



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CATANIA

DOTTORATO DI RICERCA IN BIOLOGIA, GENETICA UMANA E
BIOINFORMATICA: BASI CELLULARI E MOLECOLARI DEL FENOTIPO
(XXVIII CICLO)

DIPARTIMENTO DI SCIENZE BIOMEDICHE E BIOTECNOLOGICHE
SEZIONE DI BIOLOGIA E GENETICA *G.SICHEL*

Dott.ssa Lucia Tamburello

***Profiling* dei miRNA plasmatici nella
Demenza Vascolare:
dati biomolecolari e implicazioni biomediche**

TESI DI DOTTORATO

Coordinatore e *Tutor*:
Chiar.mo Prof. Michele Purrello

Anno Accademico 2014/2015

INDICE

RIASSUNTO	5
INTRODUZIONE	7
Invecchiamento e Neurodegenerazione	7
Uno stadio intermedio: il Mild Cognitive Impairment (MCI)	10
Le Malattie neurodegenerative	11
Classificazione	14
Le Demenze	17
Storia	17
Definizione	20
Classificazione	22
BASI VASCOLARI DELLE DEMENZE	23
Anatomia e fisiologia della vascolarizzazione cerebrale	23
Territori di irrorazione dei vasi cerebrali	28
Danni vascolari e declino cognitivo	30
La Demenza Vascolare (VaD)	32
Storia	32
Caratteristiche generali	34
Fenotipo clinico	35
Diagnosi e Classificazione	38
Fattori di rischio e prevenzione	41
Malattia di Alzheimer	43
Caratteristiche Generali	43
Genetica dell'AD	46
Caratteristiche Cliniche e Diagnosi	47
Demenza Vascolare e Alzheimer	48
I microRNA	51
Biogenesi	52
MiRNA Circolanti	57
miRNA e Demenze	60
Materiali e metodi	64
Selezione Dei Pazienti	64
Estrazione dei miRNA da Plasma	66
Retrotrascrizione, preamplificazione, profiling dei miRNA	68
Analisi dei dati delle TLDA	70
Saggi singoli TaqMan	71
Target Prediction	71
Identificazione delle Pathways	72
Costruzione e analisi della Network	72
Quantificazione degli mRNAs target nel plasma	73

Risultati	75
Discussione	85
Conclusioni	92
BIBLIOGRAFIA	93

RIASSUNTO

La Demenza Vascolare (*Vascular Dementia*, VaD) è una forma di deficit cognitivo piuttosto eterogenea determinata dall'alterazione della circolazione sanguigna cerebrale frequentemente associata ad ipertensione ed iperlipidemia. Il danno neuronale è determinato dal venir meno di un adeguato rifornimento di ossigeno e sostanze nutritive (in particolare glucosio) in determinate aree cerebrali. Tra le forme di demenza è, per incidenza, seconda solo a quella di tipo Alzheimer (*Alzheimer's Dementia*, AD). Data la complessità e l'eterogeneità che la caratterizzano le sue basi molecolari sono state poco caratterizzate. Inoltre, l'assenza di marcatori molecolari specifici rende la VaD difficile da diagnosticare in modo inequivocabile. Una linea di ricerca, che sembra poter dare risultati, vede i microRNA (miRNA) come possibili candidati. Si tratta di molecole che svolgono importanti ruoli biomolecolari all'interno di *networks* cellulari e che, date le loro piccole dimensioni, si ritrovano nei fluidi biologici come miRNA circolanti (cmiRNA).

Nel presente lavoro è stato ipotizzato che i cmiRNA differenzialmente espressi nel plasma di pazienti affetti da VaD potrebbero permettere di individuare i geni coinvolti in questa forma di disordine ed essere usati per la diagnosi non invasiva della patologia. Tramite l'uso di *TaqMan Low Density Arrays* e saggi singoli *TaqMan*, i miR-10b* (nomenclatura alternativa 10b-3p), miR-29a-3p e miR-130b-3p sono stati identificati e validati come cmiRNA differenzialmente espressi in pazienti con VaD rispetto ad individui controllo (*Negative Control*, NC).

I tre miRNA in questione sono stati trovati essere significativamente downregolati anche in una coorte di pazienti con AD con livelli di espressione del miR-130b-3p più bassi nel plasma di questi ultimi rispetto a quelli rilevati nei pazienti con VaD.

Tra gli mRNA target (BACE1, CCT5, EDN1, GSK3B, ITPR1, LPL, NAV3, ZEB1) soltanto ZEB1 (target del miR-130b-3p) è stato identificato nel plasma di entrambe le categorie di pazienti. Inoltre, tramite un approccio di tipo bioinformatico si è indagato circa le funzioni biologiche dei geni regolati dai miRNAs oggetto dello studio.

Il profiling dei miRNAs ottenuto da pazienti con VaD e riportato nel lavoro colma una lacuna nella nostra conoscenza sulla sindrome ed apre la strada ad ulteriori analisi sulle sue basi genomiche e molecolari e sulle loro successive applicazioni traslazionali in ambito clinico-diagnostico.

INTRODUZIONE

Invecchiamento e Neurodegenerazione

“Le malattie, in vecchiaia, non sono incidenti di percorso.

Sono il percorso” (Carlo Gragnani).

Nonostante siano state formulate diverse ipotesi circa i meccanismi che stanno alla base dell' invecchiamento molti aspetti rimangono ancora da chiarire [1-3]. Sappiamo però che l'invecchiamento biologico è un processo che caratterizza tutti i viventi, con maggiore o minore velocità, consistente in un insieme di alterazioni post-maturative di cellule, tessuti e dell'intero organismo che si verificano con il passare del tempo e che dipendono dall'interazione di fattori biologici, psicologici, ambientali, sociali ed economici [Figura 1].



Figura 1. Caratteristiche dell'invecchiamento. Lopez-Otin Carlos et al 2013

Questo si manifesta con una progressiva diminuzione della capacità di adattamento dell'organismo agli stimoli e agli insulti dell'ambiente che lo conduce inesorabilmente ad una condizione di maggiore suscettibilità e vulnerabilità nei confronti delle malattie cui corrisponde un aumento della mortalità età-dipendente [2,4]. Pertanto *Senectus ipsa morbum est* (Publio Terenzio Afro) e le malattie associate con l'età anziana quali i tumori, i disordini neurodegenerativi e l'aterosclerosi [3] dovrebbero essere considerate segni o complicazioni di questa malattia universale.

Come tutti i tessuti dell'organismo anche il tessuto nervoso va incontro al processo di invecchiamento distinguibile in fisiologico e patologico. Le conseguenze che ne derivano riguardano cambiamenti molecolari e strutturali che iniziano nell'età adulta e che progrediscono col passare degli anni comportando fondamentalmente la riduzione del volume cerebrale e la perdita di sinapsi, con ripercussioni sulle capacità cognitive [7,8]. I cambiamenti cognitivi che si verificano nell'anziano dipendono molto spesso dalla copresenza di molteplici patologie, tra cui ad esempio le proteinopatie neurodegenerative ed i disturbi cerebrovascolari, e vanno da lievi a severi con fasi intermedie riconoscibili lungo il processo di invecchiamento [9]. Tuttavia i meccanismi molecolari che stanno alla base di questi processi non sono stati ancora ben compresi; dunque, dato il loro forte impatto personale e sociale risulta sempre più importante la distinzione tra il normale invecchiamento cerebrale e le condizioni neurodegenerative patologiche tipiche dell'età senile ed ancor più la comprensione del processo patogenetico delle stesse.

Uno stadio intermedio: il Mild Cognitive Impairment (MCI)

All'interno del processo di invecchiamento è possibile distinguere diverse fasi comprese tra due estremi: l'invecchiamento fisiologico da una parte e tutte le patologie che vanno sotto la denominazione di demenza dall'altro [Figura 2].

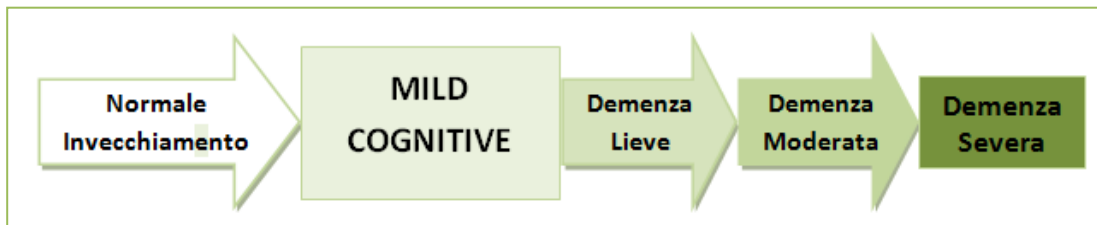


Figura 2. Tappe intermedie tra il normale invecchiamento e la demenza

Il MCI è generalmente definito come uno degli stadi intermedi in cui i sintomi clinici cominciano ad essere evidenti ma nel quale non si può ancora parlare di una forma neurodegenerativa conclamata perché i pazienti, pur presentando segni clinici di deterioramento cognitivo, riescono a svolgere senza problemi tutte le attività quotidiane [10]. Si tratta dunque di un periodo critico in cui la neuroplasticità è ancora efficace nel rimarginare i danni e le eventuali terapie farmacologiche possono mostrare un effetto benefico diminuendo la probabilità di progressione verso la neurodegenerazione [11]. Tale condizione intermedia presenta una

forte eterogeneità sia per quanto riguarda la sua manifestazione, si parla infatti di un MCI con sintomi anamnestici (a-MCI) e di un MCI senza sintomi anamnestici (na-MCI) [12-14], sia per quanto riguarda la sua evoluzione. Infatti, in alcuni casi si può assistere ad una reversione allo stato fisiologico mentre in altri ad una progressione verso la demenza [15-17]. L'instaurarsi della condizione patologica può avere un andamento che va da lento a medio a rapido [18-20] con quadri clinici di neurodegenerazione piuttosto eterogenei quali AD, VaD, Demenza a corpi di Lewy, *Huntington disease*, *Parkinson disease* e altre forme di demenza. [18,21].

Le Malattie neurodegenerative

La parola Neurodegenerazione è composta da “neuro” che designa le cellule nervose e “degenerazione” che fa riferimento al progressivo danneggiamento strutturale e funzionale delle stesse. Al di là del significato etimologico il termine si riferisce ad un ampio ed eterogeneo gruppo di disordini del Sistema Nervoso Centrale (SNC) caratterizzati da cambiamenti metabolici ereditabili nelle

cellule nervose, perdita di sinapsi ed altri compartimenti neuronali e, dunque, da una progressiva perdita di tessuto nervoso dovuta alla morte delle cellule cerebrali [22,23]. La principale caratteristica delle malattie neurodegenerative riguarda il loro lento avanzamento che fa sì che tra l'insorgenza della malattia ed il manifestarsi dei sintomi passino diversi anni. Ciò è dovuto alla plasticità del sistema nervoso che cerca di arginare i danni subiti ristabilendo nuove connessioni [24,25]. Negli stadi tardivi del processo neurodegenerativo, però, si verificano cambiamenti morfologici tali che la capacità compensatoria cerebrale perde efficacia e l'intervento farmacologico non sortisce più alcun effetto [23,26]. Proprio a motivo di ciò una delle principali problematiche riguardanti la neurodegenerazione è relativa alla necessità di mettere a punto sistemi per la diagnosi precoce delle stesse così da poter intervenire prima che i danni diventino irreparabili. Di fondamentale importanza sarebbe anche la diagnosi differenziale. Infatti, altra caratteristica distintiva dei processi neurodegenerativi riguarda la loro grande eterogeneità morfo-patologica e sintomatologica dovuta al fatto che diverse sono le aree cerebrali che possono essere colpite [Figura 3] e diverse combinazioni di

lesioni possono dar luogo a diversi quadri clinici che si sovrappongono tra loro.

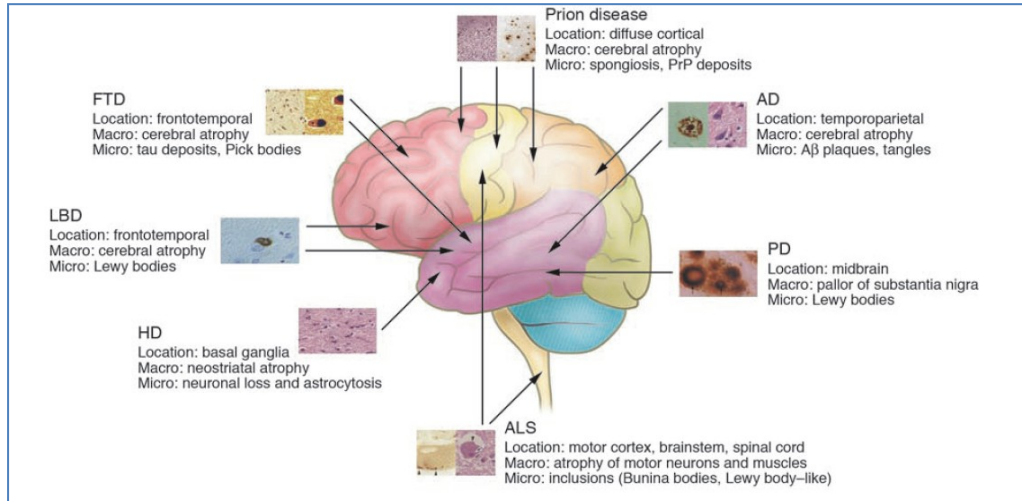


Figura 3. Schema della posizione anatomica e dei cambiamenti macroscopici e microscopici caratteristici delle malattie neurodegenerative (Bertram L., Tanzi R.E., 2005). AD: Alzheimer disease; PD: Parkinson disease; ALS: Amyotrophic lateral sclerosis; HD: Huntingto

Inoltre, lo stesso processo neurodegenerativo, soprattutto all'inizio, in individui diversi, può influenzare diverse aree del cervello, facendo sì che una data malattia appaia molto diversa dal punto di vista sintomatico [27,28]. Tuttavia la presenza di aggregati proteici intra- ed extracellulari rilevati tramite l'esame istologico eseguito su campioni autoptici di pazienti con differenti patologie a livello del SNC è un tratto comune [29] [Figura 4].

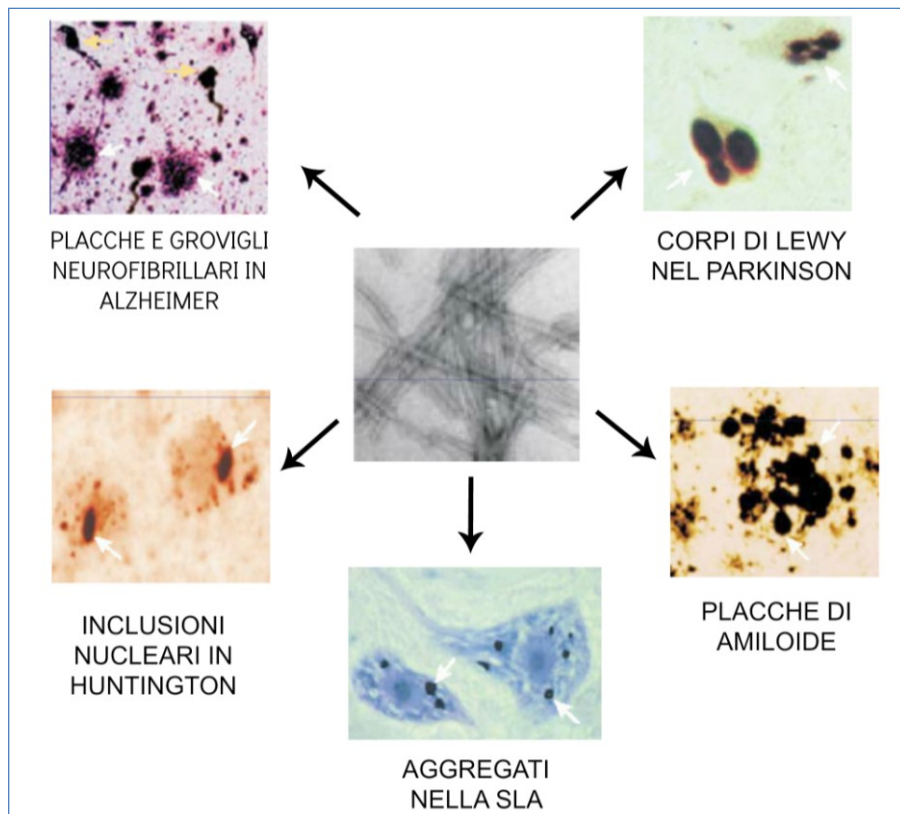


Figura 4. Esempi di aggregati proteici nelle varie patologie

Classificazione

In relazione a quanto dissertato nei precedenti paragrafi e considerato il fatto che gli aspetti neuropatologici associati ai vari disordini a volte rimangono sconosciuti fino a diagnosi autoptica è chiaro quanto difficile sia delineare i confini tra le diverse malattie neurodegenerative per poterle poi categorizzare; tuttavia una loro classificazione nosologica può essere effettuata tenendo conto delle caratteristiche cliniche predominanti, dell'area cerebrale

maggiormente colpita, delle proteine conformazionalmente alterate coinvolte nel processo patogenico e, se conosciuta, dell'eziologia che può talvolta avere basi genetiche [31,32].

Tenendo conto all'**area cerebrale colpita** le malattie neurodegenerative del SNC possono essere suddivise in quattro categorie ciascuna delle quali contenente delle sottocategorie definite in relazione alla sintomatologia clinica. Dunque si parla di

- **malattie della corteccia:** vengono a loro volta suddivise in dementigene (di cui l'AD è il principale rappresentante) e non dementigene
- **malattie dei gangli basali:** sono essenzialmente caratterizzate da anomalie dei movimenti ed, in relazione alla fenomenologia, classificate in ipocinetiche (rappresentate dal *Parkinson disease*) ed ipercinetiche (rappresentate dall' *Huntington disease*)
- **malattie del cervelletto:** la loro classificazione è piuttosto difficile a causa dell'elevata sovrapposizione tra le varie forme patologiche; tuttavia molte rientrano all'interno di tre categorie (atrofia cerebellare corticale, atrofia pontocerebellare e atassia di Friedreich) mentre altre non possono farne parte

- **malattie del midollo spinale:** sono rappresentate dalla Sclerosi Laterale Amiotrofia (SLA) e dall'Atrofia Muscolare Spinale (SMA), che comportano lesioni alla parte anteriore del midollo spinale, e la già citata atassia di Friedreich che ne colpisce la parte posteriore

[28]

In relazione alle **caratteristiche cliniche** è possibile suddividere le malattie neurodegenerative nelle seguenti tre categorie:

- **declino cognitivo, demenza e alterazioni delle funzioni cerebrali di ordine superiore**
- **disordini del movimento**
- **disordini in cui si osserva la combinazione delle due tipologie di manifestazioni cliniche.**

Si può operare, inoltre, una **classificazione neuropatologica** che tiene conto dei seguenti parametri:

- distribuzione anatomica del danno neuronale o delle lesioni di tipo vascolare
- valutazione dei depositi proteici intra- ed extracellulari

[32]

Le Demenze

Storia

Lo studio dei processi dementigeni affonda le sue radici in un lontano passato e non risulta semplice tracciarne la storia in maniera precisa ed esaustiva. Tuttavia volendo ricordare le tappe salienti dell'interesse medico in questo ambito possiamo dire che il termine demenza (dal latino *demens*=senza mente) veniva usato già nella medicina dell'antica Roma, infatti, Aulo Cornelio Celso la descriveva all'interno del *De medicina* come una condizione generica di alterazione intellettiva e comportamentale ma soltanto tra il 1800 e il 1900 il termine acquisisce una vera e propria connotazione medica.

Jean Etienne Esquirol (1772-1840), secondo cui un soggetto affetto da demenza può essere considerato “*un uomo ricco che è divenuto povero*”, definì la demenza, nel suo trattato *Des maladies mentales, considérées sous les rapports médicaux, hygiénique et médico-légal* (Parigi 1838), come un quadro clinico caratterizzato da perdita della memoria, della capacità di giudizio e

dell'attenzione. Inoltre Esquirol identificò sottotipi e categorie di disordini mentali gettando le basi per la moderna classificazione.

Nel 1883 Emil Kraepelin proponeva, all'interno del suo *Compendium der Psychiatrie*, un nuovo sistema di classificazione delle malattie mentali, che fu per decenni il punto di riferimento della nosologia psichiatrica. Nell'ottava edizione dello stesso compendio, pubblicata tra il 1910 e il 1915, Kraepelin presentò un'esposizione completa e dettagliata della demenza senile di cui rimane ancora oggi traccia nei principali manuali di classificazioni diagnostiche (ICD e DSM). All'interno della categoria demenza venne inserita anche la forma di disordine descritta nel 1906 da Alois Alzheimer e approfondita poi da Gaetano Perusini nel 1909, chiamandola Malattia di Alzheimer o Demenza Presenile.

