



Università del Piemonte Orientale

“A. Avogadro”

Dipartimento di Scienze e Innovazione Tecnologica

Corso di Laurea Magistrale in Biologia

TESI DI LAUREA

“Il morbo di Alzheimer: studio delle correlazioni tra le concentrazioni plasmatiche e liquorali dei biomarcatori”

Candidata: Stefania Trombin

Relatrice: Prof.ssa Anna Aspesi

Stage svolto presso “Città della Salute e della Scienza” di Torino

Co-relatore: Dott. Giulio Mengozzi

Anno Accademico 2023/2024

INDICE

1. INTRODUZIONE

1.1 Il morbo di Alzheimer

1.2 La patogenesi della malattia

1.3 La genetica della malattia

1.4 Le fasi della malattia

1.5 I fluidi di indagine

1.6 I biomarcatori della malattia

1.7 La diagnosi della malattia

1.8 Il trattamento della malattia

2. SCOPO DEL LAVORO

3. MATERIALI E METODI

3.1 La popolazione in studio

3.2 Lo strumento analitico

3.3 La tecnica analitica

3.4 L'analisi statistica

4. RISULTATI

5. DISCUSSIONE

6. CONCLUSIONI

7. BIBLIOGRAFIA

8. RINGRAZIAMENTI

1. INTRODUZIONE

1.1 Il morbo di Alzheimer

Il morbo di Alzheimer (MA) è una patologia neurodegenerativa irreversibile e progressiva caratterizzata istologicamente dalla deposizione all'interno del tessuto cerebrale di proteine con struttura tridimensionale alterata, che generano placche amiloidi extracellulari e grovigli neurofibrillari intracellulari [1]. La malattia rappresenta il 50-70% di tutte le forme di demenza, definita come significativo deterioramento acquisito in uno oppure diversi domini cognitivi che gradualmente interferisce con le attività del vivere quotidiano [2]. In tale caso le difficoltà di apprendimento ed il deficit della memoria non sono pertanto correlati al normale processo di invecchiamento, ma sono dovuti ad un processo patologico. I neuroni colpiti dalle alterazioni sia istologiche che funzionali sono localizzati in diverse aree del cervello come la corteccia cerebrale (importante nel pensiero e nel linguaggio), i gangli della base (molti neuroni contengono il neurotrasmettitore acetilcolina) e l'ippocampo (importante nel mantenimento della memoria). Le stime prognostiche dell'Alzheimer's Disease International (ADI) indicano che il numero dei pazienti raddoppierà nei prossimi 20 anni, determinando inevitabilmente lo sviluppo di una crisi sociale significativa e di un piano di gestione globale della demenza [3]. Tuttavia all'aumento dell'incidenza dell'Alzheimer non si associano dei progressi nei metodi diagnostici o nelle opzioni terapeutiche efficaci, ed i trattamenti disponibili aiutano solamente ad alleviare la sintomatologia.

1.2 La patogenesi della malattia

Il morbo di Alzheimer è una sindrome amnesica di tipo ippocampale caratterizzata da cambiamenti biochimici, fisiologici ed anatomici che possono essere identificati molti anni prima della comparsa di sindromi cognitivo-comportamentali clinicamente evidenti [4]. Il MA deriva da un significativo danno strutturale e funzionale del sistema nervoso centrale, determinato da due distinte lesioni istologiche: le placche amiloidi ed i grovigli neurofibrillari. La formazione amiloide ha inizio nella neocorteccia ed evolve nell'ippocampo, nei nuclei sottocorticali ed infine nel cervelletto [5]. Le placche amiloidi hanno origine dall'aggregazione e dall'accumulo anomalo del peptide

β -amiloide o $A\beta$ nell'ambiente extracellulare. Il peptide $A\beta$ è prodotto attraverso la via amiloidogena che segue la sequenziale scissione proteolitica della proteina precursore dell'amiloide (APP) da parte delle β - e γ -secretasi [6]. La proteina precursore dell'amiloide è un membro di una famiglia di proteine transmembrana correlate che include le proteine simili al precursore dell'amiloide (APLP1 ed APLP2) nei mammiferi e la proteina simile al precursore dell'amiloide (APPL) nella *Drosophila* [7]. L'APP, prodotta in grandi quantità nei neuroni e metabolizzata molto rapidamente, è smistata nel reticolo endoplasmatico e nel Golgi al fine di arrivare mediante trasporto assonale veloce ai terminali sinaptici [8]. In condizioni fisiologiche e seguendo la via non amiloidogena, l'APP viene metabolizzata dall' α -secretasi; si ottiene così il frammento (s)APP α , che rimane nello spazio extracellulare, ed il frammento carbossi-terminale di 83 amminoacidi (C83) che rimane attaccato alla membrana plasmatica. In condizioni neuropatologiche e seguendo la via amiloidogena, l'APP viene metabolizzata dalla BACE1 (β -secretasi 1) che taglia nella regione N-terminale e dalla γ -secretasi che taglia dal versante C-terminale; si producono così i frammenti (s)APP β ed $A\beta_{40/42}$, che rimangono nello spazio extracellulare, ed il frammento carbossi-terminale di 99 amminoacidi (C99) che può essere trasportato all'interno della cellula e traslocato nel nucleo [9-12]. Il clivaggio differenziale da parte della γ -secretasi produce diversi peptidi $A\beta$: la $A\beta_{1-40}$ è la normale isoforma solubile mentre la $A\beta_{1-42}$ è il peptide che si aggrega e che si deposita inizialmente nella formazione delle placche amiloidogene [13] (Figura 1). Le placche amiloidi intaccano il sistema limbico e la corteccia associativa esercitando degli effetti tossici sulle sinapsi neuronali, e successivamente la risposta gliale e l'attivazione degli astrociti e/o della microglia, inducendo sia il rilascio di citochine o di componenti del sistema del complemento che l'avvio delle risposte infiammatorie. Inoltre, l'omeostasi degli ioni calcio viene interrotta determinando l'iperattivazione delle proteine chinasi e l'inattivazione delle proteine fosfatasi [14]. Molti ricercatori ritengono che il primo evento patologico nel MA sia l'accumulo di $A\beta$ [15,16]. Le placche amiloidi sono state studiate in modo approfondito ma a causa della loro insolubilità, i tentativi di identificarne la composizione sono falliti fino alla metà degli anni '80 [17]. Inizialmente si credeva che l' $A\beta$ fosse una proteina anomala ma la sua presenza nel terreno di coltura, nel liquido cerebrospinale e nel plasma ha rivelato che l' $A\beta$ è un prodotto normale del metabolismo della proteina precursore dell'amiloide

[16]. Questa osservazione ha portato all'ipotesi della cascata amiloide, secondo cui una disregolazione nella produzione e nella clearance di A β nel cervello determina l'accumulo di A β in oligomeri, protofibrille e fibrille mature [18], con evoluzione finale nella neurodegenerazione e nella demenza. Di conseguenza, si è ipotizzato che tutte le altre caratteristiche della malattia, come la formazione dei grovigli neurofibrillari dalla tau iperfosforilata, siano il risultato di questo accumulo [19].

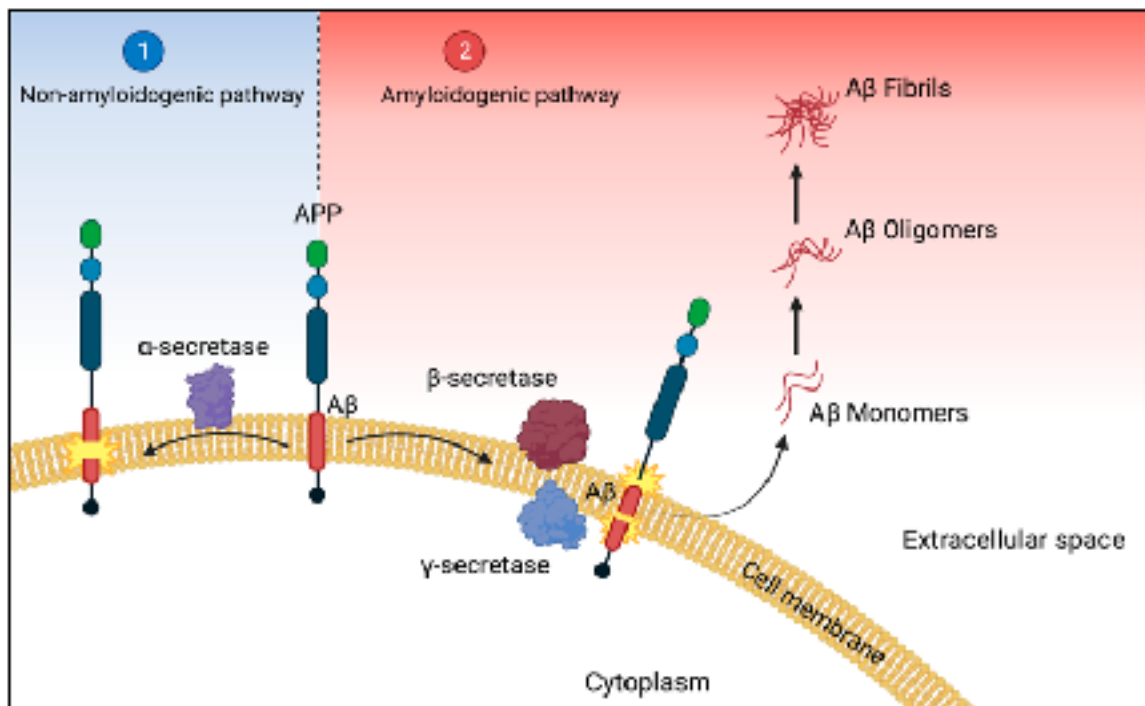


Figura 1: La formazione delle placche amiloidi. In condizioni fisiologiche la proteina precursore dell'amiloide APP viene metabolizzata dall' α -secretasi producendo il frammento (s)APP α . In condizioni neuropatologiche l'APP viene metabolizzata dalla β -secretasi 1 e dalla γ -secretasi producendo i frammenti (s)APP β ed A β 40/42. (Alzheimer's Disease: A Brief History of Immunotherapies Targeting Amyloid β , Int. J. Mol. Sci. 2023)

La formazione neurofibrillare inizia nella parte interna del lobo temporale ed evolve nella parte esterna, prima di diffondersi alle aree associative corticali posteriori ed all'intera corteccia [20]. I grovigli neurofibrillari hanno origine dall'iperfosforilazione e dalla conformazione anomala in coppie di filamenti elicoidali delle proteine tau nel mezzo intracellulare. La proteina tau è presente nel cervello umano in sei isoforme derivanti dallo splicing alternativo degli esoni 2, 3 e 10 del gene *MAPT*. Questo processo sembra essere di particolare interesse nello splicing dell'esone 10, che determina la presenza di isoforme tau contenenti 3- (3R) o 4-ripetizioni (4R) di una

sequenza di circa 32 amminoacidi nel dominio di legame dei microtubuli (MBD) [21]. Inoltre, lo splicing degli esoni 2 e 3 determina la presenza di isoforme tau contenenti 0- (0N), 1- (1N) o 2-inseriti (2N) quasi ammino-terminali di 29 amminoacidi [22]. Le ripetizioni R e N sono capaci di legare i microtubuli mentre le regioni fiancheggianti sono in grado di legare diverse proteine [23,24]; la regione MBD contiene la maggior parte dei residui accettori di fosfato, necessari alla regolazione sia della struttura che della funzione della proteina tau [25]. In condizioni fisiologiche la proteina tau corrisponde ad una proteina filamentosa a doppia elica coinvolta nella polimerizzazione e nella stabilizzazione dei microtubuli [26]. In questa situazione sono presenti due fosfati per molecola di tau [27]. In condizioni neuropatologiche l'iperfosforilazione attivata dall'abbondanza di A β nell'ambiente induce la deposizione della proteina tau nel citosol, che non riesce pi \dot{u} a legare i microtubuli, con conseguente aggregazione e formazione dei grovigli neurofibrillari. Inoltre, questo deposito compromette le normali funzioni cellulari come la trasmissione sinaptica, il trasporto assonale e la trasduzione del segnale [28]. In questo caso sono presenti otto fosfati per molecola di tau [29] (Figura 2). Alcuni ricercatori ritengono che il primo evento patologico nel MA sia l'accumulo di tau, dato che la deposizione delle placche amiloidi non si correla in maniera adeguata con la perdita dei neuroni [30]. Tuttavia, non esiste un consenso sul fatto che l'iperfosforilazione della proteina tau preceda oppure sia causata dalla formazione di aggregati anormali [31]. Un supporto all'ipotesi tau deriva anche dall'esistenza di altre malattie note con il nome di tauopatie, in cui la proteina stessa \grave{e} erroneamente ripiegata [32]. Sebbene la sequenza degli eventi non sia chiara, la presenza sia delle placche amiloidi che dei grovigli neurofibrillari accelera senza dubbio i processi neurodegenerativi legati al MA.

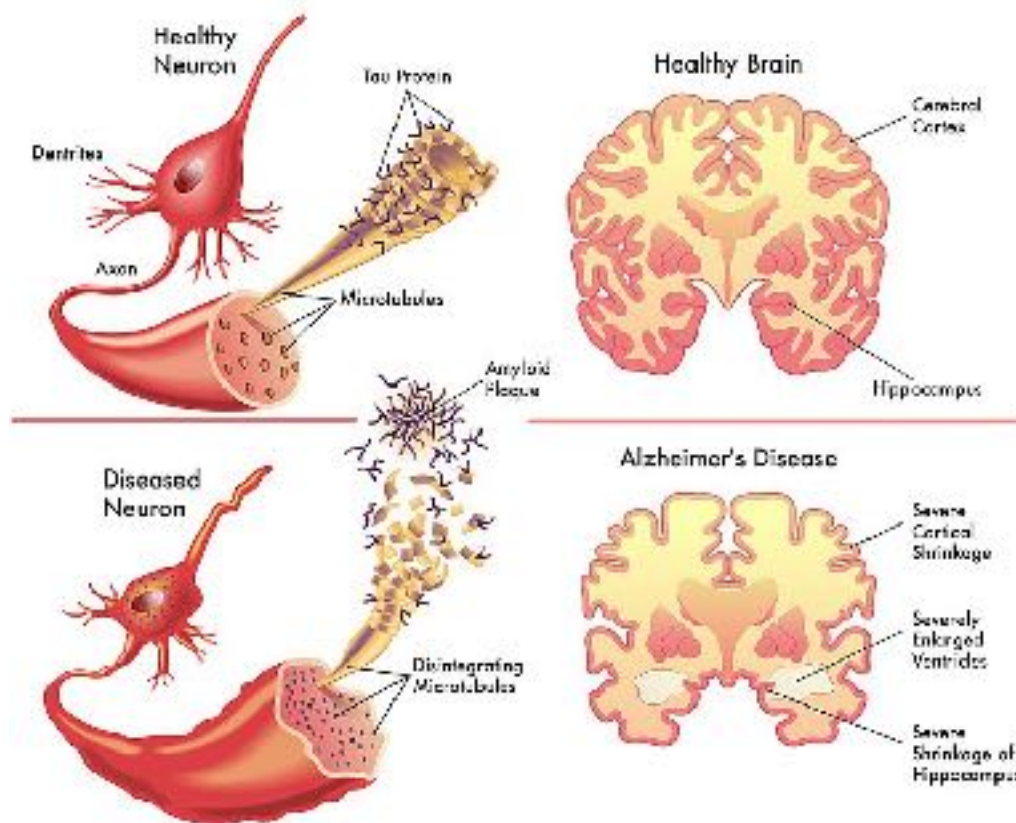


Figura 2: La formazione dei grovigli neurofibrillari. In condizioni fisiologiche la proteina tau corrisponde ad una proteina filamentosa a doppia elica coinvolta nella polimerizzazione e nella stabilizzazione dei microtubuli. In condizioni neuropatologiche l'iperfosforilazione attivata dall'abbondanza di $A\beta$ nell'ambiente induce la deposizione della proteina tau nel citosol. (Circa la metà dei casi di Alzheimer sono miti, un quinto sono gravi, associazione alzheimer odv, 2021)

1.3 La genetica della malattia

Il MA è stato riconosciuto come un gruppo eterogeneo e poligenico di disturbi neurodegenerativi sia ereditari che sporadici, con delle comuni alterazioni neuropatologiche sottostanti. In base all'età di insorgenza dei primi sintomi si identifica una forma ad esordio precoce che colpisce gli individui di età inferiore ai 65 anni, rappresentando circa il 4-6% dei casi, ed una forma ad esordio tardivo che colpisce gli individui di età pari o superiore ai 65 anni [33]. Generalmente le forme ad esordio precoce sono genetiche mentre le forme ad esordio tardivo sono sporadiche. L'eziologia del MA è determinata da fattori di rischio genetici ed ambientali multifattoriali, classificati come fattori non modificabili e fattori modificabili [34]. Circa il 70% del rischio di sviluppare il MA può essere attribuito alla predisposizione genetica. La forma precoce è determinata da una mutazione nei geni *APP*,

PSEN1 e *PSEN2* (geni della proteina precursore dell'amiloide, della presenilina 1 e della presenilina 2) mentre la forma tardiva è principalmente associata ad un polimorfismo nel gene *APOE* (gene dell'apolipoproteina E) localizzato sul cromosoma 19 [35,36]. L'apolipoproteina E (ApoE) è una proteina coinvolta nel metabolismo dei lipidi, compreso il colesterolo, nei tessuti periferici e nel sistema nervoso centrale. Il suo ruolo nel trasporto del colesterolo da parte degli astrociti assicura la consegna dei lipidi ai neuroni e l'omeostasi della membrana, processo critico nella riparazione sia dei neuroni che delle lesioni cerebrali. L'ApoE è presente nella popolazione in tre alleli $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ ed $\epsilon 4$ caratterizzati da una frequenza diversa. L'allele $\epsilon 4$ è il principale fattore di rischio, caratterizzato da un'alta probabilità di evoluzione in MA ed associato ad alterazioni nei meccanismi sia neurotossici che neuroprotettivi [37] (Figura 3). Numerosi studi hanno dimostrato che l'allele $\epsilon 4$ aumenta il rischio di sviluppare il MA di 12 volte in omozigosi e di 3 volte in eterozigosi, l'allele $\epsilon 2$ lo riduce mentre l'allele $\epsilon 3$ non ha alcun effetto [38,39]. Tuttavia alcuni portatori dell'allele $\epsilon 4$ non hanno mai manifestato la patologia, sottolineando che anche altri fattori non ancora identificati possano essere coinvolti nello sviluppo della malattia [40]. Le cause di questa associazione non sono ancora del tutto chiare, tuttavia indicano una possibile interazione tra l'ApoE ed il peptide A β . L'isoforma ApoE $\epsilon 4$ si associa all'A β promuovendone la polimerizzazione e la deposizione mentre le isoforme ApoE $\epsilon 2$ e ApoE $\epsilon 3$ si associano all'A β inducendone la clearance [41]. Il rischio di sviluppare il MA correlato al gene *APOE* può essere influenzato da molti fattori come l'etnia, il genere, l'invecchiamento, la dieta e l'ambiente, che esercitano la loro influenza tramite dei meccanismi distinti che prevedono la regolazione della trascrizione oppure dell'espressione del gene e l'alterazione del metabolismo dei lipidi.

