]. Disponibile su: <https://www.epicentro.iss.it/demenza/convegno-finale-fondo-demenze-21-23>
- [7] A. Wimo *et al.*, «The worldwide costs of dementia in 2019», *Alzheimer's & Dementia*, vol. 19, fasc. 7, pp. 2865–2873, lug. 2023, doi: 10.1002/alz.12901.
- [8] S. J. Lwi, B. Q. Ford, J. J. Casey, B. L. Miller, e R. W. Levenson, «Poor caregiver mental health predicts mortality of patients with neurodegenerative disease», *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 114, fasc. 28, pp. 7319–7324, lug. 2017, doi: 10.1073/pnas.1701597114.
- [9] P. B. Rosenberg, M. A. Nowrangi, e C. G. Lyketsos, «Neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease: What might be associated brain circuits?», *Molecular Aspects of Medicine*, vol. 43–44, pp. 25–37, giu. 2015, doi: 10.1016/j.mam.2015.05.005.
- [10] H. Förstl e A. Kurz, «Clinical features of Alzheimer's disease», *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, vol. 249, fasc. 6, pp. 288–290, dic. 1999, doi: 10.1007/s004060050101.
- [11] N. I. Bradfield e D. Ames, «Mild cognitive impairment: narrative review of taxonomies and systematic review of their prediction of incident Alzheimer's disease dementia», *BJPsych Bull*, vol. 44, fasc. 2, pp. 67–74, apr. 2020, doi: 10.1192/bjb.2019.77.
- [12] S. Li, Y. Guo, J. Men, H. Fu, e T. Xu, «The preventive efficacy of vitamin B supplements on the cognitive decline of elderly adults: a systematic review and meta-analysis», *BMC Geriatr*, vol. 21, fasc. 1, p. 367, giu. 2021, doi: 10.1186/s12877-021-02253-3.
- [13] F. Bermejo-Pareja e T. Del Ser, «Controversial Past, Splendid Present, Unpredictable Future: A Brief Review of Alzheimer Disease History», *JCM*, vol. 13, fasc. 2, p. 536, gen. 2024, doi: 10.3390/jcm13020536.
- [14] M. della Salute, «Dati epidemiologici». Consultato: 27 febbraio 2024. [Online]. Disponibile su: <https://www.salute.gov.it/portale/demenze/dettaglioContenutiDemenze.jsp?lingua=italiano&id=2402&area=demenze&menu=vuoto>
- [15] J. Jia *et al.*, «A 19-Year-Old Adolescent with Probable Alzheimer's Disease», *JAD*, vol. 91, fasc. 3, pp. 915–922, gen. 2023, doi: 10.3233/JAD-221065.
- [16] W. J. Strittmatter *et al.*, «Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease», *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 90, fasc. 5, pp. 1977–1981, mar. 1993, doi: 10.1073/pnas.90.5.1977.
- [17] «Alzheimer's Biomarkers, Explained». Consultato: 27 febbraio 2024. [Online]. Disponibile su: <https://www.alzdiscovery.org/news-room/blog/alzheimers-biomarkers-explained>
- [18] F. K. Wiseman *et al.*, «A genetic cause of Alzheimer disease: mechanistic insights from Down syndrome», *Nat Rev Neurosci*, vol. 16, fasc. 9, pp. 564–574, set. 2015, doi: 10.1038/nrn3983.
- [19] B. Farnsworth Von Cederwald, M. Josefsson, A. Wåhlin, L. Nyberg, e N. Karalija, «Association of Cardiovascular Risk Trajectory With Cognitive Decline and Incident Dementia», *Neurology*, vol. 98, fasc. 20, mag. 2022, doi: 10.1212/WNL.00000000000020255.
- [20] A. Abdullahi, T. W. Wong, e S. S. Ng, «Understanding the mechanisms of disease modifying effects of aerobic exercise in people with Alzheimer's disease», *Ageing Research Reviews*, vol. 94, p. 102202, feb. 2024, doi: 10.1016/j.arr.2024.102202.
- [21] T. Ballarini *et al.*, «Mediterranean Diet, Alzheimer Disease Biomarkers, and Brain Atrophy in Old Age», *Neurology*, vol. 96, fasc. 24, giu. 2021, doi: 10.1212/WNL.00000000000012067.
- [22] S. Sindi, F. Mangialasche, e M. Kivipelto, «Advances in the prevention of Alzheimer's Disease», *FL1000Prime Rep*, vol. 7, mag. 2015, doi: 10.12703/P7-50.
- [23] H. Hampel *et al.*, «The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease», *Brain*, vol. 141, fasc. 7, pp. 1917–1933, lug. 2018, doi: 10.1093/brain/awy132.
- [24] M. Chapleau, L. Iaccarino, D. Soleimani-Meigooni, e G. D. Rabinovici, «The Role of Amyloid PET in Imaging Neurodegenerative Disorders: A Review», *J Nucl Med*, vol. 63, fasc. Supplement 1, pp. 13S–19S, giu. 2022, doi: 10.2967/jnumed.121.263195.