Alois Alzheimer descrisse il quadro clinico-patologico di una donna di 51 anni che aveva sviluppato un progressivo decadimento cognitivo con allucinazioni, incompetenza sociale, iniziali deliri e successivo disorientamento spazio-temporale. All'esame autoptico vennero riscontrate atrofia cerebrale, placche senili e agglomerati neurofibrillari.

Fino alla seconda metà del '900, tuttavia, la demenza veniva considerata una *conditio sine qua non* del normale processo di

senescenza neuronale e l'interesse per gli aspetti diagnostici e clinici è restato piuttosto scarso. Soltanto a partire dagli anni '60, grazie alla maggiore disponibilità di tecniche di studio del funzionamento del SNC, ad una più chiara conoscenza dei processi neuropsicologici e neuropatologici e all'introduzione di criteri clinici definiti, è stata operata una maggiore caratterizzazione clinica delle demenze e la loro distinzione sia dalle psicosi in generale che dalle modificazioni delle funzioni cognitive riscontrabili con l'invecchiamento [33]. Inoltre, mentre in passato sia le forme degenerative che quelle vascolari di demenza venivano identificate sotto la definizione di "arteriosclerosi" [34], oggi, seppur con difficoltà vista la sovrapposizione della sintomatologia clinica che contraddistingue le condizioni dementigene, si tende sempre più ad un approccio multidisciplinare e ad una distinzione tra le forme degenerative (rappresentate dall'AD), di origine vascolare o associate ad altri quadri di deterioramento cognitivo [35].

Definizione

Le demenze sono tra le malattie neurodegenerative maggiormente diffuse nel mondo in conseguenza dell'innalzamento della vita media. Tuttavia diversi studi hanno dimostrato che la prevalenza di demenza varia ampiamente tra le diverse aree geografiche, essendo influenzata da fattori culturali e socio-economici [36]. Secondo il censimento dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), nel 2010, le persone affette da demenza erano circa 35,6 milioni, numero che, come si prevede, si triplicherà entro il 2050 [37]. La più frequente forma di demenza è rappresentata dall'AD seguita dalla VaD con cui talvolta coesiste nello stesso individuo [38].

Per darne una definizione quanto più possibile corretta prendiamo in considerazione le recenti versioni dei due manuali leader di classificazione delle malattie ICD-10 [39] e DSM-V [40].

Nell'ICD-10 AD e VaD vengono catalogate sia all'interno della voce *Mental and behavioural disorders* sia all'interno della sezione *Disease of the nervous system* ed in particolare all'interno della sottocategoria *Other degenerative diseases of the nervous system* in essa contenuta. Nella sezione *Mental and behavioural*

disorders la demenza viene definita come un quadro sindromico conseguente a malattie del cervello generalmente di natura cronica o progressiva in cui si assiste all'insorgere di disturbi delle funzioni corticali superiori, quali memoria, pensiero, orientamento, linguaggio, comprensione, capacità di calcolo, d'apprendimento e di giudizio, ed in cui la coscienza non viene offuscata. Inoltre, le alterazioni delle funzioni cognitive sono talvolta accompagnate dal deterioramento del controllo emotivo, del comportamneto sociale e motivazionale [39,42].

Il DSM-V rispetto al DSM-IV-TR [41] rimpiazza il termine demenza con l'espressione "Disordine Neurocognitivo Maggiore" (*Major Neurocognitive Disorder*) e riconosce una certa importanza alle condizioni in cui i disturbi sono meno severi ma hanno comunque un significato clinico attribuendo a tali condizioni la denominazione di *Mild Neurocognitive Disorder*. Anche se il confine che permette di separare le due condizioni non è netto vale comunque la pena di considerarle e trattarle separatamente perché i disordini neurocognitivi maggiori conclamati devono essere attenzionati in termini di assistenza al paziente e alla famiglia, invece, le condizioni lievi che le precedono sono il focus principale della ricerca che mira alla messa a punto di metodi e alla

identificazione di marcatori che permettano la diagnosi precoce. La demenza è dunque un quadro sindromico caratterizzato dalla presenza di una compromissione della memoria associato a disturbi di altre funzioni cognitive, così come ad importanti disturbi psicologici e comportamentali (si diventa ansiosi, irrequieti, timorosi, depressi o si soffre di deliri, irritabili e talvolta aggressivi anche solo verbalmente, insonni, apatici etc..) in grado di causare una significativa riduzione delle capacità di svolgere le attività della vita quotidiana del paziente [42].

Classificazione

Una chiara ed inequivocabile classificazione delle varie forme di demenza non è per nulla semplice a causa della loro grande eterogeneità clinica e della loro grande complessità neuropatologica. Tuttavia, secondo quanto definito dal *National Institute of Health* (NIH) le varie forme di demenza possono essere raggruppate in cinque categorie principali:

- (1) *Alzheimer's Dementia*;
- (2) *Vascular Dementia*;
- (3) *Dementia with Lewy bodies*;
- (4) *Frontotemporal Dementia*;

(5) Mixed Dementias

ciascuna delle quali ha una propria unicità ma condivide con le altre la presenza di un'alterazione cerebrovascolare in qualche stadio del processo patologico così come l'anormale deposizione proteica. Fondamentalmente possiamo dire che tra i meccanismi molecolari che stanno alla base di tutte le forme di demenza vi sono: ipossia, stress ossidativo, neuroinfiammazione, neurodegenerazione ed alterata permeabilità della barriera emato-encefalica responsabili tanto dell'eziologia quanto della progressione della malattia. [43].

BASI VASCOLARI DELLE DEMENZE

Anatomia e fisiologia della vascolarizzazione cerebrale

Il SNC è totalmente dipendente dal metabolismo aerobio e non dispone di valide riserve energetiche pertanto per poter funzionare bene richiede costante apporto di ossigeno e sostanze nutritive, quindi, di un'efficiente e continua irrorazione. A motivo di ciò pur rappresentando solo il 2% del peso corporeo, l'encefalo è l'organo maggiormente irrorato ricevendo circa il 15-20% della gittata cardiaca [44]. L'architettura del sistema circolatorio

cerebrale è unica e particolare [44-46] e le sue caratteristiche salienti sono di seguito riassunte:

- le grandi arterie contribuiscono alla resistenza cerebrale in maniera più importante che negli altri distretti corporei garantendo un costante flusso ematico e proteggendo il microcircolo in caso di sbalzi pressori [47]
- le cellule che costituiscono i vasi cerebrali interagiscono con una gamma diversificata di altri tipi di cellule, tra cui neuroni, astrociti, periciti e cellule gliali; si parla infatti di "unità neurovascolare" [48]
- la barriera emotoencefalica è un ottimo sistema di protezione che, grazie alla sua permeabilità estremamente selettiva, permette il passaggio delle sostanze necessarie alle funzioni metaboliche cerebrali (bisogna ricordare che i neuroni sono particolarmente selettivi per quanto riguarda i nutrienti e generalmente l'unica molecola che utilizzano per ottenere energia è il glucosio) ed evita il verificarsi di fluttuazioni delle concentrazioni di ormoni, ioni e sostanze neuroattive che si trovano in circolo.[49,50]

- l'interconnessione tra vasi sanguigni (anastomosi) garantisce continuità del flusso ematico anche quando parte di esso risulta compromesso [51]

L'encefalo riceve sangue arterioso da due circoli indipendenti, uno anteriore formato dalle arterie carotidi interne (destra e sinistra) e che apporta il 70% del sangue, ed uno posteriore che prende origine dalle arterie vertebrali (destra e sinistra) e che ne apporta il 30%. [Figura 5.]

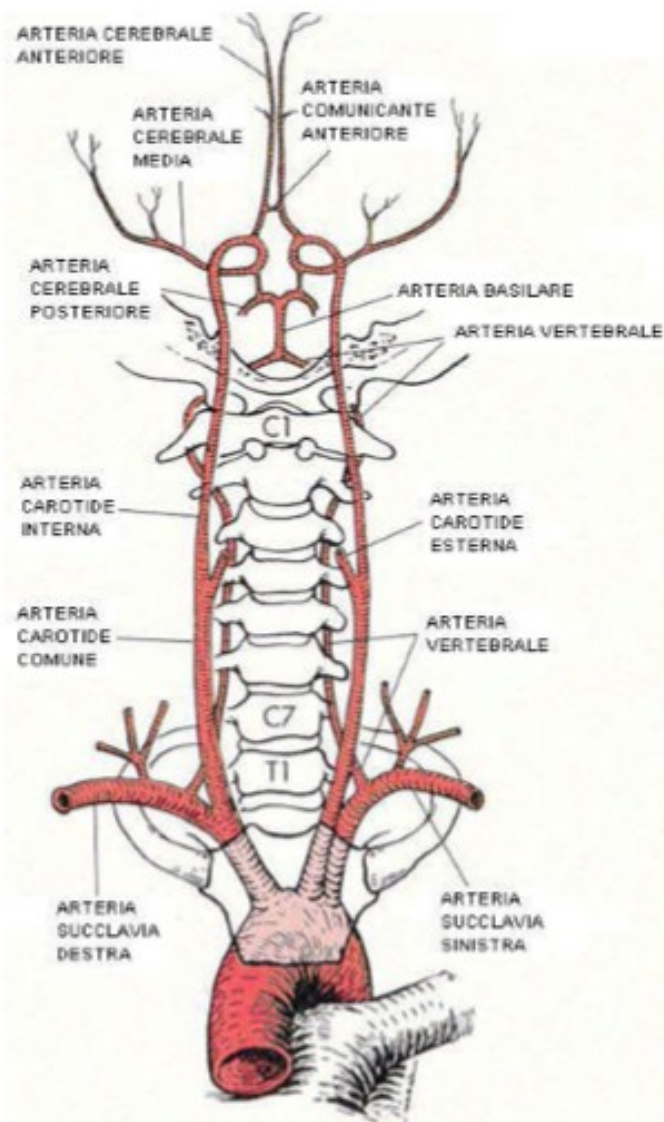


Figura 5. Arterie cerebrali

Le arterie carotidi interne prendono origine dalle arterie carotidi comuni sinistra e destra che a loro volta originano la prima direttamente dalla faccia superiore dell'arco dell'aorta insieme all'arteria anonima e la seconda da quest'ultima. Ciascuna arteria carotide interna una volta penetrata nella cavità cranica si divide nei suoi rami terminali vascolarizzanti l'encefalo: arteria cerebrale anteriore, arteria cerebrale media, arteria comunicante posteriore e coroidea anteriore. Inoltre la carotide interna fornisce anche un ramo collaterale ovvero l'arteria oftalmica. Per quanto riguarda le arterie vertebrali prendono origine dall'arteria succlavia sinistra che nasce a livello dell'arco aortico insieme alla carotide comune sinistra, come già detto, ed alla arteria anonima da cui nasce, oltre alla carotide comune destra, la succlavia destra. Una volta giunte all'interno della cavità cranica, tra bulbo e ponte, le due arterie vertebrali confluiscono nell'arteria basilare che poi dà origine alle due arterie cerebrali posteriori. La congiunzione delle arterie cerebrali anteriori e l'arteria comunicante anteriore che le unisce con le due arterie comunicanti posteriori e il tratto iniziale delle due arterie cerebrali posteriori alla base del cervello dà luogo al Poligono (o Circolo) di Willis che offre il vantaggio di una migliore distribuzione del flusso ematico e fornisce percorsi alternativi nel

caso di occlusione di un'arteria afferente al poligono stesso [52,53] [Figura 6]. E' importante sottolineare che il Circolo di Willis varia da individuo a individuo ed è spesso asimmetrico [53].

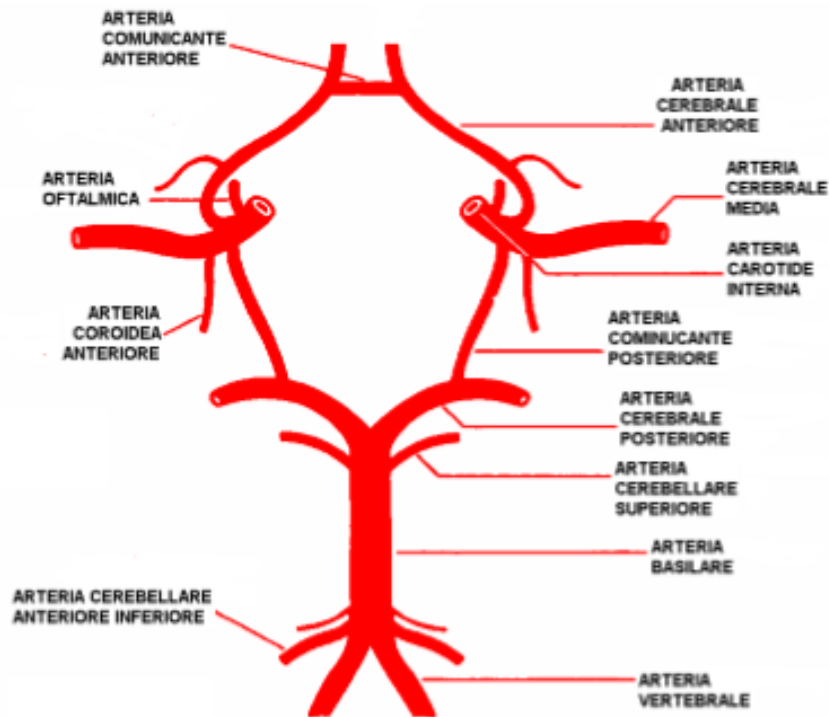


Figura 6. Circolo di Willis

I rami arteriosi secondari che penetrano nell'encefalo, sebbene presentino anastomosi, da un punto di vista funzionale si possono considerare di tipo terminale in quanto non sono in grado di sopperire alle mancanze di flusso in caso di occlusioni acute. Le varie arterie si suddividono in vasi via più piccoli andando ad irrorare le varie aree cerebrali. La delimitazione dei territori di

irrorazione delle diverse arterie ha un valore approssimativo per l'esistenza delle variazioni morfologiche della rete vasale [51,54,55].

Volendo fare un breve cenno al sistema venoso encefalico possiamo dire che inizia con i piccoli vasi che si portano negli spazi subaracnoidei e confluiscono in vene maggiori che sboccano infine nei seni della dura madre. Tutto il sangue venoso fuoriesce dal cranio tramite le due vene giugulari interne [51, 56, 57].

Territori di irrorazione dei vasi cerebrali

In linea del tutto generale è possibile dire che gli emisferi cerebrali ricevono irrorazione da entrambi i sistemi arteriosi (carotideo e vertebrale) così come anche il diencefalo; invece, tronco encefalico e cervelletto sono irrorati unicamente dalla parte vertebrale. L'irrorazione delle diverse aree cerebrali può essere illustrata come di seguito.

Arteria cerebrale anteriore: è responsabile dell'irrorazione della faccia mediale del lobo frontale e di quello del lobo parietale nonché del corpo calloso. Un danno a questa arteria potrebbe causare un deficit motorio del tipo emiparesi controlaterale all'arto

inferiore ed incontinenza. Inoltre, l'altro disturbo potrebbe interessare il comportamento con conseguenti modifiche del carattere (giudizio, critica, pensiero astratto).

Arteria cerebrale media: è la branca più grossa della carotide interna ed anche quella più frequentemente interessata da occlusione. Irrora i lobi frontali, parietali e temporali. I rami profondi vascolarizzano i gangli della base, la capsula interna ed esterna e il talamo. A seconda di quali rami subiscono il danno si può avere: afasia motoria e sensitiva, emidisattenzione spaziale controlaterale, aprassia, debolezza ed ipoestesia, emiplegia controlaterale del volto, del braccio e della gamba, talvolta con emianestesia, disturbi visivi, della sensibilità e del linguaggio.

Arteria coroidea anteriore: decorre lungo il tratto ottico, irrorando principalmente questo, l'ippocampo, la coda del caudato, l'amigdala, parte del globo pallido, la capsula interna e fornendo i rami per i plessi coroidei.

Arteria comunicante posteriore: fornisce un ramo a destra ed a sinistra del poligono del Willis e si distribuisce al chiasma ottico, all'ippocampo, al peduncolo cerebrale, alla capsula interna ed al talamo.

Arteria cerebrale posteriore: vascolarizza il lobo occipitale, il lobo temporale, il mesencefalo ed il talamo posteriore. Tra i principali sintomi da occlusione di questa arteria si annoverano diplopia, perdita del campo visivo, vertigini, atassia, paresi, parestesia, nausea, disturbi della memoria, compromissione dello stato di coscienza o coma, segni cerebellari (tremore, dismetria), - disturbi di accomodazione e convergenza, tetraplegia completa, - atassia, disfunzioni motorie e sensitive bilaterali, problemi nella denominazione di colori e oggetti.

[58,59]

Danni vascolari e declino cognitivo

Le malattie cerebrovascolari mostrano un'alta prevalenza tra la popolazione anziana e, considerando che la percentuale di individui con un'età superiore ai 65 anni è in crescente aumento nei paesi in via di sviluppo [60,61] possiamo dire che si tratta delle malattie con frequenza maggiore. Esse vanno da disturbi cognitivi lievi a medi a severi con conseguenze addirittura superiori ad altre patologie croniche [62,63].

Il potenziale impatto delle lesioni cerebrovascolari asintomatiche venne inizialmente descritto da Hachinski e dal suo

gruppo il quale identificò, tramite Tomografia Computerizzata (TC), la leucoaraiosi quale condizione associata a disordini cognitivi riscontrabili in soggetti con e senza demenza ed a potenziale rischio vascolare [64-66].

Awand descrisse invece, a seguito dell'analisi di immagini di Risonanza Magnetica (RMI), delle lesioni corticali, significativamente associate con l'età avanzata ed a malattie vascolari, che oggi definiamo come iperintensità della sostanza bianca (WMH-white matter hyperintensities) [67].

In linea del tutto generale possiamo dire che questo tipo di disturbi deriva da un processo patologico che coinvolge i vasi cerebrali con conseguenze differenti a seconda della localizzazione del vaso stesso. A seconda del tipo di danno, si può parlare di encefalopatia anossica, ictus ischemico (più frequente), ictus emorragico (in un numero minore di casi), infarto cerebrale clinicamente asintomatico, atrofia cerebrale addirittura accelerata e, talvolta, di emorragia subaracnoidea. Questi quadri clinici sono comuni tra gli individui cognitivamente normali avanti negli anni [68,69].

Inoltre, I danni cerebrali di tipo vascolare possono avere delle basi genetiche complesse interagenti con fattori ambientali [70-73].

E' importante considerare, come già accennato nei paragrafi precedenti, che le malattie età correlate interessano fondamentalmente la memoria e che nonostante la AD sia la principale causa di deterioramento cognitivo, attuali evidenze suggeriscono che il rischio di sviluppare una malattia cerebrovascolare può essere simile o addirittura superiore al rischio di sviluppare l'AD e queste due malattie comunemente coesistono [74,75].

La Demenza Vascolare (VaD)

Storia

La relazione tra deficit neurovascolari e demenza è stata messa in luce più di un secolo fa anche se il modo di essere concepita si è evoluto col passare degli anni. Nel diciannovesimo secolo le demenze su base vascolare venivano correlate ai processi arteriosclerotici e ad encefalomalacia[75,76].

Diverse forme di VaD furono descritte da Alzheimer e Binswanger.

Nel 1984 Otto Binswanger, psichiatra e neurologo svizzero, fu il primo a descriverla identificando una forma di demenza da atrofia della materia bianca di origine vascolare. Binswanger

riconobbe tre principali forme di demenza con base vascolare ovvero l'encefalite sottocorticale cronica associata ad atrofia della sostanza bianca, la degenerazione cerebrale arteriosclerotica e una forma di demenza post apoplezia caratterizzata da insorgenza acuta e deficit focali [77,78].

Alzheimer fornì poi delle descrizioni microscopiche di queste forme patologiche identificate da Biswanger mettendo in evidenza alcune delle conseguenze ad esse associate. Tra queste l'ampliamento degli spazi perivascolari, la proliferazione gliale e la presenza di cicatrici. Inoltre Alzheimer descrisse anche l'atrofia corticale senile e le sue principali caratteristiche assegnando il nome di malattia di Biswanger a questo ampio spettro anatomico patologico [78-80].

Nel 1968 Tomlinson mise in evidenza il ruolo dell'infarto cerebrovascolare e la conseguente perdita di tessuto cerebrale nell'insorgenza della demenza suggerendo una correlazione tra sintomi cognitivi e volume di materia cerebrale interessata dal danno[81,82].

Hachinski ed i suoi collaboratori, invece, evidenziarono l'importante ruolo di eventi ischemici di origine tromboembolica

assegnando al numero ed alla localizzazione di questi eventi un peso maggiore del volume di tessuto danneggiato [83].

Pertanto la definizione data alla demenza di tipo vascolare è mutata nel tempo passando da "Demenza arterosclerotica" (Binswanger, 1894) a "Psicosi arterosclerotica" (Roth, 1955), da "Demenza multi-infartuale" (Hachinski, 1974), a "Deterioramento cognitivo su base vascolare" (Hachinski VC. Neurology, 1993) per arrivare all'attuale definizione di "Demenza Vascolare", che nel DMS-V viene oggi definita come Disordine Cognitivo Maggiore.