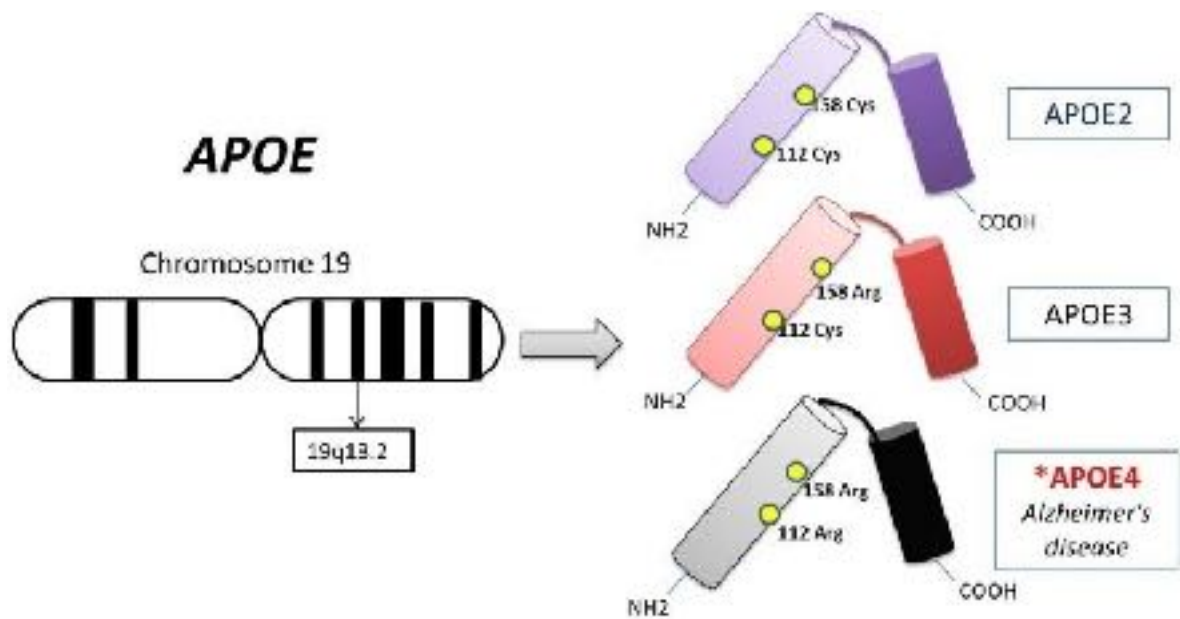


Figura 3: Il gene APOE e le sue varianti alleliche. L'allele $\epsilon 4$ è il principale fattore di rischio, caratterizzato da un'alta probabilità di evoluzione in MA ed associato ad alterazioni nei meccanismi sia neurotossici che neuroprotettivi. (Neutralizzato il gene più importante responsabile del morbo di Alzheimer, DOTTOR SALUTE, 2023)

La frequenza degli alleli cambia in maniera significativa tra le diverse etnie. Generalmente la frequenza dell'allele $\epsilon 2$ è relativamente costante, il che determina la correlazione negativa degli alleli $\epsilon 3$ ed $\epsilon 4$ [42]. L'allele $\epsilon 4$ mostra una percentuale maggiore in Africa centrale (40%), in Oceania (37%) ed in Australia (26%) mentre una percentuale variabile dal 10% al 25% in Europa ed in Asia [43]. È stato dimostrato che le donne soffrono di una maggiore incidenza di MA, soprattutto nel gruppo di età più anziano (> 75 anni). Il meccanismo alla base rimane poco chiaro, tuttavia sia gli studi clinici che gli studi sugli animali hanno fornito una possibile spiegazione: è diventato gradualmente chiaro che anche la variazione dei livelli di tau nel liquido cerebrospinale dei pazienti dipende dal sesso [44]. L'invecchiamento è uno dei fattori di rischio più consolidati e cruciali. L'incidenza annuale del MA cresce gradualmente dallo 0,6% nelle persone di età compresa tra 65 e 69 anni, al 3,3% nelle persone di età compresa tra 80 e 84 anni e ad una percentuale ancora più elevata nelle persone di età pari o superiore a 85 anni [45]. Durante l'invecchiamento la struttura del cervello cambia nella fluidità e nella composizione lipidica della membrana, nel volume cerebrale regionale, nella densità, nello spessore corticale e nella microstruttura della

materia; si assiste ad una progressiva perdita delle sinapsi, con conseguente diminuzione della densità neuronale. Il rischio di MA dipendente dall'età e correlato all'ApoEε4 può essere parzialmente spiegato dalla deposizione accelerata di Aβ-42 nei portatori dell'allele ε4, in particolare nel gruppo di età 45-49 anni [46]. Dato che attualmente nessun farmaco può fermare o invertire la progressione del MA, numerosi studi hanno cercato di scoprire l'esatto ruolo della dieta nel decorso della malattia. Diversi nutrienti, generalmente riconosciuti come necessari per lo sviluppo e la rigenerazione del cervello, sono stati presi in considerazione per primi nella ricerca dei modificatori della malattia. La vitamina B6, la vitamina B9, la vitamina B12 e la vitamina D esercitano un'azione protettiva contro il declino cognitivo [47-49]. Inoltre, una dieta con un maggiore apporto di pesce, acidi grassi omega-3 o acido docosaesaenoico (componente principale degli acidi grassi omega-3) determina un minore rischio di sviluppare il MA [50]. I dati epidemiologici sottolineano come l'ambiente modelli distintamente la distribuzione dei polimorfismi APOE; la maggior parte degli studi ha infatti riportato una correlazione tra l'altitudine, la latitudine e la gravità del deterioramento cognitivo. Le popolazioni che vivono ad alta quota mostrano una velocità di elaborazione più lenta ed un'attenzione ridotta, indipendentemente dall'età e dalla discendenza [51]. Inoltre, le popolazioni che vivono in zone settentrionali, meno esposte alla luce UV ed alla temperatura, mostrano una frequenza più elevata dell'isoforma ApoEε4 [52] (Figura 4).

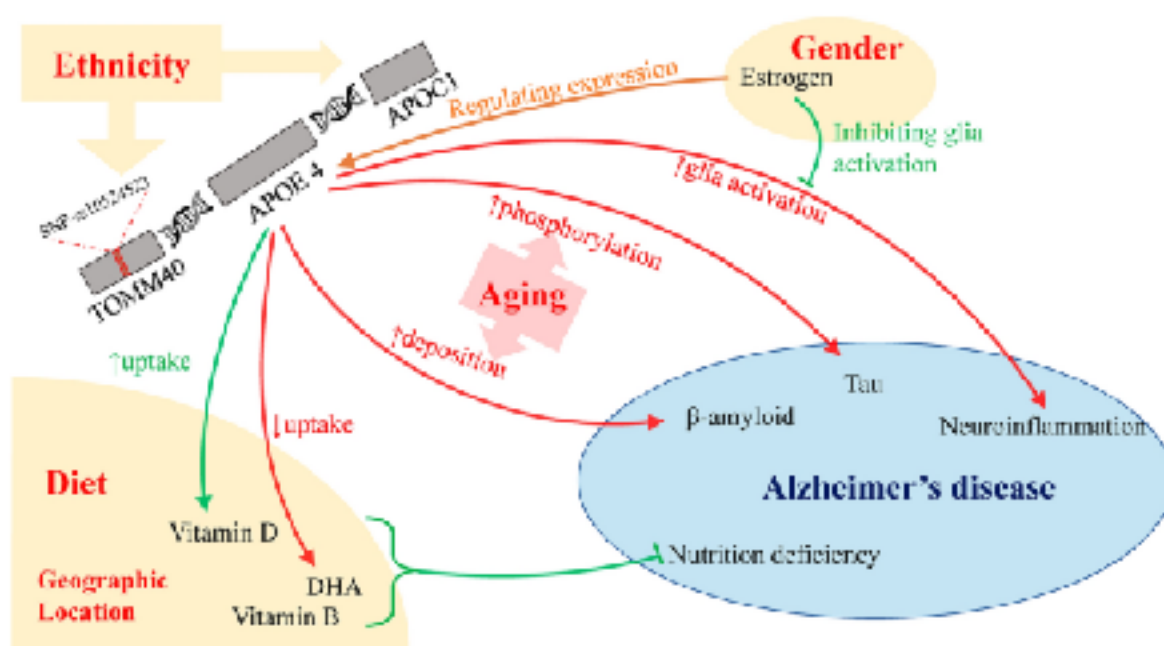


Figura 4: I fattori che influenzano il gene APOE. (Factors Influencing Alzheimer's Disease Risk: Whether and How They are Related to the APOE Genotype, SPRINGER LINK, 2022)

1.4 Le fasi della malattia

Il MA determina la morte delle cellule nervose e la perdita del tessuto cerebrale, con conseguente diminuzione del volume del cervello e compromissione delle sue funzioni. In particolare, la corteccia si accartocchia danneggiando le aree coinvolte nel pensiero, nella pianificazione e nel ricordo. L'ippocampo, un'area della corteccia fondamentale nella formazione dei nuovi ricordi, diminuisce notevolmente le sue dimensioni mentre i ventricoli, gli spazi del cervello contenenti il liquido cefalorachidiano, diventano più ampi (Figura 5). Bisogna sottolineare che le placche amiloidi ed i grovigli neurofibrillari diffondono secondo uno schema prevedibile durante tutta l'evoluzione del MA [54]. Il decorso della malattia è unico per ogni individuo ed è suddiviso in quattro fasi, nelle quali si verifica un progressivo deterioramento sia cognitivo che funzionale: la fase iniziale, la fase intermedia, la fase severa e la fase terminale. Questa suddivisione ha il solo scopo di orientare chi si occupa del malato rispetto alle caratteristiche evolutive del MA, al fine di consentirgli un'adeguata pianificazione dell'assistenza ed una maggiore consapevolezza degli eventi [54]. Inizialmente le placche amiloidi ed i grovigli neurofibrillari si formano nelle aree del cervello responsabili sia dell'apprendimento e della memoria che del pensiero e della pianificazione [53]. La fase iniziale ha una durata media di 2-4 anni ed è caratterizzata principalmente da un deficit della memoria anterograda, con conseguente difficoltà nella rievocazione e nell'apprendimento degli eventi più recenti. La mancata espressione di frasi adeguate e l'utilizzo di pause frequenti dovute all'incapacità di "trovare la parola giusta" sono i principali disturbi del linguaggio. L'incapacità nel seguire i percorsi abituali e la difficoltà nel ricordare la data oppure l'orario derivano invece dal possibile disorientamento topografico e temporale. La perdita progressiva delle abilità cognitive interferisce con il normale svolgimento delle attività quotidiane. La persona malata è consapevole delle proprie difficoltà e dei propri fallimenti, pertanto la sintomatologia psico-comportamentale è caratterizzata soprattutto da una deflessione del tono dell'umore. Il malato potrebbe ridurre le interazioni sociali oppure reagire con delle manifestazioni aggressive ed ansiose [54]. Successivamente le regioni deputate alla memoria, al pensiero ed alla pianificazione sviluppano più placche e più grovigli rispetto alla prima fase. Inoltre, i depositi si formano anche nelle aree del cervello responsabili sia del linguaggio e della

comprensione che del senso di posizione del corpo rispetto agli oggetti circostanti [53]. La fase intermedia ha una durata media di 2-10 anni ed è caratterizzata da un aggravamento dei sintomi della fase precedente. Il malato fatica sempre di più nel ricordare gli eventi più recenti ed i nomi dei familiari, nell'esprimersi in modo comprensibile e nel capire ciò che gli si dice, nell'orientarsi all'interno del contesto familiare, e nel ricordare il periodo in cui sta vivendo. Inoltre, i cambiamenti dell'umore e del comportamento diventano particolarmente rilevanti, rappresentando una strategia individuale per adattarsi oppure per affrontare le conseguenze della demenza [55-57]. In questa fase, la più difficile da sopportare sia per la durata che per le difficoltà, aumenta la necessità di supervisione e di assistenza del paziente [54]. Nell'ultima fase la corteccia è gravemente danneggiata ed il volume del cervello diminuisce drasticamente [53]. La fase severa ha una durata media di 3 anni ed è caratterizzata da una sintomatologia tale da richiedere un supporto continuo. Il malato perde quasi completamente le capacità di produzione e di comprensione linguistica, tuttavia conserva la capacità comunicativa attraverso il corpo. Inoltre, diventa totalmente incapace di riconoscere i familiari e di compiere le attività quotidiane. In questa fase il movimento è sempre più compromesso ed il paziente moltiplica le cadute, le ferite e le fratture. La fase terminale ha una durata media di 6 mesi. In questa fase le difficoltà di deglutizione inducono la necessità di un'alimentazione parenterale. Infine, i dolori fisici indeboliscono il paziente e lo rendono vulnerabile alle infezioni, che rappresentano la principale causa del decesso [54].

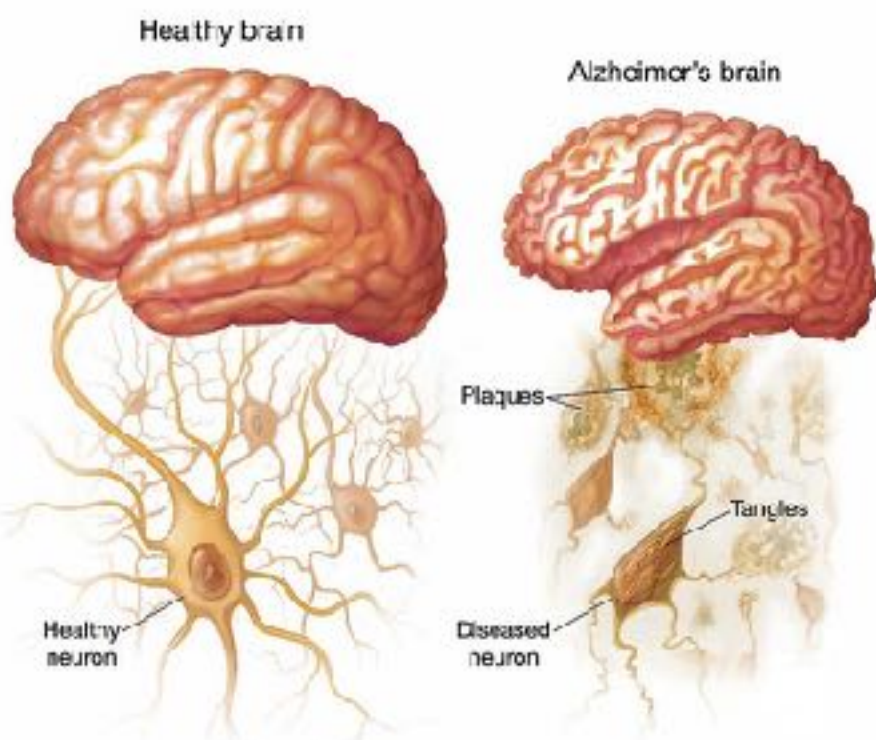


Figura 5: Il cervello nel morbo di Alzheimer. La patologia determina la morte delle cellule nervose e la perdita del tessuto cerebrale, con conseguente diminuzione del volume del cervello e compromissione delle sue funzioni. (ALZHEIMER: CAUSE, SINTOMI, DIAGNOSI E TRATTAMENTO, medlatec, 2023)

1.5 I fluidi di indagine

Il liquido cefalorachidiano (LCR), a stretto contatto con lo spazio extravascolare del sistema nervoso centrale ed isolato dagli altri liquidi corporei, è indispensabile per la diagnostica di molte patologie del sistema nervoso centrale stesso. I requisiti necessari all'accettazione in laboratorio consistono in una richiesta in cui siano presenti oltre ai dati anagrafici, alla data, all'ora ed alla sede del prelievo anche delle indicazioni di sospetto diagnostico, con eventuali notizie anamnestiche, e delle indicazioni di una figura clinica di riferimento [58-60]. Il liquor è un campione prezioso la cui raccolta deriva principalmente dalla rachicentesi, una procedura invasiva che può causare complicanze e pertanto raramente viene ripetuta. La rachicentesi viene di norma eseguita al mattino a digiuno con inserimento di un ago sottile tra la terza e la quarta oppure più comunemente tra la quarta e la quinta vertebra lombare (Figura 6).