- [25] A.-C. S. Vogt, G. T. Jennings, M. O. Mohsen, M. Vogel, e M. F. Bachmann, «Alzheimer's Disease: A Brief History of Immunotherapies Targeting Amyloid β », *IJMS*, vol. 24, fasc. 4, p. 3895, feb. 2023, doi: 10.3390/ijms24043895.
- [26] H. Hampel *et al.*, «The β -Secretase BACE1 in Alzheimer's Disease», *Biological Psychiatry*, vol. 89, fasc. 8, pp. 745–756, apr. 2021, doi: 10.1016/j.biopsych.2020.02.001.
- [27] J. Zhao, X. Liu, W. Xia, Y. Zhang, e C. Wang, «Targeting Amyloidogenic Processing of APP in Alzheimer's Disease», *Front. Mol. Neurosci.*, vol. 13, p. 137, ago. 2020, doi: 10.3389/fnmol.2020.00137.
- [28] D. J. Selkoe e M. S. Wolfe, «Presenilin: Running with Scissors in the Membrane», *Cell*, vol. 131, fasc. 2, pp. 215–221, ott. 2007, doi: 10.1016/j.cell.2007.10.012.
- [29] S. A. Kent, T. L. Spires-Jones, e C. S. Durrant, «The physiological roles of tau and A β : implications for Alzheimer's disease pathology and therapeutics», *Acta Neuropathol*, vol. 140, fasc. 4, pp. 417–447, ott. 2020, doi: 10.1007/s00401-020-02196-w.
- [30] L. Yang, S. Feng, C. Wu, e L. Yang, «Microglia-Mediated A β Propagation in Alzheimer's Disease», *Neurosci Bull.*, vol. 38, fasc. 10, pp. 1274–1276, ott. 2022, doi: 10.1007/s12264-022-00907-9.
- [31] H. Hampel *et al.*, «The Amyloid- β Pathway in Alzheimer's Disease», *Mol Psychiatry*, vol. 26, fasc. 10, pp. 5481–5503, ott. 2021, doi: 10.1038/s41380-021-01249-0.
- [32] M. Simon *et al.*, «Loss of perivascular aquaporin-4 localization impairs glymphatic exchange and promotes amyloid β plaque formation in mice», *Alz Res Therapy*, vol. 14, fasc. 1, p. 59, dic. 2022, doi: 10.1186/s13195-022-00999-5.
- [33] H. Wang, M. Sun, W. Li, X. Liu, M. Zhu, e H. Qin, «Biomarkers associated with the pathogenesis of Alzheimer's disease», *Front. Cell. Neurosci.*, vol. 17, p. 1279046, dic. 2023, doi: 10.3389/fncel.2023.1279046.
- [34] J. N. K. Nyarko *et al.*, «Profiles of β -Amyloid Peptides and Key Secretases in Brain Autopsy Samples Differ with Sex and APOE ϵ 4 Status: Impact for Risk and Progression of Alzheimer Disease», *Neuroscience*, vol. 373, pp. 20–36, mar. 2018, doi: 10.1016/j.neuroscience.2018.01.005.
- [35] R. A. Nixon, «Autophagy, amyloidogenesis and Alzheimer disease», *Journal of Cell Science*, vol. 120, fasc. 23, pp. 4081–4091, dic. 2007, doi: 10.1242/jcs.019265.
- [36] «I MARCATORI PROTEICI LIQUORALI NELLA MALATTIA DI ALZHEIMER E NELLE ALTRE FORME DI DEMENZA», [Online]. Disponibile su: <https://medicinadilaboratorio.hsr.it/static/upl/ar/artic.alzheimer.pdf>
- [37] S. E. Schindler *et al.*, «High-precision plasma β -amyloid 42/40 predicts current and future brain amyloidosis», *Neurology*, vol. 93, fasc. 17, ott. 2019, doi: 10.1212/WNL.00000000000008081.
- [38] E. Area-Gomez *et al.*, «A key role for MAM in mediating mitochondrial dysfunction in Alzheimer disease», *Cell Death Dis.*, vol. 9, fasc. 3, p. 335, feb. 2018, doi: 10.1038/s41419-017-0215-0.
- [39] T. Ashleigh, R. H. Swerdlow, e M. F. Beal, «The role of mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease pathogenesis», *Alzheimer's & Dementia*, vol. 19, fasc. 1, pp. 333–342, gen. 2023, doi: 10.1002/alz.12683.
- [40] L. Zhong *et al.*, «Soluble TREM2 induces inflammatory responses and enhances microglial survival», *Journal of Experimental Medicine*, vol. 214, fasc. 3, pp. 597–607, mar. 2017, doi: 10.1084/jem.20160844.
- [41] M. T. Heneka *et al.*, «Neuroinflammation in Alzheimer's disease», *The Lancet Neurology*, vol. 14, fasc. 4, pp. 388–405, apr. 2015, doi: 10.1016/S1474-4422(15)70016-5.
- [42] P.-P. Guan, L.-L. Cao, e P. Wang, «Elevating the Levels of Calcium Ions Exacerbate Alzheimer's Disease via Inducing the Production and Aggregation of β -Amyloid Protein and Phosphorylated Tau», *IJMS*, vol. 22, fasc. 11, p. 5900, mag. 2021, doi: 10.3390/ijms22115900.