Caratteristiche generali

La VaD è definita come una forma di decadimento cognitivo causata da alterazioni della circolazione cerebrale conseguenti a differenti eventi patologici quali ad esempio ictus, emorragia cerebrale, ipoperfusione ed aterosclerosi [43,84,85]. E' stato stimato che tra l'1% e il 4% di soggetti di età superiore o uguale ai 65 anni sono affetti da questa forma di demenza con una frequenza maggiore negli uomini rispetto alle donne e la sua prevalenza sembra raddoppiare ogni 5-10 anni dopo questa soglia di età [84, 86 87]. La VaD è una delle forme più comuni di demenza con il 20%

dei casi ed è seconda solo all'Alzheimer con il 60% dei casi [88, 89]. Diversi studi hanno messo in evidenza il fatto che la prevalenza di demenza, pur essendo elevata nei paesi sviluppati quanto in quelli in via di sviluppo, varia nelle diverse nazioni in maniera probabilmente dipendente da fattori culturali e socio economici così come anche in relazione all'aspettativa media di vita con differenze tra le due principali forme patologiche [36]. Le basi molecolari della VaD non sono state ancora ben caratterizzate tuttavia recentemente si è visto che le forme di declino cognitivo correlate a problemi di tipo vascolare sono molto spesso associate a condizioni neurodegenerative [90,91].

Dunque la patogenesi della demenza è complessa, con lesioni vascolari interagenti con processi neurodegenerativi primari e con un quadro clinico che talvolta non permette di distinguere facilmente tra le due forme di demenza più comuni (VaD an AD) [92-94].

Fenotipo clinico

A causa della molteplicità dei meccanismi patogenetici le manifestazioni cliniche della VaD sono a loro volta varie e determinate dalla dimensione, dalla localizzazione, dal tipo di

danno cerebrale e sono diverse da paziente a paziente. [86]. Inoltre, bisogna considerare il fatto che talvolta i sintomi clinici non riflettono quella che è la reale situazione istopatologica e fisiopatologica cerebrale. La patologia può procedere infatti in maniera silente per diversi anni prima che i disordini cognitivi, comportamentali e funzionali si rendano manifesti. Quanto detto è stato confermato da studi autoptici compiuti su soggetti anziani non dementi nei quali sono stati ritrovati segni di patologia cerebrovascolare e caratteristiche neuropatologiche tipiche di una complessa e silente forma di demenza mista di tipo subclinico [95,96].

Proprio per la molteplicità dei fenotipi, talvolta si preferisce usare la definizione più ampia di *Vascular Cognitive Impairment* (VCI) per riferirsi a questo gruppo di disordini cognitivi con o senza demenza aventi una presunta causa vascolare. Il termine incorpora anche deficit di tipo minore definiti come *vascular MCI* [97-99] che nel 50% dei casi progrediscono verso la demenza dopo 5 anni dall'insorgenza dei primi disturbi [100]. La manifestazione sintomatologica può essere improvvisa (come avviene dopo un ictus), oppure lenta e caratterizzata da peggioramento progressivo (come in caso di micro-ictus ripetuti o in presenza di aterosclerosi

diffusa). In riferimento a quest ultimo caso si dice che la VaD può presentare un andamento particolare definito “a gradini”. Ogni gradino rappresenta un nuovo evento ischemico o emorragico che produce bruschi cambiamenti intervallati a periodi di stabilità. La patogenesi della VaD è dunque molto complessa [101]

Potenzialmente i danni cerebrovascolari possono verificarsi in qualsiasi regione dell’encefalo e le manifestazioni cliniche sono espressione della specifica regione colpita [102]. Pertanto, volendo riassumere quanto già ampiamente detto nei precedenti paragrafi, lesioni a livello corticale possono comportare afasia, aprassia e crisi epilettiche, mentre lesioni sottocorticali, includenti anche lesioni della sostanza bianca, si associano a disfunzioni esecutive, anomalie nel movimento, incontinenza e parkinsonismo. Tra le lesioni sottocorticali quelle riguardanti i circuiti gangliari-talamici corticobasali rivestono particolare importanza, insieme alle lesioni ai lobi frontali, sulla lenta progressione della malattia. Diversi studi hanno confermato una ridotta sopravvivenza dei pazienti affetti da VaD a causa del verificarsi, negli stessi soggetti, di infarti miocardici oltre ad ictus ricorrenti come già detto [103, 104].

Al di là della grande eterogeneità tipica di questo disordine, vi è una serie di sintomi cognitivi e comportamentali comuni, che

talvolta insorgono precocemente rispetto alla sindrome dementigena conclamata ed in alcuni casi senza destare sospetto. Tra questi vi sono: depressione, sbalzi d'umore e apatia, confusione mentale, difficoltà di concentrazione, facile distraibilità, difficoltà nel prendere decisioni, nel pianificare attività mediamente complesse, problemi di memoria/apprendimento, difficoltà del linguaggio, disturbi dell'equilibrio, aumento del bisogno di urinare o problemi a controllare lo stimolo, maggior tendenza ad avere reazioni impulsive, agitazione, ansia, vagabondaggio notturno [105,106].

Diagnosi e Classificazione

I criteri diagnostici proposti per la diagnosi di VaD sono molteplici e fondamentalmente basati sulla valutazione dei sintomi clinici e sui risultati di indagini tramite *neuroimaging*. I principali sono di seguito riportati:

- *Mini Mental State Examination (MMSE)* (frequentemente utilizzato come strumento per valutare il grado di disfunzione cognitiva) [107]

-*The National Institute of Neurological Disorders and Stroke and the Association International pour la Recherche et l'Enseignement en Neurosciences (NINDS-AIREN)* [108]

-*The California Alzheimer's Disease Diagnostic and Treatment Centres (CAD-DTC)* [109]

-*The International Classification of Diseases (ICD-10)* [39]

-*The diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 5th ed (DSM-V)*, che rimpiazza il termine "Demenza" con l'espressione "Disordine Neurocognitivo Maggiore" [40]

La sensibilità e la specificità di questi criteri è diversa, anche in relazione alle finalità che si propongono: quelli del NINDS-AIREN sono stati sviluppati soprattutto a scopo di ricerca, mentre gli altri vengono comunemente usati nella pratica clinica [110]

Seguendo le indicazioni NINDS-AIRENS, per poter definire una sindrome dementigena di tipo vascolare è necessario che siano soddisfatti i seguenti criteri:

- evidenza clinica di demenza con compromissione delle attività quotidiane;
- evidenze di malattia cerebrovascolare attraverso accertamenti clinici e di *neuroimaging* (TAC, RMN);

- relazione temporale evidente o indiretta tra la demenza e la malattia cerebrovascolare (esordio, fluttuazioni, deterioramento “a scalini” dei deficit cognitivi).

Gli esami di *neuroimaging* cerebrale, come TC o RMI, almeno al momento della prima diagnosi, risultano strumenti fondamentali, al pari delle caratteristiche cliniche, per la diagnosi generale di VAD e per la differenziazione dei diversi sottotipi, infatti, rientrano nel percorso diagnostico obbligatorio [111,112]

L’alta eterogeneità clinica che caratterizza la VaD si riflette nella sua classificazione che risulta ardua e controversa. La diagnosi di VaD risulta ulteriormente complicata dal fatto che non è assolutamente semplice determinare se un evento ischemico, documentato nella storia clinica di un paziente, sia la causa della demenza o solo un fattore che ha contribuito all’aggravamento di una demenza degenerativa già in atto.

Tuttavia le diverse forme di VaD possono essere categorizzate come segue:

- **VaD da patologia dei grandi vasi**, che include *Demenza Multi-Infartuale Corticale o Sottocorticale* (caratterizzata da infarti multipli ed estesi) e la *Demenza a Singoli Infarti Strategici* (dovuta ad un singolo infarto cerebrale, spesso di

dimensione lacunare in grado di danneggiare aree critiche funzionali);

- **VaD da patologia dei piccoli vasi**, che include *Demenza Ischemica Sottocorticale* ed *altre forme di Demenza* conseguenti a specifiche arteriopatie. Rientra in questo sottotipo di VaD anche la *CADASIL (Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leucoencephalopathy)*;
- **VaD Emorragica** (dovuta ad ematoma traumatico subdurale, ematoma cerebrale e trombosi venosa);
- **VaD da Ipoperfusione** (dovuta ad infarto incompleto della sostanza bianca, encefalopatia diffusa anossico-ischemica) (Tedeschi et al., 2005) (McVeigh et al., 2006).
- **Demenza mista VaD/AD**

Fattori di rischio e prevenzione

Un fattore di rischio può essere definito come una caratteristica propria dell'individuo o eventualmente acquisita dallo stesso che si associa, in maniera statisticamente significativa, alla probabilità di sviluppare in futuro una determinata malattia;di

contro il termine fattore protettivo sta ad indicare quella caratteristica che si associa alla ridotta probabilità di sviluppare un dato disturbo [115, 116].

Negli ultimi anni numerosi studi si sono concentrati sulla relazione intercorrente tra demenza e disordini di tipo metabolico quali ad esempio diabete, obesità, ipercolesterolemia, ipertensione ed insulina resistenza [117]. Tra questi l' ipertensione è emersa come uno dei maggiori predittori di disordine cognitivo fungendo così da comune denominatore per una varietà di condizioni neurodegenerative [43, 118].

Per quanto riguarda la VaD i fattori di rischio che predispongono alla sua insorgenza possono essere essenzialmente distinti in due grandi gruppi:

- fattori *non modificabili*: tra questi i più importanti sono il sesso e l'età seguiti dalla predisposizione genetica, dall'etnia e da una precedente storia di ictus
- fattori *modificabili* (ipertensione, malattia aterosclerotica, diabete mellito, cardiopatia ischemica, malattia vascolare periferica, lesioni della sostanza bianca, fumo, e iperlipidemia)

[86].

Relativamente ai fattori genetici c'è da dire che la forma di VaD su base genetica, indicata con l'acronimo CADASIL [43], è caratterizzata da mutazioni a livello del gene Notch3[110]. e, dal punto di vista clinico, associata a demenza progressiva, disturbi dell'umore, emicrania e ricorrenti infarti cerebrali sottocorticali. Inoltre, i pazienti affetti da questa forma ereditaria di VaD mostrano anche iperintensità della sostanza bianca alla MRI [120]..

I Fattori di rischio *modificabili*, spesso associati ai fattori comportamentali, sono il focus su cui si incentrano le misure preventive e le attuali terapie.

La prevenzione può essere distinta in primaria e secondaria. La prima mira ad evitare l'insorgenza della malattia inducendo i soggetti a rischio a modificare stile di vita così da allontanare i fattori di rischio, la seconda viene messa in atto nel caso in cui degli eventi ischemici si siano già verificati per cercare di evitare che si ripetano e talvolta si ricorre alla terapia farmacologica [101, 114].

Malattia di Alzheimer

Caratteristiche Generali

Sebbene sia passato più di un secolo dalla descrizione di questa forma di neurodegenerazione la patogenesi dell'AD non è

ancora del tutto chiara. Diversi studi hanno messo in evidenza come alterazioni nel metabolismo energetico, nella trasmissione sinaptica e nell'interazione assone-mielina possono precedere la comparsa degli indicatori neuropatologici. Tuttavia la principale ipotesi circa l'insorgenza dell'AD vede come attori protagonisti le proteine *tau* e *beta-amiloide* che si depositano nel cervello causando la morte delle cellule nervose e che rappresentano, insieme alla marcata atrofia cerebrale, i segni distintivi della malattia [121].

Come tutte le malattie neurodegenerative l'AD comporta, nei soggetti affetti, graduale e diffusa perdita di neuroni e sinapsi e, allo stadio terminale, si può verificare una riduzione di ~ 40% della massa cerebrale [122]. Molti dei neuroni che vanno incontro a degenerazione usano l'acetilcolina come neurotrasmettitore, pertanto, la riduzione dell'attività del sistema colinergico è tipica della patogenesi dell'AD [124]

Come già accennato le due importanti lesioni che colpiscono il cervello dei pazienti affetti da AD sono rappresentate dalle placche amiloidi extracellulari e dai grovigli neurofibrillari intracellulari [125].

Le placche amiloidi sono il risultato dell'aggregazione delle molecole di peptide beta amiloide tra di loro. Queste ultime sono il

prodotto del clivaggio sequenziale della proteina precursore dell'amiloide (APP) ad opera della β -secretasi (BACE1) e del complesso γ -secretasi/presenilina (PS1, PS2).[126,127]. La presenza delle placche neuronali innesca un processo infiammatorio mediato da astrociti e microglia con conseguente induzione della risposta immunitaria che comporta poi la produzione di citochine, interleuchine e TNF-alfa, da parte di macrofagi e neutrofilii, danneggiando così irreversibilmente i neuroni, [128]. Anche se questa prima risposta è un tentativo di proteggere il cervello, lo stato prolungato dell' infiammazione cronica si crede sia alla base della degenerazione neuronale.

Un ruolo importante nella patogenesi dell'AD è svolto dalla formazione dei grovigli neurofibrillari, che derivano dall'aggregazione delle forme iperfosforilate della *proteina tau*, proteina che promuove l'assemblaggio e la stabilizzazione dei microtubuli. La sua fosforilazione da parte di alcune protein-chinasi, come GSK-3 β e Cdk-5, determina il distacco dai microtubuli e ulteriori eventi di fosforilazione, o la mancata defosforilazione, ne causano un cambiamento conformazionale che induce l'aggregazione e la formazione dei grovigli neurofibrillari con conseguente morte neuronale [Figura7] [129].

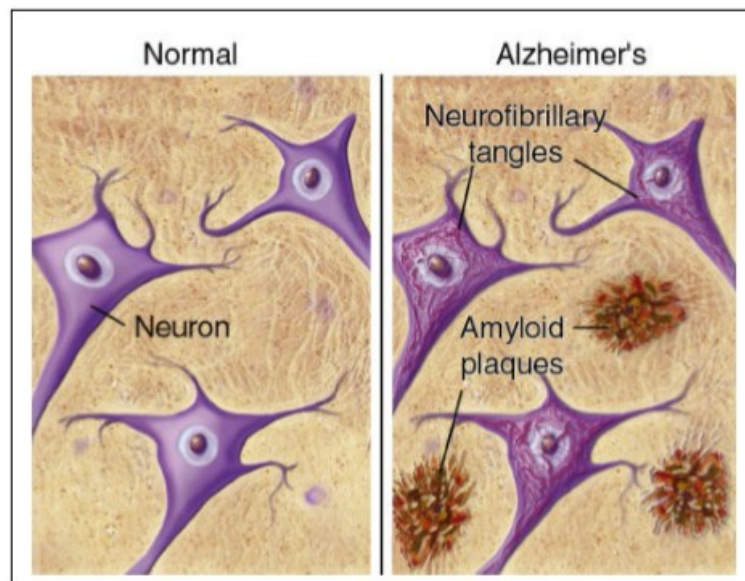


Figura 6. Placche neuritiche e Grovigli neurofibrillari in condizioni normali ed in presenza di AD

Genetica dell'AD

Circa l'1-5% dei casi di AD sono causati da mutazioni nei geni APP, PS1 e PS2. Non si conosce invece l'esatta causa delle forme di AD sporadico [125]

Tuttavia molti esperti concordano sul fatto che gli AD sporadici possano essere causati da una combinazione di fattori genetici e ambientali cui si associano stress ossidativo e processi infiammatori. Mutazioni a carico dell'allele $\epsilon 4$ della Apolipoproteina E sembrano essere il fattore di rischio più noto [130]. L'ApoE è una proteina plasmatica, coinvolta nel trasporto del colesterolo e in neurobiologia riveste ruoli importanti e specifici

per ciascuna isoforma. E' stato dimostrato, inoltre, che ApoE può contribuire alla formazione delle placche amiloidi e degli ammassi neurofibrillari [131].

Caratteristiche Cliniche e Diagnosi

Sebbene il decorso clinico dell'AD sia individuo-specifico, i sintomi sono comuni alla maggior parte dei soggetti affetti. La perdita della memoria è in assoluto il sintomo più evidente e sempre presente. Come la VaD, anche l'AD viene spesso anticipata dal MCI, cui segue un progressivo declino psicologico nel corso del quale il paziente, oltre all'amnesia, manifesta: depressione, agnosia, aprassia, anomia ed agrafia.

La diagnosi viene fondamentalemente eseguita valutando i sintomi clinici sulla base dei criteri diagnostici del NINCDS-ADRDA (*National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke – Alzheimer's Disease and Related Disorders Association*) [132], che consentono di formulare una diagnosi di "AD probabile" o "possibile". Tuttavia si parla di AD solo dopo l'accertamento della presenza delle placche amiloidi e dei grovigli neurofibrillari e delle modifiche anatomiche tipiche della patologia.

Pertanto oltre all'anamnesi e alla valutazione neuropsicologica e cognitiva devono essere effettuate tutte le indagini di neuroimaging, TAC, MRI, e la tomografia ad emissione di positroni (PET, Positron Emission Tomography). La diagnosi posta è eventualmente confermata tramite indagini postmortem.

L'AD è una patologia incurabile e non esistono ad oggi trattamenti capaci di arrestarne la progressione né tantomeno di curare la degenerazione cerebrale da essa causata. Di conseguenza ogni trattamento farmacologico risulta finalizzato a rallentarne il decorso, cercando di garantire una qualità della vita buona o quantomeno dignitosa. [133].

Demenza Vascolare e Alzheimer

La linea di confine tra VaD e AD è davvero molto sottile [134], infatti mentre agli inizi del '900 quando Alzheimer sosteneva che alterazioni del sistema circolatorio fungessero da innesco per l'instaurarsi della patologia da lui descritta la maggior parte dei patologici del tempo classificavano l'AD come una patologia puramente degenerativa ad eziologia incerta, verso la metà del XX secolo si è cominciato a metterne in discussione la dicotomia tra demenza di natura arteriosclerotica e demenza degenerativa [43].

Proprio per questo, talvolta si parla di una forma “mista” di demenza in cui le due forme di disordine hanno effetti additivi e probabilmente interagiscono [94,135]. Infatti, referti autoptici hanno messo in evidenza che nel 24-28% dei casi di AD venivano riscontrati segni di patologia vascolare [136] e, al contrario, la metà dei pazienti con malattia vascolare che avevano sviluppato demenza erano affetti da AD [137, 138].

L’eziologia mista AD e VaD è molto comune con l’aumentare dell’età in particolare in soggetti di età superiore agli 85 anni [139]. Tuttavia è difficile da determinare se la componente vascolare è la causa o l’effetto dell’AD ma non vi è dubbio circa il fatto che le disfunzioni cerebrali agiscono in sinergia con i cambiamenti neurodegenerativi in un circolo vizioso che aggrava il deficit cognitivo trovato nell’ AD. [140]. In particolare la presenza dell’allele dell’apolipoproteina E è stato correlato con un incrementato rischio di insorgenza di entrambe le patologie mettendo in luce un possibile legame tra aterosclerosi, VaD ed AD [141]. Inoltre, la deposizione di placche amiloidi nei vasi cerebrali causata dall’AD aumenta il rischio di ictus ischemico e, di conseguenza, di insorgenza di VaD [142].

Non esiste una cura a portata di mano, né per la VaD né per l'AD, e non esistono terapie risolutive in grado di bloccare o invertire il decorso di entrambe, anche perché quando manifeste ogni intervento farmacologico risulta vano. Pertanto si fa sempre più urgente il bisogno di identificare dei marcatori molecolari facilmente quantificabili, capaci di aiutare a discriminare la VaD dall'AD, fornire una solida e precoce diagnosi di neurodegenerazione e che possano fungere da indicatori prognostici.

A tal proposito c'è da dire che molti sono gli studi che, nell'ambito dell'AD, hanno indagato circa la possibilità di andare a rintracciare marcatori molecolari a livello del fluido cerebrospinale (CSF), che è una buona fonte di informazioni relative alle condizioni biochimiche e metaboliche cerebrali. Nei pazienti con AD, è stato visto che la concentrazione del peptide A β 1-42 solubile nel CSF è ridotta di circa il 40-50% rispetto ad individui controllo della stessa età [144]. Inoltre, più studi hanno recentemente sottolineato quanto sia importante andare a valutare il rapporto A β 1-42 : A β 1-40 nel CSF perché può essere considerato un buon indicatore di presenza di AD [144-146]. La proteina *tau*, invece, non può essere utilizzata per identificare correttamente l'AD tramite

dosaggio nel CSF_, poiché le sue variazioni non sono specifiche di AD ma indicative di neurodegenerazione in genere [147].

In ogni caso nessuna indagine di questo tipo è stata compiuta per la VaD. Inoltre, il prelievo del CSF è alquanto invasivo: proprio per questo motivo, molti ricercatori puntano sull'identificazione di marcatori molecolari individuabili a livello ematico. A tale scopo, sono sempre di più gli esperti che concordano sul fatto che questo ruolo di biomarcatori molecolari non invasivi potrebbe essere rivestito dai miRNA. Tuttavia anche in questo caso molto è stato fatto per l'AD, ma nulla per la VAD.

