



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

**SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE
BIOMEDICHE**

Direttore della Scuola: Prof. Andrea Fausto Piana

**INDIRIZZO IN FISIOLOGIA, MORFOLOGIA
E FISIOPATOLOGIA DEL SISTEMA NERVOSO**

XXVIII CICLO

**STUDIO DI METALLI PESANTI IN PAZIENTI AFFETTI
DA SCLEROSI LATERALE AMIOTROFICA ED ANALISI
DELLE CORRELAZIONI CLINICHE**

Direttore:

Prof. Andrea Fausto Piana

Tutor:

Prof. Roberto Madeddu

Tesi di dottorato di:

Dott. Riccardo Oggiano

Anno Accademico 2014 - 2015

La presente tesi è stata prodotta nell'ambito della Scuola di Dottorato in Scienze Biomediche dell'Università degli Studi di Sassari, a.a. 2012/2013 – XXVIII ciclo, con il supporto di una borsa di studio finanziata con le risorse del P.O.R. SARDEGNA F.S.E. 2007-2013 - Obiettivo competitività regionale e occupazione, Asse IV Capitale umano, Linea di Attività I.3.1.

INDICE

1 INTRODUZIONE.....	4
1.1 SCLEROSI LATERALE AMIOTROFICA	5
1.1.1 MECCANISMO FISIOPATOLOGICO DELLA SLA	5
1.1.2 DATI STATISTICI SULLA SLA	10
1.2 METALLI	12
1.2.1 CADMIO	13
1.2.2 PIOMBO	13
1.2.3 MERCURIO	14
1.2.4 ALLUMINIO.....	15
1.2.5 MANGANESE	16
1.2.6 ZINCO	16
1.2.7 RAME	17
1.2.8 FERRO	18
1.2.9 SELENIO.....	19
1.2.10 MAGNESIO	20
1.2.11 CALCIO	20
2 OBIETTIVI	22
3 MATERIALI E METODI	24
3.1 CAMPIONAMENTO.....	25
3.2 DETERMINAZIONE DEI METALLI	26
3.3 ANALISI STATISTICHE DEI METALLI.	28
3.4 ANALISI STATISTICHE DELLO STUDIO CLINICO.	28
4 RISULTATI	30

4.1 RISULTATI DEI METALLI.	31
4.2 RISULTATI DELLO STUDIO CLINICO.	34
5 DISCUSSIONE	40
5.1 DISCUSSIONE SUI METALLI.	41
5.2 DISCUSSIONE DELLO STUDIO CLINICO.	49
6. CONCLUSIONI	52
BIBLIOGRAFIA	54

1 Introduzione

Autore: Riccardo Oggiano

Titolo della tesi: Studio di metalli pesanti in pazienti affetti da Sclerosi Laterale Amiotrofica ed analisi delle correlazioni cliniche.

Tesi di Dottorato in: Fisiologia, Morfologia e Fisiopatologia del Sistema Nervoso.

Università degli Studi di Sassari

Pag. 4

1.1 Sclerosi Laterale Amiotrofica

La sclerosi laterale amiotrofica (SLA) è una malattia neurodegenerativa fatale che insorge nell'età adulta ed è caratterizzata dalla progressiva perdita dei motoneuroni nella corteccia motoria, nel tronco cerebrale e nel midollo spinale. La malattia provoca atrofia muscolare, paralisi e inevitabilmente la morte di solito entro 2-5 anni dalla diagnosi.

Esistono due forme di SLA: quella sporadica (SLAs) e quella familiare (SLAf). SLAs rappresenta circa il 90-95% dei casi mentre la familiare il restante 5-10%. I quattro geni più importanti coinvolti nella malattia sono: C9ORF72, responsabile di ca. 40% dei casi familiari e 5-7% dei casi sporadici, che dà luogo ad una espansione di una ripetizione intronica esanucleotidica; il gene SOD1 sul cromosoma 21 (circa il 20% dei casi familiari e 2-7% dei casi sporadici), che codifica per la Rame/Zinco Super Ossido Dismutasi (Cu/Zn-SOD); il gene FUS sul cromosoma 16 (circa il 5% dei casi familiari e <1% dei casi sporadici), che codifica per la proteina fus; e TARDBP (circa il 3% dei casi familiari e 1,5% dei casi sporadici), che codifica per la TAR DNA binding protein-43 (TDP-43).

1.1.1 Meccanismo fisiopatologico della SLA

L'esatto meccanismo molecolare che porta alla degenerazione del motoneurone (MN) che poi sfocia nella SLA è sconosciuto. Come per altre malattie neurodegenerative, è probabile che ci sia una complessa interazione tra molteplici meccanismi cellulari

patogenetici che non si escludono a vicenda e in cui è ancora sconosciuto il rapporto causale tra loro o se siano una conseguenza di un disturbo a monte (Shaw, 2005; Pasinelli e Brown, 2006; Ferraiuolo et al, 2011). La gamma completa di meccanismi fisiopatologici coinvolti nella morte del motoneurone nella SLA è riassunto in Fig 1.

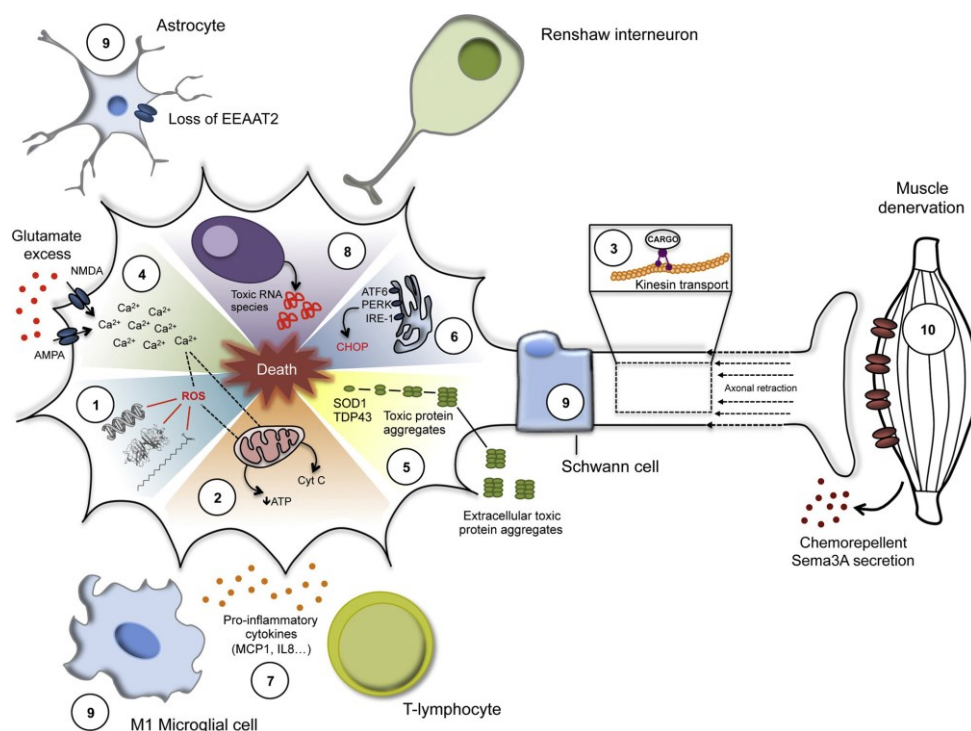


Figura 1: Principali meccanismi fisiopatologici che contribuiscono alla degenerazione del motoneurone nella SLA: (1) stress ossidativo, (2) disfunzione mitocondriale, (3) compromissione del trasporto assonale, (4) eccitotossicità, (5) aggregazione di proteine, (6) stress del reticolo endoplasmatico, (7) neuro-infiammazione, (8) processamento anormale dell'RNA, (9) cellule non neuronali e (10) il contributo del muscolo bersaglio (da Mancuso e Navarro 2015).

Lo stress ossidativo è uno di questi, deriva dallo squilibrio tra la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e la capacità del sistema biologico di rimuoverle o riparare il danno che queste inducono. Anche se lo stress ossidativo di per sé non può essere molto dannoso, l'accumulo di ROS può essere un fattore importante che riduce la capacità della cellula di far fronte a una

situazione patologica basale. La scoperta che i difetti nel gene che codifica per SOD1 (Rosen, 1993) sono stati associati con casi di SLA familiare, ha accresciuto l'interesse per la possibilità che lo stress ossidativo possa contribuire alla morte del MN. Tuttavia, ulteriori esperimenti hanno dimostrato che la morte del MN era legata all'anomalo accumulo di SOD1 mutata (mSOD1) invece che alla perdita di attività della proteina, poiché nei topi la delezione della SOD1 non porta alla degenerazione del MN (Reaume et al, 1996). L'analisi sia di liquor che di siero in pazienti affetti da SLA_f e SLA_s ha messo in evidenza un aumento della concentrazione di prodotti dannosi indotti dallo stress ossidativo (Lyras et al, 1996;. Smith et al, 1998; Simpson et al, 2004; Mitsumoto et al, 2008). In questo senso, prove di danno ossidativo alle proteine (Shaw et al, 1995b), ai lipidi (Simpson et al, 2004) e al DNA (Bogdanov et al, 2000) sono state trovate nei tessuti di pazienti affetti da SLA. Un altro fattore che causa danno al MN riguarda la disfunzione mitocondriale. Numerosi studi hanno messo in evidenza il ruolo comune dei mitocondri nella patogenesi di malattie neurodegenerative (Lin e Beal, 2006). Ci sono prove che implicano i mitocondri come protagonisti nella fisiopatologia della SLA (Shi et al, 2010), tant'è che nel midollo spinale di pazienti con SLA è stato trovato un ridotto contenuto di DNA mitocondriale associato ad un aumento delle mutazioni nello stesso e a una ridotta attività dei complessi della catena respiratoria (Hirano et al, 1984; Wiedemann et al, 2002). Disturbi della funzione mitocondriale sono stati riportati anche nel muscolo scheletrico di pazienti affetti da SLA (Wiedemann et al, 1998). Una delle principali prove che sostengono che il deficit nel trasporto assonale contribuisca alla neuro-degenerazione è l'accumulo di organelli e altre proteine osservato nel corpo cellulare e nell'assone in uomini affetti da

malattie neurodegenerative (De Vos et al, 2008). Per quanto riguarda la SLA, alcuni lavori mostrano l'accumulo di neurofilamenti nei corpi cellulari dei MNs di pazienti umani, suggerendo che il trasporto assonale sia alterato in queste cellule (Hirano et al, 1984; Schmidt et al, 1987; Julien, 1997; Julien et al, 1998). In più, anomalie nel traffico assonale di organelli sono state descritte nei pazienti con SLA (Breuer et al, 1987). Il danno neuronale causato da mediatori eccitatori, noto come eccitotossicità, risulta dall'eccessiva attivazione dei recettori del glutammato, e può essere causato dalla mancanza di clearance del neurotrasmettitore dallo spazio sinaptico o dalla maggiore sensibilità postsinaptica al glutammato. Le prove più importanti a sostegno del ruolo dell'eccitotossicità nella fisiopatologia della SLA sono i dati che mostrano un aumento di tre volte del livello di glutammato nel CSF di pazienti SLA (Perry et al, 1990; Shaw et al, 1995a) e i benefici ottenuti dal riluzolo come farmaco anti-eccitotossico (Ludolph e Jesse, 2009).

Inclusioni o aggregati proteici sono da tempo riconosciuti come un segno patologico distintivo in diverse malattie neurodegenerative, tra cui la SLA, in cui aggregati proteici sono comuni nei MNs spinali. Inclusioni ubiquitina-positive sono caratteristiche dell'istopatologia della SLA (Picher-Martel et al, 2015). Tuttavia, rimane sconosciuta se la formazione delle inclusioni è responsabile della tossicità cellulare e della patogenesi della SLA, se gli aggregati possono essere prodotti innocui derivati dalla neuro-degenerazione o se possono rappresentare una reazione protettiva della cellula per ridurre le concentrazioni intracellulari di proteine tossiche. Anche i meccanismi che il reticolo endoplasmatico (ER) mette in atto in risposta allo stress, sono

implicati nella degenerazione del MN, come dimostrato da diversi autori (Atkin et al, 2006; Atkin et al, 2008; Saxena et al, 2009). L'identificazione di TDP-43, una proteina che lega RNA e DNA, come una componente importante delle inclusioni proteiche ubiquitinate nei pazienti affetti da SLA (Neumann et al, 2006), ha focalizzato l'attenzione sull'alterazione dell'RNA come un importante meccanismo fisiopatologico. TDP-43 è prevalentemente localizzata nel nucleo in cui è implicata in una serie di eventi per l'elaborazione dell'RNA, tra cui la regolazione trascrizionale, lo splicing alternativo e il processamento dei microRNA. Inclusioni citoplasmatiche TDP-43-positive correlate alla SLA sono state trovate in cellule neuronali e non-neuronali (Mackenzie et al, 2007 e 2010). Anche la neuroinfiammazione è un evento patologico comune in diversi disturbi neurodegenerativi (Khandelwal et al, 2011) e la sua regolazione è stata proposta come un potenziale target terapeutico (Yong e Rivest, 2009). Nella SLA, i danni subiti dai MNs portano all'attivazione della microglia, degli astrociti e del sistema del complemento, contribuendo ulteriormente alla neurodegenerazione (Troost et al, 1990; Zhao et al, 2013). L'analisi di tessuti del midollo spinale e di CSF di pazienti SLAs e SLAf ha mostrato un aumento dell'attivazione della microglia e dell'infiltrazione delle cellule T (Henkel et al, 2004; Sta et al, 2011), e una più alta concentrazione di alcuni mediatori proinfiammatori, tra cui la MCP-1 e IL-8 (Kuhle et al, 2009). È ormai accertato che anche le cellule gliali hanno un ruolo cruciale nella degenerazione del MN (Ilieva et al, 2009; Valori et al, 2014). L'analisi dell'eccitabilità dell'assone motorio nei pazienti con SLA ha dato prove evidenti di anomalie nella depolarizzazione, coerente con un aumento della conduttanza al sodio e una riduzione della conduttanza al potassio (Bostock et al, 1995; Kanai

et al, 2006; Vucic e Kiernan, 2006 a, b; Cheah et al, 2012). Questi cambiamenti di eccitabilità descritti nei pazienti con SLA non sono stati osservati in topi SOD1^{G93A} (Boërio et al, 2010). Infine, ci sono prove a sostegno che la SLA sia una assonopatia distale, in cui i cambiamenti patologici si verificano a livello della giunzione neuromuscolare prima della degenerazione del MN. Patologie del muscolo scheletrico e precoci anomalie funzionali si verificano in SLAs (Vielhaber et al, 1999; Krasnianski et al, 2005; Echaniz-Laguna et al, 2006) e SLAf (Comi et al, 1998; Corti et al, 2009) e nei modelli di topi transgenici (Derave et al, 2003; Dupuis et al, 2004; Mahoney et al, 2006). Tuttavia, queste anomalie nel muscolo scheletrico sono generalmente state interpretate come secondarie rispetto all'inizio della malattia (Mancuso e Navarro 2015).

