



A.D. MDLXII

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI SASSARI
FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA

**DOTTORATO DI RICERCA IN FISIOLOGIA, MORFOLOGIA,
FARMACOLOGIA E FISIOPATOLOGIA DEL SISTEMA NERVOSO
XXI CICLO**

METALLI PESANTI E SCLEROSI MULTIPLA

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. Eusebio Tolu

Tutor:

Chiar.mo Prof. Andrea Montella

Dottorando:

Maria Alessandra Sotgiu

Anno Accademico 2007-2008

INDICE

1. Introduzione

1.1. Sclerosi Multipla.....	p.1
1.1.1 Epidemiologia.....	p.2
1.1.2. Patogenesi.....	p.6
1.1.3 Fattori immunogenetici.....	p.6
1.1.4. Meccanismo immunopatologico.....	p.9
1.1.5. Fattori ambientali.....	p.14
1.1.6 Caratteristiche cliniche.....	p.20
1.2. Metalli pesanti.....	p.24
1.2.1. Alluminio.....	p.25
1.2.2. Cadmio.....	p.27
1.2.3. Piombo.....	p.28
1.2.4. Zinco.....	p.32
1.2.5. Rame.....	p.33
1.2.6. Manganese.....	p.36
1.2.7. Ferro.....	p.38

2. Obiettivi dello studio.....	p.39
---------------------------------------	-------------

3. Materiali e Metodi.....	p.39
-----------------------------------	-------------

3.1. Area di studio.....	p.40
--------------------------	------

3.2. Pazienti.....	p.41
3.3. Campioni biologici.....	p.42
3.4. Analisi campioni.....	p.45
3.5. Analisi Statistica.....	p.49
4. Risultati.....	p.50
5. Discussione.....	p.56
Figure	
Figura 1.....	p.3
Figura 2.....	p.5
Figura 3.....	p.5
Figura 4.....	p.11
Figura 5.....	p.13
Tabelle	
Tabella I.....	p.50
Tabella II.....	p.53
Tabella III.....	p.55
Bibliografia.....	p.63

1. Introduzione

1.1. Sclerosi Multipla

La sclerosi multipla (SM), malattia demielinizzante del sistema nervoso centrale a carattere infiammatorio-degenerativo (1), è la causa più comune di disabilità nel giovane adulto. E' una delle condizioni patologiche più invalidanti, non solo sul piano fisico, ma anche su quello psico-sociale. Pur non essendo la più frequente tra le affezioni del sistema nervoso centrale, gli oltre dodicimila studi pubblicati sulla SM nelle ultime decadi confermano il grande interesse sociale e scientifico attorno a questa patologia. Nonostante la quantità di studi sulla malattia ed un approccio multi-disciplinare al problema, alcuni meccanismi patogenetici della SM restano ancora oscuri e l'eziologia è sconosciuta. Le ipotesi più comuni suggeriscono che la malattia è causata da un processo immuno-mediato che si sviluppa in soggetti geneticamente predisposti con l'esposizione a fattori ambientali, anche aspecifici, come ad es. infezioni virali (2).

1.1.1 Epidemiologia

Secondo quanto dimostrato dagli studi descrittivi, la distribuzione geografica della SM è disomogenea (3). Nel complesso sembra interessare soprattutto i paesi dell'Europa centro-settentrionale e quelle regioni extra-europee che in varie epoche storiche sono state soggette ad un rilevante insediamento di popolazioni di origine nord-europea.

Nei Caucasicci, i tassi medi di prevalenza totale variano tra i 30 ed i 180 casi per 100.000 abitanti (3).

In Sardegna, nelle ultime tre decadi, sono stati effettuati accertamenti ripetuti sulla epidemiologia della SM (4-7) (fig.1). Nel 1994 veniva calcolato un tasso di prevalenza di 152 per 100.000 in provincia di Nuoro (8) e di 141 in provincia di Sassari (9). Questi valori, fino a tre volte più elevati rispetto a quanto rilevato in Paesi a simile latitudine ed, in assoluto, tra i più alti del mondo, pongono la Sardegna un'area geografica ad elevato rischio per la malattia (10). La malattia è più frequente nelle donne che negli uomini con un rapporto donne/uomini, in Europa, che varia da 1,1 a 3,4 (11). Dai dati emersi dallo studio sulla provincia di Nuoro emerge una

prevalenza di 195 per 100.000 nelle donne e 92 negli uomini, con un rapporto donne/uomini pari a 2,1 (12).

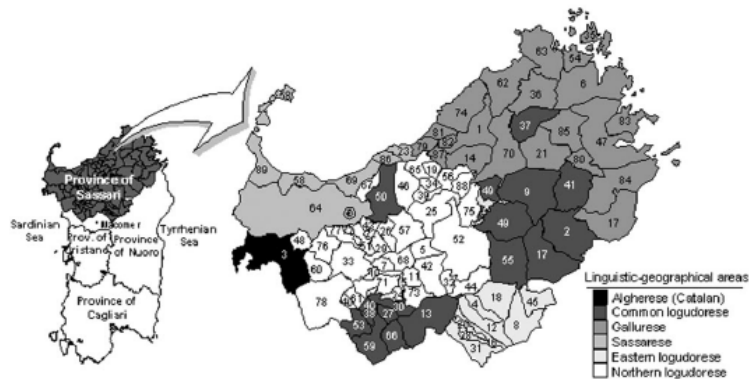


Fig.1- *I gradienti di prevalenza di SM nella provincia di Sassari corrispondono a significative differenze di domini genetici e linguistici (Pugliatti et al, Neurology. 2002;58:277-282)*

Lo studio dei tassi di prevalenza specifici per età mostra una distribuzione pressochè identica tra i due sessi, con valori elevati nel gruppo di età compreso fra i 35 ed 64 anni ed un picco tra i 35 ed 49 anni (10,11). Anche i tassi di incidenza variano in rapporto all' area geografica presa in considerazione, possono mostrare fluttuazioni nel tempo e numerosi studi mostrano un pattern

incrementale solo in parte giustificato da un miglioramento del grado di accertamento diagnostico (11).

In Sardegna, negli ultimi trent'anni, i tassi medi di incidenza annuale della malattia hanno mostrato un andamento incrementale. In provincia di Sassari, il tasso medio totale di incidenza era di 1,1 per 100.000 nel periodo 1965-69 e di 5,8 per 100.000 nel periodo 1995-99 (13). In provincia di Nuoro si assisteva ad un aumento da 1,9 a 6,4 per 100.000 nel periodo 1955-95 (8) (fig.2,3)).

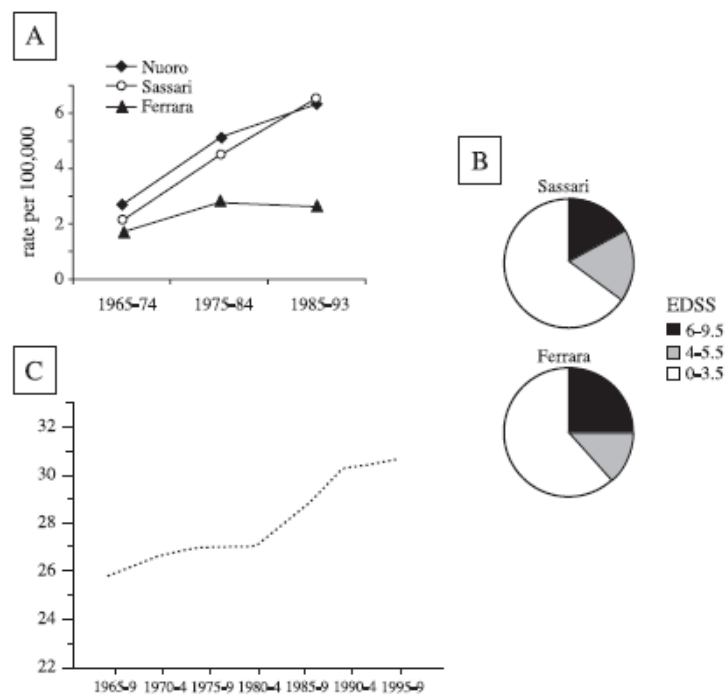


Fig.2 – (A) *Trend temporale delle percentuali di incidenza della Sclerosi Multipla nelle provincie di Nuoro, Sassari e Ferrara dal 1965 al 1983.* (B) *Proporzione delle prevalenze dei casi secondo l'EDSS.* (C) *Distribuzione dell'età media all'esordio, in un intervallo di tempo di 5 anni, nella provincia di Sassari dal 1965* (S. Sotgiu et al, *Neurobiology of Disease* 2004;17:131-143)

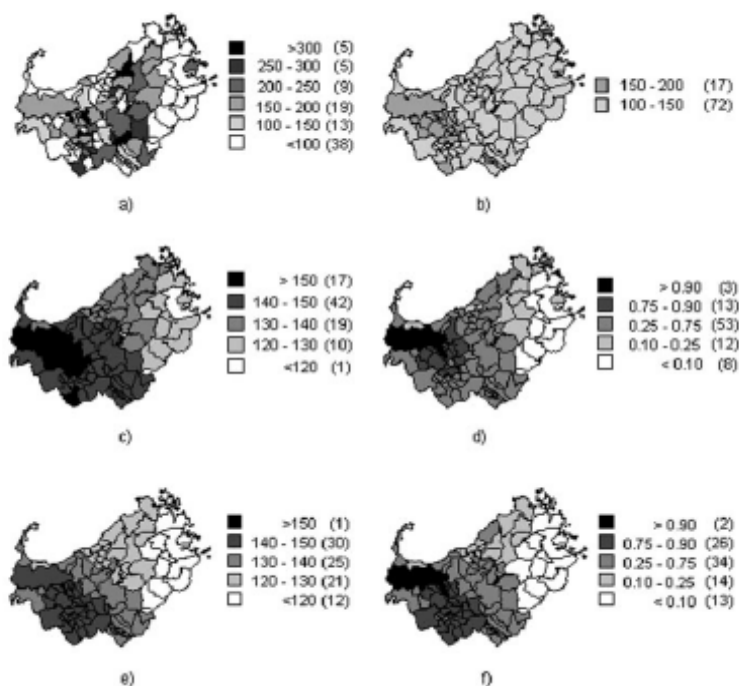


Fig.3 – *Prevalenze della SM per ciascun comune espresse per una popolazione di 100.000 abitanti (Pugliatti et al, Neurology. 2002;58:277-282)*

1.1.2. Patogenesi

La SM può così essere considerata il risultato di una complessa interazione di tipo multifattoriale tra influenze ambientali e genetiche. Nonostante le diverse ipotesi sia sul versante genetico che su quello ambientale, la maggiorparte dei ricercatori sembra essere concorde sul fatto che, alla luce delle attuali conoscenze, alla base del processo di demielinizzazione vi siano almeno tre fattori principali:

- un particolare assetto immunogenetico.
- un meccanismo di tipo immunopatologico.
- alcuni fattori ambientali

1.1.3 Fattori immunogenetici

I risultati di svariati studi sembrerebbero dimostrare come la SM sia una malattia immuno-mediata dall'azione dei linfociti T ed indotta da agenti esterni sconosciuti, quali virus o batteri, in soggetti con uno specifico substrato genetico.

