

# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DEL MOLISE



**DIPARTIMENTO DI SCIENZE PER LA SALUTE**

*Tesi di dottorato in Scienze per la Salute*

**XXIV CICLO**

**SETTORE DISCIPLINARE BIO/09**

**“RELAZIONE FRA ATTIVITA’ FISICA, MODIFICHE  
DELL’UMORE ED INVECCHAMENTO: ASPETTI  
GENETICI E PREVENTIVI”**

Relatore:  
Chiar.mo Prof.  
Davide VIGGIANO

Coordinatore del dottorato:  
Chiar.mo Prof.  
Guido Maria GRASSO

Candidato:  
Dott. Pasquale MIGNOGNA

Anno accademico 2010/2011

*“Non nascere, ecco la cosa  
migliore, e se si nasce, tornare  
presto là da dove si è giunti.  
Quando passa la giovinezza con le  
sue lievi follie, quale pena mai  
manca? Invidie, lotte, battaglie,  
contese, sangue, e infine, spregiata  
e odiosa a tutti, la vecchiaia.”*

(Sofocle, Edipo a Colono, vv. 1224-1237)

## Sommario

Introduzione generale.....	4
Modifiche anatomiche e fisiologiche connesse con l'invecchiamento .....	5
Sistema cardiovascolare .....	7
Sistema respiratorio.....	9
Sistema nervoso.....	11
Modifiche dell'attività fisica e dell'umore durante l'invecchiamento.....	18
Determinanti genetici dei livelli di attività fisica: studio metanalitico in modelli animali.....	21
Manipolazioni genetiche: animali knock-out .....	21
Uso di animali transgenici per lo studio del comportamento .....	25
Materiali e metodi.....	27
Risultati.....	35
Discussione .....	37
Distribuzione dei livelli di attività fisica, dell'umore e dello stato mentale in una popolazione anziana .....	42
Scopo dello studio .....	43
Materiali e metodi.....	44
Partecipanti.....	44
Randomizzazione .....	54
Monitoraggio durante lo studio .....	56
Trattamento dei dati personali.....	56
Calcolo della potenza statistica.....	57
Analisi dei dati.....	57
Risultati.....	59
Discussione .....	63
Bibliografia .....	65

## Introduzione generale

La popolazione anziana è in aumento in quanto le persone vivono più a lungo grazie a importanti progressi nella scienza medica e a miglioramenti del tenore di vita.

Infatti, nei paesi occidentali le persone over 65 di età rappresentano approssimativamente il 15% della popolazione. Inoltre le persone anziane<sup>1</sup> hanno un più alto tasso di morbidità e mortalità paragonato alle persone più giovani. Questo rischio è relativo a normali processi fisiologici che si hanno con l'invecchiamento e ad un'aumentata prevalenza di patologie sistemiche coesistenti (Dodds C., Murray D., 2001).

Solo qualche decade fa, quando l'aspettativa di vita era più bassa ed i disordini neurodegenerativi si manifestavano raramente come percentuale della popolazione che raggiungeva un'età comunemente associata ad un danno del sistema nervoso centrale, la perdita progressiva dell'indipendenza personale e quindi la conseguente ed eventuale disabilità si manifestava in modo molto minore rispetto ad oggi. Perciò, sottolineare i meccanismi che sottendono le alterazioni età-relative, sia per quanto riguarda l'aspetto anatomico che quello fisiologico, è diventato un punto cruciale per l'identificazione di nuovi approcci terapeutici e per lo sviluppo di nuove strategie multimodali di cura di cui ha bisogno la popolazione che invecchia di continuo.

Nonostante la grande quantità di studi relativi all'invecchiamento, i determinanti genetici che condizionano il tempo e la gravità di comparsa di tutte le modifiche fisiologiche ed anatomiche connesse all'invecchiamento rimangono elusivi. In particolare, non è chiaro se e come determinanti genetici condizionino le modifiche dei livelli di attività fisica e dei livelli di ansia con l'invecchiamento.

Il presente lavoro sperimentale si divide in due parti: in una prima parte affronta il problema dei determinanti genetici del livello di attività fisica e dell'ansia mediante uno studio metanalitico basato sulla tecnologia dei topi geneticamente manipolati; la seconda parte è invece uno studio sperimentale caso-controllo che

---

<sup>1</sup> Definiamo "anziano" un soggetto della età compresa fra i 75 e 84 anni, giovane un soggetto di età compresa fra i 18 e 24 anni mentre un adulto di mezza età tra i 45 e i 64 anni.

verifica la relazione fra attività fisica, depressione ed età in una popolazione anziana.

Nel seguito forniremo prima alcuni richiami relativi alle modifiche anatomiche e fisiologiche con l'età. Richiameremo quindi le evidenze che mostrano una variabilità qualitativa e quantitativa nei cambiamenti di attività fisica e dell'umore fra i vari soggetti anziani, suggerendo un substrato di tipo genetico. Introdurremo infine gli studi su tali determinanti genetici in modelli animali ed infine gli studi sull'uomo.

### **Modifiche anatomiche e fisiologiche connesse con l'invecchiamento**

L'invecchiamento è un processo graduale durante il quale i processi molecolari e cellulari si deteriorano progressivamente, spesso portando ad alcune condizioni patologiche quali possono essere i disordini vascolari e metabolici e il declino cognitivo.

Esistono ottime rivisitazioni relative all'argomento alle quali si rimanda il lettore. Nel seguito riportiamo solo alcuni elementi essenziali per il lettore.

L'accumulo di danni molecolari e cellulari che si hanno durante il corso della vita conduce ad un ampio range di condizioni patologiche età relative come i disordini vascolari, la sarcopenia, l'osteoporosi, disfunzioni al fegato e declino cognitivo. La perdita di proteine e di tessuto osseo e il concomitante aumento della massa grassa sono alcuni effetti che si hanno con l'invecchiamento: questo porta ad un aumento dell'incidenza di patologie infiammatorie, dislipidemia, aterosclerosi, obesità, diabete insulino-resistenza e diabete mellito di tipo 2. Alcuni di questi effetti dovuti all'invecchiamento sono dei fattori di rischio per altre patologie cardiovascolari che si hanno in tarda età. Inoltre, alcuni di questi fattori come la dislipidemia sono associati ad un'aumentata incidenza di patologie neurodegenerative caratterizzate da un deterioramento dei neuroni e delle cellule gliali del sistema nervoso centrale che, frequentemente, portano ad un declino cognitivo e alla demenza senile. Sorprendentemente, due studi condotti su un campione di 1624 anziani Latini (Yaffe et al., 2007) e 2632 anziani di origine africana e caucasica (Yaffe et al., 2004) hanno riportato che la sindrome

metabolica<sup>2</sup> potrebbe essere un fattore predittivo di declino cognitivo in un follow-up di 3-5 anni rispettivamente. Questi dati ci suggeriscono che i fattori associati ad uno stile di vita che riduce l'insorgenza di malattie metaboliche e cardiovascolari potrebbero anche diminuire il rischio di sviluppare un declino cognitivo o addirittura la malattia di Alzheimer. Nel momento in cui una persona invecchia, la sua anatomia e fisiologia subiscono dei cambiamenti che appaiono sempre più evidenti con il trascorrere dell'età cronologica. L'invecchiamento è un processo caratterizzato da una degenerazione di organi, sistemi e tessuti con conseguente perdita delle funzioni di questi sistemi. La perdita di queste funzioni compromette la capacità dell'individuo di affrontare le sfide fisiologiche della vita (Dodds C., Murray D., 2001). Le persone con la stessa età cronologica possono differire significativamente in base al declino delle loro funzioni cognitive; ci sono persone che, anche se anziane, hanno mantenuto una capacità funzionale più alta rispetto alla media e quindi queste sono definite "fisiologicamente giovani" rispetto a quelle definite "fisiologicamente vecchie" il cui declino funzionale è più alto.

Il processo dell'invecchiamento è controllato da fattori genetici ed ambientali, essendo fortemente influenzato dalla dieta, l'esercizio fisico, l'esposizione a microrganismi, a sostanze inquinanti e radiazioni. Questo spiega il perché due persone della stessa età possono differire marcatamente in termini di sembianza fisica e fisiologia. Inoltre ancora, anche il genere maschio/donna gioca un ruolo importante: nei paesi più sviluppati le donne tipicamente sopravvivono rispetto agli uomini di 7-10 anni (T. Perls & R. Fretts, 1998).

---

<sup>2</sup> Secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), la sindrome metabolica è definita come un insieme di fattori di rischio che aumentano l'incidenza di malattie cardiovascolari. Questi fattori sono: la presenza di diabete mellito, alterata glicemia a digiuno, ridotta tolleranza al glucosio o insulino-resistenza in associazione a due dei seguenti fattori: dislipidemia (*trigliceridi 150 mg/dL e/o HDL < 35 mg/dL nei maschi e < 39 mg/dL nelle femmine*), elevata pressione arteriosa con livelli 140/90 mmHg e/o in terapia antipertensiva, Obesità (*BMI > 30 kg/m<sup>2</sup> e/o WHR > 0,90 nei maschi, e > 0,85 nelle femmine*), Microalbuminuria 20 µg/min o rapporto albumina/creatinina 30 mg/g (World Health Organization, 1999). Da notare che la definizione può essere leggermente diversa a seconda della classificazione (vedi ad es. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR) (Ferrannini 1997), Third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP), 2002).

### **Sistema cardiovascolare**

Il sistema cardiovascolare è il maggiore sistema di trasporto del nostro corpo con la funzione principale di rimuovere l'anidride carbonica per veicarla ai polmoni e prodotti di scarto come l'urea e l'acido urico per la loro eliminazione con i reni. Inoltre il sangue trasporta ossigeno, i nutrienti ed i segnali chimici quali gli ormoni, agli organi e tessuti. In aggiunta a ciò, esso ha un ruolo importante di termoregolazione, distribuzione e dissipazione del calore attraverso il nostro corpo.

Alla nostra nascita le nostre arterie sono elastiche e flessibili. Con l'età, la funzione del cuore è influenzata principalmente da una diminuzione nell'elasticità e nella capacità di rispondere ai cambiamenti pressori (compliance) del sistema arterioso. Il risultante aumento nella resistenza all'azione di pompa del cuore aumenta il lavoro necessario per guidare il sangue ai vari organi del corpo. Con l'invecchiamento le arterie perdono la loro elasticità diventando così più rigide. Inoltre, la tunica media di cui sono composti gli strati di muscolatura liscia va incontro ad un graduale ispessimento. Questo è associato ad un aumento nel numero e densità delle fibre collagene, rendendo l'arteria sempre più rigida e meno efficiente (Alberto et al., 2003). Infine, i vasi sanguigni mostrano delle fratture della componente elastica (elastina) e spesso anche delle calcificazioni di diverso grado.

Per quanto riguarda l'endotelio, lo strato più interno dei vasi sanguigni composto da un singolo strato di cellule epiteliali piatte, con l'invecchiamento inizia a cambiare la forma delle proprie cellule mostrandosi ispessito a causa della migrazione delle cellule muscolari lisce della parete soprastante (tonaca media). Questo ispessimento non solo contribuisce ad una riduzione dell'elasticità dell'arteria e della sua efficienza ma riduce anche il lume della stessa, incrementando ulteriormente la resistenza del flusso sanguigno. Per superare questa resistenza, i ventricoli devono pompare con maggiore forza. Essendo il cuore costituito da miociti, questi reagisce similmente agli altri muscoli: diventa ipertrofico. Tipicamente, in termini di dimensione il ventricolo sinistro aumenta di circa il 30% tra i 20 e gli 80 anni con un conseguente aumento del peso del miocardio (Gudipati and Labovitz, 1990). Quindi con l'invecchiamento si ha una

diminuzione numerica dei miociti mentre quelli che restano sono spesso ipertrofici mostrando degli aumentati livelli di fibre collagene (Alberto et al., 2003).

L'ispessimento delle pareti delle arterie causa del processo aterosclerotico è relativamente facile da misurare nelle arterie del collo (a livello carotideo) grazie al metodo Doppler, che comporta un'immagine sonar o ecografica dell'arteria. La presenza di alcuni ispessimenti potrebbe essere essa stessa un segnale di patologia preclinica e potrebbe anche predire un disordine cardiovascolare futuro. Il conseguente irrigidimento delle arterie porta ad un aumento della pressione e, nelle persone anziane, ad un aumento della pressione sistolica, ad una diminuzione della pressione diastolica e, data la differenza tra le due pressioni, la pressione a livello del polso aumenta. Questo ultimo effetto è un fattore di rischio indipendente per lo sviluppo di patologie cardiovascolari.

L'aumento dello sforzo da parte cuore conduce ad un aumento della massa cardiaca (ipertrofia cardiaca) e alla formazione di tessuto cicatriziale nel tessuto cardiaco, quindi compromettendo la funzione cardiaca. Se questo effetto cicatriziale colpisce il nodo del seno da cui parte l'impulso per la contrazione cardiaca o altri minuscoli nodi (nodo atrioventricolare) essenziale per la propagazione dell'impulso elettrico ai ventricoli, si possono verificare disturbi nel battito cardiaco e nel ritmo cardiaco che possono essere anche fatali.

Studi sul nodo senoatriale, origine degli impulsi per la contrazione del cuore, hanno rivelato una perdita di cellule dello stesso del 50-75% dopo i 50 anni. Mentre le cellule del nodo atrioventricolare restano relativamente costanti come numero, quelle del fascio atrioventricolare o fascio di His vanno incontro a fibrosi e apoptosi. Questi cambiamenti causano una ridotta efficienza del cuore, contribuiscono ad una riduzione della massima frequenza cardiaca e aumentano i casi di aritmie osservate con l'invecchiamento (Alberto et al., 2003).

Uno dei più importanti cambiamenti che si ha con l'invecchiamento è la riduzione della massima frequenza cardiaca raggiungibile durante l'esercizio fisico calcolata con la formula di Karvonen ( $FC_{max} = 220 - \text{età}$ ). Si pensa che questa riduzione sia dovuta a cambiamenti nel sistema di conduzione del cuore.



### **Sistema respiratorio**

Il sistema respiratorio adempie a numerose funzioni. Oltre al suo ruolo importante nello scambio gassoso a livello alveolare, esso regola anche il pH sanguigno, controlla la pressione sanguigna e gioca un ruolo importante in alcune risposte immunitarie non-specifiche (Montague et al., 2005). Sfortunatamente, l'efficienza del sistema respiratorio progressivamente diminuisce con l'avanzare dell'età.

Nei primi anni di vita la parete toracica è morbida ed elastica. Con l'invecchiamento, c'è un graduale aumento nelle calcificazioni delle costole, particolarmente in quelle costali anteriori e, in misura minore, nel punto in cui le costole si articolano con la colonna vertebrale. Questi cambiamenti conducono ad un progressivo aumento nella rigidità delle pareti della gabbia toracica (Janssens, 1999). Diversi studi hanno anche rivelato una graduale riduzione associata all'età della forza dei muscoli respiratori, che si pensa essere primariamente dovuta alla perdita di massa muscolare in termini di unità motorie nel diaframma e nei muscoli intercostali. Come risultato di questi cambiamenti, il processo della respirazione diventa più laborioso.

L'epitelio ciliato è un importante parte delle difese immunitarie non-specifiche. Questo produce il muco che ricopre la superficie interna dell'albero bronchiale e cattura tutte le particelle nocive inalate come ad esempio i batteri e la polvere. All'arrivo del muco a livello faringeo, questo viene ingoiato e viene sterilizzato dall'ambiente acido dello stomaco. Diversi studi hanno dimostrato che la produzione di muco da parte dell'epitelio ciliato diminuisce con l'invecchiamento. Inoltre c'è anche una riduzione del numero delle ciglia (Levitzky, 1984). Questi cambiamenti riducono la "clearance" di agenti patogeni nei polmoni aumentando la probabilità di infezione.

Nelle persone giovani, le vie aeree sono estremamente sensibili alle stimolazioni meccaniche. Inalando delle sostanze estranee di solito si evoca un riflesso, la tosse, per espellere tale sostanza. Tuttavia, questi recettori sensoriali che monitorano le vie aeree sembrano diventare meno sensibili con l'invecchiamento quindi questo riflesso in risposta ad agenti esterni non si ha nelle persone anziane. Questo aumenta la probabilità di irritazioni ed infezioni delle vie respiratorie.

La parte delle vie aeree tra il naso e i bronchioli viene chiamata zona di conduzione. Il volume di questa zona forma uno spazio comunemente chiamato spazio morto anatomico in cui non si hanno scambi gassosi. Con l'invecchiamento, gli anelli cartilaginei che costituiscono le vie aeree superiori vanno incontro a calcificazione. Questo aumenta il diametro delle vie aeree, particolarmente della trachea e poi dei bronchi, causando un progressivo aumento del volume di questo spazio morto anatomico (Janssens, 1999).

Anche i polmoni vanno incontro a delle modificazioni con l'età. Le fibre di elastina e di collagene che li formano restano relativamente costanti ma perdono la loro elasticità causando una dilatazione dei polmoni. Con l'avanzare dell'età si ha un progressivo aumento del diametro dei bronchioli e dei dotti alveolari dovuto alla perdita di elasticità delle fibre che li compongono. Questo aumento porta gli alveoli ad appiattirsi e ridurre la loro superficie. Gli anziani tipicamente perdono intorno al 20% di questa superficie: questo si traduce in una maggiore possibilità di incorrere in un enfisema definito senile sebbene gli alveoli comunque continuano a svolgere la loro funzione (Verbeken et al., 1992).

Per quanto concerne la pressione all'interno delle arterie polmonari, questa aumenta con l'età, anche in assenza di patologie. Questo è dovuto ad una perdita di elasticità delle arterie ed associato ad una ipertrofia ventricolare.

Dal punto di vista fisiologico, i polmoni subiscono delle modificazioni con il trascorrere degli anni. Alcuni parametri fisiologici come ad esempio il volume residuo e la capacità vitale tendono a peggiorare. Gli unici due parametri che tendenzialmente restano quasi invariati sono la capacità polmonare totale ed il volume corrente. Nel caso del volume residuo che normalmente in un soggetto di 25 anni è di 1,2 lt, in un soggetto anziano diventerà 1,8 lt a causa della scarsa elasticità dei polmoni. Anche la capacità vitale che in media nei soggetti giovani maschi e femmine è di circa 5 lt e 3,5 lt rispettivamente, diventerà di circa 3,9 lt e 2,8 lt rispettivamente dopo i 65 anni.

Uno dei parametri che non tende a cambiare molto con l'età è la capacità polmonare totale rappresentata dal volume totale di aria che entra nei polmoni in seguito ad una inspirazione completa (in media 6 lt nei maschi e 4,2 lt nelle femmine). La spiegazione ipotizzata è che la riduzione dell'elasticità dei polmoni

e controbilanciata dall'aumento della rigidità della gabbia toracica. L'altro parametro, il volume corrente calcolato essere intorno a 500 ml, non subisce delle modificazioni con l'età tranne dal punto di vista della spesa energetica per effettuare un atto respiratorio. A causa dell'aumento della rigidità delle pareti della gabbia toracica e la riduzione dell'elasticità dei polmoni, la spesa energetica per atto respiratorio aumenta del 20% rispetto ad un soggetto di 20 anni (Janssens, 1999).

### **Sistema nervoso**

L'età è un fattore di rischio per la maggior parte delle patologie neurodegenerative, dall'Alzheimer al Parkinson fino alle malattie cerebrovascolari. Altri fattori di rischio come le mutazioni genetiche e i danni cerebrali contribuiscono molto meno al rischio di incorrere in queste patologie. Ci sono pochi studi sulla biologia molecolare dell'invecchiamento cerebrale in assenza di patologie neurodegenerative. Tuttavia, molti ricercatori suggeriscono che il processo dell'invecchiamento è associato con diversi cambiamenti strutturali, chimici e funzionali del cervello in aggiunta ad una moltitudine di cambiamenti neurocognitivi.

Con l'invecchiamento, ci sono diversi cambiamenti che colpiscono il sistema nervoso dal punto di vista fisico, chimico e biologico. Studi di Tomografia Computerizzata (TC) hanno riscontrato che i ventricoli cerebrali si espandono in funzione dell'età, dando vita al fenomeno della ventricolomegalia<sup>3</sup>. Altri recenti studi di risonanza magnetica hanno riportato delle diminuzioni di alcune regioni in termini di volume cerebrale con l'invecchiamento. La riduzione del volume di alcune regioni non è uniforme; alcune regioni cerebrali diminuiscono di volume con un rapporto superiore all'1% per anno, mentre altre restano relativamente stabili fino alla morte (Craik F., Salthouse T., 2000).

Un meccanismo proposto per i deficit di plasticità neuronale<sup>4</sup> osservati con l'invecchiamento è il risultato di alterazioni indotte dall'età nella regolazione del calcio (Barnes C. & Burke S., 2006). I cambiamenti nella capacità di gestione del

---

<sup>3</sup> La ventricolomegalia è una condizione cerebrale dovuta ad una dilatazione dei ventricoli laterali.

<sup>4</sup> La plasticità neuronale è la capacità del sistema nervoso di cambiare strutturalmente e funzionalmente in risposta a degli input provenienti dall'ambiente esterno.

calcio influenzano la trasmissione neuronale e la capacità del potenziale d'azione di propagarsi, che a sua volta va ad influire la capacità del cervello di alterare le sue strutture e funzioni. A causa della complessità del sistema nervoso, è logico pensare che ci sono delle aree più vulnerabili all'invecchiamento rispetto ad altre. Due di queste aree sono rappresentate dall'ippocampo e di circuiti neocorticali. Si pensa che il declino cognitivo relativo all'invecchiamento è dovuto in parte non alla morte dei neuroni ma a delle alterazioni sinaptiche. Questa ipotesi è supportata da studi su animali che hanno suggerito che questo deficit cognitivo è dovuto a cambiamenti funzionali e biochimici come l'attività enzimatica, i messaggeri chimici o l'espressione genica nei circuiti corticali (Hof P. & Morrison J., 2004).

Grazie alle immagini di Risonanza Magnetica (MRI), è stato notato che c'è una diminuzione nel volume di sostanza grigia passando dalla fanciullezza alla vecchiaia, mentre il volume della sostanza bianca è stato trovato aumentare dai 19 ai 40 anni per poi diminuire (Henkenius et al., 2003). È stato anche osservato che i primi 60 anni di vita sono correlati con il più rapido decremento nella densità della materia grigia.

C'è una prova convincente da parte di neuroscienziati cognitivi che i deficit cognitivi indotti dall'invecchiamento non sono dovuti alla perdita di neuroni o alla morte cellulare ma dovuti al cambiamento morfologico di neuroni di piccole regioni specifiche (Barnes C. & Burke S., 2006). Studi condotti da Duan et al. hanno mostrato che le arborizzazioni e le spine dendritiche di neuroni piramidali diminuiscono sia in numero che forma in specifiche regioni della corteccia come risultato dell'invecchiamento (Duan et al., 2003). È interessante notare che una diminuzione del 46% nel numero e nella densità delle spine dendritiche è stata riportata negli umani più vecchi di 50 anni paragonati ad individui più giovani (Hof P. & Morrison J., 2004).

Il declino cognitivo è stato attribuito anche allo stress ossidativo, a reazioni infiammatorie e cambiamenti nella micro-vascularizzazione cerebrale (Appleton C. et al., 2004). Lo stress ossidativo<sup>5</sup> è il fattore di rischio maggiormente controllabile ed è quello più compreso. Paragonato ad altri tessuti del nostro

---

<sup>5</sup> Lo stress ossidativo è il danno provocato alle cellule dal rilascio di radicali liberi da parte del processo di ossidazione.

corpo, quello cerebrale è considerato quello maggiormente sensibile al danno ossidativo (Butterfield A. et al., 2005). Un aumentato danno ossidativo è stato associato a patologie neurodegenerative, declino cognitivo lieve e altre differenze individuali nell'ambito cognitivo in soggetti anziani. In un invecchiamento normale, il sistema nervoso è sottoposto a stress ossidativo in molteplici modi. I principali contribuenti a tale processo sono l'ossidazione delle proteine, la perossidazione lipidica<sup>6</sup> e le modificazioni ossidative nel nucleo e nel DNA mitocondriale.