1.1.2 Dati statistici sulla SLA

L'età media di esordio è di ca. 60 anni per la forma sporadica e ca. 50 anni per quella familiare, la forma sporadica è più frequente negli uomini che nelle donne (Kiernan et al, 2011). La SLA ha una incidenza a livello mondiale di circa 2 casi per 100.000 soggetti e una prevalenza che varia dai 4 ai 7 casi per 100.000 soggetti (Eisen, 2002). Chiò et al (2013) hanno riportato un'incidenza di 1,75 e una prevalenza di 3,4 per 100.000 soggetti negli Stati Uniti d'America, mentre in Europa si registra un'incidenza di 2,1 e una prevalenza di 5,4 per 100.000 soggetti. In Italia, l'incidenza è di circa 2-3 casi ogni 100.000 soggetti mentre la prevalenza SLA è di ca. 7 casi per 100.000 soggetti (Logroscino et al, 2008). In particolare, è stato riportato che in Sardegna il tasso di prevalenza è più elevato, con ca. 8 casi ogni 100.000 soggetti (FIASO-AISLA, 2012). Altre fonti hanno riferito che nel 2012 circa 170 soggetti

con SLA vivevano in Sardegna e sono stati stimati 50 nuovi casi all'anno (AISLA, 2015), come mostrato in Fig 2. Il tasso più elevato di casi di SLA in Sardegna riflette probabilmente la natura incontaminata della popolazione combinata con l'effetto del fondatore (Cavalli-Sforza et al, 1994; Caselli et al, 2006). I due geni maggiormente coinvolti nella SLA di pazienti sardi sono l'allele-A382T codificante TARDBP e l'espansione della ripetizione C9ORF72 (Chiò et al, 2011). In questo contesto, Borghero et al (2014) hanno trovato che più del 40% di tutti i casi di SLA sardi portava una mutazione a uno dei due suddetti geni, che rappresenta la più alta percentuale di casi SLA geneticamente trovati al di fuori della Scandinavia e in gran parte superiori rispetto ad altre popolazioni caucasiche. Inoltre, la popolazione dell'isola ha un'unica alta incidenza di diverse malattie autoimmuni come il diabete di tipo 1 (Forte et al, 2013) e la sclerosi multipla (SM) (Madeddu et al, 2011).



Figura 2. Dati sui malati di SLA in Italia con il dettaglio regione per regione.
***Numero stimato malati prevalenti/Numero stimato nuovi malati all'anno.**
Stime dati Eurals 2012.

1.2 Metalli

I metalli pesanti sono metalli di transizione con numero atomico superiore a quello del ferro e con densità molto elevata, ai quali vengono normalmente aggiunti altri elementi che, pur non appartenendo a tale gruppo, hanno proprietà chimiche e fisiche molto simili. Fanno parte di questa particolare categoria anche i cosiddetti micronutrienti o microelementi, che sono essenziali alla nutrizione e alla crescita di piante ed animali e possono essere dannosi solo nel caso in cui le loro concentrazioni superino o vadano al di sotto di un certo valore-soglia che varia da elemento ad elemento e da organismo ad organismo. Altri metalli pesanti non svolgono alcun ruolo biologico e la loro presenza è considerata sempre potenzialmente tossica. C'è da aggiungere che sono presenti naturalmente nella crosta terrestre e che la maggior

Autore: Riccardo Oggiano

Titolo della tesi: Studio di metalli pesanti in pazienti affetti da Sclerosi Laterale Amiotrofica ed analisi delle correlazioni cliniche.

Tesi di Dottorato in: Fisiologia, Morfologia e Fisiopatologia del Sistema Nervoso.

Università degli Studi di Sassari

parte di questi elementi non sono degradati dall'attività biologica per cui possono rimanere nell'ambiente per migliaia di anni. Si accumulano nell'organismo umano (in particolar modo nel fegato, nei reni, nel cervello e nelle ossa) ostacolando il normale svolgimento di determinate funzioni vitali e danneggiando alcuni organi. L'eliminazione di questi metalli è quasi assente.

1.2.1 Cadmio

Il cadmio (Cd) è un elemento chimico con numero atomico 48. Si trova principalmente nei minerali dello zinco e viene utilizzato soprattutto in agricoltura e nell'industria per la produzione di pile nichel-cadmio, nei pigmenti, nelle vernici e nelle materie plastiche. Il cadmio può essere assorbito dall'uomo per via cutanea, alimentare o inalatoria. Non svolge nessun ruolo biologico e risulta essere tossico già a bassissime concentrazioni. Provoca danni a carico del sistema nervoso, sostituisce lo zinco nelle arterie rendendole meno flessibili e creando disturbi cardiovascolari, altera il metabolismo di calcio e fosforo dando luogo ad osteoporosi e fragilità dentale, antagonizza lo zinco interferendo nella produzione di insulina e nel metabolismo del testosterone ed inoltre può provocare alopecia, diarrea, deficit immunologici e renali.

1.2.2 Piombo

Il piombo (Pb) è un elemento chimico con numero atomico 82. Nella crosta terrestre si trova in grandi quantità soprattutto nel minerale galena (PbS). Ha un ampio utilizzo: batterie, accumulatori, tubi, cavi, vernici, come schermo contro le radiazioni, come antidetonante nella benzina e nelle saldature in

lega con lo stagno. Il piombo figura al 2° posto nella lista delle sostanze pericolose indicate dall' Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) nel 1999. L'inquinamento ambientale da Pb arriva all'uomo non solo attraverso l'aria inquinata ma anche attraverso l'acqua e l'alimentazione, viene assorbito essenzialmente attraverso la respirazione e la nutrizione. Questo metallo non viene metabolizzato ma per la maggior parte è escreto attraverso le normali vie, il restante si accumula nei tessuti e in particolare nel sangue, nei tessuti minerali (ossa) e nei tessuti molli (reni, midollo osseo, fegato e cervello). Provoca danni al sistema nervoso (con demielinizzazione delle fibre nervose), può provocare encefalopatia, neuropatia e in più può interferire con le normali vie di neurotrasmissione; può causare nefropatie e inibire alcuni enzimi agendo sui gruppi sulfidrilici liberi impedendo che possano essere utilizzati da enzimi a cui sono indispensabili e in più, il Pb ostacola la sintesi dell'eme.

1.2.3 Mercurio

Il mercurio (Hg) è un elemento chimico con numero atomico 80. Si trova principalmente legato allo Zolfo nel minerale cinabro. Ha svariati impieghi: nella preparazione di prodotti chimici industriali (catalizzatori, coloranti, insetticidi), in campo elettrico ed elettronico, in termometri, barometri e molti altri strumenti da laboratorio ed è utilizzato con altri metalli per realizzare l'amalgama delle otturazioni dentali. Non ha nessun ruolo biologico ed è molto tossico. Le principali vie di assorbimento umano sono quella inalatoria, quella orale (il consumo di pesce è la più importante causa di esposizione all'ingestione di questo metallo) e quella cutanea (è in grado di attraversare la pelle).

L'intossicazione acuta a questo metallo provoca broncopolmonite, con sintomi neurologici a livello del SNC e dell'apparato gastrointestinale, invece l'intossicazione cronica si presenta con tremori, forme di allucinazioni, danno renale, neuro-tossicità a livello della corteccia cerebrale e del cervelletto, alterazioni dei movimenti, debolezza muscolare, perdita della vista e dell'udito.

1.2.4 Alluminio

L'alluminio (Al) è un elemento chimico con numero atomico 13. Non è un vero e proprio metallo pesante e si estrae principalmente dai minerali di bauxite. L'Al viene usato in molte industrie per la fabbricazione di tantissimi diversi prodotti, grazie alle sue caratteristiche. Lo troviamo in tutti i mezzi di trasporto, imballaggi, costruzioni, beni di consumo durevoli, linee elettriche, macchinari, armi e proiettili. Il maggiore assorbimento di questo elemento avviene a livello intestinale anche se la maggior parte di questo metallo viene escreta con le feci. Tuttavia a dosi elevate tende ad accumularsi nei polmoni, nei reni, nelle ossa, nel cervello, nel fegato e nella tiroide. Nessun sistema vivente utilizza l'alluminio per i processi biochimici. Perciò possiamo ritenerlo tossico. Anche se prima si pensava che non fosse dannoso e che addirittura non venisse assorbito dall'organismo (questo giustifica il suo larghissimo impiego anche in campo alimentare) ora si sa che non è così. Un sovraccarico di Al ha effetti nocivi sul SNC, sui reni, sui polmoni e sull'apparato digerente. Altri effetti di una intossicazione da alluminio possono essere: perdita della memoria, indebolimento e tremore.

1.2.5 Manganese

Il manganese (Mn) è un elemento chimico con numero atomico 25. Giacimenti di manganese sono frequenti sulla crosta terrestre e si trova in grandi quantità anche sul fondale degli oceani. Viene utilizzato come componente chiave per gli acciai inossidabili e in alcune leghe di alluminio, è usato come catalizzatore e come pigmento in vernici. Viene assorbito nell'intestino tenue e ne viene eliminata una piccola quantità attraverso le feci. È essenziale per l'uomo perché implicato in tantissime vie metaboliche oltre ad avere anche un ruolo antiossidante. Tra le tante funzioni del manganese si annoverano il benessere del sistema nervoso e del cervello, il mantenimento della produzione degli ormoni sessuali, il normale sviluppo dello scheletro, il buon funzionamento del sistema immunitario e la formazione del sangue. Il Mn è presente in piccole dosi nelle ossa, nell'ipofisi, nel pancreas, nella mucosa intestinale, nel fegato e in altri tessuti. Se da un lato la carenza di manganese nell'organismo non scatena effetti gravi indiscutibilmente dimostrati, dall'altro l'eccesso di questo minerale può avere gravi riflessi sulla salute dell'uomo. L'intossicazione da manganese può manifestarsi con debolezza, difficoltà psicologiche e motorie, instabilità, anoressia, apatia, crampi alle gambe, emicranie, astenia, cambiamenti polmonari, difficoltà di locuzione, spasmi e rigidità muscolari, impotenza e morbo di Parkinson.

1.2.6 Zinco

Lo zinco (Zn) è un elemento chimico con numero atomico 30. Lo troviamo nella crosta terrestre allo stato minerario legato ad altri

metalli. Trova diversi impieghi: è usato per galvanizzare i metalli, in diverse leghe e nella produzione di parti di autoveicoli, elettrodomestici, giocattoli, bottoni, cerniere, vernici ad acqua. Viene rapidamente assorbito nella parte superiore dell'intestino tenue ed eliminato per la maggior parte attraverso le feci. È essenziale per l'organismo umano, tant'è che per quantità, è secondo solo al Fe tra tutti gli oligoelementi. È un elemento costitutivo di oltre 2000 enzimi, oltre ad avere un'importante funzione strutturale, regolatoria e antiossidante. La carenza di Zn ostacola la produzione di energia, la sintesi delle proteine, la formazione del collagene e la tolleranza all'alcool oltre a causare una riduzione della produzione di linfociti e macrofagi, e condizionare pesantemente la crescita corporea e l'aumento di peso. Mentre un suo eccesso causato dall'assunzione prolungata può dare nausea, vertigini, perdita della coordinazione muscolare, sonnolenza, fastidi gastrointestinali, apatia, insufficienza renale, anemia e vomito.

1.2.7 Rame

Il rame (Cu) è un elemento chimico con numero atomico 29. In natura lo troviamo quasi sempre sotto forma di minerali e molto più raramente sotto forma di pepite. Ha tantissimi utilizzi: fili e cavi elettrici, motori elettrici, tubature, maniglie, pomelli, sculture e in leghe per il conio di monete solo per citarne alcuni. L'assorbimento di questo metallo avviene nello stomaco e nella parte superiore dell'intestino, anche se la maggior parte di quello che viene assunto col cibo viene eliminata nelle feci, nella bile e una piccola quantità nelle urine. È un metallo essenziale per l'organismo umano e ha numerosi ruoli. Tra i più importanti,

partecipa alla formazione e il mantenimento della mielina, alla sintesi di neurotrasmettitori, alla sintesi dell'emoglobina e alla produzione di collagene e noradrenalina; oltre ad avere effetti antiossidanti, contribuisce alla produzione di melanina e partecipa al metabolismo delle proteine e in più è presente in molti enzimi, come la Cu-Zn Super Ossido Dismutasi (SOD1). La carenza di Cu ha notevoli ripercussioni su certi tipi di cellule, a livello del sistema emopoietico e causa ingrossamento cardiaco, degenerazione e aneurismi alle arterie. Un eccesso di rame può aggravare l'ipertensione e può causare balbuzie, autismo, iperattività infantile, tossiemia gravidica, tensione premestruale, depressione, insonnia, senilità, calvizie precoce, pigmentazione facciale, dolori alle articolazioni, ipoglicemia funzionale, cirrosi epatica, ipoproteinemia, carenza di niacina, infezioni, attacchi di cuore, leucemia e malattie mentali. I casi di intossicazione più grave possono dare tachicardia, ipertensione, ittero, uremia, coma e morte.

1.2.8 Ferro

Il ferro (Fe) è un elemento chimico con numero atomico 26. È l'elemento più abbondante nella crosta terrestre, si trova per lo più nei minerali ematite e magnetite. È il metallo in assoluto più usato dall'umanità, rappresenta da solo il 95% della produzione di metalli del mondo. un materiale da costruzione indispensabile, specialmente nella realizzazione di automobili, di scafi di navi e di elementi portanti di edifici. Entra nell'organismo per via orale e viene assorbito nel duodeno. Il Fe è essenziale per gli esseri viventi, costituisce infatti una parte dell'emoglobina oltre a partecipare a processi enzimatici e di ossidoriduzione. Sebbene sia

un elemento di vitale importanza, l'eccesso di ferro porta all'emocromatosi, malattia che causa danni ad alcuni organi importanti, come il fegato, il pancreas ed il cuore. I sintomi da eccesso di ferro sono dunque riscontrabili in: affaticamento cronico, dolori agli arti, aritmie e insufficienze o disturbi cardiaci, cambiamento del colore della pelle, ciclo mestruale irregolare o assente, osteoporosi, impotenza o sterilità, caduta dei capelli, depressione e sbalzi d'umore, fino a patologie più gravi quali Parkinson, infarti e cancro. La carenza di Fe può portare debolezza e sonnolenza, eccessivo affaticamento durante le comuni attività quotidiane, irregolarità cardiaca, sensibilità al freddo, pallore, ulcere sulla lingua e mal di testa.

