

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI  
“FEDERICO II”**



**DOTTORATO DI RICERCA IN  
FISIOPATOLOGIA CLINICA E MEDICINA SPERIMENTALE**

**INDIRIZZO SCIENZE GERONTOLOGICHE**

**XXII CICLO**

**Coordinatore: Chiar.mo Prof. Gianni Marone**

**TESI DI DOTTORATO**

***Neurorecettori GABA<sub>A</sub>ergici nella  
diagnosi precoce di malattia di Alzheimer***

**TUTORE**

**Chiar.mo  
Prof. *Alfredo Postiglione***

**CANDIDATA**

**Dott.ssa  
*Caterina De Falco***

Anno Accademico 2008-2009

<b>1. INTRODUZIONE</b>	<b>1</b>
<b>1.1 MILD COGNITIVE IMPAIRMENT E DEMENZA</b>	<b>1</b>
<b>1.2 NEUROTRASMISSIONE RECETTORIALE E DEMENZA</b>	<b>5</b>
<i>1.2A SISTEMA COLINERGICO</i>	6
<i>1.2B SISTEMA SEROTONINERGICO</i>	6
<i>1.2C SISTEMA DOPAMINERGICO</i>	7
<i>1.2D SISTEMA GABAERGICO</i>	7
<b>2. OBIETTIVI DELLA RICERCA</b>	<b>11</b>
<b>3. PAZIENTI E METODI</b>	<b>13</b>
<b>3.1 PAZIENTI</b>	<b>13</b>
<b>3.2 IMAGING</b>	<b>23</b>
<b>3.3 ANALISI DEI DATI</b>	<b>24</b>
<b>3.4 ANALISI DELLE ROIS</b>	<b>25</b>
<b>3.5 ANALISI VOXEL</b>	<b>27</b>
<b>4. RISULTATI</b>	<b>28</b>
<b>5. DISCUSSIONE</b>	<b>37</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>44</b>

# **1. INTRODUZIONE**

## **1.1 Mild Cognitive Impairment e Demenza**

Il *deterioramento mentale* indica una condizione clinica caratterizzata da una riduzione apprezzabile delle prestazioni cognitive, riferita dallo stesso soggetto e/o da osservatori esterni (per esempio i familiari) e/o riscontrata dal medico. La sua espressione varia da deficit lievi di una o più funzioni cognitive a quadri patologici gravi ed altamente disabilitanti come la franca demenza.

La sua prevalenza è massima in età avanzata dove rappresenta il disturbo neurologico di maggiore riscontro, con una prevalenza del 6% nei soggetti di età superiore ai 65 anni, ma ben del 40% negli ultraottantenni (1). Il deterioramento mentale è una delle principali cause di disabilità, di completa perdita dell'autosufficienza ed è uno dei principali fattori di rischio per l'insorgenza di gravi sindromi geriatriche durante il ricovero ospedaliero (2).

L'esatto inquadramento nosografico del deterioramento mentale presenta elementi di particolare difficoltà per diversi motivi: il declino cognitivo è associato al normale invecchiamento; tale declino può esprimersi in modo diverso da individuo a individuo, secondo il contesto in cui vive e lavora; è difficile tracciare il confine tra normalità e patologia; malattie di frequente riscontro in geriatria, quali la depressione, il delirium, le sindromi da

deprivazione sensoriale, possono avere tra le loro manifestazioni cliniche anche una compromissione delle capacità cognitive, che talora si determina e/o si aggrava anche per l'uso di molteplici farmaci comunemente utilizzati nell'anziano.

Definire gli esatti confini tra ciò che è espressione del semplice fattore età e ciò che è attribuibile a malattia non è spesso un compito facile, specialmente nelle fasi iniziali di malattia. È, pertanto, importante poter disporre di metodologie diagnostiche sempre più raffinate, sensibili e specifiche, capaci di individuare il deterioramento mentale patologico nelle sue fasi più precoci, nella speranza di poter arrestare o comunque rallentare la sua progressione verso la demenza mediante idonei interventi terapeutici, farmacologici e non.

Della difficoltà di stabilire se lievi deficit cognitivi di un anziano siano semplice espressione dell'invecchiamento o rappresentino i prodromi o l'esordio di demenza, ne sono prova le numerose entità cliniche sinora utilizzate per separare l'invecchiamento cerebrale normale e patologico.

#### Invecchiamento

1962: Benigne Senescent Forgetfulness (3)

1982: Limited Dementia (4)

1982: Questionable Dementia (5)

1983: Simple Senile Dementia (6)

1986: Minimal Dementia (7)

1986: Age-Associated Memory Impairment (8)

1987: Deterioramento Mentale Senile Compensato (9)

1993: Mild Cognitive Disorders (10)

1994: Age Related Cognitive Decline (11)

1994: Aging Associated Cognitive Decline (12)

1997: Cognitive Impairment No Dementia (13)

1999: Mild Cognitive Impairment (14)

Demenza

Attualmente, **Mild Cognitive Impairment** (MCI) è la definizione più utilizzata nella ricerca clinica e sperimentale per identificare un lieve deterioramento della memoria (15-18) in presenza di uno stato cognitivo globale del tutto conservato (19, 20), che non rientra nella definizione di demenza (11, 21, 22). La diagnosi di MCI è essenzialmente clinica (23): a) deficit soggettivo di memoria – la cui presenza è confermata da un osservatore esterno (ad esempio un familiare); b) deficit di memoria documentato da una prestazione a test di memoria episodica di entità superiore a quanto atteso sulla base di età e scolarità; c) normalità delle altre funzioni cognitive e completa autosufficienza nello svolgimento delle attività della vita quotidiana, sociale e lavorativa; d) assenza di demenza e di altre condizioni morbose che possano spiegare il disturbo di memoria (ad esempio depressione maggiore, malattie endocrine, dismetabolismi, patologie croniche, eccetera) (14). In seguito, tali criteri sono

stati rivisti e modificati dagli stessi autori (23), che propongono la suddivisione del MCI in tre sottotipi: 1) “MCI-amnestic” (aMCI): compromissione della sola funzione mnemonica; 2) “MCI-multiple domains slightly impaired” (mdMCI): diverse aree cognitive lievemente compromesse; 3) “MCI-single non memory domain” (snmMCI): deficit in un’unica area cognitiva non mnemonica. L’importanza di tale classificazione risiede nel fatto che ciascuna di queste entità tenderebbe ad evolvere verso forme diverse di demenza (24) con un tasso annuo di conversione di circa il 12-15% (14). In particolare, pazienti con aMCI sono ad alto rischio di evolvere in Demenza di Alzheimer (AD).

È importante, pertanto, poter identificare i casi di MCI che tendono ad evolvere in AD. Una diagnosi preclinica permetterebbe di poter intervenire in una fase molto precoce della malattia, in cui maggiori sono le possibilità di successo terapeutico. Vari tentativi sono stati eseguiti studiando i punteggi alle valutazioni neuropsicologiche e seguendone nel tempo la loro evoluzione: le persone che rimangono nella condizione di MCI non variano i punteggi all’esame nel corso degli anni, mentre quelli che evolvono in malattia hanno una progressione più o meno rapida verso valori patologici. Purtroppo, non è stata identificata alcuna scala o batteria di scale neuropsicologiche in grado di predire i casi di MCI che evolvono in AD, per cui l’interesse scientifico si è indirizzato verso metodiche strumentali e di laboratorio, che possano essere in grado di identificare i soggetti a maggior rischio di evoluzione in AD.

Un campo di ricerca che sembra promettente è quello che studia la neurotrasmissione cerebrale e la possibilità di poter identificare deficit recettoriali mediante tecniche di medicina nucleare, quali la tomografia ad emissione di fotone singolo (SPECT) e la tomografia ed emissione di positroni (PET).

## **1.2 Neurotrasmissione recettoriale e Demenza**

Sempre maggiore interesse è rivolto al progressivo deterioramento dei vari sistemi neurotrasmettitoriali, responsabili dei sintomi cognitivo/comportamentali tipici della demenza: questo perché non solo caratterizzando e quantificando le loro modifiche è possibile definire e successivamente monitorare studi terapeutici, ma soprattutto perché una identificazione precoce delle loro alterazioni potrebbe portare ad una diagnosi precoce di demenza e consentire di seguire la progressione di malattia (25).

Il coinvolgimento dei sistemi neurotrasmettitoriali nella demenza viene studiato *in vivo* mediante PET e SPECT (26). Tuttavia, solo pochi studi hanno esaminato il grado di tale coinvolgimento nelle fasi iniziali o prodromiche dell'AD. La caratterizzazione *in vivo* delle modifiche neurotrasmettitoriali in soggetti affetti da MCI a rischio di convertire in AD, potrebbe fornire ulteriori indicazioni sulla vulnerabilità neuronale/sinaptica o sui meccanismi di compensazione che si verificano nelle fasi precliniche dell'AD; potrebbe, inoltre, consentire di individuare biomarcatori candidati per la diagnosi precoce

della stessa. Vari sono i sistemi neurotrasmettitoriali coinvolti nella patogenesi della AD e studiati con tecniche di medicina nucleare.

### 1.2a Sistema colinergico

Nell'AD, studi *post-mortem* hanno riportato un deficit dei neuroni colinergici a livello del nucleo basale di Meynert (27, 28), responsabile di deficit cognitivi, alterazioni dello stato di coscienza e allucinazioni (29). L'acetilcolina (ACh), infatti, regola l'attenzione, l'elaborazione degli stimoli sensoriali, la memoria di lavoro, il linguaggio, il sonno e la coscienza (29, 30). Studi *in vivo* hanno dimostrato una riduzione dell'attività colinergica a livello dell'ippocampo e del lobo temporale nell'AD lieve (31), dell'amigdala nell'AD moderata (32, 33), della regione temporo-parietale (31-35) e dell'ippocampo nell'AD severa (32, 35). Nei pazienti con MCI, l'attività corticale dell'ACh è ridotta, ma non in maniera significativa rispetto ai controlli (35, 36), ad eccezione dei casi di MCI che sono progrediti in AD (36). Ciò suggerirebbe un possibile ruolo dell'attività dell'ACh nell'identificare i pazienti con AD in una fase preclinica di malattia.

### 1.2b Sistema serotoninergico

La serotonina (5HT) è implicata principalmente nella modulazione del tono dell'umore, ma anche nel linguaggio e nella memoria. Il deficit di tale neurotrasmettitore nella demenza è responsabile di sintomi cognitivi, comportamentali e psichiatrici (37). Studi *in vivo* hanno dimostrato una marcata e diffusa riduzione dei recettori 5HT<sub>2A</sub>: a livello del cingolo anteriore, e della corteccia prefrontale, temporale e sensitivo motoria nell'AD lieve-moderata



(38); a livello della corteccia occipitale, parietale, temporale e frontale nell'AD moderato-severa (39). Nei pazienti con MCI vi è una diffusa e significativa riduzione dei recettori 5HT<sub>2A</sub>, già nelle primissime fasi di malattia (40). I recettori 5HT<sub>1A</sub> sono invece ridotti nel nucleo del rafe nei pazienti con AD e nell'ippocampo, sia degli AD che degli MCI (41).

### 1.2c Sistema dopaminergico

La dopamina (DA) svolge la sua funzione principale nel controllo della motilità, ma è anche responsabile della modulazione dei processi cognitivi, del comportamento e del tono dell'umore (42). Sebbene la conoscenza dell'esatto ruolo della DA nel determinare deficit cognitivi sia ancora limitata, anche perché la maggior parte degli studi condotti *in vivo* sono stati circoscritti allo striato, è verosimile che un deficit dopaminergico possa interferire con le funzioni esecutive di tipo frontale (43). Nell'AD, il sistema striatale dopaminergico è essenzialmente conservato o solo lievemente ridotto: in quest'ultimo caso, sono presenti disturbi extrapiramidali (44).

### 1.2d Sistema GABAergico

Il ruolo dell'acido- $\gamma$ -aminobutirrico (GABA) è ancora controverso nell'AD. Rispetto ai sistemi glutammatergico e colinergico, il sistema GABAergico è relativamente preservato nell'AD, sebbene i meccanismi precisi che sottintendono questa differente suscettibilità non sono del tutto noti. Nonostante la resistenza del sistema GABAergico alla neurodegenerazione, particolari subunità del recettore sono alterate nella demenza, inducendo un

aumento compensatorio di altre subunità recettoriali delle cellule circostanti (45).