I microRNA

I miRNA, rappresentano un gruppo di piccoli RNA endogeni, non codificanti, a singolo filamento, di lunghezza compresa tra i 21 e i 25 nucleotidi, derivanti dal processamento di trascritti primari molto più lunghi (di centinaia o migliaia di nucleotidi). Il loro ruolo è quello di regolare negativamente l'espressione genica a livello post-trascrizionale, sia nelle piante che negli animali, legandosi specificamente alle sequenze 3'-UTR di mRNA, inibendone la traduzione se la complementarietà con il target è parziale, o promuovendone la degradazione se la complementarietà è totale.

E' stato di recente dimostrato il ruolo cruciale dei miRNA nella regolazione di importanti processi fisiologici, quali lo sviluppo, la proliferazione, il differenziamento, l'apoptosi e la risposta a differenti segnali extracellulari e di stress. Inoltre, è stato evidenziato un profilo di espressione anormale dei miRNA nel cancro, in malattie autoimmuni e in alcuni disordini del sistema nervoso [148].

Biogenesi

Nel genoma umano, i geni per i miRNA possono trovarsi nelle regioni intergeniche, introniche intrageniche o esoniche intrageniche, distinguendo i miRNA in:

- miRNA intergenici
- miRNA intronici in trascritti codificanti
- miRNA intronici in trascritti non codificanti
- miRNA esonici in trascritti non codificanti
- miRNA esonici in trascritti codificanti
- geni codificanti miRNA con promotori indipendenti

La maggior parte dei miRNA viene trascritta nel nucleo dalla RNA polimerasi II (*Pol II*) [149], sebbene un minor gruppo di

miRNA associati a sequenze ripetute (Alu) può essere trascritto dalla RNA polimerasi III (*Pol III*) [150] in un lungo trascritto primario chiamato pri-miRNA (*pri-miR*) [Figura 8]

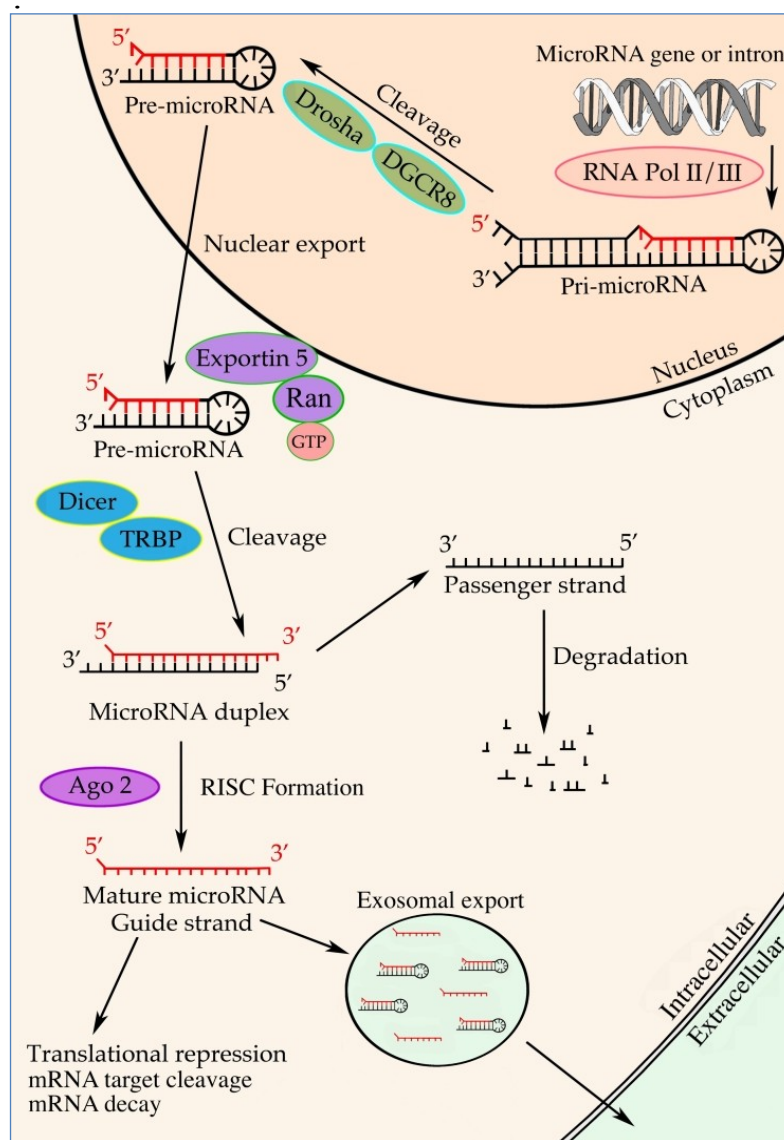


Figura8. Modello di biogenesi dei miRNA

Il pri-miRNA è caratterizzato da una complessa struttura a forcina di varia lunghezza (generalmente 1-3 kb), che può essere poliadenilato e subire un *capping* ad opera della RNA polimerasi III

[151]; questa molecola è processata nel nucleo da una ribonucleasi ad attività endonucleasica specifica per il doppio filamento di RNA, *Drosha*, che agisce in concerto con la proteina *Pasha* (*DGCR8*, *DiGeorge syndrome critical region gene 8*) appartenente alla stessa famiglia. Il complesso *Drosha-Pasha*, noto come complesso *Microprocessore*, processa il pri-miRNA in un microRNA precursore (*pre-miRNA*) della lunghezza di 70-100 nucleotidi, spesso contenente la sequenza di miRNA maturi differenti. *Pasha* contiene due domini di legame all'RNA a doppio filamento e interagisce direttamente con lo stelo e le regioni fiancheggianti a singolo filamento del pri-miRNA [152,153] il sito di taglio è precisamente ad un giro d'elica (11 paia di basi) di distanza dalle regioni fiancheggianti a singolo filamento.

Il pre-miR formatosi viene esportato dal nucleo al citoplasma ad opera dell'Esportina 5 (*Exp5*), un trasportatore nucleo/citoplasmatico GTP-dipendente [154]; qui subisce un ulteriore processo di maturazione ad opera dell'RNA pol III *Dicer*, da cui si forma un RNA a doppio filamento (*ds*, *double strand*) di 18-24 nucleotidi.

Dicer è una proteina altamente conservata di circa 200 kDa e come *Drosha* si associa a un cofattore, che lega l'RNA a doppio

filamento (nell'uomo *TRBP*, *HIV-1 TAR RNA binding protein*) [155]. Il dominio Paz di *Dicer* interagisce col 3' terminale e il sito di taglio è a circa due giri d'elica (22 paia di basi) di distanza. Alla fine, il doppio filamento interagisce con il complesso proteico RISC (*RNA induced silencing complex*), che include la proteina Argonata (*AGO1-AGO4 nell'uomo*). Per formare un complesso RISC attivo, il doppio filamento deve essere separato in *filamento guida*, complementare all'*RNA target*, e *filamento passeggero*, che viene successivamente degradato. Il clivaggio comporta la formazione di un doppio filamento imperfetto, che viene svolto. Un filamento del miRNA rimane stabilmente associato con RISC e diventa un miRNA maturo, che guida il complesso RISC principalmente alla regione 3' non tradotta (3'- *UTR*) dell'*mRNA target*. Conseguentemente, la traduzione e/o la stabilità dell'*mRNA* sono compromesse, causando una riduzione dei livelli di espressione della proteina [156]. L'altro filamento, invece, viene degradato [157]. Questa asimmetria funzionale dipende dalla stabilità termodinamica dell'appaiamento tra le basi delle due estremità del doppietto; al momento in cui il *duplex* è stato formato, in seguito all'azione di *Dicer*, i due filamenti presentano una stabilità differente da un punto di vista termodinamico a livello

dell'estremità 5'; sebbene il miRNA maturo possa essere identificato in uno o nell'altro filamento, esso si origina quasi sempre dal filamento che presenta l'estremità 5' più instabile, mentre l'altro filamento verrà degradato [158]. Tuttavia, nei rari casi in cui le due estremità 5' presentano una stabilità paragonabile, ognuno dei due filamenti può con la stessa probabilità andare a costituire il miRNA maturo, dotato di attività biologica [Figura 9]

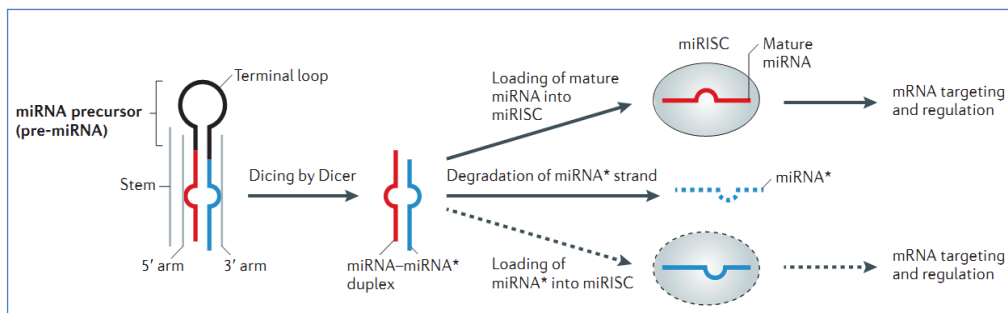


Figura9. Selezione del filamento che costituirà il miRNAmaturo (da Berezikov,2011).

Il taglio mediato dal Microprocessore non è l'unica via di produzione di pre-miRNA negli animali: infatti, un processo alternativo usa lo *splicing* del trascritto pri-miRNA per liberare introni che imitano perfettamente le caratteristiche strutturali di un pre-miRNA [159, 160]. Questi frammenti, chiamati *mirtrons*, appartengono ad una sottofamiglia di miRNA, la cui sequenza codificante è localizzata all'interno degli introni di geni di seconda classe, ed entrano nella via di processamento dei microRNA senza

l'intervento di Drosha [Figura 10]. Non sono comuni, ma sono stati trovati in tutto il regno animale.

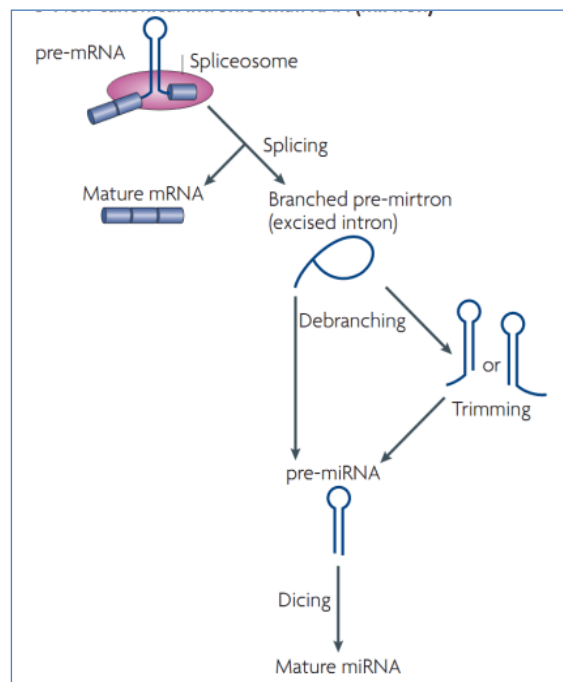


Figura 10. Biogenesi dei mirtrons. (Kim, Nat Rev Molecular cell Biology 2009).

MiRNA Circolanti

I miRNA oltre ad essere rilasciati all'interno delle cellule si trovano anche a livello dei fluidi biologici, quali siero, plasma, urine, saliva in forma libera o all'interno di vescicole; tutte queste forme di cmiRNA circolanti sono altamente stabili nel plasma e negli altri liquidi corporei [161].

Questa stabilità (che permette ai miRNA di resistere a livelli di pH e di temperatura molto alti o molto bassi e di essere conservati

senza essere danneggiati per molti anni) probabilmente è data dal fatto che sono inglobati all'interno di strutture, complessi di lipoproteine, microvescicole o esosomi [162], della dimensione di 30-100 nm, contenenti miRNA, mRNA e proteine, che li proteggono dalla degradazione ad opera delle RNAsi.

Studi effettuati sui cmiRNA hanno dimostrato che possono essere complessati non solo all'interno di esosomi o intrappolati all'interno di corpi apoptotici, ma anche complessati con le proteine Argonata 2 (*AGO2*) o in associazione a lipoproteine ad alta densità (*HDL*) [Figura 11]; tuttavia, se i complessi HDL-miRNA costituiscono solo una minima parte del totale dei miRNA circolanti, al contrario i miRNA associati alla proteina *AGO2* rappresentano la maggiore parte dei miRNA extracellulari. A tal proposito è stato ipotizzato che i complessi *AGO2*-ribonucleoproteici vengono rilasciati passivamente da tutte le cellule dopo il verificarsi di necrosi o apoptosi e rimangono inalterati nell'ambiente extracellulare grazie all'elevata stabilità delle proteine *AGO2* [163]. Sebbene sia stato ipotizzato che i miRNA inglobati all'interno degli esosomi siano coinvolti nella comunicazione intercellulare, molti miRNA extracellulari potrebbero essere, in realtà, sottoprodotti di cellule morte, che

rimangono nello spazio extracellulare grazie all'alta stabilità delle proteina Ago2 e al complesso Ago2-miRNA.

In generale, qualunque sia il meccanismo con il quale siano secreti, risulta comunque evidente che i cmiRNA nei fluidi corporei e nei compartimenti fluidi extracellulari abbiano un effetto simile a quello degli ormoni, agendo a distanza dalle cellule che li hanno prodotti [164].

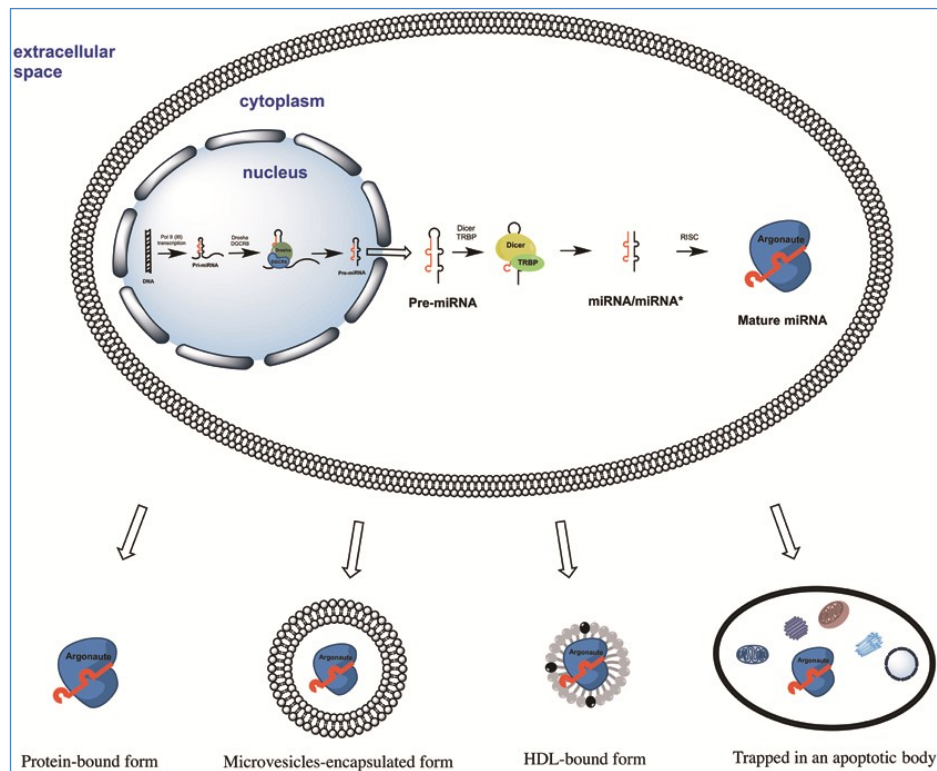


Figura 11. miRNA extracellulari: possono essere associati unicamente alla proteina AGO oppure incapsulati in microvescicole, in particelle HDL o intrappolati in corpi apoptotici. Tratta da: (Turchinovich A. et al 2013)

miRNA e Demenze

Negli ultimi anni sono stati effettuati numerosi studi sulle alterazioni dell'espressione dei miRNA in molte malattie. Molteplici sono infatti i lavori compiuti sul ruolo dei miRNA nello sviluppo del cervello, nei processi di normale invecchiamento cerebrale, e soprattutto sui vari disturbi neurologici [165]. Evidenze recenti suggeriscono un potenziale coinvolgimento dei miRNA nella neurodegenerazione, confermando la loro importanza nelle funzioni e nelle patologie del SNC . [166, 167].

Gli studi condotti da Sheinerman et al (2013) avvalorano l'ipotesi che la degenerazione dei neuroni e delle sinapsi, che è alla base dei processi patologici delle malattie neurodegenerative e prima ancora del MCI, possono essere identificate *in vitro* attraverso l'analisi quantitativa di cmiRNA.

Come detto in precedenza, l'AD rappresenta la forma più comune di demenza e per tale ragione negli ultimi anni i gruppi di ricerca che si sono focalizzati sull'indagare circa un possibile coinvolgimento dei miRNA nell'AD sono stati numerosi. I miRNA giocherebbero un ruolo chiave nei quattro processi fondamentali

nell'insorgenza dell'AD: accumulo di amiloide- β , tossicità tau-dipendente, infiammazione, morte neuronale [168].

Diversi sono i miRNA la cui espressione risulta essere alterata nei soggetti affetti da Alzheimer. Tra questi, vi è il gruppo di miR-15/107 che, tra le varie funzioni, ha quella di regolare i geni APP, responsabili della produzione della proteina precursore amiloide (*APP*), e BACE1, che codifica un enzima coinvolto nella trasformazione della proteina APP nel prodotto finale β -amiloide, alcuni membri della famiglia Let-7 (let-7f, let-7b e let-7i), miR-9, miR-181 e miR-29 [169], che sembrano coinvolti nell'infiammazione e nella risposta immunologica, processi che precedono l'insorgenza dell'AD [123]. Il miR107 e altri membri di questo gruppo, inoltre, regolano fortemente l'espressione del gene della progranulina, le cui mutazioni sono causa di demenza frontotemporale (FTLD) [170].

La deregolazione dei miRNA nel SNC può influire su una vasta gamma di funzioni cellulari, che non si limitano esclusivamente alla eziopatogenesi dell' AD. L'identificazione di miRNA omologhi nelle diverse condizioni neurologiche può indicare percorsi comuni di disfunzione neuronale e degenerazione. Ad esempio, la sovraespressione di miR-181b nella schizofrenia, o

let-7 e miR-125b nella Sindrome di Down, è stata osservata anche in sporadici pazienti AD: ciò può indicare meccanismi comuni di malattia [148]. Queste osservazioni indicano che i processi neurodegenerativi potrebbero essere il risultato dell'alterazione di diverse *pathways* cellulari, nelle quali i miRNA possono giocare un ruolo significativo come elemento unificante fenotipi molto eterogenei.

Ulteriori prove riguardanti la regolazione dei microRNA nei processi di neurodegenerazione è data dal lavoro di Delay et al del 2011, grazie al quale risulta evidente come una mutazione a carico del sito di legame del miRNA può bloccare il legame con il suo bersaglio, o crearne illegittimi, contribuendo così in modo significativo al rischio per le malattie neurodegenerative.

Attualmente in letteratura è possibile reperire numerosi studi che hanno focalizzato la loro attenzione sulla possibilità di utilizzare i miRNA sierici come marcatori di neurodegenerazione, ed in particolare di AD, considerandone l'alterata espressione.[123,125,171]. Tuttavia, ad oggi questo approccio non è stato applicato alla VAD. Nel presente studio si è cercato di tracciare il profilo di espressione dei miRNA plasmatici di pazienti

VaD rispetto ad NCs ed i risultati sono stati confrontati con quelli ottenuti da una coorte di pazienti con AD.

Materiali e metodi

Selezione Dei Pazienti

I pazienti oggetto dello studio ed i rispettivi individui controllo sono stati selezionati tra quelli afferenti all'istituto "Oasi Maria SS." di Troina. In totale sono stati sottoposti ad indagine 118 individui così ripartiti tra le tre categorie: 38 VaD, 40 AD e 40 CN ed accoppiati tra loro per sesso e per età. [Tabella 1]

Campioni e Controlli	Sesso		Età		MMSE	
	uomo	donna	media	deviazione standard	media	deviazione standard
VAD	18	20	82.24	6.58	14.14	5.75
CN	19	21	81.9	6.18	28.5	1.95
AD	17	23	81.375	4.68	19	4.93

Tabella 1: Informazioni generali sui campioni VaD, AD e NCs.

I pazienti appartenenti al primo gruppo sono stati identificati applicando il criterio NINDS-AIREN (Tabella 2) [108] [Tabella 2], quelli appartenenti al secondo utilizzando il criterio NINCDS-ARDA [132].