1.2.9 Selenio

Il selenio (Se) è un elemento chimico con numero atomico 34. Non è un vero e proprio metallo. In natura si trova in minerali costituiti da solfuri come la pirite. Trova impiego in elettronica, nelle fotocellule e nelle celle fotovoltaiche oltre ad essere stato usato anche nei diodi fino agli anni settanta. È impiegato per decolorare il vetro e per migliorare la resistenza all'abrasione della gomma vulcanizzata. usato anche nell'industria della riproduzione per fotocopia e nella fotografia. Viene assorbito per via gastrointestinale ed eliminato per via polmonare e urinaria. È un micronutriente essenziale con proprietà antiossidanti, in più è implicato nel funzionamento degli ormoni tiroidei, nella fertilità, nella risposta immunitaria ed infiammatoria e svolge un'importante azione anticancro per prostata, colon e polmoni. ma è tossico ad alte dosi. La carenza di questo elemento è associata a malattie cardiovascolari, neurodegenerative e cancro.

L'eccesso di selenio può portare a gravi danni sulla salute: spossatezza, nausea, debolezza, alitosi, alopecia, vomito, problemi gastrici, confusione mentale e nei casi più gravi anche alterazioni neurologiche con convulsioni, sonno eccessivo e problemi motori.

1.2.10 Magnesio

Il magnesio (Mg) è un elemento chimico con numero atomico 12. È un elemento molto abbondante sulla crosta terrestre e si trova disciolto nell'acqua marina. Si trova combinato con altri elementi ed è utilizzato nella produzione di leghe, come additivo, in agricoltura e nell'industria chimica. È presente in numerosi alimenti perché si trova nella clorofilla, viene assorbito nell'intestino tenue ed è eliminato tramite feci e urina. È essenziale per l'organismo umano perché è responsabile di molti processi metabolici essenziali, come la formazione dell'urea, la trasmissione degli impulsi muscolari, la trasmissione nervosa e la stabilità elettrica cellulare oltre ad essere coinvolto nella sintesi e nell'utilizzo dell'ATP. L'ipomagnesimia dovuta a scarso assorbimento dà anoressia, nausea, vomito, aumento dell'eccitabilità muscolare, vasodilatazione, aritmia e coma, mentre un suo eccesso determina depressione del SNC causando torpore, prostrazione, disturbi dell'attività cardiaca e respiratoria.

1.2.11 Calcio

Il calcio (Ca) è un elemento chimico con numero atomico 20. Questo elemento metallico si trova in grandi quantità nel calcare, nel gesso e nella fluorite, tutte rocce di cui è un componente fondamentale. Viene usato nell'estrazione mineraria ed è essenziale per tutta la vita. Lo troviamo in tantissimi alimenti e

nelle acque, il suo assorbimento avviene nell'intestino ma la maggior parte viene espulso tramite feci, urine e sudore. È l'elemento più abbondante nell'organismo umano. Ha una funzione strutturale fondamentale poiché costituisce le ossa. Lo troviamo nelle ossa anche come riserva, dato che può essere mobilizzato per ottemperare ad alcuni fabbisogni cellulari e plasmatici e per ovviare alla scarsità di altri minerali. Fondamentale in diversi meccanismi: attivazioni enzimatiche, trasmissione dell'impulso nervoso, contrazione muscolare, permeabilità delle membrane, moltiplicazione e differenziazione cellulare. Un eccesso di calcio è rarissimo e può dipendere da infiammazioni in corso o malfunzionamento della tiroide, e causare stitichezza, acidità gastrica, nausea e problemi allo stomaco. La sua carenza può determinare un mancato raggiungimento di densità ossea, provoca dolori muscolari e scheletrici, debolezza, fragilità ossea e osteoporosi.

2 Obiettivi

Autore: Riccardo Oggiano

Titolo della tesi: Studio di metalli pesanti in pazienti affetti da Sclerosi Laterale Amiotrofica ed analisi delle correlazioni cliniche.

Tesi di Dottorato in: Fisiologia, Morfologia e Fisiopatologia del Sistema Nervoso.

Università degli Studi di Sassari

Pag. 22

Abbiamo in letteratura esempi di popolazioni geograficamente limitate che presentano un alto tasso di incidenza della SLA e questo porta a sospettare che l'ambiente possa giocare un ruolo importante nell'insorgere della malattia. Quindi lo studio di un campione della popolazione sarda, che mostra un aumentato tasso di SLA rispetto al resto dell'Italia, e che ha un suo peculiare pattern genetico, può aggiungere informazioni originali allo stato dell'arte. Inoltre, l'esposizione sia ambientale che professionale a metalli tossici, è stata proposta come uno dei vari possibili fattori di rischio della malattia, oltre al fatto che si pensa che i metalli possono contribuire all'insorgere della SLA.

Obiettivo 1: valutare la concentrazione di metalli pesanti ed altri elementi in pazienti SLA residenti in Sardegna e confrontarli con controlli sani. Non sono disponibili infatti dati che mostrano l'associazione della malattia con i metalli quantificati direttamente in tre matrici biologiche (sangue, urina e capelli) prelevate da pazienti sardi. Le tre matrici prese in esame hanno diversi obiettivi: il sangue riflette l'esposizione ai metalli a breve o medio termine mentre le urine riflettono recenti esposizioni. Discorso a parte meritano i capelli, che sono considerati un vero e proprio deposito di stoccaggio. Considerando la loro crescita, circa 1 cm al mese, possono essere presi in considerazione per determinare il carico dei metalli per un lungo periodo di tempo.

Obiettivo 2: correlare la concentrazione dei metalli con altri dati quali la progressione della malattia valutata tramite la "ALS Functional Rating Scale – Revised" (ALSFRS_r), il sito di insorgenza e la dieta.

3 Materiali e metodi

Autore: Riccardo Oggiano

Titolo della tesi: Studio di metalli pesanti in pazienti affetti da Sclerosi Laterale Amiotrofica ed analisi delle correlazioni cliniche.

Tesi di Dottorato in: Fisiologia, Morfologia e Fisiopatologia del Sistema Nervoso.

Università degli Studi di Sassari

Pag. 24

3.1 Campionamento

Trentaquattro soggetti affetti da SLA definita secondo i criteri di El Escorial e 30 controlli sani hanno partecipato a questo studio. Tutti i soggetti erano nativi della Sardegna e con la stessa origine etnica. I pazienti affetti da SLA sono stati reclutati da tre presidi medici della Sardegna: l'ospedale di Ozieri, l'azienda ospedaliero universitaria di Sassari e l'ospedale di Macomer. I controlli erano dei donatori volontari, non affetti da malattie neurologiche, e residenti nelle stesse aree geografiche dei pazienti. Lo studio è iniziato nel 2013. Ciascun soggetto ha firmato un consenso informato e un questionario con i dati personali (sesso, età, indice di massa corporea, il tipo e la durata della malattia, il fumo e il consumo di alcol, la presenza di protesi metalliche, esposizione professionale a metalli). Tutti i pazienti (tranne uno) hanno poi compilato una scheda con le abitudini alimentari e la ALSFRSr. Tutti i soggetti erano non fumatori e non bevitori. Considerando il lavoro, nessuno dei 64 soggetti è stato esposto professionalmente ai metalli e nessuno di loro aveva protesi metalliche nel corpo. In tabella 1 sono riassunte le caratteristiche dei pazienti e dei controlli.

	SLA	Controlli
Numero dei soggetti	34	30
Età media (anni)	61.9±9.7	64.9±11.0
BMI media (kg/m ²)	23.6±3.3	25.3±3.5
Durata media della malattia (anni)	5.50±2.65	
Sesso (n.ro)		
Femmine	13	12
Maschi	21	18
Tipo di SLA (n.ro)		
Familiare	1	
Sporadica	33	
Luogo di insorgenza (n.ro)		
Bulbare	16	
Spinale	18	

Tabella 1: Caratteristiche descrittive dei pazienti e dei controlli.

3.2 Determinazione dei metalli

Ad ogni soggetto sono stati prelevate le tre matrici biologiche: sangue, capelli e urine.

Il sangue è stato raccolto in provette di potassio-EDTA vacutainer BD (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA) dedicate all'analisi dei metalli e conservate a -20°C fino al momento dell'elaborazione. Campioni di 1 ml di sangue sono stati digeriti in tubi di plastica da 15 ml (Falcon, Becton, Franklin Lakes, Stati Uniti d'America) con 2 ml di Suprapur HNO₃ concentrato (Romil Ltd, Cambridge, UK) a 80° C per 3 ore (ModBlock, CPI Internazionale,

Autore: Riccardo Oggiano

Titolo della tesi: Studio di metalli pesanti in pazienti affetti da Sclerosi Laterale Amiotrofica ed analisi delle correlazioni cliniche.

Tesi di Dottorato in: Fisiologia, Morfologia e Fisiopatologia del Sistema Nervoso.

Università degli Studi di Sassari

USA) e poi diluiti con acqua deionizzata ultrapura. Per la precisione della procedura analitica, è stato utilizzato come materiale di riferimento certificato (CRM) di livello 1 sangue umano intero Seronorm liofilizzato (Sero AS, Billingstadt, Norvegia) e la media dei recuperi dei metalli è stata trovata nel range di 97% -108% dei valori certificati. La ripetibilità intra-giornaliera variava da 1,3% a 5,3%.

I campioni di capelli sono stati tagliati dalla zona sub-occipitale della testa a circa 1 cm dal cuoio capelluto, raccolti in sacchetti di plastica individuali e conservati fino all'utilizzo. Il livello endogeno del contenuto dei metalli nei capelli è significativamente influenzato dalla contaminazione esterna causata da polvere, contaminanti ambientali, sudore e desquamazione dell'epidermide, così come da detergenti e trattamenti cosmetici. Per queste ragioni, i campioni di capelli sono stati sottoposti a lavaggio esterno adeguato per quantificare solo internamente il livello dei metalli (Forte et al, 2005). Dopo questa procedura, i capelli sono stati essiccati, pesati e digeriti in forno a microonde con una miscela di $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ diluita con acqua deionizzata. Il CRM utilizzato per verificare l'esattezza metodo è stato il BCR 397 e i recuperi medi variavano tra 96% -105% dei valori certificati. La ripetibilità intra-giornaliera era compresa tra 1,2% e 6,1%.

I campioni di urina sono stati raccolti in flaconi di polietilene ad alta densità (Kartell, Milano, Italia) e conservati a -20°C fino all'analisi. 1 ml di urina è stato prelevato da ciascun contenitore, quindi è stato aggiunto 0,1 ml di HNO_3 e diluito con acqua ultrapura deionizzata. Come CRM è stata usata l'urina umana liofilizzata Seronorm (livello 1, Sero AS) e i recuperi medi sono stati

trovati tra il 96% e il 110% dei valori certificati. Ripetibilità Intra-giornaliera variava dal 1,8% al 6,9%.

La determinazione dei metalli è stata effettuata tramite uno spettrometro di massa a plasma accoppiato induttivamente ad alta risoluzione (ICP-HR-MS) della Thermo Scientific Element 2 (Brema, Germania). La modalità a bassa risoluzione (LR, $m/\Delta m=300$) è stata utilizzata per la determinazione di Cd^{114} , Hg^{202} e Pb^{208} , la modalità a media risoluzione (MR, $m/\Delta m=4000$) è stata utilizzata per la determinazione di Al^{27} , Ca^{44} , Cu^{63} , Fe^{56} , Mg^{26} , Mn^{55} e Zn^{66} , mentre la modalità ad alta risoluzione (HR, $m/\Delta m=10,000$) è stata utilizzata per la determinazione del Se^{82} ; come standard interno nell'LR e nell'HR è stato utilizzato In^{115} , mentre nell'MR è stato utilizzato il Ga^{69} .

3.3 Analisi statistiche dei metalli.

Poiché i dati non erano distribuiti normalmente, i risultati sono stati espressi come mediana (P50), 5° e 95° percentile (P5-P95). Le differenze tra metalli in pazienti affetti da SLA e nei controlli, le interazioni metallo-metallo e le associazione metallo-variabili (sesso, età, indice di massa corporea, la durata della malattia e tipo di malattia) sono stati testati da test non parametrici (U Mann-Whitney, Kruskal-Wallis, ρ di Spearman) e valori di $p < 0,05$ sono stati considerati statisticamente significativi. IBM SPSS Statistics 21 è stato utilizzato come pacchetto statistico.

3.4 Analisi statistiche dello studio clinico.

Il test Shapiro Wilks è stato applicato per valutare se i dati presi in considerazione fossero distribuiti normalmente. Risultano essere

distribuiti normalmente solo il Mg, il Fe, lo Zn e il Se nel sangue e il Mg nelle urine ($p < 0,05$). Tutti le altre variabili presentano distribuzione asimmetrica non normale. Solo per le variabili con distribuzione normale sono stati applicati i test parametrici, per le restanti sono stati utilizzati test non parametrici.

È stata testata la differenza tra le concentrazioni media dei metalli e i pazienti divisi per il sito di insorgenza della malattia (bulbare e spinale), applicando il test t di Student per campioni indipendenti solo per le variabili con distribuzione normale mentre per le variabili con distribuzione non normale è stato applicato il Wilcoxon Rank test.

Tutti i pazienti (tranne uno) hanno compilato la ALSFRSr. In base ai valori della ALSFRSr, i pazienti sono stati divisi in due gruppi: il gruppo 1 (17 soggetti) i cui valori variavano da 0 a 31 e il gruppo 2 (16 soggetti) i cui valori variavano da 32 a 48. Successivamente si è andati a calcolare la mediana, il 5° e il 95° percentile delle concentrazioni dei metalli nei due gruppi. Successivamente è stato applicato il Wilcoxon test per testare le differenze delle mediane tra i due gruppi. Le concentrazioni statisticamente significative secondo il test di Wilcoxon sono state poi analizzate con un test di regressione logistica per valutare il contributo delle singole variabili sulla gravità della malattia. Infine è stato applicato il test di Kolmogorov per testare la differenza tra le mediane dei controlli e dei due gruppi di pazienti. Il pacchetto statistico utilizzato è stato il software Stata 12.

4 Risultati

Autore: Riccardo Oggiano

Titolo della tesi: Studio di metalli pesanti in pazienti affetti da Sclerosi Laterale Amiotrofica ed analisi delle correlazioni cliniche.

Tesi di Dottorato in: Fisiologia, Morfologia e Fisiopatologia del Sistema Nervoso.