Le evidenze sul contributo dei fattori genetici nella patogenesi della SM derivano da studi su famiglie e gemelli (14-17). Questi studi hanno dimostrato che il rischio per la malattia è più elevato nei familiari biologicamente imparentati con pazienti con SM, rispetto alla popolazione generale. I fratelli dei pazienti hanno un rischio di malattia 22 volte superiore rispetto a quello della popolazione generale, mentre i genitori ed i cugini primi di pazienti con SM hanno un rischio di rispettivamente 12 e 7 volte più alto (18). I risultati degli studi familiari potrebbero anche suggerire una comune condivisione di esposizione a fattori di rischio ambientali durante periodi critici di rischio (infanzia ed adolescenza) e quindi giustificare l'aumentata frequenza di malattia in altri membri della famiglia. Tuttavia Ebers e coll. (1995) hanno dimostrato che il rischio di malattia in parenti di primo grado non consanguinei, individui adottati, che convivono con i pazienti con SM è sovrapponibile a quanto atteso per la popolazione generale canadese. Nei pazienti caucasici affetti da SM, studi genetici di popolazione hanno dimostrato un'associazione con gli alleli di classe II (DRB1*1501, DRB5*0101 e DQB1*0602) del complesso maggiore di istocompatibilità (19). Questi alleli sono, nell'uomo,

tutti contenuti nell'aplotipo HLA-DR2, quello più frequentemente associato alla malattia nei Caucasic.

Per molti altri geni candidati, un'associazione con la SM non è mai stata confermata, probabilmente perché le analisi genetiche sono state effettuate su popolazioni poco stratificate.

In Sardegna tale associazione è più frequente nei soggetti HLA-DR3 e HLA-DR4 (20), come avviene per altre malattie autoimmuni diffuse sul nostro territorio, quali il diabete mellito insulino-dipendente (21) e la celiachia (22).

Le analisi genotipiche e fenotipiche dimostrano ora che la suscettibilità è probabilmente di tipo oligo- o multigenico, mediata cioè da un insieme eterogeneo di geni che interagiscono in maniera epistatica (23,24). In questo tipo di interazione il genotipo di un locus influenzerebbe l'espressione fenotipica del genotipo di un altro locus (25). Dal confronto dei dati di linkage ottenuti da uno screening genomico relativo a 23 malattie autoimmuni o immunomediate, è emerso che la maggior parte dei linkage positivi mappava in maniera non casuale su 18 raggruppamenti o cluster differenti, supportando l'ipotesi che, in alcuni casi, malattie autoimmuni clinicamente distinte possono essere controllate da uno stesso gruppo di geni di suscettibilità (26).

1.1.4. Meccanismo immunopatologico

L'elemento patologico di base tipico della SM è la presenza di placche multifocali di demielinizzazione (27). Queste aree focali di distruzione della mielina sono costituite prevalentemente da linfociti T, pochi linfociti B e plasmacellule, e da un'intensa attivazione di macrofagi e microglia.

Le lesioni possono essere distinte in attive inattive (28). L'attivazione dei macrofagi e la fagocitosi delle proteine della mielina nelle lesioni sono indicatori efficaci di progressione dell'attività di demielinizzazione (29).

Le lesioni attive sono fortemente infiltrate da macrofagi contenenti frammenti di mielina, spesso strettamente associati alle guaine mieliniche in attiva disintegrazione. La lesione cronica inattiva, al contrario, è una lesione nettamente circoscritta, con ridotta componente cellulare, senza evidenza di distruzione attiva della mielina. Predomina la gliosi fibrillare, mentre la densità assonale è spesso marcatamente ridotta. Gli oligodendrociti sono fortemente diminuiti o assenti. Può tuttavia essere ancora presente un grado

variabile di infiammazione, particolarmente nelle regioni perivascolari.

La reazione infiammatoria è associata ad una up regulation di diverse citochine Th1 mediate, inclusi l'interleuchina 2 (IL-2), l'interferone gamma (IFN- γ) e tumor necrosis factor-alfa (TNF- α) che si riscontrano inoltre nel liquor di pazienti con malattia in fase di attività (30,31). Le cellule endoteliali, attivate dalle lesioni attive, esprimono molecole di adesione, fibronectina, il recettore dell'attivatore della plasmina-urochinasi, molecole di classe II del complesso maggiore di istocompatibilità, chemochine e proteine dello stress (32) (fig.4).

Studi di risonanza magnetica nelle fasi iniziali di malattia suggeriscono che la maggiorparte delle lesioni sia preceduta dalla rottura focale della barriera emato-encefalica; tale condizione faciliterebbe pertanto l'ingresso di cellule T autoreattive ed anticorpi all'interno del sistema nervoso centrale (33).

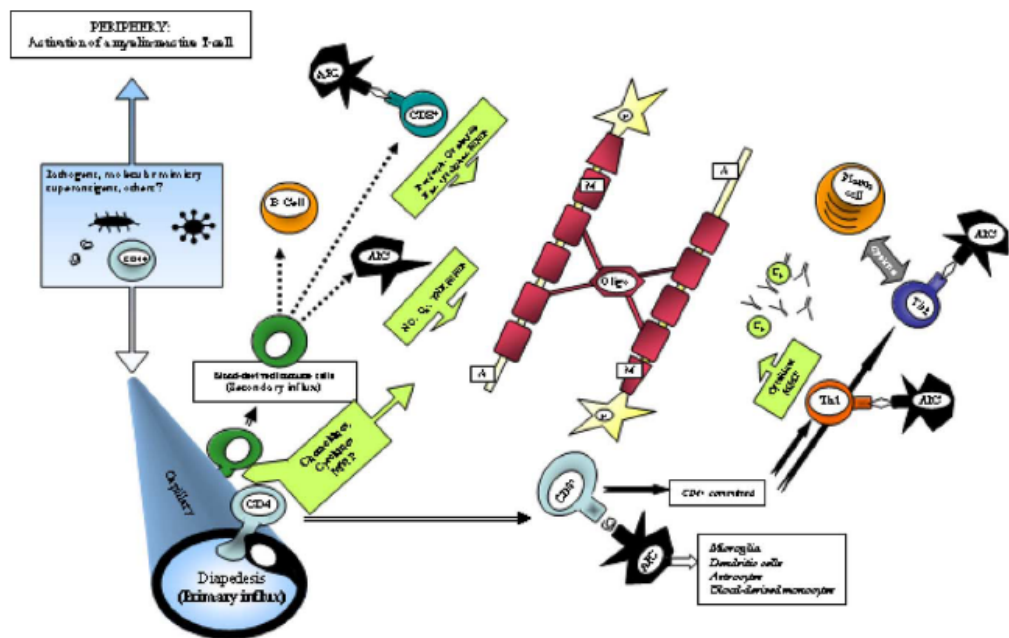


Fig.4 – Meccanismi patogenetici coinvolti nell'induzione e nella propagazione del processo infiammatorio nella Sclerosi Multipla (S. Sotgiu et al, Neurobiology of Disease 2004;17:131-143)

Il risultato istopatologico dei meccanismi infiammatori suddescritti è più frequentemente la demielinizzazione, cioè la formazione di una 'placca' (gliosi), esito del danno a carico della guaina mielinica, quest'ultima prodotta dall'oligodendrocita. Il neurone pertanto, sprovvisto del rivestimento mielinico, perde la capacità di

veicolare i segnali nervosi portando alla comparsa di un segno o di un sintomo.

Gli studi neuropatologici delle lesioni SM hanno chiaramente dimostrato un processo di rimielinizzazione. Sebbene tale fenomeno sia incompleto nelle lesioni croniche e limitato solitamente ai bordi delle placche di demielinizzazione, l'esame delle placche nelle lesioni acute e precoci fa sì che queste stesse vengano definite come "placche ombra", ovvero aree nettamente demarcate dal pallore della mielina e da gliosi. Negli ultimi anni è stata raccolta tutta una serie di dati provenienti da un'ampia casistica biptica ed autptica, che suggerisce la presenza di quadri neuropatologici diversi e, nel singolo caso, predomina un unico pattern neuropatologico. I patologi di Vienna hanno differenziato 4 patterns (34) (fig.5), di cui i primi 2 indicativi di una malattia infiammatoria T mediata ed anticorpo mediata, mentre gli altri 2 più suggestivi di una primaria distrofia oligodendrocitaria.