Oltre ai cambiamenti strutturali a cui può andare incontro il sistema nervoso con l'invecchiamento, si possono avere anche dei cambiamenti biochimici. Nello specifico, i neuroni comunicano l'uno con l'altro attraverso dei messaggeri chimici altamente specializzati chiamati neurotrasmettitori. Diversi studi hanno identificato diversi neurotrasmettitori che, in aggiunta ai loro recettori, mostrano una marcata alterazione in differenti regioni cerebrali come parte integrante di un processo di invecchiamento che colpisce l'intero corpo umano. Un primo esempio ci è dato dalla dopamina che, secondo diversi studi di Tomografia ad Emissione di Positroni in soggetti vivi, diminuisce in termini di sintesi dopaminergica (Hof P. R. & Mobbs C. V., 2009). Significative diminuzioni relative all'età nei recettori della dopamina D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub> e D<sub>3</sub> sono stati anche riportati (Kaasinen V. et al., 2000; Wang Y. Et al., 1998; Iyo M. et al., 1993; Juha O. Rinne et al., 1989; Wong D. F. et al., 1984).

Diminuiti livelli di differenti recettori e trasportatori della serotonina, 5-HTT, sono stati mostrati accadere con l'invecchiamento. Studi condotti usando il metodo PET negli umani hanno mostrato che i livelli del recettore S<sub>2</sub> nel nucleo caudato, putamen e corteccia cerebrale frontale diminuisce con l'età (Wong D. F. et al., 1984).

Il glutammato è un altro neurotrasmettitore che mostra un trend di diminuzione con l'invecchiamento (Chang L. et al., 2009; Saliasuta N. et al., 2008; Kaiser L. G. et al., 2005). Alcuni studi hanno dimostrato che i soggetti anziani hanno una

---

<sup>6</sup> La perossidazione lipidica è un processo dovuto ai "radicali liberi contenenti O<sub>2</sub> molecolare; in virtù di tale processo i lipidi contenenti acidi grassi insaturi e i loro esteri vengono direttamente ossidati dall'ossigeno molecolare.

concentrazione di glutammato più bassa nella corteccia motoria paragonata a soggetti più giovani (Kaiser L. G. et al., 2005).

### **Invecchiamento cognitivo**

Le differenze relative all'età nei volumi cerebrali e l'integrità della sostanza bianca sono associati ad una performance cognitiva. Tuttavia, alcune review della letteratura rilevano che la grandezza delle associazioni osservate è modesta (Raz, 2000, Gunning-Dixon and Raz, 2000). Quando sono state trovate associazioni tra struttura ed aspetti cognitivi, non sempre è stato possibile replicarle e sembrano sensibili alla composizione del campione e alla scelta delle misurazioni cognitive. Ad oggi, prove di collegamenti tra piccoli volumi di ippocampo e performance di memoria risultano essere piuttosto deboli (Van Petten, 2004) e contraddittorie rispetto ai più chiari risultati di campioni patologici (Raz, 2000).

Le associazioni struttura-funzione sono state osservate in altre aree di invecchiamento cerebrale. Una migliore performance sui compiti esecutivi (per esempio il Wisconsin Card Sorting Test) è stata associata ad una più grande corteccia prefrontale (Raz et al. 1998, Gunning-Dixon and Raz, 2003). Più grandi volumi ippocampali e alti livelli di marcatori metabolici neuronali sono stati osservati in giovani adulti che mostravano migliori performance di memoria spaziale rispetto alla controparte più vecchia (Driscoll et al. 2003). In altri studi, la memorizzazione di una lista di parole è stata associata ad un'aumentata produzione di lattato nella sostanza grigia prefrontale in giovani soggetti ma non negli adulti più vecchi.

Le differenze di età nell'acquisizione di abilità motorio-percettive e la velocità e precisione della performance possono essere mediate da differenze nel volume delle strutture striatali (caudato e putamen) in aggiunta alla corteccia prefrontale e il cervelletto (Kennedy and Raz, 2005, Raz et al. 2000, Woodruff-Pak et al. 2001). In particolare, la relazione tra la struttura cerebrale e la performance può cambiare il processo di acquisizione dell'abilità. Ad esempio in uno stage avanzato di allenamento di coordinazione e apprendimento motorio (Pursuit Rotor Task), solo il volume del cervelletto ma non del putamen resta un significativo predittore della performance (Raz et al. 2000). Questo studio mostra quanto fragile possa essere la relazione tra funzione cognitiva e struttura di supporto. Le associazioni

tra volume di regioni cerebrali e performance possono o no sembrare dipendenti a seconda di quale aspetto e quale stage di abilità motoria viene misurato.

È possibile che la relazione tra le strutture è influenzata dall'invecchiamento ed i declini relativi all'età emergono da una ridotta connessione che influenza i sinergismi fronto-striatali e fronto-cerebellari. I cambiamenti nella connessione cortico-subcorticale possono influenzare l'uso di risorse che sono necessarie al mantenimento della performance cognitiva e alla memoria di lavoro (o memoria a breve termine). Il ruolo di questa memoria nel mediare le differenze relative all'età nell'aspetto cognitivo è poco chiaro. La memoria di lavoro può influenzare la performance cognitiva e motoria direttamente o tramite le differenze relative all'età nelle strutture cerebrali da cui essa dipende. Il problema è che anche nello stesso campione, l'effetto indiretto della memoria di lavoro sulla performance può essere mediato dalle differenze relative all'età in diverse regioni cerebrali come la corteccia prefrontale (Head et al. 2002) o nel cervelletto (Raz et al. 2000). Ci sono, tuttavia, report di correlazioni negative tra il volume corticale nelle stesse regioni prefrontali e la performance su compiti di memoria a breve termine (Salat et al. 2002, Van Petten et al. 2004). Così, in adulti sani a livello neurologico, la connessione tra volumi regionali misurati e performance cognitive resta poco chiara, e una sostanziale proporzione delle differenze individuali può essere dovuta a fattori che vanno oltre l'invecchiamento, come le patologie vascolari. Per esempio, in uno studio recente, i declini nella memoria di lavoro nel tempo e i loro collegamenti alla diminuzione di regioni cerebrali sono stati osservati in soggetti con vari fattori di rischio vascolare ma non in soggetti sani. Così, anche in una popolazione relativamente sana, il rischio vascolare può giocare un ruolo significativo nella spiegazione del collegamento tra performance cognitiva e cambiamenti delle regioni cerebrali (Raz et al. 2004).

Riassumendo, la grandezza e la direzione dell'associazione tra volume regionali e funzioni cognitive nel normale invecchiamento non può essere valutata con precisione. Maggiori indagini sono necessarie per chiarire questo aspetto.

### **Fattori che influiscono sull'invecchiamento cerebrale**

Considerando che l'invecchiamento è associato al passare del tempo, non dovrebbe essere confuso con esso. Diversi fattori influenzano lo sviluppo

cerebrale e l'invecchiamento alterando le caratteristiche dell'individuo e dell'intera specie. Alcuni di questi fattori modificanti agiscono come acceleratori del declino relativo all'invecchiamento, mentre altri possono rallentare il deterioramento relativo all'età e ritardare il raggiungimento di livelli patologici. Identificando alcuni fattori e misurando il loro contributo per l'insorgere dell'invecchiamento cerebrale è cruciale capire quali sono le basi neuronali dell'invecchiamento cerebrale.

#### *Ipertensione e altri fattori di rischio*

L'ipertensione essenziale è una condizione cronica relativa all'età associata a diversi cambiamenti nel sistema vascolare (Marin and Rodriguez-Martinez, 1999). L'aumento cronico della pressione sanguigna aumenta gli effetti dell'invecchiamento sulle strutture cerebrali (De Leeuw et al. 2001, Raz et al. 2003a–c, Carmelli et al. 1999, Goldstein et al. 2002, Salerno et al. 1992, Schmidt et al. 1996, Strassburger et al. 1997, den Heijer et al. 2005) e persone con una ipertensione controllata medicalmente hanno un rischio minore per declino cognitivo rispetto a quelli che sono non diagnosticati o non trattati (Dufouil et al., 2001; Fukuda and Kitani, 1995; Tzourio et al., 1999).

Persone con ipertensione e altri fattori di rischio vascolari mostrano dei declini in regioni che di solito sono stabili in un invecchiamento normale, come la corteccia primaria visiva.

In aggiunta e in unione all'ipertensione, i marcatori metabolici di rischio cardiovascolare possono essere associati a delle differenze strutturali cerebrali di solito attribuite all'invecchiamento. Uno dei marcatori è l'omocisteina (Hcy), un amminoacido che è sintetizzato con la partecipazione della vitamina del gruppo "B" come cofattore. Nelle persone sane, l'aumento dell'omocisteina è associato ad atrofia dell'ippocampo (den Heijer et al. 2003, Williams et al. 2002), ridotto volume della sostanza grigia (Whalley et al. 2003) e ventricolomegalia (Sachdev et al., 2002). Aumentati livelli di omocisteina nel plasma predicono declini cognitivi (soprattutto quelli più lenti) in soggetti anziani non dementi, e sono collegati a peggiori performance in diversi test neuropsicologici (Teunissen et al. 2003) in particolar modo in quelli che misurano la rievocazione e il controllo esecutivo (Dufouil et al. 2003). Così, è possibile che l'omocisteina contribuisce ai



cambiamenti cerebrali che sono frequentemente identificati con il normale invecchiamento. Tuttavia, studi ancora in corso non spiegano bene gli effetti di elevati concentrazioni di omocisteina a livello cerebrale lasciando aperta ancora la questione dell'interazione omocisteina ed invecchiamento.

#### *Attività fisica*

Negl'ultimi anni, c'è stata una crescente evidenza che l'attività fisica rappresenti un intervento valido per la sanità pubblica per migliorare e mantenere la qualità della vita durante l'invecchiamento (Rejeski & Mihalko, 2001). Mentre diversi fattori come le funzioni fisiche e l'indipendenza costituiscono le caratteristiche principali della qualità della vita durante l'invecchiamento, il benessere psicologico è di particolare importanza per una buona qualità della vita in quanto si riflette nel desiderio di mantenere una propria indipendenza e un'interazione attiva con l'ambiente esterno (Spiriduso, Francis & MacRae, 2004).

È stato ben documentato che l'invecchiamento è associato ad una diminuzione delle performance cognitive a vari livelli come la memoria, l'attenzione e il tempo di reazione (Salthouse, 1998, Schaie, 2000). Dopo i 40 anni si ha un graduale deterioramento delle funzioni cerebrali. È chiaro tuttavia, che la variabilità di queste perdite funzionali aumentano con l'età (Morse, 1993). Alcuni individui mantengono alti livelli di funzioni mentali con l'invecchiamento mentre altri subiscono un veloce declino mentale.

Questa variabilità inter-individuale del livello funzionale nell'invecchiamento è spesso spiegata sulla base di fattori estrinseci al processo di invecchiamento (Kramer & Willis, 2002). Uno di questi fattori è l'attività fisica. Diversi ricercatori hanno esaminato gli effetti comportamentali diretti ed indiretti dell'attività fisica sulla performance cognitiva. Nell'esaminare gli effetti diretti dell'attività fisica, molti ricercatori sono stati primariamente rivolti all'influenza dell'attività fisica sul flusso sanguigno a livello cerebrale, alla disponibilità dei neurotrasmettitori e all'efficienza neuronale. Questi ricercatori hanno incluso soprattutto studi animali (Gordon, Spector, Sjoerdsma, & Udenfriend, 1966; Isaacs, Anderson, Alcantara, Black, & Greenough, 1992), ma recentemente grazie alle nuove tecnologie come la Risonanza Magnetica Funzionale è stato possibile studiare anche immagini relative all'essere umano (Churchill et al., 2002;

Colcombe et al., 2003). I risultati indicano che l'attività aerobica ha un impatto positivo sulle funzioni cerebrali attraverso una varietà di meccanismi cellulari e molecolari, e che il ruolo del fitness cardiovascolare come protettore delle funzioni cognitive e dell'integrità del sistema nervoso centrale nelle persone anziane sembra avere una solida base biologica.

Le influenze indirette dell'attività fisica sull'aspetto cognitivo sono state esaminate in termini di influenza sulla capacità cognitiva testata tramite test comportamentali. L'idea è che l'attività fisica causa diversi cambiamenti nel sistema nervoso centrale i quali sono stati dimostrati nei diversi test comportamentali.

Le ultime scoperte in merito alla relazione invecchiamento – attività fisica ci suggeriscono che le influenze patologiche dei fattori di rischio cardiovascolare sull'invecchiamento cerebrale possono essere alleviate e anche prevenute. Un numero sempre crescente di studi dimostrano che il fitness aerobico influenza positivamente una grande varietà di variabili collegate ad un invecchiamento cerebrale sano (Cotman and Berchtold, 2002). Fino a poco tempo fa, gli studi sull'invecchiamento cerebrale e l'esercizio erano basati sulle misurazioni indirette delle strutture e funzioni cerebrali come l'attività globale elettrica (EEG) e le performance cognitive su compiti con risaputa sensibilità alle lesioni cerebrali (Churchill et al. 2002). Tuttavia, la direzione generale di queste scoperte supporta la teoria che le funzioni esecutive e l'inferenza delle strutture cerebrali che le supportano, sono in particolar modo sensibili agli effetti benefici del fitness aerobico (Colcombe and Kramer. 2003, Colcombe et al. 2003, Lesniak and Dubbert. 2001).

### **Modifiche dell'attività fisica e dell'umore durante l'invecchiamento**

Oltre alle già citate modifiche delle caratteristiche fisiche che l'invecchiamento arreca all'individuo, ci sono anche altre modifiche cognitive: il difetto di memoria, la lentezza nell'apprendimento con relativo rallentamento delle performance cognitive, la perdita degli interessi, l'instabilità emotiva e tante altre. Tutti questi aspetti sono tra loro connessi ma si possono manifestare con delle sfaccettature differenti. Infatti ci possiamo trovare di fronte ad anziani che non hanno nessun problema a livello cognitivo ma comunque psicologicamente a terra

oppure ad anziani che non ricordano nemmeno il loro nome ma psicologicamente brillanti e pieni di vita.

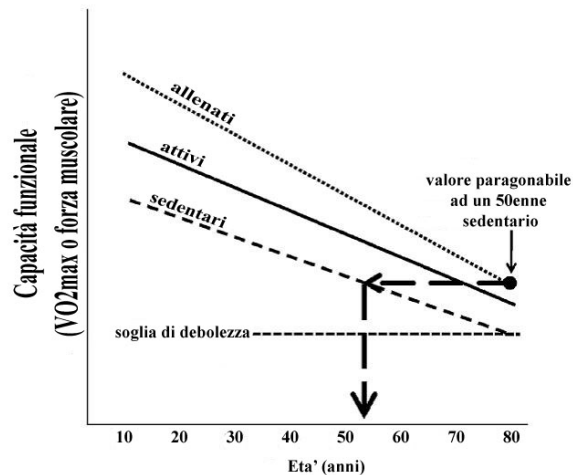
Mentre il declino cognitivo è dovuto ad una involuzione di tutte le strutture del nostro Sistema Nervoso Centrale e alla conseguente perdita dei neuroni e delle loro sinapsi, l'ambito psicologico è collegato alla sfera emotiva di una persona, alla sua personalità, al suo background, al suo umore. Con l'invecchiamento si accentuano alcuni aspetti della personalità mentre altri si moderano.

Nonostante i fattori cerebrali dell'invecchiamento quali la perdita di cellule nervose e relative sinapsi si ripercuotono negativamente sull'assetto cognitivo di un individuo, anche i fattori psicologici quali l'abbassamento del tono dell'umore e la scarsità delle relazioni interpersonali sono strettamente correlati con il deficit cognitivo.

L'invecchiamento è associato al declino della capacità di eseguire dei lavori fisici. I declini sia nella capacità di resistenza aerobica<sup>7</sup> e sia nella forza muscolare (dovuto alla perdita della massa muscolare) portano ad una diminuzione delle qualità aerobiche e ad una debolezza muscolare rispettivamente, con l'avanzare dell'età. Gulve et al. (1993) dimostrarono che l'attività fisica volontaria nell'arco della vita dei ratti diminuisce di circa i 2/3 con l'avanzare dell'età. Sorprendentemente, la mancanza dell'attività fisica accelera la perdita delle capacità aerobiche e di forza di 25-30 anni; pertanto, l'inattività fisica porta ad un precoce inizio di debolezza fisica. I meccanismi molecolari che sottolineano il declino nella capacità di compiere dei lavori fisici che si ha con l'età ancora non sono ancora ben compresi.

---

<sup>7</sup> La capacità di resistenza aerobica è definita come la resistenza alla fatica quando il consumo di ossigeno da parte dei mitocondri uguaglia la produzione di Adenosindifosfato (ADP) e di Adenosinmonofosfato (AMP); la resistenza aerobica declina con l'invecchiamento dovuto alla perdita della massima capacità aerobica.



**Figura 1.** L'attività fisica ritarda il declino delle funzioni fisiche (VO2 max o forza muscolare) con l'invecchiamento. Sorprendentemente, durante l'intera vita, gli anziani fisicamente attivi di 80 anni hanno dei valori di VO2max e forza muscolare paragonabili a soggetti sedentari di 50-55 anni. La figura è stata modificata da Fitzgerald et al. (1997), con il contributo di Pearson et al (2002), con il mantenimento dell'inclinazione generale. La soglia di debolezza è definita come un VO2max<18 mL/kg/min da Carr et al. (2006).

Tuttavia quello che non conosciamo sono i geni e i meccanismi in base a quali la mancanza di attività fisica accelera l'inizio della debolezza aerobica con l'invecchiamento.

L'invecchiamento è associato ad una diminuzione della massa scheletrica muscolare, iniziando nella terza decade d'età e accelerando dopo i 50 anni (Lexell et al. 1986). La diminuzione si spiega in gran parte da un più grande declino nella massa muscolare della parte inferiore del corpo rispetto a quella superiore (Janssen et al. 2000). L'allenamento di forza resistente per le persone anziane non rallenta il declino nella funzione muscolare con l'aumento dell'età, ma porta ad uno spostamento verso un nuovo ed alto livello assoluto di massa muscolare che ha un simile declino nei soggetti di controllo. Tuttavia, Pearson et al. (2002) dimostrarono che la potenza media generata da atleti di sollevamento peso di 80 anni allenati per la forza resistente era equivalente a quella di soggetti non allenati di 55 anni, indicando che l'allenamento di resistenza potrebbe ritardare l'inizio della debolezza fisica di circa 25 anni, diversamente dall'allenamento aerobico (Fig. 1). Anche qui non si conoscono i geni e i meccanismi in base ai quali la mancanza di un allenamento della forza accelera l'inizio della debolezza fisica con l'invecchiamento.

Quindi si ipotizza che i soggetti con più basse capacità motorie per attività aerobiche e di forza avevano una maggiore probabilità di avere un ben distinto

patrimonio genetico prima di raggiungere l'età riproduttiva, suggerendo così la possibilità di un fenotipo più attivo fisicamente prodotto da un processo di selezione naturale.

Inoltre, Bronikowsky et al. (2006) dimostrarono che gli effetti comportamentali dell'esercizio, quando selezionati per una capacità di elevato running wheel in età precoce, diminuisce durante l'intera vita, suggerendo una diminuzione nell'eterogeneità per i geni coinvolti nell'aumento delle capacità fisiche negli anni.

## **Determinanti genetici dei livelli di attività fisica: studio metanalitico in modelli animali**

Come sopra discusso, la grande eterogeneità dei livelli di attività fisica e dei livelli di umore nella popolazione anziana induce a riflettere sulla possibilità che esistano determinanti genetici, piuttosto che ambientali, dei livelli basali dell'attività fisica.

Gli studi di tali determinanti negli esseri umani sono particolarmente complessi, richiedono campioni molto grandi di soggetti ed i risultati sono spesso poco chiari. Pertanto, nel presente studio abbiamo intrapreso una via indiretta, sfruttando l'introduzione della tecnologia degli animali transgenici. Come più avanti discusso, tale studio ha lo scopo di chiarire quanti e quali geni possono intervenire nella modificazione dei livelli di attività fisica e di ansia.

Nel prosieguo daremo alcuni richiami sulla tecnologia dei transgenici, ed in particolare dei knock-out, sul loro uso per lo studio di malattie genetiche ed infine introdurremo i nostri dati.

### **Manipolazioni genetiche: animali knock-out**

Lo sviluppo della tecnica che permette la manipolazione dell'ovocita e dell'embrione è uno dei maggiori traguardi raggiunti nel campo della manipolazione genetica per modelli di malattia animale, per la scienza di base nella regolazione dei geni e per applicazioni commerciali (Fig. 2-3).

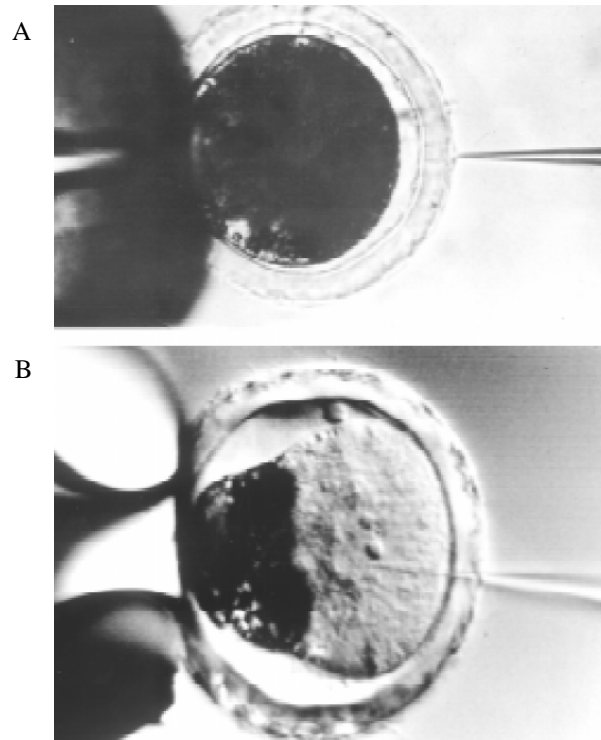


Figura 2. Microiniezione di DNA nel pronucleo di un maiale zigote. (A) Micrografia di un embrione di maiale che non consente la visualizzazione del pronucleo, un problema importante che non consente una iniezione accurata di DNA nel pronucleo, necessaria per una efficiente integrazione del DNA estraneo. (B) Usando la tecnologia sviluppata dal laboratorio del Dr. Brinster, la centrifugazione dello zigote definisce chiaramente le regioni del pronucleo e consente una diretta iniezione del DNA estraneo nel pronucleo senza compromettere la vitalità dell'embrione. (da "The use of transgenic animals in biotechnology mouse", Karl M. Ebert 1998, Int. J. Dev. Biol. 42: 1003-1008)

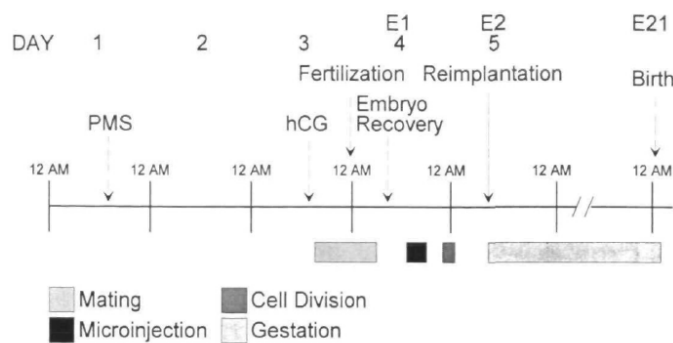


Figura 3. Eventi per la produzione di un animale transgenico. Questa figura mostra il corso degli eventi durante la produzione di un topo transgenico. L'iniezione del siero in gravidanza (PMS) è designato come day 1. La gonadotropina corionica umana (hCG) è iniettata al giorno 3, e gli accoppiamenti tra i topi donatori e i maschi dello stesso ceppo avvengono durante la notte. Al giorno 4, gli embrioni sono rimossi dai loro donatori, microiniettati e coltivati durante la notte fino a che essi non si dividono in due cellule.