Università degli Studi di Sassari

Pag. 30

4.1 Risultati dei metalli.

In accordo con le statistiche trovate in bibliografia, nel nostro studio abbiamo trovato un solo caso di SLA familiare sui 34 totali analizzati. Infatti sappiamo che la malattia a carattere ereditario coinvolge solo una piccola parte del campione. La mutazione coinvolta è quella a carico di C9ORF72.

La Tabella 2 descrive i livelli dei metalli in sangue, capelli e urine (P5, P50, P95) nei soggetti affetti da SLA e nei controlli.

Sangue ($\mu\text{g/L}$)	SLA		Controlli	
	P50	P5-P95	P50	P5-P95
Al*	8.04	5.89-16.1	6.68	4.81-12.8
Cd	0.85	0.59-1.37	0.81	0.48-1.08
Hg	1.87	0.21-9.61	2.22	0.42-11.1
Mn	6.13	3.47-10.9	6.00	3.27-9.44
Pb*	24.4	10.7-84.3	20.8	9.03-33.1
Capelli ($\mu\text{g/g}$)	P50	P5-P95	P50	P5-P95
Al*	3.56	1.16-45.3	7.76	2.07-25.3
Cd	0.02	0.01-0.10	0.02	0.01-0.08
Hg	0.68	0.06-3.74	0.45	0.05-1.49
Mn*	0.20	0.08-1.13	0.33	0.10-1.13
Pb	0.46	0.06-1.43	0.39	0.05-1.64
Urine ($\mu\text{g/L}$)	P50	P5-P95	P50	P5-P95
Al	2.53	0.70-11.2	2.90	1.30-17.4
Cd	0.51	0.17-1.53	0.44	0.10-1.03
Hg	0.42	0.10-2.17	0.63	0.10-3.14
Mn	0.08	0.04-0.42	0.09	0.05-0.24
Pb	1.81	0.69-46.0	2.01	0.35-18.5

Tabella 2: Livelli dei metalli nelle tre matrici nei pazienti SLA e nei controlli espressi come mediana (P50) e come quinto e novantacinquesimo percentile (P5-P95). *Statisticamente significativi (p value<0.05).

Nel sangue, la concentrazione di Pb ($p=0,026$) è stata trovata significativamente più alta nei pazienti rispetto ai controlli. Sebbene il contenuto assoluto di Al sembra essere simile nei due

campioni, è stata osservata una differenza statisticamente significativa tra pazienti e controlli ($p=0.045$). Lo stesso risultato è stato osservato confrontando pazienti maschi e controlli maschi sia per Al (P50, 8.18 $\mu\text{g/L}$ vs 6.44 $\mu\text{g/L}$; $p=0,048$) che per Pb (P50, 29,2 $\mu\text{g/L}$ vs 20,6 $\mu\text{g/L}$; $p=0,019$). Inoltre, nei soggetti SLA il Pb nel sangue è risultato significativamente maggiore nei maschi rispetto alle femmine (P50, 29.2 $\mu\text{g/L}$ vs 18,7 $\mu\text{g/L}$; $p=0,019$). Considerando l'analisi di correlazione, nel sangue il Hg correla negativamente ($p=0.015$, $\rho=-0,431$) mentre il Pb correla positivamente ($p=0.015$, $\rho=0,433$) con l'età dei pazienti affetti da SLA.

Nei capelli è stato trovato un livello più basso nelle concentrazioni di Al ($p=0.006$) e Mn ($p=0,032$) nei soggetti affetti rispetto ai controlli. Concentrazioni più basse di Al sono state trovate anche nei maschi SLA rispetto ai controlli maschi (P50, 3,56 $\mu\text{g/g}$ vs 7.67 $\mu\text{g/g}$; $p=0.022$). Inoltre, nel gruppo SLA, le femmine avevano più Cd nei capelli dei maschi (P50, 0,03 $\mu\text{g/g}$ vs. 0,014 $\mu\text{g/g}$; $p=0,003$). Il test di correlazione ha indicato che il Hg contenuto nei capelli dei soggetti affetti da SLA correla negativamente con l'età ($p=0,013$, $\rho=-0.44$), mentre Cd ($p=0.038$, $\rho=-0,362$), Hg ($p=0,033$, $\rho=-0,373$) e Mn ($p=0.030$, $\rho=-0,380$) correlano negativamente con la durata della malattia.

Nelle urine, non sono state trovate differenze significative tra i gruppi. I maschi SLA avevano livelli urinari di Pb (P50, 2,67 $\mu\text{g/L}$ vs. 1.21 $\mu\text{g/L}$; $p=0,028$) e Mn (P50, 0,12 $\mu\text{g/L}$ vs 0.07 $\mu\text{g/L}$; $p=0.033$) più elevati rispetto alle femmine. Il test di Spearman ha indicato che il Hg nell'urina ($p=0,019$, $\rho=-0,420$) correla negativamente con l'età dei soggetti affetti da SLA.

Il test di Spearman è stato applicato per controllare le interazioni metallo-metallo nei soggetti affetti da SLA. I risultati hanno

mostrato che il livello di Hg nel sangue correla positivamente col livello di Hg nelle urine ($p=0,002$, $\rho=0,594$) e negativamente col livello di Al ($p=0,018$, $\rho=-0,403$) e Pb ($p<0.001$, $\rho=-0,734$) nelle urine. Inoltre, il Cd nel sangue era positivamente associato al Cd capelli ($p=0.018$, $\rho=0,400$) e il Hg nel sangue al Hg nei capelli ($p<0.001$; $\rho=0.700$). Molti metalli nelle urine correlano con metalli nei capelli: Hg urine-Hg capelli ($p=0,002$ con $p=0,506$); Al urina-Hg capelli ($p=0,016$, $\rho=-0,410$), Mn urina-Hg capelli ($p=0,035$, $\rho=-0,363$); Pb urina-Hg capelli ($p=0,005$, $\rho=-0,475$), Cd urina-Al capelli ($p=0.039$, $\rho=-0,366$). Sono state osservate altre interazioni sinergiche: Cd-Pb ($p=0,011$; $\rho=0,536$) nei capelli; Cd-Hg ($p=0,019$; $\rho=0,407$) e Cd-Pb ($p=0,035$; $\rho=0,367$) nelle urine. Infine, le seguenti interazioni inverse sono state trovate nelle urine: Hg-Mn ($p=0,011$; $\rho=-0,432$), Hg-Al ($p=0,0365$; $\rho=-0,360$), Al-Mn ($p<0.001$; $\rho=-0,563$).

4.2 Risultati dello studio clinico.

Nessuna differenza statisticamente significativa è stata trovata tra le concentrazioni mediane dei metalli e i pazienti divisi per localizzazione della malattia, sia per le variabili normalmente distribuite che per quelle non normalmente distribuite.

La tabella 3 mostra i risultati ottenuti con il test di significatività di Wilcoxon, utilizzato per testare le differenze tra le mediane nei due gruppi di pazienti divisi in base ai risultati della scala ASLFRSr. Sono risultati statisticamente significativi i seguenti metalli: Hg ($p=0.003$), Pb ($p=0.009$), Cu ($p=0.024$) e Se ($p=0.000$) nel sangue; Hg ($p=0.024$), Pb($p=0.024$), Cu ($p=0.024$) e Zn ($p=0.009$) nei capelli; Mg ($p=0.024$) e Ca ($p=0.024$) nelle urine.

	Gruppo 1		Gruppo 2	
Sangue (µg/L)	P50	P5-P95	P50	P5-P95
Cd	1.01	0.59-1.81	0.80	0.48-1.31
Hg*	0.55	0.15-9.45	2.76	0.34-10.07
Pb*	34.99	9.93-161.59	20.71	10.05-51.65
Mg	39789	27664-51325	39532	31343-48607
Al	8.11	5.92-14.98	8.01	5.28-65.86
Ca	56889	44004-64986	57878	50379-77489
Mn	6.03	3.03-14.25	6.29	3.90-12.34
Fe	446839	297297-564537	468415	253639-594397
Cu*	958	148-1227	1070	906-1222
Zn	7040	5354-8615	7257	5122-8935
Se*	123.32	69.10-240.17	163.95	72.26-229.54
Capelli (ng/g)	P50	P5-P95	P50	P5-P95
Cd	9.03	3.97-70.36	21.67	12.14-295.22
Hg*	359.37	35.59-3042.83	801.22	267.90-5068.24
Pb*	206.28	32.81-3147.45	538.45	94.14-1881.31
Mg	50690	13001-244888	85642	29593-1172386
Al	3582	876-1946680	3591	1036-799013
Ca	401959	132924-1986089	754113	131754-5251635
Mn	231.79	44.40-1327.99	192.94	73.75-6468.00
Fe	4816	1632-31386	5847	4208-11004
Cu*	9370	4437-30009	12822	8336-44669
Zn*	224376	44827-2162432	143511	75201-247515
Se	446.81	134.32-924.30	588.02	260.86-81580
Urine (µg/L)	P50	P5-P95	P50	P5-P95
Cd	0.56	0.16-5.79	0.49	0.13-1.58
Hg	0.27	0.09-2.04	0.71	0.11-9.21
Pb	2.66	0.71-75.75	1.21	0.45-31.16
Mg*	42661	20915-92403	70062	16649-137833
Al	2.63	0.62-31.48	1.82	0.67-12.07
Ca*	70465	12954-395131	164125	13401-450622
Mn	0.08	0.04-1.03	0.07	0.04-0.21
Fe	8.65	1.89-70.17	5.44	1.25-34.79
Cu	8.66	3.52-40.79	8.70	5.03-21.72
Zn	567.75	115.39-2835.98	347.96	56.29-1553.66
Se	13.73	7.42-64.97	26.36	8.85-75.78

Tabella 3: Livelli dei metalli nelle tre matrici nei due gruppi di pazienti SLA espresse come mediana (P50) e come quinto e novantacinquesimo percentile (P5-P95). *Statisticamente significativi (p value<0.05).

Questi metalli sono stati presi in considerazione per valutare la loro influenza sulla gravità/progressione della malattia valutata con la scala ALSFRSr. Tramite il test di regressione logistica si è voluto valutare quali possano dare un contributo sulla progressione della malattia. I risultati sono riportati in tabella 4. Sui 10 metalli presi in esame nelle diverse matrici, solo 4 hanno valenza statistica anche nel test di regressione logistica; di questi 4 il Hg e il Se nel sangue sembrano avere un effetto protettivo nella malattia avendo un odds ratio minore di 1. Il Pb nel sangue dimostra di essere invece un fattore di rischio. Lo Zn nelle urine ha una odds ratio di 1, quindi non è né un fattore di rischio né un fattore protettivo.

Sangue (µg/L)	Odds ratio	[I. C. 95%]	P value
Hg*	0.6765108	0.4675482- 0.9788656	0.038
Pb*	1.057125	1.004331-1.112694	0.034
Cu	0.9924938	0.9847358-1.000313	0.060
Se*	0.9671184	0.9415443- 0.9933871	0.014
Capelli (ng/g)			
Hg	0.9990369	0.997938-1.000137	0.086
Pb	0.99957	0.9983345-1.000807	0.496
Cu	0.9998686	0.9997045-1.000033	0.117
Zn*	1.000011	1.000001-1.000022	0.039
Urine (µg/L)			
Mg	0.999976	0.9999483-1.000004	0.089
Ca	0.9999937	0.9999862-1.000001	0.098

Tabella 4: Test di regressione logistica con odds ratio e intervallo di confidenza dei metalli statisticamente significativi tra i due gruppi di pazienti. *Statisticamente significativi (p value<0.05).

Infine si è andati a valutare con il test di Kolmogorov le mediane dei due gruppi di pazienti con le mediane dei controlli. In tabella 5 e 6 sono riportati i risultati di quest'ultima analisi. Risultano essere statisticamente significative tra il gruppo 1 e i controlli le mediane

di Cd ($p=0.025$), Hg ($p=0.009$), Pb ($p=0.018$), Fe ($p=0.044$) e Se ($p=0.001$) nel sangue; Al ($p=0.024$), Mn ($p=0.030$) e Zn ($p=0.001$) nei capelli; Mg ($p=0.009$), Ca ($p=0.044$), Cu ($p=0.044$) e Se ($p=0.001$) nelle urine. Risultano essere statisticamente significativi tra il gruppo 2 e i controlli i valori delle mediane del Cu ($p=0.000$) nel sangue e del Se ($p=0.001$) nei capelli.

	Gruppo 1		Controlli	
Sangue ($\mu\text{g/L}$)	P50	P5-P95	P50	P5-P95
Cd*	1.01	0.59-1.81	0.81	0.42-1.31
Hg*	0.55	0.15-9.45	2.22	0.35-12.90
Pb*	34.99	9.93-161.59	20.78	8.23-35.54
Mg	39789	27664-51325	39441	35093-47703
Al	8.11	5.92-14.98	6.67	4.29-14.37
Ca	56889	44004-64986	53993	45904-62773
Mn	6.03	3.03-14.25	5.99	2.88-10.94
Fe*	446839	297297-564537	496922	334494-576106
Cu	958.86	148.30-1227.76	953.84	794.07-1303.19
Zn	7040	5354-8615	6986	4472 -8493
Se*	123.32	69.10-240.17	152.96	93.70-184.04
Capelli (ng/g)	P50	P5-P95	P50	P5-P95
Cd	9.03	3.97-70.36	23.07	5.24-318.85
Hg	359.37	35.59-3042.83	450.07	28.44-1845.95
Pb	206.28	32.81-3147.45	471.29	40.30-19368.56
Mg	50690	13001-244888	326552	9158-58390
Al*	3582	876-1946680	7759	1499-26362
Ca	401959	132924-1986089	429841	150008-2181337
Mn*	231.79	44.40-1327.99	327.40	57.25-1274.08
Fe	4816	1632-31386	5224	1282-16214
Cu	9370	4437-30009	9510	2200-135896
Zn*	224376	44827-2162432	138105	21787-187021
Se	446.81	134.32-924.30	352.97	118.78-1030.50
Urine ($\mu\text{g/L}$)	P50	P5-P95	P50	P5-P95
Cd	0.56	0.16-5.79	0.44	0.10-1.30
Hg	0.27	0.09-2.04	0.63	0.10-3.59
Pb	2.66	0.71-75.75	2.01	0.27-33.89
Mg*	42661	20915-92403	206524	13819-75761
Al	2.63	0.62-31.48	2.90	1.08-23.97
Ca*	70465	12954-395131	158359	11800-360290
Mn	0.08	0.04-1.03	0.09	0.05-0.29
Fe	8.65	1.89-70.17	7.63	1.04-22.10
Cu*	8.66	3.52-40.79	12.58	2.70-33.63
Zn	567.75	115.39-2835.98	359.22	65.10-1196.14
Se*	13.73	7.42-64.97	35.55	4.63-84.01

Tabella 5: Livelli dei metalli nelle tre matrici nel gruppo 1 di pazienti SLA e nei controlli espresse come mediana (P50) e come quinto e novantacinquesimo percentile (P5-P95). *Statisticamente significativi (p value<0.05).