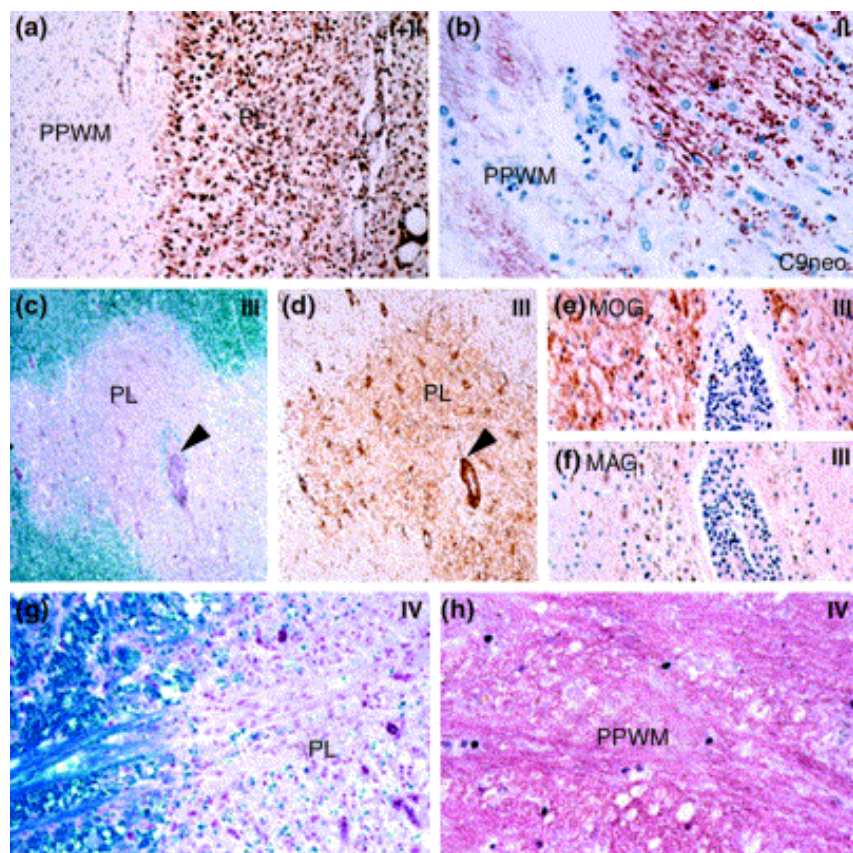


Fig.5 – *Pattern anatomopatologici della Sclerosi Multipla*
(Lucchinetti et al, *Ann Neurol* 2000;47:707-717)

In associazione alla demielinizzazione, nelle lesioni SM si presenta anche una degenerazione assonale, il cui meccanismo sembra essere ancora sconosciuto (35-37).

In realtà persino le storiche descrizioni di Charcot e Marburg indicavano la presenza di una degenerazione assonale, suggerendo tuttavia la natura primariamente demielinizzante della malattia.

Nonostante i vari studi condotti al fine di chiarire i fattori implicati nel meccanismo del danno assonale acuto, il meccanismo resta ancora poco conosciuto. Tuttavia, la grande variabilità interindividuale nell'entità del danno assonale, così come un'evidente dissociazione tra danno assonale e demielinizzazione dimostrata da questi studi, conduce all'ipotesi che il danno della mielina e quello dell'assone possano essere mediati da meccanismi effettori differenti.

Il principale obiettivo dell'identificazione dei meccanismi di danno nelle lesioni SM è rappresentato dalla possibilità di individuare una terapia efficace, limitando conseguentemente i deficit clinici dipendenti in parte dalla demielinizzazione ed in parte conseguenti anche al danno assonale.

1.1.5 Fattori ambientali

Studi di migrazione hanno fornito informazioni di grande importanza sulla determinazione del ruolo ambientale nell'acquisizione del rischio di SM ed hanno quindi permesso di

formulare ipotesi sulla patogenesi ed sul periodo di suscettibilità (40). Individui emigrati da zone ad alto rischio di malattia a zone a basso rischio, quali ad es. Sud Africa (41) o Hawaii (42) (aree a “basso rischio” di SM), mantenevano il livello di rischio del loro Paese d’origine. Tuttavia questa tendenza risultava valida soltanto per gli individui che erano migrati dopo l’età di 15 anni (41). Coloro invece che erano migrati in età infantile o prima della pubertà o adolescenza acquisivano lo stesso rischio dei paesi ospitanti.

Altre osservazioni derivanti da studi su migranti da aree a basso rischio verso aree ad alto rischio (43,44), sebbene meno convincenti per incertezze metodologiche ed interpretative (40), sembrano indicare una tendenza all’incremento del rischio di SM tra gli immigrati, simile a quello dei paesi ospitanti.

Queste conclusioni sono rilevanti, probabilmente vicine alla realtà, tuttavia le ricerche da cui derivano non sono esenti da bias per effetto della selezione di popolazioni migranti e di fattori di confondimento che limitano l’interpretazione dei risultati (40). Per lungo tempo ha dominato incontrastata l’opinione che la SM sia una malattia la cui frequenza resta stabile nel tempo.

L'insieme dei dati d'incidenza dimostra invece l'esistenza di situazioni differenziate e variabili anche in aree geografiche con popolazioni stabili ed etnicamente omogenee (3). Si può quindi affermare che la SM sia una malattia con una distribuzione disomogenea sia sul piano spaziale che temporale. Tali dati porterebbero ad affermare che l'agente eziologico responsabile della malattia diffonde da area ad area, da una popolazione all'altra e deve poter modificare la sua concentrazione e "virulenza" nel tempo (45). Queste qualità sembrerebbero proprie degli agenti infettivi. In seguito ad alcune osservazioni che riportano a fenomeni di tipo epidemico nelle isole Faroe, associazioni tra infezioni virali delle prime vie aeree e recidive di SM e reattività crociate T-cellulari tra proteine della guaina mielinica e antigeni virali (46,47), sono i virus ad aver attirato particolarmente l'attenzione dei ricercatori. I virus maggiormente indagati sono l'herpesvirus umano 6 (HHV-6), per il suo neurotropismo (48), il virus di Epstein-Barr (EBV) secondo un'azione caratterizzata da "molecular mimicry", ovvero dalla capacità dei linfociti T o degli anticorpi di reagire simultaneamente con i peptidi o i determinanti antigenici condivisi sia dagli agenti infettivi che dagli antigeni della mielina (49), ed il retrovirus LM7, noto con il nome di "multiple sclerosis

associated retrovirus” (MSRV) (50-53). Tuttavia, nessun agente virale è ancora certamente attribuibile all’eziologia della SM. E’ comunque probabile che diversi agenti infettivi, anche aspecifici, inducano, in determinate circostanze, una risposta immunitaria contro gli autoantigeni e quindi contro la malattia, piuttosto che sia implicato un singolo virus specifico per la malattia (54). Gli agenti infettivi possono giocare un ruolo non soltanto attraverso un’infezione diretta del sistema nervoso centrale ed un successivo danno tissutale, ma anche attraverso l’induzione, in determinate circostanze, delle risposte immunitarie contro gli antigeni del self. Tra le cause ambientali è stata ventilata più volte la possibilità che l’avvelenamento da metalli pesanti possa essere uno dei fattori principali nel sorgere della malattia.

Evidenze epidemiologiche indicano una preoccupante “esplosione” di 40 casi nell’Ohio, USA, in relazione ad un eccesso di concentrazione di rifiuti di metalli pesanti e specialmente di Cadmio (Cd) nelle acque (55). Un altro piccolo cluster è stato osservato nell’Illinois, USA, nella zona circostante uno smaltitore di metalli pesanti, soprattutto di zinco (Zn) (56) Il mercurio (Hg) dell’amalgama dentale, o derivato da altre fonti, è stato considerato un possibile cofattore eziologico della MS (57-59) mentre ad altri

elementi, tra cui il piombo (Pb), è stato attribuito un possibile effetto tossico sulla mielina, attraverso l'induzione di un aumento della produzione di superossido. Recentemente (60), uno studio di spettrometria ad assorbimento atomico (AAS) mostra che livelli di rame (Cu) sono più elevati nel liquor di pazienti con MS ipotizzando un passaggio di elementi attraverso la barriera emato-encefalica (BEE) cronicamente lesionata nella MS. Le basi fisiopatologiche dell'azione del Cu (61) potrebbero essere in relazione all'enzima citocromo-ossidasi, contenente appunto Cu, mentre per lo Zn in relazione alle metalloproteinasi Zn-dipendenti (MMP), responsabili della degradazione della matrice extracellulare (61-62). E' noto che l'esposizione di ratti con encefalomielite autoimmune sperimentale (EAE, il modello animale di MS) a dosi esogene di Metallotioneina-II (MT-II) Zn-dipendente, riduce in misura significativa i sintomi, l'infiammazione e il danno assonale del sistema nervoso centrale (63) Qualche studio mostra infine che il rischio di MS tra i fumatori e tra gli esposti ai solventi organici è superiore rispetto ai non-fumatori (64-65) Il Cd potrebbe avere relazione eziologica in queste ipotesi di lavoro. Svariati meccanismi sono stati dimostrati, altri solo ipotizzati, per spiegare l'azione tossica dei metalli pesanti sulle strutture nervose coinvolte nelle

suddette patologie. Tuttavia, numerosi aspetti, quali l'effetto esercitato dai metalli pesanti sulle proprietà intrinseche della membrana neuronale, nonché il loro ruolo fisiopatologico nelle malattie suddette e le possibili misure preventive sono ancora ben lontani dall'essere pienamente compresi.

1.1.6 Caratteristiche cliniche della malattia

La SM colpisce preferenzialmente le fasce d'età comprese tra 20 e 40 anni, rara oltre i 50 anni (66) ed il sesso femminile con un rapporto F:M in genere pari a 3:2.

I segni e i sintomi della SM sono diretta espressione del deterioramento della conduzione delle vie neuronali che trasportano segnali elettrici importanti per lo svolgimento di una vita normale.

Le manifestazioni cliniche più comuni di SM comprendono disturbi della sensibilità, disturbi motori, cerebellari, bulbari ed autonomici; tale variabilità, in termini di caratteristiche e tempo di insorgenza, è una peculiarità della malattia, tuttavia non specifica di un preciso decorso clinico.

Il decorso ed il tipo di malattia non possono essere stabiliti né previsti al momento della diagnosi, neanche sulla base di elementi anamnestici certi e di dati emersi da studi sulla storia naturale della malattia (67,68) e sulla base di criteri clinici e neuroradiologici (69, 70).

La classificazione del decorso della malattia è pertanto basata sul follow-up.

Nell'ottica di standardizzare la terminologia da utilizzare sia per descrivere il decorso clinico che i sottotipi di malattia, è stata creata una task-force di 215 esperti, membri della comunità internazionale di ricerca sulla SM (68), che ha identificato consensualmente quattro tipi di malattia:

- *Recidivante-remittente (Relapsing-remitting SM)*: ricadute clinicamente evidenti con completo recupero o deficit residui dopo la risoluzione della crisi. Nessuna progressione di malattia.
- *Primariamente progressiva (Primary progressive)*: progressione della malattia ab initio. Non riesacerbazioni acute.
- *Secondariamente progressiva (Secondary progressive)*: continua progressione della malattia dopo un periodo di tempo ascrivibile come relapsing-remitting, con o senza ricadute o remissioni.
- *Recidivante progressiva (Progressive relapsing)*: malattia progressiva ab initio ma con chiare esacerbazioni acute seguite o meno da completo recupero della *functio lesa*.