- [43] B. C.-K. Tong, A. J. Wu, M. Li, e K.-H. Cheung, «Calcium signaling in Alzheimer's disease & therapies», *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, vol. 1865, fasc. 11, pp. 1745–1760, nov. 2018, doi: 10.1016/j.bbamcr.2018.07.018.
- [44] K. Kowalski e A. Mulak, «Brain-Gut-Microbiota Axis in Alzheimer's Disease», *J Neurogastroenterol Motil*, vol. 25, fasc. 1, pp. 48–60, gen. 2019, doi: 10.5056/jnm18087.
- [45] Y. Zhao, L. Cong, V. Jaber, e W. J. Lukiw, «Microbiome-Derived Lipopolysaccharide Enriched in the Perinuclear Region of Alzheimer's Disease Brain», *Front. Immunol.*, vol. 8, p. 1064, set. 2017, doi: 10.3389/fimmu.2017.01064.
- [46] L. Ho, K. Ono, M. Tsuji, P. Mazzola, R. Singh, e G. M. Pasinetti, «Protective roles of intestinal microbiota derived short chain fatty acids in Alzheimer's disease-type beta-amyloid neuropathological mechanisms», *Expert Review of Neurotherapeutics*, vol. 18, fasc. 1, pp. 83–90, gen. 2018, doi: 10.1080/14737175.2018.1400909.
- [47] A. Troci *et al.*, «Disease- and stage-specific alterations of the oral and fecal microbiota in Alzheimer's disease», *PNAS Nexus*, vol. 3, fasc. 1, p. pgad427, dic. 2023, doi: 10.1093/pnasnexus/pgad427.
- [48] M. R. Minter *et al.*, «Antibiotic-induced perturbations in gut microbial diversity influences neuro-inflammation and amyloidosis in a murine model of Alzheimer's disease», *Sci Rep*, vol. 6, fasc. 1, p. 30028, lug. 2016, doi: 10.1038/srep30028.
- [49] M.-S. Kim *et al.*, «Transfer of a healthy microbiota reduces amyloid and tau pathology in an Alzheimer's disease animal model», *Gut*, vol. 69, fasc. 2, pp. 283–294, feb. 2020, doi: 10.1136/gutjnl-2018-317431.
- [50] M. della Salute, «Probiotici e prebiotici». Consultato: 27 febbraio 2024. [Online]. Disponibile su: https://www.salute.gov.it/portale/temi/p2_6.jsp?lingua=italiano&id=1426&area=Alimenti%20particolari%20e%20integratori&menu=integratori
- [51] M. Nishikawa, A. M. Brickman, J. J. Manly, N. Schupf, R. P. Mayeux, e Y. Gu, «Association of Dietary Prebiotic Consumption with Reduced Risk of Alzheimer's Disease in a Multiethnic Population», *CAR*, vol. 18, fasc. 12, pp. 984–992, ott. 2021, doi: 10.2174/1567205019666211222115142.
- [52] S. Grabrucker *et al.*, «Microbiota from Alzheimer's patients induce deficits in cognition and hippocampal neurogenesis», *Brain*, vol. 146, fasc. 12, pp. 4916–4934, dic. 2023, doi: 10.1093/brain/awad303.

- [53] D. A. Butterfield e B. Halliwell, «Oxidative stress, dysfunctional glucose metabolism and Alzheimer disease», *Nat Rev Neurosci.*, vol. 20, fasc. 3, pp. 148–160, mar. 2019, doi: 10.1038/s41583-019-0132-6.
- [54] J. H. Yoon *et al.*, «How Can Insulin Resistance Cause Alzheimer’s Disease?», *IJMS*, vol. 24, fasc. 4, p. 3506, feb. 2023, doi: 10.3390/ijms24043506.
- [55] M. D. Weingarten, A. H. Lockwood, S. Y. Hwo, e M. W. Kirschner, «A protein factor essential for microtubule assembly.», *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 72, fasc. 5, pp. 1858–1862, mag. 1975, doi: 10.1073/pnas.72.5.1858.
- [56] H. Fatafta, S. Samantray, A. Sayyed-Ahmad, O. Coskuner-Weber, e B. Strodel, «Molecular simulations of IDPs: From ensemble generation to IDP interactions leading to disorder-to-order transitions», in *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, vol. 183, Elsevier, 2021, pp. 135–185. doi: 10.1016/bs.pmbts.2021.06.003.
- [57] A. Gauthier-Kemper *et al.*, «Annexins A2 and A6 interact with the extreme N terminus of tau and thereby contribute to tau’s axonal localization», *Journal of Biological Chemistry*, vol. 293, fasc. 21, pp. 8065–8076, mag. 2018, doi: 10.1074/jbc.RA117.000490.
- [58] N. I. Trushina, L. Bakota, A. Y. Mulikjanian, e R. Brandt, «The Evolution of Tau Phosphorylation and Interactions», *Front. Aging Neurosci.*, vol. 11, p. 256, set. 2019, doi: 10.3389/fnagi.2019.00256.