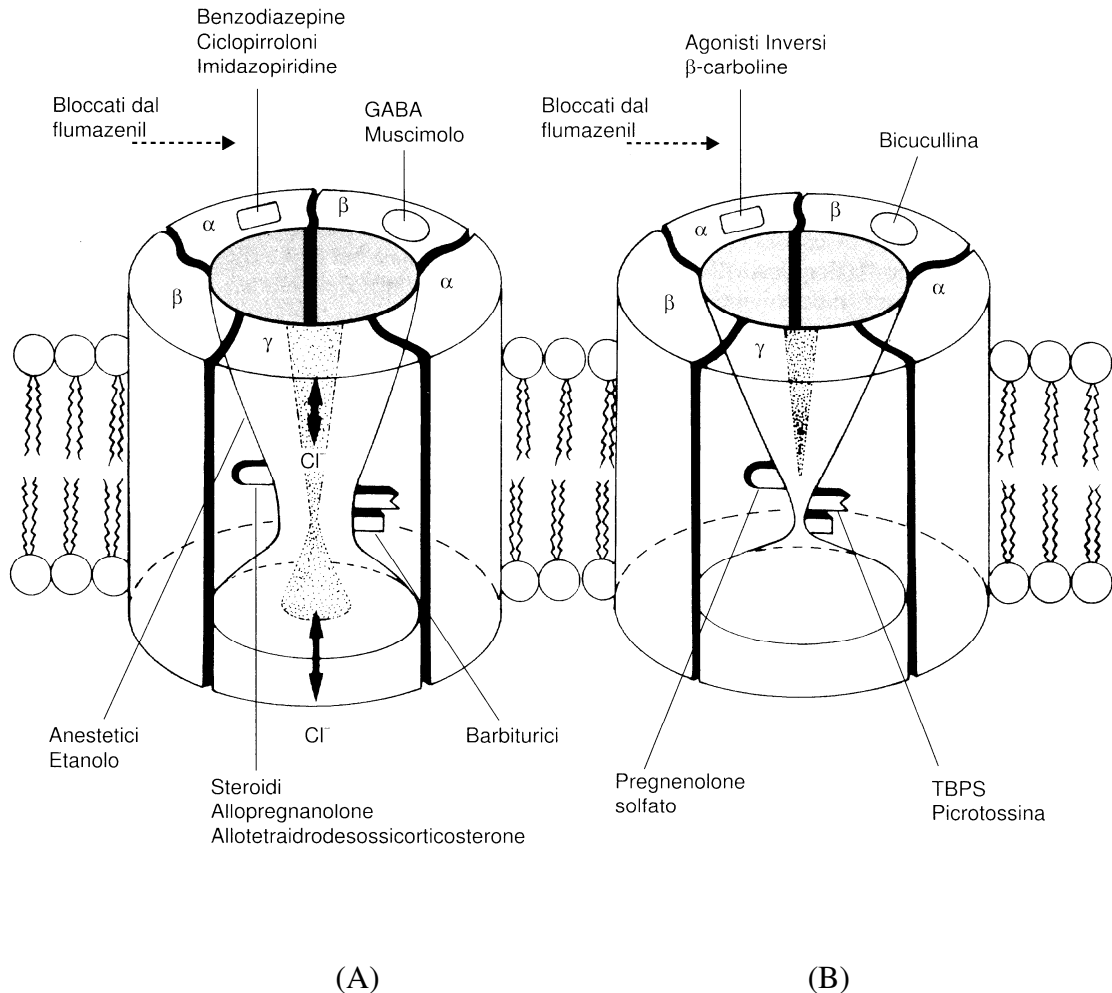


Figura 1. Il Recettore GABA<sub>A</sub>ergico è un canale per il cloro presente a livello postsinaptico in molti neuroni, costituito da almeno due differenti subunità; finora sono state identificate sei isoforme di subunità  $\alpha$  ( $\alpha_1$ - $\alpha_6$ ), tre  $\beta$  ( $\beta_1$ - $\beta_3$ ), tre  $\gamma$  ( $\gamma_1$ - $\gamma_3$ ) e una  $\delta$ . Sono schematizzati due differenti momenti funzionali dei canale: (A) attivato, (B) inibito. Sono indicate le tre differenti subunità  $\alpha$   $\beta$   $\gamma$  necessarie per costituire un recettore funzionalmente sensibile sia all'azione dei barbiturici che delle benzodiazepine. Sulle subunità e a livello del canale sono riportati i siti recettoriali di differenti modulatori positivi e negativi. In (A) sono riportati i siti di legame dei modulatori positivi dell'attività del recettore e in (B) quelli negativi capaci di inibire la funzione dei canale allo ione cloro.

Il GABA è il principale neurotrasmettitore inibitore nel cervello umano ed è coinvolto sia nelle funzioni comportamentali che cognitive, tra cui l'ansia, il sonno e la memoria (46). Inoltre, può anche agire modulando altri sistemi

neurotrasmettitoriali coinvolti nell'AD, quali il serotonergico, il colinergico e il glutammatergico (47). In particolare, il GABA, inibendo l'azione eccitatoria del glutammato, previene la morte neuronale indotta dalla  $\beta$ -amiloide, giocando così un ruolo nella riduzione della eccitotossicità nei neuroni corticali (48).

Fa parte del complesso recettoriale del GABA il sito di legame centrale delle benzodiazepine (BZD), che rappresenta un bersaglio, *in vitro* e *in vivo*, per i radioligandi utilizzati per effettuare gli esami PET e SPECT. Studi *post-mortem* hanno ritrovato una riduzione del legame del recettore GABAergico per le BZD ( $GABA_A/BZD$ ) a livello della corteccia paraippocampale, entorinale, temporale e frontale nel tessuto cerebrale di pazienti affetti da AD (47). Tuttavia, la maggior parte di questi studi sono stati condotti in fase avanzata di malattia. Recentemente è stata, inoltre, segnalata una suscettibilità selettiva di alcune subunità del recettore  $GABA_A$  nell'ippocampo dei pazienti con MCI (49), suggerendo il coinvolgimento di questi recettori già durante le prime fasi di AD. *In vivo*, studi PET e SPECT sono stati essenzialmente limitati a un piccolo numero di pazienti, affetti da AD moderata o severa, mostrando risultati controversi. Gli studi SPECT condotti presso il nostro (50) ed altri laboratori (51), utilizzando lo [ $^{123}I$ ]-Iomazenil, radiotracciante specifico per il recettore  $GABA_A/BZD$  a livello centrale come misura della densità neuronale, hanno riportato una diminuzione del legame del tracciante a livello di tutta la corteccia cerebrale, in particolare quella temporale e parietale, fatta eccezione per la occipitale. Gli studi PET, condotti utilizzando il [ $^{11}C$ ]-Flumazenil, antagonista

competitivo del recettore GABA<sub>A</sub>/BZD, hanno dimostrato, invece, un legame del tracciante che rimaneva sostanzialmente conservato (52, 53). Tuttavia, da studi condotti sia *post-mortem* che *in vivo* risulta ancora incerto se le modifiche dei recettori GABA<sub>A</sub>/BZD si verificano già in una fase iniziale di AD.

## **2. OBIETTIVI DELLA RICERCA**

La variabilità dei criteri diagnostici utilizzati e l'assenza di studi longitudinali di lunga durata su ampie coorti di soggetti non permette di stabilire se tutti i pazienti con aMCI convertiranno in AD e di conseguenza se il MCI rappresenti la fase preclinica dell'AD o una condizione che molto si avvicina al concetto di "*normal aging*". Lo sviluppo di markers specifici per individuare i soggetti affetti da MCI, ma soprattutto di 'markers predittivi' di conversione da MCI ad AD è uno dei maggiori obiettivi della ricerca clinica attuale. Negli ultimi anni, infatti, la ricerca ha individuato una serie di caratteristiche genetiche, biologiche e cliniche nei soggetti con MCI associate ad un maggior rischio di sviluppare demenza: presenza dell'allele  $\epsilon_4$  dell'apolipoproteina E (14); atrofia dell'ippocampo, rilevabile con metodiche di neuroradiologia morfologica (54, 55); ridotta concentrazione di sostanze come l'N-acetilaspato a livello della sostanza bianca, rilevabile con metodiche di neuroradiologia funzionale (56); ridotta concentrazione di antiossidanti plasmatici (57); perdita neuronale/sinaptica, che coinvolge in modo preferenziale la corteccia entorinale e l'ippocampo (25).

In particolare, scopo del nostro lavoro è stato quello di individuare marcatori cognitivi clinici e strumentali di tipo funzionale capaci di identificare

soggetti con MCI e di predire quali di questi convertiranno in AD, allo scopo di fornire elementi utili alla diagnosi precoce di demenza. Si è pertanto proceduto alla:

- a) misurazione quantitativa, mediante somministrazione di test neuropsicologici, dei deficit cognitivi del gruppo di soggetti con MCI rispetto ai controlli;
- b) identificazione delle regioni cerebrali maggiormente interessate da perdita neuronale, valutando il coinvolgimento dei recettori  $GABA_A/BZD$  – e se i cambiamenti nel legame intervenivano già in una fase preclinica di AD: per definire questo obiettivo, abbiamo confrontato il legame dello [ $^{123}I$ ]-Iomazenil ai neuroni della corteccia cerebrale in tutti i soggetti con MCI, con quello dei controlli sani; in particolare, abbiamo anche valutato se i soggetti con MCI che hanno convertito in AD entro uno o due anni di *follow-up* mostravano un diverso modello di legame recettoriale rispetto ai soggetti che sono rimasti stabili;
- c) confronto tra possibili modificazioni della densità neuronale dei recettori  $GABA_A/BZD$  in relazione al flusso ematico cerebrale regionale (rCBF) in soggetti affetti da MCI: questo, allo scopo di fornire ulteriori indicazioni sui rapporti tra lo status dei recettori  $GABA_A/BZD$  e l'attività sinaptica nei pazienti affetti da AD in fase preclinica.

## **3. PAZIENTI e METODI**

### **3.1 Pazienti**

Sono stati valutati 305 soggetti, pervenuti presso l'Unità di Valutazione Alzheimer (UVA) dell'Area Funzionale di Medicina Geriatrica del Dipartimento di Clinica Medica dell'Azienda Ospedaliera Universitaria Policlinico "Federico II" di Napoli, per la comparsa di disturbi cognitivi, nell'arco temporale di un anno, da gennaio 2006 a giugno 2007.

Tutti i pazienti, durante la fase di *screening* per la demenza, sono stati sottoposti ad attento esame clinico, che comprendeva: la raccolta dell'anamnesi, tenendo conto di elementi quali la scolarità, il livello intellettuale pre-morboso, le condizioni socio-ambientali ed economiche, l'attività lavorativa svolta, lo stile di vita, lo stato di salute fisica e psichica, il tipo di alimentazione, l'uso di farmaci, il livello di integrazione familiare e sociale, che influiscono notevolmente sull'espressività di un disturbo cognitivo, nonché il riscontro di familiarità per malattie neuropsichiatriche; l'esame obiettivo, individuando probabili elementi di comorbilità somatica che possono influenzare lo stato cognitivo come pure, sul piano neurologico, segni patognomonicamente di specifici quadri patologici; la somministrazione del Mini Mental State Examination (MMSE), delle scale per la valutazione delle Attività della Vita Quotidiana

(ADL) e delle Attività Strumentali della Vita Quotidiana (IADL) e della Clinical Dementia Rating Scale (CDR).

Il MMSE è un test costituito da 11 item suddivisi in due parti: verbale (orientamento, memoria a breve e lungo termine, attenzione e calcolo, linguaggio) e di performance (esecuzione di ordini scritti e orali, scrittura e copia di un disegno). Le prove verbali hanno un punteggio massimo di 24 punti; le prove non verbali hanno un punteggio massimo di 6 punti. Il punteggio totale, dato dalla somma dei punteggi che il paziente ha ottenuto a ciascun item, va da un minimo di 0 (deficit cognitivo grave) ad un massimo di 30 (assenza di deficit cognitivo) (58).

La scala di valutazione ADL misura, in base ad informazioni raccolte dal paziente o da una persona informata, sei attività fondamentali della vita quotidiana, quali fare il bagno, vestirsi, toilette, spostarsi, continenza urinaria e fecale, alimentarsi (59). La scala IADL valuta le capacità funzionali considerate necessarie per il mantenimento della propria indipendenza (60).

La CDR è uno strumento di valutazione globale della gravità dell'AD, che permette la stadiazione clinica della demenza, attraverso l'indagine di sei domini cognitivi e funzionali: memoria, orientamento, giudizio e soluzione di problemi, attività sociali, casa e tempo libero, cura personale (61).

La diagnosi di MCI, in accordo con i criteri di Petersen (14), è stata postulata in presenza di: disturbo soggettivo di memoria (preferibilmente confermato da un familiare); presenza di un deficit di memoria documentato da



una prestazione a test di memoria episodica al di sotto del valore medio normale per età e scolarità del soggetto; funzioni cognitive generali preservate; attività della vita quotidiana intatte (il deficit non doveva interferire sulle attività della vita lavorativa, sociale e quotidiana del soggetto); assenza di demenza; assenza di altre condizioni morbose, che potevano spiegare il disturbo di memoria (es. depressione maggiore, malattie endocrine, dismetabolismi, patologie croniche, eccetera).