E' stata inoltre definita *malattia benigna* l'assenza di riscontro di deficit neurologico a 15 anni dall'esordio. *Malattia maligna*, invece, quando c'è un decorso rapido e progressivo che provoca

deficit neurologici multipli o, addirittura, morte in un breve lasso di tempo (non specificato).

I criteri diagnostici tuttora utilizzati sono stati elaborati prima dell'introduzione della risonanza magnetica (RM) e sono basati principalmente sulla clinica, sull'esame neurologico e sull'analisi immunologica del liquido cefalo-rachidiano, mirata alla ricerca delle bande oligoclonali (68). Lo sviluppo, tuttavia, di nuove metodiche di RM ha reso necessaria una revisione dei criteri di diagnosi e ha portato alla formulazione dei nuovi criteri secondo McDonald et al (69) nati con lo scopo di semplificare il processo diagnostico e di formulare il più rapidamente possibile la diagnosi di SM, anche laddove essa non sia supportata da una evidenza puramente clinica di una disseminazione spazio-temporale. Utilizzando i nuovi criteri è possibile formulare una diagnosi di SM anche in pazienti con un singolo episodio clinico, qualora sia dimostrata una disseminazione spaziale e temporale mediante RM. Per valutare l'impairment della SM, cioè quel complesso di sintomi e segni neurologici determinato dal danno anatomico del sistema nervoso che rappresenta l'impatto della malattia a livello biologico (65), sono state composte delle scale specifiche, tra le quali la più

largamente usata è quella di Kurtzke nella sua versione definitiva,
la Expanded Disability Status Scale (EDSS) (66).

1.2. Metalli pesanti

Vanno sotto il nome di metalli pesanti una serie di elementi appartenenti in massima parte al cosiddetto gruppo degli elementi di transizione, ai quali vengono normalmente aggiunti alcuni altri elementi (metalli come Ba e metalloidi quali As, Sb, Bi e Se) che, pur non appartenendo a tale gruppo, posseggono proprietà chimiche e fisiche molto simili.

Le loro concentrazioni in suoli e rocce sono generalmente dell'ordine dei ppm o ppb. Sono definiti elementi in traccia in contrapposizione a Fe, Al, O, Si, Na, K, Ca e Mg che sono presenti in quantità >0.1% nella crosta terrestre.

Alcuni metalli pesanti vanno anche sotto il nome di micronutrienti o microelementi in quanto risultano essenziali alla nutrizione e alla crescita di piante ed animali (es.: Zn), manifestandosi nocivi solo nel caso in cui le loro concentrazioni superino delle soglie che sono variabili da elemento ad elemento e da organismo ad organismo.

Altri metalli pesanti (es.: Cd) non svolgono alcun ruolo nello sviluppo di biomassa, e la loro presenza è considerata sempre potenzialmente tossica. In realtà la concentrazione di metallo pesante nel suolo alla quale non si osservano effetti negativi

indesiderati, ovvero "sicura", è comunque difficile da stabilire in quanto la tossicità può dipendere da fattori che si sommano alla concentrazione dell'elemento.

La tossicità e la pericolosità dei metalli pesanti non è semplicemente legata alla loro presenza nell'ambiente ed al loro possibile contatto con gli organismi viventi, ma soprattutto alla forma chimica in cui essi sono presenti quando vengono a trovarsi in queste situazioni.

Nella maggior parte dei casi i metalli non sono tossici quando presenti nel loro stato elementare, ad eccezione di Hg allo stato di vapore (ma non allo stato liquido). Le forme cationiche sono potenzialmente più pericolose dal punto vista ambientale sia per la loro maggiore possibilità di diffusione nell'ambiente, che per la maggiore capacità di essere assimilate dagli organismi viventi.

1.2.1 Alluminio

L'alluminio non è un vero metallo pesante: ha un peso molecolare leggero (numero 13 sulla tabella periodica degli elementi) e si comporta diversamente dai metalli come piombo o mercurio.

La gamma della quantità di alluminio nel corpo umano è fra i 50 mg e 150 mg, con una media di circa 65 mg. Il maggiore

assorbimento avviene a livello intestinale e la maggior parte dei 10-100 mg presenti nell'alimentazione (tutti gli alimenti anche se non contaminati contengono tracce di questo metallo) viene escreta con le feci.

Le fonti possibili di esposizione di alluminio includono l'acqua potabile (76) (particolarmente nelle zone esposte a pioggia acida), sale da cucina (solo se addizionato a silicato di Al come antiagglomerante), le pentole, utensili da cucina e farmaci che lo contengono come gli antiacidi.

Proprio a causa della sua abbondanza sulla terra e dell'utilizzo diffuso, molti scienziati ritengono che non sia realmente molto tossico.

Per la maggior parte delle persone, l'assorbimento maggiore proviene dagli additivi alimentari quali il fosfato di alluminio di sodio (un emulsionante dei formaggi fusi), l'allume di potassio (usato per imbiancare farine) ed il silico-alluminato di sodio e/o il silicato di calcio di alluminio (aggiunto al sale comune da tavola per facilitarne l'uscita dalla saliera impedendo la formazione di grumi) (78).

La maggior parte di questo minerale può essere trovata nei polmoni, nei reni, nelle ossa, nel cervello, nel fegato e nella tiroide.

Le cellule dei pazienti affetti da diverse forme senili di demenza, e in particolare quelli affetti da Alzheimer (79), contengono da 4 a 6 volte più alluminio dei controlli. Può determinare stipsi, cute secca, cefalea ed importanti disturbi della memoria.

1.2.2. Cadmio

Il cadmio è un minerale in traccia, tossico, che ha una struttura molto simile a quella dello zinco. Non ha nessuna funzione biologica nel corpo umano ed i suoi effetti tossici nell'organismo vengono tenuti sotto controllo dallo zinco (78).

Il cadmio si trova principalmente negli alimenti raffinati come la farina, il riso e lo zucchero bianco. E' presente anche nell'aria, nel fumo di sigaretta e nelle zone inquinate come quelle intorno alle fabbriche di zinco. Inoltre, l'acqua più dolce contiene di solito maggiori quantità di cadmio rispetto all'acqua più dura in quanto assorbe il cadmio dalle tubature metalliche degli acquedotti. Il fumo delle sigarette contiene quantità notevoli di cadmio. Un pacchetto di sigarette deposita da 2 a 4 milligrammi (mg) di cadmio nei polmoni di un fumatore. Una parte del fumo rimane nell'aria e viene inalata nello stesso modo da fumatori e non fumatori.

La concentrazione totale di cadmio nell'organismo umano aumenta con l'età e varia nelle diverse aree geografiche. L'assunzione giornaliera di cadmio è stata valutata tra i 13 ed i 24 microgrammi (μg). L'eliminazione giornaliera è di 10 μg /litro. Viene assorbito molto poco, quindi in circostanze normali dal punto di vista alimentare e ambientale, non rappresenta un problema. Il fegato e i reni sono le zone in cui si deposita maggiormente.

Lo zinco è un antagonista naturale del cadmio. Quando si presenti una carenza di zinco nell'alimentazione, il corpo può reagire accumulando il cadmio al suo posto. Se l'assunzione giornaliera di zinco è elevata, lo zinco sarà immagazzinato e il cadmio verrà invece espulso (78). L'intossicazione da cadmio può essere combattuta col selenio e con gli arginati, contenuti nelle alghe che, combinandosi col cadmio, lo eliminano dal corpo, un procedimento che può prevenire l'avvelenamento.

1.2.3. Piombo

Il piombo è l'82° elemento nella tavola periodica. Il suo numero atomico è 82 e il peso atomico 207,19 . E' un metallo noto dall'antichità ed è relativamente abbondante sulla crosta terrestre (13gr/ton, al 36° posto), dove si trova nel minerale galena (PbS). Il

cristallo ha una struttura cubica a facce centrate. Il piombo è un metallo lucido e bluastro; è piuttosto morbido, molto malleabile e duttile ed è un mediocre conduttore di elettricità. E' molto resistente alla corrosione, ma al contatto con l'aria si ossida e annerisce. Tubature di piombo, che portano le insegne dell'impero romano e venivano usate come scarichi dei bagni, sono tuttora funzionanti.

Il piombo ha molteplici utilizzi, che recentemente si cerca di limitare a causa della consapevolezza della sua tossicità e del danno indotto dalla sua dispersione non controllata nell'ambiente. Viene impiegato negli accumulatori, nelle munizioni, nelle tubature, in vernici come il minio, come schermo contro le radiazioni, e in leghe con lo stagno per saldature. Nella benzina, ha una funzione di antidetonante in forma di piombo tetraetile ($PbEt_4$). Il piombo figura al 2° posto nella lista delle sostanze pericolose indicate dall'ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry) nel 1999. La nocività di questo metallo è nota da molto tempo, specie nelle sue manifestazioni acute (colica saturnina), tuttavia solo recentemente la dose considerata critica è stata notevolmente abbassata: viene considerata “alta” una dose di Pb pari $30 \mu g/dl$ e potenzialmente nocive, specie nello sviluppo, quantità uguali o superiori a $10 \mu g/dl$ ($0.1 ppm$) (77). Assorbito essenzialmente

attraverso la respirazione e la nutrizione, il piombo non viene metabolizzato, ma per larga parte escreto, mentre il resto (circa 20%) si distribuisce nei tessuti e in particolare nel sangue (dove circola quasi esclusivamente negli eritrociti), nei tessuti minerali (ossa e denti), nei tessuti molli (reni, midollo osseo, fegato e cervello).