- [59] L. Wang, Y. Zhou, D. Chen, e T. H. Lee, «Peptidyl-Prolyl Cis/Trans Isomerase Pin1 and Alzheimer’s Disease», *Front. Cell Dev. Biol.*, vol. 8, p. 355, mag. 2020, doi: 10.3389/fcell.2020.00355.
- [60] H. E. R. Baughman, A. F. Clouser, R. E. Klevit, e A. Nath, «HspB1 and Hsc70 chaperones engage distinct tau species and have different inhibitory effects on amyloid formation», *Journal of Biological Chemistry*, vol. 293, fasc. 8, pp. 2687–2700, feb. 2018, doi: 10.1074/jbc.M117.803411.
- [61] A. Corsi, C. Bombieri, M. T. Valenti, e M. G. Romanelli, «Tau Isoforms: Gaining Insight into MAPT Alternative Splicing», *IJMS*, vol. 23, fasc. 23, p. 15383, dic. 2022, doi: 10.3390/ijms232315383.
- [62] F. Liu e C.-X. Gong, «Tau exon 10 alternative splicing and tauopathies», *Mol Neurodegeneration*, vol. 3, fasc. 1, p. 8, 2008, doi: 10.1186/1750-1326-3-8.
- [63] V. García-Escudero *et al.*, «A new non-aggregative splicing isoform of human Tau is decreased in Alzheimer’s disease», *Acta Neuropathol*, vol. 142, fasc. 1, pp. 159–177, lug. 2021, doi: 10.1007/s00401-021-02317-z.
- [64] A. Cario e C. L. Berger, «Tau, microtubule dynamics, and axonal transport: New paradigms for neurodegenerative disease», *BioEssays*, vol. 45, fasc. 8, p. 2200138, ago. 2023, doi: 10.1002/bies.202200138.
- [65] L. Qiang *et al.*, «Tau Does Not Stabilize Axonal Microtubules but Rather Enables Them to Have Long Labile Domains», *Current Biology*, vol. 28, fasc. 13, pp. 2181–2189.e4, lug. 2018, doi: 10.1016/j.cub.2018.05.045.
- [66] Y. Wang e E. Mandelkow, «Tau in physiology and pathology», *Nat Rev Neurosci.*, vol. 17, fasc. 1, pp. 22–35, gen. 2016, doi: 10.1038/nrn.2015.1.
- [67] J. N. Rauch *et al.*, «LRP1 is a master regulator of tau uptake and spread», *Nature*, vol. 580, fasc. 7803, pp. 381–385, apr. 2020, doi: 10.1038/s41586-020-2156-5.
- [68] N. Younas, T. Saleem, A. Younas, e I. Zerr, «Nuclear face of Tau: an inside player in neurodegeneration», *acta neuropathol commun*, vol. 11, fasc. 1, p. 196, dic. 2023, doi: 10.1186/s40478-023-01702-x.
- [69] M. Violet *et al.*, «A major role for Tau in neuronal DNA and RNA protection in vivo under physiological and hyperthermic conditions», *Front. Cell. Neurosci.*, vol. 8, mar. 2014, doi: 10.3389/fncel.2014.00084.
- [70] F. Biundo, D. Del Prete, H. Zhang, O. Arancio, e L. D’Adamio, «A role for tau in learning, memory and synaptic plasticity», *Sci Rep*, vol. 8, fasc. 1, p. 3184, feb. 2018, doi: 10.1038/s41598-018-21596-3.
- [71] R. L. Mueller, B. Combs, M. M. Alhadidy, S. T. Brady, G. A. Morfini, e N. M. Kanaan, «Tau: A Signaling Hub Protein», *Front. Mol. Neurosci.*, vol. 14, p. 647054, mar. 2021, doi: 10.3389/fnmol.2021.647054.
- [72] Y. Zhang, K.-M. Wu, L. Yang, Q. Dong, e J.-T. Yu, «Tauopathies: new perspectives and challenges», *Mol Neurodegeneration*, vol. 17, fasc. 1, p. 28, dic. 2022, doi: 10.1186/s13024-022-00533-z.
- [73] C. Sexton *et al.*, «Current directions in tau research: Highlights from Tau 2020», *Alzheimer’s & Dementia*, vol. 18, fasc. 5, pp. 988–1007, mag. 2022, doi: 10.1002/alz.12452.
- [74] C. Alquezar, S. Arya, e A. W. Kao, «Tau Post-translational Modifications: Dynamic Transformers of Tau Function, Degradation, and Aggregation», *Front. Neurol.*, vol. 11, p. 595532, gen. 2021, doi: 10.3389/fneur.2020.595532.
- [75] S. Wegmann, J. Biernat, e E. Mandelkow, «A current view on Tau protein phosphorylation in Alzheimer’s disease», *Current Opinion in Neurobiology*, vol. 69, pp. 131–138, ago. 2021, doi: 10.1016/j.conb.2021.03.003.
- [76] I. Guisile *et al.*, «Circadian and sleep/wake-dependent variations in tau phosphorylation are driven by temperature», *Sleep*, vol. 43, fasc. 4, p. zsz266, apr. 2020, doi: 10.1093/sleep/zsz266.