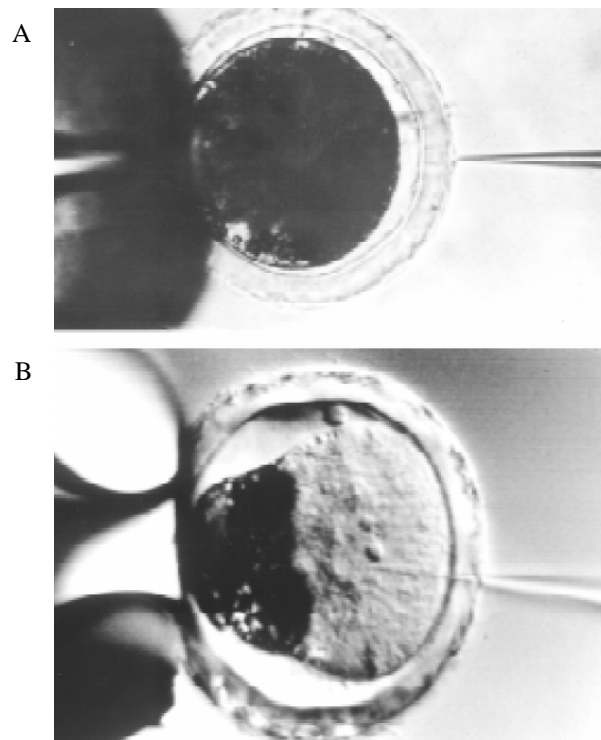
L'introduzione di molecole provenienti dall'esterno nel citoplasma dell'ovocita di alcuni mammiferi e in embrioni fertilizzati ci ha portato ad avere un enorme quantità di informazioni su cosa accade e quali funzioni si hanno durante lo sviluppo delle cellule germinali. La tecnologia che ha portato alla ricerca di animali transgenici è stata introdotta inizialmente solo in pochissimi laboratori. Il loro approccio è stato introdurre delle molecole estranee direttamente nella cellula germinale dei topi. In seguito a questi esperimenti, la micromanipolazione tramite l'iniezione di molecole di DNA nel nucleo di cellule fertilizzate ha portato alla produzione di animali transgenici. La micromanipolazione e le tecniche microchirurgiche hanno consentito l'alterazione della mappatura genetica di embrioni mammiferi: alcuni dei precedenti esperimenti hanno mostrato che si poteva iniettare nell'ovocita un numero di sostanze senza avere un effetto deleterio sullo sviluppo dello stesso (Papaioannou and Ebert, 1986).

I recenti sviluppi della biologia molecolare hanno permesso di modificare il genoma di animali da laboratorio. In particolare distinguiamo animali transgenici (in cui è stato inserito un gene esogeno), knock-out (in cui è stato eliminato un gene dell'animale), transgenici inducibili o condizionali (in cui la modifica genetica avviene solo dopo trattamento con uno specifico farmaco) e transgenici tessuto-specifici (in cui la modifica genetica avviene solo in alcuni tessuti).

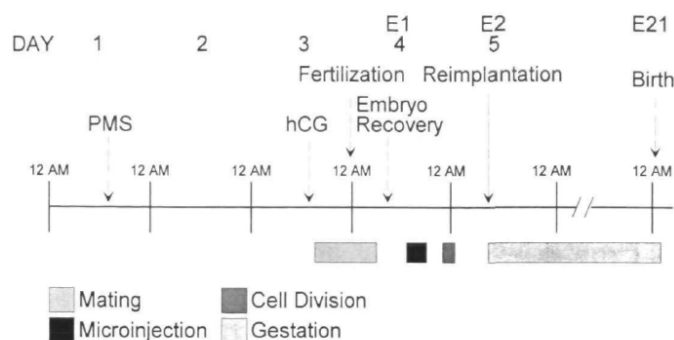
Lo sviluppo della tecnologia transgenica è stata possibile solo grazie ad una serie di importanti tappe:

- l'invenzione della tecnica di micromanipolazione con cui materiale genetico può essere direttamente iniettato in cellule
- la comprensione dei meccanismi con cui procede la trascrizione del DNA ed il ruolo del promotore in tale processo
- lo sviluppo di tecniche di biologia molecolare in grado di realizzare sequenze di DNA *ad libitum*
- l'invenzione del sistema CRE-LOX ricombinarsi per ottenere la ricombinazione del DNA negli ovociti

Tutto questo ha portato alla realizzazione del primo animale transgenico nel 1974 e del primo animale knock-out alla fine degli'anni ottanta. Di seguito diamo brevi note sul processo di realizzazione di un animale knockout.



**Figura 4. Microiniezione di DNA nel pronucleo di un maiale zigote. (A) Micrografia di un embrione di maiale che non consente la visualizzazione del pronucleo, un problema importante che non consente una iniezione accurata di DNA nel pronucleo, necessaria per una efficiente integrazione del DNA estraneo. (B) Usando la tecnologia sviluppata dal laboratorio del Dr. Brinster, la centrifugazione dello zigote definisce chiaramente le regioni del pronucleo e consente una diretta iniezione del DNA estraneo nel pronucleo senza compromettere la vitalità dell'embrione. (da "The use of transgenic animals in biotechnology mouse", Karl M. Ebert 1998, Int. J. Dev. Biol. 42: 1003-1008)**



**Figura 5. Eventi per la produzione di un animale transgenico. Questa figura mostra il corso degli eventi durante la produzione di un topo transgenico. L'iniezione del siero in gravidanza (PMS) è designato come day 1. La gonadotropina corionica umana (hCG) è iniettata al giorno 3, e gli accoppiamenti tra i topi donatori e i maschi dello stesso ceppo avvengono**



**durante la notte. Al giorno 4, gli embrioni sono rimossi dai loro donatori, microiniettati e coltivati durante la notte fino a che essi non si dividono in due cellule.**

### **Uso di animali transgenici per lo studio del comportamento**

La corrente tendenza della psichiatria biologica di focalizzarsi su substrati genetici della salute mentale e delle malattie ha guidato molti ricercatori a trovare le mutazioni geniche in differenti patologie mentali, sperando di predire il rischio di sviluppare una malattia mentale oppure trovare nuovi target farmacologici (Feder A. et al. 2009, Tretter F. et al. 2008) (vedi il lavoro di C. Lombroso nell'ultimo secolo per una maggiore prospettiva storica riguardo a questo approccio (Lombroso C. 1888 – Gould SJ. 1981)).

La recente tecnologia di topi transgenici ha consentito di applicare questo paradigma tramite lo studio degli effetti comportamentali di delezioni, inserzioni o mutazioni di singoli geni in topi. La principale conclusione emersa da una grande quantità di dati ora disponibili è che la relazione tra la tendenza comportamentale e la mutazione/delezione di un gene non è lineare né monotonica, quindi non segue un dato ordine, poiché gli effetti di molteplici cambiamenti genetici potrebbe essere completamente differente dalla somma degli effetti indotti da geni presi singolarmente, e quindi i risultati delle molteplici modificazioni genetiche spesso non si possono predire (Crabbe JC. et al. 1999 – Crusio WE. et al. 2008).

Effettivamente, il numero di topi transgenici prodotti finora è molto grande: una fonte in internet elenca almeno 5283 differenti animali transgenici includendo quelli con delezioni di geni (topi knock-out; vedi <http://www.informatics.jax.org/imsr/IMSRSearchForm.jsp>).

La maggior parte di questi animali è stata testata a livello comportamentale, ma non è ancora disponibile un database che descriva o confronti il pattern comportamentale di ogni topo transgenico (tuttavia, si veda Anagnostopoulos AV. et al. 2001 e il database di referenze che descrivono i singoli topi knock-out disponibile al sito <http://www.bioscience.org/knockout/knockout.htm>). Un simile database dovrebbe consentire di studiare la relazione tra geni e comportamento e l'identificazione di animali che mostrano uno specifico deficit comportamentale all'interno dell'intero set di modelli transgenici (approccio metanalitico; si vedano anche i progetti di Mouse Genome Informatics (MGI) (Hancock JM. et al. 2007) e

il sito web <http://www.informatics.jax.org/phenotypes.shtml>). Il paragone delle caratteristiche comportamentali degli animali transgenici riportato in diversi articoli scientifici dovrebbe considerare diversi problemi, come le differenze nelle procedure dei test comportamentali (si veda e.g. (Richter SH. et al. 2009)), l'età e il sesso degli animali (si veda e.g. (Curtis KS. et al. 2009 – Thoma MB. et al. 2009)), il campione, le condizioni di allevamento come il numero di animali per gabbia (si veda e.g. (Tretter F. et al. 2008)) e il background genetico. Tutti questi parametri possono influenzare i risultati e la riproducibilità dei dati tra i diversi laboratori (Crabbe JC. et al. 1999).

Un articolo precedente che classifica le attività comportamentali dei topi mutanti sulla base di numerosi articoli sui topi transgenici, concluse che il numero di geni collegabili all'aumento dell'attività locomotoria è molto alto. Specificamente, i dati riguardanti tutti i topi transgenici con aumentata o diminuita attività locomotoria furono recuperati e filtrati per limitare gli effetti della variabili confondenti. Inaspettatamente, i risultati identificarono un grande numero di geni coinvolti nell'iperattività dopo esposizione ad un nuovo ambiente, che è stato stimato essere almeno l'1,56% dei geni dell'intero genoma (Viggiano D. 2008). Non è chiaro il perché la mutazione di così tanti geni possa aumentare l'attività locomotoria. Inoltre, non era possibile raggruppare tutti questi geni in uno o pochi sistemi di neurotrasmettitori o pathways biochimici (Viggiano D. 2008). Perciò, un'ipotesi in corso suggeriva che tutti questi geni erano richiesti per un corretto sviluppo/funzionamento di una comune rete neuronale per diminuire un'iperattività che si aveva spontaneamente (Viggiano D. 2008). Il presente lavoro testa questa ipotesi tramite l'analisi dell'espressione a livello cerebrale di geni relativi a cambiamenti (aumento/diminuzione) nel comportamento locomotorio.

A questo scopo un database di topi knockout testati per l'attività locomotoria in un ambiente nuovo è stato realizzato da studi precedentemente pubblicati, filtrato sulla base di alcuni criteri di inclusione/esclusione. I topi knockout sono stati divisi in un gruppo di iperattivi, un gruppo di normoattivi e uno di ipoattivi sulla base del loro comportamento locomotorio. Infine, la distribuzione cerebrale basale

dei geni knockout in questi gruppi fu studiata usando due database disponibili in internet (Allen Brain Atlas e SymAtlas).

### **Materiali e metodi**

La lista completa dei geni descritti in questo articolo è riportata nella Tabella 1. Questa lista è stata estratta da un set iniziale di 15806 abstract contenenti le parole chiavi “locomozione”, “attività”, “topi”, recuperati da PubMed (<http://ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez/>). Questo set è stato allora filtrato per includere solo le pubblicazioni contenenti i topi knockout e il loro comportamento locomotorio. Queste pubblicazioni vennero organizzate in una tabella contenente: 1) il nome del gene delecto, 2) i vari parametri sul test comportamentale, come la durata del test, il numero di ripetizioni, le dimensioni e la forma dell'arena, le procedure comportamentali, l'attività orizzontale o verticale (alzate sulle zampe posteriori o rearings), il sistema di misurazione (fotocellule, videotracking, etc), 3) i dati sul campione, come la dimensione del campione, l'età e il sesso degli animali, il tipo di controllo dei topi, il background genetico e 4) le analisi statistiche (effect size espresso come % di cambiamento paragonato ai topi gemelli wild-type e il livello di significatività).

Infine, gli animali in questa prima tabella sono stati selezionati in accordo ai seguenti criteri di inclusione:

- 1) Età degli animali compresa tra 2 e 6 mesi;
- 2) Minimo 7 animali per gruppo sperimentale;
- 3) Gruppi sperimentali consistenti di soli maschi (no femmine);
- 4) Osservazioni comportamentali sull'attività locomotoria orizzontale (cambiamenti nella frequenza di sollevamenti sulle zampe posteriori non furono considerati);
- 5) Il gruppo di controllo consistente di topi gemelli wild-type;
- 6) I geni dovevano essere espressi nel cervello (questa informazione è stata recuperata dall'Allen Brain Atlas e SymAtlas, come descritto sotto).

Inoltre di seguito vengono riportati anche i criteri di esclusione:

- 1) I dati comportamentali non discriminavano i topi maschi dalle femmine essendo raggruppati insieme;

- 2) Gli animali non venivano studiati in un ambiente nuovo;
- 3) I cambiamenti comportamentali si avevano solo per intervalli molto piccoli (meno di 5 minuti) o solo dopo lunghi periodi di esposizione alla novità (più di 30 minuti) o ancora solo dopo ripetute esposizioni alla novità;
- 4) I topi erano in una età prepuberale o anziani;
- 5) Gruppi di controlli inappropriati (non venivano usati topi gemelli wild-type) oppure gruppi sperimentali poco numerosi, con meno di sette animali;
- 6) I geni non erano espressi nel cervello (questo criterio di esclusione fu usato per minimizzare la possibilità che le alterazioni nell'attività comportamentale fossero dovute a degli effetti sistemici della delezione genetica).

I lavori scientifici che soddisfacevano tutte questi criteri richieste furono allora usati per categorizzare l'attività locomotoria. Gli animali furono divisi in tre gruppi, in accordo con la loro attività locomotoria: 1) aumentata attività o 2) diminuita attività, se l'attività locomotoria cambiava con un effect size (aumento o diminuzione rispettivamente) più grande del 20%; e 3) animali normoattivi, che mostrano un effect size più piccolo del 20% paragonato al loro gruppo di controllo wild-type, che non era statisticamente significativo (perciò gli animali che mostravano nessuna differenza significativa rispetto al gruppo di controllo ma con un effect size più grande del 10% comunque furono inclusi). Gli animali nel gruppo normoattivo soddisfacevano i seguenti criteri aggiuntivi: 1) non dovevano essere possibili isoforme del gene silenziato che avrebbe potuto vicariare la sua funzione, e 2) il gene silenziato doveva essere comunque coinvolto in altre funzioni cerebrali poiché erano riportate altre anomalie neurologiche/comportamentali (ansia, deficit della memoria, etc).

Successivamente il pattern di espressione cerebrale del gene candidato è stato recuperato da due differenti database: l'Allen Brain Atlas (<http://mouse.brain-map.org>), un database che descrive il pattern di espressione cerebrale di mRNA dei geni murini basato sulla tecnica di ibridazione in situ e il SymAtlas

(disponibile tramite il portale BioGPS <http://biogps.gnf.org/>) che quantifica il pattern di espressione di mRNA basato su una tecnica di microarray.

Tabella 1.

Geni relativi al comportamento locomotorio.

Attività locomotoria aumentata di più del 20% quando il gene viene eliminato (gruppo 1)	Attività locomotoria diminuita di più del 20% quando il gene viene eliminato (gruppo 2)	Cambiamenti di attività locomotoria più piccoli del 10% (non significativi) quando il gene viene eliminato (gruppo di “controllo”)
ATP-binding cassette, subfamily A (ABC1), member 2 (Abca2) (Mack JT. et al. 2007)	Calcium channel, voltage-dependent, beta 4 subunit (Cacnb4) (Khan Z. et al. 2002)	Acetylcholine esterase (AChE) (Espallergues J. et al. 2010)
Adenylate cyclase activating polypeptide 1, PACAP (Adcyap1) (Tanaka K. 2006 – Fujii H. 2007)	Dopamine beta hydroxylase (Dbh) (Weinshenker D. et al. 2002 – Schank JR. et al. 2006)	Adrenergic receptor, alpha 2a (Adra2a) (Juhila J. et al. 2005)
Adaptor-related protein complex 3, delta 1 subunit (Ap3d1) (Miller CL. et al. 1999)	D site albumin promoter binding protein (Dbp) (Le Niculescu H. et al. 2008)	Calpstatin (Cast) (Nakajima R. et al. 2008)
Arylsulfatase A (Arsa or Asa) (D’Hooge R. et al. 2001)	Dopamine receptor 2 (Drd2) (Ymaguchi H. et al. 1996)	Cav1.3 (cacna1d) (Busquet P. et al. 2009)
ATPase, Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> transporting, alpha 3 polypeptide (Atp1a3) (Moseley AE. et al. 2007)	Dopamine Receptor 4(Drd4) (Rubinstein M. et al. 1997)	Cell adhesion molecule with homology to L1CAM (Chl1) (Morellini F. et al. 2007 – Pratte M. et al. 2009)
Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II alpha (Camk2a) (Chen C. et al. 1994)	Engrailed 1 (En1) (Sgado P. et al. 2006)	Muscarinic receptor M2 (Chrm2) (Bainbridge NK. et al. 2008)
Cholinergic receptor, muscarinic 1, CNS (Chrm1) (Miyakawa T. et al. 2001 – Gerber DJ. et al. 2001)	Engrailed 2 (En2) (Sgado P. et al. 2006)	Cholinergic receptor, nicotinic, beta 2 subunit (neuronal) (Chrn2) (Marubio LM. et al. 2003)
Cyclic nucleotide phosphodiesterase 1 (Cnp1) (Kaga Y. et al. 2006)	Gastrin (Gast) (Singh P. et al. 2004)	Claudin 14 (cldn 14)
Dopamine receptor D1A (Drd1a) (Xu M. et al. 1994 –	Glutamate receptor, metabotropic 8 (Grm8)	Aromatase (Cyp19a1) (Chavez C. et al. 2009)

Karasinska JM. et al. 2005)	(Duvoisin RM. et al. 2005)	
Fibroblast growth factor 1 and 2 (Fgf1 and Fgf2) (Fadda P. et al. 2007)	Orexin (Hcrt) (Mori T. et al. 2009)	Egr2 (Poirier R. et al. 2007)
Fibroblast growth factor receptor 1 (Fgfr1) (Shin DM. et al. 2004)	Hdc (Acevedo SF. Et al. 2006 – Dere E. et al. 2004)	Forkhead Box, Class O (Foxo3a) (Polter A. et al. 2009)
Fragile X mental retardation syndrome 1 homolog (Fmr1) (Ventura R. et al. 2004)	Htr1a (Zanettini C. et al. 2009)	Galanin (Gal)
Fragile X mental retardation gene 2, autosomal homolog (Fxr2h) (Bontekoe CJ. et al. 2002)	Potassium inwardly rectifying channel, subfamily J, member 11, Kir 6.2 (Kcnj11) (Deacon RM. et al. 2006)	Galanin receptor 2 (Galr2) (Lu X. et al. 2008)
Gamma-aminobutyric acid (GABA-B) receptor, 1 (Gabbr1) (Vacher CM. et al. 2006)	Yamaguchi sarcoma viral (v-yes-1) oncogene homolog (Lyn) (Umemori H. et al. 2003)	Connexin 36, gap junction membrane channel protein alpha 9 (Gja9) (Frisch C. et al. 2005)
Gamma-aminobutyric acid (GABA) B receptor 2 (Gabbr2) (Gassmann M. et al. 2004)	Methyl CpG binding protein 2 (MeCP2) (Shahbazian M. et al. 2002)	Glucagon-like peptide 1 receptor (Glp1r) (Abbas T. et al. 2009)
Gamma-aminobutyric acid (GABA-A) receptor, subunit alpha 3 (Gabra3) (Yee BK. et al. 2005)	Npy (Karl T. et al. 2008)	G-substrate (Gsbs) (Endo S. et al. 2009)
Growth associated protein 43 (Gap43) (Metz GA. et al. 2004)	Soluble adenylyl cyclase (sacy) (Iwamoto T. et al. 2008)	Nr cam (C130076O07Rik) (Moy SS. et al. 2009)
Connexin 43, gap junction membrane channel protein alpha 1 (Gja1) (Theis M. et al. 2003)	Solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, noradrenalin), member 2, NET (Slc6a2) (Mitchell HA. et al. 2006 – Dzedzicka-Wasylewska M. et al. 2006)	Neuropsin (Opn5) (Horii Y. et al. 2008)
Glast (Slc1a3) (Karlson RM. et al. 2008)	Serotonin Transporter, SERT (Slc6a4) (Sgado P. et al. 2006 – Holmes	P2rx7 (Basso AM. et al. 2009)

	A. et al. 2002 – Kalueff AV. et al. 2007)	
Glutamate Receptor, ionotropic, AMPA1 (alpha 1) (Gria1) (Cowen MS. et al. 2003)	Somatostatin receptor-2 (sstr2) (Viollet C. et al. 2000)	Cyclophilin D (Ppid) (Luvisetto S. et al. 2008)
Glutamate receptor, ionotropic, NMDA1 (zeta 1) (Grin1) (Dorval KM. et al. 2007 – Duncan GE. et al. 2006)	Tyrosine Hydroxylase (Th) (Viggiano D. et al. 2004 – Hnasko TS. et al. 2006)	Relaxin3 (Rln3) (Smith CM. et al. 2009)
Glycogen synthase kinase 3 beta (Gsk3b) (Prickaerts J. et al. 2006)	Tyroid Hormone Receptor alpha (Thra) (Wilcoxon JS. et al. 2007)	Solute carrier family 32 (GABA vesicular transporter), member 1 (Slc32a1) (Chiu CS. et al. 2005)
5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2C (Htr2c) (Nonogaki K. et al. 2003)	Ubiquitin protein ligase E3 component n-recognin 1 (Ubr1) (Balogh SA. et al. 2002)	Sv2a (Lamberty Y. et al. 2009)
Inositol (myo)-1(or 4)-monophosphatase 1 (Impa1) (Cryns K. et al. 2008)	Vitamin D receptor (Vdr) (Burne TH. et al. 2005)	
Kv3.1, potassium voltage-gated channel, Shaw-related subfamily, member 1, Potassium channel (Kcnc1) (Joho RH. Et al. 2006 – Espinosa F. et al. 2004)		
Kv3.3, potassium voltage-gated channel, Shaw-related subfamily, member 3 (Kcnc3) (Joho RH. Et al. 2006 – Espinosa F. et al. 2004)		
GIRK2, potassium inwardly rectifying channel, subfamily J (Kcnj6) (Blednov YA. et al. 2002)		
Potassium voltage-gated channel, subfamily Q, member 2 (Kcnq2) (Peters HC. et al. 2005)		
ERK1, mitogen activated protein kinase 3 (Mapk3) (Engel SR. et al. 2009)		
Melanin-concentrating hormone receptor 1 (Mchr1) (Smith DG. et al. 2005)		

Microtubule-associated protein 6 or Stable Tubule-only peptide (STOP) (Mtap6) (Fradley RL. et al. 2005 – Begou M. et al. 2007)		
NFkB-p50 subunit (Nfkb1) (Kassed CA. et al. 2004)		
Nur77, Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1 (Nr4a1) (Gilbert F. et al. 2006)		
Nurr1, nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2 (Nr4a2) (Jiang C. et al. 2005 – Backman C. et al. 2003)		
Heregulin (Nrg1) (Gerlai R. et al. 2000114)		
Protein-L-isoaspartate (D-aspartate) O-methyltransferase 1 (Pcmt1) (Vitali R. et al. 2004)		
p85alpha (Pik3r1)(Tohda C. et al. 2009)		
Prion protein (Prnp) (Valenti P. et al. 2001)		
Ryr3 (Katsuta K. et al. 2003)		
Slc2a8 (Schmidt S. et al. 2008)		
DAT1, solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, dopamine), member 3 (Slc6a3) (Gainetdinov R. et al. 1999 – Zhuang X. et al. 2001)		
Synaptosomal-associated protein 25 (Snap25) (Wilson MC. et al. 2000)		
Synapsin2 (Syn2) (Dyck BA. et al. 2009)		
Tropomodulin 2 (Tmod2) (Cox PR. Et al. 2003)		
Tenascin R, (Tnr) (Fukamauchi F. et al. 1997)		

Specificamente, l'Allen Brain Atlas è stato usato per recuperare due diversi quantificazioni di mRNA da 17 differenti regioni cerebrali: la densità di espressione e il livello di espressione (<http://mouse.brain-map.org/pdf/InformaticsDataProcessing.pdf>) (Ng L. et al. 2009).



