



Università degli Studi di Cagliari

DOTTORATO DI RICERCA

IN NEUROSCIENZE

Ciclo XXIX

**CORRELAZIONE TRA ACCUMULO DI LIPIDI NEUTRI NEI LINFOMONOCITI E
DEFICIT COGNITIVO IN UNA POPOLAZIONE DI ULTRASSESSANTACINQUENNI**

Settori scientifici disciplinari di afferenza

BIO/14, MED/09, MED/26

Presentata da:	Dott. Luca Serchisu
Coordinatore Dottorato	Prof. Antonio Argiolas
Tutor	Prof.ssa Antonella Mandas

Esame finale anno accademico 2015 – 2016

Tesi discussa nella sessione d'esame marzo – aprile 2017

Indice

Definizione e aspetti epidemiologici delle demenze.....	3
Aspetti storici e classificativi delle demenze.....	6
Obiettivi dello studio.....	23
Materiali e metodi.....	25
Risultati.....	30
Discussione.....	42
Conclusioni.....	48
Bibliografia.....	50
Abbreviazioni.....	55

Definizione e aspetti epidemiologici delle demenze

La demenza è una sindrome caratterizzata da una compromissione acquisita e permanente delle funzioni cerebrali superiori, che implica un'incapacità dell'individuo a rispondere alle proprie esigenze quotidiane, e si presenta clinicamente con deficit cognitivi, alterazioni dello stato emozionale e disturbi comportamentali (1).

Nella Tabella 1 sono riportate le principali cause di demenza secondo l'ultima edizione dell'International Classification Disease (ICD), dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS).

Tabella 1: Cause di demenza secondo ICD-10.

Malattia di Alzheimer
Demenza Vascolare
Malattia di Pick
Malattia di Creutzfeldt-Jacob
Malattia di Huntington
Malattia di Parkinson
Demenza correlata ad infezione HIV
Demenza correlata ad altre malattie*
Demenza non meglio specificata

* Lipidosi cerebrale, epilessia, degenerazione epatolenticolare, Ipercalcemia, Ipotiroidismi, Intossicazioni, malattia a corpi di Lewy, sclerosi multipla, neurosifilide, pellagra, poliartrite nodosa, lupus eritematoso sistemico, tripanosomiasi, uremia, deficit vitamina B12.

I dati epidemiologici, nonostante presentino una forte variabilità, indicano univocamente che la demenza è un disturbo molto frequente e fortemente correlato all'età: secondo i dati del World Alzheimer Report 2016 (2), le persone affette da demenza sono 47 milioni e la prevalenza nei paesi industrializzati è di circa l'8% negli ultrasessantacinquenni. Nelle regioni più povere il numero delle diagnosi di demenza è minore, come in Africa Sub-Sahariana (prevalenza 2-4 %), ma i dati di incidenza indicano un trend in aumento anche in questi paesi (2). Secondo l'OMS la stima annua dei nuovi casi incidenti di demenza nel mondo è di circa 9,9 milioni nel 2015: nei paesi ad alto reddito l'incidenza varia tra 3,5 casi ogni 1000 abitanti nella fascia di età tra i 60 e i 64 anni e i 124,9 ogni 1000 dopo i 90 anni; considerando le stesse fasce di età, nei paesi a reddito basso e intermedio l'incidenza varia tra 5,2 e 58 casi ogni 1000 abitanti (2). Le forme a insorgenza giovanile sono una minoranza e interessano maggiormente i maschi. Di contro, le demenze a insorgenza in età geriatrica hanno una prevalenza superiore nelle femmine, soprattutto nelle ultime decadi di vita (2). La Malattia di Alzheimer (DA) rappresenta la prima causa di demenza (50-70%), mentre la seconda è rappresentata dalla Demenza Vascolare (DV, 15-25%) (3). Secondo i dati ISTAT 2013 i soggetti affetti da demenza in Italia sono un milione, di cui 60000 affetti da DA (4).

Aspetti storici e classificativi delle demenze

Il termine demenza (dal latino *demens*, ovvero senza mente) venne introdotto nell'uso medico nel 1478, dopo il ritrovamento del trattato De Medicina di Aulo Cornelio Celso (I secolo d.C.), che definiva questa sindrome come alterazioni generiche del comportamento e dell'intelligenza, indipendentemente dall'età e dalla causa (5). Il deterioramento cognitivo correlato all'età, invece, sebbene fosse conosciuto già dall'antichità, fu oggetto di interesse scientifico solo in epoca moderna. Infatti, nel XVIII secolo, lo psichiatra francese Philippe Pinel fu il primo a definire la demenza come un disordine mentale tipico degli anziani e nella sua classificazione la distinse dagli altri disturbi psichiatrici noti (melanconia, mania e ritardo mentale) (6). Negli anni successivi, l'interesse verso i disturbi cognitivi crebbe progressivamente e vennero descritte le malattie che generano demenza. In particolare, nel 1907 Alois Alzheimer presentò il caso clinico di "Auguste D." in un Congresso a Tubingen, pur senza generare un forte interesse da parte dei colleghi. Per i successivi decenni, infatti, la DA è stata considerata una patologia rara e limitata ai soggetti giovani, distinta dalla demenza senile, considerata a sua volta come una conseguenza dell'invecchiamento (5). L'interesse per le demenze da parte del mondo scientifico, però, fu confermato e nel 1910 il termine demenza comparve nella ICD-2 (6). Successivamente la patologia dementigina è stata a lungo accostata ai disturbi schizoaffettivi, soprattutto nelle forme a insorgenza giovanile (*dementia praecox*), e solo nel 1965 la demenza è stata inquadrata come disturbo cognitivo e distinta in forme senili e presenili (ICD-8) (7, 8).

Nella pratica clinica, alle classificazioni ICD sono stati in genere preferiti altri modelli di categorializzazione, meglio rispondenti all'esigenza di una diagnosi non immediata, ma

graduale e basata sui sintomi. La prima distinzione operata è in forme reversibili, in genere secondarie ad alterazioni di altri organi o apparati (Tabella 2), e irreversibili. Nel corso della seconda metà del XX Secolo, in particolare in seguito alle pubblicazioni di Albert et al. del 1974 (9) e McHugh&Folstein del 1975 (10) che definirono meglio il concetto di demenza sottocorticale, entrò in uso classificare le demenze degenerative in forme corticali, quali la DA, la Malattia di Pick e la Malattia di Creutzfeldt-Jacob, e sottocorticali, come la Parkinson Demenza, la Paralisi Sopranucleare Progressiva, la Malattia di Huntington, la Degenerazione cortico basale (11). Oltre che per la differente localizzazione delle lesioni, le demenze corticali si caratterizzavano prevalentemente per difetti di linguaggio, prassia, percezione e cognizione spaziale, mentre le demenze sottocorticali per alterazioni motorie, bradifrenia e disturbi dell'emoattività; entrambe le forme di demenza presentavano disturbi della memoria e dell'attenzione (11).

Tabella 2: Cause di deficit cognitivo reversibile (Modificato da Heil A et al., 12).

Delirium
Disturbi psichiatrici (depressione, schizofrenia, disturbo maniacale)
Idrocefalo
Lesioni occupanti spazio (neoplasie cerebrali, ematomi subdurali)
Malattie metaboliche (deficit vitaminici, alterazioni della glicemia e idroelettrolitiche, distiroidismo, disparatiroidismo)
Tossicità da sostanze (etanolo, farmaci, sostanze d'abuso)
Sindrome post-traumatica
Epilessia
Malattie infettive e infiammatorie a localizzazione nel SNC (ascessi cerebrali, HIV, sifilide, LES, vasculiti, sarcoidosi)
Miscellanee (malattie respiratorie ostruttive croniche, sindrome dell'apnee del sonno, ipossia, dialisi)

Anche nel Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM) le demenze sono state inizialmente classificate in maniera generica, indipendentemente dalla patologia causale, come “Sindromi cerebrali croniche” (DSM-I, 1952) (13) e solo successivamente furono individuate come “Demenze degenerative primarie” (DSM-III, 1980) (14). Fino a quegli anni la DA era ancora considerata solo come demenza presenile; nel 1984, il National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke (NINCDS) e l’Alzheimer’s Disease and Related Disorders Association (ADRDA) (15) formularono nuovi criteri per la diagnosi di DA, che distinsero la malattia in certa, probabile e possibile (Tabella 3). Nella revisione del 1987 del DSM-III la DA fu inserita nei “Disturbi mentali organici” come “Demenza degenerativa primaria di tipo Alzheimer”, rendendo finalmente possibile il rimborso assicurativo nel sistema sanitario degli Stati Uniti d’America (16). Nel DSM-IV del 1994 i criteri per la diagnosi di DA furono ulteriormente elaborati (Tabella 4), in particolare rafforzando il concetto che la malattia debba essere causa di disabilità e di ridotta autonomia nelle attività di vita quotidiana (8).

Tabella 3: Classificazione diagnostica NINCDS- ADRDA per la diagnosi di DA (15).

CERTA (basata su riscontri neuro-patologici)
PROBABILE (definita su base clinica e confermata da test neuropsicologici, con deficit ad ingravescenza progressiva in due o più aree cognitive, tra cui memoria, con età d'esordio compresa tra 40 e 90 anni, ed assenza di disturbi di coscienza e patologie sistemiche che possano spiegare il deficit cognitivo)
POSSIBILE (presenza di deficit cognitivo isolato, progressivo e grave, presenza di elementi atipici nell'esordio, nella presentazione o nel decorso clinico, presenza di una patologia neurologica o sistemica concomitante in grado di determinare la demenza).

Tabella 4: Criteri per la diagnosi di DA secondo il DSM-IV (17).