La manifestazione più subdola e pericolosa dell'avvelenamento da piombo è quella a carico del sistema nervoso. Negli adulti il danno da piombo si manifesta soprattutto con neuropatia periferica, che si ritiene dovuta a un processo di demielinizzazione delle fibre nervose. L'esposizione intensa ad elevate dosi di piombo (da 100 a 200µg/dl) provoca encefalopatia, i cui sintomi sono: vertigini, insonnia, cefalea, irritabilità e successivamente crisi convulsive e coma. La neuropatia da piombo colpisce soprattutto nello sviluppo, con turbe comportamentali e danni cognitivi. Studi epidemiologici hanno mostrato una forte correlazione fra il livello di piombo nel sangue e nelle ossa e scarse prestazioni in prove attitudinali (test QI o psicometrici). Il processo di apprendimento avviene attraverso la formazione e il rimodellamento delle sinapsi e l'effetto tossico del piombo su questo processo suggerisce che questo metallo danneggi specificamente la funzione sinaptica. Gli effetti del piombo sul

cervello, con il conseguente ritardo mentale e deficit cognitivo, sono mediati da una sua interferenza con i tre principali sistemi di neurotrasmissione: il sistema dopaminergico, quello colinergico e soprattutto quello glutammatergico. L'effetto del piombo sui primi di questi due sistemi (dopaminergico e colinergico) sono accertati, ma scarsamente descritti dal punto di vista dei meccanismi. E' noto invece come il piombo interferisca direttamente con l'azione del glutammato, il fondamentale neurotrasmettitore del cervello. Il glutammato esplica la sua azione di stimolazione eccitatoria dei neuroni legandosi a recettori di membrana che appartengono a diverse famiglie. Dosi micromolari di piombo sono in grado di bloccare il flusso di ioni attraverso il canale di membrana associato a una classe specifica di recettori del glutammato (denominati tipo NMDA). I recettori NMDA, appunto attraverso il funzionamento del canale ionico, svolgono un ruolo fondamentale nella trasmissione sinaptica eccitatoria e, per certe loro caratteristiche peculiari, appaiono coinvolti nei processi di formazione delle reti neuronali, e quindi nelle funzioni della memoria e dell'apprendimento. Sono proprio questi recettori che appaiono uno dei bersagli critici del piombo nei neuroni del sistema nervoso

centrale. Come ciò sia in grado di alterare lo sviluppo cognitivo è tuttora ignoto.

1.2.4. Zinco

Lo zinco è un minerale in traccia essenziale, presente nell'organismo in quantità superiore a quella di qualsiasi altro oligoelemento al di fuori del ferro. Lo zinco è presente in tutti i tessuti. Il corpo umano contiene approssimativamente dai 2 ai 3 gr di zinco. Il sangue ne contiene circa 900 µg/100 ml.

E' un elemento costitutivo di oltre 2000 enzimi preposti alla digestione e al metabolismo ivi compresa l'anidrasi carbonica, necessaria per la respirazione dei tessuti. Alcuni di questi enzimi hanno un ruolo nella disintossicazione dall'alcool, nel metabolismo osseo, nella digestione delle proteine, nella sintesi dell'RNA, nel trasporto degli elettroni, e nella produzione di energia aerobica e anaerobica. Inoltre è importante nella sintesi del DNA. Le migliori fonti di tutti gli oligoelementi nel giusto equilibrio sono i cibi naturali che non hanno subito processi di lavorazione. Diete ricche di proteine, prodotti a base di cereali integrali, lievito di birra, crusca, germe di grano e semi di zucca sono di solito ricchi di zinco. Viene rapidamente assorbito nella parte superiore

dell'intestino tenue ed eliminato per la maggiorparte attraverso le feci. Le riserve maggiori di zinco sono il fegato, il pancreas, i reni, le ossa e i muscoli volontari. E' depositato anche in alcune parti degli occhi, nella prostata e negli spermatozoi, nella cute, nei capelli, nelle unghie ed è presente anche nei globuli bianchi. Lo zinco è relativamente poco tossico. Tuttavia l'assunzione prolungata di dosaggi alti ha causato effetti collaterali. come nausea, vertigini, perdita della coordinazione muscolare, sonnolenza, fastidi gastrointestinali, apatia, insufficienza renale, anemia e vomito. La carenza di zinco ostacola la produzione di energia, la sintesi delle proteine, la formazione del collagene e la tolleranza all'alcool (76).

1.2.5. Rame

Il rame è un minerale in traccia presente in tutti i tessuti dell'organismo in quantità che vanno dai 75 ai 100 mg. Durante la crescita la percentuale più alta si trova nei tessuti in via di sviluppo. Ha un ruolo nella respirazione perché partecipa alla sintesi dell'emoglobina, la sostanza che nel sangue trasporta l'ossigeno. Partecipa alla produzione del collagene e della noradrenalina. Il rame è anche uno dei più importanti antiossidanti del sangue e

previene l'irrancidimento degli acidi grassi polinsaturi e aiuta la membrana cellulare a rimanere sana.

Il rame è presente in molti enzimi. Contribuisce alla conversione dell'aminoacido tirosina in melanina che colora capelli e cute. Partecipa anche al metabolismo delle proteine e ai processi di cicatrizzazione. Il rame è necessario per la sintesi dei fosfolipidi, sostanze essenziali nella formazione delle membrane protettive della mielina che circondano le fibre nervose. Il rame ha un ruolo nel processo di ossidazione della vitamina C e collabora con questa vitamina alla formazione dell'elastina, una componente fondamentale delle fibre elastiche dei muscoli del corpo. Il rame è necessario per la formazione di una buona struttura ossea. E' necessario anche per la produzione dell'RNA. Tra gli alimenti più ricchi di rame ricordiamo il fegato, i cereali integrali, le mandorle, le verdure a foglia verde, i molluschi, i crostacei, i rognoni, le noci, le melasse, il cavolfiore, gli avocados, le interiora, le uova, il pollame e i legumi secchi (in particolare la soia). L'assorbimento avviene nello stomaco e nella parte superiore dell'intestino. La maggior parte del rame proveniente dal cibo viene eliminata nelle feci e nella bile, una piccola quantità viene eliminata con le urine. Il rame viene immagazzinato nei tessuti; troviamo le concentrazioni

più alte nel fegato, nel cuore e nel cervello. Le ossa e i muscoli hanno minori concentrazioni di rame, ma a causa della loro massa, contengono oltre il 50% del totale del rame presente nell'organismo. Il rame in piccole quantità non è tossico per gli esseri umani: un adulto può assumerne sino a 35 mg al giorno senza rischio di intossicazioni. La configurazione biochimica di alcuni individui li predispone all'accumulo di rame. Uno di questi casi è rappresentato dal morbo di Wilson, un disturbo genetico raro derivante da un metabolismo anomalo del rame, che determina un accumulo eccessivo di rame nel fegato, nel cervello, nei reni e nella cornea. Un eccesso di rame nel sangue può aggravare l'ipertensione (dovuta all'uso di contraccettivi orali o al fumo), può causare balbuzie, autismo, iperattività infantile, tossiemia gravidica, tensione premestruale (l'attività ormonale ne aumenta i livelli ematici), depressione, insonnia, senilità, calvizie precoce, tinnito (fischi nelle orecchie), pigmentazione facciale, dolori alle articolazioni, ipoglicemia funzionale, cirrosi epatica, ipoproteinemia, carenza di niacina, infezioni, attacchi di cuore, leucemia e malattie mentali. Tra i sintomi dell'intossicazione troviamo nausea, vomito, dolore epigastrico, cefalea, vertigini, debolezza, diarrea e un gusto metallico in bocca. I casi di

intossicazione più grave possono dare tachicardia, ipertensione, ittero, uremia, coma e morte.

1.2.6. Manganese

Oggi sappiamo che l'oligoelemento manganese svolge un ruolo molto importante come antiossidante prevenendo la formazione di forme tossiche di ossigeno. Si ritiene che possa avere un ruolo nel processo degenerativo di invecchiamento. Agisce come attivatore di numerosi enzimi necessari per l'utilizzazione della colina, della biotina, della tiamina e dell'acido ascorbico. E' un catalizzatore nella sintesi degli acidi grassi, del colesterolo e dei mucopolisaccaridi. Partecipa anche alla produzione delle proteine, dei carboidrati e dei grassi ed è necessario per la regolazione dello zucchero nel sangue. Tra le funzioni del manganese troviamo 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 manganese è presente in piccole dosi nelle ossa, nell'ipofisi, nel pancreas, nella mucosa intestinale, nel fegato e in altri tessuti. Tra gli alimenti più ricchi di manganese ricordiamo i cereali integrali, l'avocado, le alghe, il tuorlo d'uovo,

la frutta secca, i semi, i legumi, i mirtilli, l'ananas, gli spinaci, i piselli secchi e le verdure verdi. Il manganese viene assorbito mentre transita nell'intestino tenue e ne viene eliminata una quantità pari a 4 mg/die attraverso le feci. Si concentra soprattutto nei reni, nelle ossa, nel fegato, nel pancreas e nella ghiandola pituitaria. Un accumulo eccessivo di manganese nei tessuti 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, espressione assente, impotenza, morbo di Parkinson e malattie virali.

1.2.7. Ferro

Il ferro è un metallo brillante, duttile, malleabile, grigio-argenteo (gruppo VIII della tavola periodica). Il ferro è più usato tra tutti i metalli, formando il 95 % di tutto il metallo prodotto universalmente. La combinazione di basso costo ed ad alta resistenza lo rendono indispensabile: le sue applicazioni vanno da contenitori alimentati ad automobili famigliari, dai cacciaviti alle lavatrici, dalle navi da carico alle graffette per la carta. L'acciaio è la lega migliore del ferro nota ed alcuni di composti del ferro includono: ghisa, ferro di getto, acciaio al carbonio, ferro modellato, acciai legati, ossidi di ferro. E' il metallo più abbondante sulla terra ed e' considerato essere il decimo elemento più abbondante nell'universo. Il ferro è essenziale per gli esseri viventi, costituisce una parte essenziale dell'emoglobina. Il fabbisogno giornaliero è pari a 7 mg nell'uomo e 11 mg nella donna. Può essere trovato nella carne, patate e vegetali. Il ferro può causare congiuntivite, coroiditi e retiniti se entra e rimane in contatto con i tessuti. L'inalazione cronica di concentrazioni eccessive dei vapori delle polveri dell'ossido del ferro può provocare lo sviluppo di pneumoconiosi benigna, detta siderosi, che è osservabile come

cambiamento dei raggi X. Nessun danno fisico alle funzione polmonare è associato alla siderosi.