Il livello di espressione (L) è il prodotto dell'intensità media dei pixel (I) per l'area totale delle cellule positive ( $a_g$ ), normalizzata dall'area di tutte le cellule:

$$L = I * (a_g/a_{max})$$

La densità di espressione (D) è il numero di cellule positive ( $n_g$ ) normalizzato dal numero totale di cellule ( $n_{max}$ ) nella stessa regione:

$$D = n_g/n_{max}$$

Le espressioni L e D erano già quantificate dal database dell'Allen Brain Atlas per le seguenti regioni cerebrali: cervelletto (CB), corteccia cerebrale (CTX), la regione ippocampale (HIP), la formazione ippocampale (HPF=HIP + subiculum<sup>8</sup>), l'ipotalamo (HY), il settimo complesso laterale (LSX), il mesencefalo (MB), la medulla (MY), le aree olfattoria (OLF=bulbo olfattorio, nuclei olfattori anteriori e la corteccia piriforme), il ponte (P), il pallido (PAL), la regione retroippocampale (RHP), lo striato (STR), il talamo (TH), i nuclei dell'amigdala simili allo striato (AMY=nuclei dell'amigdala centrali + anteriori + mediali). Studi futuri indirizzeranno possibili suddivisioni di queste aree (in particolare della regione corticale) per ottenere dei risultati più definiti a livello spaziale.

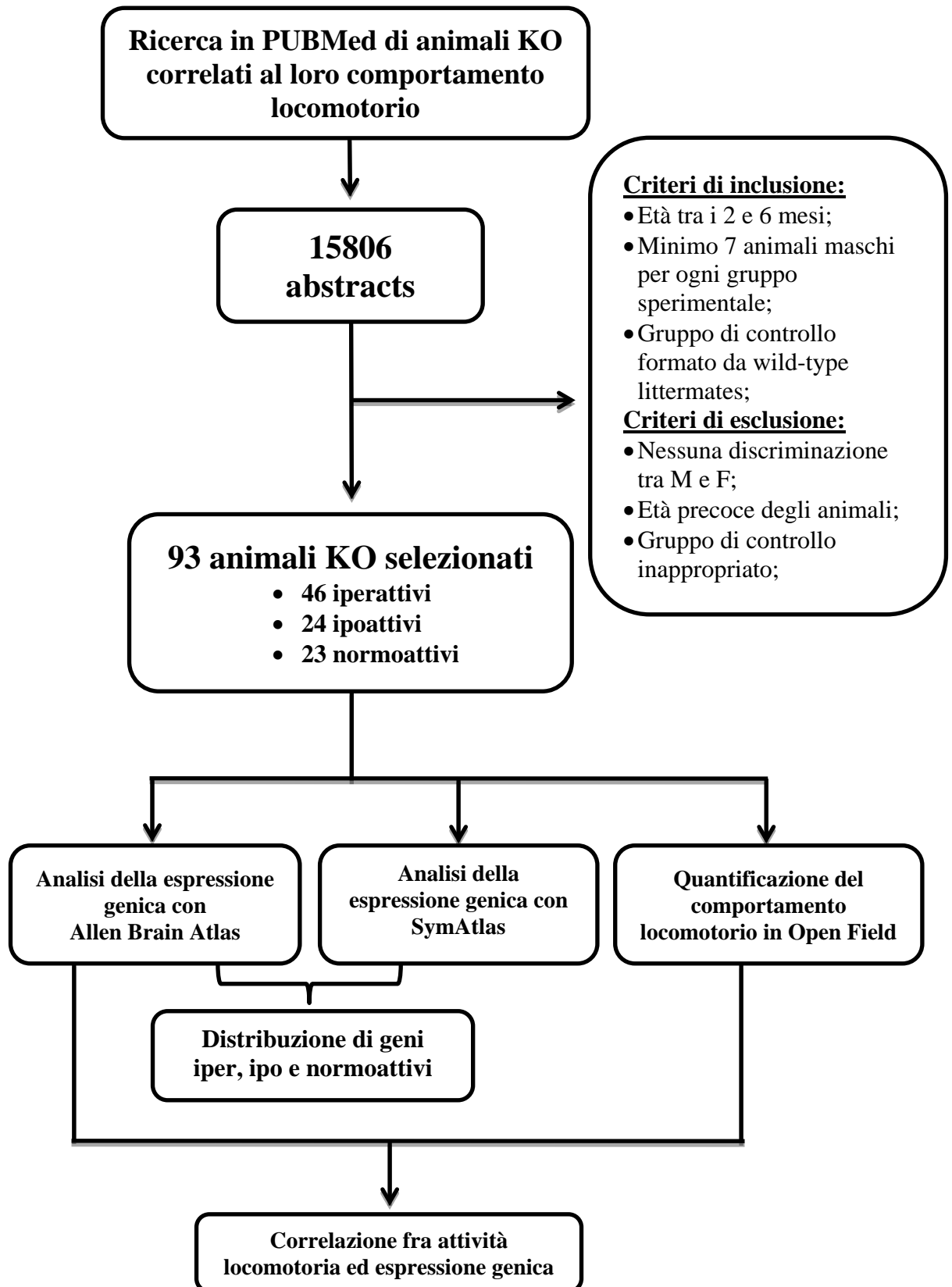
Il database SymAtlas è stato usato per recuperare il valore di espressione di mRNA dalle seguenti regioni cerebrali: CB, CTX, HIP, HY, substantia nigra (SN), OLF, STR, AMY, corteccia frontale (FC), epitelio olfattorio mediale (MOB), il nucleo preottico (PO) e il midollo spinale (SC). Il database usato (Mouse GNF1M Gene Atlas) riportava l'espressione di mRNA da diverse indagini normalizzate con il Robust Multy-array Analysis (algoritmo del gcmrna) (15, 16).

I dati furono sottoposti ad un'analisi della varianza a due vie per regione separatamente per i due database. In seguito furono fatti i confronti usando l'LSD test per paragoni ripetuti. Il livello di significatività venne settata a  $p < 0.05$ .

---

<sup>8</sup> Il subiculum è la componente inferiore della formazione ippocampale.

## Flow chart



## **Risultati**

Usando i criteri di inclusione/esclusione descritti sopra sono stati selezionati 93 topi knockout: 46 topi knockout con comportamento locomotorio aumentato, 24 topi knockout con comportamento locomotorio diminuito e 23 topi knockout con altre forme di menomazioni neurologiche ma con un comportamento locomotorio normale (tabella 1). Cinque topi knockout aggiuntivi furono esclusi dall'analisi perché i dati presenti in letteratura inerenti al loro comportamento erano contrastanti (*cnr1*, *cckbr* e *bdnf*) o furono identificati come “outlier” sulla base del livello di espressione (*Pde10A*) oppure il loro coinvolgimento in altre anomalie comportamentali era mediato probabilmente da alterazioni sistemiche metaboliche (*pah*).

In accordo con precedenti ricerche, i geni relativi al comportamento iperattivo o ipoattivo non poterono essere raggruppati in separate classi di neurotrasmettitori. Allo stesso modo, i geni del gruppo di controllo “normoattivo” appartenevano a neurotrasmettitori/neuropeptidi (*galanina*) o proteine strutturali (*Gja9*, *Nr CAM* e *L1CAM*), o differenti sistemi di neurotrasmettitori (*epinefrina*, *acetilcolina* e *GABA*) e di conseguenza non potevano essere raggruppati in un solo sistema cellulare o di neurotrasmettitori.

Perciò, la conoscenza delle funzioni di uno specifico gene a livello cellulare o neuronale non ci dà abbastanza informazioni per predire se la sua delezione potrà cambiare il comportamento locomotorio. In opposizione a ciò, un migliore predittore dell'effetto della delezione di un gene sul comportamento locomotorio potrebbe essere il livello di espressione dello stesso gene nel cervello (espressione di mRNA). Per testare questa ipotesi i livelli di espressione dello specifico gene furono analizzati in differenti regioni cerebrali per avere degli indicatori prevedibili sul comportamento locomotorio dopo la delezione di un gene, usando due differenti database.

Nella seguente descrizione il termine “geni del gruppo 1” è riferito al gruppo di geni che, dopo delezione, sono accompagnati da iperattività, “geni del gruppo 2” è riferito al gruppo di geni che, dopo delezione, sono accompagnati da ipoattività e

“gruppo di controllo” è riferito al gruppo di geni che, dopo delezione, non è accompagnato da cambiamenti nell’attività locomotoria.

Dato che il background genetico non è lo stesso per tutti gli animali KO selezionati, abbiamo testato se era presente un bias nel background tra i gruppi. La maggior parte degli animali KO proveniva dalla linea C57BL/6 o Sv129 o da un mix di C57BL/6 e Sv129. Pochi animali nel nostro set furono studiati nei loro background genetici come la linea bulb/c (n=4), FVB (n=2) o DBA (n=2). Perciò, per testare l’omogeneità dei gruppi abbiamo focalizzato la nostra attenzione solo su tre background maggiori (C57BL/6-Sv129 e un mix di C57BL/6 e Sv129). Questi background furono rappresentati in modo analogo in gruppi divisi in accordo all’attività comportamentale. Infatti, un test non parametrico del  $\chi^2$  della distribuzione della frequenza osservata dei tre background nei tre gruppi comportamentali non fu statisticamente significativa.

L’analisi del pattern di espressione a livello cerebrale di questi geni è mostrata in Fig. 4. I geni del gruppo 1 mostravano un più alto livello di espressione e un più alto livello di densità in tutte le regioni paragonato ai geni del gruppo 2 (Fig. 4-5). I pattern di espressione del gruppo 1 e del gruppo 2 furono paragonati al gruppo di controllo. Questa analisi mostra che, quando paragonati al gruppo di controllo, i geni del gruppo 1 mostrano una più alta e significativa espressione (sia livello che densità di espressione) in tutte le regioni cerebrali in accordo all’Allen Brain Atlas ( $p < 0,001$  in tutte le regioni). Tuttavia, usando i livelli di espressione dal database SymAtlas, solo nelle seguenti regioni si aveva la significatività: 1) la corteccia cerebrale (CTX;  $p < 0,041$ , il test LSD per confronti ripetuti), 2) l’ippocampo (HIP,  $p < 0,035$ , il test LSD per confronti ripetuti) e 3) l’amigdala (AMY,  $p < 0,030$ , il test LSD per confronti ripetuti).

I geni del gruppo 2 non mostrano significanti cambiamenti rispetto al gruppo di controllo in tutte le regioni in accordo all’Allen Brain Atlas e il SymAtlas.

Un’analisi più accurata fu allora condotta per verificare la relazione tra il livello di espressione di ogni gene nell’ippocampo e il cambiamento dell’attività locomotoria risultante dalla loro delezione. A questo scopo, piuttosto che classificare gli animali knockout in tre gruppi (aumentato, diminuito e normale attività locomotoria), l’attività locomotoria di ogni topo knockout confrontata al

suo gemello (espresso come valore percentuale rispetto al basale) fu recuperata dai dati presenti in letteratura. I livelli di attività locomotoria furono allora confrontati con il livello di espressione nell'ippocampo di ogni gene in accordo con l'Allen Brain Atlas e il SymAtlas. C'è una significativa correlazione tra la densità di espressione dei differenti geni nell'ippocampo e il livello di attività locomotoria dopo la delezione dello stesso gene ( $r=0,542$  in accordo con Allen Brain Atlas e  $r=0,502$  in accordo con il SymAtlas). Così, più alta l'espressione di un gene nell'ippocampo, più alto sarà il comportamento locomotorio osservato quando c'è la delezione dello stesso gene.

### **Discussione**

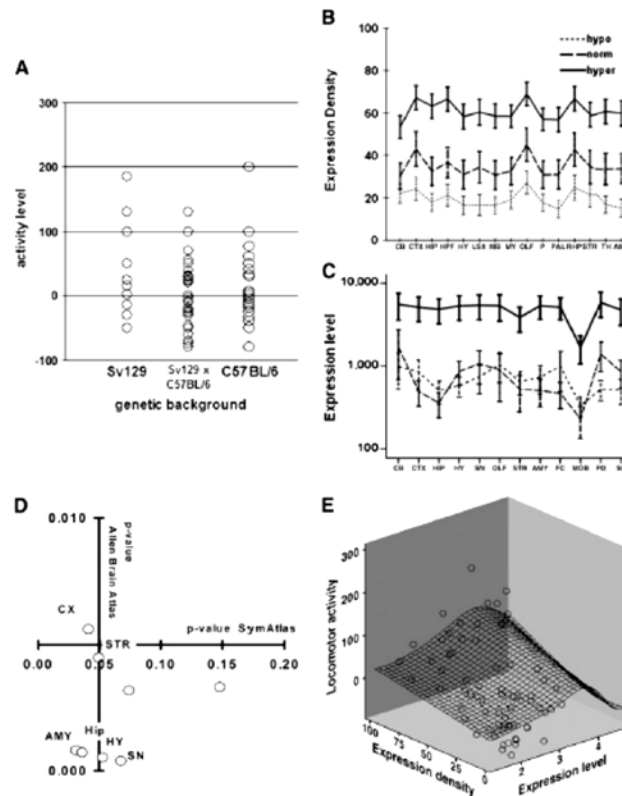
Questa sezione della tesi descrive il pattern di espressione cerebrale dei geni che sono accompagnati da cambiamenti locomotori quando si ha la delezione del gene e li paragona al pattern di espressione dei geni espressi a livello cerebrale ma la cui delezione non cambia l'attività locomotoria in un nuovo ambiente (Fig. 5).

La scoperta principale è che i geni accompagnati, dopo la loro delezione, da un'attività locomotoria aumentata (geni del gruppo 1) sono maggiormente espressi in tutte le regioni cerebrali paragonati ai geni accompagnati da un'attività locomotoria diminuita (geni del gruppo 2).

Per sottolineare se questo effetto era dovuto ad un più basso livello di espressione dei geni del gruppo 2 oppure ad un più alto livello di espressione dei geni del gruppo 1, entrambi i gruppi sono stati paragonati ad un gruppo "di controllo" formato dai geni espressi a livello cerebrale, la cui delezione non altera il comportamento locomotorio. L'analisi comparativa dei due database mostrava che i geni del gruppo 1 erano altamente espressi in poche regioni cerebrali come la corteccia cerebrale, l'ippocampo e l'amigdala, paragonata ai geni del gruppo di controllo.

Diversi aspetti dovrebbero essere considerati nell'interpretazione dei risultati. Un aspetto importante è l'influenza delle condizioni sperimentali nelle scoperte comportamentali. Come sottolineato prima da precedenti articoli (si veda e.g. (Crabbe JC. et al. 1999)), le condizioni di laboratorio non cambiano maggiormente l'effect size di una specifica mutazione genica, ma anche la possibilità di vedere i cambiamenti comportamentali.

Invece, la maggior parte degli elementi che possono disturbare l'analisi di correlazione è probabilmente dovuta alle differenze tra i laboratori (per esempio le condizioni di luce potrebbero essere molto importanti per un comportamento locomotorio indotto dalla novità). Tuttavia, le conclusioni generali – cioè più alta è l'espressione a livello cerebrale di un gene (e specificamente l'espressione a livello della corteccia e dell'ippocampo) più alta sarà la probabilità che la sua delezione sarà accompagnata da un comportamento locomotorio iperattivo - sembra essere abbastanza robusta. Specificamente, la conclusione principale resta inalterata anche dopo l'inclusione di nuovi animali knockout nel database o dopo l'esclusione di alcuni di loro dovuta alle inconsistenze in nuove pubblicazioni o anche usando due indipendenti database di geni.



**Figura 6. Distribuzione cerebrale e livello di espressione di geni la cui delezione è accompagnata da cambiamenti nell'attività locomotoria.**

Distribuzione di background genetico in accordo al cambiamento dell'attività locomotoria come percentuale degli animali del gruppo di controllo (0 = nessun cambiamento comportamentale, +100/-100 = 100% dell'aumento o diminuzione dell'attività locomotoria paragonata ai wilde-type littermates; ogni punto rappresenta una differente linea di knockout).

Densità di espressione genica secondo l'Allen Brain Atlas.

**Livello di espressione genica secondo il SymAtlas. Le figure B e C mostrano i geni la cui delezione è accompagnata da un comportamento iperattivo (hyper) o ipoattivo (hypo) o nessun cambiamento dell'attività locomotoria (normal) in differenti regioni cerebrali. Ogni punto rappresenta l'espressione media dei geni che, dopo delezione, sono accompagnati da iperattività/ipoattività o nessun cambiamento locomotorio (vedi Tabella 1 per la lista dei geni). Questi dati si riferiscono a dati medi con l'aggiunta dell'errore standard.**

**Significatività statistica dell'aumento nel livello di espressione secondo il SymAtlas (asse orizzontale) e l'Allen Brain Atlas (asse verticale) di geni iperattivi paragonati ai geni di controllo in varie regioni cerebrali (ogni punto rappresenta una regione cerebrale).**

**Correlazione monotonica non-lineare tra l'attività locomotoria (0 = comportamento normale) di animali knockout e densità di espressione nella corteccia cerebrale di geni knock-out (ogni punto rappresenta un differente gene).**

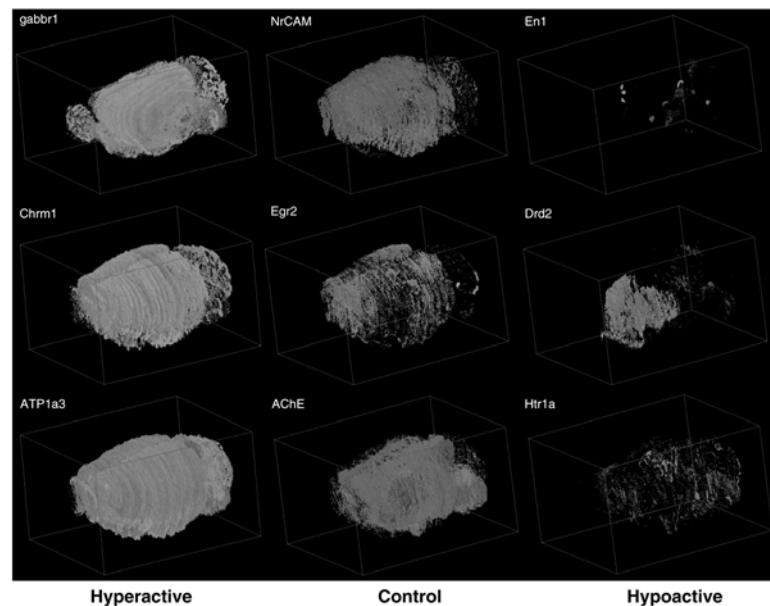
**CB: cervelletto; CTX: corteccia cerebrale; HIP: ippocampo; HPF: formazione ippocampale; HY: ipotalamo; LSX: settimo complesso laterale; MB: mesencefalo; MY: medulla; OLF: regione olfattoria; P: ponte; PLA: pallido; RHP: regione retroippocampale; STR: striato (dorsale/ventrale); TH: talamo; AMY: nuclei dell'amigdala simili allo striato; SN: substantia nigra; MOB: epitelio olfattorio mediale; PO: preottico; FC: corteccia frontale; SC: midollo spinale.**

Un altro aspetto da considerare è relativo allo studio di animali ipoattivi. Il massimo effect size negli animali ipoattivi è circa la metà del massimo effect size negli animali iperattivi. Questo era atteso in quanto l'ipoattività può rapidamente raggiungere il minimo consistente nella completa immobilità dell'animale (floor effect). Questo potrebbe limitare la possibilità di indagare l'ipoattività, in particolare se i topi gemelli mostrano già bassi livelli di attività locomotoria. Perciò, è possibile ipotizzare che i background genetici con una più alta attività locomotoria in basale (come C57BL/6) potrebbe essere utile indagare il comportamento ipoattivo (e viceversa come suggerito da referee anonimi, il background Sv129 o FVB che mostrano più bassa attività in un ambiente nuovo, potrebbero essere utile indagare un comportamento iperattivo dovuto alla delezione del gene). Noi non osserviamo un particolare bias del background genetico usato in letteratura per osservare un comportamento ipoattivo e iperattivo. Tuttavia, il più piccolo numero di animali ipoattivi potrebbero riflettere una reale difficoltà ad indagare questo tipo di comportamento (Fig. 4).

Un altro aspetto è la considerazione che la maggior parte dei geni selezionati sono anche espressi in regioni che sono fuori la corteccia cerebrale e quindi gli effetti comportamentali dovuti alla loro delezione potrebbero essere indiretti, come cambiamenti metabolici. Quando saranno disponibili più topi knockout, questi aspetti saranno ulteriormente indagati. Tuttavia, i risultati concernenti il pattern di

espressione cerebrale dei geni del gruppo 1 sono consistenti con i dati provenienti da studi sulle lesioni. Infatti, le lesioni della corteccia cerebrale e dell'ippocampo hanno mostrato un aumento dell'attività locomotoria (review (Viggiano D. et al. 2008)). Perciò è plausibile che la delezione dei geni altamente espressi in queste regioni potrebbe anche risultare in un aumento dell'attività locomotoria.

A tal proposito, la delezione di geni altamente espressi nella corteccia cerebrale può portare a un aumento nell'attività locomotoria, indipendentemente dalla sua funzione cellulare/neuronale. Si dovrebbe notare che, se la mancanza di un gene specifico è accompagnata da iperattività, la normale "funzione" dello stesso gene dovrebbe diminuire l'attività locomotoria. Per esempio l'iperattività emerge quando due geni altamente espressi nella corteccia come *girk2* (Blednov YA. et al. 2002) o serotonin receptor 2C (Nonogaki K. et al. 2003) sono deleti, e perciò si dovrebbe aspettare una diminuita attività locomotoria nei topi normali quando normalmente espressi.



**Figura 7.** Distribuzione cerebrale dei geni più rappresentativi la cui delezione è accompagnata da un aumento (colonna di sinistra), una diminuzione (colonna di destra) dell'attività locomotoria in un ambiente nuovo oppure nessun cambiamento (colonna centrale). I dati sono stati presi dall'Allen Brain Atlas, ricostruiti usando il software Brain Explorer.

Quindi, un'ipotesi in corso è che i geni altamente espressi nella corteccia, e in particolare nella corteccia cerebrale, hanno una più larga possibilità di essere



necessari per lo sviluppo di una rete neuronale che normalmente riduce l'attività locomotoria (Viggiano D. et al. 2008).

Si dovrebbe avere che le lesioni focali di differenti porzioni in questa rete neuronale o dovute a interventi farmacologici (si veda (Viggiano D. et al. 2008) per una review) o dovute alla delezione/mutazione di geni altamente espressi nella stessa regione cerebrale potrebbe alterare le proprietà computazionali di queste strutture, un prerequisito per lo sviluppo di iperattività indotto dalla novità. Questo tipo specifico di iperattività dipende dal riconoscimento di precedenti situazioni esplorate, poiché in animali normali l'esplorazione di ambiente familiari causa una riduzione dell'attività esplorativa (abitudine). Così, se le regioni cerebrali, come la corteccia cerebrale, coinvolte nel riconoscimento e nella mappatura dell'ambiente sono alterate da modificazioni genetiche o farmacologiche, la loro funzione dovrebbe essere danneggiata, con una conseguente diminuzione della capacità di riconoscimento e una più lenta abitudine ad un nuovo ambiente. Questo è in accordo con le precedenti ricerche che un largo numero di topi transgenici mostra un'alterata memoria spaziale dipendenti dall'ippocampo. Inoltre, questa rete neuronale dovrebbe essere matura in una fase della vita molto precoce, da quando i topi più piccoli riescono ad esplorare in modo molto simile ai topi adulti (Smith KS. et al. 2007).

Un aspetto irrisolto è se le alterazioni dell'espressione dei geni potrebbe essere relativa ai meccanismi comportamentali come la paura, reattività ai rinforzi. Inoltre, ulteriori studi sono tuttora in corso per recuperare animali knockout con queste anomalie comportamentali, per studiare le associazioni statistiche con iper/ipoattività nell'intero set di topi knockout.

Questi risultati hanno implicazioni per sottolineare le relazioni gene-comportamento e per la ricerca nelle malattie psichiatriche umane. Infatti, sembra che il meccanismo d'azione di uno specifico gene è meno importante rispetto al suo livello di espressione in una specifica regione cerebrale nel predire la sua rilevanza nei processi comportamentali.