Tipo di VAD	Numero di pazienti affetti	MMSE	
		media	deviazione standard
Multi-Infartuale Corticale	16	15	6.03
Infarto strategico	3	18	0
Subcorticale	19	12.86	5.54

Tabella 2: Fenotipi clinici dei pazienti affetti da VaD

Gli individui controllo, oltre a non presentare né VAD né AD, non erano affetti né da altre malattie neurodegenerative né tanto meno da malattie cardiovascolari o neoplastiche; inoltre, sesso ed età sono stati gli altri due parametri tenuti in considerazione, in modo tale che i CNs fossero paragonabili ai pazienti affetti da VAD e AD. Previa consenso informato, e approvazione del comitato etico, i soggetti appartenenti alle tre categorie sono stati sottoposti a prelievo venoso tramite l'uso di *vacutainer tubes* con ed il campione ematico è stato centrifugato a 4000 rpm per 15 minuti. Il plasma così isolato è stato suddiviso in aliquote e conservato a -80°C fino al momento dell'analisi.

Estrazione dei miRNA da Plasma

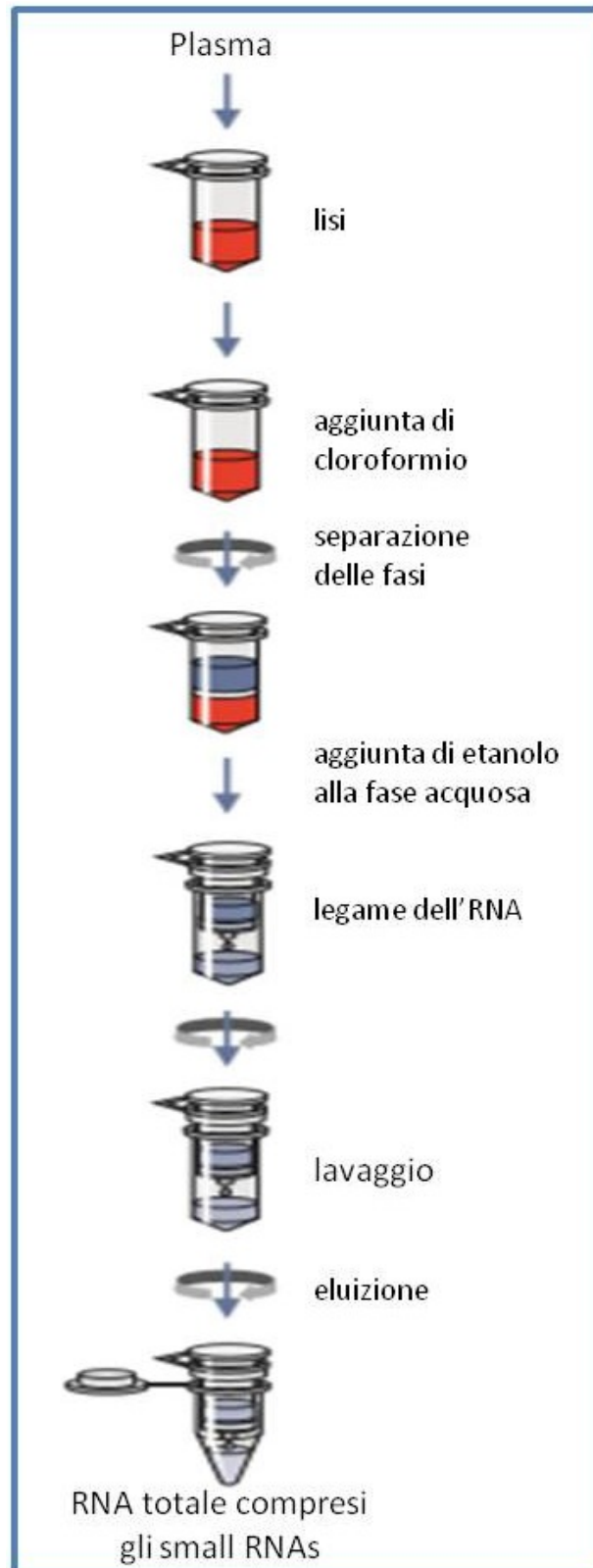


Figura 12 Schema estrazione RNA totali

I campioni di plasma selezionati sono stati sottoposti al processo di estrazione dell'RNA tramite l'impiego del Qiagen miRNeasy Mini Kit (Qiagen, GmbH, Hilden, Germany), secondo il Qiagen Supplementary Protocol che consente la purificazione di piccoli RNA (miRNAs compresi) a partire da siero o da plasma. Data la bassa concentrazione dei miRNA a livello plasmatico si è deciso di utilizzare 400 µl di plasma di partenza a cui sono stati aggiunti 2000 µl di QIAzol Lysis Reagent ovvero una soluzione monofasica di fenolo e guanidina tiocianato che permette di lisare le cellule, inibire l'Rnase, e rimuovere dunque il DNA cellulare e le proteine dal lisato tramite estrazione organica. Dopo essere stati vortexati i campioni così trattati sono stati incubati a temperatura ambiente per 30' così da promuovere la dissociazione dei complessi nucleoproteici. La successiva aggiunta di cloroformio, 15' di incubazione e la centrifugazione a 10000 rpm per 20' a 4°C ha permesso di ottenere tre fasi: una fase acquosa superiore contenete RNA, un'interfase bianca in cui si raccoglie il DNA, ed in parte le proteine, ed una fase organica inferiore di color rosa in cui si raccolgono la maggior parte delle proteine. La fase acquosa è stata separata dalle sottostanti fasi ed addizionata di 1800 µl di etanolo così da fornire alle molecole di RNA da 18 nucleotidi in su

opportune condizioni di legame. Il campione è stato caricato poco per volta (volume Massimo 700 µl) nelle colonnine fornite dal kit dotate di una membrana in silica che lega gli RNA lasciando passare tutti i contaminanti. La membrana viene lavata tramite l'impiego di due diversi buffer: l'RWT prima e l'RPE dopo, quindi l'RNA è stato eluito con 30 µl di H₂O RNase-free [172]. L'RNA estratto è stato quantificato tramite lettura spettrofotometrica [Figura 12].

Retrotrascrizione, preamplificazione, profiling dei miRNA

Per valutare il profilo di espressione dei miRNA dei pazienti con VAD rispetto ai CN sono stati selezionati 4 VAD e 4 CN accoppiati tra loro per sesso ed età, con un rapporto maschio/femmina di 2/2, età media di 86.25 anni per i VAD e di 87.5 per i CN, MMSE medio pari a 19 per la prima categoria ed a 25 per la seconda.

L'uso delle Taq Man Low Density Array è stato preceduto da retrotrascrizione di 3µl di RNA plasmatico per campione mediante TaqManMicroRNA Reverse Transcription Kit ed i primer per l'RT Megaplex™ RT Primers, Human Pool A e Pool B Applied Biosystems (il kit consente di retrotrascrivere 384 miRNA in un

unico esperimento). Data l'importanza della sensibilità dell'analisi e le ridotte concentrazioni di RNA disponibili, è stata eseguita una reazione di pre-amplificazione dei prodotti di retrotrascrizione utilizzando PreAmp Master Mix, e Megaplex PreAmp Primers. Per allestire la reazione, abbiamo utilizzato 3.5 μ l di prodotto di RT. A questo punto si è passati all'analisi del trascrittoma di 754 miRNA con le TaqMan Low Density Arrays (TLDA), TaqMan Human MicroRNA Array v3.0 A and B (Applied Biosystems| Life Technologies™ Monza, Italy) (Figura 13), utilizzando 18 μ l di prodotto di preamplificazione. La reazione di Real-Time PCR è stata eseguita tramite l'impiego della macchina 7900HT Fast Real Time PCR System (Applied Biosystem | Life Technologies™ Monza, Italy).

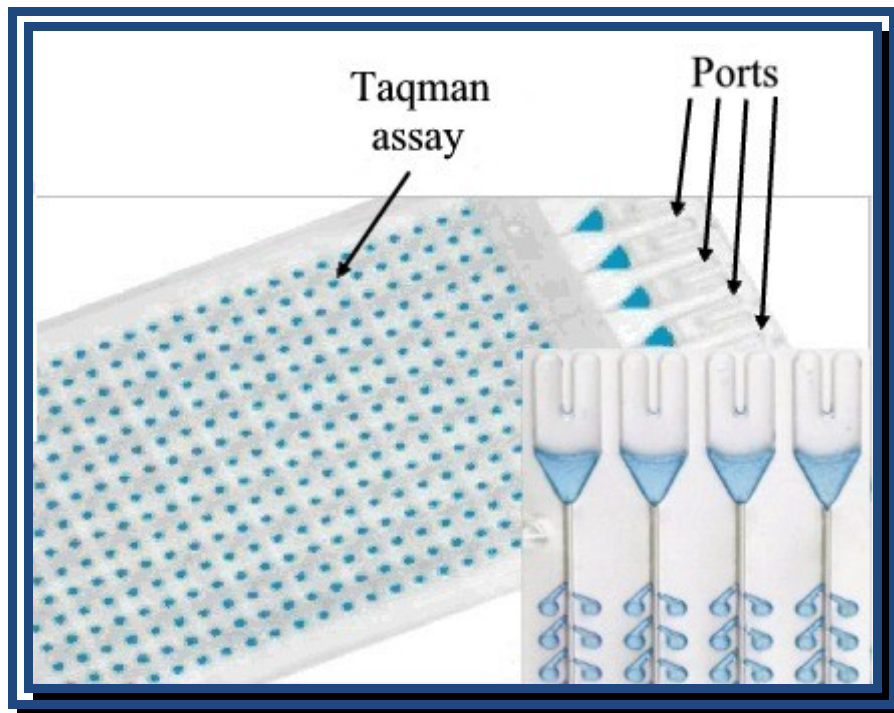


Figura 13: *TaqMan Low Density Arrays (TLDAs)*,

Analisi dei dati delle TLDA

I valori di Ct ottenuti per ciascun campione sono stati normalizzati utilizzando media e mediana dei Ct dell'array [173]. È stato poi applicato il test statistico SAM (Significance Analysis of Microarray), che fa parte del software di analisi statistica Mev (Multi experiment viewer v4.8.1) [174], avvalendosi di due classi di test: paired e unpaired; quindi, i ΔCt delle due categorie in analisi sono stati presi in considerazione sia in maniera accoppiata che disaccoppiata. È stato scelto come filtro una False Discovery Rate < 0.15 . I valori di Relative Quantity (RQ) sono stati calcolati applicando il metodo del $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Inoltre, calcolando il

coefficiente di correlazione di Pearson tra i Ct mediani e medi dell'array ed i Ct di ciascun miRNA è stato identificato un miRNA con un profilo di espressione vicino al valore di Ct medio e mediano delle TLDA, usato come normalizzatore nelle indagini successive, ovvero il miR-191-5p

Saggi singoli TaqMan

Per la validazione dei dati ottenuti dal profilo, sono stati eseguiti saggi singoli per gli specifici miRNA identificati dalla precedente analisi come differenzialmente espressi (DE) tra VAD, AD e CN mediante retrotrascrizione (Reverse Trascrizione Kit, Applied Biosystem) e amplificazione tramite Real Time PCR con sonde TaqMan.

Il miR-191-5p è stato utilizzato per la normalizzazione dei dati, applicando il metodo del $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Per validare statisticamente i miRNAs è stato applicato il T-Test (paired e unpaired).

Target Prediction

I targets validati dei miRNAs DE sono stati estrapolati da miRTarbase, versione 4.5 [175], mentre i targets predetti sono stati ottenuti dall'intersezione delle predizioni di Starbase v 2.0 [176] e

DIANA-microT CDS v5.0 [177]; tra i targets predetti da entrambi i tools sono stati selezionati quelli con un miRSVR score ≤ -0.1 .

Identificazione delle Pathways

L'analisi delle pathways, nelle quali i geni target dei miRNA selezionati sono coinvolti, è stata eseguita utilizzando due tools differenti: Gene Trail [178] e DIANA mirPath v2.0 [179]. Relativamente alle categorie biologiche identificate con Gene Trail, sono state ritenute significative soltanto quelle con un valore di p-value < 0.05 . Il tool DIANA mirPath v2.0 può utilizzare sia i targets predetti tramite DIANA-microT-CDS [177] che quelli sperimentalmente validati tramite DIANA-TarBase v7.0; [180]; tuttavia, si è scelto di prendere in considerazione soltanto le pathways dei targets predetti, perché con questo tool non sono stati trovati targets validati per il miR-10b*. I criteri adottati per la selezione delle pathways sono stati un microT threshold di 0.8 ed un p-value < 0.05 (Benjamini & Hochberg correction).

Costruzione e analisi della Network

I targets selezionati sono stati utilizzati per la costruzione della network tramite il software Cytoscape v2.8.3 [181] ed il MiMi Plugin 3.1 [182]. L'analisi di centralità è stata messa a punto con

CentiScaPe Plugin v.1.21 [183] selezionando Betweenness, Closeness, Degree e Stress come parametri per l'identificazione dei nodi centrali. Inoltre, per identificare le funzioni biologiche dei nodi è stato utilizzato Cytoscape plug-in ClueGO v2.1.5, che esegue un arricchimento funzionale dell'analisi in termini di Gene Ontology and KEGG pathways [184].

Quantificazione degli mRNAs target nel plasma

L'mRNA è stato estratto dal plasma tramite il protocollo di estrazione con Triazol che nelle fasi iniziali si sovrappone alla procedura precedentemente descritta per l'estrazione degli RNA totali. Alla fase acquosa recuperata dopo centrifugazione sono stati aggiunti 5 µl di glicogeno, per favorire la precipitazione dell'RNA, 1 ml di isopropanolo al 100% per poi essere centrifugata per 20' a 4°C e 10000 rpm. Il pellet una volta recuperato è stato lavato con 2ml di etanolo al 75% (che poi è stato eliminato per centrifugazione) ed alla fine risospeso in 10 µl di acqua a 50 °C.

Gli mRNAs codificanti per CCT5, GSK3 (targets del miR-10b*), BACE1, LPL, NAV3 (targets del miR-29a), EDN1, ITPR1, ZEB-1 (targets del miR-130b) tramite Power Sybr Green One Step Real

Time PCR (Life Technologies), following the manufacturer's protocol. GPDH è stato utilizzato come gene housekeeping. Le sequenza dei Primers sono riportate nella [Tabella 3].

Target	Forward	Reverse	amp. length
BACE1	GATCATTGTGCGGGTGGAGA	CTTTCTTGGGCAAACGAAGGT	116
CCT5	TCAGACAGCAAAAACCACGC	TCAACGTCTCTCCGCTCCAT	117
EDN1	TCAGCAGTTAGTGAGAGGAAGA	TTGCCTTTCAGCTTGGGATCAT	123
GSK3B	CGAGAGCTCCAGATCATGAGAA	CGGAACATAGTCCAGCACCA	123
ITPR1	CGGAGCAGGGTATTGGAACA	CTGAGGGCTGAAACTCCAGG	116
LPL	TTGGAGAAGCTATCCGCGTG	CGTGGGAGCACTTCACTAGC	72
NAV3	TACCAGACACAGCAACTTCCC	CCACTGCTCACTGAACTGCT	100

Tabella 3: Sequenze Primers

Risultati

Nella prima fase del lavoro è stato eseguito un *profiling* di miRNA, mediante l'utilizzo della tecnologia *TaqMan Low Density Array* e tra i 754 miRNA testati sul plasma di 4 pazienti con VaD accoppiati a 4 NCs ne sono stati identificati 13 differenzialmente espressi in modo significativo.

All'interno di questo gruppo, per la validazione con saggi singoli, però, sono stati scelti solo quei miRNA con curve di amplificazione qualitativamente buone.

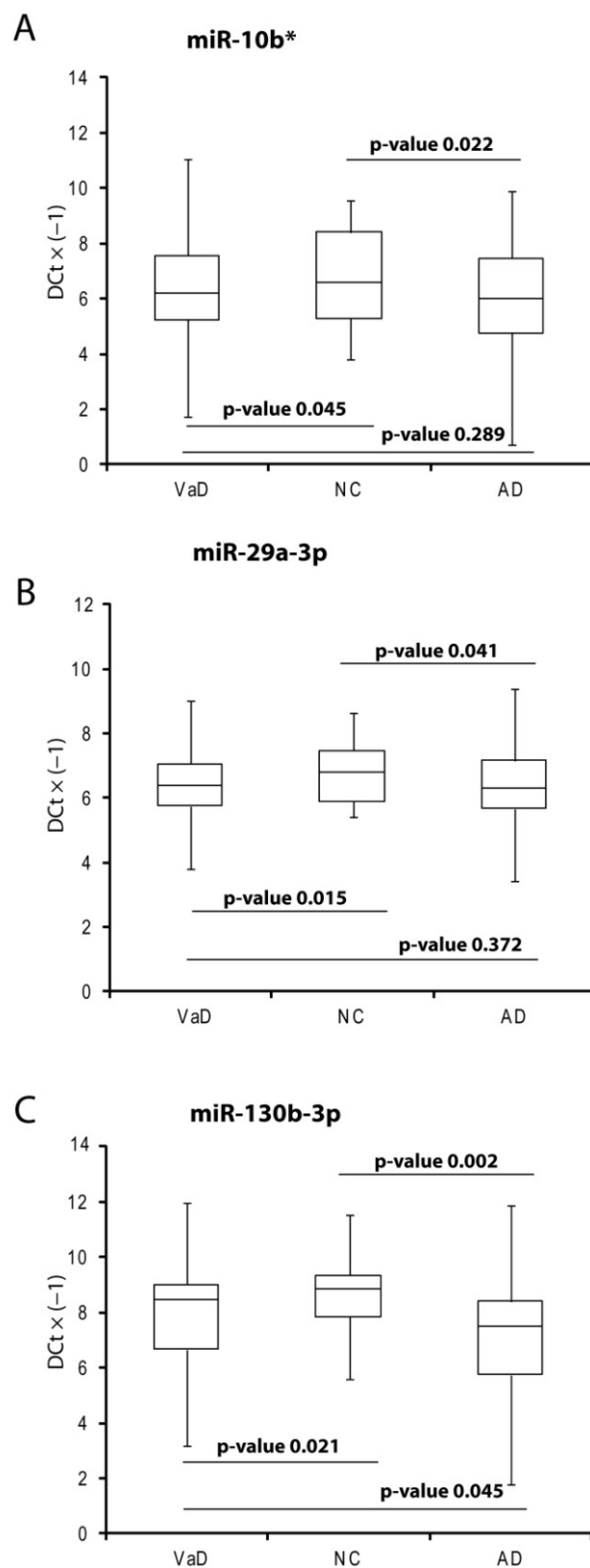
In particolare, il miR-886-3p e il miR-886-5p hanno mostrato una significativa sovraespressione nei VaD rispetto ai corrispettivi CNs, mentre il miR-10b*, il miR-29a-3p ed il miR-130b-3p hanno mostrato una significativa sottoespressione nei primi rispetto ai secondi. [Tabella 4].

miRNAs	RQ
hsa-miR-103	0.18
hsa-miR-10b*	0.35
hsa-miR-130b	0.27
hsa-miR-142-5p	0.57
hsa-miR-143	0.29
hsa-miR-145	0.77
hsa-miR-181c	0.45
hsa-miR-185	2.61
hsa-miR-223	0.48
hsa-miR-26b	0.37
hsa-miR-29a	0.22
hsa-miR-886-3p	3.47
hsa-miR-886-5p	3.04

Tabella 4: Lista dei miRNA differenzialmente espressi nei pazienti con VaD vs NCs identificati tramite **TaqMan Low Density Arrays**. **In grassetto sono evidenziati i miRNA selezionati per i saggi singoli TaqMan**. RQ= Relative Quantity. False discovery rate < 0.15

Nella seconda fase del lavoro l'analisi è stata estesa all'intera coorte di 38 pazienti VaD e 38 CNs. I saggi singoli per ogni miRNA hanno dimostrato che la sovraespressione osservata per il miRNA-886-3p e per il miRNA-886-5p non sembra essere statisticamente significativa. Tuttavia, gli altri tre miRNA continuano a mostrare una significativa sottoespressione nei VAD rispetto ai CN.

Per raggiungere lo scopo del lavoro è stata analizzata l'espressione dei miRNA -10b*, 29a-3p, 130b-3p nel plasma di 40 pazienti con AD, appaiati per sesso e per età con i 38 VAD e con i 40 CN già analizzati. È stato visto che questi tre miRNA sono DE tra le diverse categorie in maniera statisticamente significativa [Figura 14]. Il miR-10b* è sottoespresso nei pazienti con VAD e con AD rispetto ai CN, mentre non vi è alcuna differenza significativa nel confronto tra VAD e AD [Figura 14A]. Lo stesso andamento del miR-10b* è stato osservato nell'analisi del miR-29a-3p in tutti i tipi di confronto [Figura 14B]. Il miR-130b-3p, invece, è significativamente sottoespresso nei VAD rispetto ai CN ed anche negli AD rispetto ai CN, ma nei pazienti AD i livelli di espressione erano più bassi rispetto a quelli mostrati nei VAD [Figura 14C].