- [77] S. Mondragón-Rodríguez, G. Perry, J. Luna-Muñoz, M. C. Acevedo-Aquino, e S. Williams, «Phosphorylation of tau protein at sites SER³⁹⁶⁻⁴⁰⁴ is one of the earliest events in Alzheimer’s disease and Down syndrome», *Neuropathology Appl Neurobio*, vol. 40, fasc. 2, pp. 121–135, feb. 2014, doi: 10.1111/nan.12084.
- [78] D. R. Thal e S. O. Tomé, «The central role of tau in Alzheimer’s disease: From neurofibrillary tangle maturation to the induction of cell death», *Brain Research Bulletin*, vol. 190, pp. 204–217, nov. 2022, doi: 10.1016/j.brainresbull.2022.10.006.
- [79] M. Jin, S. Wang, X. Gao, Z. Zou, S. Hirotsune, e L. Sun, «Pathological and physiological functional cross-talks of α -synuclein and tau in the central nervous system», *Neural Regeneration Research*, vol. 19, fasc. 4, pp. 855–862, apr. 2024, doi: 10.4103/1673-5374.382231.
- [80] J. Zhao e M. Lang, «New insight into protein glycosylation in the development of Alzheimer’s disease», *Cell Death Discov.*, vol. 9, fasc. 1, p. 314, ago. 2023, doi: 10.1038/s41420-023-01617-5.
- [81] P. Chakraborty *et al.*, «Acetylation discriminates disease-specific tau deposition», *Nat Commun*, vol. 14, fasc. 1, p. 5919, set. 2023, doi: 10.1038/s41467-023-41672-1.

- [82] Q. Liu *et al.*, «Acetylated tau exacerbates learning and memory impairment by disturbing with mitochondrial homeostasis», *Redox Biology*, vol. 62, p. 102697, giu. 2023, doi: 10.1016/j.redox.2023.102697.
- [83] J. Yang, N. Shen, J. Shen, Y. Yang, e H.-L. Li, «Complicated Role of Post-translational Modification and Protease-Cleaved Fragments of Tau in Alzheimer's Disease and Other Tauopathies», *Mol Neurobiol*, dic. 2023, doi: 10.1007/s12035-023-03867-x.
- [84] B. Caballero *et al.*, «Acetylated tau inhibits chaperone-mediated autophagy and promotes tau pathology propagation in mice», *Nat Commun*, vol. 12, fasc. 1, p. 2238, apr. 2021, doi: 10.1038/s41467-021-22501-9.
- [85] L. Li, Y. Jiang, J.-Z. Wang, R. Liu, e X. Wang, «Tau Ubiquitination in Alzheimer's Disease», *Front. Neurol.*, vol. 12, p. 786353, feb. 2022, doi: 10.3389/fneur.2021.786353.
- [86] E. Metwally, H. A. Al-Abbadi, T. Hussain, G. Murtaza, A. M. Abdellatif, e M. F. Ahmed, «Calpain signaling: from biology to therapeutic opportunities in neurodegenerative disorders», *Front. Vet. Sci.*, vol. 10, p. 1235163, set 2023, doi: 10.3389/fvets.2023.1235163.
- [87] G. Meisl *et al.*, «In vivo rate-determining steps of tau seed accumulation in Alzheimer's disease», *Sci. Adv.*, vol. 7, fasc. 44, p. eabh1448, ott. 2021, doi: 10.1126/sciadv.abh1448.
- [88] C. M. Moloney, V. J. Lowe, e M. E. Murray, «Visualization of neurofibrillary tangle maturity in Alzheimer's disease: A clinicopathologic perspective for biomarker research», *Alzheimer's & Dementia*, vol. 17, fasc. 9, pp. 1554–1574, set. 2021, doi: 10.1002/alz.12321.
- [89] D. Chu e F. Liu, «Pathological changes of tau related to Alzheimer's disease», *ACS Chemical Neuroscience*, vol. 10, fasc. 2, pp. 931–944, 2018.
- [90] B. Hyman, «All the Tau We Cannot See», *Annu. Rev. Med.*, vol. 74, fasc. 1, pp. 503–514, gen. 2023, doi: 10.1146/annurev-med-042921-023749.
- [91] Y. Yang *et al.*, «Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response: emerging regulators in progression of traumatic brain injury», *Cell Death Dis*, vol. 15, fasc. 2, p. 156, feb. 2024, doi: 10.1038/s41419-024-06515-x.
- [92] Y. Dong *et al.*, «Hyperphosphorylated tau mediates neuronal death by inducing necroptosis and inflammation in Alzheimer's disease», *J Neuroinflammation*, vol. 19, fasc. 1, p. 205, ago. 2022, doi: 10.1186/s12974-022-02567-y.
- [93] R. Zhang, Y. Song, e X. Su, «Necroptosis and Alzheimer's Disease: Pathogenic Mechanisms and Therapeutic Opportunities», *JAD*, vol. 94, fasc. s1, pp. S367–S386, lug. 2023, doi: 10.3233/JAD-220809.
- [94] S. S. Kang *et al.*, «Tau modification by the norepinephrine metabolite DOPEGAL stimulates its pathology and propagation», *Nat Struct Mol Biol*, vol. 29, fasc. 4, pp. 292–305, apr. 2022, doi: 10.1038/s41594-022-00745-3.