<p>A. Sviluppo di deficit cognitivi multipli, manifestati da entrambe le condizioni seguenti:</p> <ol style="list-style-type: none">1) deficit della memoria (compromissione della capacità di apprendere nuove informazioni o di ricordare informazioni già acquisite)2) una (o più) delle seguenti alterazioni cognitive:<ol style="list-style-type: none">a) afasia (alterazione del linguaggio)b) aprassia (alterazione della capacità di eseguire attività motorie nonostante l'integrità della funzione motoria)c) agnosia (incapacità di riconoscere o di identificare oggetti nonostante l'integrità della funzione sensoriale)d) disturbo delle funzioni esecutive (cioè, pianificare, organizzare, ordinare in sequenza, astrarre)
<p>B. Ciascuno dei deficit cognitivi dei Criteri A1 e A2 causa una compromissione significativa del funzionamento sociale o lavorativo, e rappresenta un significativo declino rispetto ad un precedente livello di funzionamento.</p>
<p>C. Il decorso è caratterizzato da insorgenza graduale e declino continuo delle facoltà cognitive</p>
<p>D. I deficit cognitivi dei Criteri A1 e A2 non sono dovuti ad alcuno dei seguenti fattori:</p> <ol style="list-style-type: none">1) altre condizioni del sistema nervoso centrale che causano deficit progressivi della memoria e delle facoltà cognitive (per es., malattia cerebrovascolare, M. di Parkinson, M. di Huntington, ematoma sottodurale, idrocefalo normoteso, tumore cerebrale)2) affezioni sistemiche che sono riconosciute come causa di demenza (per es., ipotiroidismo, deficienza di vitamina B12 o acido folico, deficienza di niacina, ipercalcemia, neurosifilide, infezione HIV)3) affezioni indotte da sostanze.
<p>E. I deficit non si presentano esclusivamente durante il decorso di un delirium</p>

Nel Sistema Sanitario Nazionale (SSN) italiano l'approccio clinico alle demenze è stato profondamente influenzato dal Decreto del Ministero (DMin) della Sanità del 20 luglio 2000 (18), che ha istituito un percorso clinico-assistenziale attraverso la rete delle Unità di Valutazione Alzheimer finalizzato al trattamento della DA e alla prescrizione dei farmaci anti-colinesterasici e della memantina (18). Nell'allegato del DMin era riportato il "Protocollo di monitoraggio dei piani di trattamento farmacologico per la Malattia di Alzheimer" (Progetto Cronos), con i criteri diagnostici per la DA (Tabella 5) (18). Attraverso i criteri del DMin si è confermata l'impostazione del DSM-III e IV basata soprattutto sulla storia clinica. Tuttavia, l'esigenza di proporre una terapia ai pazienti con deficit cognitivo ha comportato, con forte probabilità, una sovrastima delle diagnosi di DA.

Tabella 5: Criteri per la diagnosi di DA secondo il Progetto Cronos (18).

<p>A) Criteri che devono essere presenti contemporaneamente</p> <ul style="list-style-type: none">- Demenza stabilita con esami e documentati con test oggettivi (ad es. MMSE)- Disturbi della memoria e di almeno un'altra funzione cognitiva (ad es. linguaggio o percezione)- Progressivo deterioramento della memoria e di almeno un'altra funzione cognitiva- Nessun disturbo della coscienza- Comparsa tra i 40 e i 90 anni- Assenza di altre patologie del SNC o malattie sistemiche che possano causare demenza
<p>B) Criteri a supporto della diagnosi</p> <ul style="list-style-type: none">- Compromissione delle abilità motorie- Riduzione dell'indipendenza nelle attività di vita quotidiana- Storia familiare di disturbi simili- Quadro di neuroimaging

Alla fine dell'ultimo decennio del XX Secolo, è stato fatto un ulteriore passo avanti nella descrizione del decadimento cognitivo, introducendo il concetto di Mild Cognitive Impairment (MCI), per individuare i soggetti con un deficit cognitivo lieve, isolato e potenzialmente a rischio di sviluppare DA, e quindi per meglio caratterizzare la fase di transizione tra l'invecchiamento normale e la demenza (Tabella 6) (19).

Tabella 6: Caratteristiche cliniche del MCI amnesico (19).

1. Presenza di disturbi soggettivi di memoria riferiti dal paziente o da un familiare
2. Deficit obiettivi di memoria misurabili con test psicometrici
3. Autonomia nella vita quotidiana conservata
4. Altre funzioni cognitive nella norma
5. Assenza di demenza o di altre condizioni che possano spiegare il deficit organico

Più recentemente, i criteri proposti nel 1984 per la diagnosi di DA sono stati rielaborati da un gruppo di esperti (20, 21), con lo scopo di individuare forme precliniche del disturbo, attraverso l'utilizzo combinato di esami clinici e strumentali e marker biologici. A tal fine, è stata introdotta una nuova classificazione per la DA che prende in considerazione gli stadi precoci della malattia, distinguendo tre fasi: pre-clinica, prodromica e di malattia conclamata (Tabella 7) (20, 21). Tali criteri sono stati sollecitati dall'avvento delle nuove metodiche diagnostiche, ovvero la Risonanza Magnetica Nucleare (RMN) ad alta definizione, Tomografia ad Emissione di Positroni (PET) con fluorodesossiglucosio e il dosaggio della Beta-amiloide e della Proteina Tau nel Liquido Cefalo-Rachidiano (LCR) (Tabella 8).

Tabella 7: Classificazione della DA secondo Dubois (20).

<p>Fase preclinica: periodo asintomatico compreso tra l'instaurarsi dei processi patologici della malattia e la manifestazione dei primi sintomi clinici.</p>
<p>Fase prodromica: presenza di disturbi di memoria episodica con impermeabilità al cueing (la rievocazione di stimoli appresi viene facilitata da indizi) e presenza di biomarker nel liquido cerebrospinale o cambiamenti patologici propri della DA, individuati tramite tecniche di neuroimmagini</p>
<p>Fase sintomatica: presenza di sintomi cognitivi che interferiscono con le attività di vita quotidiana e lavorative</p> <p>DA tipica (alterazioni cerebrali a carico delle strutture temporo-mediali, dell'ippocampo e della corteccia entorinale, disturbo a carico dei processi di memoria e di un altro dominio cognitivo, positività ad uno o più biomarker)</p> <p>DA atipica (include sindromi focali corticali non-amnesiche, quali afasia progressiva primaria non fluente, afasia logopenica, atrofia corticale posteriore, variante frontale della DA ed evidenze in vivo di amiloidosi nel cervello o nel LCR)</p> <p>DA mista (patologia Alzheimer in concomitanza con altre cause biologiche che determinano un declino cognitivo come la malattia cerebrovascolare).</p>

Tabella 8: Metodiche per la diagnosi precoce di DA (22).

Metodica	Misurazione
RMN ad alta definizione	Misurazione volume ippocampale
PET con fluorodesossiglucosio	Misurazione attività metabolica nelle regioni temporo-parietali e del cingolo posteriore
Rachicentesi	Dosaggio di proteina Tau e Beta-amiloide nel LCR

Nel 2011 anche il National Institute on Aging (NIA) ha proposto una ridefinizione dei criteri diagnostici per DA (23), aggiungendo alle precedenti definizioni, che individuavano DA probabile o possibile, un terzo criterio basato sulla positività dei biomarcatori tipici della DA (Tabella 9) (23). Con questi criteri la diagnostica delle demenze, in particolare per la DA, individua nelle metodiche strumentali e laboratoristiche un supporto fondamentale, sebbene le stesse siano mal distribuite nel territorio e richiedano di effettuare una manovra invasiva, come la rachicentesi.

Tabella 9: Criteri NIA per la diagnosi di DA (23).

<p>DA probabile: i sintomi hanno un esordio insidioso, esiste una chiara storia di compromissione cognitiva progressiva, i deficit si presentano in forma amnestica o non amnestica, senza disturbi cerebrovascolari o altre patologie neurologiche o mediche maggiori che possano spiegare i sintomi.</p>
<p>DA possibile: decorso atipico con esordio improvviso, presenza di malattia cerebrovascolare concomitante o di altro disturbo che possa avere conseguenze sulle capacità cognitive.</p>
<p>DA probabile o possibile con evidenza dei processi fisiopatologici della DA: diagnosticata rispettivamente quando: sono rispettati i criteri per DA e si riscontra la presenza di biomarker; il paziente soddisfa i criteri per una demenza non – Alzheimer, ma presenta comunque i biomarker tipici del processo patologico di DA.</p>

Riguardo all'adozione di questi nuovi criteri per definire DA, la Società Italiana di Neurologia delle Demenze (SINDEM) stilò nel 2012 un position paper nel quale veniva criticata la scelta di incentrare la diagnosi sulla positività dei biomarker (24). In particolare, i neurologi italiani si sono espressi favorevolmente per mantenere la diagnosi preclinica di DA e una fase asintomatica a rischio di DA, ribadendo però l'impossibilità di adoperare i marker strumentali e di laboratorio nella pratica clinica routinaria, per insufficienti evidenze (24).

Nel 2013 è stata pubblicata l'ultima edizione del DSM, che ha incluso le demenze nel capitolo dei "Disturbi neurocognitivi", suddivisi sulla base della gravità in maggiori e lievi. Nel DSM 5 la diagnosi dei disturbi neurocognitivi è rimasta di tipo clinico (25).

Tabella 10: Criteri diagnostici per le demenze secondo il DSM 5 (25).

Disturbi neurocognitivi maggiori
<p>A. Evidenza di un declino significativo nelle funzioni cognitive rispetto a un livello precedente in uno o più dei seguenti domini cognitivi basata su:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Preoccupazione dell'individuo, di un testimone affidabile o di un clinico relativa all'esistenza di un significativo declino cognitivo. 2. Una compromissione sostanziale nelle performances cognitive, documentata preferenzialmente da delle prove neuropsicologiche standardizzate o in difetto, da un'altra valutazione clinica quantitativa.
B. Il deficit cognitivo interferisce con le attività quotidiane
C. Il deficit cognitivo non avviene esclusivamente in presenza di un delirium m
D. Il deficit cognitivo non è meglio spiegato da altri disordini mentali
Disturbi neurocognitivi lievi
<p>A. Evidenza di un declino modesto nelle funzioni cognitive rispetto a un livello precedente in uno o più domini cognitivi basata su:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Preoccupazione dell'individuo, di un testimone affidabile o di un clinico relativa all'esistenza di un modesto declino cognitivo. 2. Una compromissione lieve nelle performances cognitive, documentata preferibilmente da delle prove neuropsicologiche standardizzate o in difetto, da un'altra valutazione clinica quantitativa.
B. Il deficit cognitivo non interferisce con le attività quotidiane
C. Il deficit cognitivo non avviene esclusivamente in presenza di un delirium
D. Il deficit cognitivo non è meglio spiegato da altri disordini mentali

Allo stato attuale la DA resta la patologia dementigena su cui si versa il maggiore interesse del mondo scientifico. Nonostante i progressi tecnologici, ancora manca uno strumento che consenta di stabilire precocemente la presenza di disturbo neurodegenerativo, quale per esempio la DA. Poiché il Sistema Nervoso Centrale (SNC) non è accessibile in vivo, è indispensabile individuare un marcatore surrogato di danno del SNC.