**Figura 14**

Box plot dell'espressione dei miR -10b* (A), miR -29a-3p (B), miR-130b-3p (C) validati mediante saggio singolo TaqMan in pazienti VAD comparati a CN e AD e in AD comparati a CN.

Valori nell'asse y sono riportati come $\Delta Ct \times (-1)$.

Campioni analizzati:

38VAD, 40 VAD and 40 CN.

La significatività statistica è stata valutata mediante T-Test e ($p < 0.05$). In figura è riportato il p-value del T-Test paired)

Per individuare le funzioni molecolari di questi tre miRNA DE si è proceduto con l'analisi dei *targets*. Dalla *target prediction* sono stati identificati : (A) 55 *targets* predetti per il miR-10b*; (B) 43 *targets* validati e 9 predetti per il miR-29a-3p; 7 *targets* validati e 14 *targets* predetti per il miR-130b [Tabella 5]

miR-10b-3p	Target Type	miR-29a-3p	Target Type	miR-130b-3p	Target Type
MARCH5	P	ABL1	V	CSF1	V
ATP11B	P	ADAMTS9	V	DICER1	V
AZI2	P	BACE1	V	PPARG	V
BACH1	P	BCL2	V	RUNX3	V
C14orf101	P	BCL7A	V	TP53INP1	V
CCDC68	P	CD276	V	UVRAG	V
CCT5	P	CDC42	V	ZEB1	V
CNTLN	P	CDK6	V	ACSL4	P
DBF4	P	COL4A1	V	BLCAP	P
DOPEY2	P	COL4A2	V	BTG1	P
EDARADD	P	CPEB3	V	EDN1	P
FGF13	P	CPEB4	V	ENPP5	P
FMR1	P	DICER1	V	HBP1	P
GLS	P	DKK1	V	ITPR1	P
GSK3B	P	DNMT3A	V	MAP7	P
HLA-B	P	DNMT3B	V	MBNL1	P
HOXD1	P	FGA	V	MLL3	P
KCNJ3	P	FGB	V	SLC44A1	P
KPNA3	P	FGG	V	TSC22D1	P
LMO3	P	GLUL	V	ZFYVE26	P
MAX	P	HBP1	V	ZNF800	P
MBNL2	P	IMPDH1	V		
MCTP1	P	ITGA11	V		
MEF2C	P	ITIH5	V		
MLLT10	P	KREMEN2	V		
MSI2	P	LPL	V		
NEK9	P	MCL1	V		
NEUROD1	P	MYCN	V		
PHKB	P	NASP	V		
PNN	P	NAV3	V		
PPP1CC	P	PIK3R1	V		
PPP3CC	P	PPM1D	V		
RAP1A	P	PPP1R13B	V		
ROCK2	P	PTEN	V		

RSBN1	P	PXDN	V
RSPO2	P	RAN	V
SLC48A1	P	S100B	V
TBC1D9	P	SAPCD2	V
TFAP2C	P	SERPINB9	V
TOR1AIP1	P	SFRP2	V
TSGA10	P	SPARC	V
TTC33	P	TET1	V
UBR3	P	TNFAIP3	V
XIRP2	P	AMMECR1L	P
ZNF148	P	E2F7	P
ZNF474	P	ELF2	P
PAX6	P	FSTL1	P
GOLGB1	P	IREB2	P
HHIP	P	KDM5B	P
NAV1	P	PDHX	P
NCOA1	P	SIKE1	P
PCGF5	P	TMTC3	P
SPA17	P		
SPATA5	P		
WASL	P		

Tabella 5: Lista dei target dei miRNA differenzialmente espressi in VaD e AD. Identificati tramite Starbase v2.0 e DIANA-microT CDS v5.0. Tipologia di target P=Predetto, V=Validato.

L'analisi di arricchimento delle *pathways* mediante *GeneTrail* ha permesso di identificare 8 KEGG *pathways* non neoplastiche [Figura 15] di cui quattro sono risultate essere sovrarappresentate anche dall'analisi con DIANA mirPath ovvero: *Axon guidance*, *Focal adhesion*, *Neurotrophin signaling pathway* e *Wnt signaling pathway*.

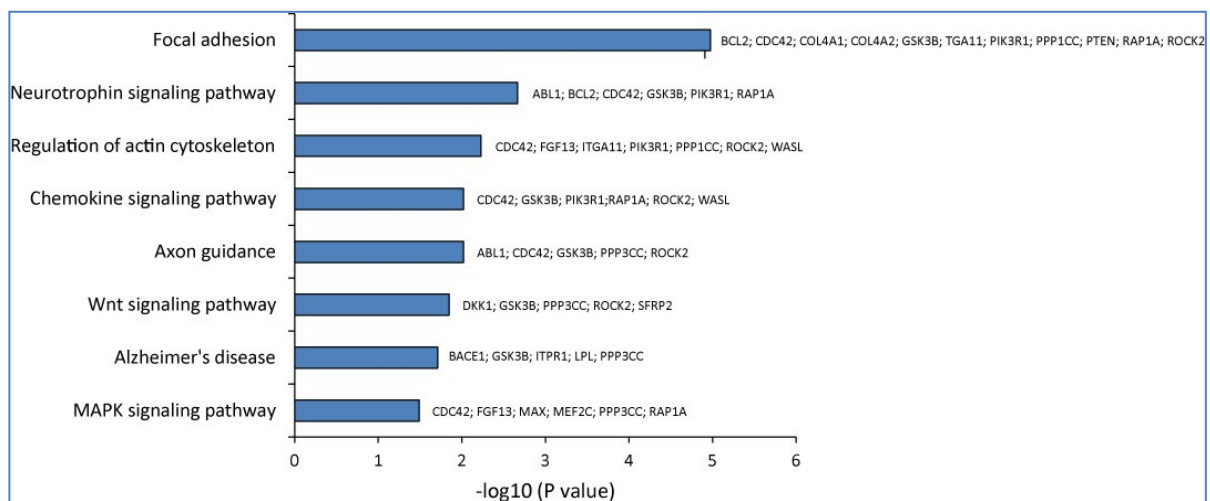


Figura 15 KEGG Pathways statisticamente overappresentate, identificate tramite Gene Trail, e geni target inclusi in ciascuna KEGG categoria.

La *network* comprende un totale di 2149 nodi e 23704 interazioni, per un totale di 225 nodi centrali per tutti i parametri selezionati in CentiScaPe Plugin; di questi ultimi, 14 nodi sono bersagli putativi o convalidati dei microRNA DE [Tabella 6].

Gene name	Betweenness	Closeness	Node degree	Stress	microRNA
ABL1	53128.18407	0.000194024	114	1042402	miR-29a-3p
BCL2	43725.92144	0.00019685	87	618550	miR-29a-3p
CDC42	57209.37086	0.000184706	196	1484632	miR-29a-3p
CDK6	3925.902513	0.000190223	29	77466	miR-29a-3p
DBF4	6859.612505	0.000187723	50	122608	miR-10b-3p
GSK3B	65904.27245	0.000202881	92	905754	miR-10b-3p
HLA-B	21479.08582	0.000173943	33	223294	miR-10b-3p
MAX	667705.2549	0.000261028	825	11331412	miR-10b-3p
MCL1	10741.79516	0.000188573	27	112630	miR-29a-3p
NCOA1	12103.90375	0.000183857	71	209502	miR-10b-3p
PIK3R1	61403.80834	0.000189934	140	1242124	miR-29a-3p
RAN	37519.18522	0.000175716	81	781382	miR-29a-3p
TSC22D1	15665.48624	0.000181984	28	143384	miR-130b-3p
WASL	22223.47917	0.000202963	34	273272	miR-10b-3p

Tabella 6: Nodi centrali della network identificati tramite CentiScaPe Plugin

L'analisi mediante ClueGo ha permesso di identificare, le seguenti pathways KEGG maggiormente coinvolte: Cell cycle, Focal adhesion, FoxO signaling, Hepatitis B, Insulin signaling, MAPK signaling, Neurotrophin signaling, Rap1 signaling, T cell receptor signaling; tre delle quali (Focal adhesion, MAPK signaling, Neurotrophin signaling) coincidono con le *pathways* individuate con GeneTrail.

Tra gli mRNA target dei miR-10b*, 29a-3p, 130b-3p analizzati nel plasma dei pazienti con VaD e AD e dei NCs (BACE1, CCT5, EDN1, GSK3B, ITPR1, LPL, NAV3, ZEB1), soltanto ZEB1 (target del miR-130b-3p) è stato individuato: tuttavia la sua concentrazione plasmatica non mostrava alcuna differenza tra le tre coorti analizzate.

Discussione

La demenza vascolare può insorgere in seguito a diversi eventi patologici che colpiscono la circolazione cerebrale quali ictus, emorragia, trauma e malattie croniche come l'aterosclerosi. La DV Presenta delle caratteristiche clinico-patologiche piuttosto eterogenee e, a differenza dell'AD le sue basi genetiche non sono state ancora ben definite [185]. In questo studio, nel valutare la possibilità di utilizzare i cmiRNA per ampliare le conoscenze in questo settore e sfruttarli come marcatori diagnostici, si è proceduto tenendo conto del fatto che

- la concentrazione dei miRNA nel plasma è bassa;
- non è facile determinare l'origine tissutale dei miRNA circolanti;
- non ci sono dati in letteratura che riguardano la VaD con cui confrontare le nostre ipotesi;
- data la complessità della VaD il suo studio risulta piuttosto arduo.

Profiling dei cmiRNA in pazienti con VaD, loro mRNA target e corrispondenti network geniche

Si è cercato di individuare un set di cmiRNA per poter rintracciare geni coinvolti nella VaD. Il miR-10b*, il miR-29a-3p il miR-130b-3p si

sono rivelati differenzialmente espressi nel plasma di pazienti VaD rispetto agli NCs; inoltre, sono sottoespressi anche nel plasma di pazienti AD rispetto ai rispettivi controlli. Tuttavia è stato interessante notare che i livelli di espressione del miR-130b-3p sono più bassi nei pazienti affetti da AD rispetto a quelli affetti da VaD [Figura 14 C]. a motivo di ciò i miR-10b* e 29a-3p possono essere considerati marcatori sia di VaD che di AD (e di neurodegenerazione in generale) ma il miR-130b-3p può essere utilizzato come marcatore utile per la diagnosi differenziale tra VaD e AD.

Per identificare il ruolo biologico dei tre miRNA in questione si è proceduto all'analisi dei *targets* predetti e validati. Questa ci ha permesso di scoprire che i miR-10b*, 29a-3p e 130b-3p svolgono importanti funzioni nella regolazione dell'attività del sistema nervoso centrale e sono coinvolti in malattie neurodegenerative e cardiovascolari, entrambe talvolta associate a VaD. [Tabella 5, Figura 15]

Tra i target del miR10b* la glicogeno sintasi chinasi-3 (GSK3) è il *target* più importante del miR-10b* in quanto è coinvolto nei meccanismi alla base dell'apprendimento e della memoria [186], come mediatore chiave dell'apoptosi [187] potrebbe contribuire direttamente alla perdita neuronale in AD, è coinvolto nella risposta locale ai processi infiammatori cerebrali [188] e la sua over espressione inibisce la pathway di sopravvivenza mediata

da BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor) . Inoltre, GSK3 è coinvolta in sei delle *pathways* ottenute da DIANA mirPath, quattro delle quali corrispondono a quelle identificate anche da GeneTrail (*Axon guidance, Focal adhesion, Neurotrophin signaling, Wnt signaling pathway*) [figura 15] ed è uno dei quattordici nodi centrali della *network* identificati con CentiScaPe Plugin (tabella..). Due delle *pathways* individuate da GeneTrail (*Focal adhesion, Wnt signaling pathway*) sono state selezionate anche con ClueGo(figura) a conferma dell'importante ruolo che questo gene riveste all'interno della VaD e comunque della neurodegenerazione. Il ruolo di regolazione che il miR-10b* svolge all'interno del SNC è confermato dal fatto che, oltre a GSK3, tra i suoi target ci sono: CCT5 è associato a diverse forme di neuropatia [189], FGF13 che sembra giocare un importante ruolo nella crescita cellulare e nella riparazione tissutale [190, 191], GLS e KCNJ3, coinvolti rispettivamente nella schizofrenia e nel morbo di Parkinson [192, 193]. Quanto detto potrebbe spiegare il perché dei bassi livelli del miR-10b* osservati sia nei pazienti con VAD che nei pazienti AD rispetto ai CN e il suo importante ruolo durante la prima fase del processo neurodegenerativo ovvero quando il SNC tenta di arginare il danno subito.

La famiglia del miR-29 comprende quattro membri, miR-29a, miR-29b-1, miR-29b-2 e miR-29c che pur avendo sequenze simili tra loro sono caratterizzati da piccole variazioni e da diversa localizzazione subcellulare che conferisce alla famiglia eterogeneità funzionale sia nell'ambito del sistema nervoso che in quello cardiovascolare [194]. Tra i loro target ci sono geni con funzioni neurologiche chiave. NAV3, (*Neuron Navigator 3*), regolatore del processo dell'*axon guidance* è un importante target del miR-29a-3p: sono stati trovati elevati livelli dell'mRNA NAV3 nel cervello di pazienti con AD in associazione alla sottoespressione del miR-29a-3p [195]. Also Arpc3 [196] and PGRN [197], due potenziali target della famiglia dei miR-29, sono potenzialmente coinvolti nella patogenesi della VaD: Arpc3 è un componente del complesso ARP2/3 che è stato identificato come target downregolato del miR-29a-3p [196]; PGRN, regola il metabolismo del glucosio e la sensibilità all'insulina [197]. I miR-29a e -29b regolano l'espressione di BACE1 in vivo ed è stato visto che l'espressione del cluster miR-29a/b-1 decresce significativamente in pazienti con AD in concomitanza ad alti livelli della proteina BACE-1 [198]. Una simile correlazione tra l'espressione di questo cluster di miRNA e BACE1 è stata vista durante lo sviluppo cerebrale e in cellule neuronali

primarie [198]. BACE1 rientra nella *Alzheimer's disease pathway* individuate da GeneTrail.

Una significativa correlazione negativa è stata identificata tra il peptide A β 42 e il miR-29a nel CFS [199] e nel sangue [171] di pazienti con AD. Due *targets* del miR29a sono stati identificati anche in questo studio: BACE1 e NAV3. Tra questi, BACE1 rientra nella *Alzheimer's disease pathway* individuate da GeneTrail.

L'importanza del miR-130b nel processo neurodegenerativo è suggerita dal ruolo dei suoi *targets*. EDN1 che è il più importante dei tre membri della famiglia delle endoteline (EDN1, EDN2, EDN3) [200] è un potente vasocostrittore con effetti fisiologici a lungo termine con una espressione prevalente a livello endoteliale [Figure 16] [201]. ENPP5, che è altamente espresso nel cervello codificando per una proteina che svolge un importante ruolo nella comunicazione tra le cellule neuronali [202]. Pertanto EDN1 ed ENPP5 potrebbero spiegare la sottoespressione del miR130b. Infatti, EDN1 risulta essere importante nella patogenesi della VAD, è coinvolto principalmente nel deficit della circolazione cerebrale e nella patogenesi di molte malattie del cuore e del sistema circolatorio generale, dunque, ha un ruolo chiave nell'omeostasi neuronale [201]. La sovraespressione di ENPP5, invece, sembra avere un ruolo importante in

una fase successiva all'insorgenza del danno cerebrale, quando il SNC tenta di ristabilire le connessioni neuronali perse [203]. Frequentemente i referti di *neuroimaging* nei pazienti con VAD mostrano leucoaraiosi, principalmente localizzata attorno ai ventricoli laterali, a causa di una sofferenza ischemica diffusa a livello arteriolare [204], altro target del miR-130b-3p potrebbe essere particolarmente importante per la patogenesi della VaD perché coinvolto nella sintesi della mielina [205]. ZEB1 è coinvolto nella determinazione neurogenica e nei programmi di differenziamento in particolare il suo ruolo è particolarmente rilevante nel processo di transizione epitelio-mesenchima [206]. ACSL4, coinvolto nelle disabilità intellettive [207]. ITPRI gioca un ruolo importante nell'atassia spinocerebellare ed è coinvolto in una delle vie identificate con GeneTrail, *Alzheimer's disease pathway*, a conferma del ruolo che questo miRNA potrebbe avere nei processi neurodegenerativi [208] [Figura 16].

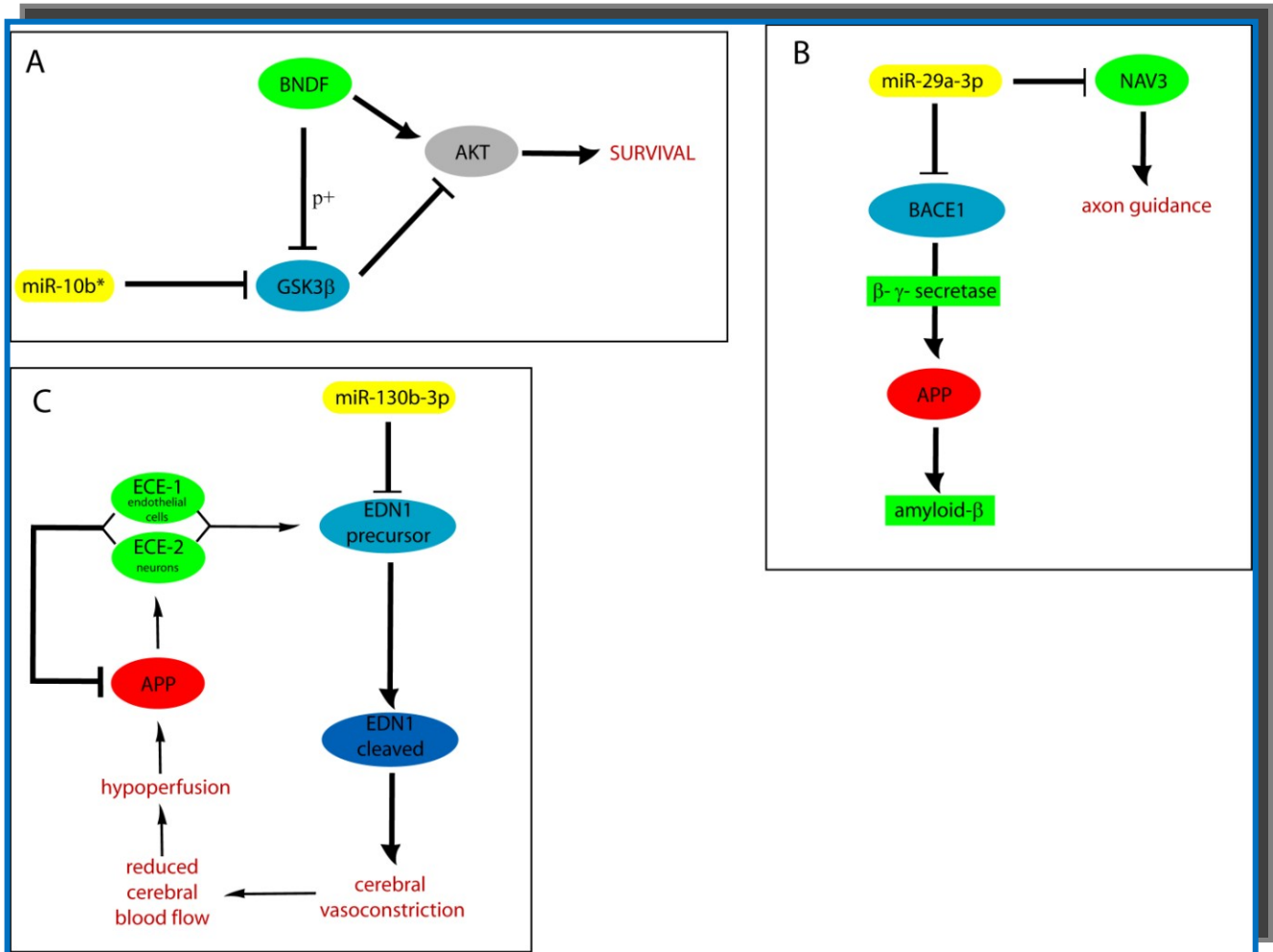


Figura 16 pathway cellulari controllate rispettivamente da miR-10b* (A), miR-29a (B), and 130b-3p (C), APP= Amyloid Precursor Protein; ECE= Endothelin converting enzyme;p+=phosphorylation.

Conclusioni

Il presente studio descrive per la prima volta un set di miRNA plasmatici come biomarcatori non invasivi che potrebbe conferire precisione molecolare nella diagnosi VaD.

In particolare i miR-10b* e miR-29a-3p non sono marcatori diagnostici specifici per la VaD, ma la loro sottoespressione permette di indicare la presenza di una malattia neurodegenerativa, di conseguenza potrebbero essere utilizzati come marcatori diagnostici e prognostici di neurodegenerazione.