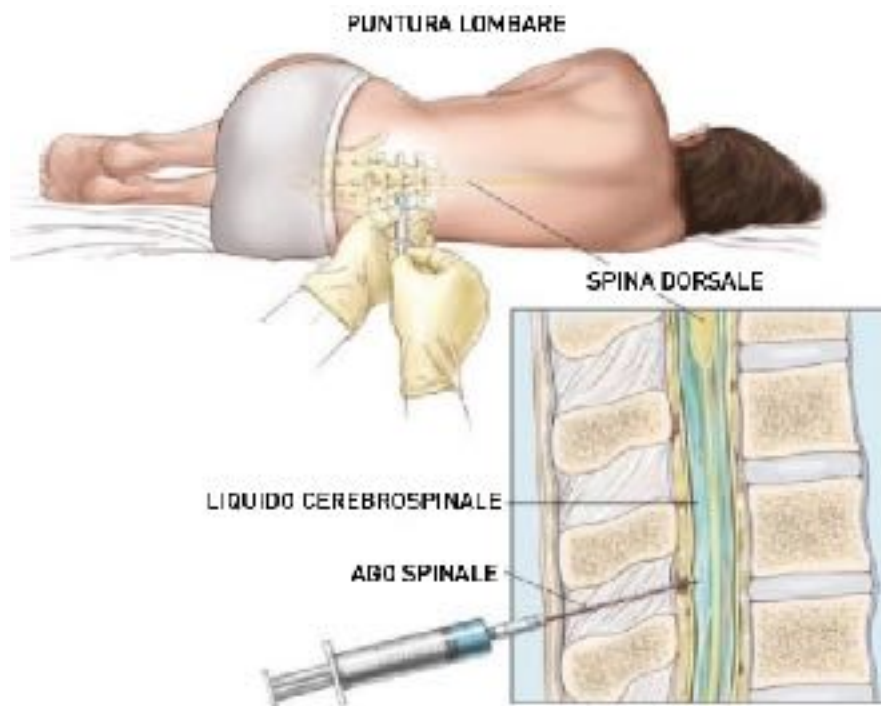


Figura 6: La rachicentesi. (anatomia della puntura lombare, ita.animalia-life.club)

Il liquido cefalorachidiano deve essere raccolto in quantità adeguata al numero ed al tipo di analisi che si prevede di eseguire ed è buona norma raccoglierlo in 3-4 provette consecutive di polipropilene sterili, per evitare l'adesione delle cellule e delle proteine alle pareti [61,62]; materiali diversi influenzano la concentrazione di alcune proteine come la proteina amiloide e la proteina tau [63,64]. Se non analizzato immediatamente, può essere mantenuto a 4-8°C per brevi periodi ed a -80°C per lungo termine. Le provette, identificate con etichette resistenti all'acqua ed alle basse temperature, devono avere un riempimento >75% al fine di prevenire il crioessiccamento; la temperatura di conservazione dipende dagli analiti da ricercare ma onde assicurare la stabilità di tutti i marcatori è consigliata a -80°C [60,62]. Per un corretto inquadramento clinico è consigliabile che l'esame biochimico di base preceda sempre le ulteriori indagini, indipendentemente dal sospetto diagnostico. Il glucosio è la principale sorgente di energia del tessuto nervoso; il suo superamento della barriera ematoencefalica avviene mediante un sistema di trasporto attivo. La glicorrachia - la concentrazione di glucosio liquorale - è direttamente proporzionale alla concentrazione di glucosio ematica, e la sua corretta valutazione (QGlu) richiede la determinazione contemporanea dell'analita nel liquor e nel siero con il calcolo del rapporto LCR/siero. La concentrazione di glucosio nel liquor è il 50-60% dei valori sierici [65] ed un Qglu <0,4-0,5 è considerato patologico [66]. Il lattato origina dal metabolismo del glucosio in condizioni anaerobiche ed è prodotto dalla normale attività metabolica cerebrale. Dato che non attraversa la barriera ematoencefalica, la sua concentrazione nel liquor è indipendente dalla concentrazione plasmatica [67] ed i suoi livelli si correlano in maniera inversamente proporzionale ai valori di Qglu. La protidorrachia - la concentrazione di proteine totali ed albumina - dipende principalmente dalla concentrazione proteica sierica e dalla funzionalità sia della barriera ematoliquorale che della barriera ematoencefalica. Il contenuto proteico del liquor è fisiologicamente compreso tra 0,20-0,45 g/L; varia con l'età ed è particolarmente elevato nel neonato e nell'anziano [61]. L'albumina, sintetizzata esclusivamente a livello epatico, deriva completamente dal plasma e costituisce circa il 57% delle proteine liquorali. Il rapporto tra l'albumina liquorale e l'albumina sierica costituisce il Qalb, che fornisce delle indicazioni sull'integrità della barriera ematoliquorale [68]. L'esame citometrico consiste nel conteggio delle cellule (EN, elementi nucleati) e delle emazie (RBC) presenti nel liquor e nella differenziazione delle cellule stesse in funzione delle

caratteristiche morfologiche. Tale indagine è fondamentale per l'inquadramento diagnostico, dato che un'alterata cellularità è sempre indicativa di un processo patologico in atto; la cellularità fisiologica nell'adulto è $<5 \text{ EN}/\mu\text{L}$ e $<5 \text{ RBC}/\mu\text{L}$ [59] mentre i valori variano in età neonatale ed in età pediatrica. Il metodo in microscopia ottica con camera di conta rappresenta il riferimento per il conteggio delle cellule e la loro differenziazione [59,60]. L'esame citologico consiste nell'identificazione delle cellule secondo dei criteri morfologici mediante la lettura al microscopio di vetrini opportunamente colorati (May Grunwald-Giemsa). La tecnica più utilizzata per la preparazione delle cellule da analizzare è la citocentrifugazione con o senza prearricchimento del campione [61]. Il pre-arricchimento, che consiste nel centrifugare il campione a bassa velocità, prelevarne il sovrantante conservandolo per le altre indagini non cellulari e risospenderne il fondello, permette di concentrare gli elementi corpuscolati del campione; può tuttavia contribuire al danneggiamento delle cellule. Questa analisi contribuisce al processo diagnostico in molte patologie neurologiche identificando i leucociti, gli elementi epiteliali che tappezzano gli spazi subaracnoidei ed i condrociti, le cellule tumorali presenti oppure sospette. La lettura del vetrino permette di valutare la percentuale di ciascun tipo cellulare; associando pertanto i dati qualitativi con i dati quantitativi della citometria si completa il quadro citologico. Negli ultimi anni il sangue accompagna il liquido cerebrospinale nella diagnostica differenziale, assumendo un ruolo importante nella diagnosi precoce della malattia e nel monitoraggio della terapia [69]. Il sangue è un tessuto liquido connettivo specializzato costituito al 45% da elementi corpuscolati ed al 55% da plasma; in un uomo adulto costituisce circa 1/12 del peso corporeo e corrisponde a 5-6 litri. Gli elementi corpuscolati comprendono i globuli rossi deputati all'ossigenazione dei tessuti, i globuli bianchi incaricati alla difesa dell'organismo e le piastrine necessarie al processo di emostasi. Il plasma è un fluido leggermente alcalino e con un caratteristico colore giallognolo costituito da acqua (90%) e da numerose sostanze organiche come i glucidi, i lipidi, le proteine, gli amminoacidi, le vitamine, gli ormoni ed i sali minerali (Figura 7). Gli esami del sangue, attraverso un semplice prelievo venoso, consentono di verificare i valori dei componenti ematici, che riflettono la salute del soggetto ed il funzionamento del suo organismo. Il paziente, che deve essere a digiuno, preferibilmente tra le sette e le nove di mattina si reca in ambulatorio ove un'operatore dopo aver applicato il laccio emostatico e disinfettato la zona dell'avanbraccio dove

avverrà il prelievo chiederà al paziente di chiudere il pugno al fine di individuare la vena in cui inserire l'ago. L'esame non è né pericoloso né doloroso, si potrà avvertire un pizzico all'inserimento dell'ago nel braccio. La procedura termina togliendo l'ago e trasferendo il sangue in una oppure più provette in base agli esami prescritti [70].

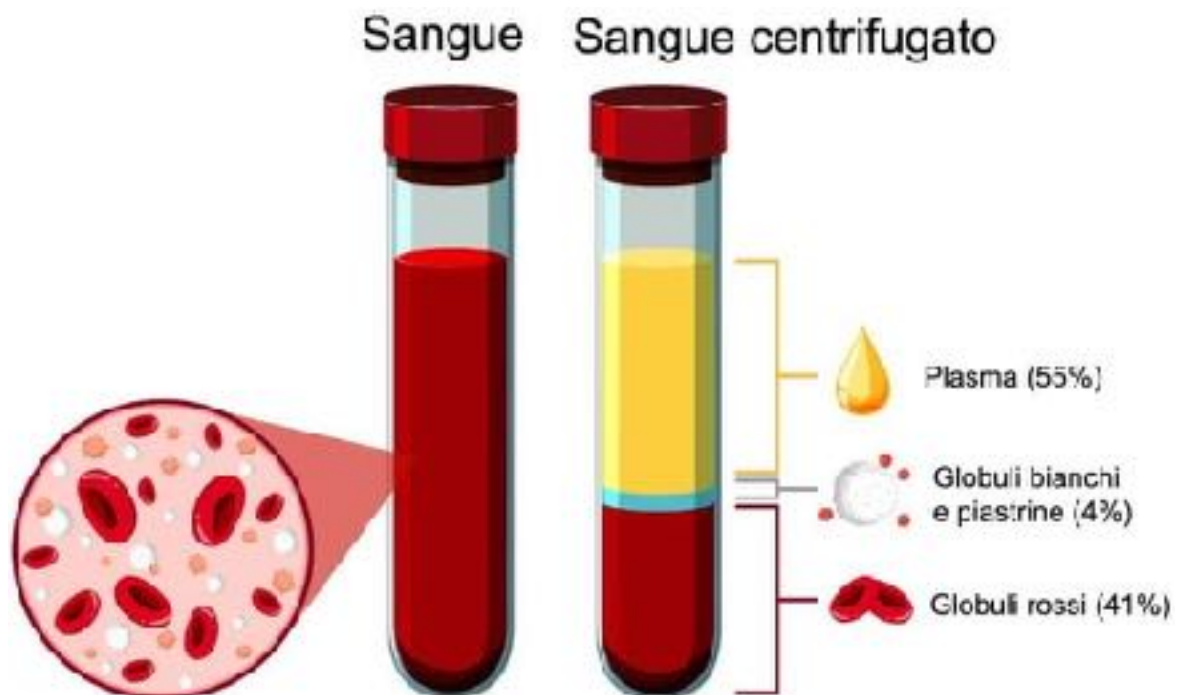


Figura 7: I componenti del sangue. (PLASMA SANGUIGNO, smile.hr)

1.6 I biomarcatori della malattia

La ricerca dei biomarcatori del MA deve fornire ai medici ed agli specialisti di diagnostica di laboratorio degli strumenti biochimici o di neuroimaging che consentano una diagnosi accurata nella fase iniziale del deperimento neuronale [71]. Infatti la fase pre-clinica della malattia, il periodo che precede la manifestazione dei sintomi clinici, può durare diversi anni. Il marcatore ideale dovrebbe garantire una semplice identificazione ed una non invasività del test; dovrebbe permettere di riconoscere la malattia asintomatica, di seguirne la progressione, di valutare l'efficacia del trattamento e di differenziare il MA dalle altre malattie neurodegenerative. Il MA è un disturbo eterogeneo e multifattoriale, la cui diagnosi deve basarsi sulla rilevazione delle alterazioni patologiche oppure dei marcatori nel materiale biologico [72]; si considerano due forme della proteina amiloide (l'A β 1-40 e l'A β 1-42) e due principali

forme della proteina tau (la tau totale e la tau fosforilata in posizione 181). In un malato, l'A β 1-42 ed il rapporto A β 1-42/A β 1-40 mostreranno dei livelli eccessivamente bassi nel liquido cerebrospinale, già molto prima della comparsa dei sintomi della malattia, offrendo la possibilità di effettuare una diagnosi di Alzheimer precoce. Viceversa, la tau totale e la tau fosforilata mostreranno dei livelli alti [73]. Nonostante sia evidente l'importanza della proteina A β 1-42, il biomarcatore mostra una sovrapposizione in diversi disturbi neurodegenerativi. Il rapporto A β 1-42/A β 1-40 rivela invece una maggiore concordanza con il carico di amiloide nel cervello rispetto alla sola A β 1-42 [74], differenziando più accuratamente il MA. La misurazione combinata della proteina A β 1-42 e delle proteine tau permette di prevedere la progressione della malattia con una sensibilità del 95% ed una specificità dell'87% mentre la misurazione della proteina tau fosforilata permette di differenziare il MA dalle altre forme di demenza con un'accuratezza dell'85% [75]. Altri biomarcatori rappresentativi della degenerazione neuronale sono un ridotto assorbimento del 18-fluorodeossiglucosio nella corteccia temporo-parietale ed un'atrofia sproporzionata nelle strutture del lobo temporale mediale (tra le quali l'ippocampo, l'amigdala e la corteccia entorinale) [76] (Figura 8). La tomografia a emissione di positroni con fluorodesossiglucosio (FDG-PET) misura l'assorbimento di un analogo del glucosio radiomarcato, correlato al metabolismo cerebrale ed all'attività sinaptica [77]. Il ridotto tasso metabolico è associato all'età; il confronto delle scansioni FDG-PET tra i pazienti con MA e gli individui sani della stessa età ha rivelato il cosiddetto endofenotipo FDG-PET [78], secondo cui alcune regioni o aree del cervello sono colpite seguendo uno schema spaziale [79]. L'ipometabolismo si verifica prima nelle aree temporo-parietali del cervello, e con il progredire della malattia si aggrava gradualmente. Il danno neuronale nell'ippocampo si manifesta come una diminuzione del volume [80], pertanto un metodo ampiamente accettato per la valutazione precoce della malattia è la scansione volumetrica dell'ippocampo con risonanza magnetica (MRI) [81]. Un altro biomarcatore che ha assunto una notevole importanza di questi tempi è la catena leggera dei neurofilamenti (NFL), che appartiene allo scheletro costitutivo delle cellule cerebrali e che aumenta a livello periferico in seguito ad un danno neuronale aspecifico, prima dell'insorgenza del decadimento cognitivo.