Obiettivi dello studio

In un precedente studio abbiamo riportato che i Linfo-Monociti (LM) isolati a fresco (naïve) da sangue periferico, prelevato in pazienti affetti da DA e in alcuni loro parenti di primo grado, presentavano un accumulo di Lipidi Neutri (LN), rappresentati principalmente da Esteri del Colesterolo (EC), nel loro citoplasma (26, 27). Questa evidenza suggeriva che l'aumento dei LN nei LM, riflettendo una possibile alterazione del metabolismo del colesterolo cerebrale, potrebbe avere un ruolo nella patogenesi della DA. Nei precedenti lavori, abbiamo utilizzato differenti approcci metodologici per stabilire il contenuto di LN nei LM, come l'estrazione mediante solvente, la cromatografia su strato sottile, marcatura con ¹⁴Carbonio-acetato, colorazioni Nile red e Oil Red O (ORO): attraverso tutte queste tecniche abbiamo confermato la presenza di alti livelli di LN nei LM prelevati da pazienti affetti da DA (26-28). Tra queste metodiche abbiamo scelto la colorazione ORO, in quanto è la più semplice, veloce ed economica, e richiede una minima quantità di sangue (500 µl) (26-28). In questi nostri studi abbiamo evidenziato, inoltre, che i LM prelevati da pazienti con DA hanno, contrariamente ai controlli di pari età, una tendenza all'aggregazione spontanea in vitro, dando luogo alla Formazione di Cluster (FC) di cellule, in maniera simile a quanto si verifica in seguito all'attivazione della mitosi dopo trattamento con fitoemoagglutinina (PHA) dei LM (26,27). Abbiamo quindi considerato che la FC nei LM naïve in vitro potrebbe essere un segnale dello loro attivazione in vivo (29). La valutazione dell'entità di FC dei LM non stimolati in vitro potrebbe essere, quindi, insieme alla colorazione ORO, un ulteriore marcatore per individuare i soggetti affetti da DA o a rischio di sviluppare la malattia.

Poiché DA e DV presentano diverse caratteristiche fisiopatologiche e cliniche in comune (30), abbiamo ipotizzato che la colorazione ORO e il tasso di FC possa essere utile nella diagnosi precoce anche di DV e Demenza Mista (DM). Nel presente studio abbiamo determinato la colorazione ORO e il tasso di FC in LM isolati a fresco prelevati da soggetti non affetti da demenza (controlli) e da soggetti affetti da DA, DV e DM. Abbiamo inoltre incluso campioni provenienti da individui con MCI.

Il nostro scopo è stato di verificare se l'incremento del contenuto dei LN e della FC nei LM possa rappresentare un marcatore di neurodegenerazione e se quest'aumento sia presente già nelle fasi precoci di malattia.

Sono state descritte, infine, numerose analogie tra patologie come DA e DV e diversi processi degenerativi oculari correlati all'età, in particolare la cataratta, la retinopatia diabetica, il glaucoma e la degenerazione maculare senile (DMS), tutte cause frequenti di deficit del visus e cecità in età geriatrica (31). Tutti questi disordini oculari sono accomunati da una degenerazione multifattoriale del tessuto del SNC (31). Per validare la colorazione ORO e l'entità di FC come potenziale marcatore di danno del SNC, abbiamo esteso lo studio anche ai più comuni disordini oculari correlati all'età.

Materiali e metodi

Sono stati arruolati 192 soggetti di età ≥ 65 anni, selezionati a random da un database anonimo di 1320 soggetti, relativo alle visite geriatriche praticate presso lo specifico ambulatorio dell'Azienda Ospedaliero Universitaria di Cagliari tra gennaio 2006 a dicembre 2013. Tutti i pazienti sono stati ricontattati e poi sottoposti a visita e prelievo di 10 ml sangue venoso per la valutazione dei LN attraverso la colorazione ORO. Durante la visita ogni paziente, o in sua vece il suo tutore legale, ha espresso il consenso informato scritto per effettuare queste procedure, e quindi per adoperare in modo anonimo i dati raccolti e per il campione ematico per finalità di ricerca. E' stata quindi effettuata l'anamnesi, l'esame obiettivo e la Valutazione Multi-Dimensionale Geriatrica (VMD-G). La diagnosi di DA probabile o possibile è stata posta secondo i criteri NINCDS-ADRDA (15). La diagnosi di DV possibile o probabile è stata posta secondo i criteri NINCDS-AIREN (32). Per supportare la diagnosi differenziale tra DA e DV è stata utilizzata la diagnostica per immagini (tomografia computerizzata e/o risonanza magnetica cerebrale, in accordo con le linee guida del Health Quality Ontario) (33). Il MCI è definito sulla base di criteri clinici, cognitivi e funzionali. Come per la diagnosi di demenza, non esiste uno specifico test di laboratorio neppure per il MCI. Pertanto, la diagnosi di MCI è stata effettuata sulla base del rilievo di un lieve deficit cognitivo interessante il dominio mnesico, con preservazione dell'indipendenza nelle abilità funzionali, secondo i criteri di Petersen (34). I soggetti privi di demenza e MCI sono stati inclusi nel gruppo di controllo.

La presenza di dislipidemie, ipertensione arteriosa e diabete mellito, così come la diagnosi di aterosclerosi e disturbi oculari è stata stabilita sulla base di un'analisi dettagliata della storia clinica e, se clinicamente indicati, la prescrizione di esami laboratoristici e strumentali mirati.

Valutazione multidimensionale geriatrica:

La VMD-G comprendeva le seguenti scale di valutazione:

- Mini Mental State Examination (MMSE) secondo Folstein: scala per la valutazione delle capacità cognitive; i punteggi variano da 0 (massimo deficit cognitivo) a 30 (deficit cognitivo assente); un punteggio inferiore a 24 è indicativo di deficit cognitivo. I punteggi ottenuti sono stati corretti per età e scolarità (35);
- Geriatric Depression Scale (GDS) a 15 items: scala per la valutazione dell'umore; i punteggi variano da 0 a 15 e punteggi superiori a 5 sono indicativi di depressione del tono dell'umore (36);
- Activities of Daily Living (ADL) secondo Barthel: scala per lo studio dell'autonomia nelle attività di base della vita quotidiana; i punteggi variano da 0 (totale dipendenza) a 100 (piena autonomia) (37);
- Instrumental Activities of Daily Living (IADL) secondo Lawton: scala per lo studio dell'autonomia nelle attività strumentali della vita quotidiana; i punteggi variano da 0 (totale dipendenza) a 8 (piena autonomia) (38);
- Cumulative Illness Rating Scale (CIRS) secondo Parmalee: scala per la valutazione delle comorbilità; la CIRS è costituita da 14 domini (ognuno indicativo di un

apparato/sistema o organo) e a ciascun dominio è assegnato un punteggio da 1 (nessuna compromissione) a 5 (massima compromissione). Nella CIRS, oltre a un punteggio totale (T-CIRS), ottenuto dalla somma dei risultati dei 14 domini, sono individuabili tre diversi indici: Maximum Impairment (MI-CIRS) è il punteggio maggiore attribuito agli items, Comorbidity Index (CI-CIRS) è il numero degli items che riporta un punteggio pari o superiore a 3, Severity Index (SI-CIRS) è la media di tutti gli items escluso quello relativo ai disturbi psichiatrici (39).

Valutazione dei LN e della FC con la colorazione ORO

Il campione di sangue, prelevato dai pazienti in provette da emocromo contenenti EDTA, è stato successivamente inserito in una provetta tipo Eppendorf da 1,5 ml. Le provette sono state sottoposte a centrifuga di 5000 g al minuto per 10 minuti. Dopo la centrifuga i LM sono stati prelevati, con l'utilizzo di micropipette, dall'anello centrale di colore bianco (buffy coat), dove risultano stratificati i leucociti, e successivamente trasferiti in una piastra a 6 pozzetti. I LM sono stati lavati per tre volte con una soluzione salina tamponata con fosfato (STP) e fissati per 10 minuti con formalina neutra tamponata al 10%. Le cellule sono state quindi trattate con alcool isopropilico al 60%, lavate, colorate con 1 ml di soluzione ORO e incubate a temperatura ambiente per alcuni minuti. È stata adoperata l'ematossilina, come colorante di contrasto, per visualizzare il nucleo cellulare. L'eccesso di colorante ORO è stato rimosso attraverso i lavaggi delle cellule con soluzione salina tamponata con fosfato per 3 cicli di 3 minuti ciascuno. Dopo la colorazione ORO, le cellule sono state fotografate con un microscopio ottico a fase invertita, su cui era montata una camera digitale, con un ingrandimento di 400x. Per ciascun campione, infine, sono state riprodotte due immagini,

analizzate da due diversi osservatori in cieco. Come risultato finale è stata considerata la media dei due punteggi.

L'intensità del rosso è stata valutata con una scala semi-quantitativa da entrambi gli osservatori, secondo la seguente gradazione da 0 a 4:

0 assenza di colorazione ORO

1 colorazione ORO limitata a poche cellule o colorazione scarsamente visibile

2 colorazione ORO focale o diffusa ma a bassa intensità (ben visibile con una bassa illuminazione)

3 colorazione ORO multifocale o di intensità diffusamente moderata

4 colorazione ORO diffusamente intensa

La FC dei LM è stata valutata attraverso una scala semiquantitativa da 0 a 2, secondo la seguente gradazione:

0 cellule non aggregate o aggregati cellulari molto scarsi

1 moderato numero di aggregati cellulari

2 alto numero di aggregati cellulari

L'intensità del rosso alla colorazione ORO è stata valutata anche attraverso il software Image J (National Institutes of Health, United States), selezionando manualmente un'area di interesse (ROI, Region of Interest) e calcolando la percentuale d'area di cellule colorate (PACC).