- [95] N. A. Jackson, M. J. Guerrero-Muñoz, e D. L. Castillo-Carranza, «The prion-like transmission of tau oligomers via exosomes», *Front. Aging Neurosci.*, vol. 14, p. 974414, ago. 2022, doi: 10.3389/fnagi.2022.974414.
- [96] Y. Zhao, Y. Gu, Q. Zhang, H. Liu, e Y. Liu, «The Potential Roles of Exosomes Carrying APP and Tau Cleavage Products in Alzheimer's Disease», *JCM*, vol. 12, fasc. 5, p. 1883, feb. 2023, doi: 10.3390/jcm12051883.
- [97] V. Papaliagkas, K. Kalinderi, P. Varelziz, D. Moraitou, T. Papamitsou, e M. Chatzidimitriou, «CSF Biomarkers in the Early Diagnosis of Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease», *IJMS*, vol. 24, fasc. 10, p. 8976, mag 2023, doi: 10.3390/ijms24108976.
- [98] FDA-NIH Biomarker Working Group, *BEST (Biomarkers, EndpointS, and other Tools) Resource*. Silver Spring (MD): Food and Drug Administration (US), 2016. Consultato: 29 febbraio 2024. [Online]. Disponibile su: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK326791/>
- [99] J. S. Generoso, R. Morales, e T. Barichello, «Biomarkers in Alzheimer disease: are we there yet?», *Braz. J. Psiquiatria*, vol. 42, fasc. 4, pp. 337–339, ago. 2020, doi: 10.1590/1516-4446-2020-0013.
- [100] C. Delaby, C. Hirtz, e S. Lehmann, «Overview of the blood biomarkers in Alzheimer's disease: Promises and challenges», *Revue Neurologique*, vol. 179, fasc. 3, pp. 161–172, mar. 2023, doi: 10.1016/j.neurol.2022.09.003.
- [101] N. J. Ashton *et al.*, «Cerebrospinal fluid p-tau231 as an early indicator of emerging pathology in Alzheimer's disease», *EBioMedicine*, vol. 76, 2022.
- [102] G. B. Frisoni *et al.*, «European intersocietal recommendations for the biomarker-based diagnosis of neurocognitive disorders», *The Lancet Neurology*, vol. 23, fasc. 3, pp. 302–312, mar. 2024, doi: 10.1016/S1474-4422(23)00447-7.
- [103] C. Jie, V. Treyer, R. Schibli, e L. Mu, «Tauvid™: The First FDA-Approved PET Tracer for Imaging Tau Pathology in Alzheimer's Disease», *Pharmaceuticals*, vol. 14, fasc. 2, p. 110, gen. 2021, doi: 10.3390/ph14020110.
- [104] J. Simrén *et al.*, «The diagnostic and prognostic capabilities of plasma biomarkers in Alzheimer's disease», *Alzheimer's & Dementia*, vol. 17, fasc. 7, pp. 1145–1156, lug. 2021, doi: 10.1002/alz.12283.
- [105] S. Janelidze *et al.*, «Plasma P-tau181 in Alzheimer's disease: relationship to other biomarkers, differential diagnosis, neuropathology and longitudinal progression to Alzheimer's dementia», *Nat Med*, vol. 26, fasc. 3, pp. 379–386, mar. 2020, doi: 10.1038/s41591-020-0755-1.
- [106] N. J. Ashton *et al.*, «Diagnostic Accuracy of a Plasma Phosphorylated Tau 217 Immunoassay for Alzheimer Disease Pathology», *JAMA Neurol*, gen. 2024, doi: 10.1001/jamaneurol.2023.5319.
- [107] S. Nazir, «Salivary biomarkers: The early diagnosis of Alzheimer's disease», *Aging Medicine*, p. agm2.12282, feb. 2024, doi: 10.1002/agm2.12282.
- [108] The Lancet Neurology, «Dementia diagnosis in the anti-amyloid era», *The Lancet Neurology*, vol. 23, fasc. 3, p. 219, mar. 2024, doi: 10.1016/S1474-4422(24)00041-3.
- [109] I. Vecchio, L. Sorrentino, A. Paoletti, R. Marra, e M. Arbitrio, «The State of The Art on Acetylcholinesterase Inhibitors in the Treatment of Alzheimer's Disease», *J Cent Nerv Syst Dis*, vol. 13, p. 117957352110291, gen. 2021, doi: 10.1177/11795735211029113.

- [110] G. Marucci, M. Buccioni, D. D. Ben, C. Lambertucci, R. Volpini, e F. Amenta, «Efficacy of acetylcholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease», *Neuropharmacology*, vol. 190, p. 108352, 2021, doi: <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2020.108352>.
- [111] C. Pathak e U. D. Kabra, «A comprehensive review of multi-target directed ligands in the treatment of Alzheimer's disease», *Bioorganic Chemistry*, vol. 144, p. 107152, mar. 2024, doi: [10.1016/j.bioorg.2024.107152](https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2024.107152).
- [112] G. Mylan, «FOGLIO ILLUSTRATIVO: INFORMAZIONI PER L'UTILIZZATORE».