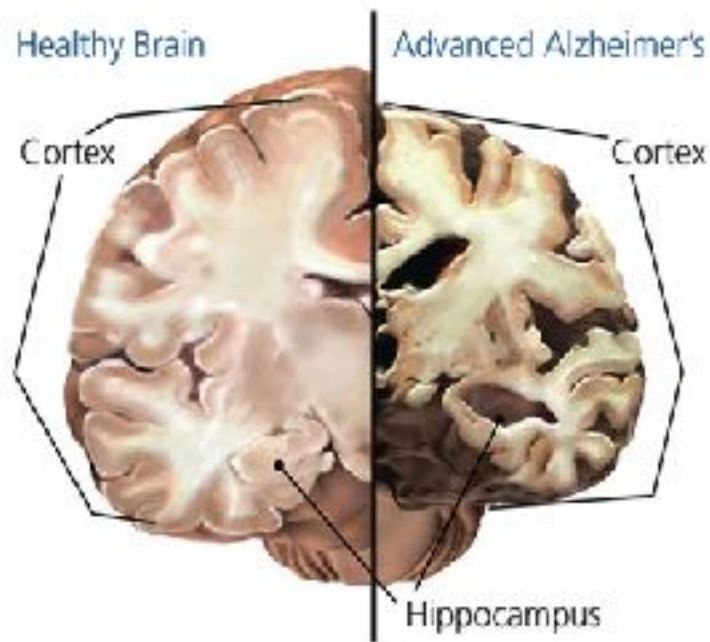


Figura 8: Il cervello nel morbo di Alzheimer. Con il progredire della patologia emerge un'atrofia sproporzionata nelle strutture del lobo temporale mediale tra le quali l'ippocampo, l'amigdala e la corteccia entorinale. (Alzheimer's Disease and Dementia Today, brainfacts.org, 2012)

1.7 La diagnosi della malattia

La diagnosi del MA nell'ambito delle cure primarie dipende principalmente dal sospetto clinico basato sulle preoccupazioni del paziente oppure del caregiver piuttosto che dall'uso degli strumenti di valutazione. Frequente è il ritardato o il mancato rilevamento della malattia, dovuto soprattutto alla ridotta conoscenza ed alla scorretta comunicazione tra il paziente e l'operatore sanitario. La fase pre-clinica inizia con l'amiloidosi cerebrale asintomatica. Inizialmente la proteina A β lascia il liquido cerebrospinale e si accumula sulla superficie neuronale e sulle sinapsi, senza essere tuttavia riscontrata nelle tecniche di indagine. Successivamente, diventano rilevabili alcuni biomarcatori come l'aumento della proteina tau, l'ipometabolismo nel cingolo posteriore e l'assottigliamento corticale [82]. Infine, il paziente inizia ad accusare dei sintomi mentre i biomarcatori continuano ad aumentare. La deposizione della proteina A β precede sia il danno neuronale che i sintomi clinici del MA. La fase di deterioramento cognitivo lieve (MCI) è caratterizzata da una riduzione della funzione cognitiva, che consente comunque al paziente di rimanere un membro autonomo e funzionale della società. Nonostante i progressi nei biomarcatori e nelle

tecniche di imaging, il MCI richiede ancora la determinazione soggettiva di un medico attraverso dei test cognitivi e funzionali [83]. In questa fase il paziente lamenta una ridotta capacità cognitiva rispetto ad una persona con un'età ed un livello di istruzione simili. Indipendentemente dal fatto che il paziente e la famiglia notino questo sintomo, il declino progressivo sarà evidente nel corso del tempo [83]. Un biomarcatore A β positivo (diminuzione dei livelli di A β nel liquido cerebrospinale) e dei biomarcatori di danno neuronale positivi indicano il MA come possibile causa dei sintomi del MCI [76]. La demenza viene diagnosticata dalla graduale insorgenza di sintomi cognitivi e/o comportamentali che interferiscono con la capacità di svolgere le attività della vita quotidiana. Una diagnosi di demenza deve includere la compromissione di almeno due dei seguenti ambiti: ridotta capacità di ricordare nuove informazioni, ridotta capacità di ragionamento, ridotta capacità visuo-spaziale, ridotta funzionalità linguistica oppure cambiamenti nella personalità e nel comportamento [76]. Il MA probabile viene diagnosticato quando il paziente soddisfa i criteri per la demenza, oltre all'esordio insidioso ed all'evidente peggioramento dei sintomi nel corso del tempo (Figura 9). I tre biomarcatori liquorali fondamentali nella diagnostica del MA sono la proteina A β -42, la proteina t-tau e la proteina p-tau fosforilata nella treonina 181 [84]. Uno schema di classificazione dei biomarcatori denominato "ATN", che si basa sui primi risultati e sulle prime interpretazioni [85], è stato suggerito come strumento per valutare la fisiopatologia nel cervello indipendentemente dalla valutazione clinica. Questo sistema considera i tre principali risultati neuropatologici legati al MA. La lettera A si riferisce alla patologia A β misurata mediante PET amiloide o A β -42 nel liquido cerebrospinale, la lettera T rappresenta la patologia del groviglio valutata attraverso PET tau o p-tau nel liquido cerebrospinale e la lettera N corrisponde alla neurodegenerazione rilevata mediante FDG-PET, risonanza magnetica strutturale o t-tau del liquido cerebrospinale [86].

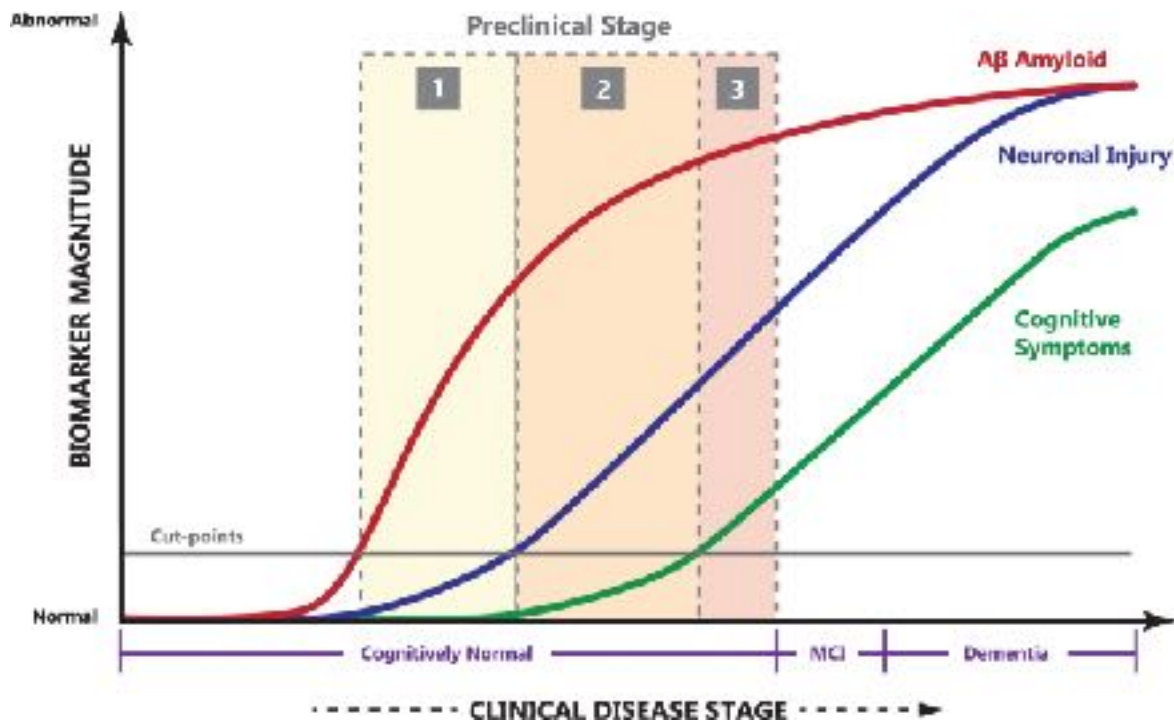


Figura 9: Il cambiamento dei biomarcatori nell'evoluzione della patologia. (Recenti progressi nella ricerca sulla malattia di Alzheimer, parte 3: diagnosi e trattamento, J Alzheimer Dis, 2017)

1.8 Il trattamento della malattia

Gli attuali trattamenti farmacologici del MA si basano sull'attenuazione dei sintomi piuttosto che sul limitare la progressione della demenza; in Italia sono stati approvati quattro farmaci (donepezil, memantina, galantamina e rivastigmina) che appartengono alle due famiglie degli inibitori anticolinesterasici e antiglutaminergici, somministrati per via orale oppure per via transdermica [87,88]. Gli inibitori dell'anticolinesterasi sono delle molecole progettate per aumentare i livelli di acetilcolina nel cervello, una molecola che consente la trasmissione delle informazioni tra alcuni neuroni e che svolge un ruolo nella memoria, allo scopo di correggere la carenza osservata nel sistema nervoso centrale delle persone affette da MA. Gli anti-glutaminergici sono delle molecole utilizzate per regolare i livelli di glutammato attraverso un effetto antagonista non competitivo dei recettori N-metil-D-aspartato (NMDA). Il glutammato è un neurotrasmettitore ed ha un ruolo nelle funzioni cerebrali di apprendimento e di memorizzazione; livelli elevati di glutammato possono causare degli effetti patologici con conseguente morte dei neuroni. Questi trattamenti farmacologici vengono utilizzati per ritardare l'evoluzione della malattia, per stabilizzare o migliorare, anche se

temporaneamente, le funzioni cognitive e per controllare i disturbi del comportamento. Sebbene non siano curativi, aiutano comunque a mantenere l'indipendenza ed a migliorare la qualità della vita delle persone con MA e di chi si prende cura di loro [89,90]. L'assenza di trattamenti efficaci e le difficoltà nel diagnosticare accuratamente il MA in stadio iniziale, dimostrano chiaramente la necessità di implementare delle strategie preventive e neuroprotettive al fine di rallentare il processo neurodegenerativo e di ridurre il rischio della malattia [91]. Le terapie non farmacologiche rappresentano un'alternativa al trattamento delle malattie neurodegenerative [88]. Numerosi studi e sperimentazioni internazionali sono stati completati o stanno facendo progressi per studiare l'intervento multidominio nel MA [91]. In effetti, la ricerca mostra una correlazione positiva tra l'aumento dell'attività fisica, l'allenamento cognitivo, il miglioramento dell'alimentazione ed il rallentamento del declino sia cognitivo che funzionale.

2. SCOPO DEL LAVORO

Lo studio vuole indagare la correlazione esistente tra le concentrazioni liquorali e plasmatiche dei biomarcatori di principale interesse per la diagnostica clinica del morbo di Alzheimer. Sono stati presi in considerazione quei biomarcatori che le autorità di regolamentazione, come la FDA (Food and Drug Administration) e l'EMA (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products), hanno identificato come possibili indici di rilievo generale nei casi di danno neurologico e di demenza quali la proteina amiloide β 42, la proteina amiloide β 40, la proteina tau totale, la proteina tau fosforilata e la catena leggera dei neurofilamenti. È stato dimostrato che, grazie al dosaggio di queste proteine, è possibile distinguere anche precocemente il morbo di Alzheimer, tuttavia non è ancora nota con precisione l'accuratezza diagnostica di tali marcatori, motivo per cui non è possibile attribuire loro una precisa funzione nella diagnosi delle demenze. Partendo da questi presupposti si vuole valutare l'esistenza di una correlazione tra le concentrazioni liquorali e plasmatiche, soprattutto in relazione all'applicazione nella pratica clinica, attraverso uno studio retrospettivo condotto su una coorte di pazienti con decadimento cognitivo e degenerazione neuronale dovuti alla malattia in esame.

3. MATERIALI E METODI

3.1 La popolazione in studio

Lo studio è stato condotto presso il Centro Diagnosi e Cura delle Demenze (CDCD) del Dipartimento di Neuroscienze “Rita Levi Montalcini” della Città della Salute e della Scienza di Torino, in collaborazione con il Laboratorio di Biochimica Clinica “Baldi e Riberi”. La raccolta del liquido cefalorachidiano è stata effettuata tramite puntura lombare con ago atraumatico tra le ore 9:00 e le ore 12:00 del mattino, previo digiuno notturno, all’interno di provette di polipropilene monouso e sterili. I campioni sono stati centrifugati entro un’ora dal prelievo a 2500 rpm ed a 4°C per 10 minuti e sono stati conservati alla stessa temperatura fino all’esecuzione dell’analisi.

3.2 Lo strumento analitico

La quantificazione dei marcatori della malattia avviene tramite l’utilizzo della piattaforma automatizzata LUMIPULSE® G600 (Figura 10) sviluppata e commercializzata dalla ditta giapponese Fujirebio. Lo strumento analitico è progettato per eseguire dei test immunologici ad alta precisione utilizzando la tecnologia CLEIA (Chemiluminescent Enzyme Immunoassay), che sfrutta la chemiluminescenza per rilevare la presenza e la quantità di specifici biomarcatori.



Figura 10: La piattaforma automatizzata LUMIPULSE® G600. (LUMIPULSE® G600II - a chemiluminescent enzyme immunoassay (CLEIA) analyzer from Fujirebio)

La piattaforma automatizzata LUMIPULSE® G600 si compone di una struttura esterna per assicurare la protezione e la sicurezza dei componenti interni e dell'operatore, e di un pannello di controllo per gestire le operazioni del sistema. Dopo l'accensione dello strumento, che richiede all'incirca 20 minuti, è necessario eseguire un'accurata verifica delle riserve e dei residui sia dei puntali monouso che dei reattivi; questo passaggio è fondamentale dato che l'aggiornamento del sistema viene effettuato manualmente dall'operatore. Lo strumento analitico è configurato per alloggiare due piastre da 96 puntali ciascuna, delle quali almeno una deve essere completamente carica al fine di garantire la disponibilità continua ed il corretto funzionamento della procedura analitica, ed otto alloggiamenti per cartridge da 14 reattivi ciascuno. Lo strumento è inoltre dotato di 3 caroselli riservati alle provette di emergenza, seguiti da ulteriori 30 caroselli destinati alle analisi di routine. In queste posizioni possono essere inserite sia le provette standard, munite di un codice a barre univoco di identificazione, che le provette specifiche dello strumento denominate "Hitachi Cup", nelle quali vengono inserite le aliquote del campione in esame (Figura 11).



Figura 11: L'interno dello strumento analitico LUMIPULSE® G600. (LUMIPULSE® G600II - a chemiluminescent enzyme immunoassay (CLEIA) analyzer from Fujirebio).

La calibrazione del sistema è necessaria per assicurare l'accuratezza e la precisione dei risultati. Questa operazione, che viene generalmente eseguita ogni 30 giorni oppure ogni volta che si cambia il lotto dei reagenti, prevede il simultaneo dosaggio dei campioni dei pazienti e dei campioni di controllo noti al fine di confrontare i risultati restituiti dallo strumento analitico e di assicurare che le sue letture corrispondano ai valori ottenuti. È importante che i risultati di ogni analita cadano all'interno delle due deviazioni standard, rispettando così i rigidi criteri di qualità e di affidabilità imposti sia dalla normativa che dalle buone pratiche di laboratorio. La calibrazione del sistema prevede un kit con tre livelli per ogni analita considerato, che possono essere pronti all'uso (nel caso di p-tau e dei neurofilamenti) oppure da diluire con 1mL di soluzione di ricostituzione (nel caso dell'A β e di t-tau) e che devono essere mescolati al vortex 5 secondi previo utilizzo. I controlli di qualità interni (CQI) sono invece necessari per valutare l'imprecisione analitica e gli eventuali errori sistematici e/o casuali. Nel caso in cui questa operazione, sempre ripetuta all'inizio della procedura analitica, non sia superata, la qualità analitica dei risultati restituiti dallo strumento potrebbe essere compromessa. È essenziale che la segnalazione di "fuori controllo" sia disponibile in tempi brevi, al fine di permettere l'adozione immediata di azioni correttive. Anche in questo caso, i controlli di qualità interni del sistema prevedono un kit con tre livelli per ogni analita considerato, che possono essere pronti all'uso oppure da diluire con 1mL di soluzione di ricostituzione. Ogni controllo è specifico per il singolo analita, tranne per la proteina A β che mostra un unico set per entrambe le forme analizzate.

Nella Tabella 1 sono riportate le prestazioni analitiche dei kit utilizzati sulla matrice liquorale, validati secondo la normativa CE-IVDR, che rappresenta un quadro aggiornato e rigoroso per i dispositivi medici-diagnostici in vitro, con l'obiettivo di migliorarne la qualità e l'affidabilità. I kit adoperati sui neurofilamenti liquorali sono tuttavia dei kit RUO (Research Use Only). La marcatura CE è il marchio con cui il fabbricante attesta che il prodotto è conforme ai requisiti essenziali di sicurezza previsti da tutte le norme comunitarie europee della categoria in cui esso ricade.

	AB40	AB42	T-TAU	P-TAU	NFL
Volume	40 µL	50 µL	75 µL	40 µL	60 µL
Range di Misurazione	51-30000 pg/mL	9-2335 pg/mL	150-2000 pg/mL	1,1-400 pg/mL	4-50000 pg/mL
Limite di Rilevabilità (LOD)	2,78 pg/mL	6,7 pg/mL	141 pg/mL	0,282 pg/mL	4 pg/mL
Limite di Quantificazione (LOQ)	4,08 pg/mL	8,46 pg/mL	44 pg/mL	1,058 pg/mL	6 pg/mL

Tabella 1: Le prestazioni analitiche dei kit utilizzati sulla matrice liquorale, validati secondo la normativa CE-IVDR.

Nella Tabella 2 sono invece riportate le prestazioni analitiche dei kit RUO (Research Use Only) utilizzati sulla matrice plasmatica, dispositivi diagnostici esclusivamente a scopo di ricerca. Questi kit non sono ancora approvati per l'uso clinico e non possono essere utilizzati per prendere delle decisioni mediche riguardanti la diagnosi, il trattamento oppure la gestione dei pazienti. I kit RUO sono in fase di sviluppo ed il loro utilizzo inappropriato nella potrebbe minacciare la precisione diagnostica, l'efficienza analitica, i margini operativi e la gestione del rischio.

	AB40	AB42	P-TAU	NFL
Volume	70 µL	110 µL	130 µL	100 µL
Range di Misurazione	0,10-5000 pg/mL	0,10-1000 pg/mL	0,05-60 pg/mL	2-5000 pg/mL
Limite di Rilevabilità (LOD)	/	/	/	1,99 pg/mL
Limite di Quantificazione (LOQ)	/	/	/	3,84 pg/mL

Tabella 2: Le prestazioni analitiche dei kit RUO (Research Use Only) utilizzati sulla matrice plasmatica.