Dai soggetti esaminati, sono stati esclusi dallo studio 187 pazienti che presentavano un punteggio MMSE corretto  $<24$  ovvero non soddisfacevano i criteri di inclusione per MCI. Di questi, 95 avevano una Demenza di Alzheimer, 38 una Demenza Vascolare, 24 erano affetti da depressione maggiore, 13 da diabete mellito, 15 da distiroidismo, 1 da tumore cerebrale, 1 da malnutrizione. Dei rimanenti 118, altri 88 sono stati esclusi, nonostante avessero un punteggio MMSE  $>24$ , perché presentavano malattie polmonari, cirrosi epatica, nefropatia complicata, parkinsonismi, gravi deficit sensoriali, tali da compromettere notevolmente le condizioni cliniche generali.

Sono stati quindi arruolati nello studio 30 soggetti, suddivisi in due gruppi: quattordici soggetti risultati sani, senza alcun disturbo cognitivo, e senza evidenza alla Tomografia Assiale Computerizzata (TAC) e/o alla Risonanza Magnetica Nucleare (RMN) di lesioni cerebrali sono stati considerati come controlli; sedici soggetti affetti da MCI, 8 uomini e 8 donne, con età media di  $72 \pm 7$  anni, con punteggio MMSE, corretto per età e scolarità compreso tra 24 e

30, con attività della vita quotidiana preservate. Nessun paziente era in trattamento con inibitori dell'acetilcolinesterasi.

Inoltre, sono stati eseguiti esami di laboratorio atti ad escludere qualsiasi causa secondaria di demenza, quali la concentrazione sierica di vitamina B<sub>12</sub> e dei folati, dei parametri di funzionalità tiroidei (TSH, FT<sub>3</sub>, FT<sub>4</sub>, Ab anti-Tg, Ab anti-TPO), del paratormone (PTH), dell'omocisteina, del DHEA-S (Deidroepiandrosterone solfato), VDRL (Venereal Disease Research Laboratory), TPHA (Treponema Pallidum Hemoagglutination), dei markers epatitici e tumorali.

Successivamente, ai pazienti è stata somministrata una serie di test psicometrici per una più dettagliata valutazione neuropsicologica del deficit manifestato (Tabella 1).

Tabella 1. *Funzioni cognitive e tests neuropsicologici*

<b>Funzioni cognitive esplorate</b>	<b>Test neuropsicologici utilizzati</b>
Memoria verbale a breve termine	<i>Span verbale</i>
Memoria verbale a lungo termine	<i>Parole di Rey (RAVLT)</i>
Memoria di prosa	<i>Breve racconto</i>
Memoria spaziale	<i>Span Corsi</i>
Prassia	<i>Copia di disegni</i>
Memoria visuo-spaziale/prassia	<i>Figura di Rey</i>
Linguaggio	<i>Fluenza verbale semantica e fonologica</i>
Attenzione	<i>Matrici Attenzionali</i>
Capacità logico-deduttive	<i>Matrici di Raven</i>

Funzioni esecutive	<i>Trail Making Test</i>
Depressione	<i>GDS</i>
Disturbi psichiatrici/comportamentali	<i>Neuropsychiatric Inventory</i>

Lo Span Verbale è un test che misura la capacità della memoria verbale a breve termine. Consiste nella ripetizione seriale di sequenze di parole bisillabiche, di numero crescente. Vengono presentate tre stringhe per ogni lunghezza. Se il soggetto rievoca correttamente almeno due stringhe su tre si passa alla stringa di lunghezza maggiore. Il punteggio è attribuito in base alla serie più lunga per la quale sono state ripetute correttamente almeno due stringhe (62).

La rievocazione immediata e differita delle 15 parole di Rey è una prova di apprendimento e rievocazione di una lista di quindici nomi appartenenti ad oggetti concreti, che vengono presentati al paziente per cinque volte consecutive. Dopo ogni presentazione, al paziente viene chiesto di ripetere, in qualsiasi ordine, il maggior numero possibile di parole, registrando ogni volta il numero e l'ordine con cui le parole vengono rievocate. La somma delle parole correttamente rievocate nei cinque trial costituiscono il punteggio di Rievocazione Immediata. Dopo un intervallo di 15 minuti, durante il quale vengono eseguite prove di tipo visuo-percettivo, al paziente viene di nuovo chiesto di rievocare il maggior numero possibile di parole della lista: il numero

di parole rievocate in questo trial costituiscono il punteggio di Rievocazione Differita (63).

Il test di memoria di prosa è un test di memoria a lungo termine che permette di valutare l'apprendimento di materiale verbale organizzato in modo gerarchico per blocchi di informazioni. Il test si svolge in due tempi: una prima lettura del testo seguita da un richiamo immediato ed una seconda lettura con richiamo differito di 10 minuti durante i quali il soggetto viene impegnato in prove di tipo non verbale. Il punteggio viene attribuito in base agli elementi semantici principali ed alle informazioni accessorie ad essi correlati ricordati dal paziente, cui corrispondono specifici punteggi (64).

Lo Span Spaziale è un test che misura la memoria seriale a breve termine di posizioni spaziali. Consiste nel far toccare al paziente una sequenza prestabilita di lunghezza progressivamente crescente di cubetti posti su una tavoletta di legno. Vengono presentate tre sequenze per ogni serie. Se il soggetto riproduce correttamente almeno due sequenze su tre si passa ad esaminare la serie successiva. Il punteggio è attribuito in base alla serie più lunga di cubetti per la quale sono state riprodotte correttamente almeno due sequenze (62).

Il test per l'Aprassia Costruttiva è una prova volta a valutare la capacità del paziente di copiare, rispettando le coerenze reciproche, gli elementi costruttivi dei disegni geometrici del modello, presentando al paziente una serie di sette fogli recanti figure di difficoltà crescente. Il punteggio è dato dalla

somma dei punteggi ottenuti per ciascuna copia, attribuiti in base alla presenza degli elementi del modello e alla loro distribuzione spaziale (62).

La figura di Rey è un test che indaga le abilità e le strategie costruttive di un soggetto e la memoria non verbale, immediata e a lungo termine. Consiste nella copia di una figura geometrica complessa, costituita da 18 elementi, per verificare la presenza di aprassia costruttiva, ovvero l'incapacità di costruire strutture complesse, ponendo gli elementi costituenti nei corretti rapporti spaziali reciproci. Dopo un intervallo di 30 secondi, durante il quale si distrae il paziente con una conversazione, si chiede al soggetto di riprodurre a memoria la figura (Riproduzione Immediata). Dopo un intervallo di 20 minuti dalla fine della copia, durante i quali si può impegnare il soggetto in test verbali, si chiede una seconda riproduzione a memoria (Riproduzione Differita). Il punteggio viene attribuito tenendo conto del numero di elementi della figura riprodotti dal soggetto, della fedeltà al modello e della giusta collocazione di ciascun elemento rispetto agli altri (64).

Il test di fluency verbale sia semantica, che fonologica, è uno strumento volto a valutare la capacità di ricerca rapida di parole nel lessico interno del soggetto. Nel primo caso si chiede al paziente di dire il maggior numero di parole che conosce per ciascuna delle quattro categorie di cose: colori, animali, frutta, città; per ogni stimolo viene concesso un tempo massimo di due minuti. Il punteggio viene dato dal numero complessivo di parole prodotte, diviso quattro (62). Nel secondo caso si chiede al soggetto di dire il maggior numero di parole

che conosce per ciascuna lettera F A S: per ogni stimolo viene concesso un tempo massimo di un minuto e il punteggio viene attribuito al numero complessivo di parole prodotte (65).

Il test delle Matrici Attenzionali misura la capacità di selezione in una situazione di ricerca visiva. Consiste nel mostrare al soggetto tre matrici in ordine di difficoltà crescente, riportanti 13 righe contenenti 10 numeri ciascuna e di far barrare con una matita tutti i numeri corrispondenti a quelli indicati in testa alla matrice nel minor tempo possibile. Il punteggio è dato dal numero totale di risposte esatte fornite dal soggetto entro 45 secondi nelle 3 matrici (62).

Le matrici colorate di Raven sono un test di ragionamento logico-deduttivo e di intelligenza non verbale, su dati visuo-spaziali, formato da tre set di dodici item ciascuno. Ognuna delle tavole si compone di una parte superiore che contiene la figura stimolo con un tassello mancante ed una parte inferiore che contiene sei alternative di risposta. Al paziente viene richiesto di osservare attentamente lo stimolo e di indicare, tra le sei alternative di risposta, quella che a suo parere completa meglio la figura stimolo. Il punteggio è dato dal numero di risposte esatte fornite nella prova (63).

Il Trail Making Test valuta la capacità di pianificazione spaziale in un compito di tipo visuo-motorio. Si compone di due parti: nella parte A il soggetto deve unire in sequenza con una linea i numeri dall'1 al 25; nella parte B il soggetto deve unire sia in ordine progressivo, che alternato i numeri dall'1 al 13 e le lettere dalla A alla N. Il punteggio viene calcolato in base al numero di

secondi impiegati per completare il test. Vengono ottenuti tre punteggi (parte A; parte B; differenza B – A); per ogni parte il punteggio grezzo va corretto in base all'età e alla scolarità del soggetto (66).

La Geriatric Depression Scale (GDS), valuta il grado di riduzione del tono dell'umore nell'anziano. Si compone di 30 item, a ciascuno dei quali viene dato un punteggio di 1 o 0 a seconda che il sintomo descritto sia attribuibile o meno ad uno stato depressivo. Il punteggio totale, dato dalla somma dei punteggi che il paziente ha ottenuto per ciascun item, va da un minimo di 0 ad un massimo di 30 (0-10: paziente non depresso; 11-20: paziente moderatamente depresso; 21-30: paziente molto depresso) (67).

La Neuropsychiatric Inventory (NPI) è una intervista strutturata con il caregiver che valuta 12 comportamenti: deliri, allucinazioni, agitazione/aggressività, depressione/disforia, ansia, euforia, apatia, disinibizione, irritabilità/labilità emotiva, comportamento motorio aberrante, sonno, disturbi dell'appetito e dell'alimentazione, sulla base della frequenza (0 = assente, fino a 4 = almeno quotidianamente) e della gravità (1-3), assegnando un punteggio da 0 a 144 (68).

Tutti i pazienti hanno eseguito, se non già praticata entro l'anno, una valutazione neuroradiologica con TAC e/o RMN dell'encefalo, senza mezzo di contrasto, sia per escludere patologie potenzialmente responsabili di demenza, che come supporto alla diagnosi clinica e neuropsicologica (69).

Tutti i pazienti affetti da MCI, entro tre mesi dall'inclusione, sono stati studiati con SPECT dedicata al cervello, sia per valutare la distribuzione dei recettori GABA<sub>A</sub>/BZD che il rCBF.

Per valutare la conversione in AD, come definito dai criteri del DSM IV (11) e del National Institute of Neurological Communicative Disorders and Stroke and the Alzheimer's Disease and Related Disorders Association (NINCDS-ADRDA) (22), tutti i soggetti sono stati nuovamente testati, a uno e a due anni dopo l'inclusione, utilizzando la stessa batteria neuropsicologica sopra descritta.

Dei quattordici soggetti arruolati come controlli sani, in cinque sono stati effettuati entrambi gli studi SPECT: per il recettore GABA<sub>A</sub>/BZD e per il rCBF; in altri cinque è stato effettuato lo studio SPECT per il recettore GABA<sub>A</sub>/BZD; e nei rimanenti quattro lo studio SPECT per il rCBF. Nel complesso, quindi, sono stati disponibili i dati di 10 controlli (6 uomini e 4 donne, con età media di  $67 \pm 8$  anni) per il recettore GABA<sub>A</sub>/BZD, da confrontare con i dati di 9 controlli (6 uomini e 3 donne, con età media di  $66 \pm 10$  anni) per il rCBF.

Nessun paziente o controllo sano ha assunto farmaci che agivano sul sistema GABAergico nei 3 mesi precedenti la valutazione neuropsicologica e/o l'esame SPECT.

Lo studio è stato approvato dal comitato etico locale e tutti i soggetti hanno firmato il loro consenso informato.



### 3.2 Imaging

Le immagini della distribuzione cerebrale dello [ $^{123}\text{I}$ ]-Iomazenil sono state acquisite a 20 e a 180 minuti dopo un'iniezione endovenosa lenta di 185 MBq di radiotracciante in bolo. Prima dell'iniezione, la tiroide, per evitare una indebita irradiazione, è stata bloccata con la somministrazione orale di un preparato iodurato, quale la soluzione di Lugol. Le immagini del rCBF sono stati acquisite a 20 minuti (entro 30 minuti dalla ricostituzione del tracciante) dopo un'iniezione endovenosa lenta di 740 MBq di [ $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ]-HMPAO (Ceretek, Amersham, UK). I soggetti sono stati iniettati in posizione supina, dopo almeno 10 minuti di riposo dalla pratica dell'accesso venoso che è stato mantenuto mediante infusione di soluzione fisiologica, onde evitare lo stress da venipuntura, con gli occhi chiusi, in una stanza buia e priva di rumore di fondo.