In secondo luogo, l'aumentata attività locomotoria che accompagna le malattie mentali come la schizofrenia e l'ADHD, potrebbero essere dovute al livello di espressione dei geni coinvolti nei principali sintomi della malattia (e.g.

allucinazioni e inattenzione, rispettivamente), specificamente è plausibile che se i geni implicati nella mancanza di attenzione (come l'ADHD) o nelle allucinazioni (come la schizofrenia) sono altamente espressi nella corteccia o nell'ippocampo, questo potrebbe portare ad iperattività come mostrato nei lavori precedenti. Perciò, la presenza di iperattività in diverse malattie psichiatriche potrebbe essere spiegato come un sintomo collaterale dovuto all'alterazione di geni altamente espressi nella corteccia cerebrale o nell'ippocampo.

Avendo dimostrato mediante questo lavoro una origine genetica dei livelli di attività fisica, ci siamo chiesti se tali conclusioni erano applicabili anche nell'uomo. A tale scopo abbiamo analizzato la distribuzione dei livelli di attività fisica in una popolazione di anziani, valutandone la correlazione con una serie di variabili quali lo stato mentale e l'umore.

## **Distribuzione dei livelli di attività fisica, dell'umore e dello stato mentale in una popolazione anziana**

L'invecchiamento è un fenomeno di carattere mondiale e che di solito viene associato alla demenza. Attualmente i soggetti che soffrono di tale patologia sono circa 24 milioni: questo dato è destinato a raddoppiare di 20 anni in 20 anni fino a raggiungere gli 81 milioni nel 2040 (Ferri CP. et al. 2005). Quindi la demenza, considerata una vera e propria emergenza mondiale rappresenta un costo umano e non solo per il paziente e per la propria famiglia ma anche a livello sanitario ed assistenziale. Il costo medio di tali soggetti si aggira intorno ai 50 mila euro annui fino ad arrivare ad un costo annuale nazionale, oggi di 50 miliardi di euro, stimato in 120 miliardi di euro (Maraldi C. and Pahor M. 2006).

La terapia farmacologica per il trattamento della demenza e, in particolare per la massima forma di tale malattia, la malattia di Alzheimer, è limitata in termini di intervento terapeutico poiché tende a controllare i disturbi del comportamento in quanto non c'è ad oggi una terapia valida per arrestare il decorso della malattia (Pepeu G. and Giovannini MG. 2009). È evidente quindi che, mentre da un lato occorre trovare delle nuove strategie in grado di prevenire o rallentare la progressione verso la demenza, dall'altro bisogna trovare i soggetti a rischio di

incorrere in tale patologia. È stato stimato che se si riuscisse a rallentare la progressione verso questa malattia nei soggetti a rischio si avrebbero nel mondo 9,2 milioni di malati di Alzheimer in meno ogni anno (Brookmeyer R. et al. 2007).

Diversi studi epidemiologici hanno dimostrato che l'attività fisica nei soggetti di età avanzata non solo può ritardare l'esordio e la progressione della malattia, ma anche migliorare l'efficienza fisica e l'aspetto psicologico della persona rendendo la sua qualità della vita migliore (Maraldi C. and Pahor M. 2006, Forbes D. et al. 2008, Angevaren M. et al. 2008, Teri L. et al. 2008). Gli studi clinici controllati randomizzati che hanno indagato le possibili correlazioni tra esercizio fisico e aspetto cognitivo hanno evidenziato dei risultati contrastanti. Alcuni hanno demarcato un miglioramento delle funzioni cognitive mentre altri studi hanno affermato il contrario (Maraldi C. and Pahor M. 2006).

Questa grande variabilità può essere spiegata in termini di differenti programmi di attività motoria somministrati nei diversi studi, differenti misurazioni delle funzioni cognitive, un campione di indagine ridotto oppure ancora la breve durata del programma di attività motoria (Forbes D. et al. 2008, Angevaren M. et al. 2008, Teri L. et al. 2008). Inoltre pochissimi studi si sono attenuti alle linee guida consigliate dal documento CONSORT (Consolidated Standards of Reporting Trials) redatto per aiutare i ricercatori nella progettazione e conduzione di uno studio clinico controllato e randomizzato (Altman DG. et al. 2001). È evidente quindi il bisogno di ulteriori studi clinici utilizzando un buon rigore metodologico per ottenere dei risultati significativi.

Diversi studi osservazionali hanno dimostrato che i soggetti anziani con un declino della memoria hanno maggiori probabilità di essere affetti dalla malattia di Alzheimer (Van Oijen M. et al. 2007, Petersen RC. 2004).

### **Scopo dello studio**

Lo scopo principale dello studio, coordinato dal prof. A. Di Costanzo, per lo più ancora in corso, è di descrivere i livelli di attività fisica in una popolazione anziana, e come questa si correla ad altre variabili di interesse, in particolare dell'efficienza cognitiva di tali soggetti e dello stato dell'umore. Successivamente abbiamo voluto indagare se esisteva una connessione causa-effetto fra le

correlazioni osservate. A tale scopo abbiamo randomizzato il gruppo degli anziani in due gruppi e sottoposti a due diversi livelli di attività fisica. In tal modo sarà possibile comprendere se le variazioni di attività fisica causano o sono piuttosto effetto delle modifiche neurologiche riscontrate.

Per questo scopo, secondo le linee guida del documento CONSORT (Altman DG. et al. 2001), abbiamo ideato uno studio clinico controllato randomizzato della durata di 24 mesi denominato “Studio EPD: Esercizio per la Prevenzione della Demenza” cercando di ovviare a tutte le limitazioni avutesi nei trials clinici precedenti.

## **Materiali e metodi**

### **Partecipanti**

I partecipanti allo studio sono stati selezionati nell’ambito del progetto “ACCA” (Dall’ACcoglienza al CAre. Continuità assistenziale e integrazione socio sanitaria anziani e diversamente abili. Valutazione multidimensionale integrata) e i pazienti afferenti alle Unità Valutazione Alzheimer, Azienda Sanitaria Regione Molise (ASReM).

I criteri di eleggibilità sono stati:

1. età > 50 anni;
2. disturbo soggettivo di memoria, confermato o non da test di memoria;
3. punteggio > 24 al Mini Mental State Examination (MMSE) (Folstein MF. et al. 1975);
4. punteggio < 1 alla scala Clinical Dementia Rating (CDR) (Morris J. 1993);

I criteri di esclusione sono stati:

1. condizioni mediche (neurologiche, cardio-respiratorie, muscolo-scheletriche, ecc.) di gravità tale da non consentire la partecipazione al programma di esercizio;
2. depressione clinicamente significativa (punteggio > 6 alla Geriatric Depression Scale (Almeida OP. and Almeida SA. 1999));
3. incapacità a camminare senza assistenza per 6 minuti (6-minute walk test) (Enright PL. et al. 2003);

4. diagnosi di demenza secondo l'International Statistical Classification of Diseases, 10th Revision (ICD-10) (World Health Organization 1992).

Tutti i partecipanti arruolati allo studio sono stati considerati affetti da deterioramento cognitivo lieve (Mild Cognitive Impairment, MCI) qualora avessero riportato alla batteria dei test neuropsicologici (vedi oltre):

1. un punteggio (corretto per età e scolarità) al MMSE > 24;
2. un punteggio alla CDR = 0.5;
3. almeno un punteggio su 3 patologico in una delle prove di memoria episodica;
4. punteggi nella norma in tutte le altre prove della batteria.

Inoltre è stato richiesto il parere favorevole del Comitato Etico dell'Università del Molise e dell'ASReM e tutti i partecipanti allo studio hanno firmato un consenso informato valido per la partecipazione allo studio e al trattamento dei dati personali.

#### **Valutazione dello stato di salute**

I partecipanti sono stati sottoposti ad un'attenta anamnesi, ad un accurato esame obiettivo ed alcuni esami strumentali (elettrocardiogramma, ecocardiogramma, eco-Doppler dei principali vasi arteriosi) e di laboratorio (glicemia, azotemia, creatininemia, colesterolemia totale, HDL e LDL, trigliceridemia, transaminasi, ecc.). I partecipanti ritenuti essere a rischio di incorrere in eventi indesiderati durante lo svolgimento dei programmi di attività motoria (American College of Sport Medicine (ACSM) 2006) sono stati sottoposti a test da sforzo al cicloergometro seguendo le raccomandazioni dell'American Heart Association (Myers J. et al. 2009).

In base alle raccomandazioni fornite dall'American College of Sport Medicine (ACSM), i partecipanti con 2 o più fattori di rischio quali familiarità, ipertensione, dislipidemia, obesità, diabete, fumo di sigaretta e sedentarietà sono stati considerati a rischio medio mentre quelli con segni, sintomi o diagnosi di malattia cardio-vascolare, polmonare e/o metabolica sono stati considerati a rischio alto (American College of Sport Medicine (ACSM) 2006). Infine i partecipanti con

patologie tali da precludere loro l'attività motoria sono state escluse dallo studio in questione.

#### **Valutazione delle funzioni fisiche**

Per verificare i livelli di attività fisica, i fattori associati all'attività fisica e l'associazione tra attività fisica, salute e funzioni fisiche, ci siamo serviti della Physical Activity Scale for the Elderly (PASE) (Washburn R. A. et al. 1999), una scala di valutazione dell'intensità e durata di diverse attività, da quelle sportive a quelle occupazionali, da quelle ricreative a quelle casalinghe, effettuate nell'arco temporale di una settimana. Lo score di tale scala va da un valore minimo di 0 ad un valore massimo di 400.

Per la valutazione della forma fisica dei partecipanti ci siamo avvalsi di una batteria di test denominata "Test AAHPERD" (American Alliance for Health, Physical Education, Recreation and Dance) (Capranica L. et al. 1996) con cui si è valutata la flessibilità, l'agilità/equilibrio dinamico, la coordinazione, la forza/resistenza e la resistenza.

#### *Sit and reach test*

Il Sit and Reach test o test di flessibilità è il metodo per valutare la flessibilità della colonna vertebrale e dei muscoli posteriori della coscia (Wells KF. and Dillon EK. 1952). Nel test di flessibilità, il soggetto seduto a gambe tese e divaricate eseguirà una flessione del busto in avanti cercando di toccare il punto più distante su una fettuccia metrica posta tra le sue gambe e mantenendo la posizione per 2 secondi. Questo test è stato eseguito due volte per assegnare come punteggio la media dei due risultati ottenuti.

#### *Test di agilità ed equilibrio dinamico*

Questo test denominato "Agility and Dynamic Balance Test" è utilizzato per valutare contemporaneamente sia l'agilità che l'equilibrio. Il soggetto partendo da una posizione seduta deve alzarsi e girare intorno ad un cono posto ad una distanza di 5 mt dalla sedia, ritornare nella posizione di partenza (seduto sulla sedia), rialzarsi e girare intorno all'altro cono posto alla medesima distanza. Questo test viene eseguito il più velocemente possibile e lo score di questo test è dato dal tempo impiegato per effettuare due circuiti completi.

#### *Soda pop test*

Questo test valuta la destrezza degli arti superiori e la coordinazione oculo-manuale. Ci sono tre lattine (33 cl) poste in tre cerchi separati da altrettanti cerchi adiacenti agli stessi. Il test è completo quando il soggetto, dopo aver capovolto le lattine nel cerchio adiacente, le riporterà alla condizione di partenza eseguendo il test sempre con la stessa mano. Anche questo test viene eseguito il più rapidamente possibile e lo score, per entrambe le mani, è il tempo impiegato per effettuare il test.

#### *Arm Curl Test*

Questo test valuta la forza e la resistenza degli arti superiori (Róžańska-Kirschke A. et al. 2006, Jones C.J. et al. 2002). Nell'arco temporale di 30" il soggetto deve eseguire più quante possibili flessione-estensioni dell'arto superiore non dominante avendo in mano un manubrio da 1 kg per le donne e 2 kg per gli uomini. Lo score è dato dal numero di ripetizioni effettuate nel tempo stabilito.

#### *Six minutes walking test*

Questo test valuta la resistenza aerobica del soggetto che deve percorrere la distanza di 15 mt più quante volte riesce a farlo in 6 minuti. La velocità di andatura verrà scelta dal soggetto con una sola indicazione: deve cercare di mantenere un'andatura costante che può essere la corsa o la camminata.

### **Valutazione delle funzioni cognitive, della depressione e della qualità di vita**

L'outcome primario dello studio è dato dall'Alzheimer Disease Assessment Scale (ADAS-Cog) (Rosen WG. et al. 1984); questa scala è composta da 11 brevi test cognitivi che valutano la memoria, il linguaggio e le prassie con un punteggio che può variare tra 0 e 70 dove il valore "0" indica nessuna compromissione cognitiva mentre il valore "70" indica una severa compromissione cognitiva. Gli outcome cognitivi secondari sono dati da un protocollo neuropsicologico basato su una serie di test per valutare le funzioni cognitive dei diversi partecipanti. Questo protocollo neuropsicologico include i seguenti test.

#### *Mini-Mental State Examination*

Il Mini-Mental State Examination (MMSE) valuta le funzioni cognitive. Il test si basa su delle domande che esaminano diverse aree delle funzioni cognitive:

dall'orientamento nel tempo all'orientamento nello spazio, dalla registrazione di parole all'attenzione e al calcolo, dalla rievocazione al linguaggio, dalla prassia costruttiva alla copia di una figura. Il punteggio totale del MMSE è largamente accettato come un indicatore di un declino cognitivo (Woodbury M., Fillenbaum G. 1996 - Crook T. et al. 1986). Questo test è altamente sensibile (87%) e specifico (82%) nella valutazione della demenza (Folstein MF. et al. 1975). La validità del test è stata dimostrata con numerosi test neuropsicologici (Cobb JL. et al. 1993) e anche con studi longitudinali (Mitrushina M., Satz P. 1991). Usato sia nella pratica clinica (Patten S., Fick G. 1993) che nella ricerca (Woodbury M., Fillenbaum G. 1996), il MMSE è stato utilizzato in valutazioni longitudinali di pazienti affetti dalla demenza di Alzheimer.

Diversi studi hanno inoltre dimostrato l'influenza dell'età e del livello di scolarità del paziente sul MMSE. Infatti si raccomanda che il punteggio finale del test dovrebbe essere calcolato considerando sia le caratteristiche demografiche che la scolarità della popolazione in esame (Bird HR. et al. 1987, Crum RM. et al. 1993, Escobar JJ. et al. 1986, Liu HC. et al. 1994, Manubens JM. et al. 1998, Pi' J. et al. 1994, Tombaugh TN. et al. 1992). Il punteggio assegnato va da 0 a 30: un risultato uguale o inferiore a 18 indica grave compromissione cognitiva, fino a 24 indica una compromissione moderata e maggiore di 25 indica normalità cognitiva (Folstein et al. 1975).

#### *Frontal Assessment Battery*

Il Frontal Assessment Battery (FAB) è un test composto da 6 subtest che esplorano differenti funzioni relative ai lobi frontali. Ogni subtest ha un punteggio che può variare da 0 (punteggio minimo) a 3 (punteggio massimo): il punteggio totale è dato dalla somma dei punteggi dei singoli subtest (Dubois B. et al. 2000). Le funzioni esplorate sono:

1. la concettualizzazione; questa si basa su alcuni test di somiglianza inclusi nella scala di intelligenza proposta da Wechsler (Wechsler D. 1981). Questo test valuta la capacità del soggetto di generare somiglianze;
2. la flessibilità mentale; il soggetto deve riferire più quante parole conosce che iniziano con la lettera "S" in un minuto escludendo quelle riferite a cognomi e nomi propri (Dubois B. et al. 2000). L'esaminatore può aiutare



- il soggetto se nei primi 5 secondi non riesce a riferirne alcuna. In base al numero di parole riferite viene assegnato un punteggio (0 se meno di 3 parole, 1 da tre a cinque parole, 2 da sei a nove parole e 3 più di nove parole);
3. la programmazione motoria; l'esaminatore esegue la sequenza motoria di Luria (pugno, palmo e taglio della mano) (Dubois B. et al. 2000, Luria AR. 1966) chiedendo al soggetto di prestare attenzione perché dovrà ripetere la stessa sequenza. L'esaminatore esegue tre prove della sequenza di Luria con la mano sinistra, quindi il soggetto ripete la stessa sequenza con la mano destra. Il punteggio è assegnato in base alle corrette sequenze motorie di Luria eseguite dal soggetto (0 per meno di tre sequenze consecutive corrette aiutato dall'esaminatore, 1 per due di tre sequenze consecutive corrette eseguite da solo, 2 per tre sequenze consecutive corrette eseguite da solo e 3 per sei sequenze consecutive corrette eseguite da solo);
  4. la sensibilità alle interferenze; l'esaminatore chiede al soggetto di battere due volte sul tavolo quando sente un singolo battito. Così facendo l'esaminatore esegue una sequenza di tre prove (1-1-1). In seguito l'esaminatore chiede al soggetto di battere una volta quando sente due battiti eseguendo una sequenza di tre prove (2-2-2). Infine l'esaminatore esegue la seguente serie: 1-1-2-1-2-2-2-1-1-2. Se il soggetto batte allo stesso modo dell'esaminatore almeno quattro volte riceve 0 punti, 1 punto se compie più di due errori, 2 punti se compie uno o due errori e 3 punti se non compie errori.
  5. il controllo inibitorio; questo test si basa sul tradizionale paradigma no-no go. È simile al test precedente ma in questo caso, il soggetto dovrebbe inibire quello già appreso e, non battere sul tavolo quando sente un solo battito e battere due volte sul tavolo quando sente un solo battito. Infine l'esaminatore esegue la sequenza 1-1-2-1-2-2-2-1-1-2. Il punteggio è assegnato allo stesso modo del precedente test.
  6. l'autonomia rispetto all'ambiente; questo test valuta l'innaturale e spontanea tendenza del soggetto di relazionarsi all'ambiente tramite un

comportamento di prensione. L'esaminatore chiede al soggetto di posizionare le mani davanti allo stesso con il palmo rivolto verso l'alto: l'esaminatore valuta se il soggetto spontaneamente afferra o meno le sue mani. Se il soggetto afferra le mani dell'esaminatore, gli viene chiesto, nella prova successiva, di non afferrarle. Se nella seconda prova il soggetto comunque afferra senza esitazione le mani dell'esaminatore riceve 1 punto, 2 punti se il soggetto esita ad afferrarle e 3 punti se il soggetto non le afferra.

#### *Test di Rey*

Il test delle 15 parole di Rey valuta la performance di rendimento mnestico ed è costituito da sei prove (Rey A. 1958). Nella prima prova, l'esaminatore legge le parole e chiede al soggetto di ripeterglielle. Dopodiché, le parole vengono rilette altre quattro volte con conseguente rievocazione dopo ogni lettura anche delle parole già dette. Dopo le prime cinque prove, il soggetto viene "distratto" con diverse prove visuo-spaziali per circa 15 minuti, e successivamente gli viene chiesto di ricordare le parole lette. Il test comprende una rievocazione immediata, che valuta la memoria a breve e lungo termine, e una differita che riflette i processi di memoria episodica a lungo termine; inoltre da una valutazione qualitativa sul come il soggetto affronta la prova di memorizzazione, sulla curva di posizione seriale, la curva di apprendimento e la valutazione delle possibili intrusioni. Il punteggio finale viene attribuito sia nella prova immediata calcolato come la somma delle parole rievocate nelle prime cinque prove e sia nella prova differita calcolato come il numero delle parole rievocate.

#### *Test delle matrici attentive (o attenzionali)*

Questo test si basa su tre matrici composte da una serie di numeri al cui interno bisogna evidenziare il numero specifico per ogni matrice. Esso valuta l'attenzione selettiva cioè l'abilità del soggetto di identificare all'interno di un contesto distraente delle informazioni specifiche. Le prima riga di ogni matrici viene utilizzata come esempio mentre la seconda viene detta riga di "run-in": questa riga serve per familiarizzare con il test. Il punteggio parziale di ogni matrice calcolato nel tempo di 45 secondi è dato dalla somma di ogni numero identificato contando

dalla terza riga mentre il punteggio totale è dato dalla somma dei punteggi parziali (Spinnler H. and Tognoni G. 1987).

#### *Test delle matrici di Raven*

Il test delle matrici di Raven o test delle matrici progressive valuta l'intelligenza non verbale. In questo test viene chiesto al soggetto di completare, per ogni scheda presentatagli, una figura scegliendo tra sei possibili opzioni. Inoltre è diviso in tre blocchi composti da dodici figure diverse: ogni blocco ha una difficoltà crescente richiedendo una sempre più elevata capacità di analisi, codifica, interpretazione e comprensione della figura. Il punteggio totale è dato dalla somma delle risposte esatte per ogni blocco annotate su una griglia di valutazione (Raven J.C. 1947).

#### *Stroop test*

Lo Stroop Test è uno strumento importante per la valutazione di anomalie attentive di tipo selettivo ed inoltre rappresenta un valido metodo di studio della flessibilità concettuale e dei processi inibitori soprattutto in quei soggetti che hanno delle lesioni del lobo frontale. In altre parole esso è un test che misura la facilità con cui un soggetto riesce a passare da una percezione ad un'altra in base alla variazione delle richieste sopprimendo delle risposte che secondo il soggetto sono ovvie in favore di altre poco abituali (un classico esempio è la denominazione del colore dell'inchiostro e non della parola scritta) (Spreen O. and Strauss E. 1991).

Questo test è composto da tre subtest:

1° subtest comprende una sequenza di 30 parole rappresentanti i diversi colori (verde, rosso, blu, rosso,...) che il soggetto deve leggere nel minor tempo possibile;

2° subtest comprende 30 palline di diverso colore (verde, rosso, blu, rosso,...): il compito del soggetto è quello di enunciare il colore della pallina nel minor tempo possibile;

3° subtest comprende una sequenza di 30 parole rappresentanti i diversi colori (verde, rosso, blu, rosso,...) scritte con un colore d'inchiostro diverso: il compito del soggetto è quello di enunciare non la parola in se ma il colore dell'inchiostro con cui è scritta.

Il calcolo del punteggio del test di Stroop viene calcolato tenendo presente sia il tempo che gli errori (Stroop J.R. 1935). L'interferenza sul tempo si calcola in base alla seguente formula:

$$[T = T3 - (T1 + T2)/2]$$

Allo stesso modo l'interferenza degli errori viene calcolata con la seguente formula:

$$[E = E3 - (E1 + E2)/2]$$

L'effetto Stroop indagato da questo test consiste nel ritardo del processazione del colore della parola osservabile tramite un rallentamento dei tempi di reazione e tramite l'aumento degli errori nella condizione incongruente cioè quando la parola "VERDE" è scritta in colore rosso rispetto a quella congruente cioè quando la parola "ROSSO" è scritta in colore rosso.

#### *Memoria di Prosa*

La memoria di Prosa valuta la memoria a breve e lungo termine di un soggetto a cui viene somministrato un racconto che il soggetto dovrà ricordare sia nell'immediato che a distanza di alcuni minuti. Ad ogni parola o sequenze di parole che il soggetto ricorda viene assegnato un punteggio seguendo dei criteri specifici. Il punteggio totale è dato dalla somma di tutti i punteggi parziali (Spinnler H. and Tognoni G. 1987).

Il processo di rievocazione di un testo è sostanzialmente diverso da quello che permette la rievocazione di una lista di parole. Un testo la cui lunghezza superi la capacità della memoria a breve termine non viene, infatti, mai rievocato integralmente e letteralmente, ma solo in alcune sue parti. Molto spesso la rievocazione non è del tutto aderente al testo, ma esprime in modo più o meno accurato i significati generali o gli eventi più importanti esposti nel testo. Il test di memoria di prosa viene valutato per mezzo di un punteggio che valorizza di procedimento di astrazione dei significati principali del test.

### *Trail Macking Test (TMT)*

Questo test valuta la funzione di esplorazione visiva, di attenzione selettiva e di shifting attentivo del soggetto. Il test è composto da due parti: un TMT prova "A" e un TMT prova "B". Nella prova "A" il soggetto deve unire con una linea 25 numeri cerchiati e disposti in modo casuale su un foglio, partendo da 1 e terminando a 25, senza staccare mai la penna dal foglio. Nella prova "B" il soggetto dovrà eseguire le stesse cose della prova "A" facendo attenzione ad abbinare ad un numero la rispettiva lettera (1..A, 2..B, 3..C.....). L'obiettivo del test è quello di eseguire ogni prova nel minor tempo possibile. Per tutte le prove viene calcolato sia il tempo di esecuzione che gli errori commessi (Reiten R. M. 1958).