3.3 La tecnica analitica

La tecnica analitica CLEIA (Chemiluminescent Enzyme Immunoassay) utilizza dei principi di immunologia e di chemiluminescenza al fine di rilevare quantitativamente degli analiti specifici all'interno di campioni biologici come il sangue, le urine o il liquido cerebrospinale. (Figura 12). Inizialmente il campione biologico viene raccolto e centrifugato per separare sia le componenti cellulari che i contaminanti ed ottenere il surnatante pulito. Successivamente un anticorpo coniugato con un enzima (tipicamente la fosfatasi alcalina) viene aggiunto ed incubato per un periodo definito ad una temperatura controllata, permettendo la formazione di un complesso tra l'antigene e l'anticorpo. Il campione biologico viene sottoposto a dei cicli di lavaggio per rimuovere gli anticorpi non legati; questo procedimento è cruciale per ridurre il rumore di fondo e per migliorare la precisione dell'analisi. Infine il substrato enzimatico (tipicamente il diossetano fosfato) viene aggiunto e catalizzato, determinando l'emissione di una luce direttamente proporzionale alla quantità di analita presente nel campione. La tecnica analitica CLEIA è altamente sensibile, permettendo la rilevazione di piccole quantità di campione biologico, ed altamente specifico, riducendo la probabilità di risultati falsi positivi. Il test CLEIA rappresenta pertanto una tecnologia avanzata e potente per la diagnosi ed il monitoraggio del MA; la sua capacità di rilevare con precisione i biomarcatori specifici della malattia lo rende uno strumento prezioso nella pratica clinica, contribuendo ad una diagnosi precoce e ad un trattamento più efficace del paziente.

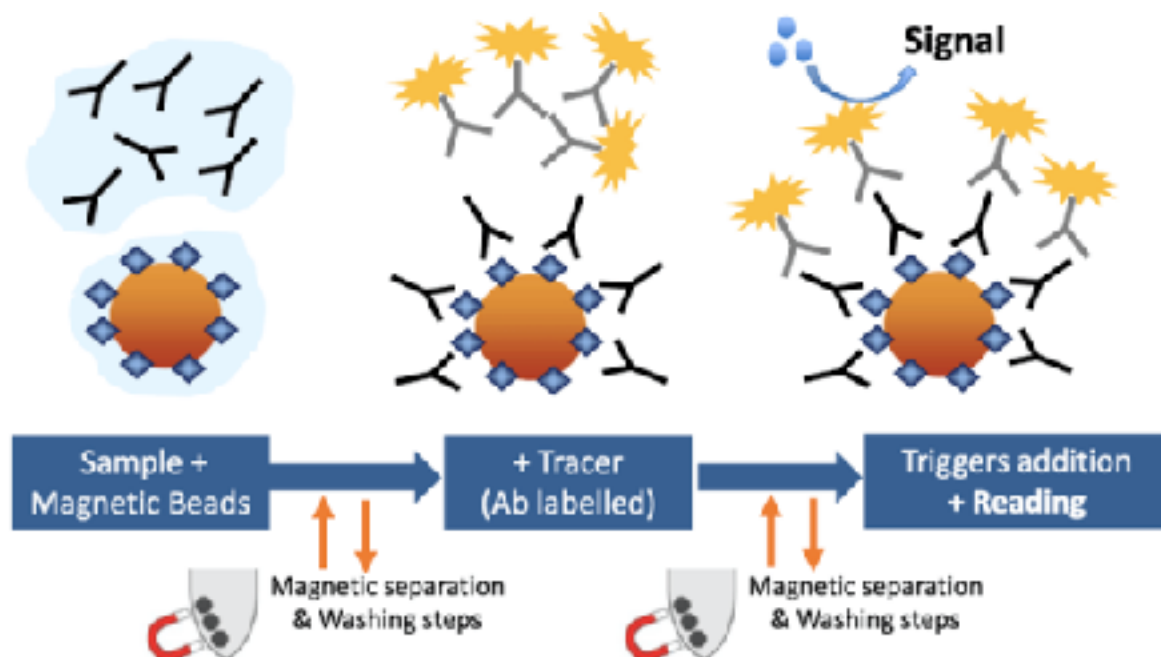


Figura 12: La tecnica analitica CLEIA (Chemiluminescent Enzyme Immunoassay) (SEPMAG Chief Scientific Officer, Magnetic beads in Chemiluminescent Immunoassay CLIA)

La determinazione combinata dei tre biomarcatori liquorali può incrementare la sensibilità e la specificità diagnostica fornendo un dato di laboratorio che, associato alla clinica del paziente, può aiutare ad individuare quali soggetti affetti da deficit cognitivi e da alterazioni neurologiche evolveranno verso il MA o le altre forme di demenza. Le placche amiloidi hanno origine dall'aggregazione e dall'accumulo anomalo del peptide β -amiloide o A β nell'ambiente extracellulare. Livelli normali di questo peptide sono stati osservati in soggetti non affetti da demenza ed in soggetti affetti da patologie neurodegenerative legate all'invecchiamento o alla depressione mentre una diminuita concentrazione è correlata positivamente alla deposizione delle placche cerebrali. I grovigli neurofibrillari hanno origine dall'iperfosforilazione e dalla conformazione anomala in coppie di filamenti elicoidali delle proteine tau nel mezzo intracellulare. Livelli normali di questo peptide sono stati osservati in soggetti affetti da depressione, infarto cerebrale, morbo di Parkinson e demenze di origine vascolare, frontotemporale o a corpi di Lewy. Livelli normali o leggermente aumentati sono stati riscontrati in soggetti affetti da morbo di Creutzfeld-Jakob mentre una aumentata concentrazione è correlata positivamente alla formazione dei grovigli cerebrali. Nella tabella 3 sono riportati i valori di riferimento dei biomarcatori liquorali forniti dalla ditta giapponese Fujirebio, in relazione all'età del paziente.

Biomarcatore	Valori di Riferimento	Età
AB42	>500 pg/mL (ng/L)	Indipendente dall'Età
AB42/40	0,068-0,115	Indipendente dall'Età
T-TAU	<300 pg/mL (ng/L)	21-50 anni
	<450 pg/mL (ng/L)	51-70 anni
	<500 pg/mL (ng/L)	>70 anni
P-TAU 181	<61 pg/mL (ng/L)	Indipendente dall'Età

Tabella 3: I valori di riferimento dei biomarcatori liquorali della ditta giapponese Fujirebio in relazione all'età del paziente.

3.4 L'analisi statistica

Per l'analisi statistica è stato utilizzato il software "IBM SPSS Statistics versione 29.0.1.0" e per tutti i test applicati sono stati considerati statisticamente significativi i valori di p-Value inferiori a 0,05. La normalità delle distribuzioni di ciascuna variabile quantitativa è stata studiata mediante test di Shapiro-Wilks, vista la numerosità inferiore a 50 di ciascun gruppo diagnostico. In accordo alla prevalente distribuzione non normale tra le variabili continue desiderate, le tendenze centrali ed il grado di dispersione sono stati descritti in termini di mediane e di range interquartili. Le variabili categoriche, tutte di tipo binario, sono state invece descritte mediante frequenza assoluta e percentuale. Le differenze delle distribuzioni di ciascuna variabile tra i diversi gruppi diagnostici sono state studiate attraverso test di Mann-Whitney o t-test di Student per campioni indipendenti nel caso delle variabili quantitative mentre test chi-quadrato o test esatto di Fisher nel caso delle variabili categoriche. Infine, l'analisi della correlazione delle variabili quantitative è stata studiata tramite il metodo di Pearson o l'equivalente non parametrico di Spearman.

4. RISULTATI

I partecipanti (n = 24) con un'età compresa tra 49 e 84 anni al momento della rachicentesi sono stati classificati secondo il sistema diagnostico ATN, tenendo in considerazione sia la presenza o l'assenza delle proteine A β (A) e tau (T) misurate con la PET-amiloide, la PET-tau o i biomarcatori che la stadiazione della neurodegenerazione (N) misurata con l'FDG-PET, i biomarcatori o la risonanza magnetica. Nelle tabelle seguenti sono riportati i biomarcatori liquorali con colore azzurro ed i biomarcatori plasmatici, preceduti dalla lettera P, con colore lilla. Per un numero esiguo di campioni (inferiore a 50), si presuppone che la distribuzione delle variabili sia non normale, per cui è necessario verificare la suddetta ipotesi mediante test di Shapiro-Wilks. Considerando la popolazione totale (n = 24), nella tabella 4

appare evidente che i valori di età al prelievo, A β 42, A β 40 ed A β 42/40 presentano una distribuzione normale mentre i valori di p-tau 181, t-tau e NFL presentano una distribuzione non normale, sia in relazione al liquor che per quanto riguarda il plasma.

	Media	Deviazione Standard	1°Quartile	Mediana	2°Quartile	p-Value
Età al Prelievo	67,670	9,595	62,000	69,000	74,750	0,252
AB42	513,851 pg/mL	253,873 pg/mL	332,250 pg/mL	419,500 pg/mL	713,822 pg/mL	0,118
AB40	8101,164 pg/mL	2895,121 pg/mL	5665,250 pg/mL	7788,646 pg/mL	10015,750 pg/mL	0,691
AB42/40	0,063	0,021	0,044	0,060	0,087	0,091
P-TAU 181	89,837 pg/mL	62,795 pg/mL	41,950 pg/mL	67,700 pg/mL	125,225 pg/mL	0,004
T-TAU	510,390 pg/mL	274,069 pg/mL	365,000 pg/mL	416,000 pg/mL	611,000 pg/mL	<0,001
CSFNFL	1855,540 pg/mL	2666,283 pg/mL	377,500 pg/mL	1020,000 pg/mL	1851,000 pg/mL	<0,001
PAB42	24,798 pg/mL	7,741 pg/mL	19,442 pg/mL	26,400 pg/mL	30,160 pg/mL	0,727
PAB40	290,856 pg/mL	68,110 pg/mL	260,159 pg/mL	297,400 pg/mL	330,772 pg/mL	0,366
PAB42/40	0,083	0,013	0,077	0,082	0,092	0,936
PP-TAU 181	1,947 pg/mL	1,192 pg/mL	1,020 pg/mL	1,640 pg/mL	2,600 pg/mL	0,020
PNFL	35,552 pg/mL	32,791 pg/mL	16,325 pg/mL	23,850 pg/mL	43,625 pg/mL	<0,001

Tabella 4: I valori dei biomarcatori liquorali e plasmatici nella popolazione totale.

Considerando invece la suddivisione della popolazione in base alla diagnosi (MA = 12 e demenze non MA = 12), si sono confrontati i valori ottenuti per i singoli biomarcatori attraverso test di Mann-Whitney o t-test di Student, al fine di dimostrare quali siano effettivamente significativi da un punto di vista diagnostico. Nella figura 13 è

rappresentata la distribuzione dei valori dei singoli biomarcatori liquorali. I valori di $A\beta_{42}$, $A\beta_{42}/40$ e p-tau 181 mostrano differenze statisticamente significative nelle due popolazioni considerate (p -value $<0,001$).

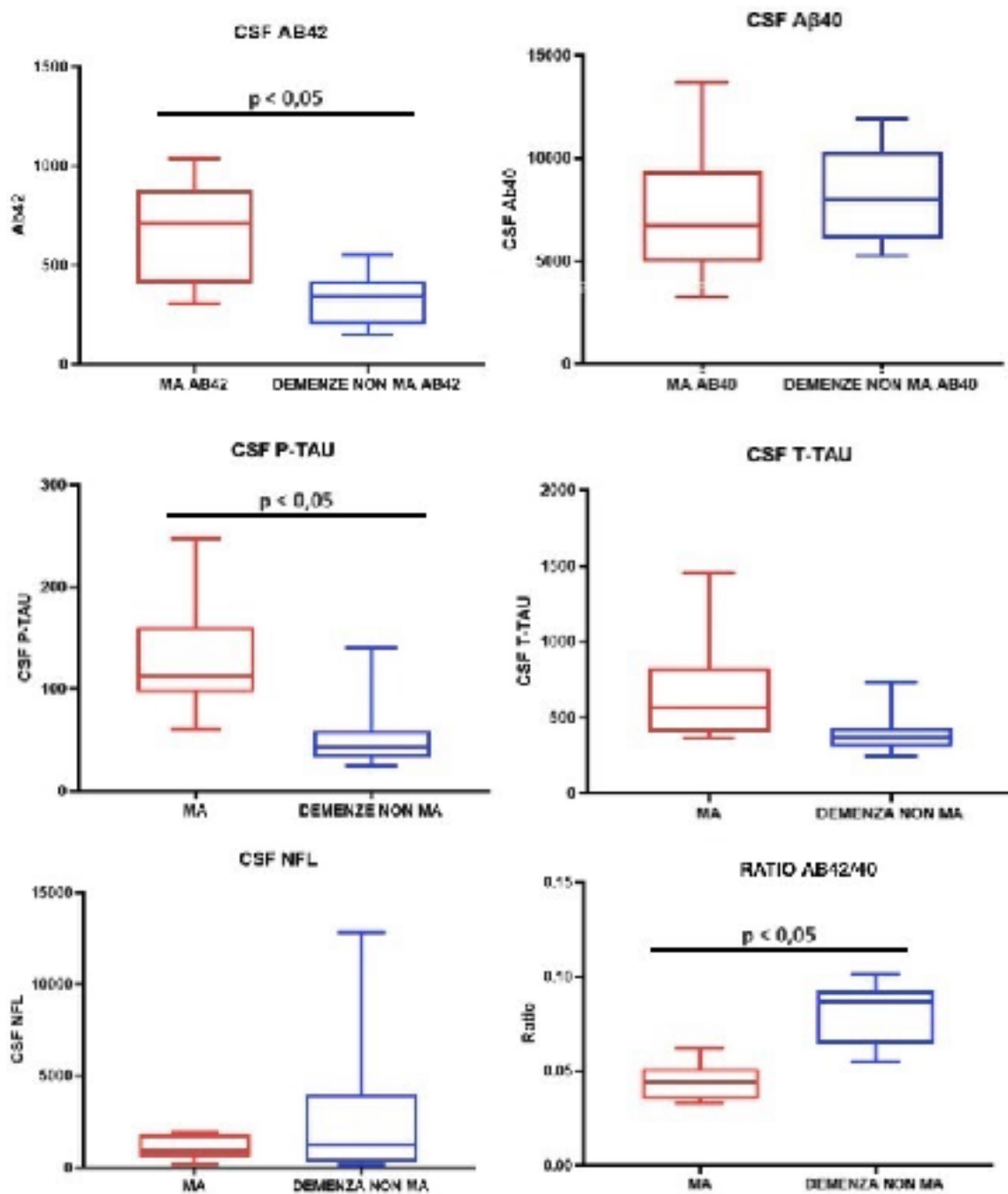


Figura 13: La distribuzione dei valori dei biomarcatori liquorali.

Nella figura 14 è rappresentata la distribuzione dei valori dei singoli biomarcatori plasmatici. I valori di $A\beta_{42}/40$ e p-tau 181 mostrano differenze statisticamente significative nelle due popolazioni considerate (p -value $<0,05$).

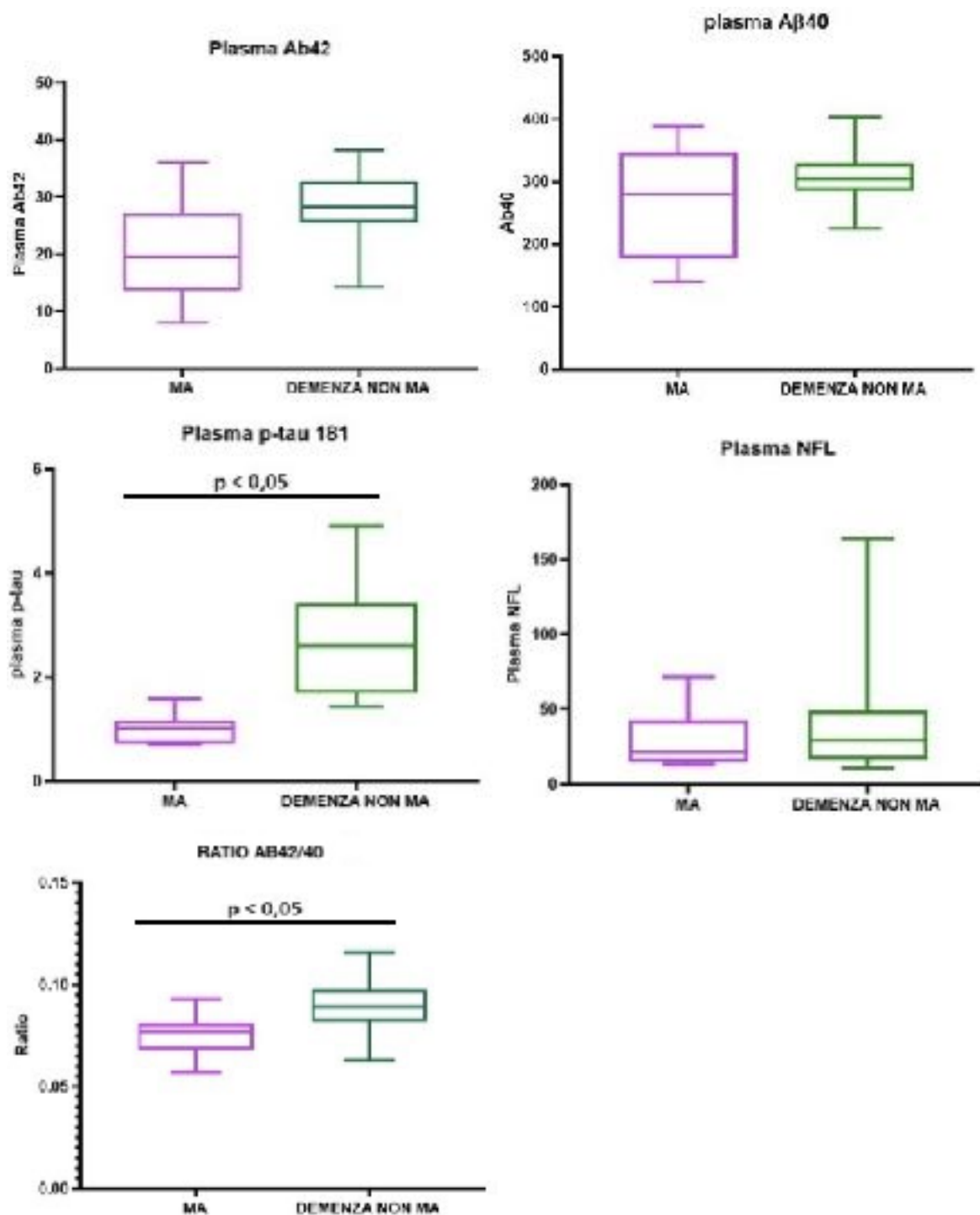


Figura 14: La distribuzione dei valori dei biomarcatori plasmatici.