L'attività cerebrale è stata registrata in modalità *step-and-shoot*, con una gammacamera Ceraspect dedicata al cervello (Digital Scintigraphics, Waltham, Massachusetts, USA). L'elemento sensibile del rivelatore della gammacamera è un cristallo anulare di ioduro di sodio, che ha la proprietà di riemettere, sotto forma di radiazione luminosa visibile, una parte dell'energia assorbita quando è colpito da radiazioni ionizzanti. Tale energia viene riassorbita, eliminando i fotoni che si propagano secondo direzioni diverse rispetto a quella desiderata, da un collimatore di rotazione a fori paralleli. Un collimatore di questo tipo è costituito da una struttura assorbente realizzata con un materiale in grado di assorbire le radiazioni, entro la quale vi sono dei fori disposti in modo da

selezionare le desiderate direzioni di propagazione delle radiazioni. Le immagini sono state acquisite con una matrice 128 x 128, con un voxel di 1,67 x 1,67 x 1,67 mm, sono state ricostruite mediante una backprojection filtrata con filtro Butterworth (cut-off 1, ordine 10), e sono state attenuate utilizzando l'algoritmo di Chang (coefficiente di attenuazione 0,120 centimetri<sup>-1</sup>).

Ciascuno dei due studi SPECT è stato separato dall'altro da un intervallo di tempo che andava da una settimana fino a tre mesi.

### **3.3 Analisi dei dati**

Abbiamo assunto che la distribuzione cerebrale dello [<sup>123</sup>I]-Iomazenil dopo 180 minuti dall'iniezione del tracciante (immagini 'tardive') rappresenti principalmente un indice dell'affinità di legame ai recettori GABA<sub>A</sub>/BZD, consentendo di studiarne la densità cerebrale (70).

Le immagini, sia dell'assorbimento dello [<sup>123</sup>I]-Iomazenil, che quelle del rCBF sono state valutate per l'analisi dei dati utilizzando le regioni di interesse (ROIs) e la metodica voxel.

Per entrambi gli approcci, le immagini sono state spazialmente normalizzate secondo gli standard di spazio del Montreal Neurological Institute (MNI), utilizzando le impostazioni predefinite di normalizzazione spaziale (trasformazione affine con componenti non lineari, dimensioni del voxel di 2 x 2 x 2 mm) di SPM2 (Wellcome Department of Cognitive Neurology, London, UK, <http://www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm>).

Per quanto riguarda il rCBF, ogni scansione è stata normalizzata rispetto al modello generico SPECT in SPM2. Per le immagini tardive, ottenute dopo la somministrazione dello [ $^{123}\text{I}$ ]-Iomazenil, è stato generato prima di tutto un modello di normalizzazione spaziale a partire dai controlli anziani per ciascuna scansione rispetto al modello generico SPECT. Successivamente, è stata creata un'immagine principale dalle scansioni normalizzate spazialmente, che è stata poi appianata con un filtro gaussiano di 8 mm. Quindi, le immagini tardive dello [ $^{123}\text{I}$ ]-Iomazenil di ciascun soggetto (sia controlli che pazienti) sono state normalizzate spazialmente rispetto al modello precedentemente creato sulle immagini tardive e normalizzate spazialmente dei soggetti sani.

### **3.4 Analisi delle ROIs**

Quest'analisi è stata effettuata utilizzando il software Anatomist (<http://brainvisa.free.fr>). Un modello delle ROIs è stato inizialmente generato manualmente nello spazio del MNI sulla media delle immagini del rCBF spazialmente normalizzate, ottenute nei controlli e quindi automaticamente sovrapposte sul modello delle immagini tardive dello [ $^{123}\text{I}$ ]-Iomazenil spazialmente normalizzate. A differenza delle immagini ottenute in seguito all'infusione di [ $^{123}\text{I}$ ]-Iomazenil, le immagini del rCBF hanno fornito un contrasto elevato anche a livello della corteccia temporale mesiale, facilitando il posizionamento delle ROIs a livello dell'amigdala e dell'ippocampo, regioni che sono caratterizzate da una bassa concentrazione di recettori GABA<sub>A</sub>/BZD. Una

serie di ROIs di dimensione fissa, variabile dai 9 ai 25 voxel, si trovava su specifiche regioni della corteccia cerebrale e del cervelletto bilateralmente, su fette consecutive (di 2 mm di spessore) a specifici livelli Z nello spazio del MNI. La posizione delle ROIs è stata ricavata in accordo alle coordinate dell'Atlante di Talairach, convertite in quelle del MNI. Il modello delle ROIs così generato è stato quindi applicato alle immagini del rCBF spazialmente normalizzate e a quelle ritardate dello [ $^{123}\text{I}$ ]-Iomazenil di ciascun soggetto (controlli e pazienti), regolate manualmente, laddove necessario. I conteggi medi per voxel sono stati calcolati sia per lo [ $^{123}\text{I}$ ]-Iomazenil che per il [ $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ]-HMPAO, in regioni cerebrali funzionali, mettendo in comune tutte le ROIs, definite su fette transassiali consecutive, per entrambi gli emisferi. Le regioni cerebrali così generate erano la corteccia: associativa prefrontale, orbitofrontale, occipitale, parietale (aree di Brodmann (BA): 7 e 39/40), temporale, visiva primaria e sensitivo-motoria, l'amigdala, l'ippocampo, il cingolo posteriore e anteriore, il cervelletto. Successivamente, al fine di ridurre la variabilità nella captazione dei traccianti tra i vari soggetti, il valore medio dei conteggi, ottenuti in ciascuna regione, è stato normalizzato rispetto al valore medio dei conteggi ottenuti nel cervelletto e in tutto il cervello (cioè globali). I conteggi globali sono stati desunti dall'analisi statistica basata sui voxel, effettuata utilizzando SPM e una normalizzazione a livello globale di ridimensionamento proporzionale.

Differenze di età, del legame ai recettori  $\text{GABA}_A/\text{BZD}$  e del rCBF tra gli MCI e i controlli sono state valutate usando il test T-Student per dati spaiati.

Differenze tra il legame ai recettori  $GABA_A/BZD$  e il rCBF, tra i controlli e gli MCI che hanno convertito in AD – o MCI-converters (MCI-C) – e gli MCI che sono rimasti stabili – o MCI non-converters (MCI-NC) – sono stati testati utilizzando l'analisi one-way ANOVA. Un confronto post-hoc è stato effettuato utilizzando la correzione di Bonferroni.

### 3.5 Analisi Voxel

Le immagini tardive dello [ $^{123}I$ ]-Iomazenil e quelle del rCBF spazialmente normalizzate nello spazio del MNI e normalizzate al cervelletto, sono state appianate con un filtro gaussiano di 12 mm. È stato applicato un modello di SPM2 di covariate (età come interferenza) e di condizioni a soggetto unico (controlli, MCI-C, MCI-NC). Lo stesso modello statistico è stato applicato alle immagini tardive dello [ $^{123}I$ ]-Iomazenil e del rCBF non normalizzate al cervelletto. In quest'ultima analisi, la scala proporzionale è stata utilizzata per rimuovere gli effetti confondenti dovuti al cambiamento globale. Differenze significative tra i gruppi sono state fissate al valore di  $p < 0,001$  a livello di voxel, non corretta per comparazioni multiple, e al valore di  $p < 0,05$  per l'estensione del cluster, corretta per comparazioni multiple.

## **4. RISULTATI**

Nella tabella 2 sono riportate le principali caratteristiche dei pazienti arruolati nel presente studio:

sedici soggetti affetti da MCI, 8 uomini e 8 donne, con età media di  $72 \pm 7$  anni, i cui livelli sierici dei parametri metabolici indagati sono risultati nella norma, consentendo di escludere qualsiasi tipo di deficit cognitivo secondario.

Tabella 2. *Caratteristiche antropometriche principali ed esami ematochimici dei pazienti*

<b>Uomini/Donne 8/8</b>	<b>Media</b>	<b>Deviazione Std <math>\pm</math></b>	<b>Valori di riferimento</b>
<b>Età (anni)</b>	72	7	--
<b>Colesterolo mg/dl</b>	170,90	44,23	fino a 190
<b>Glicemia mg/dl</b>	87,35	16,93	60 – 110
<b>ProteineTotali g/dl</b>	7,14	0,53	6,5 – 8,2
<b>Albumina g/dl</b>	4,52	0,54	3,6 – 5,2
<b>Vitamina B<sub>12</sub> pg/ml</b>	602,15	264,25	197 – 866
<b>Folati sierici ng/ml</b>	5,72	2,17	2 – 9,1

La tabella 3 illustra i punteggi medi ottenuti in ognuna delle varie prove neuropsicologiche somministrate. Per tutte le prove, ad eccezione della memoria verbale a lungo termine, i punteggi medi sono risultati al di sopra dei valori del *cut-off point*. Da questi risultati si rileva una conservazione globale dello stato

cognitivo, tipica dei soggetti MCI. Questi, inoltre, riferivano attività della vita quotidiana, sia basiche che strumentali, intatte e non presentavano disturbi dell'umore e/o del comportamento.

Tabella 3. *Test NPS somministrati*

<b>Test Neuropsicologici</b>	<b>Media</b>	<b>Deviazione Std</b>	<b>Cut-off</b>
<b>MMSE corretto</b>	26,8	1,80	23,8
<b>Span Verbale</b>	4,14	0,69	2,75
<b>Parole di Rey RI</b>	30,55	6,86	28,53
<b>Parole di Rey RD</b>	4,38	1,95	4,69
<b>Racconto RI + RD</b>	6,97	2,92	4,75
<b>Span Spaziale</b>	4,77	0,93	3,5
<b>Copia disegni</b>	11,00	2,45	7,75
<b>Figura di Rey RI</b>	33,18	3,73	28,87
<b>Figura di Rey RD</b>	13,52	8,22	9,46
<b>Fluenza Semantica</b>	15,34	4,59	7,25
<b>Fluenza Fonologica</b>	27,85	8,73	17,35
<b>Matrici Attenzionali</b>	54,75	4,57	31
<b>Matrici di Raven</b>	31,00	2,58	18,96
<b>Trail A</b>	56,55	28,93	≥ 94
<b>Trail B</b>	101,27	60,28	≥ 283

Dopo la prima valutazione, tutti i soggetti sono stati ritestati con la batteria neuropsicologica riportata nella tabella 1, ogni 12 mesi, per valutare l'eventuale evoluzione del MCI in AD.

Tabella 4. Risultati dei test neuropsicologici dei pazienti MCI: confronto fra i valori basali ed i valori al follow-up nei soggetti NC vs i soggetti C

Test	MCI-NC (9)		MCI-C (7)	
	Basale	Follow-up	Basale	Follow-up
MMSE corretto	25,9 ± 1,8	26,0 ± 2,5	25,4 ± 1,9	20,5 ± 3,0
Span Verbale	4,2 ± 0,84	4,0 ± 1,0	3,29 ± 0,49	2,57 ± 1,27
Parole di Rey RI	31,8 ± 5,08	33,57 ± 6,31	28,14 ± 8,47	24,25 ± 8,64
Parole di Rey RD	5,28 ± 1,69	6,0 ± 1,77	3,30 ± 1,99	2,96 ± 1,53
Racconto RI + RD	7,14 ± 2,07	7,36 ± 1,62	5,91 ± 4,15	4,37 ± 3,90
Span Spaziale	4,95 ± 0,89	5,4 ± 1,67	4,39 ± 1,12	2,86 ± 1,97
Copia disegni	11,8 ± 1,92	11,67 ± 2,52	10,43 ± 3,05	7,0 ± 3,06
Figura di Rey RI	34,2 ± 3,15	34,91 ± 3,26	31,36 ± 4,66	29,86 ± 8,17
Figura di Rey RD	9,95 ± 9,25	11,4 ± 9,85	14,36 ± 8,26	14,25 ± 9,58
Fluenza Semantica	14,45 ± 3,74	16,15 ± 3,06	14,68 ± 6,2	12,54 ± 4,66
Fluenza Fonologica	32,34 ± 6,85	35,0 ± 6,86	24,69 ± 8,21	24,7 ± 9,21
Matrici Attenzionali	53,2 ± 4,82	51,75 ± 6,24	47,86 ± 5,7	43,0 ± 10,02
Matrici di Raven	32,0 ± 3,16	31,0 ± 2,58	25,43 ± 6,32	21,71 ± 6,95
Trail A	63,60 ± 36,31	63,97 ± 42,47	50,67 ± 22,9	79,17 ± 56,21
Trail B	95,20 ± 20,03	93,14 ± 22,39	106,33 ± 82,94	178,33 ± 95,71

I risultati ottenuti ci hanno consentito di dividere i soggetti MCI in due gruppi con differenti profili delle performance cognitive: soggetti con iniziale progressione verso l'AD e soggetti non progrediti. Sette soggetti sono convertiti in AD: quattro (2 uomini e 2 donne) dopo 1 anno e tre (2 uomini e 1 donna) dopo 2 anni di *follow-up*, ottenendo punteggi al MMSE inferiori al *cut-off point*



ed evidenziando una compromissione in domini cognitivi non ancora interessati nella valutazione basale (memoria episodica, visuo-spaziale, prassia), come si evince dalla tabella 4. I soggetti non ancora convertiti in AD, invece, mostrano punteggi sia basali che al *follow-up*, sebbene ai limiti del *cut-off point*, comunque ancora in un intervallo di normalità, ad indicare che la valutazione neuropsicologica non è uno strumento sensibile nella diagnosi precoce preclinica di demenza.