### *Copia disegni*

Questo test valuta l'abilità manuale del soggetto. Questo test si suddivide in una copia di disegni e una copia di disegni con programmazione. Nella copia di disegni il soggetto deve copiare i disegni che gli vengono presentati (stella, cubo e casetta) mentre in quelli con programmazione il soggetto deve completare il disegno che gli viene proposto con delle linee. La copia di disegni ha un punteggio che va da 0 a 4 dove: 4 punti se la prospettiva, l'orientamento delle linee, la relazione spaziale e la proporzione tra le parti sono correttamente riprodotte; 3 punti se il disegno è ben riconoscibile e tutti gli elementi costitutivi sono presenti e correttamente posizionati, tuttavia, la prospettiva è persa e/o ci sono lievi imperfezioni riguardanti l'orientamento delle linee, la relazione spaziale o la proporzione tra le parti; 2 punti se il disegno risulta difficilmente riconoscibile per la mancanza, o la dislocazione, di uno o più elementi costitutivi e/o per gravi imperfezioni nell'orientamento delle linee, nella relazione spaziale o nella proporzione tra le parti; 1 punto se il disegno non è riconoscibile ma non si osserva il fenomeno di closing-in; 0 punti se è presente il fenomeno del closing-in per cui tutta o parte della copia viene eseguita ricalcando o sovrapponendosi al modello. Nella copia di disegni con elementi di programmazione viene assegnato 1 punto per ogni linea completata (Gainotti et al. 1977, Carlesimo et al. 1996).

### *Mac-Q*

Il Memory Assessment Clinics-Questionnaire o Mac-Q è un test di autovalutazione delle funzioni mnestiche del soggetto a cui viene chiesto di definire rispetto al passato le proprie abilità in diversi compiti che richiedono un minimo sforzo di memoria (ricordare numeri di telefono o codici postali). Questo test è composto da 6 domande a risposta multipla dove un punteggio superiore a 25 è indice di disturbo cognitivo.

### *Geriatric Depression Scale*

La Geriatric Depression Scale o GDS è un buon strumento di screening per quanto riguarda la depressione. Questa scala di autovalutazione è composta da 30 item la cui risposta può essere “SI” o “NO” e valuta lo stato depressivo del soggetto. Questa scala di solito viene usata come parte integrante di una valutazione geriatrica globale. Una diagnosi di depressione clinica non deve basarsi solo su questa scala anche se ampiamente validata (Yesavage J. A. et al. 1983).

### *SF-36*

L'SF-36 è un questionario che valuta lo stato di salute del soggetto. Di solito questo questionario viene usato in economia sanitaria come variabile per calcolare la qualità della vita anno dopo anno per determinare il costo del trattamento sanitario. Questo questionario è caratterizzato da 36 item che fanno riferimento ad 8 domini di salute: attività fisica, limitazioni di ruolo dovute alla salute fisica e allo stato emotivo, dolore fisico, percezione dello stato di salute generale, vitalità, attività sociali, salute mentale e una sola domanda sul cambiamento dello stato di salute (Ware G. E. et al. 1998).

## **Randomizzazione**

Dopo aver effettuato la valutazione basale dei soggetti partecipanti allo studio è stata eseguita la randomizzazione ordinando i soggetti in ordine decrescente del punteggio PASE (Physical Activity Scale for Elderly). Quindi ogni soggetto è stato assegnato in modo casuale ad uno dei due programmi di attività motoria previsti dallo studio: un gruppo di controllo che esegue delle attività di ginnastica dolce ed un gruppo sperimentale che esegue attività motorie più intense caratterizzate da una parte aerobica, una parte di potenziamento muscolare e un

defaticamento. Data la natura dell'intervento, saranno ciechi solo gli sperimentatori che valuteranno le funzioni cognitive, fisiche e psicologiche e la qualità di vita dei partecipanti a 6, 12, 18 e 24 mesi. Inoltre, ad ogni seduta di valutazione sarà proibito ai partecipanti e agli esaminatori di fornire o richiedere informazioni sulle attività fisiche in corso di svolgimento.

### **Gruppo sperimentale**

Per il gruppo sperimentale è previsto un programma di attività motoria personalizzato che includerà una prima parte di riscaldamento generale, una parte centrale basata sulla resistenza aerobica e sul potenziamento degli arti ed una parte finale di stretching e defaticamento. La componente aerobica verrà eseguita con diversi macchinari quali treadmill, cyclette, ellittica (cross trainer) o a corpo libero in base alle preferenze e soprattutto alle problematiche della persona. Questo programma prevede un aumento graduale dell'intensità, durata e frequenza dell'esercizio. Partendo da sessioni di attività motoria con intensità del lavoro pari al 30-50% della riserva di frequenza cardiaca (Heart Rate Reserve, HRR<sup>9</sup>), si è arrivati ad una intensità pari al 70-80% dell'HHR. Anche per la componente di potenziamento muscolare è stata prevista un'intensità, durata e frequenza progressivamente crescenti. Partendo da sessioni di potenziamento che hanno incluso il lavoro dei principali muscoli del tronco e degli arti con resistenze pari al 40-50% della massima contrazione volontaria, si è arrivati ad uno sforzo tale da raggiungere il punteggio di 12-13 alla Scala di Borg (scala di valutazione soggettiva dello sforzo) (Borg G. 1998).

Ad ogni soggetto è stata monitorata la frequenza cardiaca durante l'attività motoria mediante l'utilizzo di un cardiofrequenzimetro.

### **Gruppo di controllo**

Il gruppo di controllo ha eseguito una programma di attività motoria basato fondamentalmente sulla ginnastica dolce con esercizi di stretching che hanno

---

<sup>9</sup> Il termine Heart Rate Reserve è usato per descrivere la differenza tra il battito cardiaco di una persona e quello massimo predetto. Se un soggetto aumenta il proprio fitness cardiovascolare, il suo battito cardiaco a riposo ( $HR_{rest}$ ) diminuirà, in questo modo il suo HHR aumenterà in base alla formula " $HRR = HR_{max} - HR_{rest}$ ". L'HHR spesso è usato per valutare l'intensità dell'esercizio (Karnoven MJ. Et al. 1957).

coinvolto le principali articolazione del corpo, evitando qualsiasi posizioni dolorosa per il soggetto, movimenti balistici e manovre di Valsalva.

### **Monitoraggio durante lo studio**

Per quanto riguarda il monitoraggio durante lo studio, sia le valutazioni fisiche che cognitive sono state ripetute a 6, 12, 18 e 24 mesi dall'inizio del trattamento.

Il monitoraggio della qualità, intensità e durata dell'attività fisica prescritta avverrà nella palestra dell'Università del Molise o in altre palestre convenzionate, ad opera di laureati in Scienze motorie (personal trainer) adeguatamente addestrati nella prescrizione e nel monitoraggio dell'attività fisica nell'anziano. Ad ogni paziente verrà affidato un diario nel quale il personal trainer annoterà, al termine di ogni seduta di allenamento, gli esercizi svolti e il grado di aderenza al programma.

Per i soggetti che per motivi di diversa natura non possono frequentare una palestra, verrà prescritto un programma personalizzato di esercizio che potrà essere svolto a casa. In tal caso, è previsto un sistema remoto di analisi del movimento e di telemedicina che consentirà di monitorare qualità, intensità, durata dell'attività fisica svolta (e quindi il grado di aderenza al programma) e parametri vitali di interesse per lo studio, come ad esempio la frequenza cardiaca, nel corso di tale attività. Anche per questi soggetti è previsto l'uso di un diario nel quale annotare gli esercizi svolti. Il grado di aderenza al programma sarà dato dalla percentuale di attività fisica completata (e registrata nel diario) rispetto a quella prescritta.

### **Trattamento dei dati personali**

I dati relativi ai singoli soggetti sono stati trattati nel rispetto di quanto stabilito dal Codice in Materia di Protezione dei Dati Personali, emanato con Decreto Legislativo del 30 giugno 2003 n. 196 e successive modificazioni. I risultati delle varie indagini e i moduli di consenso per ciascun paziente sono custoditi presso il Dipartimento di Scienze per la Salute, Università del Molise, in posto inaccessibile se non all'investigatore principale o a suo delegato per i soli fini eventuali della salute dei pazienti. Le codifiche di passaggio dalle identità singole all'anonimato sono conservate in busta sigillata presso lo stesso Dipartimento, a



disposizione, come sopra, solo per la salute del paziente. La responsabilità della custodia di tutti i predetti documenti ricade sulla direzione del Dipartimento.

### **Calcolo della potenza statistica**

Per calcolare la dimensione campionaria è stato misurato l'incremento medio annuale (+ deviazione standard, SD) del punteggio alla scala ADAS-Cog in un gruppo indipendente di soggetti con disturbi soggettivi della memoria, afferenti al centro UVA. Il risultato è stato un incremento medio di 6,0 punti (+4,5), punteggio che rappresenta la più piccola differenza ritenuta clinicamente significativa nei trial con farmaci anticolinesterasici (Birks J. 2006). Sulla base di tale punteggio medio e della sua deviazione standard, e sulla stima di una frequenza di drop-out del 20% abbiamo calcolato che l'arruolamento di 170 soggetti (85 in ciascun gruppo) risulta in una potenza dell'80% con un errore alfa a 0,05 (Norman GR. and Streiner DL. 1994).

### **Analisi dei dati**

L'analisi dei dati è stata effettuata mediante il software statistico SPSS (SPSS Inc, Chigago, IL). Le variabili sono state esaminate mediante grafici a scatole e di probabilità normale alla ricerca di dati anomali e mediante il test di Shaphiro-Wilk. Le variabili che non hanno presentato una distribuzione normale sono state sottoposte a trasformazione matematica (quadrato, radice quadrata, logaritmo decimale, reciproco o reciproco della radice quadrata). Le variabili per le quali non è stata possibile l'assunzione di normalità sono state sottoposte ad analisi statistica non parametrica. Le differenze tra i due gruppi (gruppo sperimentale vs. controllo) sono state analizzate mediante analisi della varianza per misure ripetute con confronti multipli post-hoc (test t per dati appaiati), in entrambe le modalità intention-to-treat e complete-case. Età, sesso, livello di istruzione, stato civile e QI sono stati inseriti nell'analisi come covariate. Il livello di significatività a due code è stato settato a 0,05.

## Flow chart “Studio EPD”

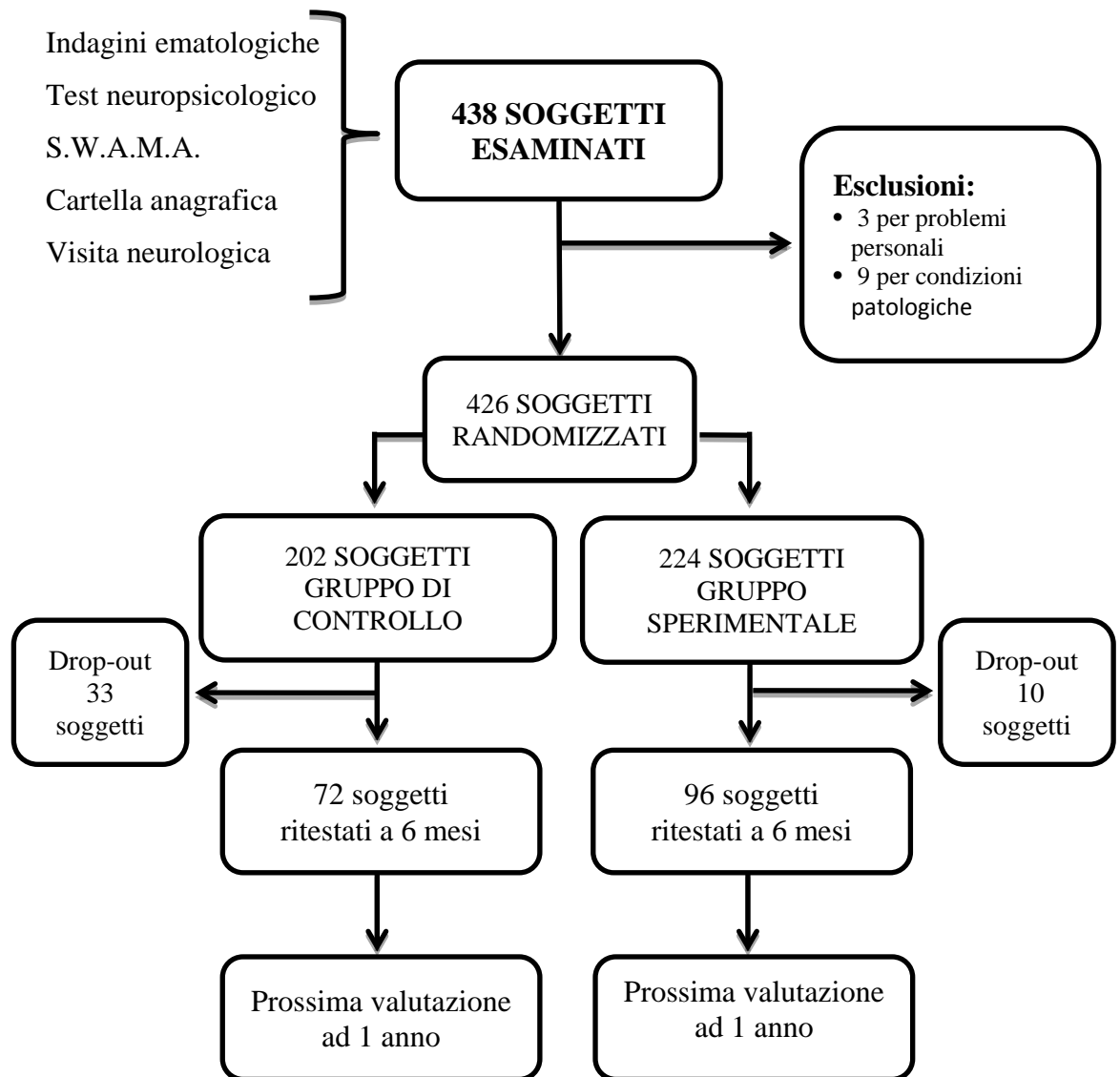
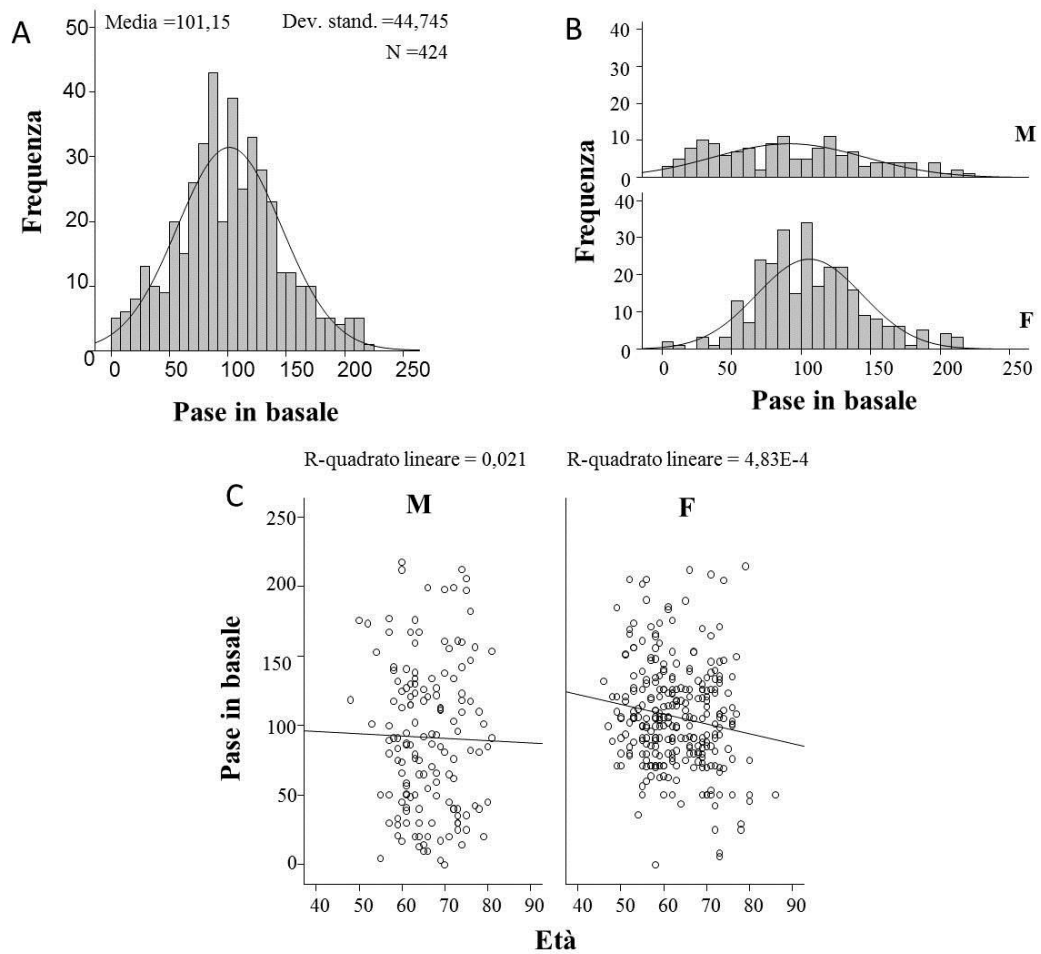


Figura 6. Flow chart dello Studio EPD. Flow chart che schematizza lo Studio EPD nella condizione attuale.

## Risultati

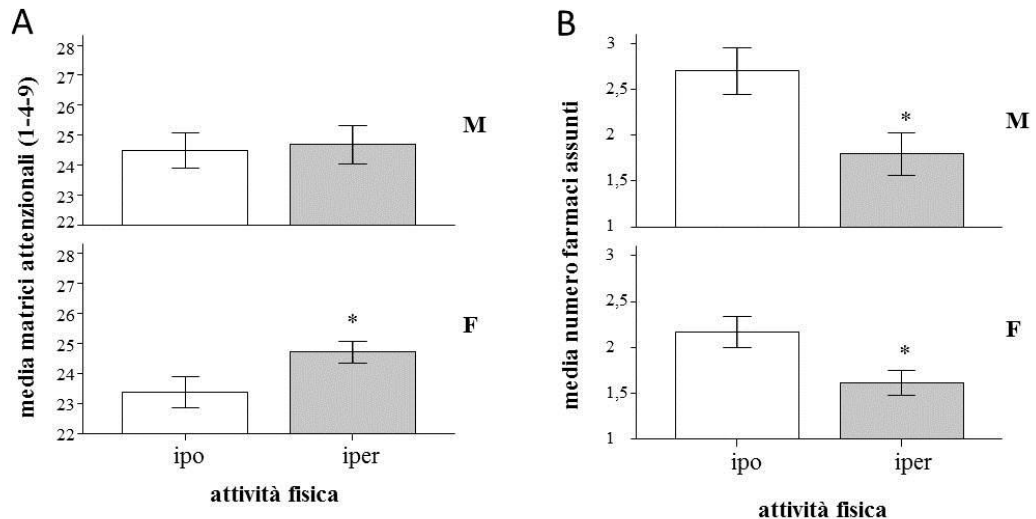


**Figura 7. Distribuzione della popolazione in base all'attività motoria spontanea (PASE). A:** distribuzione di frequenza della popolazione in base al PASE; **B:** distribuzione di frequenza della popolazione in base al PASE suddivisa anche in base al sesso; **C:** distribuzione di frequenza della popolazione in base al PASE suddivisa tenendo presente sia il sesso che l'età.

La distribuzione dell'attività fisica spontanea misurata mediante la scala PASE nella popolazione di studio è di tipo gaussiana (Fig. 7A). Tuttavia suddividendo i soggetti in base al sesso si osserva che questo è vero per le donne ma non per gli uomini i quali mostrano almeno due popolazioni, una popolazione di bassa attività ed una ad attività più alta (Fig. 7B).

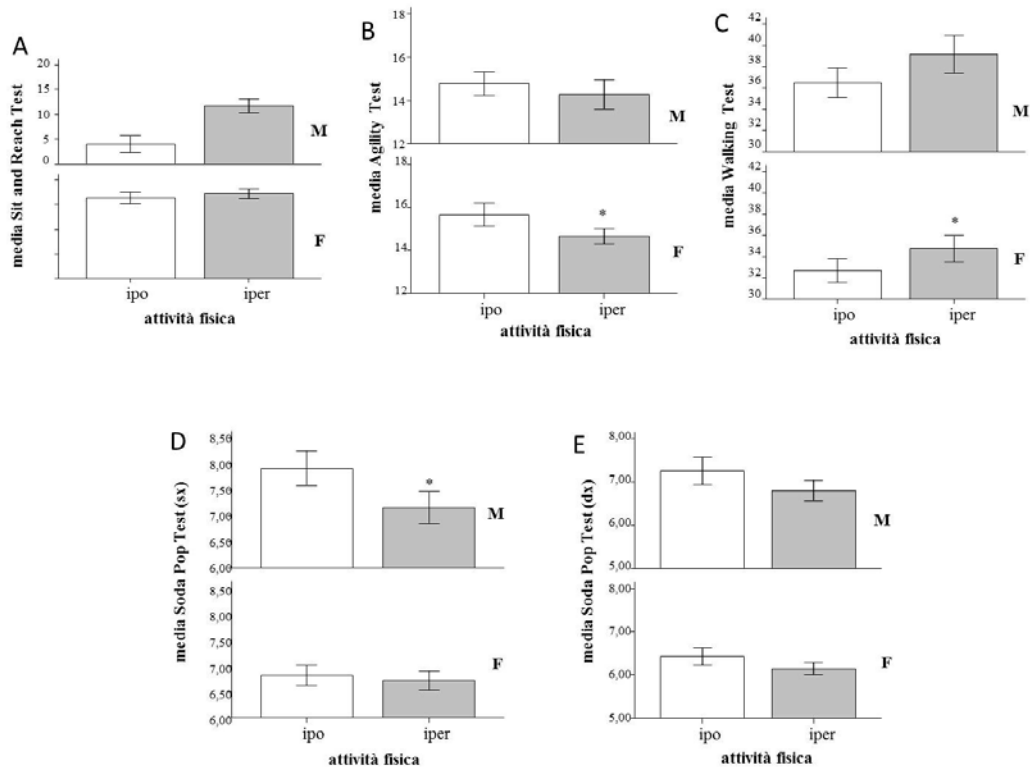
Per capire se tale distribuzione nei maschi dipenda dall'età abbiamo studiato l'indice PASE in funzione dell'età separatamente nei maschi e nelle femmine. Si osserva che non c'è correlazione tra età e PASE nella popolazione anziana (Fig. 7C).

Di conseguenza abbiamo deciso di suddividere la popolazione in due sottogruppi, a bassa ed alta attività spontanea usando come threshold un valore PASE pari a 100. I soggetti con un PASE inferiore a 100 sono stati siglati come soggetti ipoattivi mentre quelli con un PASE superiore a 100 sono stati siglati come iperattivi.