2. Obiettivi dello studio

L'obiettivo della ricerca è stato quello di rilevare, attraverso uno studio pilota di tipo trasversale, la presenza di alcuni metalli pesanti (Al, Cd, Cu, Fe, Pb, Mn, Zn) nel liquido cefalorachidiano di soggetti affetti da sclerosi multipla e soggetti affetti da altre patologie neurologiche e di quantificarne la loro concentrazione, al fine di validare l'ipotesi di un'eziologia ambientale nei meccanismi patogenetici della SM.

Obiettivo secondario è stato quello di valutare il ruolo prognostico dei suddetti metalli nel determinare le diverse forme cliniche della SM, con andamento cioè di tipo recidivante o di tipo progressivo.

3. Materiali e metodi

Per tale studio pilota è stato utilizzato un disegno trasversale randomizzato semplice basato su un metodo di indagine definito dalla raccolta consecutiva di liquor.

I dati epidemiologici, demografici e clinici (diagnosi clinica, professione, sesso, data e luogo di nascita, luogo di residenza,

esposizione a fumo, caffè, alcool, tipo di dieta) dei pazienti adulti a cui il liquor è stato prelevato sono stati raccolti presso i reparti e gli ambulatori dell'Azienda Ospedaliero Universitaria di Sassari.

Non è stata necessaria l'approvazione delle istituzioni dei diritti umani ed il consenso scritto informato, per la raccolta dei dati sud descritti, vista la natura osservazionale retrospettiva dello studio.

3.1 Area di studio

Lo studio è stato condotto su un campione di pazienti residenti o afferenti alla provincia di Sassari. Nell'ambito di questo territorio, secondo i dati dell'ultimo censimento (71), si è verificato un incremento della popolazione, da 381.191 nel 1961 a 440.517 nel 2001. In virtù del basso tasso migratorio (1,8% e 1,6% per i flussi di immigrazione ed emigrazione, rispettivamente) (72), la popolazione in studio è considerata stabile. La maggior parte del flusso migratorio avviene infatti all'interno della regione. Ciò ha portato, nel tempo, ad una composizione etnica relativamente omogenea, costituita prevalentemente da individui nati in questo territorio. Lo studio della provincia di Sassari è di particolare interesse per varie ragioni.

La provincia di Sassari rappresenta una popolazione geopoliticamente definita per la quale i tassi di prevalenza ed incidenza della SM sono stati documentati nel tempo attraverso accertamenti epidemiologici ripetuti (5-7, 9). Aggregati spaziali di malattia sono stati identificati nell'ambito di alcune sottoregioni della provincia, il che suggerisce una eterogeneità dell'incidenza della malattia a livello microgeografico (73).

I dati epidemiologico-genetici raccolti possono rappresentare la base di studi genetico-molecolari aventi lo scopo di poter correlare fenotipi clinici con polimorfismi eziologici.

3.2 Pazienti

L'Istituto di Clinica Neurologica della Facoltà di Medicina, dell'Università di Sassari, è sede di un Centro per la Diagnosi ed il Trattamento della SM, autorizzato dalla Regione Autonoma della Sardegna (Decreto Giunta RAS n. 22/21 del 16/5/1989) ed è inoltre il Centro Regionale per la Prescrizione e Dispensazione di Farmaci Immunoprofilattici per il Trattamento della SM.

Il Centro SM di Sassari costituisce pertanto la principale struttura sanitaria di riferimento per i circa 1200 pazienti con SM residenti nella Sardegna centro-settentrionale (800.000 ca. pop. gen.).

I pazienti oggetto dello studio sono inclusi in un registro di casi di SM (69) residenti o incidenti in provincia di Sassari, che fu costituito nel 1995 presso l'Istituto di Clinica Neurologica di Sassari nell'ambito di un progetto sostenuto dalla Associazione Italiana per la SM. Di fatto, tuttavia, già da oltre 10 anni prima, era stata effettuata una sistematica raccolta di dati clinici ed epidemiologici da pazienti con SM, incluse informazioni di tipo familiare-genealogico. Il periodico aggiornamento del registro attraverso le segnalazioni di casi di SM da parte di neurologi e medici di base operanti sul territorio provinciale, ed altre strutture sanitarie in ambito universitario ed ospedaliero, associazioni di volontariato, centri di neuroriabilitazione, servizi di diagnostica, elenchi di farmaci immunoprofilattici, ecc., ha consentito la realizzazione di studi epidemiologici descrittivi ed analitici, ed indagini di carattere socio-sanitario.

3.3 Campioni biologici

Tutti i pazienti in oggetto sono stati sottoposti a prelievo di liquido cefalorachidiano mediante **rachicentesi**.

E' una metodica mediante la quale si prelevano alcuni cc di un liquido (detto liquido cefalorachidiano o "liquor"), in cui sono

immerse le strutture del Sistema Nervoso Centrale, allo scopo di ottenere informazioni utili per formulare una corretta diagnosi e di instaurare una appropriata terapia. L'esame, eseguito in asepsi rigorosa, consiste nell'introduzione di un apposito ago con mandrino nello spazio compreso tra due processi spinosi vertebrali, solitamente tra L3-L4 o L4-L5 ove il Midollo Spinale non è più presente. Giunti nello spazio subaracnoidea, il mandrino viene ritirato ed il liquor può essere raccolto nella quantità minima necessaria allo svolgimento degli esami richiesti dal caso, raccogliendolo in apposite provette che verranno successivamente inviate al Laboratorio Analisi. Terminata la raccolta, il mandrino viene re-inserito e l'ago estratto. Durante la procedura il paziente manterrà una posizione seduta con il dorso flesso e le gambe pendenti oppure, se ciò non è possibile, distesa in decubito laterale con gli arti inferiori paralleli flessi sull'addome. Il dolore che avvertirete durante l'esecuzione dell'esame è di poco superiore a quello avvertito durante una normale iniezione intramuscolare. In rari casi, soprattutto in presenza di una patologia artrosica del rachide lombare che rende più difficoltoso il reperimento dello spazio subaracnoideo, l'operatore può essere costretto a ripetere la procedura, con conseguente aumento del disagio per il paziente.

Dopo l'esame può insorgere una cefalea dovuta ad una ipotensione liquorale da deflusso del liquor in corrispondenza della breccia durale aperta dall'ago, che compare classicamente in stazione eretta e che tende alla spontanea risoluzione nel giro di alcuni giorni. Per prevenire tale complicanza si usano aghi sottili e si preleva la quantità di liquor minima indispensabile, compatibilmente con le necessità del laboratorio. Successivamente all'esame si esegue una piccola medicazione, e si invita il paziente ad rimanere sdraiato per le successive 24 ore assumendo abbondanti liquidi. Se necessario si provvederà a somministrare infusioni idratanti per via endovenosa e terapia analgesica. Raramente può essere avvertito un transitorio dolore folgorante a livello di uno od entrambi gli arti inferiori che indica la puntura delle radici nervose ed è un inconveniente benigno.

I rischi dell'esame sono rappresentati da cefalea da ipotensione liquorale, erniazione di masse intracraniche (evenienza possibile solo in caso di presenza di masse intracerebrali che viene scongiurata eseguendo prima dell'esame una valutazione del fondo oculare e se possibile una TC), contaminazione delle meningi da processi settici (tale rischio viene ridotto da una rigorosa asepsi ottenuta con un accurato lavaggio delle mani dell'operatore, una

rigorosa disinfezione della cute del paziente e dall'uso di teli, guanti e strumenti sterili), emorragia subaracnoidea ed ematoma intrarachideo (eventi rari che occorrono solo in caso di presenza di diatesi emorragiche non note prima dell'esame).

Il liquor prelevato mediante rachicentesi è stato raccolto in eppendorf di polistirene, adeguatamente lavati con acqua deionizzata, al fine di eliminare eventuali fonti di contaminazione.

Il liquor è stato poi congelato a -20°C fino al momento dell'analisi mediante spettrofotometria. Prima di iniziare l'analisi, i campioni sono stati diluiti semplicemente con acqua deionizzata altamente purificata (EASY-pure, PBI) come segue: 1+4 (v+v) per tutti i metalli oggetto dello studio.

3.4. Analisi campioni

La tecnica di indagine utilizzata per l'analisi dei metalli pesanti è quella comunemente denominata **ICP** nella sua versione ICP-MS (Inductively Coupled Plasma –Mass Spectrometry)

La tecnica ICP-MS utilizza un plasma come sorgente di atomizzazione ed eccitazione. Il plasma è un gas elettricamente neutro con una certa percentuale di ionizzazione ($\sim 5\%$). Il sole, i fulmini e l'aurora boreale sono esempi di plasma in natura.

L'energia che mantiene un plasma analitico deriva da un campo elettrico o magnetico; essi non “bruciano” il campione. La maggior parte dei plasma analitici opera con argon o elio, cosa che rende la combustione impossibile.

I plasma sono caratterizzati da alta temperatura (tipicamente nel range 6000-8000 K) e da alta densità ionica ed elettronica.

Il plasma ad accoppiamento induttivo (ICP) è un plasma indotto da una radiofrequenza nel quale una spira di induzione (RF coil) viene utilizzata per produrre un campo magnetico. La spira è posta attorno ad una torcia di quarzo all'interno della quale si genera il plasma; al suo interno scorre acqua a scopo di raffreddamento. La spira è placcata in oro o argento per fornire la minima resistenza elettrica alla radiofrequenza (non si formano ossidi).

La torcia (12–30 mm OD) è formata da tre tubi circolari di quarzo concentrici. Essa ha tre inlet separati per il gas (di solito argon ad alta purezza):

- Il gas principale entra nel plasma attraverso il canale esterno con un flusso tangenziale di 8–20 mL/min
- Il gas ausiliario ha un flusso tangenziale di 0.5–3 mL/min
- Il gas nebulizzatore ha un flusso laminare di 0.1-1.0 mL/min e trasporta il campione nel plasma

La maggior parte dei campioni analizzati sono soluzioni acquose. Per le soluzioni, un nebulizzatore è utilizzato per convertire il flusso di liquido in un aerosol che consiste di particelle dal diametro compreso tra 1 e 10 μ . L'iniezione diretta di liquidi nel plasma ne causerebbe lo spegnimento, oppure si avrebbe una desolvatazione incompleta e quindi processi di eccitazione, ionizzazione ed emissione meno efficienti.