Non sono state riscontrate differenze significative tra gli MCI-C e gli MCI-NC per quanto riguarda l'età e il MMSE al momento dell'inclusione. Come atteso, al *follow-up* una riduzione significativa del MMSE è stata osservata solo negli MCI-C (tabella 5).

Tabella 5. *Dati demografici e MMSE*

<b>Parametri</b>	<b>Controlli<sup>a</sup> rCBF</b>	<b><sup>123</sup>I-Iomazenil</b>	<b>MCI</b>	<b>MCI-NC</b>	<b>MCI-C</b>
<b>Soggetti</b>	9	10	16	9	7
<b>Età (anni)</b>	66 ± 10	67 ± 8	72 ± 7	70 ± 8	75 ± 5
<b>Uomini/Donne</b>	6/3	6/4	8/8	5/4	3/4
<b>MMSE Basale</b>	-	-	26,8 ± 1,8	25,9 ± 1,8	25,4 ± 1,9
<b>MMSE (FU) a 2 anni per gli MCI-NC e alla conversione per gli MCI-C</b>				26,0 ± 2,5	<b>20,5 ± 3,0*</b>

L'età e il MMSE sono stati indicati come Media ± DS

a: 5 soggetti hanno praticato entrambe le SPECT per il rCBF e con lo [<sup>123</sup>I]-Iomazenil

\*: p<0.01 tra gli MCI-C e gli MCI-NC

-: dato non disponibile per tutti i soggetti esaminati

I dati sullo [<sup>123</sup>I]-Iomazenil e il [<sup>99m</sup>Tc]-HMPAO normalizzati al cervelletto o al cervello in toto hanno mostrato risultati simili. Abbiamo

riportato le immagini (figure 2 e 3) e i dati (tabelle 6 e 7) ottenuti con la normalizzazione del cervelletto.

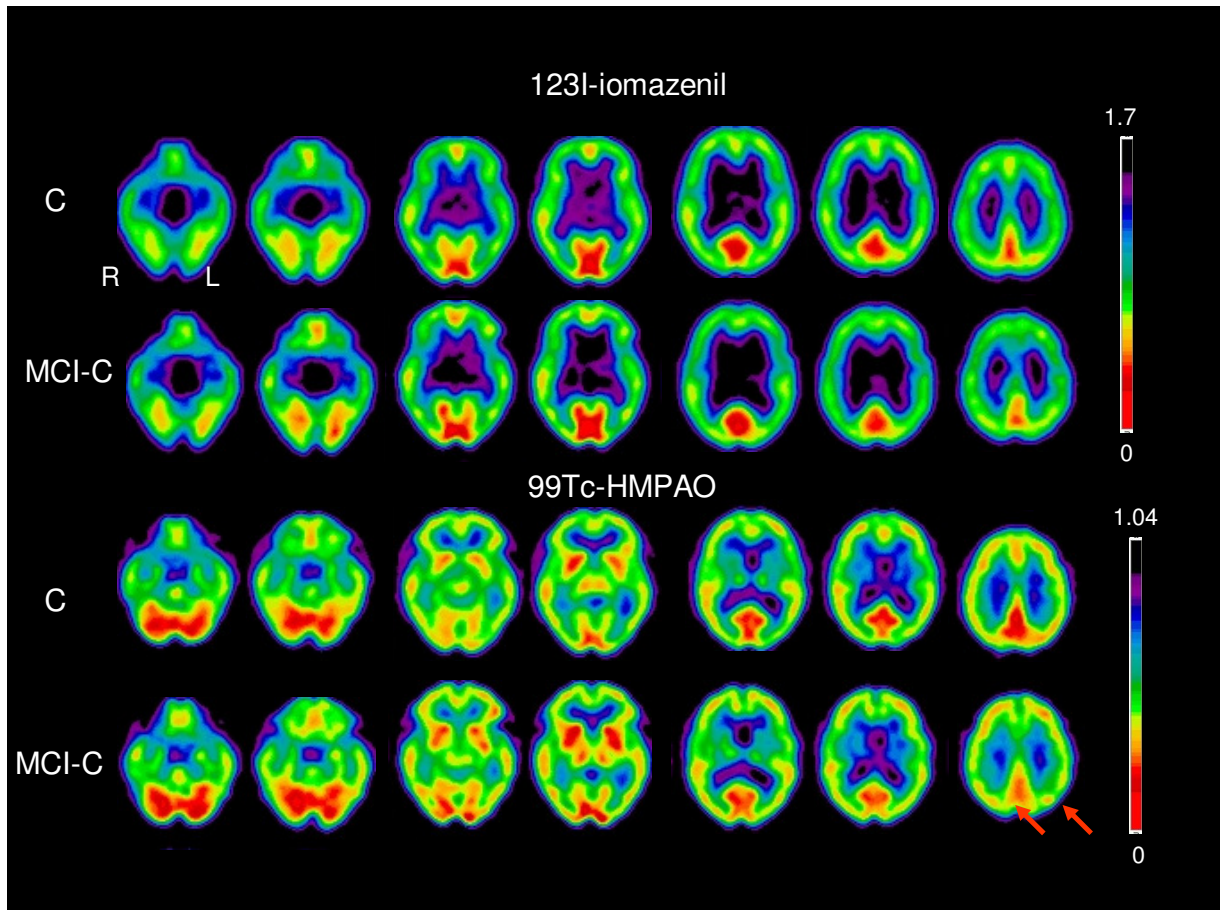


Figura 2. Media delle sezioni trasversali della captazione dello  $[^{123}\text{I}]$ -Iomazenil e del  $[^{99\text{m}}\text{Tc}]$ -HMPAO, normalizzata rispetto al cervelletto, nei controlli (C) e negli MCI-C. Da notare la lieve diminuzione dell'assorbimento del  $[^{99\text{m}}\text{Tc}]$ -HMPAO nella corteccia parietale superiore/precuneo negli MCI-C rispetto ai controlli. La scala dei colori rappresenta il valore più basso (blu) e più alto (rosso) del cervello, in rapporto al cervelletto.

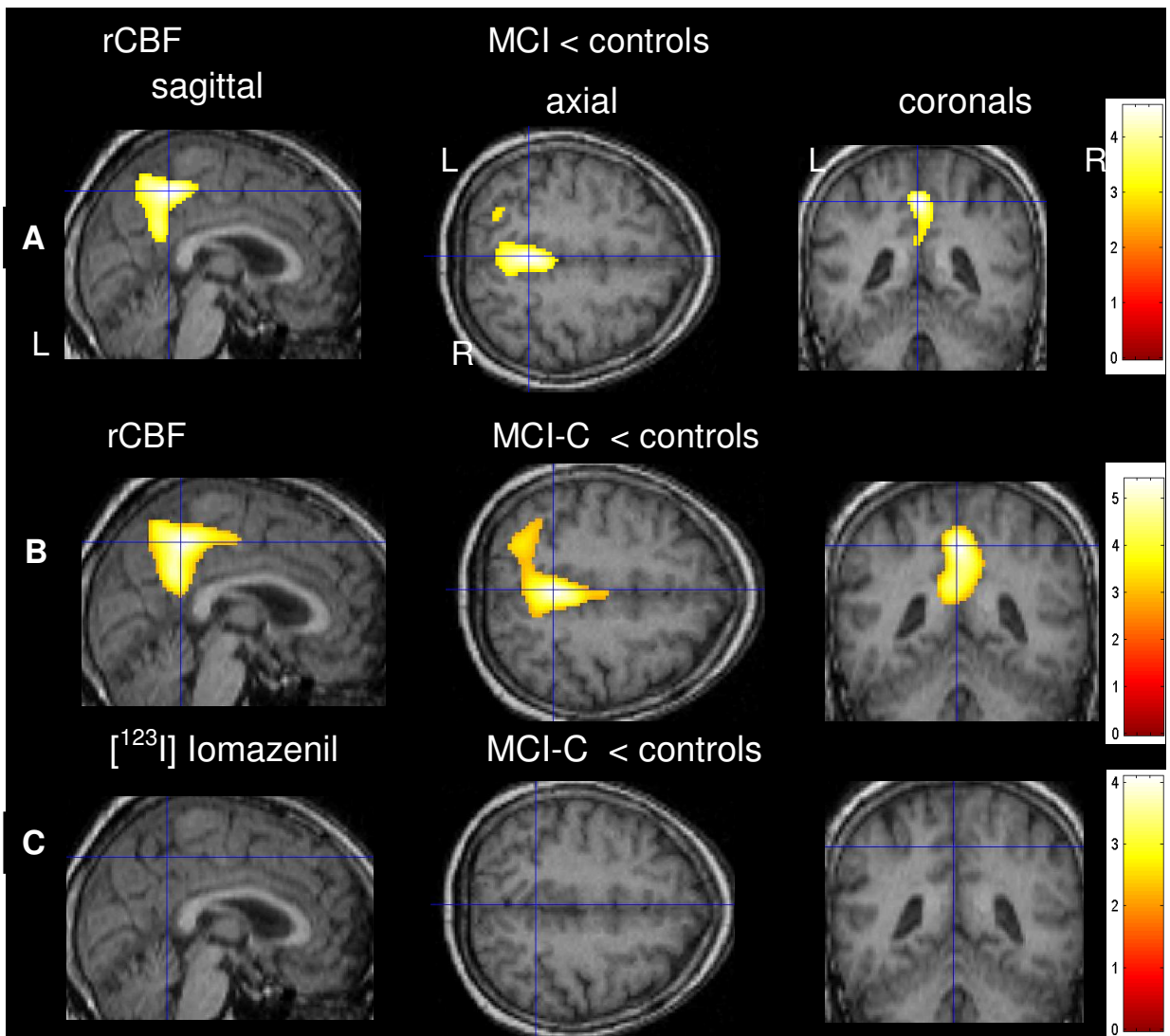


Figura 3. Risultati dell'analisi statistica della mappatura parametrica sovrapposta alle immagini RMN T1 pesate, ottenute in 10 MCI e spazialmente normalizzate nello spazio del MNI. La visualizzazione voxel riporta una relativa diminuzione del rCBF negli MCI (A) e negli MCI-C (B) rispetto ai controlli. Non vi è, invece una visualizzazione voxel che evidenzia una riduzione della distribuzione dello  $[^{123}\text{I}]$ -Iomazenil negli MCI-C, rispetto ai controlli (C). A fini illustrativi le mappe t statistiche sono state fissate al valore di significatività di  $p < 0,05$ , non corretto per il voxel. La scala di colori rappresenta il punteggio Z score.

Tabella 6. Distribuzione dello  $[^{123}\text{I}]$ -Iomazenil e del  $[^{99\text{m}}\text{Tc}]$ -HMPAO nelle diverse regioni cerebrali, normalizzata al cervelletto, ottenuta dall'analisi delle ROIs nei controlli e nell'intero gruppo degli MCI, sia MCI-NC che MCI-C. I valori sono espressi come media e (deviazione standard).