Analisi statistiche

Le variabili quantitative sono state espresse come media \pm deviazione standard ($M \pm DS$). I dati sono stati analizzati attraverso il *t*-test di Student per campioni indipendenti. Tutte le variabili sono state valutate con il test Kolmogorov-Smirnov (K-S) per valutare la distribuzione. Per comparare le differenze parametriche tra i vari tipi di demenza e i disturbi oculari è stata effettuata l'analisi della varianza (ANOVA) seguita dal test post hoc di Bonferroni. Per i dati categoriali è stato adoperato il test del Chi-quadro (χ^2). Successivamente l'analisi statistica è stata completata con il Coefficiente di Correlazione per ranghi di Spearman per determinare la correlazione di colorazione ORO, CF, MMSE ed età. Sono stati adoperati i software Excel, per le analisi, e XLSTAT 2014, per la grafica.

Risultati

Sono stati arruolati nello studio 192 soggetti, di cui 68 affetti da demenza (20 con DA, 14 con DM e 34 con DV), 29 con MCI e 95 cognitivamente integri (controlli).

L'analisi di comparazione dell'età media con il *t*-test non mostrava differenze significative tra il gruppo dei pazienti affetti da demenza e quello dei controlli (Tabella 11).

Tabella 11. Punteggi della VMD-G nel gruppo di controllo e nei soggetti con demenza.

Variabili	N	Tutti	Controlli	Demenza	MCI	DA	DM	DV
N		192	95	68	29	20	14	34
Genere (F/M)		124/68	52/43	58/10	14/15	16/4	10/4	32/2
ETÀ, anni	192	77.7±7.0	78.4 ±6.8	77.0± 6.3	77.2± 8.6	77.5±6.8	73.7±3.6	78.1±6.4
MMSE, score	192	23.4±5.8	27.3±1.7	17.7± 5.2*	24.3±4.5§ †	18.2±4.3	16.1±7.1	18.1±4.6
GDS, score	192	8.0± 4.3	6.3±3.8	10.6 ±3.5*	7.8±4.4§	11.1±2.8	10.4±4.3	10.3± 3.6
ADLs, score	120	74.9± 21.0	79.0±20.5	71.1±19.8	74.4±23.8	66.9±16.9	71.0±18.4	75.4±22.2
IADL, score	118	3.2± 2.5	4.6±2.5	1.9± 1.7*	2.9±2.3§ †	1.6±1.4	1.9±1.5	2.1±1.9
CIRS-T, score	108	33.3±4.4	32.6±5.0	34.2 ±3.5	32.7±4.4	35.1±3.3	33.3±4.0	34.1±3.2
CIRS-MI	108	3.7± 0.7	3.6±0.7	3.8 ±0.8	3.5±0.6§	3.9±0.7	3.8±0.8	3.8±0.7
CIRS-SI	108	2.3±0.3	2.3±0.4	2.4± 0.3	2.3±0.3	2.5±0.2	2.3±0.3	2.3±0.2
CIRS-CI	108	7.5±2.0	7.4±2.4	7.7±1.7	7.1± 2.0	8.4±1.5	7.5± 1.6	7.4± 1.7

I risultati sono presentati come media ± deviazione standard (DS). La significatività statistica al *t*-test è indicata qui di seguito in grassetto.

* Gruppo Controllo vs Gruppo Demenza: Età, $P=0.207$; MMSE, $P<0.001$; GDS, $P<0.001$; ADL, $P=0.973$; IADL, $P<0.001$; CIRS-T, $P=0.090$; CIRS-MI, $P=0.719$; CIRS-SI, $P=0.492$; CIRS-CI, $P=0.419$.

§ Gruppo Demenza vs Gruppo MCI: Età, $P=0.894$; MMSE, $P<0.001$; GDS, $P<0.001$; ADL, $P=0.576$; IADL, $P=0.014$; CIRS-T, $P=0.082$; CIRS-MI, $P=0.002$; CIRS-SI, $P=0.437$; CIRS-CI, $P=0.252$.

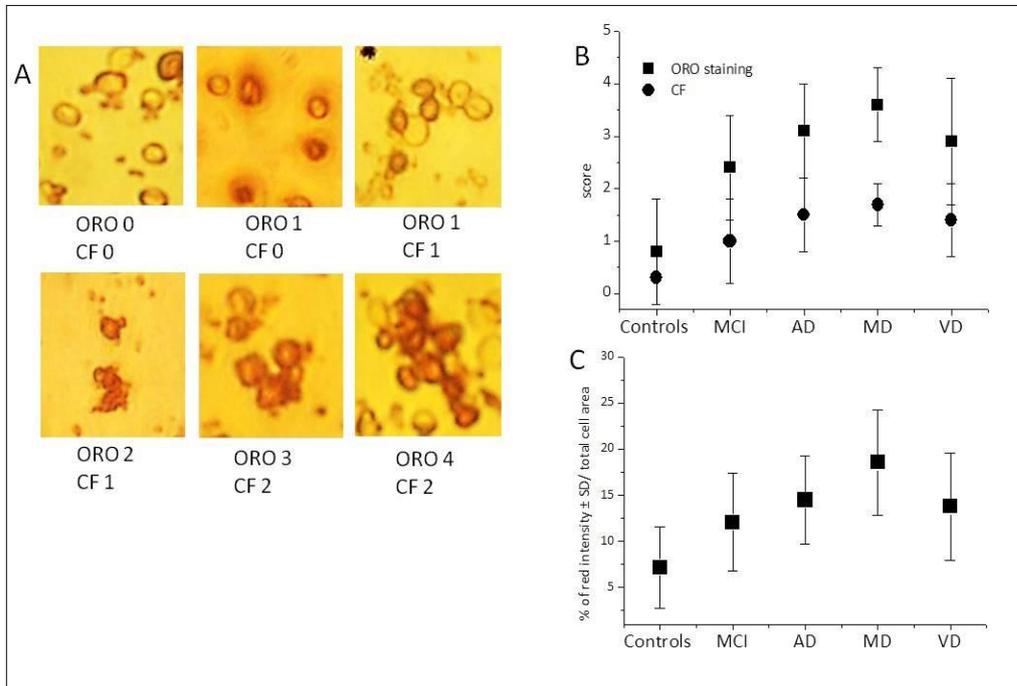
† Gruppo Controllo vs Gruppo MCI: Età, $P=0.437$; MMSE, $P<0.001$; GDS, $P=0.076$; ADL, $P=0.311$; IADL, $P=0.001$; CIRS-T, $P=0.923$; CIRS-MI, $P=0.488$; CIRS-CI, $P=0.542$

Come atteso, i soggetti con demenza presentavano punteggi più bassi al MMSE e alle IADL e più alti alla GDS, mentre le altre scale di valutazione della VMD-G non evidenziavano differenze significative tra i due gruppi. I soggetti con MCI presentavano punteggi al MMSE e alle IADL significativamente inferiori rispetto ai controlli, ma superiori rispetto a quelli con demenza. Inoltre il gruppo con MCI presentava score inferiori alla GDS e alla CIRS-MI rispetto a quelli con demenza. Al test K-S, con valore di alfa pari a 0,05, non era possibile rigettare l'ipotesi nulla di assenza di differenze tra la distribuzione teorica ed empirica dei punteggi ottenuti alla VMD-G nei soggetti MCI, DA, DM e DV. E' stata quindi applicata l'analisi della varianza ANOVA seguita dal test post hoc di Bonferroni. La media dei punteggi di ciascun subtest della VMD-G dei quattro sottogruppi di soggetti con decadimento cognitivo è riassunta nella Tabella 2. Sono stati rilevate differenze significative nei punteggi del MMSE ($F=11,911$, $df = 3$, $P < 0,0001$) e della GDS ($F=12.375$, $df = 4$, $P, <0.0001$). Nessuna differenza è stata evidenziata per l'età e gli altri punteggi della VMD-G in tutti e quattro i sottogruppi dei soggetti con decadimento cognitivo. Il test post hoc di Bonferroni ha evidenziato che nei soggetti con MCI i punteggi del MMSE erano più alti e quelli della GDS più bassi, rispetto a tutti i sottogruppi dei soggetti affetti da demenza.

Successivamente, abbiamo valutato i LN nei LM dei soggetti affetti da DA, DV, DM e MCI, e nei controlli. Nella figura 1A sono riportate le immagini delle cellule viste al microscopio ottico a fase invertita, rappresentative dell'intensità di colorazione (score da 0 a 4) e della FC (score da 0 a 2). Gli score ORO e PACC sono risultati più alti nei LM di soggetti con demenza rispetto ai controlli. La colorazione ORO non differiva significativamente tra i sottogruppi DA, DM e DV, mentre nei soggetti MCI risultava maggiore rispetto ai controlli e minore rispetto ai soggetti DA, DM e DV (Figure 1B e 1C). E' stato inoltre evidenziato che i LM naïve prelevati

dai pazienti affetti da demenza e MCI presentavano una tendenza ad aggregarsi in vitro in clusters di piccole, medie o grandi dimensioni (Figura 1A), in maniera simile ai LM in coltura dopo attivazione mitogena con PHA. La FC assumeva un pattern simile a quanto sopra descritto per la colorazione ORO; in particolare, lo score di FC era significativamente inferiore nei controlli rispetto agli altri quattro gruppi e maggiore in DA, DM e DV rispetto ai MCI (Figure 1B e 1C). Poiché c'era una disparità di genere nei diversi gruppi, abbiamo confrontato i maschi e le femmine per quanto riguarda l'età, i punteggi della VMD-G, la colorazione ORO (ORO score e PACC) e la FC (Tabella 12).

Figura 1: Intensità di colorazione ORO e FC dei LN nei LM.