La suddivisione della popolazione in base al sesso (14 uomini e 10 donne) non ha evidenziato differenze statisticamente significative né per i biomarcatori liquorali né per i biomarcatori plasmatici. Considerando invece la suddivisione della popolazione in base al genotipo (nessun allele $\epsilon 4 = 17$ e almeno un allele $\epsilon 4 = 7$), si sono

confrontati i valori acquisiti per i singoli biomarcatori mediante test di Mann-Whitney o t-test di Student, allo scopo di sottolineare quali siano effettivamente significativi tenendo in considerazione la predisposizione genetica. Nella tabella 6 risulta chiaro che è scartata l'ipotesi nulla per i valori di A β 42 e A β 40 plasmatici.

	Genotipo	Media	Deviazione Standard	1° Percentile	Mediana	2° Percentile	p-Value
Età al Prelievo	3/4	66,830	11,686	60,500	71,000	74,250	0,505
	3/3	69,570	8,244	64,000	69,000	77,250	
	2/3	62,000	18,385	49,000	62,000	/	
AB42	3/4	366,333 pg/mL	319,720 pg/mL	154,000 pg/mL	300,000 pg/mL	555,000 pg/mL	0,469
	3/3	461,787 pg/mL	303,352 pg/mL	282,000 pg/mL	410,000 pg/mL	718,072 pg/mL	
	2/3	517,000 pg/mL	513,359 pg/mL	154,000 pg/mL	517,000 pg/mL	/	
AB40	3/4	5754,767 pg/mL	3208,586 pg/mL	3802,900 pg/mL	6204,000 pg/mL	5769,250 pg/mL	0,457
	3/3	6619,536 pg/mL	3561,939 pg/mL	4812,750 pg/mL	7027,500 pg/mL	9440,500 pg/mL	
	2/3	5990,500 pg/mL	3869,995 pg/mL	3254,000 pg/mL	5990,500 pg/mL	/	
AB42/40	3/4	0,061	0,021	0,045	0,057	0,081	0,115
	3/3	0,068	0,017	0,057	0,066	0,087	
	2/3	0,074	0,038	0,047	0,074	/	
P-TAU 181	3/4	59,966 pg/mL	40,466 pg/mL	31,775 pg/mL	53,500 pg/mL	100,475 pg/mL	0,349
	3/3	72,272 pg/mL	67,635 pg/mL	25,800 pg/mL	45,400 pg/mL	116,750 pg/mL	
	2/3	100,050 pg/mL	41,365 pg/mL	70,800 pg/mL	100,050 pg/mL	/	

T-TAU	3/4	547,500 pg/mL	251,274 pg/mL	371,500 pg/mL	422,500 pg/mL	778,000 pg/mL	0,154
	3/3	415,408 pg/mL	185,170 pg/mL	293,000 pg/mL	384,000 pg/mL	499,000 pg/mL	
	2/3	361,500 pg/mL	74,246 pg/mL	309,000 pg/mL	361,500 pg/mL	/	
CSFNFL	3/4	639,170 pg/mL	629,818 pg/mL	248,250 pg/mL	314,000 pg/mL	1142,500 pg/mL	0,099
	3/3	2304,210 pg/mL	3285,959 pg/mL	610,750 pg/mL	1198,000 pg/mL	2271,750 pg/mL	
	2/3	1026,50 pg/mL	1127,835 pg/mL	229,000 pg/mL	1026,500 pg/mL	/	
PAB42	3/4	20,751 pg/mL	7,356 pg/mL	16,475 pg/mL	20,705 pg/mL	27,700 pg/mL	0,036
	3/3	26,180 pg/mL	7,404 pg/mL	19,810 pg/mL	27,400 pg/mL	32,725 pg/mL	
	2/3	32,470 pg/mL	5,133 pg/mL	28,840 pg/mL	32,470 pg/mL	/	
PAB40	3/4	255,193 pg/mL	60,925 pg/mL	211,620 pg/mL	281,850 pg/mL	294,975 pg/mL	0,027
	3/3	307,545 pg/mL	63,447 pg/mL	274,225 pg/mL	306,600 pg/mL	354,807 pg/mL	
	2/3	354,275 pg/mL	46,280 pg/mL	321,550 pg/mL	354,275 pg/mL	/	
PAB42/40	3/4	0,078	0,014	0,065	0,079	0,093	0,236
	3/3	0,084	0,013	0,076	0,081	0,089	
	2/3	0,091	0,002	0,089	0,091	/	
PP-TAU 181	3/4	2,757 pg/mL	1,584 pg/mL	1,497 pg/mL	2,350 pg/mL	4,425 pg/mL	0,156
	3/3	1,840 pg/mL	1,167 pg/mL	0,950 pg/mL	1,420 pg/mL	2,805 pg/mL	
	2/3	2,090 pg/mL	0,721 pg/mL	1,580 pg/mL	2,090 pg/mL	/	
PNFL	3/4	18,290 pg/mL	4,167 pg/mL	13,585 pg/mL	19,000 pg/mL	22,050 pg/mL	0,028
	3/3	42,537 pg/mL	38,868 pg/mL	18,275 pg/mL	32,220 pg/mL	44,962 pg/mL	
	2/3	41,405 pg/mL	42,843 pg/mL	11,110 pg/mL	41,405 pg/mL	/	

Tabella 5: I valori dei biomarcatori liquorali e plasmatici nella popolazione suddivisa in base al genotipo.

Per quanto riguarda le correlazioni delle variabili quantitative è stata presa in considerazione la popolazione totale (n = 24), vista la numerosità inferiore a 50 di ciascun gruppo diagnostico. Nella tabella 9 sono riportati i valori significativi, ottenuti tramite il metodo di Pearson o l'equivalente non parametrico di Spearman. Risulta evidente che tra i biomarcatori A β 42 e A β 42/40 liquorali, A β 42/40 liquorale e A β 42/40 plasmatico, p-tau 181 e t-tau liquorali, p-tau 181 liquorale e p-tau 181 plasmatico, NFL liquorali e NFL plasmatici, A β 42 e A β 42/40 plasmatici esiste una correlazione positiva, dato che all'aumentare del primo si verifica un aumento del secondo.

		Coefficiente r di Pearson o Spearman	p-Value
AB42	Età al Prelievo	-0,451	0,027
AB42	AB40	0,600	0,002
AB42	AB42/40	0,783	<0,001
AB42	PAB42/40	0,509	0,011
AB42	PP-TAU 181	-0,613	0,005
AB40	T-TAU	-0,577	0,004
AB42/40	P-TAU 181	-0,524	0,009
AB42/40	T-TAU	-0,558	0,006
AB42/40	PAB42	0,617	0,001
AB42/40	PAB42/40	0,716	<0,001
AB42/40	PP-TAU 181	-0,577	0,010
P-TAU 181	T-TAU	0,763	<0,001
P-TAU 181	PP-TAU 181	0,709	<0,001

T-TAU	PAB42	-0,533	0,009
T-TAU	PAB40	-0,489	0,018
CSFNFL	PNFL	0,933	<0,001
PAB42	PAB40	0,890	<0,001
PAB42	PAB42/40	0,776	<0,001
PAB40	PAB42/40	0,419	0,042
PAB42/40	PP-TAU 181	-0,551	0,014

Tabella 6: I valori ritenuti significativi della correlazione tra i valori dei biomarcatori liquorali e plasmatici nella popolazione totale.

Nella figura 15 sono riportate le correlazioni di Pearson mentre nella figura 16 sono riportate le correlazioni di Spearman, dove vengono inserite tutte le variabili parametriche: il coefficiente 1.0 rappresentato in blu indica la massima correlazione positiva tra i valori mentre il coefficiente -1.0 rappresentato in rosso sottolinea la massima correlazione negativa.

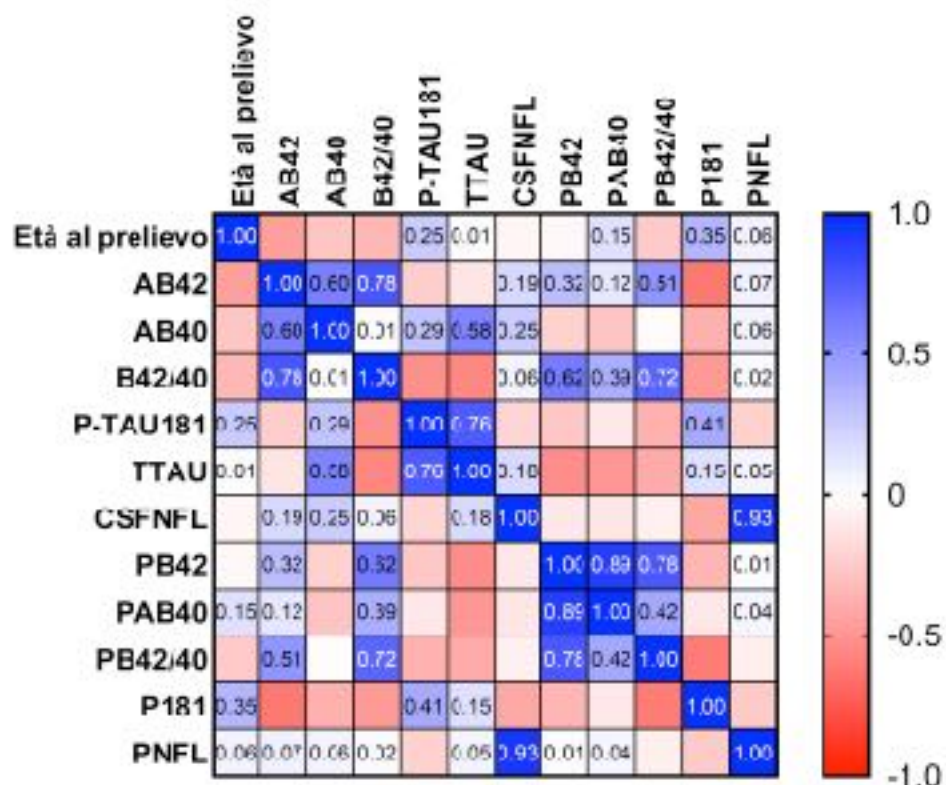


Figura 15: Le correlazioni di Pearson di tutte le variabili parametriche.

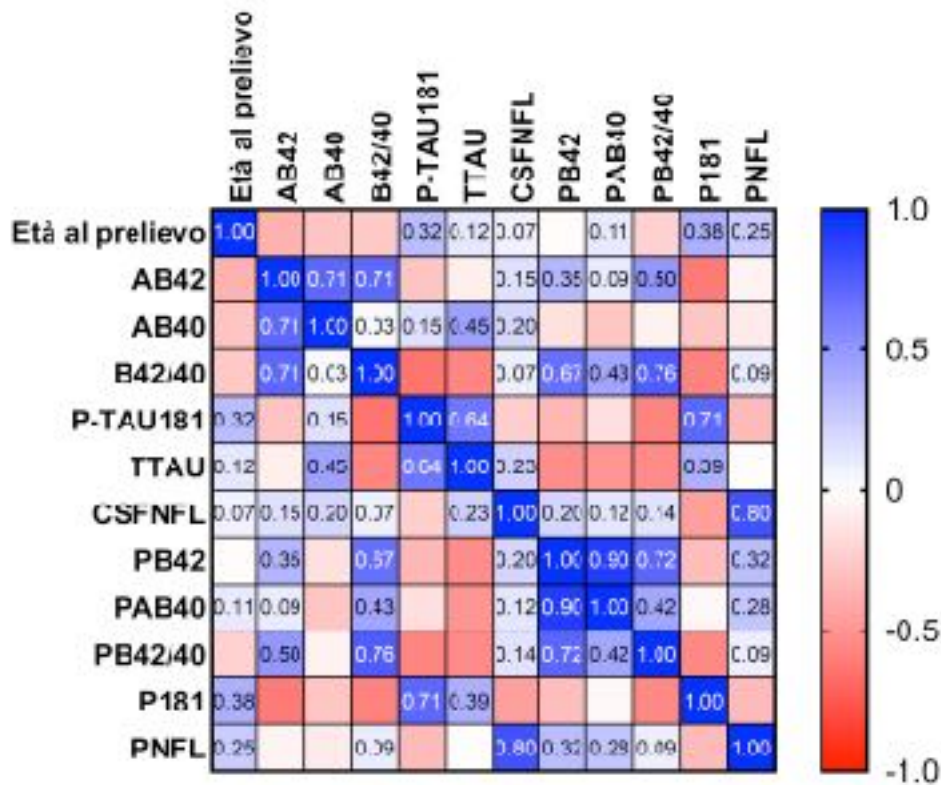


Figura 16: Le correlazioni di Spearman di tutte le variabili parametriche.

Per valutare la correlazione lineare tra le variabili si utilizza il coefficiente di correlazione di Pearson (r). Nella figura 17 si riportano le variabili quantitative dei dosaggi del rapporto $A\beta_{42}/40$ plasmatico sulle ordinate e del rapporto $A\beta_{42}/40$ liquorale sulle ascisse. Il p-value assume un valore $< 0,001$ inferiore allo 0,05 di riferimento. Si può dichiarare che c'è una considerevole correlazione positiva tra questi due biomarcatori ($r = 0,716$). Nella figura 18 si riportano invece le variabili quantitative dei dosaggi della p-tau 181 plasmatica sulle ordinate e della p-tau 181 liquorale sulle ascisse. Il p-value assume un valore $< 0,001$ inferiore allo 0,05 di riferimento. Si può pertanto dichiarare che esiste una considerevole correlazione positiva tra questi due biomarcatori (0,709). Nella figura 19 si riportano infine le variabili quantitative dei dosaggi degli NFL plasmatici sulle ordinate e degli NFL liquorali sulle ascisse. Il p-value assume sempre un valore $< 0,001$ inferiore allo 0,05 di riferimento. Si può dichiarare che c'è una considerevole correlazione positiva anche tra questi due biomarcatori ($r = 0,933$).

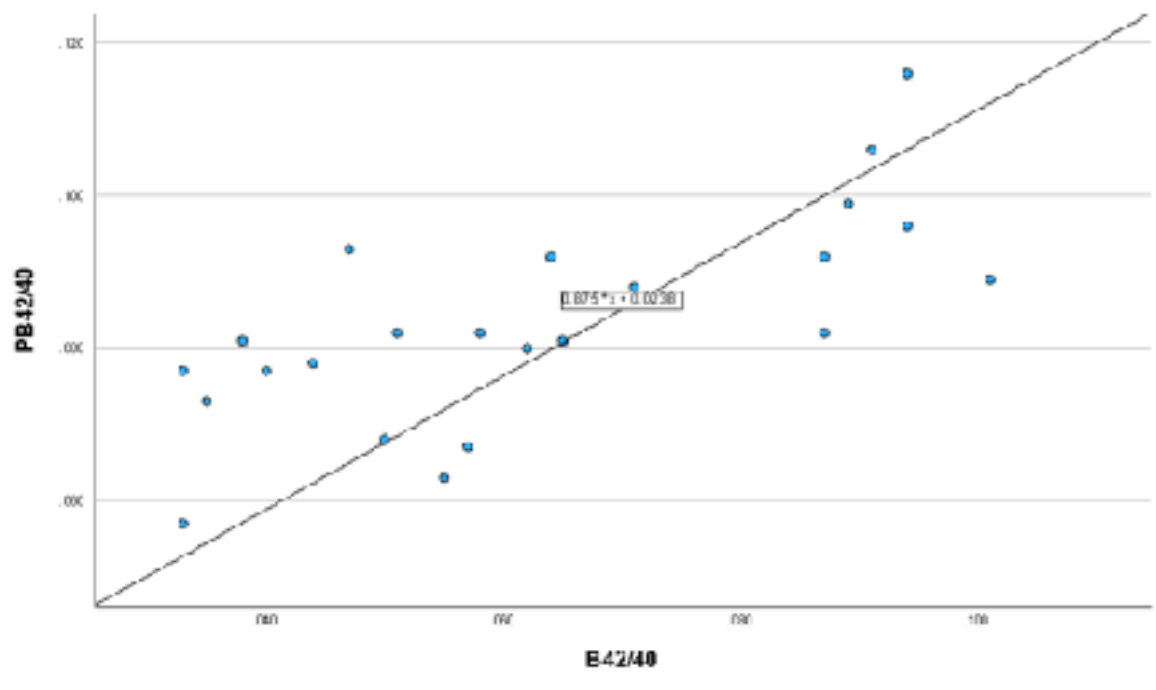


Figura 17: La correlazione di Pearson tra il rapporto Aβ42/40 plasmatico ed il rapporto Aβ42/40 liquorale.