Aree cerebrali	$[^{123}\text{I}]$ -Iomazenil				$[^{99\text{m}}\text{Tc}]$ -HMPAO			
	Controlli	MCI	MCI-NC	MCI-C	Controlli	MCI	MCI-NC	MCI-C
<b>Ippocampo</b>	0,46 (0,07)	0,48 (0,09)	0,50 (0,11)	0,46 (0,06)	0,75 (0,05)	0,76 (0,06)	0,77 (0,02)	0,74 (0,08)
<b>Temporale</b>	1,11 (0,13)	1,09 (0,10)	1,11 (0,11)	1,06 (0,09)	0,82 (0,06)	0,82 (0,05)	0,85 (0,03)	0,79 <sup>c</sup> (0,04)
<b>Parietale BA7/precuneo</b>	1,31 (0,09)	1,22 (0,20)	1,24 (0,22)	1,20 (0,18)	0,98 (0,06)	0,87 <sup>b</sup> (0,08)	0,91 (0,05)	0,81 <sup>b</sup> (0,09)
<b>Parietale BA 39/40</b>	1,13 (0,12)	1,07 (0,13)	1,10 (0,11)	1,03 (0,14)	0,85 (0,06)	0,81 (0,07)	0,84 (0,03)	0,77 <sup>a</sup> (0,08)
<b>Prefrontale</b>	1,12 (0,19)	1,04 (0,12)	1,04 (0,15)	1,04 (0,08)	0,81 (0,07)	0,81 (0,05)	0,84 (0,03)	0,78 (0,06)
<b>Cingolo Posteriore</b>	1,31 (0,11)	1,25 (0,15)	1,28 (0,18)	1,21 (0,11)	0,96 (0,06)	0,89 <sup>b</sup> (0,10)	0,93 (0,09)	0,83 <sup>b</sup> (0,08)
<b>Cingolo Anteriore</b>	1,16 (0,20)	1,07 (0,15)	1,06 (0,16)	1,08 (0,15)	0,83 (0,08)	0,81 (0,06)	0,83 (0,04)	0,77 (0,07)
<b>Occipitale</b>	1,31 (0,13)	1,27 (0,13)	1,26 (0,14)	1,28 (0,12)	0,84 (0,05)	0,83 (0,05)	0,84 (0,05)	0,82 (0,06)

<sup>a</sup> p<0.05 vs controlli <sup>b</sup> p<0.01 vs controlli; <sup>c</sup> p<0.05 MCI-C vs MCI-NC

Tabella 7. Risultati dell'analisi SPM, che indica le aree cerebrali dove vi è una significativa diminuzione del rCBF negli MCI, rispetto ai controlli. Differenze significative tra i gruppi sono state fissate al valore di  $p < 0,001$  e di  $p < 0,05$  per l'estensione del voxel, rispettivamente non corretta e corretta per comparazioni multiple.

	Estensione dei Voxel (k)	Z score	Coordinate del MNI			Aree cerebrali	BA
			x	y	z		
<b>rCBF</b>							
MCI < controlli	498	3.76	-2	-46	50	L precuneo	7
MCI-C < controlli	1516	4.23	-2	-48	48	L precuneo	7
MCI-C < MCI-NC	526	4.11	66	-36	0	R temporale	21
	716	4.04	56	-20	-26	R giro fusiforme	20
	530	3.96	-12	-48	28	L cingolo posteriore	31

Le coordinate sono quelle riportate nello spazio del MNI R= right (destra); L= left (sinistra).

*Analisi delle ROIs:* il valore medio dei conteggi della distribuzione dello [<sup>123</sup>I]-Iomazenil nella corteccia cerebrale rispetto al cervelletto non differiva in maniera statisticamente significativa in tutto il gruppo di MCI da quella dei controlli, in qualsiasi regione analizzata. L'analisi one-way ANOVA, effettuata nei tre gruppi (controlli, MCI-C, MCI-NC) non ha mostrato alcun effetto significativo del gruppo, in ogni regione analizzata (Tabella 6).

Al contrario, rispetto ai controlli, l'intero gruppo di MCI ha mostrato una significativa diminuzione del rCBF, in rapporto al cervelletto, a livello del precuneo (BA 7) ( $p < 0,001$ ) e nella corteccia del cingolo posteriore ( $p < 0,05$ ). L'analisi one-way ANOVA ha rilevato un effetto significativo fra i gruppi a livello del precuneo (BA 7) ( $F = 10,6$ ,  $p < 0,001$ ), della corteccia parietale inferiore (BA 39/40) ( $F = 4,5$ ,  $p < 0,05$ ) e del cingolo posteriore ( $F = 5,99$ ,  $p < 0,01$ ). L'analisi post-hoc con la correzione di Bonferroni, ha rilevato che le differenze significative possono essere spiegate da una riduzione del rCBF negli MCI-C, rispetto ai controlli, nel precuneo (BA 7) ( $p < 0,001$ ), nella corteccia parietale inferiore (BA 39/40) ( $p < 0,05$ ), e nel cingolo posteriore ( $p < 0,01$ ) (Tabella 6).

*Analisi basata sui voxel:* a un valore significativo di  $p < 0,001$  per la dimensione voxel non corretta e di  $p < 0,05$  per la dimensione corretta, non sono state trovate differenze significative nel legame dello [<sup>123</sup>I]-Iomazenil ai recettori GABA<sub>A</sub>/BZD tra: l'intero gruppo di MCI, gli MC-C, gli MC-NC ed i controlli, e

negli MCI-C rispetto agli MCI-NC (Fig. 3). Al contrario, rispetto ai controlli, l'intero gruppo di soggetti con MCI ha mostrato una riduzione del rCBF statisticamente significativa a livello del precuneo, compresa la corteccia del cingolo posteriore (figura 3, tabella 7). Il confronto tra gli MCI-C ed i controlli ha rivelato una ipoperfusione, statisticamente significativa, a livello della stessa regione (figura 3, tabella 7), risultata, invece, non significativa dal confronto con gli MCI-NC. Infine, gli MCI-C rispetto agli MCI-NC hanno mostrato una riduzione del rCBF a livello del cingolo posteriore, della regione temporale destra e del giro fusiforme.

## **5. DISCUSSIONE**

La ricerca condotta in questi anni è la prima a studiare *in vivo* la distribuzione dei recettori GABA<sub>A</sub>/BZD a livello della corteccia cerebrale dei soggetti affetti da MCI. Non abbiamo riscontrato evidenza di significative variazioni del legame dello [<sup>123</sup>I]-Iomazenil nella neocorteccia e nel sistema limbico nei soggetti con MCI rispetto ai controlli. Il legame dello [<sup>123</sup>I]-Iomazenil non differisce tra gli MCI e i controlli in ogni regione del cervello che è stata indagata, comprese quelle aree critiche coinvolte nell'AD e non ancora indagate con precedenti studi PET e SPECT, quali il cingolo posteriore, il precuneo e l'ippocampo. Il legame dello [<sup>123</sup>I]-Iomazenil, rimasto inalterato in tutti i nostri soggetti MCI, era indipendente dalla analisi dei dati (a priori con le ROIs o non a priori con l'analisi basata sui voxel) o dalla conversione clinica di AD.

La maggior parte degli studi precedenti sui legami recettoriali, *post-mortem* ed *in vivo*, hanno esaminato lo stato dei recettori GABA<sub>A</sub>/BZD nei soggetti affetti da AD, in fase moderata o severa di malattia. Solo uno studio *post-mortem*, che indagava l'espressione dell'mRNA delle subunità recettoriali del GABA<sub>A</sub> a livello dell'ippocampo, è stato segnalato nei soggetti con MCI (49). Nei pazienti con AD in fase avanzata, studi *post-mortem* hanno rilevato

che la trasmissione glutammatergica è severamente compromessa con una riduzione dei recettori GABA<sub>A</sub>/BZD a livello dell'ippocampo (71, 72) e della corteccia temporale (73-75), frontale (74, 76, 77) e del cingolo posteriore (78). Il coinvolgimento dell'ippocampo nella demenza varia a seconda della suscettibilità delle subunità del recettore GABA<sub>A</sub>. La concentrazione della subunità recettoriale  $\alpha_5$  è sostanzialmente immodificata in molte regioni dell'ippocampo, ad eccezione della regione CA1, dove risulta parzialmente ridotta (27%): quest'andamento potrebbe essere secondario o ad una *down-regulation* della subunità o ad una perdita neuronale in quest'area. L'espressione della subunità  $\alpha_5$  è parzialmente ridotta anche a livello della corteccia entorinale (25%) e peririnale (30%): regioni queste che, insieme alla regione CA1, sono precocemente coinvolte nell'AD (79). La subunità  $\alpha_1$ , invece, è notevolmente ridotta nelle regioni CA1 e CA2, soprattutto nelle fasi avanzate di AD, risultando preservata nei casi moderati di malattia (80). L'entità della perdita dei recettori GABA<sub>A</sub>/BZD è risultata significativamente correlata con il numero di grovigli neurofibrillari nell'ippocampo (81) e la gravità della degenerazione neuronale nel cingolo posteriore (78). *In vivo*, uno studio SPECT condotto dal nostro gruppo (50) ha dimostrato una significativa riduzione del volume di distribuzione (VD) cerebrale dello [<sup>123</sup>I]-Iomazenil nella corteccia temporale e parietale di sei pazienti con AD moderata-grave, rispetto a cinque controlli di pari età (dal 20 al 37%). Una ridotta captazione del tracciante è stata anche riscontrata nella corteccia parietale e frontale di otto pazienti affetti da AD da



lieve a severa, rispetto a quattro pazienti con infarto cerebrale unilaterale presi come gruppo di controllo (51). Al contrario, altri studi PET e SPECT, condotti in pazienti con AD da lieve a severa hanno mostrato un VD del [ $^{11}\text{C}$ ]-Flumazenil (52, 53) e un'attività dello [ $^{123}\text{I}$ ]-Iomazenil (53), che rimanevano inalterati a livello della corteccia temporale e parietale (50), in condizioni di ridotto metabolismo (50) o di ipoperfusione (51). A questo proposito, è da notare che nel lavoro di Meyer et al., due dei tre pazienti con AD grave hanno mostrato un VD del [ $^{11}\text{C}$ ]-Flumazenil a livello della corteccia parietale con valori nello stesso intervallo o al di sotto del valore minimo dei soggetti di controllo (52). I risultati divergenti emersi tra questi studi possono essere collegati a diversi fattori, tra cui le differenze dei radiotraccianti utilizzati e delle misure di *outcome*, l'eterogeneità dei pazienti rispetto alla severità clinica della malattia e i criteri di inclusione. Nonostante alcune discordanze, nel complesso i risultati ottenuti da studi precedenti suggeriscono che i recettori  $\text{GABA}_A/\text{BZD}$  della corteccia cerebrale sono moderatamente coinvolti nell'AD, soprattutto nelle fasi avanzate di malattia. I nostri risultati negli MCI sono in linea con queste osservazioni e suggeriscono che i recettori  $\text{GABA}_A/\text{BZD}$  neocorticali e limbici sono sostanzialmente conservati nell'AD in fase preclinica. I nostri risultati sono, invece, in apparente contrasto con quelli dello studio *post-mortem*, da cui risulta ridotta l'espressione del mRNA delle subunità  $\alpha_1$  (20%) e  $\alpha_5$  (32%) del recettore  $\text{GABA}_A$  nell'ippocampo dei soggetti con MCI, rispetto a quelli senza deficit cognitivo (49). Questo potrebbe essere in parte spiegato dalla sensibilità

relativamente bassa dello [<sup>123</sup>I]-Iomazenil nel rilevare minime alterazioni delle subunità del recettore a causa della mancanza di selettività per i sottotipi del recettore GABA<sub>A</sub>/BZD.

Il risparmio relativo dei recettori GABA<sub>A</sub>/BZD, osservato nei nostri soggetti con MCI, potrebbe riflettere un risparmio della densità dei neuroni/sinapsi che esprimono questi recettori, che rimane preservata, una *up-regulation* compensatoria o entrambi i meccanismi. Poiché i recettori GABA<sub>A</sub>/BZD sono espressi da quasi tutti i neuroni corticali e da alcuni neuroni piramidali, i nostri risultati suggeriscono che la maggior parte di questi neuroni/sinapsi sono relativamente preservati nelle fasi precliniche e precoci di AD. In massima parte in linea con questa ipotesi, studi *post-mortem* condotti in passato hanno mostrato una certa capacità di resistenza alla degenerazione da parte dei neuroni GABAergici immunoreattivi alla parvalbumina, una proteina muscolare in grado di assorbire il calcio libero cellulare, nella corteccia prefrontale e temporale degli AD, supportando l'ipotesi che il processo patogenetico responsabile della demenza coinvolga specifici neuroni con particolari caratteristiche morfologiche e molecolari (82). Inoltre, nonostante una sostanziale riduzione del numero dei neuroni della corteccia entorinale e dell'ippocampo si verifichi già nell'AD lieve (83), gli interneuroni/sinapsi che esprimono il recettore GABA<sub>A</sub>/BZD sono solo lievemente ridotti o selettivamente risparmiati nell'ippocampo dei pazienti con AD, anche nelle fasi

più avanzate di malattia (45). Questi risultati sono in accordo con recenti osservazioni in modelli di topo transgenico con AD, che hanno mostrato una differente suscettibilità dei neurotrasmettitori alla beta-amiloide, con il sistema colinergico che è quello più maggiormente coinvolto, seguito dal sistema glutammatergico e quindi dal sistema GABAergico, che quindi risulta essere quello più resistente alla degenerazione (84). Una *up-regulation* dei recettori GABA<sub>A</sub>/BZD corticali può verificarsi come possibile meccanismo di compensazione in seguito alla perdita selettiva delle subunità recettoriali o, come suggerito dai modelli di topo transgenico con AD, come risposta precoce all'iniziale accumulo di amiloide (84) o come un tentativo di contrastare la supereccitabilità neuronale indotta dalla amiloide stessa (85). Nel nostro studio non abbiamo trovato, tuttavia, un incremento del legame dello [<sup>123</sup>I]-Iomazenil nell'ippocampo o in altre regioni corticali, suscettibili di una maggiore *up-regulation*, soprattutto nelle fasi più precoci di demenza, come recentemente segnalato per altri sistemi neurotrasmettitoriali, quale quello colinergico e quello serotoninergico (86, 87).