- [113] G. Marotta, F. Basagni, M. Rosini, e A. Minarini, «Memantine Derivatives as Multitarget Agents in Alzheimer's Disease», *Molecules*, vol. 25, fasc. 17, p. 4005, set. 2020, doi: [10.3390/molecules25174005](https://doi.org/10.3390/molecules25174005).
- [114] P. K. Tari, C. G. Parsons, G. L. Collingridge, e G. Rammes, «Memantine: Updating a rare success story in pro-cognitive therapeutics», *Neuropharmacology*, vol. 244, p. 109737, 2024, doi: <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2023.109737>.
- [115] A. Gholami, «Alzheimer's disease: The role of proteins in formation, mechanisms, and new therapeutic approaches», *Neuroscience Letters*, vol. 817, p. 137532, 2023, doi: <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2023.137532>.
- [116] L. Gao, Y. Zhang, K. Sterling, e W. Song, «Brain-derived neurotrophic factor in Alzheimer's disease and its pharmaceutical potential», *Transl Neurodegener*, vol. 11, fasc. 1, p. 4, gen. 2022, doi: [10.1186/s40035-022-00279-0](https://doi.org/10.1186/s40035-022-00279-0).
- [117] D. Svob Strac *et al.*, «Personalizing the Care and Treatment of Alzheimer's Disease: An Overview», *PGPM*, vol. Volume 14, pp. 631–653, mag. 2021, doi: [10.2147/PGPM.S284615](https://doi.org/10.2147/PGPM.S284615).
- [118] «PdfdownloadServlet.pdf». Consultato: 7 marzo 2024. [Online]. Disponibile su: https://farmaci.agenziafarmaco.gov.it/aifa/servlet/PdfDownloadServlet?pdfFileName=footer_002322_038188_RCPpdf&sys=m0b1l3
- [119] «FDA Approves Brexpiprazole as First Therapy for Alzheimer Agitation», *Neurology live*. Consultato: 7 marzo 2024. [Online]. Disponibile su: <https://www.neurologylive.com/view/fda-approves-brexipiprazole-first-therapy-for-alzheimer-agitation>
- [120] A. S. Correia e N. Vale, «Antidepressants in Alzheimer's Disease: A Focus on the Role of Mirtazapine», *Pharmaceuticals*, vol. 14, fasc. 9, p. 930, set. 2021, doi: [10.3390/ph14090930](https://doi.org/10.3390/ph14090930).
- [121] F. Ahmad *et al.*, «Evolving therapeutic interventions for the management and treatment of Alzheimer's disease», *Ageing Research Reviews*, vol. 95, p. 102229, 2024, doi: <https://doi.org/10.1016/j.arr.2024.102229>.
- [122] T. Khan *et al.*, «Recent advancement in therapeutic strategies for Alzheimer's disease: Insights from clinical trials», *Ageing Research Reviews*, vol. 92, p. 102113, 2023, doi: <https://doi.org/10.1016/j.arr.2023.102113>.
- [123] C. M. T. Parrocha e J. S. Nowick, «Current peptide vaccine and immunotherapy approaches against Alzheimer's disease», *Peptide Science*, vol. 115, fasc. 1, p. e24289, gen. 2023, doi: [10.1002/pep2.24289](https://doi.org/10.1002/pep2.24289).
- [124] K. Suzuki, A. Iwata, e T. Iwatsubo, «The past, present, and future of disease-modifying therapies for Alzheimer's disease», *Proceedings of the Japan Academy. Ser. B: Physical and Biological Sciences*, vol. 93, fasc. 10, pp. 757–771, 2017, doi: [10.2183/pjab.93.048](https://doi.org/10.2183/pjab.93.048).
- [125] J. Cummings, A. M. L. Osse, D. Cammann, J. Powell, e J. Chen, «Anti-Amyloid Monoclonal Antibodies for the Treatment of Alzheimer's Disease», *BioDrugs*, vol. 38, fasc. 1, pp. 5–22, gen. 2024, doi: [10.1007/s40259-023-00633-2](https://doi.org/10.1007/s40259-023-00633-2).
- [126] K. W. Park, «Anti-amyloid Antibody Therapies for Alzheimer's Disease», *Nucl Med Mol Imaging*, feb. 2024, doi: [10.1007/s13139-024-00848-3](https://doi.org/10.1007/s13139-024-00848-3).
- [127] A. Varadharajan *et al.*, «Guidelines for pharmacotherapy in Alzheimer's disease – A primer on FDA-approved drugs», *JNRP*, vol. 14, pp. 566–573, ott. 2023, doi: [10.25259/JNRP_356_2023](https://doi.org/10.25259/JNRP_356_2023).
- [128] X. Guo, L. Yan, D. Zhang, e Y. Zhao, «Passive immunotherapy for Alzheimer's disease», *Ageing Research Reviews*, vol. 94, p. 102192, feb. 2024, doi: [10.1016/j.arr.2024.102192](https://doi.org/10.1016/j.arr.2024.102192).