Il campione viene introdotto nel plasma tramite una pompa peristaltica che eroga un flusso costante intorno a 0,1 ml/min (ICP-MS).

Rispetto ad un sistema ICP-AES (Inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry) esistono degli elementi in comune, ma anche delle significative differenze. Tra gli elementi in comune vi sono l'atomizzazione con il plasma, l'analisi su un flusso continuo di campione, la risposta dipendente dalla concentrazione e non dalla massa. Tra le differenze, invece, vi sono il segnale analitico (intensità di emissione nell'ICP-AES, conteggio degli ioni nell'ICP-MS), l'orientamento della torcia (verticale o orizzontale nell'ICP-AES, sempre orizzontale nell'ICP-MS), la sensibilità (maggiore per ICP-MS), la robustezza (maggiore per ICP-AES). Entrambi gli strumenti sono in grado di effettuare un'analisi

qualitativa (riconoscimento degli elementi presenti nel campione in base alla luce emessa alle principali righe di emissione) e semiquantitativa (individuazione dell'ordine di grandezza della concentrazione degli analiti).

3.5. Analisi Statistica

Successivamente alla raccolta dei dati presenti su specifico supporto cartaceo, è stato compiuto l'inserimento in un foglio elettronico (matrice dei dati); a ciò ha fatto seguito l'elaborazione statistica mediante il sistema informatico Stata 9.0 (StataCorp, Stata Statistical Software Release 9, College Station, TX, USA, 2005). Media, mediana e range interquartile e deviazione standard sono stati utilizzati come misure di tendenza centrale e variabilità per le covariate di tipo quantitativo continuo e discreto mentre la valutazione proporzionale è stata adottata per le variabili categoriche. I confronti tra sottogruppi sono stati eseguiti mediante test del chi quadro od il test esatto di Fisher per le proporzioni, ed il test di t Student per variabili continue.

4. Risultati

L'analisi esplorativa ha considerato ventinove casi affetti da sclerosi multipla e ventidue controlli. I primi risultavano colpiti da sclerosi multipla di tipo remittente o progressivo, mentre i secondi hanno presentato condizioni neurologiche eterogenee. (Tab I)

Tab. I Caratteristiche demografiche, epidemiologiche e cliniche dei pazienti con sclerosi multipla (casi –SM-) ed altre malattie neurologiche (controlli)

Variabile	Casi	Controlli	p-value
<i>Sesso, femmine (%)</i>	21/29 (72)	11/22 (50)	0,1
<i>Età, media (D.S.) anni</i>	50 (12)	59 (18)	0,03
<hr/>			
<i>Luogo di nascita, Sassari (%)</i>	24/29 (83)	13/22 (59)	0,05
<i>Luogo di residenza, Sassari (%)</i>	27/29 (93)	18/22 (82)	0,22
<hr/>			
<i>Assunzione di alcol, no (%)</i>	26/27 (96)	19/20 (95)	0,87
<i>Assunzione di caffè, no (%)</i>	18/25 (72)	16/21 (76)	0,75
<i>Fumo, no (%)</i>	15/26 (58)	13/21 (62)	0,78
<hr/>			
<i>Sclerosi multipla, recidivante-remittente (%)</i>	20/29 (69)	-	-

I soggetti colpiti da sclerosi multipla presentavano un'età media di cinquanta anni (con dispersione standard di 12 anni) e, quindi, più giovani dei soggetti considerati controlli (cinquantanove anni in media, con variabilità di diciotto anni); per tale fattore confondente i due gruppi a confronto risultavano significativamente differenti (*p-value*: 0,03).

La variabile sesso, invece, risultava proporzionalmente distribuita nei suoi valori tra i due campioni (*p-value*: 0,1); infatti, la percentuale di soggetti di sesso femminile non risultava inferiore né nel gruppo dei casi (72%, 21/29) né in quello dei controlli (50%, 11/22).

Alla scopo di valutare l'influenza geografica al momento della nascita e durante la vita adulta, sono state prese in considerazione due variabili demografiche quali il luogo di nascita e quello di residenza; i soggetti con sclerosi multipla, per la maggior parte, provenivano dalla provincia di Sassari, ove risiedevano (27/29, 93%); i controlli, in proporzione analoga, risiedevano nella medesima provincia (82%, 18/22; *p-value*: 0,22). Anche il luogo di nascita, eventualmente espressivo di differenti esposizioni realizzatesi in epoca gestazionale, risultava proporzionalmente comparabile tra soggetti affetti da malattie neurologiche diverse

dalla sclerosi multipla e casi (13/22, 59%, e 24/29, 83%, rispettivamente; *p-value*: 0,05).

Alcune abitudini di vita, considerati quali possibili fattori di interazione o confondenti, sono stati considerati tra le variabili di possibile interesse discriminante tra i due gruppi (esposizione attuale o pregressa al fumo, all'alcool ed al caffè).

Anche in questo caso non sono state riscontrate differenze statisticamente significative che potessero rilevare un'influenza di una o più sostanze esogene, contenute nelle sostanze suddette.

La maggior parte dei soggetti con sclerosi multipla non ha, infatti, mostrato né esposizione al momento dell'indagine, né pregressa a sostanze contenute nel caffè (18/25, 72%, vs. 16/21, 76%, rispettivamente; *p-value*: 0,75), nel fumo (15/26, 58%, vs. 13/21, 62%, rispettivamente; *p-value*: 0,78) o negli alcolici (26/27, 96%, vs. 19/20, 95%, rispettivamente; *p-value*: 0,87).

Tra i pazienti affetti da sclerosi multipla la percentuale di coloro con forma recidivante-remittente risultava pari al 69% (20/29); la restante percentuale era rappresentata da pazienti che presentavano differenti forme progressive (primitivamente, secondariamente e remittente).

Il confronto delle concentrazioni medie di metalli (Alluminio, Cadmio, Rame, Zinco, Ferro, Piombo, Manganese), rilevate nel liquor dei casi ed in quello dei controlli, non ha fatto emergere differenze statisticamente significative. (Tab II)

Tab. II Concentrazioni medie dei metalli nel liquor dei pazienti con sclerosi multipla (casi –SM-) ed altre malattie neurologiche (controlli).

Variabile	n	Media (deviazione standard)	Val. minimo - Val. massimo	p-value
Alluminio (□g/l)				
Controlli	22	2,7 (1,67)	0,2 - 6,7	0,84
Casi (SM)	29	2,9 (3,58)	0,3 - 18	
Cadmio (□g/l)				
Controlli	22	0,11 (0,11)	0,2 - 0,5	0,25
Casi (SM)	29	0,08 (0,06)	0,02 - 0,3	
Rame (□g/l)				
Controlli	22	21,6 (9,8)	6,6 - 47,5	0,23
Casi (SM)	29	18,8 (6,5)	6,9 - 30,4	
Ferro (□g/l)				
Controlli	22	34,6 (21,09)	10 - 99	0,87
Casi (SM)	29	35,6 (20,8)	10 - 92,5	
Manganese (□g/l)				
Controlli	22	1,28 (0,7)	0,6 - 3,2	0,37
Casi (SM)	29	1,6 (1,4)	0,5 - 7	
Piombo (□g/l)				
Controlli	22	1 (0,72)	0,3 - 2,8	0,11
Casi (SM)	29	0,74 (0,39)	0,2 - 1,7	
Zinco (□g/l)				
Controlli	22	28,58 (19,5)	11,5 - 85	0,23
Casi (SM)	29	74,4 (175,7)	10,9 - 954	

La concentrazione media (deviazione standard) di Alluminio nei controlli è risultata pari a 2,7 (1,68), mentre nei casi è risultata

lievemente superiore, pari a 2,9 (3,58; *p-value*: 0,83). Le concentrazioni di cadmio sono risultate pari a 0,1 (0,11) e 0,08 (0,06), rispettivamente nei soggetti affetti da malattie diverse dalla sclerosi multipla e negli affetti da sclerosi multipla (*p-value*: 0,25). Il rame ed il piombo sono presenti in maggiore concentrazione nei liquidi cefalo-rachidiani dei controlli, ovvero in media 21,6 (9,78) vs. 18 (6,48; *p-value*: 0,23) e 1 (0,72) vs. 0,75 (0,39; *p-value*: 0,11), rispettivamente. Ferro, manganese e zinco sono risultati in media più elevati nel liquor dei soggetti affetti da sclerosi multipla: 35,6 (20,8) vs. 34,6 (21,1; *p-value*: 0,87), 1,58 (1,41) vs. 1,28 (0,7; *p-value*: 0,36), 74,4 (175,69) vs. 28,6 (19,5; *p-value*: 0,23). Nella sotto-analisi delle concentrazioni di metalli presenti nei soggetti affetti da sclerosi multipla è stato eseguito un confronto tra soggetti con forme recidivanti-remittenti e coloro con forme progressive. (Tab III)

Tab. III Concentrazioni medie dei metalli nel liquor dei pazienti con sclerosi multipla in forma recidivate-remittente e con forme progressive

Variabile	n	Media (deviazione standard)	p-value
Alluminio ($\mu\text{g/l}$)			
<i>SM progressive</i>	9	3,36 (5,54)	0,63
<i>SM recidivanti-remittenti</i>	20	2,65 (2,42)	
Cadmio ($\mu\text{g g/l}$)			
<i>SM progressive</i>	9	0,08 (0,07)	0,9
<i>SM recidivanti-remittenti</i>	20	0,08 (0,59)	
Rame ($\mu\text{g g/l}$)			
<i>SM progressive</i>	9	17,28 (5,95)	0.39
<i>SM recidivanti-remittenti</i>	20	19,55 (6,72)	
Ferro ($\mu\text{g g/l}$)			
<i>SM progressive</i>	9	32,23 (20,97)	0.56
<i>SM recidivanti-remittenti</i>	20	37,11 (21,09)	
Manganese ($\mu\text{g g/l}$)			
<i>SM progressive</i>	9	1,59 (1,16)	0.96
<i>SM recidivanti-remittenti</i>	20	1,57 (1,53)	
Piombo ($\mu\text{g g/l}$)			
<i>SM progressive</i>	9	0,72 (0,49)	0.84
<i>SM recidivanti-remittenti</i>	20	0,76 (0,35)	
Zinco ($\mu\text{g g/l}$)			
<i>SM progressive</i>	9	70,24 (77,57)	0.93
<i>SM recidivanti-remittenti</i>	20	76,27 (207,22)	

L'Alluminio è risultato significativamente più elevato nei soggetti con SM recidivante-remittente, ovvero in concentrazioni medie pari a 3,4 (5,54) vs. 2,7 (2,42; *p-value*: 0,63).