Come atteso, abbiamo trovato una riduzione del rCBF a livello della corteccia parietale e del cingolo posteriore dei soggetti affetti da MCI, rispetto ai controlli, riduzione che è stata essenzialmente maggiore in quei pazienti che sono convertiti in AD entro 2 anni di *follow-up*. Questi risultati sono coerenti con i precedenti studi SPECT di perfusione (88) e FDG-PET sul metabolismo

cerebrale del glucosio (89) negli MCI e supportano ulteriormente la sensibilità del rCBF nella rilevazione dell'AD in fase preclinica. La discordanza fra il risparmio dei recettori GABA<sub>A</sub>/BZD rispetto ad una riduzione del rCBF nella corteccia di associazione posteriore e nel giro cingolato posteriore supporta ulteriormente l'ipotesi che in queste regioni, nelle fasi molto precoci di AD, vi è prima di tutto un danno di connessione presumibilmente a livello dell'ippocampo, piuttosto che di perdita neuronale/sinaptica. Recenti studi FDG-PET/RMN (89) sono in accordo con la nostra osservazione, mostrando una discrepanza tra un ridotto metabolismo a livello delle regioni corticali posteriori, compreso il cingolo posteriore, e il profilo della sostanza grigia delle aree temporali mesiali negli MCI.

Un potenziale limite del nostro studio è la mancanza di una quantificazione assoluta del legame specifico dello [<sup>123</sup>I]-Iomazenil ai recettori GABA<sub>A</sub>/BZD. Non abbiamo applicato una quantificazione assoluta per evitare ai nostri soggetti prelievi di sangue arterioso e lunghi tempi della durata di acquisizione (3-4 ore). Sebbene non si possa prescindere da una ridotta precisione nella valutazione della disponibilità del recettore GABA<sub>A</sub>/BZD, le modificazioni del recettore andrebbero comunque considerate in misura minore, poiché il rapporto cervello/cervelletto delle immagini ritardate dello [<sup>123</sup>I]-Iomazenil può essere considerato un indice ragionevole di VD. Questa ipotesi si basa sulle seguenti osservazioni: 1) l'elevata correlazione riscontrata tra attività ritardata dello [<sup>123</sup>I]-Iomazenil e valori di VD (70); 2) il cervelletto (nostro

‘parametro di riferimento’ per la normalizzazione) non è presumibilmente coinvolto negli MCI; 3) il ritardo nella captazione cerebrale dello [<sup>123</sup>I]-Iomazenil non ne riflette la distribuzione, come suggerito dal risparmio del legame dello stesso, nonostante la riduzione del rCBF nelle regioni corticali posteriori nei nostri pazienti.

In conclusione, i risultati del nostro studio suggeriscono che i recettori GABA<sub>A</sub>/BZD della neocorteccia e dell’ippocampo sono sostanzialmente preservati nei pazienti affetti da AD, nelle fasi precliniche di malattia, nonostante una ipoperfusione e un’insufficienza funzionale nelle regioni corticali posteriori. Ulteriori studi, condotti su campioni maggiori e gruppi più omogenei di pazienti, saranno volti a valutare se i recettori GABA<sub>A</sub>/BZD sono conservati anche negli AD in fase iniziale di malattia, per stabilire il loro ruolo nel determinare un deficit cognitivo e per valutare, *in vivo*, il selettivo coinvolgimento delle subunità recettoriali. La preservazione dei recettori GABA<sub>A</sub>/BZD potrebbe offrire un potenziale bersaglio per future terapie neuroprotettive volte ad aumentare la funzione GABAergica, al fine di contrastare l’azione eccitatoria del glutammato e, eventualmente, per alleviare i sintomi cognitivo/comportamentali dell’Alzheimer.

The study was supported by the EC-FP6-project DiMI, LSHB-CT-2005-512146.

## **6. BIBLIOGRAFIA**

1. Canadian Study of Health and Aging Working Group. *Canadian Study of Health and Aging: study methods and prevalence of dementia*. J Canad Med Assoc, 1994; 150:899-913.
2. Mecocci P, von Strauss E, Cherubini A, Ercolani S, Mariani E, Senin U, Winblad B, Fratiglioni L. *Cognitive impairment is the major risk factor for development of geriatric syndromes during hospitalization: results from the GIFA study*. Dement Geriatr Cogn Disord, 2005; 20:262-269.
3. Kral VA. *Senescent forgetfulness: benign and malignant*. Can Med Assoc J, 1962; 86:257-260.
4. Gurland BJ, Dean L, Copeland J, Gurland B, Golden R. *Criteria for diagnosis of dementia in the community elderly*. Gerontologist, 1982; 22:180-186.
5. Hughes CP, Berg L, Danziger WL, Coben LA, Martin RL. *A new clinical scale for the staging of dementia*. Br J Psychiatry, 1982; 140:556-572.
6. Tagliavini F, Pilleri G. *Neuronal counts in the nucleus of Meynert in Alzheimer's disease and in simple senile dementia*. Lancet, 1983; 321:469-470.
7. Roth M, Tym E, Mountjoy CQ, Huppert FA, Hendrie H, Verma S, Gobbard R. *CAMDEX. A standardized instrument for the diagnosis of mental disorder in the elderly with special reference to the early detection of dementia*. Br J Psychiatry, 1986; 149:698-709.

8. Crook T, Bartus RT, Ferris SH. *Age Associated Memory Impairment: proposed diagnostic criteria and measures of clinical change-report of a National Institute of Mental Health work group*. Dev Neuropsychol, 1986; 2:261-276.
9. Senin U, Parnetti L, Petrini A, Menculini G, Menna M. *I profili del deterioramento mentale nell'anziano*. G Gerontol, 1987; 35:659-673.
10. WHO. *The ICD-10 classification of mental and behavioural disorder: diagnostic criteria for research*. WHO, Geneva, 1993.
11. American Psychiatric Association. *Diagnostic and statistical manual of mental disorders, 4<sup>th</sup> edition (DSM IV)*. American Psychiatric Association, Washington DC, 1994.
12. Levy R. *Aging-associated cognitive decline. Working Party of the International Psychogeriatric Association in collaboration with the World Health Organization*. Int Psychogeriatr, 1994; 6:63-68.
13. Graham JE, Rockwood K, Beattie BL. *Prevalence and severity of cognitive impairment with and without dementia in an elderly population*. Lancet, 1997; 349:1793-1796.
14. Petersen RC, Smith GE, Waring SC, Ivnik RJ, Tangalos EG, Kokmen E. *Mild cognitive impairment: clinical characterization and outcomes*. Arch Neurol, 1999; 56:303-308.
15. Morris JC, Storandt M, Miller JP, McKeel DW, Price JL, Rubin EH, Berg L. *Mild cognitive impairment represents early-stage Alzheimer disease*. Arch Neurol, 2001; 58:397-405.
16. Smith GE, Bohac DL, Waring SC, Kokmen E, Tangalos EG, Ivnik RJ, Petersen RC. *Apolipoprotein E genotype influences cognitive "phenotype" in patients with Alzheimer's disease but not in healthy control subjects*. Neurology, 1998; 50:355-362.

17. Huang C, Wahlund L, Dierks T, Julin P, Winbland B, Jelic V. *Discrimination of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment by equivalent EEG sources: a cross-sectional and longitudinal study*. Clin Neurophysiol, 2000; 111:1961-1967.
18. Petersen RC, Smith G, Kokmen E, Ivnik RJ, Tangalos EG. *Memory function in normal aging*. Neurology, 1992; 42:396-401.
19. Tierney MC, Szalai JP, Snow WG, Fisher RH, Tsuda T, Chi H, McLachlan DR, St George-Hyslop PH. *A prospective study of the clinical utility of Apo E genotype in the prediction of outcome in patients with memory impairment*. Neurology, 1996; 46:149-154.
20. Hogan DB, McKeith IG. *Of MCI and dementia: improving diagnosis and treatment*. Neurology, 2001; 56:1131-1132.
21. Knopman DS, DeKosky ST, Cummings JL, Chui H, Corey-Bloom J, Relkin N, Small GW, Miller B, Stevens JC. *Practice parameter: diagnosis of dementia (an evidence-based review). Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology*. Neurology, 2001; 56:1143-1153.
22. 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; 34:939-944.
23. Petersen RC, Doody R, Kurz A, Mohs RC, Morris JC, Rabins PV, Ritchie K, Rossor M, Thal L, Winblad B. *Current concepts in mild cognitive impairment*. Arch Neurol, 2001; 58:1985-1992.
24. Petersen RC. *Mild cognitive impairment as a diagnostic entity*. J Intern Med, 2004; 256:183-194.
25. Pappatà S, Salvatore E, Postiglione A. *In vivo imaging of neurotransmission and brain receptors in dementia*. J Neuroimaging, 2008; 18:111-124.



26. Volkow ND, Rosen B, Farde L. *Imaging the living human brain: magnetic resonance imaging and positron emission tomography*. Proc Natl Acad Sci USA, 1997; 94:2787-2788.
27. Francis PT, Palmer AM, Snape M, Wilcock GK. *The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1999; 66:137-147.
28. Geula C, Mesulam MM. *Cholinergic systems and related neuropathological predilection patterns in Alzheimer's disease*. In: Alzheimer's Disease. Terry RD, Katzman R, Bick KL, eds, New York: Raven Press, 1994; 263-291.
29. Perry E, Walker M, Grace J, Perry R. *Acetylcholine in mind: a neurotransmitter correlate of consciousness?* Trends Neurosci, 1999; 22:273-280.
30. Sarter M, Bruno JP. *Cognitive functions of cortical acetylcholine: toward a unifying hypothesis*. Brain Res Rev, 1997; 23:28-46.
31. Kuhl DE, Minoshima S, Fessler JA, Frey KA, Foster NL, Ficarò EP, Wieland DM, Koeppe RA. *In vivo mapping of cholinergic terminals in normal aging, Alzheimer's disease, and Parkinson's disease*. Ann Neurol, 1996; 40:399-410.
32. Shinotoh H, Namba H, Fukushi K, Nagatsuka S, Tanaka N, Aotsuka A, Ota T, Tanada S, Irie T. *Progressive loss of cortical acetylcholinesterase activity in association with cognitive decline in Alzheimer's disease: a positron emission tomography study*. Ann Neurol, 2000; 48:194-200.
33. Herholz K, Weisenbach S, Zundorf G, Lenz O, Schroder H, Bauer B, Kalbe E, Heiss WD. *In vivo study of acetylcholine esterase in basal forebrain, amygdala, and cortex in mild to moderate Alzheimer disease*. Neuroimage, 2004; 21:136-143.
34. Iyo M, Namba H, Fukushi K, Shinotoh H, Nagatsuka S, Suhara T, Sudo Y, Suzuki K, Irie T. *Measurement of acetylcholinesterase by positron emission tomography in the*

- brains of healthy controls and patients with Alzheimer's disease. Lancet, 1997; 349:1805-1809.*
35. Rinne JO, Kaasinen V, Jarvenpaa T, Nagren K, Roivainen A, Yu M, Oikonen V, Kurki T. *Brain acetylcholinesterase activity in mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2003; 74:113-115.*
  36. Herholz K, Weisenbach S, Kalbe E, Diederich NJ, Heiss WD. *Cerebral acetylcholine esterase activity in mild cognitive impairment. Neuroreport, 2005; 16:1431-1434.*
  37. Meltzer CC, Smith G, DeKosky ST, Pollock BG, Mathis CA, Moore RY, Kupfer DJ, Reynolds CF 3<sup>rd</sup>. *Serotonin in aging, late-life depression, and Alzheimer's disease: the emerging role of functional imaging. Neuropsychopharmacology, 1998; 18:407-430.*
  38. Meltzer CC, Price JC, Mathis CA, Greer PJ, Cantwell MN, Houck PR, Mulsant BH, Ben-Eliezer D, Lopresti B, DeKosky ST, Reynolds CF 3<sup>rd</sup>. *PET imaging of serotonin type 2A receptors in late-life neuropsychiatric disorders. Am J Psychiatry, 1999; 156:1871-1878.*
  39. Blin J, Baron JC, Dubois B, Crouzel C, Fiorelli M, Attar-Levy D, Pillon B, Fournier D, Vidailhet M, Agid Y. *Loss of brain 5-HT<sub>2</sub> receptors in Alzheimer's disease. In vivo assessment with positron emission tomography and [18F]setoperone. Brain, 1993; 116:497-510.*
  40. Hasselbalch SG, Madsen K, Svarer C, Pinborg LH, Holm S, Paulson OB, Waldemar G, Knudsen GM. *Reduced 5-HT(2A) receptor binding in patients with mild cognitive impairment. Neurobiol Aging, 2008; 29:1830-1838.*
  41. Kepe V, Barrio JR, Huang SC, Ercoli L, Siddarth P, Shoghi-Jadid K, Cole GM, Satyamurthy N, Cummings JL, Small GW, Phelps ME. *Serotonin 1A receptors in the living brain of Alzheimer's disease patients. Proc Natl Acad Sci, 2006; 103:702-707.*
  42. Robbins TW. *Dopamine and cognition. Curr Opin Neurol, 2003; 16(Suppl. 2):S1-S2.*