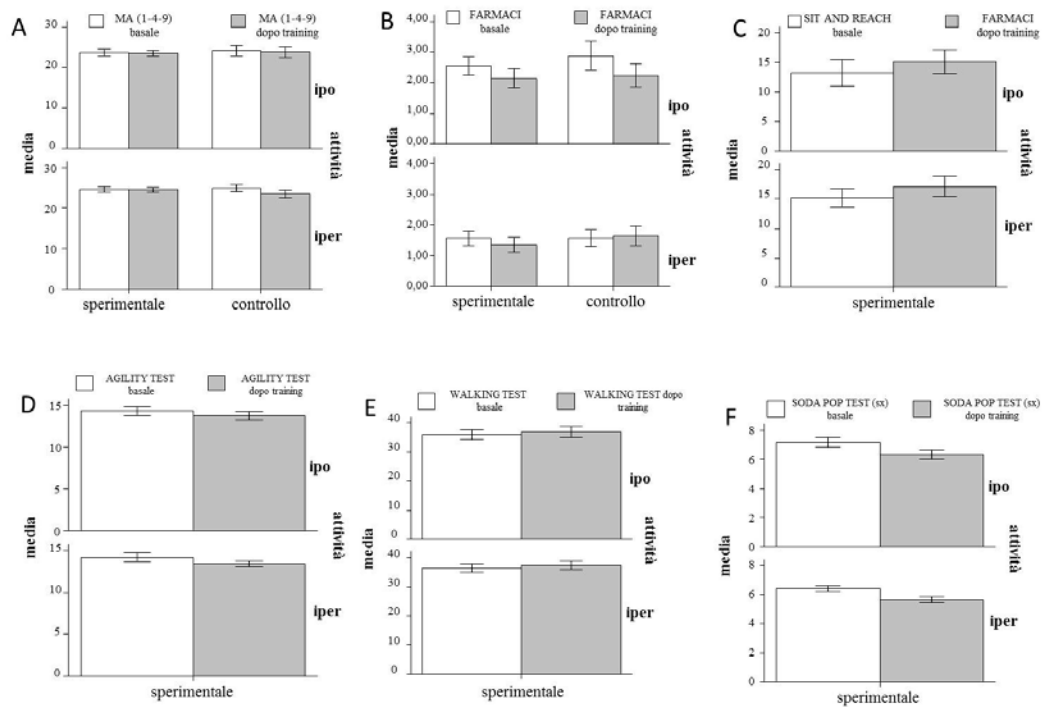
**Figura 8. Analisi della varianza a 2 vie delle variabili misurate con attività fisica e sesso come fattori. A: analisi della varianza del test delle Matrici Attenzionali della popolazione in condizioni basali; B: analisi della varianza del numero dei farmaci assunti dalla popolazione in condizioni basali.**

Un'analisi della varianza delle variabili misurate a 2 vie con attività fisica e sesso come fattori ha rivelato significative differenze solo in alcune variabili di seguito discusse. In particolare risulta essere differente il numero dei farmaci che è maggiore negli ipoattivi (Fig. 8B) ( $F_{1,9.475}$ ;  $p < 0.002$  per attività fisica; nessuna differenza per il fattore sesso senza interazione) e, per quanto riguarda l'ambito cognitivo, il test delle Matrici Attenzionali che risulta essere migliore nei soggetti iperattivi soprattutto nelle donne (Fig. 8A) ( $F_{4,00}$ ;  $p = 0.48$  per attività fisica; nessuna differenza significativa per sesso senza interazione).



**Figura 9.** Analisi della varianza a 2 vie delle variabili misurate con attività fisica e sesso come fattori. **A:** analisi della varianza della media del Sit and Reach Test della popolazione in condizioni basali; **B:** analisi della varianza dell'Agility Test dalla popolazione in condizioni basali; **C:** analisi della varianza del Walking Test dalla popolazione in condizioni basali; **D-E:** analisi della varianza del Soda Pop Test dalla popolazione in condizioni basali per la mano sinistra (D) e destra (E).

In merito alle abilità motorie, si osserva che i soggetti iperattivi hanno delle migliori prestazioni in merito al Sit and Reach Test (F=1; p=0,07 per attività fisica; c'è una differenza significativa anche per sesso senza interazione) (Fig. 9A), l'Agility test (F=1; p=0,03; nessuna differenza significativa per sesso senza interazione) (Fig. 9B), il Walking test (F=1; p=0,04; nessuna differenza significativa per sesso senza interazione) (Fig. 9C) ed il Soda Pop test per entrambe le mani (F=1; p=0,02; (mano sinistra) nessuna differenza significativa per sesso senza interazione); F=1; p=0,03; (mano destra) nessuna differenza significativa per sesso senza interazione) (Fig. 9D-E).



**Figura 10. Analisi della varianza per misure ripetute con sperimentale controllo ed attività fisica come fattori in basale e dopo il training di 6 mesi. A: Test delle Matrici Attenzionali; B: numero dei farmaci; C: Sit and Reach Test; D: Agility Test; E: Walking Test;**

Un'analisi della varianza per misure ripetute con trattamento e attività motoria come fattori rivela che non tutte le variabili differenti fra il gruppi iperattivo e quello ipoattivo si modificano con l'esercizio fisico. In particolare la performance dei test attenzionali non si modifica dopo 6 mesi di training ( $F=1$ ,  $p=0,32$ ) (Fig. 10A). Per quanto riguarda il numero dei farmaci assunti, questi diminuiscono con l'attività fisica ( $F=1$ ;  $p=0,042$ ) (Fig. 10B). Tuttavia nel gruppo che non pratica attività motoria sembra verificarsi allo stesso modo una diminuzione del numero dei farmaci. Pertanto bisogna concludere che l'effetto della diminuzione non dipende dalla quantità di attività motoria praticata.

Allo stesso modo del test delle matrici attenzionali, anche alcuni test motori come il Sit and Reach test e il Walking test non si modificano dopo il training di 6 mesi (Fig. 10C-E). Questo potrebbe dipendere dal fatto che questa tipologia di allenamento non incida sul test.

Al contrario, altre tipologie di test motori come l'Agility test e il Soda Pop test per entrambe le mani migliorano con questo allenamento suggerendo gli effetti positivi su tali test di questo protocollo di allenamento (Fig. 10D-F).

## **Discussione**

L'invecchiamento, un compagno biologico del tempo, non risparmia nessun organo o sistema, e durante il suo corso condiziona ogni cosa, dalla cellula al pensiero. Tuttavia, il ritmo dell'invecchiamento è variabile tra gli individui e l'esistenza di questa variabilità merita una misura di speranza. Se un invecchiamento sano può essere prolungato e se le sue peggiori e negative espressioni possono essere ritardate se non del tutto eliminate, questo segmento di vita vitale e divertente potrebbe durare per decenni. In altre parole, un invecchiamento di successo, raggiunto da relativamente poche persone, potrebbe diventare una norma (Rowe and Kahn, 1987).

La distribuzione di frequenza dell'attività fisica nella popolazione anziana suggerisce che esistono due popolazioni maschili a diverso livello spontaneo di attività fisica.

Questa distribuzione non sembra dipendere da cambiamenti dell'attività fisica con l'età perché non abbiamo riscontrato correlazione fra età ed attività fisica spontanea indipendentemente dal sesso della nostra popolazione. Questo non si può estrapolare a tutte le età in quanto il nostro range di riferimento è piuttosto stretto (dai 50 agli 85 anni di età). Gli studi su animali che abbiamo condotto suggeriscono che l'attività fisica spontanea abbia un substrato genetico, con animali geneticamente modificati ad alta attività fisica (iperattivi) e bassa attività (ipoattivi). È possibile che lo stesso fenomeno sia valido anche nell'essere umano. Di conseguenza abbiamo deciso di suddividere la popolazione in due sottogruppi, a bassa ed alta attività spontanea usando come threshold un valore PASE pari a 100. I soggetti con valore superiori sono stati considerati iperattivi mentre quelli con un valore inferiore sono stati considerati ipoattivi.

Il gruppo dei soggetti iperattivi sembra assumere all'inizio dello studio un numero minore di farmaci. Questo è in accordo con l'opinione generale che l'attività fisica possa ridurre l'assunzione di farmaci. Inoltre è interessante notare che una maggiore attività fisica in basale è connessa ad un miglioramento delle capacità attentive. Questo dato è molto interessante poiché nei bambini l'iperattività si può associare ad un deficit di attenzione, una sindrome detta deficit di attenzione ed iperattività (ADHD). Nella popolazione anziana osserviamo un'associazione tra iperattività e miglioramento dell'attenzione. tuttavia i test di attenzione qui usati

non sono quelli impiegati per lo studio dell'ADHD pertanto questa interessante differenza fra bambini ed anziani dovrebbe essere ulteriormente indagata con metodiche più appropriate.

Inoltre come atteso, i soggetti iperattivi hanno migliori performance in vari test di abilità motoria. Questo è in accordo con osservazioni precedenti che hanno mostrato che l'attività motoria migliora le performance fisiche negli anziani. Per capire se le modifiche nell'assunzione di farmaci, nell'attenzione e nelle abilità motorie sono dovute a all'attività fisica o siano dovute ad altri fattori che si accompagnano a modifiche dell'attività fisica abbiamo eseguito uno studio sperimentale, sottoponendo i soggetti ad un training e valutando nuovamente le variabili misurate a distanza di 6 mesi. Poiché inoltre non abbiamo osservato nessuna differenza tra fra maschi e femmine, nel seguito abbiamo raggruppato i soggetti senza distinguerli per sesso.

I dati che emergono dopo aver fatto attività fisica indicano che l'attenzione non viene modificata dall'allenamento somministrato ai soggetti. Poiché tale allenamento consiste in un programma basato su una parte aerobica, esercizi di potenziamento muscolare e una parte finale di defaticamento, è possibile che questo non impegni l'attenzione dei soggetti e quindi non porti ad un miglioramento. Questo aspetto deve essere ulteriormente indagato utilizzando altri tipi di esercizi fisici e test attentivi.



## Bibliografia

1. Acevedo SF, Ohtsu H, Benice TS, Rizk-Jackson A, Raber J. Age-dependent measures of anxiety and cognition in male histidine decarboxylase knockout (Hdc<sup>-/-</sup>) mice. *Brain Res* 2006;1071:113–23.
2. Alberto, U. et al (2003) Invited review: ageing and the cardiovascular system. *Journal of Applied Physiology*; 95: 2591–2597.
3. Almeida OP, Almeida SA. Short versions of the geriatric depression scale: a study of their validity for the diagnosis of a major depressive episode according to ICD-10 and DSM-IV. *Int J Geriatr Psychiatry* 1999;14:858-65.
4. Altman DG, Schulz KF, Moher D, Egger M, Davidoff F, Elbourne D, et al; CONSORT Group (Consolidated Standards of Reporting Trials). The revised CONSORT statement for reporting randomized trials: explanation and elaboration. *Ann Intern Med* 2001;134:663-94.
5. American College of Sport Medicine, ACM's Guidelines for Exercise Testing and Prescription (Seventh Edition), Lippincott Williams & Wilkins, 2006
6. Anagnostopoulos AV, Mobraaten LE, Sharp JJ, Davisson MT. Transgenic and knockout databases: behavioral profiles of mouse mutants. *Physiol Behav* 2001;73:675–89.
7. Angevaren M, Aufdemkampe G, Verhaar HJ, Aleman A, Vanhees L. Physical activity and enhanced fitness to improve cognitive function in older people without known cognitive impairment. *Cochrane Database Syst Rev* 2008;(3):CD005381.
8. Anna Różańska-Kirschke, Piotr Kocur, Małgorzata Wilk, Piotr Dylewicz, The Fullerton Fitness Test as an index of fitness in the elderly, *Medical Rehabilitation* 2006; 10(2): 9-16.
9. Appleton, C., Deary, I., et al. (2004). Cognitive reserve and the neurobiology of cognitive ageing. *Ageing Research Reviews*. 3; 369-382.
10. Arndt SS, Laarakker MC, van Lith HA, van der Staay FJ, Gieling E, Salomons AR, et al. Individual housing of mice — impact on behaviour and stress responses. *Physiol Behav* 2009;97:385–93.
11. Bainbridge NK, Koselke LR, Jeon J, Bailey KR, Wess J, Crawley JN, et al. Learning and memory impairments in a congenic C57BL/6 strain of mice that lacks the M2 muscarinic acetylcholine receptor subtype. *Behav Brain Res* 2008;190:50–8.
12. Barnes, C. & Burke, S. (2006). Neural plasticity in the ageing brain. *Nature Publishing Group*, 7; 30-40.
13. Bird HR, Canino G, Stipek MR, Shrout P. Use of the Mini-Mental State Examination in a probability sample of a Hispanic population. *Journal of Nervous Mental Disorders* 1987;175:731.
14. Birks J. Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2006; (1): CD005593.

15. Blednov YA, Stoffel M, Cooper R, Wallace D, Mane N, Harris RA. Hyperactivity and dopamine D1 receptor activation in mice lacking *girk2* channels. *Psychopharmacology (Berl)* 2002;159:370–8.
16. Borg G. Borg's perceived exertion and pain scales. Champaign, IL: Human Kinetics, 1998.
17. Borkowsky JG, Benton AL, Spreen O. Word fluency and brain damage. *Neuropsychologia* 1967; 5: 135-40.
18. Brookmeyer R, Johnson E, Ziegler-Graham K, Arrighi HM. Forecasting the global burden of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 2007;3:186-191.
19. Busquet P, Khoi NN, Schmid E, Tanimoto N, Seeliger MW, Ben Yosef T, et al. CaV1.3 L-type Ca<sup>2+</sup> channels modulate depression-like behaviour in mice independent of deaf phenotype. *Int J Neuropsychopharmacol* 2009:1–15.
20. Butterfield, A., Ding, Q., et al. (2005). Evidence of increase oxidative damage in subjects with mild cognitive impairment. *Neurology*; 64; 1152-1156.
21. Capranica L, Di Trolilo M, Lucchetti L, Tiberi M. Evaluating fitness in elderly by the AAHPERD test: a pilot study. *Ital J Sport Sci* 1996; 1(3): 19-24.
22. Carmelli, D., Swan, G.E., Reed, T., Wolf, P.A., Miller, B.L., DeCarli, C., 1999. Midlife cardiovascular risk factors and brain morphology in identical male twins. *Neurology* 52, 1119–1124.
23. Chang, L., Jiang, C.S., & Ernst, T. (2009). Effects of age and sex on brain glutamate and other metabolites. *Magnetic Resonance Imaging*. 27; 142-145.
24. Chavez C, Gogos A, Jones ME, Van den BM. Psychotropic drug-induced locomotor hyperactivity and prepulse inhibition regulation in male and female aromatase knockout (ArKO) mice: role of dopamine D1 and D2 receptors and dopamine transporters. *Psychopharmacology (Berl)* 2009;206:267–79.
25. Chen C, Rainnie DG, Greene RW, Tonegawa S. Abnormal fear response and aggressive behavior in mutant mice deficient for alpha-calcium-calmodulin kinase II. *Science* 1994;266:291–4.
26. Churchill, J. D., Galvez, R., Colcombe, S., Swain, R. A., Kramer, A. F., & Greenough, W. T. (2002). Exercise, experience and the aging brain. *Neurobiology of Aging*, 23, 941-955.
27. Cobb JL, D'Agostino RB, Wolf PA. Norms for the Mini-Mental State Examination. *Journal of the American Medical Association* 1993;270:2178.
28. Colcombe, S., Kramer, A.F., 2003. Fitness effects on the cognitive function of older adults: a meta-analytic study. *Psychological Science* 14, 125–130.
29. Colcombe, S.J., Erickson, K.I., Raz, N., Webb, A.G., Cohen, N.J., McAuley, E., Kramer, A.F., 2003. Aerobic fitness reduces brain tissue loss in aging humans. *Journal of Gerontology Series A—Biological Sciences and Medical Sciences* 58A, 176–180.

30. Cotman, C.W., Berchtold, N.C., 2002. Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. *Trends in Neurosciences* 25, 295–301.
31. Crabbe JC, Wahlsten D, Dudek BC. Genetics of mouse behavior: interactions with laboratory environment. *Science* 1999;284:1670–2.
32. Craik, F. & Salthouse, T.(2000) *The Handbook of Aging and Cognition*, 2nd Edition. United States of America, Lawrence Erlbaum Associates, Inc.
33. Crook T, Bartus RT, Ferris SH, Whitehouse P, Cohen GD, Gershon S. Age-associated memory impairment: proposed diagnostic criteria and measures of clinical change — Report of a National Institute of Mental Health Work Group. *Developmental Psychology* 1986;2:261–76.
34. Crum RM, Anthony JC, Basset SS, Folstein MF. Populationbased norms for the Mini-Mental State Examination by age and educational level. *Journal of the American Medical Association* 1993;269:2386–91.
35. Crusio WE, Goldowitz D, Holmes A, Wolfer D. Standards for the publication of mouse mutant studies. *Genes Brain Behav* 2008;8:1–4.
36. Curtis KS, Krause EG. Sex differences in physiology and behavior: focus on central actions of ovarian hormones. *Physiol Behav* 2009;97:141–2.
37. De Leeuw, F.E., De Groot, J.C., Breteler, M.M.B., 2001. White matter changes: frequency and risk factors. In: Pantoni, L., Inzitari, D., Wallin, A. (Eds.), *The Matter of White Matter: Clinical and Pathophysiological Aspects of White Matter Disease Related to Cognitive Decline and Vascular Dementia*. Academic Pharmaceutical Productions, Utrecht, The Netherlands, pp. 19–33.
38. den Heijer, T., Geerlings, M.I., Hofman, A., de Jong, F.H., Launer, L.J., Pols, H.A., Breteler, M.M., 2003. Higher estrogen levels are not associated with larger hippocampi and better memory performance. *Archives of Neurology* 60, 213–220.
39. den Heijer, T., Launer, L.J., Prins, N.D., van Dijk, E.J., Vermeer, S.E., Hofman, A., Koudstaal, P.J., Breteler, M.M., 2005. Association between blood pressure, white matter lesions, and atrophy of the medial temporal lobe. *Neurology* 64, 263–267.
40. D'Hooge R, Van Dam D, Franck F, Gieselmann V, De Deyn PP. Hyperactivity, neuromotor defects, and impaired learning and memory in a mouse model for metachromatic leukodystrophy. *Brain Res* 2001;907:35–43.
41. Dodds C, Murray D. Pre-operative assessment of the elderly. *Br J Anaesthesia/CEPD Reviews/ Vol 1 Number 6* 2001; 181-184
42. Driscoll, I., Hamilton, D.A., Petropoulos, H., Yeo, R.A., Brooks, W.M., Baumgartner, R.N., Sutherland, R.J., 2003. The aging hippocampus: cognitive, biochemical and structural findings. *Cerebral Cortex* 12, 1344–1351.

43. Duan, H. et al. (2003) Age-related morphologic alterations in dendrites and spine densities of corticocortically projecting neurons in macaque monkeys. *Cereb. Cortex* 13, 950–961
44. Dubois, B., Slachevsky, A., Litvan, I., & Pillon, B. (2000). The FAB: a Frontal Assessment Battery at bedside. *Neurology*, 55, 1621–1626.
45. Dufouil, C., Alperovitch, A., Ducros, V., Tzourio, C., 2003. Homocysteine, white matter hyperintensities, and cognition in healthy elderly people. *Annals of Neurology* 53, 214–221.
46. Dufouil, C., de, Kersaint-Gilly, A., Besancon, V., Levy, C., Auffray, E., Brunnereau, L., Alperovitch, A., Tzourio, C., 2001. Longitudinal study of blood pressure and white matter hyperintensities: the EVA MRI cohort. *Neurology* 56, 921–926.
47. Duvoisin RM, Zhang C, Pfankuch TF, O'Connor H, Gayet-Primo J, Quraishi S, et al. Increased measures of anxiety and weight gain in mice lacking the group III metabotropic glutamate receptor mGluR8. *Eur J NeuroSci* 2005;22:425–36.
48. Enright PL, McBurnie MA, Bittner V, Tracy RP, McNamara R, Arnold A, et al. The 6-min walk test: a quick measure of functional status in elderly adults. *Chest* 2003; 123: 387-98.
49. Escobar JI, Burnam A, Karno M, Forsythe A, Landsverk J, Golding JM. Use of the Mini-Mental State Examination (MMSE) in a community population of mixed ethnicity. Cultural and linguistic artefacts. *Journal of Nervous Mental Disorders* 1986;174:607–14.
50. Espallergues J, Galvan L, Sabatier F, Rana-Poussine V, Maurice T, Chatonnet A. Behavioral phenotyping of heterozygous acetylcholinesterase knockout (AChE+/-) mice showed no memory enhancement but hyposensitivity to amnesic drugs. *Behav Brain Res* 2010;206:263–73.
51. Fadda P, Bedogni F, Fresu A, Collu M, Racagni G, Riva MA. Reduction of corticostriatal glutamatergic fibers in basic fibroblast growth factor deficient mice is associated with hyperactivity and enhanced dopaminergic transmission. *Biol Psychiatry* 2007;62(3):235–42.
52. Feder A, Nestler EJ, Charney DS. Psychobiology and molecular genetics of resilience. *Nat Rev Neurosci* 2009;10:446–57.
53. Ferrannini E, Natali A, Capaldo B, Lehtovirta M, Jacob S, Yki-Jarvinen H. Insulin resistance, hyperinsulinemia, and blood pressure: role of age and obesity. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR). *Hypertension* 1997;30:1144-9.
54. Ferri CP, Prince M, Brayne C, Brodaty H, Fratiglioni L, Ganguli M, et al. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet* 2005; 366: 2112–17.

55. Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. "Minimal state": a practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res* 1975; 12:189-98.
56. Forbes D, Forbes S, Morgan DG, Markle-Reid M, Wood J, Culum I. Physical activity programs for persons with dementia. *Cochrane Database Syst Rev*. 2008;(3):CD006489.
57. Fujii H, Ishihama T, Ago Y, Shintani N, Kakuda M, Hashimoto H, et al. Methamphetamine-induced hyperactivity and behavioral sensitization in PACAP deficient mice. *Peptides* 2007;28:1674-9.
58. Fukuda, H., Kitani, M., 1995. Differences between treated and untreated hypertensive subjects in the extent of periventricular hyperintensities observed on brain MRI. *Stroke* 26, 1593-1597.
59. Gerber DJ, Sotnikova TD, Gainetdinov RR, Huang SY, Caron MG, Tonegawa S. Hyperactivity, elevated dopaminergic transmission, and response to amphetamine in M1 muscarinic acetylcholine receptor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:15312-7.
60. Goldstein, I.B., Bartzokis, G., Guthrie, D., Shapiro, D., 2002. Ambulatory blood pressure and brain atrophy in the healthy elderly. *Neurology* 59, 713-719.
61. Gordon, R., Spector S., Sjoerdsma, A., & Udenfriend, S. (1966). Increased synthesis of norepinephrine and epinephrine in the intact rat during exercise and exposure to cold. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapy*, 30, 440-447.
62. Gould SJ. *The ape in some of us: criminal anthropology. The Mismeasure of Man*. New York: WW. Norton & Co; 1981.
63. Gudipati, C.V., Labovitz, A.J. (1990). Effects of ageing on left ventricular structure and function. *American Heart Journal*; 121:3 (Pt 1), 871-875.
64. Gunning-Dixon, F.M., Raz, N., 2000. The cognitive correlates of white matter abnormalities in normal aging: a quantitative review. *Neuropsychology* 14, 224-232.
65. Gunning-Dixon, F.M., Raz, N., 2003. Neuroanatomical correlates of selected executive functions in middle-aged and older adults: a prospective MRI study. *Neuropsychologia* 41, 1929-1941.
66. Hancock JM, Adams NC, Aidinis V, Blake A, Bogue M, Brown SD, et al. Mouse Phenotype Database Integration Consortium: integration [corrected] of mouse phenome data resources. *Mamm Genome* 2007;18:157-63.
67. Head, D., Raz, N., Gunning-Dixon, F., Williamson, A., Acker, J.D., 2002. Age-related shrinkage of the prefrontal cortex is associated with executive, but not procedural aspects of cognitive performance. *Psychology and Aging* 17, 72-84.
68. Henkenius, A., Peterson, B., et al. (2003). Mapping cortical change across the human life span. *Nature Neuroscience*, 6(3); 309-315.