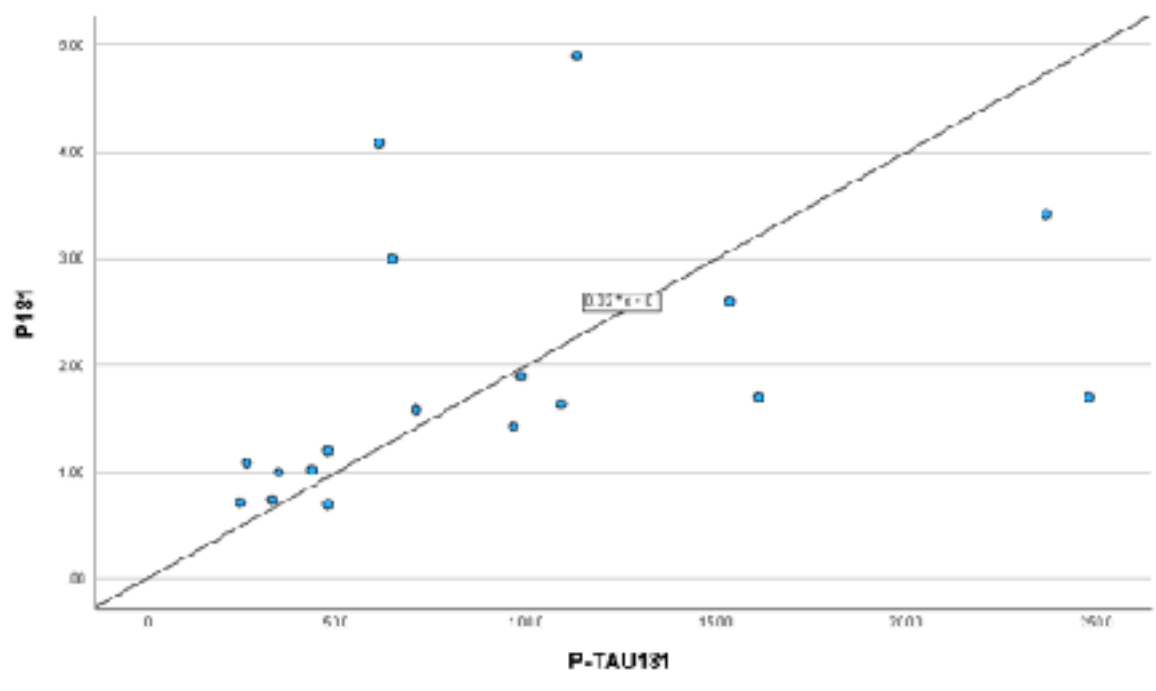


Figura 18: La correlazione di Pearson tra la p-tau 181 plasmatica e la p-tau 181 liquorale.

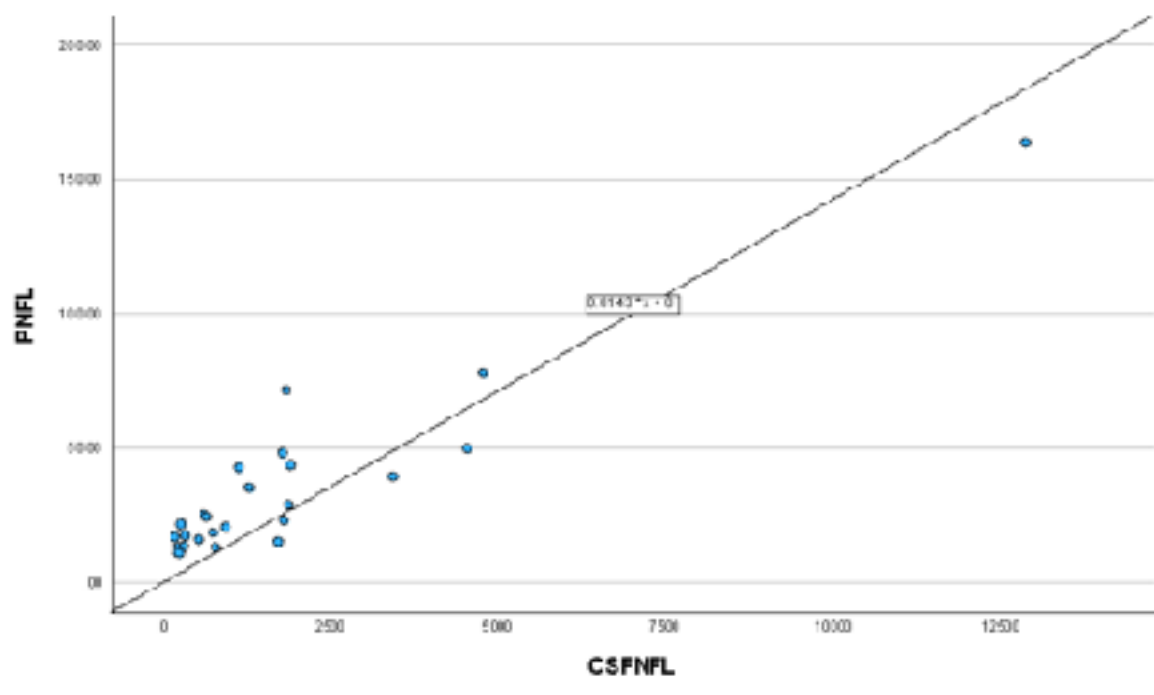


Figura 19: La correlazione di Pearson tra gli NFL plasmatici e gli NFL liquorali.

A corollario delle analisi statistiche effettuate, sono state costruite le curve ROC dei biomarcatori A β 42, A β 42/40 e p-tau 181 allo scopo di valutare le performance diagnostiche sulla matrice plasmatica. L'AUC calcolata per l'A β 42 è risultata essere pari a 0,791 mentre l'AUC calcolata per l'A β 42/40 ha restituito un valore di 0,918 pertanto, come evidenziato nella figura 20 appare chiaro che, pur risultando entrambe valide (dato che $> 0,5$) l'A β 42/40 è più performante. L'AUC calcolata per p-tau 181 è risultata essere pari a 1,000 e dalla figura 21 si evince che p-tau 181 è ancora più performante. E' stato inoltre possibile valutare il valore per cui la sensibilità e la specificità del test risultano essere massime, andando a ricercare il cut off ottimale dei biomarcatori attraverso il calcolo dell'indice di Youden. Considerando l'A β 42/40 l'indice di Youden massimo è risultato essere pari a 0,688 a cui corrispondono una sensibilità dell'81,3% ed una specificità dell'87,5%. Per quanto riguarda p-tau 181 l'indice di Youden massimo è risultato essere pari a 1,000 a cui corrispondono una sensibilità del 100% ed una specificità del 100%. In questo caso sensibilità e specificità raggiungono valori ideali.

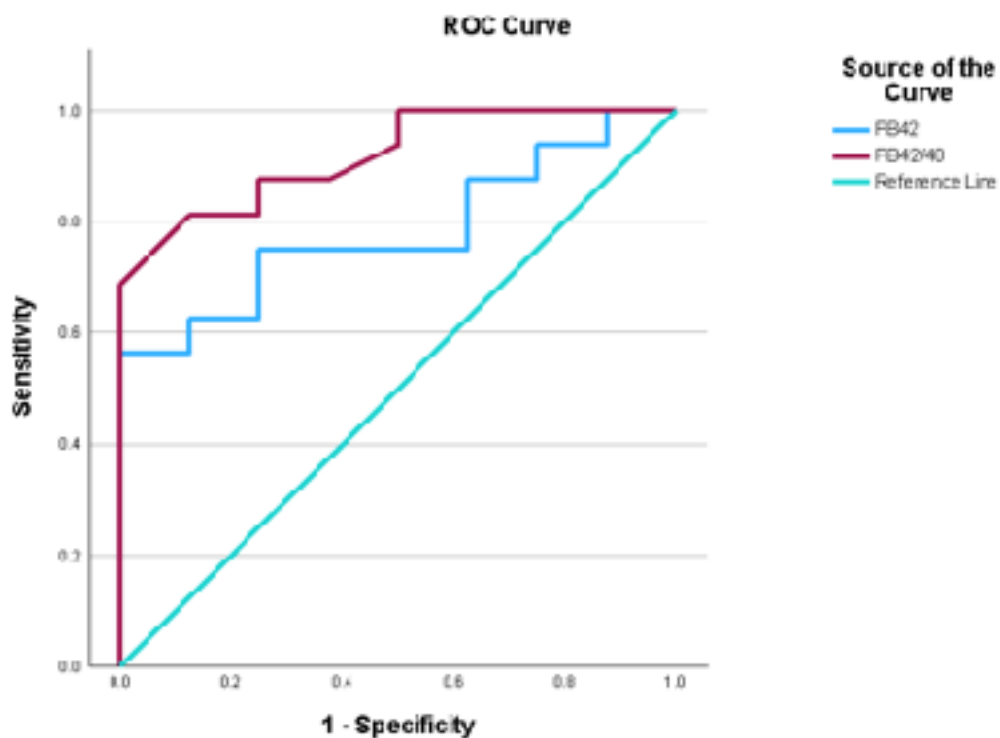


Figura 20: La curva ROC dei biomarcatori plasmatici Aβ42 e Aβ42/40.

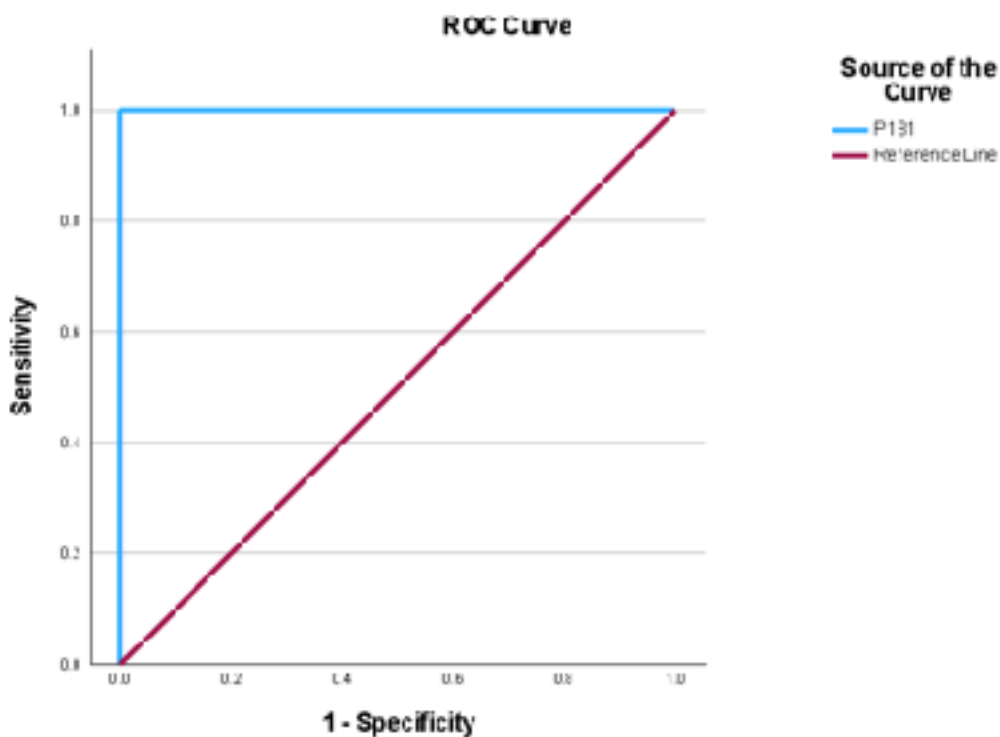


Figura 21: La curva ROC del biomarcatore plasmatico p-tau 181.

5. DISCUSSIONE

Lo studio vuole dimostrare la correlazione esistente tra le concentrazioni liquorali e plasmatiche dei biomarcatori, relativamente alla diagnostica clinica del morbo di Alzheimer, che rappresenta un grande problema per il singolo paziente e che è destinato ad aggravarsi parallelamente all'incremento dell'aspettativa di vita e dell'età media della popolazione. Attualmente la diagnosi sia del morbo di Alzheimer che delle altre demenze è basata sulla clinica e sul follow-up, tuttavia gli accertamenti strumentali disponibili non sono dotati della specificità necessaria per discriminare con certezza le diverse forme. L'insorgenza dei sintomi e dei segni clinici rappresenta inoltre un evento piuttosto tardivo nella storia naturale della malattia, dal momento che il processo patologico resta per molti anni a livello subclinico. Per queste ragioni la diagnosi è spesso effettuata con un certo ritardo e non sono infrequenti errori diagnostici, soprattutto nelle fasi iniziali. E' in quest'ottica che si pone lo studio dei biomarcatori liquorali, delle proteine presenti nel liquido cefalorachidiano dotate dell'importante caratteristica di essere correlate con il substrato patologico della malattia. Variazioni nei livelli di queste proteine possono indicare il processo neurodegenerativo in atto e possono essere utilizzate a fini diagnostici. La proteina amiloide β 42, la proteina tau totale e la proteina tau fosforilata sono i tre biomarcatori liquorali più studiati e più promettenti. È stato dimostrato che, grazie al dosaggio di queste proteine, è possibile distinguere anche precocemente il morbo di Alzheimer dalle altre forme di demenza e/o di danno neuronale. La malattia si associa ad un profilo dei biomarcatori liquorali piuttosto tipico, con $A\beta$ -42 ridotta e conseguente riduzione del rapporto tra la forma $A\beta$ 42 e la forma $A\beta$ 40, t-tau aumentata e p-tau aumentata. Tuttavia, non è ancora nota con precisione l'accuratezza diagnostica di tali marcatori, motivo per cui non è possibile attribuire loro una precisa funzione nella diagnosi delle demenze. Partendo da questi presupposti si è voluto valutare la correlazione tra le concentrazioni liquorali e plasmatiche dei biomarcatori, soprattutto in relazione all'applicazione nella pratica clinica, attraverso uno studio retrospettivo condotto su una coorte di pazienti con decadimento cognitivo e degenerazione neuronale. Dall'analisi dei dati ottenuti è subito stato evidente che tra i biomarcatori $A\beta$ 42 e $A\beta$ 42/40 liquorali, $A\beta$ 42/40 liquorale e $A\beta$ 42/40 plasmatico, p-tau 181 e t-tau liquorali, p-tau 181 liquorale e p-tau 181 plasmatico, NFL liquorali e NFL plasmatici,

A β 42 e A β 42/40 plasmatici esiste una correlazione positiva, dato che all'aumentare del primo si verifica un aumento del secondo. Sono state inoltre costruite le curve ROC dei biomarcatori A β 42, A β 42/40 e p-tau 181 allo scopo di valutare le performance diagnostiche sulla matrice plasmatica, ed è apparso chiaro che l'A β 42/40 è più performante dell'A β 42 ma p-tau 181 è ancora più rilevante. Ricercando il cut off ottimale dei biomarcatori, è stato invece dimostrato che p-tau 181 raggiunge valori ideali in termini sia di sensibilità (100%) che di specificità (100%).

6. CONCLUSIONI

Il liquido cerebrospinale, essendo a contatto diretto con lo spazio extracellulare cerebrale, è il fluido biologico più utilizzato per studiare gli eventi molecolari del cervello ed intensi sforzi di ricerca sono stati fatti per identificare marcatori biochimici in esso. Dal nostro lavoro è tuttavia emerso che esiste una correlazione positiva tra i biomarcatori liquorali e plasmatici, rendendo quindi possibile l'utilizzo in un prossimo futuro di una matrice più semplice da prelevare ed analizzare. La matrice plasmatica richiede un prelievo non invasivo effettuabile anche di routine, e la successiva ricerca dei biomarcatori presenti a questo livello può consentire di diagnosticare in tempi utili il morbo di Alzheimer, al fine di procedere al follow-up ed al trattamento del paziente prima che il decorso della malattia diventi irreversibile.

7. BIBLIOGRAFIA

- 1) Janeiro MH., et al. *Biomarkers in Alzheimer's disease* in "Adv Lab Med" anno 2021. Numero 2(1), pp 27-37.
- 2) Buffington AL., Lipski DM., Westfall E. *Dementia: an evidence-based review of common presentations and family-based interventions* in "J Am Osteopath Assoc" anno 2013. Numero 113(10), pp 768-775.
- 3) Wimo A., et al. *The worldwide economic impact of dementia 2010* in "Alzheimers Dement" anno 2013. Numero 9(1), pp 1-11.
- 4) Jack Jr CR., et al. *Hypothetical model of dynamic biomarkers of the Alzheimer's pathological cascade* in "Lancetta Neurol" anno 2010; Numero 9(1), pp 119-128.