- A. Rappresentazione della scala semiquantitativa dello score ORO (da 0 a 4) e FC (da 0 a 2)
- B. Media \pm DS degli score ORO e FC
- C. Media \pm DS di PACC

Tabella 12: Distribuzione statistica del genere (M/F) nella popolazione esaminata.

n	Femmine	Maschi	Femmine senza demenza	Maschi senza demenza	Femmine con MCI	Maschi con MCI	Femmine con demenza	Maschi con demenza
ETÀ	77.4±6.9	78.4±7.0	78.7±7.3	77.9±6.1	75.8±7.1	78.6±9.6	76.4±6.3	80.2±5.4
MMSE score	22.3±6.0	25.5±4.7*	27.0± 1.6	27.6±1.8	25.0±2.5	23.6±5.7	17.4±5.2	19.4±5.1
GDS, score	9.3±4.1	5.7±3.7*	7.2±3.8	5.1±3.5§	10.9±3.2	4.9±3.2	10.7±3.7	9.6±2.6
ADLs score	75.5±18.0	73.6±26.0	77.8± 16.5	80.6±24.8	82.9±9.7	65.9±30.0	72.3±19.6	66.0±19.6
IADL score	3.0±2.3	3.4±2.8	4.3±2.2	4.9±2.8	3.2±2.7	2.6±1.6	2.0±1.7	1.2±1.5
CIRS-T score	33.5±3.8	32.8±5.4	34.1±4.1	29.8±5.3§	30.7±3.8	34.7±4.0≠	33.7±3.2	35.8±4.2
CIRS-MI	3.6±0.7	3.7±0.7	3.6±0.7	3.5±0.6	3.2±0.6	3.8±0.4	3.8± 0.7	4.0±0.8
CIRS-SI	2.3±0.3	2.3±0.4	2.4±0.3	2.1±0.4	2.1±0.2	2.5±0.3	2.3±0.2	2.5±0.4
CIRS-CI	7.6±1.9	7.3±2.2	7.9±2.2	6.5±2.3	6.3±1.8	7.9±2.0	7.7±1.6	8.0±1.8
ORO score	2.1±1.5	1.3±1.4*	1.0±1.2	0.6±0.8	2.3±1.3	2.5±1.1	3.1±1.1	3.0±1.3
CF score	1.0±0.8	0.5±0.7*	0.5 ±0.6	0.1 ±0.3§	1.1±0.6	1.0 ±0.7	1.5±0.6	1.1±0.7
PACC	11.6±6.5	9.0 ±5.4*	7.6 ±5.0	6.8±3.6	12.1±6.2	12.0±4.5	15.1±5.6	14.2±7.2

I risultati sono presentati come media ± deviazione standard (DS). La significatività statistica al *t*-test è indicata qui di seguito in grassetto.

* femmine vs maschi: MMSE, ***P*=0.000**; GDS, ***P*=0.000**; ORO score, ***P*=0.000**; CF score, ***P*=0.000**, PACC, ***P*=0.006**

§ femmine senza demenza vs maschi senza demenza: GDS, ***P*=0.007**; CIRS-T, ***P*=0.006**; CF score, ***P*=0.001**

≠ femmine con MCI vs maschi con MCI GDS, ***P*=0.0001**.

† femmine con demenza vs maschi con demenza: NS.

Abbiamo evidenziato che i punteggi del MMSE erano significativamente superiori nei maschi rispetto alle femmine, mentre GDS, ORO score, FC e PACC erano significativamente inferiori nei maschi rispetto alle femmine. Nel gruppo dei soggetti senza demenza, GDS, CIRS-T e FC erano inferiori nei maschi rispetto alle femmine. Nel gruppo dei soggetti con demenza non c'erano differenze per i parametri esaminati, in particolare per ORO score, FC e PACC, così come nel gruppo MCI. Pertanto parrebbe rafforzarsi l'ipotesi che i cambiamenti di questi tre parametri siano presenti non solo nella demenza manifesta, ma anche negli stadi più precoci del decadimento cognitivo, quale l'MCI.

Diversi studi hanno documentato la correlazione tra malattie dell'apparato cardiovascolare (MCV) e decadimento cognitivo (40, 41). Per escludere un possibile effetto confondente delle MCV sugli score ORO e FC, è stato stimato l'impatto dei più comuni fattori di rischio per MCV (ipertensione arteriosa, dislipidemia, diabete mellito, aterosclerosi) con questi parametri; come evidenziato in Tabella 13, non è stata trovata nessuna associazione tra le variabili colorazione ORO e FC e i fattori di rischio per MCV. I dati dell'intera popolazione (n=192) sono stati inoltre analizzati con la correlazione di Spearman per età e MMSE, età e colorazione ORO, MMSE e colorazione ORO. Il coefficiente di Spearman mostrava una moderata ma significativa correlazione tra MMSE ed età ($r= 0.150$, $P= 0.037$). Nessuna correlazione è stata osservata tra ORO score e PACC ($r=-0.078$, $P= 0.284$; $r= - 0.087$, $p = 0.228$, rispettivamente) ed età. Una correlazione negativa e significativa è stata evidenziata tra MMSE e score ORO ($r=-0.699$, $P<0.0001$) e tra MMSE e PACC ($r=-0.586$, $P <0.0001$). In generale, questi risultati suggerivano che il normale invecchiamento ha pochi effetti sui cambiamenti della colorazione ORO nei LM rispetto a quelli dei soggetti con demenza di tutti i tipi e MCI.

Tabella 13: Correlazione tra fattori di rischio per MCV e score ORO e FC.

Soggetti (N=192)	Dislipidemia		Aterosclerosi		Diabete		Ipertensione	
	No	Sì	No	Sì	No	Sì	No	Sì
PACC								
Alto	65	45	40	70	71	39	28	82
Basso	53	29	30	52	53	29	16	66
χ^2	0.609		0.001		0.000		0.939	
<i>P</i>	0.435		0.975		0.990		0.333	
ORO score								
Alto	60	46	39	67	70	36	25	87
Basso	58	28	31	55	54	32	19	67
χ^2	2.354		0.011		0.219		0.060	
<i>P</i>	0.125		0.915		0.640		0.807	
CF score								
Alto	63	44	40	67	72	35	27	80
Basso	55	30	30	55	52	33	17	68
χ^2	0.679		0.089		0.774		0.735	
<i>P</i>	0.410		0.765		0.379		0.391	

Infine, è stata condotta un'analisi per valutare la correlazione dei quattro disturbi oculari più comuni (cataratta, glaucoma, retinopatia diabetica e DMS) sugli score della colorazione ORO e della FC. E' noto infatti che questi disturbi oculari abbiano affinità con DA, DM e DV (42, 43). Nella popolazione esaminata i disturbi oculari erano presenti in 52 soggetti, con una prevalenza del 27,1%. Come descritto in Tabella 14, 24 soggetti erano affetti da cataratta, 8 da glaucoma, 8 da DMS e 12 da retinopatia diabetica.

Tabella 14: Disturbi oculari nei partecipanti allo studio, con e senza demenza.

	tot	DemN	DemS	MCI	DA	DV	DM
Tot-PoN	140	65	50	25	16	24	10
PoS-C	24	10	12	2	2	8	2
PoS-DMS	8	6	2	0	2	0	0
PoS-G	8	8	0	0	0	0	0
PoS-R	12	6	4	2	0	2	2

Abbreviazioni: DemS: presenza di demenza, DemN: assenza di demenza, MCI: Mild Cognitive Impairment, DA: Demenza tipo Alzheimer, DV: Demenza Vascolare, DM: Demenza Mista, Tot-PoN: assenza di patologie oculari, PoS-C: cataratta, PoS-DMS: Degenerazione maculare senile, PoS-G: glaucoma, PoS-R: retinopatia diabetica.

Dato il numero esiguo dei pazienti per tipo di oftalmopatia, è stato costituito un unico gruppo di soggetti affetti da disturbi oculari (Tot-PoS) e suddiviso in sottogruppi sulla base della presenza o meno di demenza (PoS-DemS, PoS-DemN). Per i pazienti non affetti da disturbi oculari (Tot-PoN) sono stati costituiti analoghi sottogruppi sulla base della presenza o meno di demenza (PoN-DemS, PoN-DemN). I pazienti affetti da MCI e disturbi oculari sono risultati solo 4 (PoS-MCI) e pertanto non sono stati oggetto di analisi statistica. Il *t*-test ha mostrato che i pazienti con Tot-PoS presentavano punteggi di GDS, CIRS-T e CIRS-CI superiori rispetto a Tot-PoN (Tabella 15). Il sottogruppo PoS-DemN presentava punteggi di GDS, CIRS-T, CIRS-SI e CIRS-CI superiori e di MMSE inferiori rispetto a PoN-DemN. PoS-DemS presentava punteggi di GDS, CIRS-T, ORO e FC superiori rispetto a PoN-DemS. Nonostante non sia stata raggiunta la significatività, la PACC era inferiore nei PoN-DemS rispetto ai PoS-DemS.

Table 15. VMD-G dei soggetti con e senza demenza e con e senza patologie oculari.