69. Hof, P. & Morrison, J. (2004). The aging brain: morphomolecular senescence of cortical circuits. *Trends in Neuroscience*, 27(10); 607-613.
70. Hof, P. R., & Mobbs, C. V. (2009). *Handbook of the neuroscience of aging*. London, UK: Elsevier Inc.
71. Isaacs, K. R., Anderson, B. J., Alcantara, A. A., Black, J. E., & Greenough, W. T. (1992). Exercise and the brain: angiogenesis in the adult rat cerebellum after vigorous physical activity and motor skill learning. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 12, 110-119.
72. Iyo, M., & Yamasaki, T. (1993). The detection of age-related decrease of dopamine, D1, D2 and serotonin 5-HT<sub>2</sub> receptors in living human brain. *Prog. Neuro-Psychopharmacol & Biol. Psychait.* 17; 415-421.
73. Janssens, J.P. et al (1999) Physiological changes in respiratory function associated with ageing. *European Respiratory Journal*; 13: 197–205.
74. Jones C.J., Rikli R.E., Measuring functional fitness of older adults, *The Journal on Active Aging*, March April 2002, pp. 24–30.
75. Juha O. Rinne, Pirkko Lonngberg and Paivi Marjamaiki (1989). Age-dependent decline in human brain dopamine D1 and D2 receptors. *Brain Research*. 508; 349-352.
76. Juhila J, Honkanen A, Sallinen J, Haapalinna A, Korpi ER, Scheinin M.  $\alpha$ 2Adrenoceptors regulate D-amphetamine-induced hyperactivity and behavioural sensitization in mice. *Eur J Pharmacol* 2005;517:74–83.
77. Kaasinen, V., Vilkmann, H., Hietala, J., Någren, K., Helenius, H., Olsson, H., Farde, L., & Rinne, J.O. (2000). Age-related dopamine D2/D3 receptor loss in extrastriatal regions of the human brain. *Neurobiology of Aging*. 21; 683–688.
78. Kaga Y, Shoemaker WJ, Furusho M, Bryant M, Rosenbluth J, Pfeiffer SE, et al. Mice with conditional inactivation of fibroblast growth factor receptor-2 signaling in oligodendrocytes have normal myelin but display dramatic hyperactivity when combined with *Cnp1* inactivation. *J Neurosci* 2006;26:12339–50.
79. Kaiser, L.G., Schuff, N., Cashdollar, N., Weiner, M.W. (2005). Age-related glutamate and glutamine concentration changes in normal human brain: 1H MR spectroscopy study at 4 T. *Neurobiology of aging*. 26; 665-672.
80. Karasinska JM, George SR, Cheng R, O'Dowd BF. Deletion of dopamine D1 and D3 receptors differentially affects spontaneous behaviour and cocaine-induced locomotor activity, reward and CREB phosphorylation. *Eur J NeuroSci* 2005;22: 1741–50.
81. Karvonen MJ, Kental E, Mustala O. The effects of on heart rate a longitudinal study. *Ann Med Exp Fenn* 1957;35(3):307-15.
82. Kennedy, K.M., Raz, N., 2005. Age, sex, and regional brain volumes predict perceptual-motor skill acquisition. *Cortex* 41, 560–569.

83. Khan Z, Jinnah HA. Paroxysmal dyskinesias in the lethargic mouse mutant. *J Neurosci* 2002;22:8193–200.
84. Kolb, B. & Whishaw, I. (1988). Brain plasticity and behaviour. *Annual Review of Psychology*, 49; 43-64.
85. Kramer, A. F., & Willis, S. L. (2002). Enhancing the cognitive vitality of older adults. *Current Directions in Psychological Science*, 11, 173-177.
86. Le Niculescu H, McFarland MJ, Ogden CA, Balaraman Y, Patel S, Tan J, et al. Phenomic, convergent functional genomic, and biomarker studies in a stressreactive genetic animal model of bipolar disorder and co-morbid alcoholism. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2008;147B:134–66.
87. Lesniak, K.T., Dubbert, P.M., 2001. Exercise and hypertension. *Current Opinion in Cardiology* 16, 356–359.
88. Levitzky, M.G. (1984) Effects of aging on the respiratory system. *The Physiologist*; 27: 2,102–107.
89. Liu HC, Teng EL, Lin KN, Hsu TC, Guo NW, Chou P, Hu HH, Cheng WN, Chiang BN. Performance on a dementia screening test in relation to demographic variables. Study of 5297 community residents in Taiwan. *Archives of Neurology* 1994;51:910–5.
90. Lombroso C. *L' uomo di Genio in Rapporto alla psichiatria, alla storia ed all'estetica*. Torino; 1888.
91. Luria, A. R. (1966). *Higher cortical functions in man*. New York, NY: Basic Books.
92. Mack JT, Beljanski V, Soulika AM, Townsend DM, Brown CB, Davis W, et al. “Skittish” abca2 knockout mice display tremor, hyperactivity, and abnormal myelin ultrastructure in the central nervous system. *Mol Cell Biol* 2007;27: 44–53.
93. Manubens JM, Martí'nez-Lage P, Martí'nez-Lage JM, Larumbe R, Muruza'bal J, Martí'nez-González MA, Guarch C, Urrutia T, Sarrasqueta P, Lacruz F. Variación de las puntuaciones en el Mini-Mental-State con la edad y el nivel educativo. Datos normalizados en la población mayor de 70 años de Pamplona. (Variation in Mini-Mental-State scores with age and schooling. Normalized data in population older than 70 years from Pamplona). *Neurologia* 1998;13:111–9.
94. Maraldi C, Pahor M. Physical exercise, cognitive decline and dementia in older adults. *G Gerontol* 2006; 54:186-194.
95. Marin, J., Rodriguez-Martinez, M.A., 1999. Age-related changes in vascular responses. *Experimental Gerontology* 34, 503–512.
96. Marubio LM, Gardier AM, Durier S, David D, Klink R, Arroyo-Jimenez MM, et al. Effects of nicotine in the dopaminergic system of mice lacking the alpha4 subunit of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Eur J NeuroSci* 2003;17: 1329–37.

97. MDB - TEST DI COPIA DI DISEGNI GEOMETRICI CON E SENZA ELEMENTI DI PROGRAMMAZIONE di Gainotti et al., 1977; Carlesimo et al., 1996.
98. Miller CL, Burmeister M, Stevens KE. Hippocampal auditory gating in the hyperactive mocha mouse. *Neurosci Lett* 1999;276:57–60.
99. Mitrushina M, Satz P. Reliability and validity of the Mini- Mental State Exam in neurologically intact elderly. *Journal of Clinical Psychology* 1991;47:537–43.
100. Miyakawa T, Yamada M, Duttaroy A, Wess J. Hyperactivity and intact hippocampus dependent learning in mice lacking the M1 muscarinic acetylcholine receptor. *J Neurosci* 2001;21:5239–50.
101. Moher D, Schulz KF, Altman DG; CONSORT Group. The CONSORT statement: revised recommendations for improving the quality of reports of parallel-group randomised trials. *Clin Oral Investig* 2003; 7:2-7.
102. Montague, S.E. et al (2005) *Physiology for Nursing Practice* (3rd ed). Oxford: Baillière Tindall.
103. Morellini F, Lepsveridze E, Kahler B, Dityatev A, Schachner M. Reduced reactivity to novelty, impaired social behavior, and enhanced basal synaptic excitatory activity in perforant path projections to the dentate gyrus in young adult mice deficient in the neural cell adhesion molecule CHL1. *Mol Cell Neurosci* 2007;34: 121–36.
104. Mori T, Ito S, Kuwaki T, Yanagisawa M, Sawaguchi T. Monoaminergic neuronal changes in orexin deficient mice. *Neuropharmacology* 2009.
105. Morris J. The Clinical Dementia Rating (CDR): current version and scoring rules. *Neurology* 1993; 43:2412-3.
106. Morse, C. K. (1993). Does variability increase with age? An archived study of cognitive measures. *Psychology and Aging*, 8, 156-164.
107. Moseley AE, Williams MT, Schaefer TL, Bohanan CS, Neumann JC, Behbehani MM, et al. Deficiency in Na, K-ATPase alpha isoform genes alters spatial learning, motor activity, and anxiety in mice. *J Neurosci* 2007;27:616–26.
108. Myers J, Arena R, Franklin B, Pina I, Kraus WE, McInnis K, et al. Recommendations for Clinical Exercise Laboratories. A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation* 2009 Jun 1. [Epub ahead of print].
109. Nakajima R, Takao K, Huang SM, Takano J, Iwata N, Miyakawa T, et al. Comprehensive behavioral phenotyping of calpastatin-knockout mice. *Mol Brain* 2008;1:7.
110. Ng L, Bernard A, Lau C, Overly CC, Dong HW, Kuan C, et al. An anatomic gene expression atlas of the adult mouse brain. *Nat Neurosci* 2009;12:356–62.



111. Nonogaki K, Abdallah L, Goulding EH, Bonasera SJ, Tecott LH. Hyperactivity and reduced energy cost of physical activity in serotonin 5-HT(2C) receptor mutant mice. *Diabetes* 2003;52:315–20.
112. Norman GR, Streiner DL. *Biostatistics. The Bare Essentials*. Mosby-Year Book, St Louis, 1994.
113. Papaioannou, V. E. and Ebert, K. M. (1986). Comparative aspects of embryo manipulation in mammals. In *Experimental Approaches to Mammalian Embryonic Development*. (Ed., Roger Pedersen and Janet Rossant.).
114. Patten S, Fick G. Clinical interpretation of the mini-mental state. *General Hospital Psychiatry* 1993;15:254–9.
115. Pepeu G, Giovannini MG. Cholinesterase inhibitors and beyond. *Curr Alzheimer Res.* 2009;6:86-96.
116. Perls T. T. and Fretts R. (1998) Why women live longer than men. *Sci. Am. Presents* 9(2), 100–103.
117. Petersen RC. Mild cognitive impairment as a diagnostic entity. *J Intern Med* 2004; 256: 183-94.
118. Pi´ J, Olive´ JM, Esteban M. Mini Mental State Examination: asociacio´n de la puntuacio´n obtenida con la edad y grado de alfabetizacio´n en una poblacion anciana (Mini Mental State Examination: association of the score obtained with the age and degree of literacy in an aged population). *Medicina Clinica* 1994;103:641–4.
119. Poirier R, Cheval H, Mailhes C, Charnay P, Davis S, Laroche S. Paradoxical role of an egr transcription factor family member, egr2/krox20, in learning and memory. *Front Behav Neurosci* 2007;1:6.
120. Pratte M, Jamon M. Impairment of novelty detection in mice targeted for the Ch11 gene. *Physiol Behav* 2009;97:394–400.
121. Raven J.C. *Progressive Matrices*. Sets A, Ab, B: board and book forms. Lewis, London, 1947.
122. Raz, N., 2000. Aging of the brain and its impact on cognitive performance: integration of structural and functional findings. In: Craik, F.I.M., Salthouse, T.A. (Eds.), *Handbook of Aging and Cognition—II*. Erlbaum, Mahwah, NJ, pp. 1–90.
123. Raz, N., Dixon, F.M., Head, D.P., Dupuis, J.H., Acker, J.D., 1998. Neuroanatomical correlates of cognitive aging: evidence from structural MRI. *Neuropsychology* 12, 95–106.
124. Raz, N., Gunning-Dixon, F., Head, D., Rodrigue, K., Williamson, A., Acker, J.D., 2004a. Aging, sexual dimorphism, and hemispheric asymmetry of the cerebral cortex: replicability of regional differences in volume. *Neurobiology of Aging* 25, 377–396.
125. Raz, N., Rodrigue, K.M., Acker, J.D., 2003a. Hypertension and the brain: vulnerability of the prefrontal regions and executive functions. *Behavioral Neuroscience* 17, 1169–1180.

126. Raz, N., Rodrigue, K.M., Kennedy, K.M., Dahle, C., Head, D., Acker, J.D., 2003c. Differential age-related changes in the regional metencephalic volumes in humans: a five-year follow-up. *Neuroscience Letters* 349, 163–166.
127. Reiten, R.M. Validity of the Trial Making Test as an indication of organic brain damage. *Percentual Motor Skills*, 1958; 8: 271-276.
128. Rejeski, W. J., & Mihalko, S. L. (2001). Physical activity and quality of life in older adults. *Journal of Gerontology*, 56A (special issue II), 23-35.
129. Rey A. Memorisation d'une serie de 15 mots en 5 repetitions. In Rey A (ed.) *L'examen clinique en psychologie*. Presses Universitaires des France, Paris, 1958.
130. Richter SH, Garner JP, Wurbel H. Environmental standardization: cure or cause of poor reproducibility in animal experiments? *Nat Methods* 2009;6:257–61.
131. Rosen WG, Mohs RC, Davis KL. A new rating scale for Alzheimer's Disease. *Am J Psychiatry* 1984; 141:1356-64.
132. Rowe, J.W., Kahn, R.L., 1987. Human aging: usual and successful. *Science* 237, 143–149.
133. Rubinstein M, Phillips TJ, Bunzow JR, Falzone TL, Dziewczapolski G, Zhang G, et al. Mice lacking dopamine D4 receptors are supersensitive to ethanol, cocaine, and methamphetamine. *Cell* 1997;90:991–1001.
134. Sachdev, P.S., Valenzuela, M., Wang, X.L., Looi, J.C., Brodaty, H., 2002. Relationship between plasma homocysteine levels and brain atrophy in healthy elderly individuals. *Neurology* 58, 1539–1541.
135. Salat, D. H., Kaye, J. A., & Janowsky, J. S. (2002). Greater orbital prefrontal volume selectively predicts worse working memory performance in older adults. *Cerebral Cortex*, 12, 494-505.
136. Salerno, J.A., Murphy, D.G., Horwitz, B., DeCarli, C., Haxby, J.V., Rapoport, S.I., Schapiro, M.B., 1992. Brain atrophy in hypertension. A volumetric magnetic resonance imaging study. *Hypertension* 20, 340–348.
137. Saliasuta, N., Chang, L., & Ernst, T. (2008). Regional variations and the effects of age and sex on brain glutamate and other metabolites. *Magnetic Resonance Imaging*. 26; 667-675.
138. Salthouse, T. A. (1998). Cognitive and information-processing perspectives on aging. In: I.H. Nordhus, & G.R. Vandenbos (Eds.), *Clinical geropsychology* (pp. 49-59). Washington, DC: American Psychological Association.
139. Schaie, K.W. (2000). The impact of longitudinal studies on understanding development from young adulthood to old age. *International Journal of Behavioral development*, 24, 257-266.
140. Schank JR, Ventura R, Puglisi-Allegra S, Alcaro A, Cole CD, Liles LC, et al. Dopamine beta-hydroxylase knockout mice have alterations in dopamine

- signaling and are hypersensitive to cocaine. *Neuropsychopharmacology* 2006;31:2221–30.
141. Schmidt, R., Fazekas, F., Reinhart, B., Kapeller, P., Fazekas, G., Offenbacher, H., Eber, B., Schumacher, M., Freidl, W., 1996. Estrogen replacement therapy in older women: a neuropsychological and brain MRI study. *Journal of the American Geriatrics Society* 44, 1307–1313.
  142. Sgado P, Alberi L, Gherbassi D, Galasso SL, Ramakers GM, Alavian KN, et al. Slow progressive degeneration of nigral dopaminergic neurons in postnatal Engrailed mutant mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:15242–7.
  143. Shin DM, Korada S, Raballo R, Shashikant CS, Simeone A, Taylor JR, et al. Loss of glutamatergic pyramidal neurons in frontal and temporal cortex resulting from attenuation of FGFR1 signaling is associated with spontaneous hyperactivity in mice. *J Neurosci* 2004;24:2247–58.
  144. Singh P, Cobb S, Rengifo-Cam W, Deng X, Willis W, Li Q. Locomotor activity and behavior of mutant mice deleted for gastrin gene expression. *J Physiol Pharmacol* 2004;55:269–78.
  145. Smith KS, Morrell JI. Comparison of infant and adult rats in exploratory activity, diurnal patterns, and responses to novel and anxiety-provoking environments. *Behav Neurosci* 2007;121:449–61.
  146. Spinnler H, Tognoni G. Standardizzazione e taratura italiana di test neuropsicologici. *Ital J Neurol Sci* 1987; 8 [Suppl]:1–120.
  147. Spirduso, W. W., Francis, K.L., & MacRae, P. G. (2004). *Physical dimensions of aging* (2nd ed.). Champaign, IL: Human Kinetics.
  148. Spreen O, Strauss E. *A compendium of neuropsychological tests: administration, norms, and commentary*. Oxford University Press, New York, 1991.
  149. Strassburger, T.L., Lee, H.C., Daly, E.M., Szczepanik, J., Krasuski, J.S., Mentis, M.J., Salerno, J.A., DeCarli, C., Schapiro, M.B., Alexander, G.E., 1997. Interactive effects of age and hypertension on volumes of brain structures. *Stroke* 28, 1410–1417.
  150. Stroop J.R., (1935) Studies of interference in serial verbal reactions. *Journal of Experimental Psychology*, 18, 643-662.
  151. Su AI, Cooke MP, Ching KA, Hakak Y, Walker JR, Wiltshire T, et al. Large-scale analysis of the human and mouse transcriptomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:4465–70.
  152. Su AI, Wiltshire T, Batalov S, Lapp H, Ching KA, Block D, et al. A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:6062–7.
  153. Tanaka K, Shintani N, Hashimoto H, Kawagishi N, Ago Y, Matsuda T, et al. Psychostimulant-induced attenuation of hyperactivity and prepulse inhibition deficits in *Adcyap1*-deficient mice. *J Neurosci* 2006;26:5091–7.

154. Teri L, Logsdon RG, McCurry SM. Exercise interventions for dementia and cognitive impairment: the Seattle Protocols. *J Nutr Health Aging* 2008;12:391-4.
155. Teunissen, C.E., Blom, A.H., Van Boxtel, M.P., Bosma, H., de Bruijn, C., Jolles, J., Wauters, B.A., Steinbusch, H.W., de Vente, J., 2003. Homocysteine: a marker for cognitive performance? A longitudinal follow-up study. *Journal of Nutrition Health and Aging* 7, 153–159.
156. Third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP). Expert panel on detection, evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). Final report *Circulation* 2002;106:3143-421.
157. Thomas MB, Hu M, Lee TM, Bhatnagar S, Becker JB. Sex-specific susceptibility to cocaine in rats with a history of prenatal stress. *Physiol Behav* 2009;97:270–7.
158. Tombaugh TN, McIntyre NJ. The Mini-Mental State Examination: a comprehensive review. *Journal of the American Geriatric Society* 1992;40:922–35.
159. Tretter F, Albus M. Systems biology and psychiatry — modeling molecular and cellular networks of mental disorders. *Pharmacopsychiatry* 2008;41(Suppl 1): S2–S18.
160. Tzourio, C., Dufouil, C., Ducimetiere, P., Alperovitch, A., 1999. Cognitive decline in individuals with high blood pressure: a longitudinal study in the elderly. EVA Study Group. *Epidemiology of vascular aging. Neurology* 53, 1948–1952.
161. Urrila, A.S., Hakkarainen, A., Heikkinen, S., Vuori, K., Stenberg, D., Haikkinen, A.M., Lundbom, N., Porkka-Heiskanen, T., 2004. Stimulus-induced brain lactate: effects of aging and prolonged wakefulness. *Journal of Sleep Research* 13, 111–119.
162. Van Oijen M, de Long FJ, Hofman A, Koudstaal PJ, Breteler MMB. Subjective memory complaints, education, and risk of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 2007; 3: 92-7.
163. Van Petten, C., 2004. Relationship between hippocampal volume and memory ability in healthy individuals across the lifespan: review and meta-analysis. *Neuropsychologia* 42, 1394–1413.
164. Verbeken, E.K. et al (1992) The senile lung: comparison with normal and emphysematous lungs. 1: structural
165. Viggiano D. The hyperactive syndrome: meta-analysis of genetic alterations, pharmacological treatments and brain lesions which increase locomotor activity. *Behav Brain Res* 2008;194:1–14.
166. Wang, Y., Chan, G.L.Y., Holden, J.E., Dobko, T., Mak, E., Schulzer, M., Huser, J.M., Snow, B.J., & Ruth, T.J. (1998). Age-Dependent Decline of Dopamine D1 Receptors in Human Brain: A PET Study. *Science*. 30; 56-61.

167. Ware JE Jr, Gandek B. Overview of the SF-36 Health Survey and the International Quality of Life Assessment (IQOLA) Project. *J Clin Epidemiol* 1998;51:903-12.
168. Ware JE, Kosinski M, Gandek BG, Aaronson N, Alonso J, Apolone G, Bech P, Brazier, J., Bullinger M, Kaasa S, Leplège, A., Prieto, L., Sullivan M. The Factor Structure of the SF-36® Health Survey in 10 Countries: Results from the International Quality of Life Assessment (IQOLA) Project. *J Clin Epidemiol* 1998; 51(11): 1159-1165.
169. Washburn RA, McAuley E, Katula J, Mihalko SL, Boileau RA. The Physical Activity for the Elderly (PASE): Evidence for validity. *J Clin Epidemiol* 1999;52:643-51.
170. Wechsler, D. (1981). Wechsler Intelligence Scale for Adults-Revised (WAIS-R). New York, NY: The Psychological Corporation.
171. Weinshenker D, Miller NS, Blizinsky K, Laughlin ML, Palmiter RD. Mice with chronic norepinephrine deficiency resemble amphetamine-sensitized animals. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:13873-7.
172. Wells KF, Dillon EK. The sit and reach. A test of back and leg flexibility. *Res Q Exerc Sport*. 1952;23:115-8.
173. Whalley, L.J., Staff, R.T., Murray, A.D., Duthie, S.J., Collins, A.R., Lemmon, H.A., Starr, J.M., Deary, I.J., 2003. Plasma vitamin C, cholesterol and homocysteine are associated with grey matter volume determined by MRI in non-demented old people. *Neuroscience Letters* 341 (3), 173-176.
174. Williams, J.H., Pereira, E.A., Budge, M.M., Bradley, K.M., 2002. Minimal hippocampal width relates to plasma homocysteine in community-dwelling older people. *Age Ageing* 31, 440-444.
175. Wolfer DP, Stagljar-Bozicevic M, Errington ML, Lipp HP. Spatial memory and learning in transgenic mice: fact or artifact? *News Physiol Sci* 1998;13:118-23.
176. Wong, D.F., Wanger, H.N., Dannals, R.F., Links, J.M., Frost, J.J., Ravery, H.T., Wilson, A.A., Rosenbaum, A.E., Gjedde, A., Douglass, K.H., Petronis, J.D., Folstein, M.F., Toung, J.K.T., Burns, H.D., Kuhnar, M.J. (1984). Effects of age on dopamine and serotonin receptors measured by positron tomography in the living human brain. *Science*. 266; 1393-1396.
177. Woodbury M, Fillenbaum G. Psychometric characteristics of the Mini-Mental State Examination in patients with Alzheimer's disease — a grade of membership analysis of CERAD data: part II. *International Journal of Geriatric Psychiatry* 1996;11:543-53.
178. Woodruff-Pak, D.S., Vogel III., R.W., Ewers, M., Coffey, J., Boyko, O.B., Lemieux, S.K., 2001. MRI-assessed volume of cerebellum correlates with associative learning. *Neurobiology of Learning and Memory* 76, 342-357.
179. World Health Organization. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications: report of a WHO Consultation. Part I:

- diagnosis and classification of diabetes mellitus. Geneva, Switzerland: World Health Organization 1999, pp. 31-33.6
180. World Health Organization. International Statistical Classification of Diseases, 10th Revision (ICD-10). Geneva, Switzerland: World Health Organization; 1992.
  181. Xu M, Moratalla R, Gold LH, Hiroi N, Koob GF, Graybiel AM, et al. Dopamine D1 receptor mutant mice are deficient in striatal expression of dynorphin and in dopamine-mediated behavioral responses. *Cell* 1994;79:729–42.
  182. Yaffe K, Haan M, Blackwell T, et al. 2007. Metabolic syndrome and cognitive decline in elderly Latinos: findings from the Sacramento Area Latino Study of Aging study. *J Am Geriatr Soc*, 55:758–62.
  183. Yaffe K, Kanaya A, Lindquist K et al. The metabolic syndrome, inflammation, and risk of cognitive decline. *JAMA* 2004;292:2237–2242.
  184. Yamaguchi H, Aiba A, Nakamura K, Nakao K, Sakagami H, Goto K, et al. Dopamine D2 receptor plays a critical role in cell proliferation and proopiomelanocortin expression in the pituitary. *Genes Cells* 1996;1:253–68.
  185. Yesavage JA, Brink TL, Rose TL, Lum O, Huang V, Adey MB, Leirer VO: Development and validation of a geriatric depression screening scale: A preliminary report. *Journal of Psychiatric Research* 17: 37-49, 1983.