- 5) Thal DR., et al. *Phases of A beta-deposition in the human brain and its relevance for the development of AD* in “Neurology” anno 2002. Numero 58(12), pp 1791-1800.
- 6) Allinquant B., Clamagirand C., Potier M-C. *Role of cholesterol metabolism in the pathogenesis of Alzheimer's disease* in “Curr Opin Clin Nutr Metab Care” anno 2014. Numero 17(4), pp 319-323.
- 7) Bayer TA., et al. *It all sticks together: the APP-related family of proteins and Alzheimer's disease* in “Mol Psychiatry” anno 1999. Numero 4(6), pp 524-8.
- 8) Koo EH., et al. *Precursor of amyloid protein in Alzheimer disease undergoes fast anterograde axonal transport* in “Proc Natl Acad Sci U S A” anno 1990. Numero 87(4), pp 1561-65.
- 9) Hardy J., Selkoe D.J. *The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics* in “Science” anno 2002. Numero 297(5580), pp 353-356.
- 10) Hardy J.A., Higgins G.A. *Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis* in “Science” anno 1992. Numero 256(5054), pp 184-185.
- 11) Haass C., et al. *Trafficking and proteolytic processing of APP* in “Cold Spring Harb Perspect Med” anno 2012. Numero 2(5):a006270.
- 12) Mucke L., Selkoe D.J. *Neurotoxicity of amyloid β -protein: synaptic and network dysfunction* in “Cold Spring Harb Perspect Med” anno 2012. Numero 2(7):a006338.
- 13) Maltsev A.V., et al. *Activation of neuronal defense mechanisms in response to pathogenic factors triggering induction of amyloidosis in Alzheimer's disease* in “J Alzheimers Dis” anno 2014. Numero 40(1), pp 19-32.
- 14) Folch J., et al. *Review of the advances in treatment for Alzheimer disease: strategies for combating β -amyloid protein* in “Neurology” anno 2018. Numero 33(1), pp 47-58.
- 15) Hardy J., Higgins G. *Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis* in “Science” anno 1992. Numero 256(5054), pp184-185.
- 16) Hardy J., Selkoe D. *The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics* in “Science” anno 2002. Numero 297(5580), pp 353-356.
- 17) Blennow K., De Leon MJ., Zetterberg H. *Alzheimer's Disease* in “Lancet” anno 2006. Numero 368(9533), pp 387-403.

- 18) Ono K. *Alzheimer's disease as oligomeropathy* in "Neurochem Int" anno 2018. Numero 119, pp 57-70.
- 19) Selkoe DJ., Hardy J. *The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years* in EMBO Mol Med" anno 2016. Numero 8(6), pp 595-608.
- 20) Braak H., Braak E. *Neuropathological staging of Alzheimer-related changes* in "Acta Neuropathol" anno 1991. Numero 82(4), pp 239-259.
- 21) Dickson DW., et al. *Neuropathology of frontotemporal lobar degeneration-tau (FTLD-tau)* in "J Mol Neurosci" anno 2011. Numero 45(3), 384-389.
- 22) Liu C., Götz J. *Profiling murine tau with 0N, 1N and 2N isoform-specific antibodies in brain and peripheral organs reveals distinct subcellular localization, with the 1N isoform being enriched in the nucleus* in "PLoS One" anno 2013; Numero 8(12):e84849.
- 23) Trinczek B., et al. *Domains of tau protein, differential phosphorylation, and dynamic instability of microtubules* in "Mol Biol Cell" anno 1995. Numero 6(12), pp 1887-1902.
- 24) Kar S., et al. *Repeat motifs of tau bind to the insides of microtubules in the absence of taxol* in "EMBO J" anno 2003. Numero 22(1), pp 70-77.
- 25) Lee G., Neve RL., Kosik KS. *The microtubule binding domain of tau protein* in "Neuron" anno 1989. Numero 2(6), pp 1615-1624.
- 26) Mandelkow EM., Mandelkow E. *Biochemistry and cell biology of tau protein in neurofibrillary degeneration* in "Cold Spring Harb Perspect Med" anno 2012. Numero 2(7):a006247.
- 27) Kanemaru K., et al. *Fetal-type phosphorylation of the tau in paired helical filaments* in "J Neurochem" anno 1992. Numero 58(5), pp 1667-1675.
- 28) Lee VM., Goedert M., Trojanowski JQ. *Neurodegenerative tauopathies* in "Annu Rev Neurosci" anno 2001; Numero 24(1), pp 1121-1159.
- 29) Kopke E., et al. *Microtubule-associated protein tau. Abnormal phosphorylation of a non-paired helical filament pool in Alzheimer disease* in "J Biol Chem" anno 1993. Numero 268(32), pp 24374-24384.
- 30) Schmitz C., et al. *Hippocampal neuron loss exceeds amyloid plaque load in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease* in "Am. J. Pathol" anno 2004. Numero 164(4), pp 1495-502.

- 31) Mudher A., Lovestone S. *Alzheimer's disease - do tauists and baptists finally shake hands?* in "Trends Neurosci" anno 2002. Numero 25(1), pp 22-6.
- 32) Williams DR. *Tauopathies: classification and clinical update on neurodegenerative diseases associated with microtubule-associated protein tau* in "Intern Med J" 2006. Numero 36(10), pp 652-60.
- 33) Mendez MF. *Early-Onset Alzheimer Disease* in "Neurol Clin" anno 2017. Numero 35(2), pp 263-281
- 34) Atri A. *The Alzheimer's Disease Clinical Spectrum: Diagnosis and Management* in "Med Clin North Am" anno 2019. Numero 103(2), pp 263-293.
- 35) Giri M., Zhang M., Lu Y. *Genes associated with Alzheimer's disease: an overview and current status* in "Clin Interv Aging" anno 2016. Numero 11, pp 665-681.
- 36) Cacace R., Slegers K., Van Broeckhoven C. *Molecular genetics of early-onset Alzheimer's disease revisited* in "Alzheimers Dement" anno 2016. Numero 12(6), pp 733-748.
- 37) Liu C-C., et al. *Apolipoprotein E and Alzheimer Disease: Risk, Mechanisms and Therapy* in "Nat Rev Neurol" anno 2013. Numero 9(2), pp 106-118.
- 38) Karch CM., Goate AM. *Alzheimer's disease risk genes and mechanisms of disease pathogenesis* in "Biol Psychiatry" anno 2015. Numero 77 (1), pp 43-51.
- 39) Mahley RW. *Apolipoprotein E: from cardiovascular disease to neurodegenerative disorders* in "J Mol Med" anno 2016. Numero 94, pp 739-746.
- 40) Lambert J.C., et al. *Meta-Analysis of 74.046 Individuals Identifies 11 New Susceptibility Loci for Alzheimer's Disease* in "Nat Genet" anno 2013. Numero 45(12), pp 1452-1458.
- 41) Kim J., Basak JM., Holtzman DM. *The role of apolipoprotein E in Alzheimer's disease* in "Neuron" anno 2009. Numero 63(3), pp 287-303.
- 42) Corbo RM., Scacchi R. *Apolipoprotein E (APOE) allele distribution in the world. Is APOE*4 a 'thrifty' allele?* in "Ann Hum Genet" anno 1999. Numero 63(Pt 4), pp 301-310.
- 43) Belloy ME., Napolioni V., Greicius MD. *A Quarter Century of APOE and Alzheimer's Disease: Progress to Date and the Path Forward* in "Neuron" anno 2019. Numero 101(5), pp 820-838.
- 44) Altmann A., et al. *Sex modifies the APOE-related risk of developing Alzheimer disease* in "Ann Neurol" anno 2014. Numero 75(4), pp 563-573.

- 45) Hebert LE., et al. *Age-specific incidence of Alzheimer's disease in a community population* in “JAMA” anno 1995. Numero 273(17), pp 1354-1359.
- 46) Morris JC., et al. *APOE predicts amyloid-beta but not tau Alzheimer pathology in cognitively normal aging* in “Ann Neurol” anno 2010. Numero 67(1), pp 122-131.
- 47) Qin B., et al. *Intake of niacin, folate, vitamin B-6, and vitamin B-12 through young adulthood and cognitive function in midlife: the Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA) study* in “Am J Clin Nutr” anno 2017. Numero 106(4), pp 1032-1040.
- 48) Durga J., et al. *Effect of 3-year folic acid supplementation on cognitive function in older adults in the FACIT trial: a randomised, double blind, controlled trial* in “Lancet” anno 2007. Numero 369(9557), pp 208-216.
- 49) Zhao C., et al. *Vitamin D intake is associated with dementia risk in the Washington Heights-Inwood Columbia Aging Project (WHICAP)* in “Alzheimers Dement” anno 2020. Numero 16(10), pp 1393-1401.
- 50) Zhang Y., et al. *Intakes of fish and polyunsaturated fatty acids and mild-to-severe cognitive impairment risks: a dose-response meta-analysis of 21 cohort studies* in “Am J Clin Nutr” anno 2016. Numero 103(2), pp 330-340.
- 51) Hill CM., et al. *Cognitive performance in high-altitude Andean residents compared with low-altitude populations: from childhood to older age* in “Neuropsychology” anno 2014. Numero 28(5), pp 752-760.
- 52) Huebbe P., et al. *APOE ε4 is associated with higher vitamin D levels in targeted replacement mice and humans* in “FASEB J” anno 2011. Numero 25(9), pp 3262-3270.
- 53) Panoramica del Cervello. Alzheimer’s Associations, anno 2024.
- 54) Decorso della Malattia. Centro Alzheimer - Sito del Laboratorio di Neuroimmagine ed Epidemiologia Alzheimer.
- 55) Okamura H., et al. *Combined exercise and cognitive training system for dementia patients: A Randomized Controlled Trial* in “Dement. Geriatr Cogn Disord” Anno 2018. Numero 45(5-6), pp 318-325.
- 56) Clancy U., et al. *Neuropsychiatric symptoms as a sign of small vessel disease progression in cognitive impairment* in “Cereb Circ Cogn Behav” anno 2022. Numero 3, pp 100041-100049.
- 57) Yarns B.C., et al. *Pathophysiology of Alzheimer’s Disease* in “Psychiatr Clin North Am” anno 2022. Numero 45(4), pp 663-676.

- 58) CLSI. Analysis of body fluids in clinical chemistry. Approved guideline. CLSI document C49-A. Wayne PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, anno 2007.
- 59) CLSI. Body fluid analysis for cellular composition. Approved guideline. CLSI document H56-A. Wayne PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, anno 2006.
- 60) International Organization for Standardization (ISO) 15189:2012. Medical laboratories requirements for quality and competence. Genova: ISO, anno 2012.
- 61) Deisenhammer F., et al. *Guidelines on routine cerebrospinal fluid analysis. Report from an EFNS task force* in “Eur J Neurol” anno 2006. Numero 13(9), pp 913-22.
- 62) Teunissen CE., et al. *A consensus protocol for the standardization of cerebrospinal fluid collection and biobanking* in “Neurology” anno 2009. Numero 73(22), pp 1914-22.
- 63) Deisenhammer F., et al. *EFNS guidelines on disease-specific CSF investigations* in “Eur J Neurol” anno 2009. Numero 16(6), pp 760-70.
- 64) Teunissen CE., et al. *Consensus guidelines for CSF and blood biobanking for CNS biomarker studies* in “Must Scler Int” anno 2011. Numero 2011, pp 246412.
- 65) Jerrard DA., Hanna JR., Schindelheim GL. *Cerebrospinal fluid* in “J Emerg Med” anno 2001. Numero 21(2), pp 171-8.
- 66) Feigin RD., et al. *Countercurrent immunoelectrophoresis of urine as well as of CSF and blood for diagnosis of bacterial meningitis* in “J Pediatr” anno 1979. Numero 89(5), pp 773-5.
- 67) Watson MA., Scott MG. *Clinical utility of biochemical analysis of cerebrospinal fluid* in “Clin Chem” anno 1995. Numero 41(3), pp 343-60.
- 68) Andersson M., et al. *Cerebrospinal fluid in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus report* in “J Neurol Neurosurg Psychiatry” anno 1994. Numero 57(8), pp 897-902.
- 69) Karikari TK, et al. *Blood phospho-tau in Alzheimer disease: analysis, interpretation, and clinical utility* in “Nat Rev Neurol” anno 2022. Numero 18(7), pp 400-18.
- 70) Esami del sangue. IRCCS HUMANITAS.
- 71) Martínez-Iglesias O., et al. *Epigenetic biomarkers as diagnostic tools for neurodegenerative disorders* in “Int J Mol Sci” anno 2021. Numero 23(1), pp 13.
- 72) Lewczuk P., et al. *Clinical significance of fluid biomarkers in Alzheimer’s Disease* in “Pharmacol Rep” anno 2020. Numero 72(3), pp 528-542.

- 73) Soluzioni per il test di diagnosi precoce della malattia di Alzheimer. FUJIREBIO.
- 74) Lewczuk P., et al. *Cerebrospinal Fluid A β 42/40 Corresponds Better than A β 42 to Amyloid PET in Alzheimer's Disease* in “J Alzheimers Dis” anno 2017. Numero 55(2), pp 813-822.
- 75) Leuzy A., et al. *Blood-based biomarkers for Alzheimer's disease* in “EMBO Mol Med” anno 2022. Numero 14:e14408.
- 76) McKhann GM., et al. *The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease* in “Alzheimers Dement” anno 2011. Numero 7(3), pp 263-269.
- 77) Henriques AD., et al. *Fluid and imaging biomarkers for Alzheimer's disease: Where we stand and where to head to* in “Exp Gerontol” anno 2018. Numero 107, pp 169-177.
- 78) Johnson KA., et al. *Brain imaging in Alzheimer disease* in “Cold Spring Harb Perspect Med” anno 2012. Numero 2(4):a006213.
- 79) Liu X., et al. *Use of multimodality imaging and artificial intelligence for diagnosis and prognosis of early stages of Alzheimer's disease* in “Transl Res” anno 2018. Numero 194, pp 56-67.
- 80) De Leon MJ, et al. *MRI and CSF studies in the early diagnosis of Alzheimer's disease* in “J Intern Med” anno 2004. Numero 256(3), pp 205-223.
- 81) Jack CR., et al. *Antemortem MRI findings correlate with hippocampal neuropathology in typical aging and dementia* in “Neurology” anno 2002. Numero 58(5), pp 750-757.
- 82) Sperling RA., et al. *Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease* in “Alzheimers Dement” anno 2011. Numero 7(3), pp 280-292.
- 83) Albert MS., et al. *The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease* in “Alzheimers Dement” anno 2011. Numero 7(3), pp 270-279.

- 84) Mattsson N., Zetterberg H., Blennow K. *Lezioni da studi multicentrici sui biomarcatori del liquido cerebrospinale per la malattia di Alzheimer* in “Int J Alzheimers Dis” anno 2010. Numero 2010, pp 610613.
- 85) Blennow K., Vanmechelen E., Hampel H. *CSF total tau, Abeta42 and phosphorylated tau protein as biomarkers for Alzheimer's disease* in “Mol Neurobiol” anno 2001. Numero 24(1-3), pp 87-97.
- 86) Jack CR Jr., et al. *A/T/N: An unbiased descriptive classification scheme for Alzheimer disease biomarkers* in “Neurology” anno 2016. Numero 87(5), pp 539-547.
- 87) Briggs R., Kennelly SP., O'Neill D. *Drug treatments in Alzheimer's disease* in “Clin Med” anno 2016. Numero 16(3), pp 247-253.
- 88) Atri A. *Current and Future Treatments in Alzheimer's Disease* in “Semin Neurol” anno 2019. Numero 39(2), pp 227-240.
- 89) Cummings JL., Tong G., Ballard C. *Treatment Combinations for Alzheimer's Disease: Current and Future Pharmacotherapy Options* in “J Alzheimers Dis” anno 2019. Numero 67(3), pp 779-794.
- 90) Cummings J., Ritter A., Zhong K. *Clinical Trials for Disease-Modifying Therapies in Alzheimer's Disease: A Primer, Lessons Learned, and a Blueprint for the Future* in “J Alzheimers Dis” anno 2018. Numero 64(s1), S3-S22.
- 91) Klimova B., Kuca K. *Alzheimer's disease: Potential preventive, non-invasive, intervention strategies in lowering the risk of cognitive decline - A review study* in “J Appl Biomed” anno 2015. Numero 13, pp 257-261.

8. RINGRAZIAMENTI

Un particolare ringraziamento alle persone che mi sono state accanto durante questo percorso. Ringrazio innanzitutto la mia relattrice, Professoressa Anna Aspesi, per la sua capacità nell'esposizione dei concetti che mi ha permesso di apprendere al meglio la materia, attivando la mia curiosità ed invogliandomi nel proseguire al fine di specializzare le mie conoscenze. La ringrazio inoltre per la sua disponibilità ed attenzione dimostrate durante la stesura del lavoro. Ringrazio il Dottor Giulio Mengozzi e le Dottoresse Gabriella Priolo, Selene Limoncelli e Silvia Boschi per l'aiuto fornitomi durante il tirocinio presso il laboratorio analisi della Città della Salute

e della Scienza di Torino, che mi ha permesso di accrescere le mie conoscenze in materia di sperimentazione ed analisi. Ringrazio ancora il Dottor Andrea Marcinnò per la pazienza dimostrata nei miei confronti e per il supporto fornitomi in qualsiasi momento ne avessi bisogno.

Ringrazio la mia famiglia per avermi appoggiata in questo percorso di studi, sostenendomi e credendo nelle mie potenzialità, e ringrazio i miei amici per la pazienza dimostratami nei momenti di tensione. Ringrazio infine me stessa, per la mia tenacia ed ambizione, che nonostante le piccole delusioni mi hanno sempre permesso di raggiungere lo scopo da me prefissato.

“We are the champions”