	Tot-PoN	Tot-PoS	PoN-DemN	PoS-DemN	PoN-MCI	PoS-MCI	PoN-DemS	PoS-DemS
	(140)	(52)	(65)	(30)	(25)	(4)	(50)	(18)
	M±DS	M±DS	M±DS	M±DS	M±DS	M±DS	M±DS	M±DS
ETÀ	77.9±7.1	77.4±6.7	78.0±6.4	79.1± 7.5	78.8± 8.2	68±4.1§	77.2±7.2	76.7±2.7
MMSE score	23.5±6.0	23.2±4.9	27.5±1.7	26.7±1.7**	24.6±4.7	22.0±0.9	17.7±5.6	17.7.0±3.9
GDS score	7.0±4.2	10.8±3.3*	4.9±3.5	9.3 ±2.8**	7.7±4.4	8.5±4.6	9.4±3,3	13.7±2.0#
ADLs score	74.5±22.0	75.8±19.0	79.5±23.3	78.1±15.2	72.0±24.1	94.0±4.0	71.3.±18.8	70.7±21.8
IADL score	3.2±2.7	3.1±1.9	5.0±2.8	3.9±1.6	3.0±2.3	2.0±1°	1.8.±1.5	2.0±1.9
CIRS-T score	32.3±4.6	35.7±0.7*	30.8±5.4	35.7±1.7**	32.9±4.6	31.0±0	33.2±3.5	36.3±2.4#
CIRS-MI	3.6±0.7	3.7±0.4	3.5±0.6	3.7±0.7	3.6±0.6	3.0±0	3.8±0.8	3.9±0.6
CIRS-SI	2.3±0.3	2.5±0.2	2.2±0,4	2.5±0.2**	2.3±0.3	2.1±0.1	2.3±0.3	2.5±0.2
CIRS-CI	7.1±2.0	8.4±1.7*	6.6±2.4	8.7±1.7**	7.1±2.1	7.5±0.7	7.6±1.6	8.1±1.8
ORO score	1.8±1.5	2.1±1.6	0.7±1.0	1.0±1.2	2.3±1.3	3.0±1.3	2.9±1.2	3.7±0.5#
CF score	1.0±0.8	1.0±0.9	0.3±0.4	0.5±0.6	1.0±0.8	1.2±0.8	1.3±0.7	1.9±0.3#
PACC	11.2±6.8	11.2±6.8	7.0±3.9	7.7±5.4	11.5±4.5	15.7±8.3	14.6±6.12	16 ± 4.9

I valori sono espresso come media ± deviazione standard (M±DS).

t test:

* Tot-PoN vs Tot-PoS: GDS $P=0.0001$; CIRS-T $P=0.000$; CIRS-CI $P=0.003$.

** PoN-DemN vs PoS-DemN: MMSE $P=0.028$; GDS $P=0.0001$; CIRS-T $P=0.001$; CIRS-SI $P=0.009$; CIRS-CI $P=0.005$.

§ En-MCI vs PoS-MCI: age $P=0.020$.

PoN-DemS vs PoS-DemS: GDS $P=0.0001$; CIRS-T $P=0.005$; ORO score $P=0.008$; CF score $P=0.002$.

Discussione

In questo studio è stato rilevato che i LM naïve da soggetti con demenza accumulano LN, evidenziato con la colorazione ORO, indipendentemente dal tipo di demenza, in particolare l'ORO score e la PACC nei LM dei soggetti affetti da demenza (DA, DM e DV) e MCI erano significativamente superiori rispetto ai controlli. Inoltre, non è stata trovata alcuna differenza tra i gruppi DA, DM e DV. Il contenuto di LN nei LM dei pazienti con MCI era inferiore a quello dei soggetti con demenza. E' stato anche dimostrato che l'intensità della colorazione ORO e la FC nei soggetti arruolati non correlava con l'età, ma piuttosto con il deterioramento cognitivo. Nessuna differenza è stata, invece, evidenziata tra maschi e femmine con demenza e con MCI per quanto riguarda l'ORO score, la FC e la PACC. Pertanto l'aumento dei LN nei LM era presente non solo nella demenza manifesta, ma anche negli stadi più precoci del deficit cognitivo indipendentemente dal genere. Questi risultati sono in accordo con le nostre precedenti osservazioni in cui abbiamo documentato uno squilibrio tra colesterolo libero e LN, rappresentati soprattutto da EC, nei fibroblasti cutanei e nei LM prelevati da pazienti con probabile DA (27, 33). Inoltre, questi risultati sono in accordo con quelli di altre ricerche, che hanno evidenziato una composizione lipidica alterata, in particolare per la componente colesterolica, nei cervelli dei pazienti affetti da differenti patologie di tipo neurodegenerativo (44, 45). L'alterata omeostasi del colesterolo cerebrale è stata, infatti, correlata a patologie neurodegenerative croniche, come la DA, la malattia di Huntington, il Morbo di Parkinson, la malattia di Niemann-Pick tipo C e la sindrome di Lemli Pittz, così come danni cerebrali acuti associati a stroke o traumi (44, 45). La prima prova del ruolo determinante degli EC nella patogenesi della DA scaturisce dagli studi effettuati dal

gruppo della Professoressa Dora Kovacs (46-48), che ha focalizzato la sua ricerca sull'acetil-CoA-colesterol-aciltransferasi (ACAT), un enzima presente nella doppia membrana del reticolo endoplasmatico che catalizza la conversione del colesterolo libero in EC. Hanno infatti trovato che le cellule con elevati livelli di EC producevano una maggiore quantità di peptidi di Beta-amiloide, che come noto hanno un ruolo fondamentale nella produzione delle placche amiloidi nella DA. Di contro, le cellule carenti di EC ma con elevato colesterolo libero quasi non producevano Beta-amiloide (46-47). Questi ricercatori hanno inoltre trovato che gli inibitori dell'ACAT CP-113,818 e CI 1011 riducevano le placche di amiloide e il deficit cognitivo associato, in modelli murini di DA (48). Successivamente, Bryleva et al. (49) hanno dimostrato, attraverso un approccio combinato di tipo biochimico e genetico su topi modificati per valutare il potenziale ruolo dell'ACAT nella DA, che l'ablazione del gene ACAT1 nei topi transgenici con DA (triple AD transgenic mice) determinava una riduzione di oltre il 60% della lunghezza della Proteina Precursore dell'Amiloide (APP) umana così come dei suoi frammenti proteolitici e un miglioramento del deficit cognitivo (49). Questi risultati, indicando un'associazione diretta tra l'accumulo degli EC nel SNC e la neurodegenerazione, consentono di ipotizzare che gli inibitori dell'ACAT possano avere un ruolo nel trattamento del deficit cognitivo e, pertanto, rappresentare un target per un nuovo approccio terapeutico. Quanto ottenibile con quest'approccio nell'uomo è ostacolato dall'impossibilità di esaminare il tessuto cerebrale in vivo; pertanto, è necessario individuare un tessuto surrogato che possa in qualche modo rispecchiare quanto si realizza nelle cellule neuronali. In questo contesto i LM appaiono particolarmente adatti, in quanto sembrano coinvolti direttamente nel processo di neurodegenerazione. E' stato dimostrato che i LM contengono gran parte dell'apparato biochimico non-sinaptico dei neuroni, sia il complesso degli enzimi epigenetici sia le altre strutture, come descritto precedentemente da Arosio et al. (50).

I risultati di questo studio evidenziavano che l'accumulo di LN nel citoplasma dei LM non è esclusivo della DA, ma è presente anche in DV e DM. Lo stesso risultato, anche se di entità minore, è stato osservato nel MCI. Il gruppo controllo, cognitivamente integro e clinicamente libero da qualsiasi patologia psichiatrica e neurologica, aveva solo minime modificazioni nel contenuto dei LN nei LM, in accordo con quanto avevamo già descritto (27-29, 51). Inoltre, il contenuto di LN correlava significativamente con la severità del deficit cognitivo (27-29, 51). Questi risultati suggeriscono che variazioni nel contenuto di LN nei LM potrebbero riflettere modificazioni dinamiche dell'omeostasi del colesterolo a livello cerebrale, fin dalle fasi più precoci di deficit cognitivo (27-29, 51). Un altro dato interessante di questo studio è l'evidenza che i LM naïve dei soggetti con demenza o con MCI tendono a formare aggregati cellulari facilmente evidenziabili al microscopio ottico. In particolare, abbiamo valutato l'entità della FC con una scala semi-quantitativa da 0 a 2 e abbiamo documentato un pattern simile a quanto osservato con la colorazione ORO. Infatti lo score FC era significativamente inferiore nei controlli rispetto agli altri cinque gruppi (MCI, demenza, DA, DM, DV), e superiore nei gruppi demenza, DA, DM e DV rispetto a MCI. Allo stato attuale non è noto il meccanismo con cui i LM dei soggetti con demenza o con MCI si aggregano. Tuttavia è possibile ipotizzare che la FC dei LM naïve possa riflettere un'attivazione in vivo, così come avviene con la stimolazione dei LM in vitro con PHA (29, 34), secondaria per esempio al rilascio di mediatori infiammatori (27-29, 52). Molti studi, infatti, hanno documentato una risposta infiammatoria sostenuta, già dagli stadi precoci della neurodegenerazione, che coinvolge le cellule gliali. L'insulto cerebrale, infatti, determina l'immediato reclutamento di cellule gliali nell'area danneggiata, che si attivano e rilasciano citochine e chemochine (53-55). In particolare, sono stati evidenziati aumentati livelli plasmatici di proteine infiammatorie (ad es., interleuchina-1, interleuchina-6 e alfa-1-

antitripsina) in fase preclinica dei pazienti con DA e DV. E' stato proposto il dosaggio delle citochine circolanti come potenziale biomarcatore per lo screening, la diagnosi e il monitoraggio delle malattie neurodegenerative e altri disturbi neurologici (56, 57). Questi dati indicano pure che nel SNC e nel periferico avvengono profonde alterazioni nel metabolismo del colesterolo, associate a segnali di risposta infiammatoria già negli stadi precoci di diversi disturbi neurologici (57), ma non è chiaro se queste modificazioni siano causa o conseguenza di neurodegenerazione. Inoltre, è già emerso un meccanismo molecolare di tipo neuroinfiammatorio, seppure ancora poco chiaro, che potrebbe correlare le alterazioni dell'omeostasi del colesterolo cerebrale con quelle che si verificano a livello di cellule periferiche. Sulla base delle attuali evidenze, abbiamo proposto un possibile meccanismo che colleghi le alterazioni nel metabolismo del colesterolo con la neuroinfiammazione, e come questi effetti possano essere il riflesso dell'accumulo di LN e della FC a livello dei LM. La neuroinfiammazione, secondaria a diverse noxae patogene, come infezioni, danno cerebrale da trauma, metaboliti tossici, autoimmunità (54, 57), e alterata omeostasi del colesterolo, può promuovere o compromettere la funzione e la sopravvivenza dei neuroni (29). Questi due processi possono essere considerati dipendenti l'uno dall'altro, nel senso che l'alterata omeostasi del colesterolo potrebbe indurre neuroinfiammazione e viceversa. In sintesi, la risposta al danno neuronale induce l'attivazione delle cellule immunitarie residenti (microglia), con fagocitosi e rilascio di mediatori dell'infiammazione, quali citochine e chemochine, che potrebbero passare nella circolazione sistemica, attivando i LM (58). Questa attivazione potrebbe essere responsabile della FC osservata nei LM in vitro. D'altra parte, in conseguenza ad un insulto cerebrale, le cellule danneggiate possono rilasciare colesterolo libero, che penetra nei neuroni vicini, dove è dapprima esterificato dall'ACAT1 e poi immagazzinato nel citoplasma sotto forma di

vescicole. Il colesterolo libero in eccesso, per poter attraversare la Barriera Ematoencefalica (BEE), è idrossilato a livello neuronale a 24(S)-idrossicolesterolo (24-OHC) e poi trasferito così nel circolo ematico. Il 24-OHC, essendo un derivato ossigenato del colesterolo, è un potenziale induttore dell'ossidazione delle lipoproteine a bassa densità (LDL). Infatti, sono stati trovati aumentati livelli di LDL ossidate (LDLox) circolanti nei pazienti con disordini neurologici (29, 51). Con meccanismo simile a quello descritto per l'aterosclerosi, le LDLox sono riconosciute dai recettori di membrana dei LM, e quindi internalizzate nel citoplasma, dove liberano EC e trasformando così i LM in cellule schiumose. Un tale scenario potrebbe spiegare perché nei soggetti con disordini neurologici è presente un accumulo di EC nel citoplasma dei LM (29, 51).