Il miR-130b può essere considerato un buon indicatore di fenotipi neuropatologici e il suo livello di sottoespressione potrebbe essere utilizzato per la diagnosi differenziale VAD/AD.

Sulla base di questi dati, quindi, viene suggerito che il profiling plasmatico (o sierico) di altri ncRNAs come lncRNAs e circRNAs in neuropsychiatric diseases potrebbero avere un importante impatto in ambito neuropsiciatrico incrementando le nostre conoscenze circa la genesi molecolare di questi fenotipi che potrebbero essere traslate in ambito clinico[171, 209]

BIBLIOGRAFIA

- [1]. Franceschi C., Valensin S., Bonafè M., Paolisso G., Yashin AI. The network and the remodeling theories of aging: historical background and new perspective. *Exp Gerontol.* 2000b;35:879-896.
- [2]. Jin K. Modern Biological Theories of Aging. *Aging Dis.* 2010;1(2):72-74.
- [3]. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell.* 2013;153(6):1194-217.
- [4]. Masoro EJ. Challenges of Biological Aging. *New York: Springer.* 1999.
- [5]. Holliday R. The close relationship between biological aging and age-associated pathologies in humans. *J Gerontol. Biol Sci.* 2004; 59A:543-6.
- [6]. Gori Z., Cavallini G., Donati A., Bergamini E. Recenti progressi della terapia anti-invecchiamento. Recent progresses in anti-aging therapy. *Gerontol.* 2005;53:144-150.
- [7]. Sowell E.R., Thomson P.M., Toga A.W. Mapping changes in the human cortex throughout the span of life. *Neuroscientist.* 2004;10(4):372-92

-
- [8]. Stern P., Hines P.J., Travis J. The aging brain. Introduction. *Science*. 2014;346(6209):566-7.
- [9]. Jellinger K.A., Attems J. Challenges of multimorbidity of the aging brain: a critical update. *J Neural Transm (Vienna)*. 2015;122(4):505-21.
- [10]. Kirova A.M., Bays R.B., Lagalwar S. Working Memory and Executive Function Decline across Normal Aging, Mild Cognitive Impairment, and Alzheimer's Disease. *Biomed Res Int*. 2015;2015:748212.
- [11]. Schneider J.A., Arvanitakis Z., Leurgans S.E., Bennett D.A. The Neuropathology of Probable Alzheimer's Disease and Mild Cognitive Impairment. *Ann Neurol*. 2009; 66(2): 200–208.
- [12]. Petersen R.C., Parisi J.E., Dickson D.W., et al. Neuropathologic features of amnesic mild cognitive impairment. *Arch Neurol*. 2006; 63(5):665–72.
- [13]. Dlugaj M., Weimar C., Wege N., Verde P.E., Gerwig M., et al. Heinz Nixdorf Recall Study Investigative Group. Prevalence of mild cognitive impairment and its subtypes in the Heinz Nixdorf Recall study cohort. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2010;30(4):362-73.

-
- [14]. Saunders N. L. J. and Summers M. J.. Longitudinal deficits to attention, executive, and working memory in subtypes of mild cognitive impairment. *Neuropsychology*. 2011.
- [15]. Petersen R.C., Doody R., Kurz A., Mohs R.C., Morris J.C., et al. Current concepts in mild cognitive impairment. *Arch Neurol*. 2001; 58:1985-1992.
- [16]. DeCarli C. Mild cognitive impairment: prevalence, prognosis, etiology, and treatment. *Lancet Neurol*. 2003;2:15-21.
- [17]. Brooks L.G., Loewenstein D.A. Assessing the progression of mild cognitive impairment to Alzheimer's disease: current trends and future directions. *Alzheimers Res Therapy*. 2010 Sep 29;2(5):28.
- [18]. Jicha G.A., Parisi J.E., Dickson D.W., Johnson K., Cha R, et al. Neuropathologic outcome of mild cognitive impairment following progression to clinical dementia. *Arch Neurol*. 2006; 63:674-681.
- [19]. Doody R.S., Pavlik V., Massman P., Rountree S., Darby E., et al. Predicting progression to Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther*. 2010; 2:2-10.
- [20]. Apostolova L.G , Thompson P.M., Green A.E., Hwang K.S., Zoumalan C., et al. 3D comparison of low, intermediate, and

- advanced hippocampal atrophy in MCI. *Hum Brain Mapp.* 2010; 31:786-799.
- [21]. Stephan B.C., Matthews F.E., Khaw K.T., Dufouil C. Brayne C. Beyond mild cognitive impairment: vascular cognitive impairment, no dementia (VCIND). *Alzheimers Res Therapy.* 2009;1:4-12.
- [22]. Von Bernhardi R., Inestrosa N.C. Neurodegenerative diseases: From Molecular Concepts to Therapeutic Targets. *Nova Science Publishers.* 2008.
- [23]. Agrawal M, Biswas A. Molecular diagnostics of neurodegenerative disorders. *Front Mol Biosci.* 2015;22;2:54.
- [24]. Sheinerman K.S., Tsivinsky V.G., Crawford F., Mullan M.J., Abdullah L., et al. Plasma microRNA biomarkers for detection of mild cognitive impairment. *Aging (Albany NY).* 2012;4(9):590-605.
- [25]. Sperling RA, Jack CR Jr, Aisen PS. Testing the right target and right drug at the right stage. *Sci Transl Med.* 2011;3(111):111cm33.
- [26]. Snyder E.M., Olin J., David, F. S. Maximizing the value of diagnostics in Alzheimer's disease drug development. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2012;11,183–184.
- [27]. Kovacs G.G. Current concepts of neurodegenerative diseases. *EMJ Neurol.* 2014;1:78-86.

-
- [28]. Przedborski S., Vila M., Jackson-Lewis V. Neurodegeneration: What is it and where are we? *J. Clin. Invest.* 2003; 111:3–10.
- [29]. Skovronsky D.M., Lee V.M., Trojanowski J.Q. Neurodegenerative diseases: new concepts of pathogenesis and their therapeutic implications. *Annu Rev Pathol.* 2006;1:151-70.
- [30]. Kovacs G. G. Invited review: Neuropathology of tauopathies: principles and practice *Neuropathology and Applied Neurobiology.* 2015; 41, 3–23 doi: 10.1111/nan.12208
- [31]. Kovacs G.G., Botond G., Budka H. Protein coding of neurodegenerative dementias: the neuropathological basis of biomarker diagnostics. *ActaNeuropathol.* 2010; 119:389–408.
- [32]. Kovacs G.G. Neuropathology of Neurodegenerative Diseases: a Practical Guide. *Cambridge University Press.* 2015.
- [33]. Tomlinson B.E., Blessed G., Roth M. Observations on the brains of non-demented old people. *J Neurol Sci.* 1968; 7:331–56.
- [34]. Roman G.C., Sachdev P., Royall D.R., Bullock R.A., Orgogozo J.M., et al. Vascular cognitive disorder: a new diagnostic category updating vascular cognitive impairment and vascular dementia. *J Neurol Sci.* 2004; 226:81–7

-
- [35]. Suri S., Topiwala A., Mackay C.E., Ebmeier K.P., Filippini N. Using structural and diffusion magnetic resonance imaging to differentiate the dementias. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2014; 14: 475.
- [36]. Rizzi L., Rosset I., Roriz-Cruz M. Global epidemiology of dementia: Alzheimer's and vascular types. *Biomed Res Int.* 2014;2014:908915.
- [37]. Wortmann M. Dementia: a global health priority - highlights from an ADI and World Health Organization report. *Alzheimers Res Ther.* 2012;4(5):40.
- [38]. Korczyn A.D., Vakhapova V., Grinberg L.T. Vascular dementia. *J Neurol Sci.* 2012;322(1-2): 2–10.
- [39]. *ICD10 Version:2016*, (<http://apps.who.int/classifications/icd10/browse/2016/en#/V>)
- [40]. DSM-V. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition. *American Psychiatric Association*, 2013.
- [41]. DSM-IV/ DSM-V, <http://www.psychiatryonline.com/resource>.
- [42]. Tampi R.R., Williamson D., Muralee S., Mittal V., McEnerney N., et al. Behavioral and Psychological Symptoms of Dementia: Part I- Epidemiology, Neurobiology, Heritability, and Evaluation. *Clin Geriatr.* 2011; 19:1-6

-
- [43]. L., Knoefel J., Bhaskar K. The neuropathology and cerebrovascular mechanisms of dementia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2015;doi: 10.1038/jcbfm.2015.164
- [44]. Cipolla M.J. The Cerebral Circulation. San Rafael, CA: *Morgan & Claypool Life Sciences*. 2009.
- [45]. Dirnagl U., Niwa K., Lindauer U., Villringer A. Coupling of cerebral blood flow to neuronal activation: role of adenosine and nitric oxide. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 1994; 267: H296–H301.
- [46]. Faraci F.M. Protecting against vascular disease in brain. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011;300: H1566–H1582.
- [47]. Faraci F.M., Heistad D.D. Regulation of large cerebral arteries and cerebral microvascular pressure. *Circ Res.* 1990;66: 8–17.
- [48]. Lok J., Gupta P., Guo S., Kim W.J., Whalen M.J., et al. Cell–cell signaling in the neurovascular unit. *Neurochem Res.* 2007;32: pp. 2032–2045.
- [49]. Silverthorn D.U. *Fisiologia- Un approccio integrato*, 2^a edizione. Casa Editrice Ambrosiana. 2005.
- [50]. Abbott N.J., Patabendige A.A., Dolman D.E, Yusof S.R., Begley D.J. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis.* 2010;37: 13–25, 2010.

-
- [51]. Paolo Castano P., Donato R. F. Anatomia dell'uomo, 2^a edizione. *Edi-Ermes*. 2008.
- [52]. Hossmann K.A. Pathophysiology and therapy of experimental stroke. *Cell Mol Neurobiol*. 2006; 26:1057–1083.
- [53]. Liebeskind D.S. Collateral circulation. *Stroke*. 2003;34:2279–2284.
- [54]. Lee R.M. Morphology of cerebral arteries. *Pharmacol Ther*. 1995;66:149–173.
- [55]. Xu K., Lamanna J.C. Chronic hypoxia and the cerebral circulation. *J Appl Physiol*. 2006 100:725–730.
- [56]. Schaller B. Physiology of cerebral venous blood flow: from experimental data in animals to normal function in humans. *Brain Res Rev*. 2004; 46: 243–260.
- [57]. Kiliç T., Akakin A. Anatomy of cerebral veins and sinuses. *Frontiers Neurol Neurosci*. 2008; 23: 4–15.
- [58]. Kierman J.A. Barr's: Il Sistema Nervoso dell'Uomo - Basi di Neuroanatomia, 8^a edizione. *EdiSES*. 2008.
- [59]. Giuseppe Anastasi, et al. Trattato di anatomia umana, vol. 3, 4^a edizione. *Edi.Ermes*. 2006.
- [60]. Kinsella K., Velkoff V.A. An Aging World: 2011. *U.S Census Bureau, Washington, D.C*. 2001.

-
- [61]. De Carli C. Clinically Asymptomatic Vascular Brain Injury: A Potent Cause of Cognitive Impairment Among Older Individuals. *J Alzheimers Dis.* 2013; 33(0 1): S417–S426.
- [62]. Adamson J., Beswick A., Ebrahim S. Is stroke the most common cause of disability? *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2004;13:171-177. 3.
- [63]. American Stroke Association. About stroke. [http://www. Stroke association.org/STROKEORG/AboutStroke/AboutStroke_UCM_308529_SubHomePage.jsp](http://www.Strokeassociation.org/STROKEORG/AboutStroke/AboutStroke_UCM_308529_SubHomePage.jsp) (accessed March 30, 2015).
- [64]. Hachinski V.C., Potter P., Merskey H. Leuko-araiosis: An ancient term for a new problem. *Canad J Neurol Sci.* 1986;13:533-534.
- [65]. Steingart A., Lau K., Fox A., Diaz F., Fisman M., Hachinski V., Merskey H. The significance of white matter lucencies on CT scan in relation to cognitive impairment. *Canad J Neurol Sci.* 1986;3:383-384.
- [66]. Inzitari D., Diaz F., Fox A., Hachinski V.C., Steingart A., Lau C., Donald A., Wade J., Mulic H., Merskey H. Vascular risk factors and leuko-araiosis. *Arch Neurol.* 1987;44:42-47.
- [67]. Awad I.A., Spetzler R.F., Hodak J.A., Awad C.A., Carey R. (1986) Incidental subcortical lesions identified on magnetic resonance imaging in the elderly. I. Correlation with age and cerebrovascular risk factors. *Stroke.* 1986;17:1084-1089.

-
- [68]. DeCarli C. Vascular factors in dementia: An overview. *J Neurol Sci.* 2004;226:19-23.
- [69]. DeCarli C., Massaro J., Harvey D., Hald J., Tullberg M. et al. Measures of brain morphology and infarction in the framingham heart study: Establishing what is normal. *Neurobiol Aging.* 2005;26:491-510.
- [70]. Reed T., Kirkwood S.C., DeCarli C., Swan G.E., Miller B.L., et al. Relationship of family history scores for stroke and hypertension to quantitative measures of white-matter hyperintensities and stroke volume in elderly males. *Neuroepidemiology.* 2000;19:76-86.
- [71]. Carmelli D., Reed T., DeCarli C. (2002) A bivariate genetic analysis of cerebral white matter hyperintensities and cognitive performance in elderly male twins. *Neurobiol Aging.* 2002;23: 413-420.
- [72]. Geschwind D.H., Miller B.L., DeCarli C., Carmelli D. (2002) Heritability of lobar brain volumes in twins supports genetic models of cerebral laterality and handedness. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99: 3176-3181.
- [73]. Lessov-Schlaggar C.N., Hardin J, DeCarli C., Krasnow R.E., Reed T. et al. Longitudinal genetic analysis of brain volumes in normal elderly male twins. *Neurobiol Aging.* 2012;33: 636-644

-
- [74]. Seshadri S., Beiser A., Kelly-Hayes M., Kase C.S., et al. The lifetime risk of stroke: Estimates from the Framingham Study. *Stroke*. 2006;37:345-350.
- [75]. Loeb C. The history of vascular dementia. *J Hist Neurosci* 1995;4:121–6.
- [76]. Alzheimer A. Die arteriosklerotische Atrophie des Gehirns. *Allg Zeitschr Psychiatr*. 1895;51:1809–12.
- [77]. Binswanger O.D. Abgrenzung der allgemeinen progressiven Paralyse. *Berl Klin Wochenschr*. 1894;31:1103–86
- [78]. Mast H., Tatemichi T.K., Mohr J.P. Chronic brain ischemia: the contributions of Otto Binswanger and Alois Alzheimer to the mechanisms of vascular dementia. *J Neurol Sci* 1995;132:4–10
- [79]. Alzheimer A. D. Seelenstoerungen auf arteriosclerotischer Grundlage. *Allg Z Psychiatr Psych Gericht Med*.1902;59:695–711.
- [80]. Roman G.C. New insight into Binswanger disease. *Arch Neurol* 1999;56:1061–2.
- [81]. Tomlinson B.E., Blessed G., Roth M. Observations on the brains of non-demented old people. *J Neurol Sci*. 1968;7:331–56.
- [82]. Tomlinson B.E., Blessed G., Roth M. Observations on the brains of demented old people. *J Neurol Sci*. 1970;11:205–42.

-
- [83]. Hachinski V.D., Lassen N.A., Marshall J. Multi-infarct dementia. A cause of mental deterioration in the elderly. *Lancet*. 1974;2:207–10.
- [84]. Amos D.K., Veronika V., Grinberg L.T. Vascular dementia. *J Neurol Sci*. 2012; 322(1-2): 2–10.
- [85]. Iadecola, C. The pathobiology of vascular dementia. *Neuron*. 2013;80:844-866.
- [86]. McVeigh C., Passmore P. Vascular dementia: prevention and treatment. *Clin Interv Aging*. 2006;1(3):229-35.
- [87]. WHO, Reducing risks, promoting healthy life. World Healthy Report. *World Healthy Organization*. 2002.
- [88]. Kalaria R.N., Maestre G.E., Arizaga et al R. Alzheimer's disease and vascular dementia in developing countries: prevalence, management, and risk factors, *The Lancet Neurology*. 2008; 7(9), 812–826.
- [89]. Forette F., Boller F. Hypertension and the risk of dementia in the elderly. *Am J Med*. 1991; 90(3A):14S-19S.
- [90]. Grinberg L.T., Heinsen H. Toward a pathological definition of vascular dementia. *J Neurol Sci*. 2010; 299:136–8.
- [91]. Korczyn A.D., Vakhapova V. The prevention of the dementia epidemic. *J Neurol Sci*. 2007;257:2–4.

-
- [92]. Korczyn A.D. Mixed dementia-the most common cause of dementia. *Ann N Y Acad Sci.* 2002; 977:129–34.
- [93]. Korczyn A.D. The complex nosological concept of vascular dementia. *J Neurol Sci.* 2002; 203– 204:3–6. 10.
- [94]. Langa K.M., Foster N.L., Larson E.B. Mixed dementia: emerging concepts and therapeutic implications. *JAMA.* 2004;292:2901–8.
- [95]. Valenti R, Pantoni L, Markus HS. Treatment of vascular risk factors in patients with a diagnosis of Alzheimer's disease: a systematic review. *BMC Med* . 2014;12: 160. 18
- [96]. Jellinger KA, Attems J. Neuropathology and general autopsy findings in nondemented aged subjects. *Clin Neuropathol.* 2012; 31: 87.
- [97]. Roman G.C., Sachdev P., Royall D.R., Bullock R.A., Orgogozo J.M., et al. Vascular cognitive disorder: a new diagnostic category updating vascular cognitive impairment and vascular dementia. *J Neurol Sci.* 2004;226:81–7
- [98]. Hachinski V., Iadecola C., Petersen R.C., Breteler M.M., Nyenhuis D.L., et al. National Institute of Neurological Disorders and Stroke-Canadian Stroke Network vascular cognitive impairment harmonization standards. *Stroke.* 2006;37:2220–41.

-
- [99]. Petersen R.C., Smith G.E., Waring S.C., Ivnik R.J., Kokmen E., et al.. Aging, memory, and mild cognitive impairment. *Int Psychogeriatr*. 1997; 9:65–9.
- [100]. Wentzel C., Rockwood K., MacKnight C., Hachinski V., Hogan D.B., et al. Progression of impairment in patients with vascular cognitive impairment without dementia. *Neurology*. 2001;57:714–6.
- [101]. Manzoni G. C., Torelli, P. *Neurologia Clinica*. Casa Editrice Esculapio. 2012
- [102]. Gold G., Kovari E., Herrmann F.R., Canuto A., Hof P.R., et al. Cognitive consequences of thalamic, basal ganglia, and deep white matter lacunes in brain aging and dementia. *Stroke*. 2005;36:1184–8.
- [103]. Koga H., Takashima Y., Murakawa R., Uchino A., Yuzuriha T., Yao H. Cognitive consequences of multiple lacunes and leukoaraiosis as vascular cognitive impairment in community-dwelling elderly individuals. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2009; 18:32–7.
- [104]. Handley A., Medcalf P., Hellier K., Dutta D. Movement disorders after stroke. *Age Ageing*. 2009; 38:260–6.

- [105]. Sachdev P.S., Brodaty H., Valenzuela M.J., Lorentz L., Looi J.C., et al. The neuropsychological profile of vascular cognitive impairment in stroke and TIA patients. *Neurology*. 2004; 62:912–9.
- [106]. Nordlund A., Rolstad S., Klang O., Lind K., Hansen S., at al. Cognitive profiles of mild cognitive impairment with and without vascular disease. *Neuropsychology*. 2007; 21:706–12.
- [107]. Folstein M.F., Folstein S.E., McHugh P.R., Mini-mental state. A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res*. 1975; 12:189–98. 50
- [108]. Roman G.C., Tatemichi T.K., Erkinjuntti T., Cummings J.L., Masdeu J.C. et al., Vascular dementia: diagnostic criteria for research studies. *Report of the NINDS-AIREN International Workshop. Neurology*.1993;43(2):250-60.)
- [109]. Chui H.C., Victoroff J.I., Margolin D., Jagust W., Shankle R., et al. Criteria for the diagnosis of ischemic vascular dementia proposed by the State of California Alzheimer’s Disease Diagnostic and Treatment Centers. *Neurology*. 1992;42:473–80.