	Gruppo 2		Controlli	
Sangue (µg/L)	P50	P5-P95	P50	P5-P95
Cd	0.80	0.48-1.31	0.81	0.42-1.31
Hg	2.76	0.34-10.07	2.22	0.35-12.90
Pb	20.71	10.05-51.65	20.78	8.23-35.54
Mg	39532	31343-48607	39441	35093-47703
Al	8.01	5.28-65.86	6.67	4.29-14.37
Ca	57878	50379-77489	53993	45904-62773
Mn	6.29	3.90-12.34	5.99	2.88-10.94
Fe	468415	253639-594397	496922	334494-576106
Cu*	1070.32	906.90-1222.69	953.84	794.07-1303.19
Zn	7257.21	5122.71-8935.85	6986.40	4472-8493
Se	163.95	72.26-229.54	152.96	93.70-184.04
Capelli (ng/g)	P50	P5-P95	P50	P5-P95
Cd	21.67	12.14-295.22	23.07	5.24-318.85
Hg	801.22	267.90-5068.24	450.07	28.44-1845.95
Pb	538.45	94.14-1881.31	471.29	40.30-19368.56
Mg	85642	29593-1172386	326552	9158-58390
Al	3591.75	1036-799013	7759.61	1499-26362
Ca	754113	131754-5251635	429841	150008-2181337
Mn	192.94	73.75-6468.00	327.40	57.25-1274.08
Fe	5847	4208-11004	5224	1282-16214
Cu	12822	8336-44669	9510	2200-135896
Zn	143511	75201-247515	138105	21787-187021
Se*	588.02	260.86-81580	352.97	118.78-1030.50
Urine (µg/L)	P50	P5-P95	P50	P5-P95
Cd	0.49	0.13-1.58	0.44	0.10-1.30
Hg	0.71	0.11-9.21	0.63	0.10-3.59
Pb	1.21	0.45-31.16	2.01	0.27-33.89
Mg	70062	16649-137833	206524	13819-75761
Al	1.82	0.67-12.07	2.90	1.08-23.97
Ca	164125	13401-450622	158359	11800-360290
Mn	0.07	0.04-0.21	0.09	0.05-0.29
Fe	5.44	1.25-34.79	7.63	1.04-22.10
Cu	8.70	5.03-21.72	12.58	2.70-33.63
Zn	347.96	56.29-1553.66	359.22	65.10-1196.14
Se	26.36	8.85-75.78	35.55	4.63-84.01

Tabella 6: Livelli dei metalli nelle tre matrici nel gruppo 2 di pazienti SLA e nei controlli espresse come mediana (P50) e come quinto e novantacinquesimo percentile (P5-P95). *Statisticamente significativi (p value<0.05).

5 Discussione

Autore: Riccardo Oggiano

Titolo della tesi: Studio di metalli pesanti in pazienti affetti da Sclerosi Laterale Amiotrofica ed analisi delle correlazioni cliniche.

Tesi di Dottorato in: Fisiologia, Morfologia e Fisiopatologia del Sistema Nervoso.

Università degli Studi di Sassari

Pag. 40

5.1 Discussione sui metalli.

La SLA è la forma più comune di malattia del motoneurone in età adulta ed è caratterizzata dalla progressiva degenerazione dei motoneuroni, provocando paralisi fatale come evento culminante. In questo contesto, l'esposizione a metalli tossici sia ambientali che professionale, è stata proposta come uno dei vari possibili fattori di rischio della malattia (Kasarskis et al, 1993; Johnson e Atchison, 2009; Sutedja et al, 2009).

Il metallo Al viene assorbito per via gastrointestinale, da cui raggiunge il flusso sanguigno e può passare nel cervello attraverso la barriera ematoencefalica. L'esposizione cronica porta all'accumulo del metallo nel cervello con conseguente attivazione delle cellule gliali, produzione di citochine pro-infiammatorie e di specie reattive dell'ossigeno (ROS). La secrezione prolungata di questi fattori può diminuire i meccanismi neuro-protettivi, come le difese antiossidanti, e portare alla perdita di cellule neuronali, culminando con la neurodegenerazione (Becaria et al, 2002). Dopo l'iniezione di diverse dosi di Al nei ratti, la degenerazione dei motoneuroni è stata osservata con la formazione di ammassi neurofibrillari, cromatolisi e localizzazione anomala dei nuclei, tutti sintomi riscontrati nella SLA (Tanridag et al, 1999). Inoltre, i topi alimentati con eccesso di Al nella dieta hanno mostrato la perdita dei neuroni nel midollo spinale e nel cervello (Kihira et al, 2002). Inoltre, lo studio di Kawahara et al (2001) ha dimostrato che l'esposizione cronica ad Al in colture neuronali primarie di corteccia cerebrale di ratto crea cambiamenti conformazionali nella proteina beta-amiloide e ne potenzia l'aggregazione in vitro con formazione di depositi fibrillari sulla superficie dei neuroni in

coltura, caratteristiche osservate nell'Alzheimer (AD). In questo studio il contenuto di Al è stato trovato in leggero aumento nel sangue dei pazienti rispetto ai controlli (8.04 µg/L vs 6.68 µg/L), ma più basso nei capelli (3.56 µg/g vs 7.76 µg/g). In letteratura, Garzillo et al (2014) non hanno trovato alcuna differenza dei valori di Al nel siero tra pazienti e controlli. Anche Bergomi et al (2002) non hanno trovato prove che sostengono un possibile coinvolgimento dell'Al nella malattia dato che non hanno trovato differenze nelle unghie dei pazienti e dei controlli. Al contrario, Roos et al (2013) hanno trovato concentrazioni di Al in CSF significativamente più alte nei soggetti affetti da SLA rispetto ai controlli. Elevate concentrazioni di Al sono state notate durante l'autopsia nel cervello di pazienti con AD (Crapper et al, 1973), e sono stati riportati livelli alti di Al nel liquido cerebrospinale e nel plasma dei pazienti con la stessa malattia (Basun et al, 1991). Altri studi hanno riportato livelli invariati di Al nel liquido cerebrospinale tra popolazioni di controllo e pazienti affetti da AD (Rao et al, 1999) e da SM (Madeddu et al, 2011).

Alcuni degli effetti tossicologici del Cd rispecchiano i meccanismi biochimici alla base della fisiopatologia della SLA, fornendo così plausibilità biologica di una relazione Cd-SLA. Tra questi, Cd può indurre l'espressione della metallothioneina (MT) che può agire come agente protettivo contro i ROS, ma questa proteina si lega irreversibilmente agli ioni Zn causando la diminuzione dell'attività dell'enzima SOD1 (Price-Haughey et al, 1986; Casalino et al, 2002; Van Campenhout et al, 2004). Il cadmio induce anche inclusioni citoplasmatiche di SOD1 nel corpo dell'assone e nel neurone di cellule prossimali, che rappresentano i reperti patologici rilevati nei motoneuroni e negli astrociti di pazienti affetti da SLA

(Watanabe et al, 2001). Così, si presume che il Cd sia coinvolto nella SLA, ma l'evidenza epidemiologica è ancora inconcludente. Nel nostro caso, il contenuto del Cd è pressochè invariato nelle tre matrici nel confronto tra pazienti e controlli. Anche la correlazione negativa tra Cd nei capelli e la durata della malattia conferma l'assenza di un collegamento convincente. Altri autori hanno trovato incrementi dei livelli di Cd, sia nel sangue che nel liquor in soggetti affetti da SLA rispetto ai controlli (Vinceti et al, 1997; Roos et al 2013). In un altro studio sono stati trovati elevati livelli di MT in organi di pazienti affetti da SLA, ma la concentrazione totale di Cd non era significativamente differente (Sillevis Smitt et al, 1992). Considerando altre neuropatologie, i livelli plasmatici Cd sono risultati significativamente più alti in soggetti con malattia del motoneurone rispetto ai controlli (Pamphlett et al, 2001). Nei pazienti affetti da AD, differenze nei livelli di Cd sono stati trovati in abitanti di Svezia e Italia (Basun et al, 1994; Bocca et al, 2006). Analogamente, in campioni di capelli di soggetti affetti da morbo di Parkinson (PD), i livelli Cd sono risultati paragonabili a quelli dei controlli (Forte et al, 2007).

Gli effetti tossici di Pb sul SNC sono ben noti e comprendono Pb encefalopatia (soprattutto nei bambini) e neuropatia motoria periferica (principalmente negli adulti) (ATSDR, 2007). L'emivita di Pb nel sangue è di 1-2 mesi, e così misurazioni nel sangue riflettono l'esposizione a medio termine di questo metallo. Poiché Pb si accumula nelle ossa umane nel corso della vita, l'osso può essere una fonte endogena di Pb e le misurazioni di Pb nel sangue possono riflettere anche la sua mobilizzazione dall'osso. In questo studio, sono stati trovati nel sangue livelli Pb nei pazienti significativamente più alti (24,4 µg/L) rispetto ai controlli (20.8

µg/L). Questo risultato è in accordo con un altro studio di un'altra popolazione italiana di malati SLA in cui sono stati trovati livelli di Pb più alti nel sangue dei pazienti rispetto ai controlli (Garzillo et al, 2014). Le limitazioni nei movimenti dei pazienti affetti da SLA e, in seguito, la loro immobilità, possano promuovere la demineralizzazione ossea e i successivi crescenti livelli di piombo nel sangue. Al contrario, i capelli e le urine non erano delle opportune matrici per verificare differenze legate alla patologia. Molti studi precedenti hanno considerato l'ipotesi che l'esposizione Pb è un fattore di rischio per la SLA. Kamel et al. (2005) hanno riferito che la SLA è stata associata con alti livelli di Pb in sangue e ossa, con un aumento del rischio di 1,9 volte per ogni µg/dl nel sangue e un incremento da 2,3 a 3,6 volte per ogni raddoppio del livello di Pb nell'osso. Anche Pamphlett et al. (2001) hanno trovato alti livelli plasmatici di Pb in soggetti affetti da malattia dei motoneuroni rispetto ai controlli. Recentemente, un'associazione tra Pb nel sangue e la SLA è stata dimostrata in una popolazione del nord della California (Albers et al, 2009). Roos et al (2013) hanno osservato alti livelli di Pb nel CSF di SLA, che potrebbe compromettere la barriera emato-encefalica. Nonostante la grande quantità di dati in letteratura che indicano come il Pb sia un agente neurotossico, alcuni studi dicono che gli astrociti possano sequestrare il Pb nel cervello, impedendone l'ulteriore diffusione al compartimento neuronale e successiva neurotossicità o l'alterazione della trasmissione sinaptica (Tiffany-Castiglioni, 1993; Cabell et al, 2004). In accordo con questi risultati, uno studio preliminare caso-controllo su una popolazione del sud d'Italia ha dimostrato che i livelli di piombo nel sangue non sono risultati significativamente aumentati nei pazienti con SLA rispetto ai controlli e non hanno correlazione con la gravità della

malattia (Daniele et al, 2012). Anche Vinceti et al. (1997) ha dato un limitato supporto all'ipotesi di un coinvolgimento del Pb nella eziologia della SLA, anche se alcuni pazienti con malattia in stadio avanzato mostravano concentrazioni più alte di piombo rispetto ai restanti pazienti. Gli stessi autori sono stati in grado di rilevare un aumento dell'incidenza della malattia in una zona della provincia di Reggio Emilia dove si è verificato grave inquinamento ambientale di Pb a lungo termine (Guidetti et al, 1996). Alcuni fattori possono influenzare i livelli di piombo nel sangue, tra cui l'età e il sesso. In questo lavoro, Pb era significativamente associato con l'età nella popolazione SLA. Il progressivo aumento dei livelli di piombo nel sangue degli adulti con l'aumentare dell'età può riflettere un aumento del rimodellamento osseo con l'età (Barbosa Jr et al, 2005). Altri studi hanno riferito che l'età è il più forte predittore del livello di Pb nell'osso in pazienti con SLA (Kamel et al, 2002). Inoltre, nei pazienti, il contenuto di Pb era significativamente maggiore nei maschi rispetto alle femmine sia nel sangue (P50, 29,2 µg/L vs 18,7 µg/L) e nelle urine (P50, 2,67 µg/L vs 1.21 µg/L). Le differenze di genere sono già state descritte, con i maschi che risultano avere livelli maggiori di piombo nel sangue (Kristiansen et al, 1997).

Sebbene essenziale, il Mn è tossico ad alte concentrazioni. L'esposizione a livelli eccessivi di Mn possono provocare grave disfunzione motoria psichiatrica e extrapiramidale molto simili al PD. Un eccesso di Mn sembra essere implicato anche nella SLA. Sono stati trovati elevati livelli di Mn nel midollo spinale di pazienti SLA, e cambiamenti degenerativi neurologici si verificano a causa di locali disturbi del metabolismo del Mn nel midollo spinale di pazienti SLA (Miyata et al, 1983; Mitchell et al, 1991); questi studi

hanno anche mostrato un aumento dei livelli di Mn-SOD nei motoneuroni di soggetti affetti. In effetti, i dati ambientali dai focolai endemici del Pacifico occidentale della SLA, tra cui la penisola di Kii in Giappone, supportano il ruolo del Mn nella diffusione in queste aree geografiche (Yase et al, 2001). Il contenuto di Mn nei capelli umani riflette l'assorbimento del metallo in media per tutta la durata della formazione del follicolo (Rodushkin e Axelsson, 2000). Pertanto, misure di Mn nei capelli sono considerate un bio-marker più accurato per le esposizioni croniche rispetto al sangue che, a livelli più bassi, può variare in base alla dieta alimentare. Il meccanismo di assorbimento del Mn nei capelli non è ben conosciuto, ma si sospetta che abbia un'elevata affinità con la melanina (Lyden et al, 1984). In questo studio è stata trovata una lieve ma significativa riduzione del livello Mn nei capelli dei soggetti ALS rispetto ai controlli (0.20 µg/g vs 0.33 µg/g). Al contrario, i livelli ematici e nelle urine sono stati trovati invariati quando sono stati confrontati i due gruppi di popolazione. I dati pubblicati su Mn e SLA sono abbastanza discordanti. Garzillo et al. (2014) hanno osservato un valore normale di Mn nel siero di soggetti affetti da SLA rispetto ai controlli. Kihira et al. (2015) hanno trovato alti livelli di Mn nei capelli dei pazienti affetti da SLA. Nagata et al. (1985) hanno trovato livelli inferiori di Mn nei casi di malattia del motoneurone rispetto ai soggetti normali. Livelli invariati di Mn sono stati trovati da Kanas e Kapaki (1997) nel liquido cerebrospinale e nel siero di pazienti affetti da SLA. Kapaki et al. (1997) hanno trovato un aumento dei livelli di Mn nel siero dei pazienti e normale nel liquido cerebrospinale, mentre Roos et al. (2006) riportano un aumento dei livelli di Mn nel liquido cerebrospinale di SLA e un livello normale nel plasma. Hozumi et al (2011) hanno osservato i

livelli invariati di metallo nel liquido cerebrospinale di pazienti con SLA e aumentato nel liquido cerebrospinale di pazienti con PD.