Nella retina è presente un tipo specializzato di cellule gliali, la glia di Müller, non presente nel restante SNC. Come le altre cellule gliali del SNC, le cellule di Müller, rispondono con una gliosi reattiva in seguito ad un danno acuto della retina o a uno stress neuronale cronico (59). Studi clinici e sperimentali hanno suggerito il coinvolgimento dell'attivazione della glia di Müller nella patogenesi dei più comuni disturbi visivi, inclusi cataratta, glaucoma, retinopatia diabetica e DMS. Inoltre, alti livelli di EC, che tendono a essere metabolizzati in ossisteroli, sono stati documentati in diverse lesioni patologiche oculari, come nei drusen e nell'invecchiamento della membrana di Bruch, tipiche della DMS (58, 60, 61). Abbiamo quindi verificato se i LM non stimolati prelevati da soggetti con diversi disturbi oculari età-relati abbiano la capacità di aggregarsi in cluster e di accumulare LN. Per questo abbiamo suddiviso i partecipanti allo studio in due gruppi, in base alla presenza o meno di disturbi oculari. Ogni gruppo è stato ulteriormente suddiviso sulla base della presenza o meno di demenza (PoS-DemS, PoS-DemN, PoN-DemS, PoN-DemN). Non è stata osservata alcuna

differenza significativa tra score ORO e FC e PACC tra soggetti con e senza disordini oculari. Pertanto, gli score ORO e FC, così come PACC, erano superiori nei pazienti PoS-DemS rispetto ai PoN-DemS, indicando che un danno oculare potrebbe esacerbare l'accumulo di LN e il tasso di clusterizzazione cellulare osservato nei LM dei pazienti con demenza.

Conclusioni

L'obiettivo di questo lavoro era di individuare un marcatore biologico, che possa essere usato per lo screening e la diagnosi precoce di patologie neurodegenerative. Diversamente da altre patologie d'organo, nelle quali la diagnosi può essere fatta rapidamente con l'utilizzo di biomarcatori, a tutt'oggi non esistono marcatori biochimici specifici capaci di individuare precocemente la neurodegenerazione, di stratificarne la gravità e di monitorarizzarne la progressione. Di conseguenza, è necessario sviluppare strumenti capaci di individuare la malattia già negli stadi preclinici, oltre che di verificare l'efficacia di nuovi farmaci. E' fondamentale individuare lo stato di malattia neurodegenerativa quanto più precocemente per stabilire un approccio terapeutico efficace, quando ancora non è presente un danno neuronale irreversibile. Pertanto consideriamo la determinazione dei LN nel citoplasma dei LM naïve e la loro capacità di aggregarsi in cluster cellulari un approccio non invasivo innovativo per la ricerca di danno neuronale già in uno stadio precoce. Questo approccio è il risultato di due linee indipendenti di ricerca. La prima deriva dal problema generale del metabolismo del colesterolo nel SNC: nel cervello è, infatti, mantenuto un costante equilibrio tra sintesi e degradazione attraverso l'ossidazione del colesterolo in 24-OHC, metabolita capace di attraversare la BEE e i cui livelli ematici circolanti possono essere considerati un indice di eliminazione del colesterolo cerebrale (29, 51). La seconda dalla connessione tra infiammazione e neurodegenerazione: la risposta immunologica del SNC è diretta dalle cellule microgliali, che una volta attivate danno origine a fagociti e secernono un grosso numero di mediatori dell'infiammazione, quali citochine e chemochine, fattori di crescita, complemento e molecole di adesione (29, 51). I segnali di risposta infiammatoria

individuabili in periferia sono considerati un indice di progressione dei disturbi neurologici (62).

In conclusione, i nostri dati evidenziano che:

1. La concentrazione dei LN misurati nei LM naïve correla con la neurodegenerazione;
2. I LN e la FC nei LM potrebbero essere strumenti adeguati per discriminare i soggetti in una fase pre-clinica dai pazienti affetti da neurodegenerazione e, quindi, potrebbe essere utili per individuare i soggetti in fase preclinica.

Allo stato attuale, riteniamo che questo sia il primo lavoro che faccia riferimento all'utilizzo di test basati sulla ricerca di alterazioni del metabolismo del SNC sui LM, per la determinazione di disturbi neurodegenerativi. Per validare ulteriormente questi dati e le relative implicazioni cliniche sono necessari ampi studi di coorte longitudinali.

Bibliografia

1. Caltagirone C. Demenza. Dizionario di Medicina. Da: [http://www.treccani.it/enciclopedia/demenza_\(Dizionario-di-Medicina\)](http://www.treccani.it/enciclopedia/demenza_(Dizionario-di-Medicina)), 11/12/2016
2. Prince M, Comas-Herrera A, Knapp M, Guerchet M, Karagiannidou M. World Alzheimer Report 2016 Improving healthcare for people living with dementia coverage, Quality and costs now and In the future. Published by Alzheimer's Disease International (ADI), London. September 2016. . Da: <https://www.alz.co.uk/research/WorldAlzheimerReport2016.pdf>
3. Ustun TB. The global burden of mental disorders. *Am J Public Health* 1999;89:1315-8.
4. Tutela della salute e accesso alle cure. Anno 2013. ISTAT. Da http://www.istat.it/it/files/2014/07/salute_9-luglioDEF_14-luglio.pdf?title=Tutela+della+salute+e+accesso+alle+cure+-+10%2Fflug%2F2014+-+Testo+integrale.pdf
5. Cipriani G, Dolciotti C, Picchi L, Bonucelli U. Alzheimer e la sua malattia: una breve storia. Da <http://www.ainat.it/files/alzheimer.pdf>
6. Boller F, Forbes MM. History of dementia and dementia in history: An overview. *J Neurol Sci.* 1998; 158 (2): 125–133.
7. 6a International Classification of diseases, Revision 8 (1965) Da <http://www.wolfbane.com/icd/icd8h.htm>
8. George DR, Whitehouse PJ, Ballenger J. The evolving classification of dementia: placing the DSM-V in a meaningful historical and cultural context and pondering the future of Alzheimer's. *Cult Med Psychiatry.* 2011; 35(3): 417-35.
9. Albert M, Feldman RG, Wills AL. The subcortical dementia of progressive supranuclear palsy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1974; 37: 121 – 130.
10. McHugh PR, Folstein MF. Psychopathology of dementia: implications for neuropathology. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis.* 1979; 57: 17-30.
11. Albert ML. Subcortical Dementia: Historical Review and Personal View. *Neurocase.* 2005; 11 (4): 243-5.
12. Hejl A, Høgh P, Waldemar G. Potentially reversible conditions in 1000 consecutive memory clinic patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2002; 73: 390–394.

13. American Psychiatric Association 1952 DSM-I, Diagnostic and Statistical Manual Mental Disorders. Washington, DC: American Psychiatric Association.
14. American Psychiatric Association 1980 DSM-III, Diagnostic and Statistical Manual Mental Disorders, ed 3. DC: Washington, American Psychiatric Association.
15. McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease". *Neurology* 1984. 34 (7): 939–44.
16. American Psychiatric Association 1987 DSM-III-R, Diagnostic and Statistical Manual Mental Disorders, 3rd Edition (rev.). Washington, DC: American Psychiatric Association.
17. DSM-IV Manuale diagnostico e statistico dei disturbi mentali", Masson 1999.
18. Decreto Ministero Sanità del 20 luglio 2000. Da <http://www.medicoeleggi.com/argomenti00/italia1/12770.htm>
19. Petersen RC, Smith GE, Waring SC, Ivnik RJ, Tangalos EG, Kokmen E, Mild cognitive impairment: clinical characterization and outcome. *Arch. Neurol.* 1999; 56 (3): 303–8.
20. Dubois B, Feldman HH, Jacova C, Dekosky ST, Barberger-Gateau P, et al. Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria. *Lancet Neurol.* 2007; 6 (8): 734-46.
21. Dubois PC, Trynka G, Franke L, Hunt KA, Romanos J, et al. Multiple common variants for celiac disease influencing immune gene expression. *Nat Genet.* 2010; 42 (4): 295-302.
22. Cavedo E, Lista S, Khachaturian Z, Aisen P, Amouyel P, et al. The Road Ahead to Cure Alzheimer's Disease: Development of Biological Markers and Neuroimaging Methods for Prevention Trials Across all Stages and Target Populations. *J Prev Alzheimers Dis.* 2014; 1(3): 181–202.
23. McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, Hyman BT, Jack CR, 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. *Alzheimers Dement.* 2011 May; 7(3): 263–269.
24. Musicco M, Padovani A, Sorbi S, Scarpini E, Caffarra P, et al. Position paper of the Italian Society for the study of Dementias (SINDEM) on the proposal of a new lexicon on Alzheimer disease. *Neurol Sci.* 2012; 33 (1): 201-8.