- [129] C. Lane-Donovan e A. L. Boxer, «Disentangling tau: One protein, many therapeutic approaches», *Neurotherapeutics*, p. e00321, 2024, doi: <https://doi.org/10.1016/j.neurot.2024.e00321>.
- [130] Z. Cheng *et al.*, «Targeting glycogen synthase kinase-3 β for Alzheimer's disease: Recent advances and future Prospects», *European Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 265, p. 116065, 2024, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2023.116065>.
- [131] S. Guilliot, E. N. Wilson, J. Touchon, e M. E. Soto, «Nanolithium, a New Treatment Approach to Alzheimer's Disease: A Review of Existing Evidence and Clinical Perspectives», *J Prev Alz Dis*, 2024, doi: [10.14283/jpad.2024.26](https://doi.org/10.14283/jpad.2024.26).
- [132] Y. Liu *et al.*, «Customized Intranasal Hydrogel Delivering Methylene Blue Ameliorates Cognitive Dysfunction against Alzheimer's Disease», *Advanced Materials*, p. 2307081, mar. 2024, doi: [10.1002/adma.202307081](https://doi.org/10.1002/adma.202307081).
- [133] C. J. Mummery *et al.*, «Tau-targeting antisense oligonucleotide MAPTRx in mild Alzheimer's disease: a phase 1b, randomized, placebo-controlled trial», *Nat Med*, vol. 29, fasc. 6, pp. 1437–1447, giu. 2023, doi: [10.1038/s41591-023-02326-3](https://doi.org/10.1038/s41591-023-02326-3).
- [134] «AC Immune's Targeted Anti-pTau Active Immunotherapy for Alzheimer's Disease Advances into Phase 2b Trial | AC Immune SA». Consultato: 12 marzo 2024. [Online]. Disponibile su: <https://ir.acimmune.com/news-releases/news-release-details/ac-immunes-targeted-anti-ptau-active-immunotherapy-alzheimers>
- [135] K. Iqbal, «Tau and Alzheimer's disease: Past, present and future», *Cytoskeleton*, vol. 81, fasc. 1, pp. 116–121, gen. 2024, doi: [10.1002/cm.21822](https://doi.org/10.1002/cm.21822).
- [136] J. Jia *et al.*, «Biomarker Changes during 20 Years Preceding Alzheimer's Disease», *N Engl J Med*, vol. 390, fasc. 8, pp. 712–722, feb. 2024, doi: [10.1056/NEJMoa2310168](https://doi.org/10.1056/NEJMoa2310168).

RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare la mia relatrice, Prof.ssa Garavaglia, per la disponibilità e per il supporto alla stesura di questa tesi. Ringrazio i miei genitori, a cui devo tutto. Siete la mia vita, la mia forza. Senza il vostro supporto non sarei andata via di casa così lontano, non avrei affrontato le difficoltà che ho incontrato stando qui, lontano dalla mia città, ma soprattutto lontano da voi. Mamma, la mia confidente, la mia amica. Tu sei l'unica persona che conosce ogni mia preoccupazione e desiderio prima ancora che io li esprima. Ci sei sempre stata, ogni volta che ero triste mi bastava chiamarti e sentire la tua voce che mi assicurava che noi insieme, in ogni caso, ce l'avremmo fatta. Papà, tu mi hai sempre detto, sin dall'inizio, che ciò che contava veramente era la mia felicità e tranquillità, non il tempo impiegato per completare gli studi. Ogni problema che avevo tu, da lontano, lo affrontavi nell'immediato insieme a me, anzi, prima di me. Sin da subito siete entrati nella mia realtà universitaria e avete cercato di agevolarmi e aiutarmi in qualsiasi cosa, dalla mia prima stanza in affitto, all'automobile che mi avete portato. La vostra costante fiducia nelle mie capacità mi ha dato la determinazione necessaria per arrivare fin qui. Desidero ringraziare mio fratello Giovanni che mi è sempre stato accanto, dimostrandomi il suo affetto in modo speciale, proprio come solo un fratello sa fare. Grazie alla mia super nonna Teresa, che era a conoscenza di ciò che mi accadeva prima di qualsiasi altra persona e che mi dimostrava la sua vicinanza chiamandomi ogni giorno. Grazie nonno Cosimo, la mia fonte di saggezza e di amore incondizionato che da sempre mi incoraggia a seguire i miei sogni. Un ringraziamento speciale va a Ilario, il mio ragazzo. Sono grata di aver condiviso questo viaggio con te. Siamo arrivati qui insieme e abbiamo affrontato qualsiasi cosa, mano nella mano. Ricordo ancora il primo giorno e quanto ci sentivamo persi, ma poi, da quel momento, ci siamo fatti forza l'un l'altro. La tua presenza nella mia vita rappresenta un dono prezioso per me. Grazie per essere stato sempre al mio fianco e per avermi dimostrato il tuo amore e il tuo sostegno ogni giorno. Desidero ringraziare di cuore i miei amici, Salvatore e Alessandro, parte integrante del mio percorso universitario. Le nostre risate e tutti i momenti condivisi hanno aggiunto leggerezza alla mia vita. Vi porterò sempre con me nei miei ricordi più preziosi. Infine, grazie a tutte le persone che sono qui oggi a celebrare questo giorno così importante per me.