La neurotossicità dell'Hg e dei suoi composti è ben nota (ATSDR, 1999). Il Hg esiste in tre forme: elementare, inorganica ed organica, ogni forma con il suo profilo di tossicità. L'esposizione a vapori di mercurio metallico e Metil-Hg dà problemi nel sistema nervoso centrale. L'esposizione cronica al Hg inorganico produce stomatiti, eretismo e tremori. In una recente rassegna sul Hg, è stato riportato che la diminuzione del glutatione, la rottura dei mitocondri, l'aumento della perossidazione lipidica e l'ossidazione delle proteine e del DNA nel cervello, indotta da Hg e dai suoi sali, sono fattori importanti in condizioni come ALS e AD (Carocci et al, 2014). In questo studio, Hg è stata misurata in diverse matrici in modo da fornire un'informazione dettagliata: il livello di Hg nel sangue rappresenta la somma di tutte le forme Hg; nei capelli indica l'esposizione al solo Me-Hg, grazie alla sua alta affinità per i gruppi sulfidrilici degli amminoacidi nei capelli; nelle urine rappresenta la somma tra il Hg metallico e le sue specie inorganiche. I risultati di questo studio non indicano differenze tra pazienti e controlli nel contenuto del metallo nelle tre matrici prese in esame, anzi vi è una correlazione inversa tra il livello di Hg nei capelli e la durata della malattia. Questi risultati hanno indicato che né Hg metallico né Me-Hg erano significativamente coinvolti nella patologia. È interessante notare che, nei pazienti con SLA, Hg contenuto in una matrice è positivamente correlato con il mercurio contenuto nelle altre matrici (Hg-sangue vs. Hg-capelli, $p < 0.001$; Hg-sangue vs. Hg-urina, $p = 0,002$; Hg-capelli vs. Hg-urina, $p = 0,002$). Nel gruppo SLA, è stata osservata una correlazione negativa tra età e Hg nei capelli e nelle urine. Anche

nel caso di Hg, la letteratura precedente è insufficiente per fare una conclusione definitiva. Roos et al (2013) non ha trovato significative differenze nei livelli di Hg nel CSF dei pazienti con SLA. Schwarz et al (1996) hanno osservato sintomi clinici simili a quelli tipici della SLA in un paziente con l'esposizione accidentale a lungo termine al Hg. Inoltre, è stata identificata una popolazione di pazienti affetti da SLA in una piccola comunità del Wisconsin, popolazione caratterizzata da un grande consumo di pesce fresco pescato contenente alti livelli di Hg (Sienko et al, 1990). È stato descritto un caso di una sindrome simile alla SLA a seguito dell'esposizione al Hg organico in un contadino (Brown, 1954). Barber (1978) scoprì cambiamenti neurologici che assomigliavano a quelle che si trovano nella SLA in alcuni dipendenti di un impianto di produzione di ossido di mercurio. Un altro studio caso-controllo, attraverso un questionario autosomministrato, non ha trovato un'associazione tra Hg e la patogenesi della SLA (Gresham et al, 1986). Più recentemente, Praline et al (2007) riportano il caso donna di 81 anni affetta da SLA che presenta un elevato livello di mercurio nel sangue, urine e del midollo spinale. Moriwaka et al (1993) hanno osservato, in soggetti che vivono in una zona non endemica del Giappone, concentrazioni di mercurio più basse nel plasma, nelle cellule del sangue e nel cuoio capelluto di pazienti con SLA rispetto ai controlli, anche se tali anomalie sono state considerate un effetto indotto dalla malattia. Inoltre, Mano et al (1989) hanno riportato elevati livelli di mercurio nei capelli di soggetti affetti da SLA rispetto ai controlli.

5.2 Discussione dello studio clinico.

Per quanto riguarda il sito di insorgenza della malattia (bulbare o spinale) e la concentrazione dei metalli nei pazienti, possiamo affermare che non esistano delle correlazioni statisticamente significative, quindi la localizzazione della malattia non è influenzata dalla concentrazione dei metalli e viceversa.

Nei due gruppi di pazienti sono state trovate delle statistiche interessanti. Nel sangue il Hg, il Cu e il Se sono più elevati nel gruppo 2 rispetto al gruppo 1, mentre il Pb è più elevato nel gruppo 1. Nei capelli il Hg, il Pb e il Cu sono più elevati nel gruppo 2 rispetto al gruppo 1 mentre lo Zn ha un andamento opposto. Nelle urine Mg e Ca sono più elevati nei pazienti meno gravi rispetto ai pazienti più gravi. Considerando il test di regressione logistica, non tutti sono risultati statisticamente significativi. Ciò può essere spiegato dal fatto che la differenza è statisticamente significativa tra i due gruppi, ma l'aumento o la diminuzione di quell'elemento non influisce sulla gravità della malattia. Come riportato in tabella 4, Hg e Se nel sangue mostrano un effetto protettivo, il Pb sempre nel sangue dimostra avere un effetto dannoso mentre lo Zn nei capelli non ha né un effetto protettivo ma non è neanche un fattore di rischio. Il Hg e il Pb sono già stati analizzati nella discussione precedente. Il Hg si sa essere fortemente tossico per il SNC soprattutto ad alte concentrazioni (ATSDR, 1999) ma in letteratura si trovano dati contrastanti che lo correlano alla SLA. Alcuni sostengono un suo coinvolgimento diretto con la malattia (Moriwaka et al, 1993). Nel nostro lavoro, considerando i pazienti e i controlli non abbiamo trovato differenze nei livelli di Hg nel sangue, ma se prendiamo in

considerazione solo i pazienti, troviamo che il gruppo 2 presenta un valore di Hg più alto rispetto al gruppo 1 e nel test di regressione logistica, il Hg risulta essere addirittura un fattore protettivo avendo una odds ratio di 0,67. Anche prendendo in esame il solo gruppo 1 e i controlli si nota che il valore del Hg è più basso nei pazienti che nei controlli. Un suo possibile coinvolgimento come effetto protettivo andrà indagato meglio. Anche per quanto riguarda il Pb è già stato analizzato nella discussione sui metalli. I risultati dimostrano che il Pb nel sangue risulta essere più alto nei pazienti rispetto ai controlli. In più, risulta essere più alto nei pazienti con gravità della malattia più alta. In tutti i dati analizzati, a partire dal dato iniziale, è sempre risultato più alto e in più risulta essere un fattore di rischio, avendo un odds ratio superiore a 1. Ma considerando la gravità della malattia, i pazienti più gravi mostrano un altissimo livello di Pb nel sangue rispetto a quelli meno gravi (34.99 µg/L vs 20.71 µg/L). Questo può confermare il fatto che l'immobilità dovuta alla malattia porti a un rimodellamento osseo che rilascia il Pb nel sangue. Come detto in precedenza, il Pb si accumula nelle ossa durante tutto l'arco della vita e un rimodellamento osseo può portare al rilascio di questo metallo nel sangue. I nostri dati confermano questo fatto, anche perché un paziente grave, possiamo dire quasi immobile, a quale fonte di Pb può essere esposto rispetto a un controllo sano o a un paziente meno grave?

Discorso a parte merita il Se nel sangue. Il Se è fortemente neurotossico per le cellule neuronali umane, dovuto al fatto che anche bassi livelli di questo metallo inducono un incremento dei livelli dei ROS e attivano processi apoptotici (Maraldi et al 2011). Anche Vinceti et al 2012 sostengono un'associazione tra la sovra-

esposizione al Se e la SLA. Nel nostro caso il Se sembra avere un effetto protettivo, vista la sua diminuzione nel gruppo 1 rispetto al gruppo 2 e tra il gruppo 1 e i controlli e vista la odds ratio minore di 1. Sicuramente dovrà essere indagato più a fondo il suo ruolo, infatti sarà da valutare se il livello di Se nel sangue è statisticamente differente tra i pazienti in totale e i controlli.

Anche lo Zn merita un discorso a parte. Nei capelli risulta essere molto più alto nel gruppo 1 rispetto al gruppo 2. Stesso risultato se si prendono in considerazione il gruppo 1 e i controlli. Però se si va a vedere il test di regressione logistica, il valore di odds ratio trovato è 1,000011, con un intervallo di confidenza che va da 1,0000001 a 1,000022. Ciò vuol dire che risulta essere statisticamente differente tra i due gruppi ma non è né un fattore di rischio né un fattore protettivo. Lo zinco è un elemento essenziale per l'organismo, soprattutto come cofattore. Un ruolo fondamentale lo svolge nella Cu-Zn SOD, che sappiamo essere molto coinvolta nella SLA. Un aumento dello Zn in malati più gravi può rispecchiare la sua mobilizzazione dalla proteina inattiva?

In ultima analisi si sono andati a valutare i valori dei due gruppi rispetto ai controlli sani. Nel gruppo 2 sono risultati più alti il Cu nel sangue e Se nei capelli rispetto ai controlli. Cd e Pb nel sangue del gruppo 1 sono più alti dei controlli, mentre sempre nel sangue Hg, Fe e Se sono più alti nei controlli. Nei capelli Al e Mn sono più alti nei controlli mentre lo Zn è più alto nei pazienti. Infine nelle urine Mg, Ca, Cu e Se sono più alti nei controlli rispetto al gruppo 1.

6. Conclusioni

Autore: Riccardo Oggiano

Titolo della tesi: Studio di metalli pesanti in pazienti affetti da Sclerosi Laterale Amiotrofica ed analisi delle correlazioni cliniche.

Tesi di Dottorato in: Fisiologia, Morfologia e Fisiopatologia del Sistema Nervoso.

Università degli Studi di Sassari

Pag. 52

Uno dei possibili limiti di questo studio, da un punto di vista statistico, è la relativa piccola dimensione del campione, anche se il campione preso in esame è rappresentativo considerando la poca diffusione della patologia.

Visti i nostri risultati, una causalità diretta tra i metalli e la SLA non può essere del tutto esclusa, anche se i metalli più probabilmente potrebbero essere una concausa nell'insorgenza e nell'evolversi della malattia. I risultati ottenuti ed esposti nella discussione ci spingono ad indagare meglio sugli effetti dei metalli, oltre che valutare in modo più approfondito le interazioni tra loro, soprattutto tra quelli più neuro-tossici.

Il nostro obiettivo è quello di continuare lo studio analizzando altri dati sui pazienti, soprattutto il loro stile di vita, la dieta, la residenza, l'ambiente di vita e altri possibili fattori.

Infine, ci proponiamo di analizzare e studiare l'analisi del ruolo della suscettibilità genetica nel mediare gli effetti dei metalli per comprendere e correlare in modo più esaustivo i possibili rapporti tra i diversi fattori che potrebbero giocare un ruolo considerevole nell'insorgenza della SLA.

Bibliografia

AISLA. Associazione Italiana Sclerosi Laterale Amiotrofica. (Accessed March, 2015). <http://www.aisla.it/news.php?id=00016>.

Albers K, Nelson L, Tanner C. (2009). Lead exposure and amyotrophic lateral sclerosis in a Northern California population. *Neuroepidemiology*. 33,74.

Atkin J D, Farg M A, Turner B J, Tomas D, Lysaght J A, Nunan J, Rembach A, Nagley P, Beart P M, Cheema S S, Horne M K. (2006). Induction of the unfolded protein response in familial amyotrophic lateral sclerosis and association of protein-disulfide isomerase with superoxide dismutase 1. *J Biol Chem*. 281,30152–30165.

Atkin J D, Farg M A, Walker A K, McLean C, Tomas D, Horne M K. (2008). Endoplasmic reticulum stress and induction of the unfolded protein response in human sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis*. 30,400–407.

ATSDR. (1999). Toxicological Profile for Mercury, U. S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Atlanta, USA.

ATSDR. (2007). Toxicological Profile for Lead, U. S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Atlanta, USA.

Barber T E. (1978). Inorganic mercury intoxication reminiscent of amyotrophic lateral sclerosis. *J Occup Med*. 20,667–669.

Barbosa Jr F, Tanus-Santos J E, Gerlach R F, Parsones P J. (2005). A critical review of biomarkers used for monitoring human exposure to lead: advantages, limitations, and future needs. *Environ Health Perspect*. 113,1669–1674.

Basun H, Forssell L G, Wetterberg L, Winblad B. (1991). Metals and trace elements in plasma and cerebrospinal fluid in normal ageing and Alzheimer's disease. *J. Neural Transm (P-D Sect)*. 4,231–258.

Basun H, Lind B, Nordberg M, Nordstrom M, Bjorksten K S, Winblad B. (1994). Cadmium in blood in Alzheimer's disease and non-demented subjects: results from a population-based study. *Biomaterials*. 7,130–134.

Autore: Riccardo Oggiano

Titolo della tesi: Studio di metalli pesanti in pazienti affetti da Sclerosi Laterale Amiotrofica ed analisi delle correlazioni cliniche.

Tesi di Dottorato in: Fisiologia, Morfologia e Fisiopatologia del Sistema Nervoso.

Università degli Studi di Sassari

Pag. 54

Becaria A, Campbell A, Bondy S C. (2002). Aluminum as a toxicant. *Toxicol Ind Health*. 18, 309–320.

Bergomi M, Vinceti M, Nacci G, Pietrini V, Brätter P, Alber D, Ferrari A, Vescovi L, Guidetti D, Sola P, Malgu S, Aramini C, Vivoli G. (2002). Environmental exposure to trace elements and risk of amyotrophic lateral sclerosis: a population-based case–control study. *Environ Res*. 89,116–123.

Bocca B, Alimonti A, Bomboi G, Giubilei F, Forte G. (2006). Alterations in the level of trace metals in Alzheimer's disease. *Trace Elem Electrolytes*. 23(4),270–276.

Boërio D, Kalmar B, Greensmith L, Bostock H. (2010). Excitability properties of mouse motor axons in the mutant SOD1G93A model of amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve*. 41,774–784.

Bogdanov M, Brown Jr R H, Matson W, Smart R, Hayden D, O'Donnell H, Flint Beal M, Cudkowicz M. (2000). Increased oxidative damage to DNA in ALS patients. *Free Radic Biol Med*. 29,652–658.