25. 5th ed. Arlington: American Psychiatric Association; 2013. American Psychiatric Association: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders.
26. Pani A, Mandas A, Diaz G, Abete C, Cocco PL, et al. Accumulation of neutral lipids in peripheral blood mononuclear cells as a distinctive trait of Alzheimer patients and asymptomatic subjects at risk of disease. *BMC Med.* 2009; 7: 66.
27. Mandas A, Abete C, Putzu PF, la Colla P, Dessì S, Pani A. Changes in cholesterol metabolism-related gene expression in peripheral blood mononuclear cells from Alzheimer patients. *Lipids Health Dis.* 2012; 11: 39.
28. Pani A, Dessì S, Diaz G, La Colla P, Abete C, et al. Altered cholesterol ester cycle in skin fibroblasts from patients with Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2009; 18 (4): 829-841.
29. Mandas A, Dessì S. Mononuclear cells in dementia. *Clin Chim Acta.* 2014; 431C: 278-287.
30. Kalaria R. Similarities between Alzheimer's disease and vascular dementia. *J Neurol Sci.* 2002; 203-204: 29-34.
31. Sivak JM. The Aging Eye: Common Degenerative Mechanisms between the Alzheimer's Brain and Retinal Disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013; 54 (1) :871-880.
32. Roman GC, Tatemichi TK, Erkinjuntti T, Cummings JL, Masdeu JC, et al. Vascular dementia: Diagnostic criteria for research studies, Report of the NINDSAIREN International Workshop. *Neurology.* 1993; 43: 250-260.
33. Health Quality Ontario. The appropriate use of neuroimaging in the diagnostic work-up of dementia: an evidence-based analysis. *Ont Health Technol Assess Ser* [Internet]. 2014 February, 14(1):1–64. Available from: <http://www.hqontario.ca/Portals/0/Documents/eds/ohtas/economic-literature-imagingdementia-140218-en.pdf>.
34. Petersen RC. Conceptual overview. In: Petersen RC. *Mild Cognitive Impairment: Aging to Alzheimer's Disease.* 2003; 1-14. New York, NY: Oxford University Press, Inc.
35. Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. "Mini-Mental state", A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res.* 1975; 129-138.
36. Yesavage JA, Brink TL. Development and validation of a geriatric depression screening scale: a preliminary report. *J. Psychial. Rex.* 1983; 17: 3749.
37. Katz TF. A.D.L. Activities of Daily Living. *JAMA.* 1963; 185: 914.

38. Lawton MP, Brody EM. Assessment of older people: Selfmaintaining and instrumental activities of daily living. *Gerontologist*. 1969, 179-186.
39. Parmalee PA, Thuras PD, Katz IR, Lawton MP. Validation of the Cumulative Illness Rating Scale in a geriatric residential population. *J Am Geriatr Soc*. 1995; 43: 130-137.
40. Qiu C1, Winblad B, Marengoni A, Klarin I, Fastbom J, Fratiglioni L. Heart failure and risk of dementia and Alzheimer disease: a population-based cohort study. *Arch Intern Med*. 2006; 166 (9): 1003-1008.
41. van Oijen M1, de Jong FJ, Witteman JC, Hofman A, Koudstaal PJ, Breteler MM. Atherosclerosis and risk for dementia. *Ann Neurol*. 2007; 61 (5): 403-410.
42. Rumney NJ. The aging eye and vision appliances. *Ophthalmic Physiol Opt*. 1998; 18 (2): 191-196.
43. Cronin-Golomb A, Corkin S, Rizzo JF, Cohen J. Visual dysfunction in Alzheimer's disease: relation to normal ageing. *Ann Neurol*. 1991; 29: 41-52.
44. Rahman K. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clin Interv Aging*. 2007; 2 (2): 219-236.
45. Vance JE. Dysregulation of cholesterol balance in the brain: contribution to neurodegenerative diseases. *Dis Model Mech*. 2012; 5 (6): 746-755.
46. Huttunen HJ, Kovacs DM. ACAT as a drug target for Alzheimer's disease. *Neurodegener Dis*. 2008; 5: 212-214.
47. Puglielli L, Konopka G, Pack-Chung E, Ingano LA, Berezovska O, et al. Acylcoenzyme A: Cholesterol acyltransferase modulates the generation of the amyloid betapeptide. *Nature Cell Biol*. 2001; 3: 905-912.
48. Hutter-Paier B1, Huttunen HJ, Puglielli L, Eckman CB, Kim DY, et al. The ACAT inhibitor CP-113,818 markedly reduces amyloid pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuron*. 2004; 44: 227-238.
49. Byleva EY1, Rogers MA, Chang CC, Buen F, Harris BT, et al. ACAT1 gene ablation increases 24(S)-hydroxycholesterol content in the brain and ameliorates amyloid pathology in mice with AD. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107 (7): 3081-3086.
50. Arosio B, D'Addario C, Gussago C, Casati M, Tedone E, Ferri E, et al. Peripheral Blood Mononuclear Cells as a Laboratory to Study Dementia in the Elderly. *Biomed Res Int*. 2014. 2014:169203 <http://dx.doi.org/10.1155/2014/169203>.
51. Anchisi L, Dessì S, Pani A, Mandas A. Cholesterol homeostasis: a key to prevent or slow down neurodegeneration. *Front Physiol*. 2013; 4:3:486.

52. Peiretti E, Mandas A, Abete C, Vinci M, Piludu S, et al. Age-related macular degeneration and cognitive impairment show similarities in changes of neutral lipids in peripheral blood mononuclear cells. *Exp Eye Res.* 2014; 124:11-16.
53. Glass CK1, Saijo K, Winner B, Marchetto MC, Gage FH. Mechanisms Underlying Inflammation in Neurodegeneration. *Cell.* 2010; 140 (6): 918-34.
54. Scholz J, Woolf CJ. The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia. *Nat Neurosci.* 2007; 10 (11): 1361-1368.
55. Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science.* 2005; 308: 1314-1318.
56. Wake H, Moorhouse AJ, Jinno S, Kohsaka S, Nabekura J. Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals. *J Neurosci.* 2009; 29: 3974-3980.
57. Frank-Cannon TC, Alto LT, McAlpine FE, Tansey MG. Does neuroinflammation fan the flame in neurodegenerative diseases? *Mol Neurodegener.* 2009; 4: 47.
58. Engelhart MJ, Geerlings MI, Meijer J, Kiliaan A, Ruitenberg A, et al. Inflammatory proteins in plasma and the risk of dementia: the Rotterdam study. *Arch Neurol.* 2004; 61(5): 668-672.
59. Bettcher BM, Kramer JH. Inflammation and clinical presentation in neurodegenerative disease: a volatile relationship. *Neurocase.* 2013; 19 (2): 182-200.
60. Curcio CA, Presley JB, Millican CL, Medeiros NE. Basal deposits and drusen in eyes with age related maculopathy: evidence for solid lipid particles. *Exp Eye Res.* 2005; 80: 761-775.
61. Curcio CA, Presley JB, Malek G, Medeiros NE, Avery DV, Kruth HS. Esterified and unesterified cholesterol in drusen and basal deposits of eyes with age-related maculopathy. *Exp Eye Res.* 2005; 81: 731-741.
62. KhanTK, Alkon DL. An internally controlled peripheral biomarker for Alzheimer's disease: Erk1 and Erk2 responses to the inflammatory signal bradykinin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 29: 103(35): 13203-13207.

Abbreviazioni

24-OHC: 24(S)-idrossicolesterolo

ACAT: acetil-CoA-colesterol-aciltransferasi

ADL: Activities of Daily Living

ADRDA: Alzheimer's Disease and Related Disorders Association

BEE: Barriera Emato-Encefalica

CIRS: Cumulative Illness Rating Scale

CI: Comorbidity Index CIRS

DA: Demenza tipo Alzheimer

DM: Demenza Mista

DMin: Decreto Ministeriale

Dn: assenza di demenza

DV: Demenza Vascolare

DSM: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders

Dy: presenza di demenza

EC: Esteri del Colesterolo

FC: Formazione di Cluster di cellule

IADL: Instrumental Activities of Daily Living

ICD: International Classification Disease

GDS: Geriatric Depression Scale

ISTAT

K-S: test Kolmogorov-Smirnov

LDL: Lipoproteine a bassa densità

LDLox: LDL ossidate

LM: Linfo-Monociti

LN: Lipidi Neutri

LCR: Liquido Cefalo-Rachidiano

MCI: Mild Cognitive Impairment

MCV: Malattie dell'apparato Cardio-Vascolare

MI-CIRS: Maximum Impairment CIRS

MMSE: Mini Mental State Examination

NIA: National Institute on Aging

NINCDS: National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke

OMS: Organizzazione Mondiale della Sanità

ORO: Oil Red O

PACC: percentuale d'area di cellule colorate

PET: Tomografia ad Emissione di Positroni

PHA: fitoemoagglutinina

PoS: presenza di Patologie oculari

PoN: pazienti senza Patologie oculari

PoN-DemN: pazienti senza Patologie oculari e senza Demenza

PoN-DemS: pazienti senza Patologie oculari e con Demenza

PoN-MCI: pazienti senza Patologie oculari e con Mild Cognitive Impairment

PoS-C: pazienti con Cataratta

PoS-DemN: pazienti con Patologie oculari e senza Demenza

PoS-DemS: pazienti con Patologie oculari e con Demenza

PoS-DMS: pazienti con Degenerazione maculare senile

PoS-G: pazienti con Glaucoma

PoS-MCI: pazienti con Patologie oculari e con Mild Cognitive Impairment

PoS-R: pazienti con Retinopatia diabetica

RMN: Risonanza Magnetica Nucleare

ROI: area di interesse selezionato al software Image J

SI-CIRS: Severity Index CIRS

SINDEM: Società Italiana di Neurologia delle Demenze

SNC: Sistema Nervoso Centrale

SSN: Sistema Sanitario Nazionale Italiano

STP: Soluzione salina Tamponata con fosfato

T-CIRS: punteggio Totale CIRS

Tot-PoN: totale pazienti senza Patologie oculari

Tot-PoS: totale pazienti con Patologie oculari

VMD-G: Valutazione Multi-Dimensionale Geriatrica

χ^2 : Chi-quadro