- [110]. Erkinjuntti, T.M.D, Román G.M.D, Gauthier S., et al., Emerging Therapies for Vascular Dementia and Vascular Cognitive Impairment, *Stroke*. 2004;35(4):1010-7
- [111]. Van Straaten E.C., Scheltens P., Barkhof F. MRI and CT in the diagnosis of vascular dementia. *J Neurol Sci*. 2004;226(1-2):9-12).
- [112]. Suri S, Topiwala A, Mackay CE, Ebmeier KP, Filippini N. Using structural and diffusion magnetic resonance imaging to differentiate the dementias. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2014 Sep;14(9):475.
- [113]. Tedeschi G., Cirillo S., Caltagirone C. Le neuroimmagini nelle demenze. *Testo Atlante*, Critical Medicine Publishing. 2005,
- [114]. McVeigh C., Passmore P. Vascular dementia: prevention and treatment. *Clinical Interventions in Aging*. 2006;1(3):229-235
- [115]. Kannel W.B., Dawber T.R., Kagan A., Revotskie N., Stokes J. III. Factors of risk in the development of coronary heart disease-six year follow-up experience. The Framingham Study. *Ann Intern Med*. 1961;55:33-50.

- [116]. Kling M.A., Trojanowski J.Q., Wolk D.A., Lee V.M., Arnold S.E.
Vascular disease and dementias: paradigm shifts to drive research in
new directions. *Alzheimers Dement.* 2013;9(1):76-92.
- [117]. Craft S. The role of metabolic disorders in Alzheimer disease and
Vascular Dementia: two roads converged. *Arch Neurol.*
2009;66(3):300-5.
- [118]. In't Veld B.A., Ruitenberg A., Hofman A., Stricker BH, Breteler
MM. Antihypertensive drugs and incidence of dementia: the
Rotterdam Study. *Neurobiol Aging*, 2001;22:407-12.
- [119]. Thomas NJ, Morris CM, Scaravilli F, et al. Hereditary vascular
dementia linked to notch 3 mutations. CADASIL in British families.
Ann N Y Acad Sci. 2000 903:293-8.
- [120]. Chabriat H., Vahedi K., Iba Zizen, Joutel A., Nibbio A., et al.
Clinical Spectrum of CASADIL: a study of 7 families. Cerebral
autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and
leukoencephalopathy. *Lancet.* 1995;346(8980):934-9.
- [121]. Miller J.A., Woltjer R.L., Goodenbour J.M., Horvath S., Geschwind
D.H. Genes and pathways underlying regional and cell type changes
in Alzheimer's disease. *Genome Med.* 2013;25;5(5):48.

-
- [122]. Schneider JA, Arvanitakis Z, Bang W, Bennett DA. Mixed brain pathologies account for most dementia cases in community-dwelling older persons. *Neurology*. 2007;69,21972204.
- [123]. Dorval V., Nelson P.T. and Hébert S.S. Circulating microRNAs in Alzheimer's disease: the search for novel biomarkers *Front. Mol. Neurosci.* 2013; 30;6:24.
- [124]. Rachakonda V., Pan T. H., LE W. D. Biomarkers of neurodegenerative disorders: how good are they? *Cell Res.* 2004;14,347–358.
- [125]. Kumar P., Dezso Z., MacKenzie C., Oestreicher J., Agoulnik S., et al. Circulating miRNA Biomarkers for Alzheimer's Disease. *PLoS ONE*. 2013;8(7): e69807.
- [126]. Grundke-Iqbal I., Barra H., Iqbal K. Abnormal phosphorylation of tau and the mechanism of Alzheimer neurofibrillary degeneration: Sequestration of microtubule-associated proteins 1 and 2 and the disassembly of microtubules by the abnormal tau. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94:298–303.
- [127]. Wolfe M.S., Xia W., Ostaszewski B.L., Diehl T.S., Kimberly W.T., et al. Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for

-
- presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity. *Nature*. 1999;398(6727):513-7.
- [128]. Aguzzi A., O'Connor T. Protein aggregation diseases: pathogenicity and therapeutic perspectives. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2010;9,237-248.
- [129]. Brunden K.R., Trojanowski J.Q., Lee V.M.. Advances in tau-focused drug discovery for Alzheimer's disease and related tauopathies; *Nature Reviews Drug Discovery*. 2009; 8, 783-793
- [130]. Mahley R.W., Weisgraber K.H., Huang Y. Apolipoprotein E4: A causative factor and therapeutic target in neuropathology, including Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103(15):5644-5651.
- [131]. Huang Y., Mucke L. Alzheimer Mechanisms and Therapeutic Strategies. *Cell*. 2012;148(6):1204-1222.
- [132]. McKhann G., Drachman D., Folstein M., Katzman R., Price D., et al. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology*, 1984; 34(7):939-44.

- [133]. Alzheimer's Association. Alzheimer's Disease Facts and Figures, *Alzheimer's & Dementia*. 2013; Volume 9, Issue 2.
- [134]. Craft S. The Role of Metabolic Disorders in Alzheimer Disease and Vascular Dementia. Two Roads Converged. *Arch Neurol*. 2009; 66(3):300-5
- [135]. Jellinger K.A. The enigma of mixed dementia. *Alzheimer's & Dementia*. 2007; 3: 40-53
- [136]. Gearing M., Mirra S.S., Hedreen J.C., Sumi S.M., Hansen L.A. et al.. The consortium to establish a registry for Alzheimer's disease (CERAD). Part X. Neuropathology confirmation of the clinical diagnosis of Alzheimer's disease. *Neurology*. 1995;45:461-6.
- [137]. O'Brien M.D. How does cerebrovascular disease cause dementia? *Dementia*. 1994;5:133-6.
- [138]. Knopman D.S., Parisi J.E., Boeve B.F., Cha R.H., Apaydin H., et al. Vascular dementia in a population-based autopsy study. *Arch Neurol*. 2003;60: 569–575
- [139]. Langa K.M., Foster N.L., Larson E.B. Mixed dementia: emerging concepts and therapeutic implications. *JAMA*. 2004; 292: 2901 – 2908.

-
- [140]. Rius-Pérez S., Tormos A.M., Pérez S., Taléns-Visconti R. Vascular pathology: Cause or effect in Alzheimer disease? *Neurologia*. 2015; pii:S0213-4853(15)00185-1
- [141]. Haan M.N., Shemanski L., Jagust W.J., Manolio T.A., Kuller L. The role of APOE epsilon4 in modulating effects of other risk factors for cognitive decline in elderly persons. *JAMA*. 1999;282: 40
- [142]. Bugiani O. A beta-related cerebral amyloid angiopathy. *Neurol Sci*.2004; 25: S1–S2.
- [143]. Mehta P.D., Pirttila T., Mehta S.P., Sersen E.A., Aisen P.S., et al., Plasma and cerebrospinal fluid levels of amyloid beta proteins 1–40 and 1–42 in Alzheimer disease. *Archives of neurology*, 2000,57: 100–5.
- [144]. Wiltfang J., Esselmann H., Bibl M., Hull M., Hampel H., et al., Amyloid beta peptide ratio 42/40 but not A beta 42 correlates with phospho-Tau in patients with low- and high-CSF A beta 40 load. *Journal of Neurochemistry*, 2007; 101: 1053– 9.
- [145]. Glodzik-Sobanska L., Pirraglia E., Brys M., De Santi S., Mosconi L., et al., The effects of normal aging and ApoE genotype on the levels

-
- of CSF biomarkers for Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*. 2009; 30: 672–81.
- [146]. Hansson O., Zetterberg H., Buchhave P., et al., Prediction of Alzheimer's Disease Using the CSF Ab42/Ab40 Ratio in Patients with Mild Cognitive Impairment. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*. 2007;23: 316–320
- [147]. Humpel C. Identifying and validating biomarkers for Alzheimer's disease. *Trends in biotechnology*, 2011;29: 26–32.
- [148]. Maes O.C., Chertkow H.M., Wang E., Schipper H.M. MicroRNA: Implications for Alzheimer Disease and other Human CNS Disorders. *Current Genomics*. 2009;10(3):154-168.
- [149]. Lee Y., Kim M., Han J., et al., MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO Journal*. 2004;23(20):4051-4060.
- [150]. Borchert G.M., Lanier W., Davidson B.L. RNA polymerase III transcribes human miRNAs. *Nat Struct Mol Biol*. 2006;13(12):1097-101

-
- [151]. Cai X., Hagedorn C.H., Cullen B.R. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA*. 2004; 10: 1957–1966.;
- [152]. Denli AM et al. Processing of primary microRNAs by the microprocessor complex. *Nature*. 2004;432, 231-235.
- [153]. Han J, Lee Y, Yeom KH, Nam JW, Heo I, et al. Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell*. 2006;125:887–901.
- [154]. Lund E., Guttinger S., Calado A., Dahlberg J.E., Kutay U. Nuclear export of miRNA precursors. *Science*. 2004;303(5654):95-8.
- [155]. Chendrimada T.P. et al.; TRBP recruits Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature*. 2005; 436:740-744.
- [156]. Filipowicz W., Bhattacharyya S.N., Sonenberg N. Mechanisms of posttranscriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight. *Nat Rev Genet*. 2008; 9(2):102-114.
- [157]. Schwarz D.S. et al., Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*. 2003; 115:199–208.

- [158]. Schwar D.S. et al., Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*. 2003; 115:199–208.
- [159]. Okamura K., Hagen J.W., Duan H., Tyler D.M., Lai E.C. The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in *Drosophila*. *Cell*. 2007; 130:89–100
- [160]. Ruby J.G., Jan C.H., Bartel D.P. Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature*. 2007; 448:83–86.
- [161]. Sheinerman K.S., Umansky S.R. Circulating cell-free microRNA as biomarkers for screening, diagnosis, and monitoring of neurodegenerative diseases and other neurologic pathologies. *Front Cell Neurosci*. 2013; 7:150
- [162]. Valadi H., Ekström K., Bossios A., Sjöstrand M., Lee J.J., Lötvall J.O. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*. 2007;9(6):654-9.
- [163]. Turchinovich A., Samatov T.R, Tonevitsky A.G, Burwinkel B.; Circulating miRNAs: cell-cell communication function?; *Front in Genet* 2013

- [164]. Cortez M.A., Bueso-Ramos C., Ferdin J., Lopez-Berestein G., Sood A.K., et al. MicroRNAs in body fluids-the mix of hormones and biomarkers. *Nature reviews Clinical oncology*. 2011;8(8):467-477.).
- [165]. Sheinerman K.S., Umansky S.R. Circulating cell-free microRNA as biomarkers for screening, diagnosis, and monitoring of neurodegenerative diseases and other neurologic pathologies. *Front Cell Neurosci*. 2013; 7:150.
- [166]. Tan L, Yu JT, Tan L. Causes and Consequences of MicroRNA Dysregulation in Neurodegenerative Diseases. *Mol Neurobiol*. 2015;51(3):1249-62.
- [167]. Predecki M., Dorszewska J. The Role of MicroRNA in the Pathogenesis and Diagnosis of Neurodegenerative Diseases. *Austin Alzheimers J Parkinsons Dis*. 2014;1(3): 10.
- [168]. Santa-Maria I., Alaniz M.E., Renwick N., Cela C., Fulga T.A., Van Vactor D., et al. Dysregulation of microRNA-219 promotes neurodegeneration through post-transcriptional regulation of tau. *J Clin Invest*. 2015;125(2):681-6.

-
- [169]. Maes O.C., Chertkow H.M., Wang E., Schipper H.M. MicroRNA: Implications for Alzheimer Disease and other Human CNS Disorders. *Current Genomics*. 2009;10(3):154-168.
- [170]. Finnerty J.R., Wang W.X., Herbert S.S., Wilfred B.R., Mao G., Nelson P.T. The miR-15/107 group of microRNA genes: evolutionary biology, cellular functions, and roles in human diseases. *J Mol Biol*. 2010;402:491–509.
- [171]. Geekiyanage H, Jicha GA, Nelson PT, Chan C. Blood serum miRNA: non-invasive biomarkers for Alzheimer's disease. *Exp Neurol*. 2012;235(2):491-6.
- [172]. Ragusa M., Caltabiano R., Russo A., Puzzo L., Avitabile T., Longo A., Toro M.D., Di Pietro C., Purrello M., Reibaldi M. MicroRNAs in vitreous humor from patients with ocular diseases. *Mol. Vis* 2013; 19, 430–440
- [173]. Ragusa M., Majorana A., Statello L., Maugeri M., Salito L., Barbagallo D., Guglielmino M.R., Duro L.R., Angelica R., Caltabiano R., Biondi A., Di Vita M., Privitera G., Scalia M., Cappellani A., Vasquez E., Lanzafame S., Basile F., Di Pietro C., Purrello M. Specific alterations of microRNA transcriptome and

-
- global network structure in colorectal carcinoma after cetuximab treatment. *Mol. Cancer Ther.* 2010
- [174]. www.tm4.org
- [175]. Hsu S.D., Lin F.M., Wu W.Y. et al., miRTarBase: a database curates experimentally validated microRNA-target interactions. *Nucleic Acids Res* 2011; 39:D163-9.
- [176]. Li J.H., Liu S., Zhou H., Qu L.H., Yang J.H. starBase v2.0: decoding miRNA-ceRNA, miRNA-ncRNA and protein-RNA interaction networks from large-scale CLIP-Seq data. *Nucleic Acids Res.* 2014; 42:D92-7
- [177]. Paraskevopoulou M.D., Georgakilas G., Kostoulas N. et al., DIANA-microT web server v5.0: service integration into miRNA functional analysis workflows. *Nucleic Acids Res*, 2013;41:W169-73
- [178]. Backes C, Keller A, Kuentzer J et al. GeneTrail—advanced gene set enrichment analysis. *Nucleic Acids Res*, 2007; 35:W186-92.
- [179]. Vlachos IS, Kostoulas N, Vergoulis T et al. DIANA miRPath v.2.0: investigating the combinatorial effect of microRNAs in pathways. *Nucleic Acids Res*, 2012; 40:W498-504.

-
- [180]. I. S. Vlachos, M. D. Paraskevopoulou, D. Karagkouni, G. Georgakilas, T. Vergoulis, I. Kanellos, I-L. Anastasopoulos, S. Maniou, K. Karathanou, D. Kalfakakou, A. Fevgas, T. Dalamagas and A. G. Hatzigeorgiou. DIANA-TarBase v7.0: indexing more than half a million experimentally supported miRNA:mRNA interactions. *Nucl Acids Res* 2014; 43:D153-9.
- [181]. Smoot ME, Ono K, Ruscheinski J, Wang PL, Ideker T. Cytoscape 2.8: new features for data integration and network visualization. *Bioinformatics* 2011; 27(3):431-2
- [182]. Gao J, Ade AS, Tarcea VG, Weymouth TE, Mirel BR, Jagadish HV, States DJ. Integrating and annotating the interactome using the MiMI plugin for cytoscape. *Bioinformatics* 2009; 25(1):137-8.
- [183]. Scardoni G, Petterlini M, Laudanna C. Analyzing biological network parameters with CentiScaPe. *Bioinformatics*. 2009;2857–2859
- [184]. Bindea G., Mlecnik B., Hackl H. et al. ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks. *Bioinformatics*, 2009; 25(8):1091-3.
- [185]. Montine, T.J, Koroshetz, W.J., Babcock, D., Dickson, D.W., Galpern, W.R., Glymour, M.M., et al. (2014). ADRD 2013

- Conference Organizing Committee. Recommendations of the Alzheimer's disease-related dementias conference. *Neurology*. 83(9):851-60.
- [186]. Hooper C., Killick R., Lovestone S. The GSK3 hypothesis of Alzheimer's disease *J Neurochem*. 2008 Mar; 104: 1433–1439.
- [187]. Turenne G.A., Price B.D. Glycogen synthase kinase3 beta phosphorylates serine 33 of p53 and activates p53's transcriptional activity. *BMC Cell Biol*. 2001; 2: 12.
- [188]. Llorens-Martín M, Jurado J, Hernández F, Avila J. *GSK-3 β , a pivotal kinase in Alzheimer disease*. *Front Mol Neurosci*. 2014;21;7:46.
- [189]. Bouhouche A., Benomar A., Bouslam N., et al. Mutation in the epsilon subunit of the cytosolic chaperonin-containing t-complex peptide-1 (Cct5) gene causes autosomal recessive mutilating sensory neuropathy with spastic paraplegia. *J Med Genet*. 2006; 43(5):441-3.
- [190]. Masonic K., Petullo D., Li L.Y., et al., Pretreatment with intravenous FGF-13 reduces infarct volume and ameliorates neurological deficits following focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res*. 1999; 818(1):140-6.
- [191]. Smallwood P.M., Munoz-Sanjuan I., Tong P., et al., Fibroblast growth factor (FGF) homologous factors: new members of the FGF

- family implicated in nervous system development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1996; 93:9850-7.
- [192]. Buschdorf J.P., Li Chew L., Zhang .B, et al.; Brain-specific BNIP-2-homology protein Caytaxin relocalises glutaminase to neurite terminals and reduces glutamate levels. *J. Cell Sci.* 2006; 119(Pt 16):3337-50
- [193]. Sanna P.P., Cammalleri M., Berton F., et al., Phosphatidylinositol 3-kinase is required for the expression but not for the induction or the maintenance of long-term potentiation in the hippocampal CA1 region. *J. Neurosci.* 2002; 22, 3359–3365.
- [194]. Chang T.C., Yu D., Lee Y.S., et al.; Widespread microRNA repression by Myc contributes to tumorigenesis. *Nat Genet.* 2008; 40:43–50 3.
- [195]. Shioya M., Obayashi S., Tabunoki H., et al., Aberrant microRNA expression in the brains of neurodegenerative diseases: miR-29a decreased in Alzheimer disease brains targets neurone navigator 3. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2010; 36:320-330.
- [196]. Lippi G., Steinert J.R., Marczylo E.L., D’Oro S., Fiore R., Forsythe I.D., Schratt G., Zoli M, Nicotera P., Young K.W. Targeting of the

-
- Arcp3 actin nucleation factor by miR-29a/b regulates dendritic spine morphology. *J Cell Biol* 2011; 194:889–904 35.
- [197]. Jiao J., Herl L.D., Farese R.V, Gao F.B. MicroRNA-29b regulates the expression level of human progranulin, a secreted glycoprotein implicated in frontotemporal dementia. *PLoS One* 2010 5:e10551
- [198]. Hebert SS, Horre K, Nicolai L, Papadopoulou AS, Mandemakers W, Silaharoglu AN, Kauppinen S, Delacourte A, De Strooper B. Loss of microRNA cluster miR-29a/b-1 in sporadic Alzheimer's disease correlates with increased BACE1/beta-secretase expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105:6415–6420 34),
- [199]. Alexandrov PN, Dua P, Hill JM, Bhattacharjee S, Zhao Y, Lukiw WJ. microRNA (miRNA) speciation in Alzheimer's disease (AD) cerebrospinal fluid (CSF) and extracellular fluid (ECF). *Int. J. Biochem. Mol. Biol.* 2012; 3, 365–373.
- [200]. Maguire, J.J., Davenport , A.P. Endothelin@25 - new agonists, antagonists, inhibitors and emerging research frontiers: IUPHAR Review 12. *Br. J. Pharmacol.* 2014;171:5555-5572.
- [201]. Agapitov A.V., Haynes W.G. Role of endothelin in cardiovascular disease. *JRAAS*, 2002;3(1):1-15

-
- [202]. Ohe Y., Ohnishi H., Okazawa H, et al., Characterization of nucleotide pyrophosphatase-5 as an oligomannosidic glycoprotein in rat brain. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 Sep 5; 308:719-25.
- [203]. Schinelli S. Pharmacology and physiopathology of the brain endothelin system: an overview. in *Curr Med Chem.* 2006; 13(6):627-38.
- [204]. Scheltens P, Erkinjuntti T, Leys D, Wahlund LO, Inzitari D, del Ser T, Pasquier F, Barkhof F, Mantyla R, Bowler J, Wallin A, Ghika J, Fazekas F, Pantoni L. White matter changes on CT and MRI: an overview of visual rating scales. European Task Force on Age-Related White Matter Changes. *Eur Neurol* 1998; 39: 80-9.
- [205]. Michel V., Bakovic M. The solute carrier 44A1 is a mitochondrial protein and mediates choline transport. *FASEB J.* 2009;23:2749-2758.
- [206]. Bui, T., Sequeira, J., Wen, T.C., Sola, A., Higashi, Y., Kondoh, H., et al. (2009). ZEB1 Links p63 and p73 in a Novel Neuronal Survival Pathway Rapidly Induced in Response to Cortical Ischemia. *PLoS ONE.* 2009; 4:e4373.
- [207]. Gazou A1, Riess A, Grasshoff U, Schäferhoff K, Bonin M, Jauch A, Riess O, Tzschach A. Xq22.3-q23 deletion including ACSL4 in a

patient with intellectual disability. *Am J Med Genet A*. 2013 Apr; 161A:860-4. Novak MJ, Sweeney MG, Li A, Treacy C, Chandrashekar HS, Giunti P, Goold RG, Davis MB, Houlden H, Tabrizi SJ. An ITPR1 Gene Deletion Causes Spinocerebellar Ataxia 15/16: A Genetic, Clinical and Radiological Description. *Mov Disord*. 2010;25:2176-82.

[208]. Geaghan, M., Cairns, M.J. MicroRNA and Posttranscriptional Dysregulation in Psychiatry. *Biol. Psychiatry*. 2014;78:231-239.