Borghero G, Pugliatti M, Marrosu F, Marrosu M G, Murru M R, Floris G, Cannas A, Parish L D, Occhineri P, Cau T B, Loi D, Ticca A, Traccis S, Manera U, Canosa A, Moglia C, Calvo A, Barberis M, Brunetti M, Pliner H A, Renton A E, Nalls M A, Traynor B J, Restagno G, Chiò A, for the ITALSGEN and SARDINALS Consortia. (2014). Genetic architecture of ALS in Sardinia. *Neurobiol Aging*. 35,2882.e7-2882.e12.

Bostock H, Sharief M K, Reid G, Murray N M. (1995). Axonal ion channel dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain*. 118,217–225.

Breuer A C, Lynn M P, Atkinson M B, Chou S M, Wilbourn A J, Marks K E, Culver J E, Fleegler E J. (1987). Fast axonal transport in amyotrophic lateral sclerosis: an intra-axonal organelle traffic analysis. *Neurology*. 37,738–748.

Brown I A. (1954). Chronic mercurialism; a cause of the clinical syndrome of amyotrophic lateral sclerosis. *A.M.A. Arch Neurol Psychiatry*. 72 674–681.

Cabell L, Ferguson C, Luginbill D, Kern M, Weingart A, Audesirk G. (2004). Differential induction of heme oxygenase and other stress

Autore: Riccardo Oggiano

Titolo della tesi: Studio di metalli pesanti in pazienti affetti da Sclerosi Laterale Amiotrofica ed analisi delle correlazioni cliniche.

Tesi di Dottorato in: Fisiologia, Morfologia e Fisiopatologia del Sistema Nervoso.

Università degli Studi di Sassari

Pag. 55

proteins in cultured hippocampal astrocytes and neurons by inorganic lead. *Toxicol Appl Pharmacol.* 198,49–60.

Carocci A, Rovito N, Sinicropi M S, Genchi G. (2014). Mercury toxicity and neurodegenerative effects. *Rev Environ Contam Toxicol.* 229,1–18.

Casalino E, Calzaretto G, Sblano C, Landriscina C. (2002). Molecular inhibitory mechanisms of antioxidant enzymes in rat liver and kidney by cadmium. *Toxicology.* 179,37–50.

Caselli G, Pozzi L, Vaupel J W, Deiana L, Pes G, Carru C, Franceschi C, Baggio G. (2006). Family clustering in Sardinia longevity: a genealogical approach. *Exp Gerontol.* 41,427–436.

Cavalli-Sforza L, Menozzi P, Piazza A. (1994). *The History and Geography of Human Genes.* Princeton University Press, Princeton.

Cheah B C, Lin C S, Park S B, Vucic S, Krishnan A V, Kiernan M C. (2012). Progressive axonal dysfunction and clinical impairment in amyotrophic lateral sclerosis. *Clin Neurophysiol.* 123,2460–2467.

Chiò A, Borghero G, Pugliatti M, Ticca A, Calvo A, Moglia C, Mutani R, Brunetti M, Ossola I, Marrosu M G, Murru M R, Floris G, Cannas A, Parish L D, Cossu P, Abramzon Y, Johnson J O, Nalls M A, Arepalli S, Chong S, Hernandez D G, Traynor B J, Restagno G; Italian Amyotrophic Lateral Sclerosis Genetic (ITALSGEN) Consortium. (2011). Large proportion of amyotrophic lateral sclerosis cases in Sardinia due to a single founder mutation of the TARDBP gene. *Arch Neurol.* 68,594–598.

Chiò A, Logroscino G, Traynor B J, Collins J, Simeone J C, Goldstein L A, White L A. (2013). Global epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review of the published literature. *Neuroepidemiology.* 41,118–130.

Comi G P, Bordoni A, Salani S, Franceschina L, Sciacco M, Prella A, Fortunato F, Zeviani M, Napoli L, Bresolin N, Moggio M, Ausenda C D, Taanman J W, Scarlato G. (1998). Cytochrome c oxidase subunit I microdeletion in a patient with motor neuron disease. *Ann Neurol.* 43,110–116.

Corti S, Donadoni C, Ronchi D, Bordoni A, Fortunato F, Santoro D, Del Bo R, Lucchini V, Crugnola V, Papadimitriou D, Salani S, Moggio

Autore: Riccardo Oggiano

Titolo della tesi: Studio di metalli pesanti in pazienti affetti da Sclerosi Laterale Amiotrofica ed analisi delle correlazioni cliniche.

Tesi di Dottorato in: Fisiologia, Morfologia e Fisiopatologia del Sistema Nervoso.

Università degli Studi di Sassari

Pag. 56

M, Bresolin N, Comi G P. (2009). Amyotrophic lateral sclerosis linked to a novel SOD1 mutation with muscle mitochondrial dysfunction. *J Neurol Sci.* 276,170–174.

Cox P A e Sacks O W . (2002). Cycad neurotoxins, consumption of flying foxes, and ALS-PDC disease in Guam. *Neurology.* 58,956–959.

Crapper D R, Krishnan S S, Dalton A J. (1973). Brain aluminum distribution in Alzheimer's disease and experimental neurofibrillary degeneration. *Science.* 180,511–513.

Daniele L, Garzillo E, Trojsi F, Monsurrò M, Tedeschi G. (2012). Role of occupational and environmental exposure to heavy metals in amyotrophic lateral sclerosis: a case–control study in Campania Region, Proceedings of the 43rd Congress of the Italian Neurological Society, Rimini, Italy, 6–9 October 2012. *Neurol Sciences Springer-Verlag Italia.* Milan, Italy.

De Vos K J, Grierson A J, Ackerley S, Miller C C J. (2008). Role of axonal transport in neurodegenerative diseases. *Annu Rev Neurosci.* 31,151–173.

Derave W, Van Den Bosch L, Lemmens G, Eijnde B O, Robberecht W, Hespel P. (2003). Skeletal muscle properties in a transgenic mouse model for amyotrophic lateral sclerosis: effects of creatine treatment. *Neurobiol Dis.* 13,264–272.

Dupuis L, Oudart H, René F, Gonzalez de Aguilar J-L, Loeffler J-P. (2004). Evidence for defective energy homeostasis in amyotrophic lateral sclerosis: benefit of a high-energy diet in a transgenic mouse model. *Proc Natl Acad Sci USA.* 101,11159–11164.

Echaniz-Laguna A, Zoll J, Ponsot E, N'guessan B, Tranchant C, Loeffler J-P, Lampert E. (2006). Muscular mitochondrial function in amyotrophic lateral sclerosis is progressively altered as the disease develops: a temporal study in man. *Exp Neurol.* 198,25–30.

Eisen A. (2002). Amyotrophic lateral sclerosis: A review. *BCM J.* 44,362-366.

Ferraiuolo L, Kirby J, Grierson A J, Sendtner M, Shaw J. (2011). Molecular pathways of motor neuron injury in amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Neurol.* 7,616–630.

Autore: Riccardo Oggiano

Titolo della tesi: Studio di metalli pesanti in pazienti affetti da Sclerosi Laterale Amiotrofica ed analisi delle correlazioni cliniche.

Tesi di Dottorato in: Fisiologia, Morfologia e Fisiopatologia del Sistema Nervoso.

Università degli Studi di Sassari

Pag. 57

FIASO-AISLA. (2012). Il Network delle Cure per le malattie complesse. Il caso della SLA. Diffusione delle best practices per la gestione della Sclerosi Laterale Amiotrofica: ideazioni sulla conoscenza acquisita nel progetto SLANCIO. Fondazione ISTUD.

Forte G, Alimonti A, Violante N, Di Gregorio M, Senofonte O, Petrucci P, Sancesario G, Bocca B. (2005). Calcium, copper, iron, magnesium, silicon and zinc content of hair in Parkinson's disease. *J Trace Elem Med Biol.* 19,195–201.

Forte G, Alimonti A, Violante N, Sancesario G, Brusa L, Bocca B. (2007). Metals imbalance in hair of patients affected by Parkinson's disease. *Trace Elem Electrolytes.* 24(4),202–210.

Forte G, Bocca B, Peruzzu A, Tolu F, Asara Y, Farace C, Oggiano R, Madeddu R. (2013). Blood metals concentration in type 1 and type 2 diabetics. *Biol Trace Elem Res.* 156,79–90.

Garzillo E M, Lamberti M, Genovese G, Pedata P, Feola D, Sannolo N, Lucca D, Trojsi F, Monsurro M R, Miraglia N. (2014). Blood lead, manganese and aluminium levels in a regional cohort of ALS patients: does aluminium have an influence? *J Occup Environ Med.* 56,1062–1066.

Gresham L S, Molgaard C A, Golbeck A L, Smith R. (1986). Amyotrophic lateral sclerosis and occupational heavy metal exposure: a case–control study. *Neuroepidemiology.* 5,29–38.

Guidetti D, Bondavalli M, Sabadini R, Marcello N, Vinceti M, Cavalletti S, Marbini A, Gemignani F, Colombo A, Ferrari A, Vivoli G, Solimè F. (1996). Epidemiological survey of amyotrophic lateral sclerosis in the province of Reggio Emilia, Italy: influence of environmental exposure to lead. *Neuroepidemiology.* 15,301–312.

Henkel J S, Engelhardt J I, Siklòs L, Simpson E P, Kim S H, Pan T, Goodman J C, Siddique T, Beers D R, Appel S H. (2004). Presence of dendritic cells, MCP-1, and activated microglia/macrophages in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord tissue. *Ann Neurol.* 55,221–235.

Hirano A, Donnerfeld H, Sasaki S, Nakano I. (1984). Fine structural observations of neurofilamentous changes in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol.* 43,461–470.

Hozumi I, Hasegawa T, Honda A, Ozawa K, Hayashi Y, Hashimoto K,

Autore: Riccardo Oggiano

Titolo della tesi: Studio di metalli pesanti in pazienti affetti da Sclerosi Laterale Amiotrofica ed analisi delle correlazioni cliniche.

Tesi di Dottorato in: Fisiologia, Morfologia e Fisiopatologia del Sistema Nervoso.

Università degli Studi di Sassari

Pag. 58

Yamada M, Koumura A, Sakurai T, Kimura A, Tanaka Y, Satoh M, Inuzuka T. (2011). Patterns of levels of biological metals in CSF differ among neurodegenerative diseases. *J Neurol Sci.* 303,95–99.

Ilieva H, Polumenidou M, Cleveland D W. (2009). Non-cell autonomous toxicity in neurodegenerative disorders: ALS and beyond. *J Cell Biol.* 187,761–772.

Johnson F O e Atchison W D. (2009). The role of environmental mercury, lead and pesticide exposure in development of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurotoxicology.* 30,761–765.

Julien J P, Couillard-Després S, Meier J. (1998). Transgenic mice in the study of ALS: the role of neurofilaments. *Brain Pathol.* 8,759–769.

Julien J P. 1997. Neurofilaments and motor neuron disease. *Trends Cell Biol.* 7,243–249.

Kamel F, Umbach D M, Hu H, Munsat T L, Shefner J M, Taylor J A, Sandler D P. (2005) Lead exposure as a risk factor for amyotrophic lateral sclerosis. *Neurodegener Dis.* 2,195-201.

Kamel F, Umbach D M, Munsat T L, Shefner J M, Hu H, Sandler D P. (2002). Lead Exposure and amyotrophic lateral sclerosis. *Epidemiology.* 13,311–319.

Kanai K, Kuwabara S, Misawa S, Tamura N, Ogawara K, Nakata M, Sawai S, Hattori T, Bostock H. (2006). Altered axonal excitability properties in amyotrophic lateral sclerosis: impaired potassium channel function related to disease stage. *Brain.* 129,953–962.

Kanias G D e Kapaki E. (1997). Trace elements, age and sex in amyotrophic lateral sclerosis disease. *Biol Trace Elem Res.* 56,187–201.

Kapaki E, Zournas C, Kanias G, Zambelis T, Kakami A, Papageorgiou C. (1997). Essential trace element alterations in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci.* 147,171–175.

Kasarskis E J, Ehmann W D, Markesbery W R. (1993). Trace metals in human neurodegenerative diseases. *Prog Clin Biol Res.* 380,299–310.

Kawahara M, Kato M, Kuroda Y. (2001). Effects of aluminum on

Autore: Riccardo Oggiano

Titolo della tesi: Studio di metalli pesanti in pazienti affetti da Sclerosi Laterale Amiotrofica ed analisi delle correlazioni cliniche.

Tesi di Dottorato in: Fisiologia, Morfologia e Fisiopatologia del Sistema Nervoso.

Università degli Studi di Sassari

Pag. 59

the neurotoxicity of primary cultured neurons and on the aggregation of beta-amyloid protein. *Brain Res Bull.* 55,211–217.

Khandelwal P J, Herman A M, Moussa C E H. (2011). Inflammation in the early stages of neurodegenerative pathology. *J Neuroimmunol.* 238,1–11.

Kiernan M C, Vucic S, Cheah B C, Turner M R, Eisen A, Hardiman O, Burrell J R, Zoing M C. (2011). Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet.* 377,942–955.

Kihira T, Sakurai I, Yoshida S, Wakayama I, Takamiya K, Okumura R, Inuma Y, Iwai K, Kajimoto Y, Hiwatani Y, Kohmoto J, Okamoto K, Kokubo Y, Kuzuhara S. (2015). Neutron activation analysis of scalp hair from ALS patients and residents in the Kii Peninsula, Japan. *Biol Trace Elem Res.* 164,36–42.

Kihira T, Yoshida S, Yase Y, Ono S, Kondo T. (2002). Chronic low-Ca/Mg high-Al diet induces neuronal loss. *Neuropathology.* 22,171–179.

Krasnianski A, Deschauer M, Neudecker S, Gellerich F N, Müller T, Schoser B G, Krasnianski M, Zierz S. (2005). Mitochondrial changes in skeletal muscle in amyotrophic lateral sclerosis and other neurogenic atrophies. *Brain.* 128,1870–1876.

Kristiansen J, Christensen J M, Iversen B S, Sabbioni E. (1997). Toxic trace element reference levels in blood and urine: influence of gender and lifestyle factors. *Sci Total Environ.* 204,147–160.

Kuhle J, Lindberg R L P, Regeniter A, Mehling M, Steck A J, Kappos L, Czaplinski A. (2009). Increased levels of inflammatory chemokines in amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Neurol.* 16,771–774.

Lin M T e Beal M F. (2006). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature.* 443,787–795.

Logroscino G, Traynor B J, Hardiman O, Chiò A, Couratier P, Mitchell J D, Swingler R J, Beghi E, for EURALS. (2008). Descriptive epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: new evidence and unsolved issues. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 79,6–11.