43. Pillon B, Czernecki V, Dubois B. *Dopamine and cognitive function*. *Curr Opin Neurol*, 2003; 16(Suppl. 2):S17-S22.
44. Rinne JO, Sahlberg N, Ruottinen H, Nagren K, Lehtikoinen P. *Striatal uptake of the dopamine reuptake ligand [<sup>11</sup>C]beta-CFT is reduced in Alzheimer's disease assessed by positron emission tomography*. *Neurology*, 1998; 50:152-156.
45. Rissman RA, De Blas AL, Armstrong DM. *GABA(A) receptors in aging and Alzheimer's disease*. *J Neurochem*, 2007; 103:1285-1292.
46. Möhler H. *Molecular regulation of cognitive functions and developmental plasticity: impact of GABA<sub>A</sub> receptors*. *J Neurochem*, 2007; 102:1-12.
47. Lanctot KL, Herrmann N, Mazzotta P, Khan LR, Ingber N. *GABAergic function in Alzheimer's disease: evidence for dysfunction and potential as a therapeutic target for the treatment of behavioural and psychological symptoms of dementia*. *Can J Psychiatry*, 2004; 49:439-453.
48. Louzada PR, Paula Lima AC, Mendonca-Silva DL, Noël F, De Mello FG, Ferreira ST. *Taurine prevents the neurotoxicity of beta-amyloid and glutamate receptor agonists: activation of GABA receptors and possible implications for Alzheimer's disease and other neurological disorders*. *FASEB J*, 2004; 18:511-518.
49. Rissman RA, Bennett DA, Armstrong DM. *Subregional analysis of GABA(A) receptor subunit mRNAs in the hippocampus of older persons with and without cognitive impairment*. *J Chem Neuroanat*, 2004; 28:17-25.
50. Soricelli A, Postiglione A, Grivet-Fojaja MR, Mainenti PP, Discepolo A, Varrone A, Salvatore M, Lassen NA. *Reduced cortical distribution volume of iodine-123 iomazenil in Alzheimer's disease as a measure of loss of synapses*. *Eur J Nucl Med*, 1996; 23:1323-1328.
51. Fukuchi K, Hashikawa K, Seike Y, Moriwaki H, Oku N, Ishida M, Fujita M, Uehara T, Tanabe H, Kusuoka H, Nishimura T. *Comparison of iodine-123-iomazenil SPECT and technetium-99m-HMPAO-SPECT in Alzheimer's disease*. *J Nucl Med*, 1997; 38:467-470.

52. Meyer M, Koeppe RA, Frey KA, Foster NL, Kuhl DE. *Positron emission tomography measures of benzodiazepine binding in Alzheimer's disease*. Arch Neurol, 1995; 52:314-317.
53. Ohyama M, Senda M, Ishiwata K, Kitamura S, Mishina M, Ishii K, Toyama H, Oda K, Katayama Y. *Preserved benzodiazepine receptors in Alzheimer's disease measured with C-11 flumazenil PET and I-123 iomazenil SPECT in comparison with CBF*. Ann Nucl Med, 1999; 13:309-315.
54. deToledo-Morrell L, Stoub TR, Bulgakova M, Wilson RS, Bennett DA, Leurgans S, Wu J, Turner DA. *MRI-derived entorhinal volume is a good predictor of conversion from MCI to AD*. Neurobiol Aging, 2004; 25:1197-1203.
55. Korf ES, Wahlund LO, Visser PJ, Scheltens P. *Medial temporal lobe atrophy on MRI predicts dementia in patients with mild cognitive impairment*. Neurology, 2004; 63:94-100.
56. Metastasio A, Rinaldi P, Tarducci R, Mariani E, Feliziani FT, Cherubini A, Pelliccioli GP, Gobbi G, Senin U, Mecocci P. *Conversion of MCI to dementia: Role of proton magnetic resonance spectroscopy*. Neurobiol Aging, 2005; 27:926-932.
57. Rinaldi P, Polidori MC, Metastasio A, Mariani E, Mattioli P, Cherubini A, Catani M, Cecchetti R, Senin U, Mecocci P. *Plasma antioxidants are similarly depleted in mild cognitive impairment and in Alzheimer's disease*. Neurobiol Aging, 2003; 24:915-919.
58. 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; 12:129-138.
59. Katz S, Ford AB et al. *ADL*. JAMA, 1963; 185:914-919.
60. Lauton MP, Brody EM. *Assessment of older people: self-maintaining and instrumental activities of daily living*. Gerontologist 1969; 9:179-186.

61. Hughes CP, Berg L, Danzinger WL, Coben LA, Martin RL. *A new clinical scale for the staging of dementia*. Br J Psychiatry, 1982; 140:566-572.
62. Spinnler H, Tognoni G. *Standardizzazione e taratura italiana di test neuropsicologici*. Ita J Neurol Sci, 1987; 6(Suppl. 8).
63. Caltagirone C et al. *The Mental Deterioration Battery (Part I): description of a instrument of the neuropsychological diagnosis*. Archivio di Psicologia, Neurologia e Psichiatria, 1995; 56(4):461-470.
64. Carlesimo GA, Buccione I, Fadda L, Graceffa A, Mauri M, Lo Russo S, Bevilacqua G, Caltagirone G. *Standardizzazione di due test di memoria per uso clinico: Breve racconto e Figura di Rey*. Nuova Rivista di Neurologia, 2002, vol 12; 1:1-13.
65. Borkowski JG, Benton AL, Spreen O. *Word fluency and brain damage*. Neuropsychologia, 1967; 5:135-140.
66. Reitan RM. *Validity of the Trail Making test as an indicator of organic brain damage*. Percept Mot Skills, 1958; 8:271-276.
67. Yesavage JA, Brink TL, Rose TL, Lum O, Huang V, Adey M, Leirer VO. *Development and validation of a geriatric depression screening scale: a preliminary report*. J Psychiatr Res, 1982-83; 17(1):37-49.
68. Comings JL, Mega M, Gray K, Rosenberg-Thompson S, Carusi DA, Gornbein J. *The neuropsychiatric inventory comprehensive assessment of psychopathology in dementia*. Neurology, 1994; 44:2308-2314.
69. Frisoni GB, De Carli C. *Imaging morfologico*. In: Trabucchi M (ed) *Le demenze*. Utet, 2002; pp.157-212.
70. Millet P, Graf C, Buck A, Walder B, Westera G, Broggin C, Arigoni M, Slosman D, Bouras C, Ibáñez V. *Similarity and robustness of PET and SPECT binding*

- parameters for benzodiazepine receptors. J Cereb Blood Flow Metab*, 2000; 20:1587-1603.
71. Greenamyre JT, Penney JB, D'Amato CJ, Young AB. *Dementia of the Alzheimer's type: changes in hippocampal L-[3H]glutamate binding. J Neurochem*, 1987; 48:543-551.
72. Jansen KL, Faull RL, Dragunow M, Synek BL. *Alzheimer's disease: changes in hippocampal N-methyl-D-aspartate, quisqualate, neurotensin, adenosine, benzodiazepine, serotonin and opioid receptors--an autoradiographic study. J Neurochem*, 1990; 39:613-627.
73. Shimohama S, Taniguchi T, Fujiwara M, Kameyama M. *Changes in benzodiazepine receptors in Alzheimer-type dementia. Ann Neurol*, 1988; 23:404-406.
74. Cross AJ, Crow TJ, Ferrier IN, Johnson JA. *The selectivity of the reduction of serotonin S2 receptors in Alzheimer-type dementia. Neurobiol Aging*, 1986; 7:3-7.
75. Owen F, Poulter M, Waddington JL, Mashal RD, Crow TJ. *[3H]R05-4864 and [3H]flunitrazepam binding in kainate-lesioned rat striatum and in temporal cortex of brains from patients with senile dementia of the Alzheimer type. Brain Res*, 1983; 278:373-375.
76. Chu DC, Penney JB Jr, Young AB. *Cortical GABAB and GABAA receptors in Alzheimer's disease: a quantitative autoradiographic study. Neurology*, 1987; 37:1454-1459.
77. Lloyd GK, Lowenthal A, Javoy-Agid F, Constantidinis J. *GABAA receptor complex function in frontal cortex membranes from control and neurological patients. Eur J Pharmacol*, 1991; 197:33-39.

78. Vogt BA, Crino PB, Volicer L. *Laminar alterations in gamma-aminobutyric acidA, muscarinic, and beta adrenoceptors and neuron degeneration in cingulate cortex in Alzheimer's disease.* J Neurochem, 1991; 57:282-290.
79. Howell O, Atack JR, Dewar D, McKernan RM, Sur C. *Density and pharmacology of alpha5 subunit-containing GABA(A) receptors are preserved in hippocampus of Alzheimer's disease patients.* Neuroscience, 2000; 98:669-675.
80. Mizukami K, Ikonovic MD, Grayson DR, Sheffield R, Armstrong DM. *Immunohistochemical study of GABAA receptor alpha1 subunit in the hippocampal formation of aged brains with Alzheimer-related neuropathologic changes.* Brain Res, 1998; 799:148-155.
81. Penney JB, Maragos WF, Greenamyre JT, Debowey DL, Hollingsworth Z, Young AB. *Excitatory amino acid binding sites in the hippocampal region of Alzheimer's disease and other dementias.* J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1990; 53:314-320.
82. Hof PR, Cox K, Young WG, Celio MR, Rogers J, Morrison JH. *Parvalbumin-immunoreactive neurons in the neocortex are resistant to degeneration in Alzheimer's disease.* J Neuropathol Exp Neurol, 1991; 50:451-462.
83. Price JL, Ko AI, Wade MJ, Tsou SK, McKeel DW, Morris JC. *Neuron number in the entorhinal cortex and CA1 in preclinical Alzheimer disease.* Arch Neurol, 2001; 58:1395-1402.
84. Bell KF, Claudio Cuello A. *Altered synaptic function in Alzheimer's disease.* Eur J Pharmacol, 2006; 545:11-21.
85. Palop JJ, Chin J, Roberson ED, Wang J, Thwin MT, Bien-Ly N, Yoo J, Ho KO, Yu GQ, Kreitzer A, Finkbeiner S, Noebels JL, Mucke L. *Aberrant excitatory neuronal activity and compensatory remodeling of inhibitory hippocampal circuits in mouse models of Alzheimer's disease.* Neuron, 2007; 55:697-711.

86. DeKosky ST, Ikonomic MD, Styren SD, Beckett L, Wisniewski S, Bennett DA, Cochran EJ, Kordower JH, Mufson EJ. *Upregulation of choline acetyltransferase activity in hippocampus and frontal cortex of elderly subjects with mild cognitive impairment*. *Ann Neurol*, 2002; 51:145-155.
87. Truchot L, Costes SN, Zimmer L, Laurent B, Le Bars D, Thomas-Antérion C, Croisile B, Mercier B, Hermier M, Vighetto A, Krolak-Salomon P. *Up-regulation of hippocampal serotonin metabolism in mild cognitive impairment*. *Neurology*, 2007; 69:1012-1017.
88. Borroni B, Anchisi D, Paghera B, Vicini B, Kerrouche N, Garibotto V, Terzi A, Vignolo LA, Di Luca M, Giubbini R, Padovani A, Perani D. *Combined 99mTc-ECD SPECT and neuropsychological studies in MCI for the assessment of conversion to AD*. *Neurobiol Aging*, 2006; 27:24-31.
89. Chetelat G, Desgranges B, de la Sayette V, Viader F, Berkouk K, Landeau B, Lalevée C, Le Doze F, Dupuy B, Hannequin D, Baron JC, Eustache F. *Dissociating atrophy and hypometabolism impact on episodic memory in mild cognitive impairment*. *Brain*, 2003; 126:1955-1967.