Ludolph A C e Jesse S. (2009). Evidence-based drug treatment in

Autore: Riccardo Oggiano

Titolo della tesi: Studio di metalli pesanti in pazienti affetti da Sclerosi Laterale Amiotrofica ed analisi delle correlazioni cliniche.

Tesi di Dottorato in: Fisiologia, Morfologia e Fisiopatologia del Sistema Nervoso.

Università degli Studi di Sassari

Pag. 60

amyotrophic lateral sclerosis and upcoming clinical trials. *Ther Adv Neurol Disord.* 2,319–326.

Lyden A, Larsson B S, Lindquist N G. (1984). Melanin affinity of manganese. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh).* 55,133–138.

Lyras L, Evans P J, Shaw P J, Ince P G, Halliwell B. (1996). Oxidative damage and motor neurone disease difficulties in the measurement of protein carbonyls in human brain tissue. *Free Radic Res.* 24,397–406.

Mackenzie I R, Bigio E H, Ince P G, Geser F, Neumann M, Cairns N J, Kwong L K, Forman M S, Ravits J, Stewart H, Eisen A, McClusky L, Kretschmar H A, Monoranu C M, Highley J R, Kirby J, Siddique T, Shaw P J, Lee V M Y, Trojanowski J Q. (2007). Pathological TDP-43 distinguishes sporadic amyotrophic lateral sclerosis from amyotrophic lateral sclerosis with SOD1 mutations. *Ann Neurol.* 61,427–434.

Mackenzie I R, Rademakers R, Neumann M. (2010). TDP-43 and FUS in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Lancet Neurol.* 9,995–1007.

Madeddu R, Forte G, Bocca B, Tolu P, Sotgiu M A, Sotgiu G, Marchal J A, Sotgiu S, Montella A. (2011). Heavy metals and multiple sclerosis in Sardinian population (Italy). *Anal Lett.* 44,1699–1712.

Mahoney D J, Kaczor J J, Bourgeois J, Yasuda N, Tarnopolsky M A. (2006). Oxidative stress and antioxidant enzyme upregulation in SOD1-G93A mouse skeletal muscle. *Muscle Nerve.* 33,809–816.

Mancuso R e Navarro X. (2015). Amyotrophic lateral sclerosis: Current perspectives from basic research to the clinic. *Progress in Neurobiology.* 133,1–26.

Mano Y, Takayanagi T, Ishitani A, Hirota T. (1989). Mercury in hair of patients with ALS. *Rinsho Shinkeigaku.* 29,844–848.

Maraldi T, Riccio M, Zambonin L, Vinceti M, De Pol A, Hakim G. (2011). Low levels of selenium compounds are selectively toxic for a human neuron cell line through ROS/RNS increase and apoptotic process activation. *Neurotoxicology.* 32,180-187.

Mitchell J D, East B W, Harris I A, Pentland B. (1991). Manganese,

Autore: Riccardo Oggiano

Titolo della tesi: Studio di metalli pesanti in pazienti affetti da Sclerosi Laterale Amiotrofica ed analisi delle correlazioni cliniche.

Tesi di Dottorato in: Fisiologia, Morfologia e Fisiopatologia del Sistema Nervoso.

Università degli Studi di Sassari

Pag. 61

Selenium and other trace elements in spinal cord, liver and bone in motor neurone disease. *Eur Neurol.* 31,7–11.

Mitsumoto H, Santella R M, Liu X, Bogdanov M, Zipprich J, Wu H-C, Mahata J, Kilty M, Bednarz K, Bell D, Gordon P H, Hornig M, Mehrazin M, Naini A, Flint Beal M, Factor-Litvak P. (2008). Oxidative stress biomarkers in sporadic ALS. *Amyotroph Lateral Scler.* 9,177–183.

Miyata S, Nakamura S, Nagata H, Kameyama M. (1983). Increased manganese level in spinal cords of amyotrophic lateral sclerosis determined by radiochemical neutron activation analysis. *J Neurol Sci.* 61,283–293.

Moriwaka F, Satoh H, Ejima A, Watanabe C, Tashiro K, Hamada T, Matsumoto A, Shima K, Yanagihara T, Fukazawa T, Okumura H, Maruo Y, Itoh K, Yoshida K. (1993). Mercury and selenium contents in amyotrophic lateral sclerosis in Hokkaido, the northernmost island of Japan. *J Neurol Sci.* 118,38–42.

Nagata H, Miyata S, Nakamura S, Kameyama N, Katsui Y. (1985). Heavy metal concentration in blood cells in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci.* 67,173–178.

Neumann, M, Sampathu D M, Kwong L K, Truax A C, Micsenyi M C, Chou T T, Bruce J, Schuck T, Grossman M, Clark C M, McCluskey L F, Miller B L, Masliah E, Mackenzie I R, Feldman H, Feiden W, Kretschmar H A, Trojanowski J Q, Lee V M Y. (2006). Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science.* 314,130–133.

Nordberg G F, Fowler B A, Nordberg M. (2015). Handbook on the toxicology of metals, fourth ed. Academic Press.

Pamphlett R, McQuilty R, Zarkos K. (2001). Blood levels of toxic and essential metals in motor neuron disease. *Neurotoxicology.* 22,401–410.

Pasinelli P and Brown R H. (2006). Molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis: insights from genetics. *Nat Rev Neurosci.* 7,710–723.

Perry T L, Krieger C, Hansen S, Eisen A. (1990). Amyotrophic lateral sclerosis: amino acid levels in plasma and cerebrospinal fluid. *Ann Neurol.* 28,12–17.

Autore: Riccardo Oggiano

Titolo della tesi: Studio di metalli pesanti in pazienti affetti da Sclerosi Laterale Amiotrofica ed analisi delle correlazioni cliniche.

Tesi di Dottorato in: Fisiologia, Morfologia e Fisiopatologia del Sistema Nervoso.

Università degli Studi di Sassari

Pag. 62

Picher-Martel V, Dutta K, Phaneuf D, Sobue G, Julien J P. (2015). Ubiquilin-2 drives NF- κ B activity and cytosolic TDP-43 aggregation in neuronal cells. *Mol Brain*. 8,71.

Praline J, Guennoc A, Limousin N, Hallak H, de Toffol B, Corcia P. (2007). Case report; ALS and mercury intoxication: a relationship? *Clin Neurol Neurosurg*. 109,880–883.

Price-Haughey J, Bonham K, Gedamu L. (1986). Heavy metal-induced gene expression in fish and fish cell lines. *Environ Health Perspect*. 65,141–147.

Rao K S J, Shanmugavelu P, Shankar S K, Rukmini Devi R P, Rao R V, Pande S, Menon R B. (1999). Trace elements in the cerebrospinal fluid in Alzheimer's disease. *Alz Rep*. 2,333–338.

Reaume A G, Elliott J L, Hoffman E K, Kowall N W, Ferrante R J, Siwek D F, Wilcox H M, Flood D G, Beal M F, Brown R H, Scott R W, Snider W D. (1996). Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. *Nat Genet*. 13,43–47.

Rodushkin I e Axelsson M. (2000). Application of double focusing sector field ICP-MS for multielemental characterization of human hair and nails. Part II. A study of the inhabitants of northern Sweden. *Sci Total Environ*. 262,21–36.

Roos P M, Vesterberg O, Nordberg M. (2006). Metals in motor neuron diseases. *Exp Biol Med (Maywood)*. 231,1481–1487.

Roos P M, Vesterberg O, Syversen T, Flaten T P, Nordberg M. (2013). Metal concentrations in cerebrospinal fluid and blood plasma from patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Biol Trace Elem Res*. 151,159–170.

Rosen D R. (1993). Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*. 364,362.

Saxena S, Cabuy E, Caroni, P. (2009). A role for motoneuron subtype-selective ER stress in disease manifestations of FALS mice. *Nat Neurosci*. 12,627–636.

Schmidt M L, Carden M J, Lee V M, Trojanowski J Q. (1987). Phosphate dependent and independent neurofilament epitopes in

Autore: Riccardo Oggiano

Titolo della tesi: Studio di metalli pesanti in pazienti affetti da Sclerosi Laterale Amiotrofica ed analisi delle correlazioni cliniche.

Tesi di Dottorato in: Fisiologia, Morfologia e Fisiopatologia del Sistema Nervoso.

Università degli Studi di Sassari

Pag. 63

the axonal swellings of patients with motor neuron disease and controls. *Lab Invest.* 56,282–294.

Schwarz S, Husstedt I, Bertram H P, Kuchelmeister K. (1996). Amyotrophic lateral sclerosis after accidental injection of mercury. *J. Neurol Neurosurg Psychiatry.* 60,698.

Shaw P J, Forrest V, Ince P G, Richardson J P, Wastell H J. (1995) a. CSF and plasma amino acid levels in motor neuron disease: elevation of CSF glutamate in a subset of patients. *Neurodegeneration.* 4, 209–216.

Shaw P J. (2005). Molecular and cellular pathways of neurodegeneration in motor neurone disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatr.* 76,1046–1057.

Shaw, P J, Ince P G, Falkous G, Mantle D. (1995) b. Oxidative damage to protein in sporadic motor neuron disease spinal cord. *Ann Neurol.* 38,691–695.

Shi P, Gal J, Kwinter D M, Liu X, Zhu H. (2010). Mitochondrial dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim Biophys Acta.* 1802,45–51.

Sienko D G, Davis J P, Taylor J A, Brooks B R. (1990). Amyotrophic lateral sclerosis. A case–control study following detection of a cluster in a small Wisconsin community. *Arch Neurol.* 47,38–41.

Sillevis Smitt P A, van Beek H, Baars A J, Troost D, Louwerse E S, Kroes-Hermus A C, de Wolff F A, de Jong J.M. (1992). Increased metallothionein in the liver and kidney of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol.* 49,721–724.

Simpson E P, Henry Y K, Henkel J S, Smith R G, Appel S H. (2004). Increased lipid peroxidation in sera of ALS patients: a potential biomarker of disease burden. *Neurology.* 62,1758–1765.

Smith R G, Henry Y K, Mattson M P, Appel S H. (1998). Presence of 4-hydroxynonenal in cerebrospinal fluid of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol.* 44,696–699.

Sta M, Sylva-Steenland R M R, Casula M, de Jong J M B V, Troost D, Aronica E, Baas F. (2011). Innate and adaptive immunity in amyotrophic lateral sclerosis: evidence of complement activation. *Neurobiol Dis.* 42,211–220.

Autore: Riccardo Oggiano

Titolo della tesi: Studio di metalli pesanti in pazienti affetti da Sclerosi Laterale Amiotrofica ed analisi delle correlazioni cliniche.

Tesi di Dottorato in: Fisiologia, Morfologia e Fisiopatologia del Sistema Nervoso.

Università degli Studi di Sassari

Pag. 64

Sutedja N A, Veldink J H, Fischer K, Kromhout H, Heederik D, Huisman M H, Wokke J H, van den Berg L H. (2009). Exposure to chemicals and metals and risk of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review. *Amyotroph Lateral Scler.* 10,302–309.

Tanridag T, Coskun T, Hürdag C, Arbak S, Aktan S, Yegen B. (1999). Motor neuron degeneration due to aluminium deposition in the spinal cord: a light microscopical study. *Acta Histochem.* 101,193–201.

Tiffany-Castiglioni E. (1993). Cell culture models for lead toxicity in neuronal and glial cells. *Neurotoxicology.* 14,513–536.

Troost D, Van den Oord J J, Vianney de Jong J M. (1990). Immunohistochemical characterization of the inflammatory infiltrate in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 16,401–410.

Valori C F, Brambilla L, Martorana F, Rossi D. (2014). The multifaceted role of glial cells in amyotrophic lateral sclerosis. *Cell Mol Life Sci.* 71,287–297.

Van Campenhout K, Infante H G, Adams F, Blust R. (2004). Induction and binding of Cd, Cu, and Zn to metallothionein in carp (*Cyprinus carpio*) using HPLC-ICP-TOFMS. *Toxicol Sci.* 80,276–287.

Vielhaber S, Winkler K, Kirches E, Kunz D, Büchner M, Feistner H, Elger C E, Ludolph A C, Riepe M W, Kunz W S. (1999). Visualization of defective mitochondrial function in skeletal muscle fibers of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci.* 169,133–139.

Vinceti M, Bottecchi I, Fan A, Finkelstein Y, Mandrioli J. (2012) Are environmental exposures to selenium, heavy metals, and pesticides risk factors for amyotrophic lateral sclerosis? *Rev Environ Health.* 27,19–41.

Vinceti M, Guidetti D, Bergomi M, Caselgrandi E, Vivoli R, Olmi M, Rinaldi L, Rovesti S, Solimè F. (1997). Lead, cadmium, and selenium in the blood of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Ital J Neurol Sci.* 18,87–92.

Vucic S e Kiernan M C. (2006) a. Axonal excitability properties in amyotrophic lateral sclerosis. *Clin Neurophysiol.* 117,1458–1466.

Autore: Riccardo Oggiano

Titolo della tesi: Studio di metalli pesanti in pazienti affetti da Sclerosi Laterale Amiotrofica ed analisi delle correlazioni cliniche.

Tesi di Dottorato in: Fisiologia, Morfologia e Fisiopatologia del Sistema Nervoso.

Università degli Studi di Sassari

Pag. 65

Vucic S e Kiernan M C. (2006) b. Novel threshold tracking techniques suggest that cortical hyperexcitability is an early feature of motor neuron disease. *Brain*. 129,2436–2446.

Watanabe M, Dykes-Hoberg M, Culotta V C, Price D L, Wong P C, Rothstein J D. (2001). Histological evidence of protein aggregation in mutant SOD1 transgenic mice and in amyotrophic lateral sclerosis neural tissues. *Neurobiol Dis*. 8 933–941.

Wiedemann F R, Manfredi G, Mawrin C, Beal M F, Schon E A. (2002). Mitochondrial DNA and respiratory chain function in spinal cords of ALS patients. *J Neurochem*. 80,616–625.

Wiedemann F R, Winkler K, Kuznetsov A V, Bartels C, Vielhaber S, Feistner H, Kunz W S. (1998). Impairment of mitochondrial function in skeletal muscle of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci*. 156,65–72.

Yase Y, Yoshida S, Kihira T, Wakayama I, Komoto J. (2001). Kii ALS dementia. *Neuropathology*. 21,105-109.

Yong V W e Rivest S. (2009). Taking advantage of the systemic immune system to cure brain diseases. *Neuron*. 64,55–60.

Zhao W, Beers D R, Appel S H. (2013). Immune-mediated mechanisms in the pathoprogession of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuroimmune Pharmacol*. 8,888–899.