5. Discussione

I criteri clinico-epidemiologici rigorosi, utilizzati nella selezione dei pazienti affetti da sclerosi multipla e dei pazienti affetti da altre malattie neurologiche, hanno permesso di ottenere due campioni di popolazione complessivamente omogenei in termini di variabili di confondimento, quali il sesso, la dieta e l'esposizione a elementi ambientali. la variabile sesso è, infatti, risultata equamente distribuita tra i due campioni (con prevalenza del sesso femminile), al pari delle variabili anagrafiche (luogo di nascita e di residenza) e di quelle concernenti le esposizioni ambientali, risultate proporzionalmente distribuite tra i due gruppi oggetto dello studio. Solo l'età media, tra le variabili analizzate e considerate come fattori confondenti, è risultata significativamente diversa nei due gruppi; il campione affetto da Sclerosi Multipla è significativamente più giovane. Tale dato, tuttavia, potrebbe trovare una spiegazione intrinseca alla insorgenza della malattia stessa, tenuto conto del fatto che tale patologia presenta principalmente un età di esordio nella fascia di età oscillante dai 20 ai 40 anni, rara al di sopra dei 50 anni.

L'analisi delle concentrazioni dei metalli pesanti nel liquor dei soggetti affetti da SM e dei pazienti affetti da patologie

neurologiche differenti dalla SM ha evidenziato un incremento della concentrazione di alcuni metalli nei casi rispetto ai controlli: I risultati ottenuti, nonostante dei *p value* al di sopra del *cut-off* convenzionale (5%), mettono in luce come le concentrazioni di Al, Zn, Fe e Mn siano più elevate nel liquor dei pazienti affetti da SM. In realtà, tale risultato potrebbe essere correlato alla scarsa numerosità dei due campioni inclusi in questo studio trasversale. In misura analoga, non deve essere minimizzata la possibile distorsione sistematica correlata alla differente età dei due campioni, che, come sottolineato più volte, potrebbe agire da fattore confondente.

Un incremento della numerosità campionaria, in associazione ad una adeguata comparabilità dei campioni a confronto per ciò che concerne i fattori di confondimento, potrebbe mettere in rilievo differenze statisticamente significative.

Gli studi epidemiologici pilota rappresentano, infatti, un semplice elemento di orientamento nelle valutazioni analitiche volte ad identificare le relazioni causali tra un fattore ed un dato *outcome*.

Tali variabili sono state, successivamente, valutate nel gruppo di pazienti SM con forma recidivante-remittente ed in quello di pazienti SM con decorso progressivo: le concentrazioni di Al sono

risultate significativamente più elevate nel campione dei pazienti SM con decorso recidivante-remittente.

Una prima e semplicistica spiegazione di tale risultato potrebbe essere legata alla maggiore numerosità del campione affetto da forme recidivanti-remittenti (21 soggetti con forme di SM recidivante-remittente e 8 con forme di SM RP, SP, PP); incrementando il numero di soggetti con forme progressive, e, in generale, dei soggetti affetti da sclerosi multipla potremo avere l'opportunità di verificare se la presenza di tali metalli pesanti a livello di sistema nervoso centrale si correla con un decorso prognosticamente benigno della malattia.

I livelli di Cd, Pb e Cu, al contrario, sono risultati inferiori nei soggetti con sclerosi multipla rispetto ai livelli riscontrati nei controlli.

Anche in questo caso solo incrementando la numerosità dei sotto-insiemi di popolazione potremmo essere in grado di confermare tale dato e, quindi, definire, in maniera più accurata, un assente coinvolgimento dei metalli pesanti nella patogenesi di una malattia neurodegenerativa, quale la sclerosi multipla.

I dati suddescritti trovano delle parziali conferme nella letteratura: infatti l'analisi condotta da un gruppo norvegese (60) sul liquor di

37 pazienti, di cui 18 affetti da SM e 19 da altre malattie neurologiche, mette in evidenza, tra i tre metalli analizzati (Mn, Cu, Zn), un incremento del Cu nei soggetti affetti da SM ed un decremento significativo, negli stessi soggetti, del Mn e dello Zn. Probabilmente la SM potrebbe indurre cambiamenti biochimici nel sistema nervoso, che porterebbero a modificazioni nell'assorbimento, nella distribuzione e nell'accumulo dei metalli pesanti. Il Mn, per esempio, si lega ad un enzima, la glutamina sintetasi, specifico degli astrociti. Il reclutamento di questo metallo durante la proliferazione gliale condurrebbe ad un decremento del suo livello all'interno del liquor dei pazienti affetti da SM. L'incremento del Cu, invece, potrebbe essere correlata alla liberazione di citocromo-ossidasi, che contiene due ioni rame, conseguente a danno mitocondriale. I risultati presentati da un altro studio evidenziano i bassi livelli di Cu e di Zn nel liquor di un gruppo di pazienti affetti da SM (74), dato che viene confermato qualche anno dopo da un analogo studio condotto su un campione di 27 pazienti affetti da SM (75).

La popolazione sarda ha caratteristiche genetiche peculiari che la rendono sostanzialmente isolata e stabile. Ciò consente di studiare la malattia con più facilità rispetto a qualsiasi altra popolazione.

L'aumento di casi incidenti di sclerosi multipla si è verificato in appena 30-40 anni e le caratteristiche cliniche demografiche dei nuovi casi sono così peculiari che una spiegazione genetica non risulta sufficiente. Si può, quindi, pensare all'azione di un fattore esterno, nuovo o già presente nell'ambiente, ma concentratosi negli ultimi anni, che ha agito all'inizio della vita dei pazienti. L'età più suscettibile sarebbe la prima infanzia, allorché si verifica il cosiddetto esordio biologico della sclerosi multipla che, una volta "attecchita", può manifestarsi anche 25 anni dopo i primi danni biologici.

Due sono le ipotesi che potrebbero spiegare tale tendenza epidemiologica:

- l'attecchimento biologico della sclerosi multipla nell'organismo avverrebbe nel momento in cui il sistema immunitario si impegna ad affrontare i primi contatti con antigeni ambientali, comuni nell'età infantile. Il problema nascerebbe nei casi in cui queste esposizioni si manifestassero in età già avanzata: infatti il sistema immunitario si svilupperebbe in maniera anomala a causa dell'impossibilità di entrare in contatto con i normali fattori ambientali nella prima infanzia;

- la seconda ipotesi riguarda il sistema immunitario "vergine"; alcune popolazioni, come quella sarda (isolata e da sempre poco interessata da fenomeni come le immigrazioni o le invasioni), hanno meno possibilità di entrare in contatto con alcuni agenti ambientali, correlati ai flussi migratori di popolazione; se questo avvenisse con organismi geneticamente suscettibili si scatenerebbe la reazione anomala del sistema immunitario.

La valutazione critica, quindi, di fattori di esposizione, quali i metalli pesanti, attraverso un' adeguata metodologia di indagine potrebbe permettere di comprendere difficili percorsi patogenetici, quali quelli supposti per la sclerosi multipla.

La povertà di lavori scientifici pubblicati in merito al possibile ruolo svolto dai metalli pesanti nell'eziopatogenesi della SM e la scarsa varietà di metalli analizzati, non permette un confronto esaustivo con i risultati ottenuti da questo studio.

Nonostante la letteratura sia poco consistente in questo ambito, emerge comunque un'originalità nei risultati illustrati in questo studio che rende necessaria una prosecuzione dello studio stesso con un maggiore ampliamento del campione, sia nei casi (pazienti affetti da SM) che nei controlli (altre malattie neurologiche).

Bibliografia

1. Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM, et al. Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med* 1998;338:278-285
2. Marrie RA. Environmental risk factors in multiple sclerosis aetiology. *Lancet Neurol* 2004;3: 709–718
3. Rosati G. The prevalence of multiple sclerosis in the world: an update. *Neurol Sci* 2001;22:117-139
4. Rosati G, Aiello I, Granieri E, et al. Incidence of multiple sclerosis in Macomer, Sardinia, 1912-1981: onset of the disease after 1950. *Neurology* 1986;36:14-19
5. Rosati G, Aiello I, et al. Sardinia, a high risk area for multiple sclerosis: a prevalence and incidence study in the district of Alghero. *Ann Neurol* 1987;21:141-145
6. Rosati G, Aiello I, Mannu L, et al. Incidence of multiple sclerosis in the town of Sassari, Sardinia, 1965 to 1985: evidence for increasing occurrence of the disease. *Neurology* 1988;38:384-388
7. Rosati G, Aiello I, et al. Epidemiology of multiple sclerosis in Northwestern Sardinia: further evidence of higher frequency in Sardinians compared to other Italians. *Neuroepidemiol* 1996;15:10-19

8. Granieri E, Casetta I, Govoni V, et al. The increasing incidence and prevalence of MS in a Sardinian province. *Neurol* 2000, 26;55:842-848
9. Pugliatti M, Sotgiu S, Solinas G, et al. Multiple sclerosis epidemiology in Sardinia: evidence for a true increasing risk. *Acta Neurol Scand* 2001;103:20-26
10. Rosati G. Descriptive epidemiology of multiple sclerosis in Europe in the 1980s: a critical overview. *Ann Neurol* 1994;36 (Suppl 2):S164-S174
11. Pugliatti M, Rosati G, Carton H, et al. The epidemiology of multiple sclerosis in Europe. *Eur J Neurol* 2006;13:700-722
12. Casetta I, Granieri E, et al. An epidemiological study of multiple sclerosis in central Sardinia, Italy. *Acta Neurol Scand* 1998;98:391-394
13. Pugliatti M, Riise T, Sotgiu MA, et al. Increasing incidence of multiple sclerosis in the province of Sassari, northern Sardinia. *Neuroepidemiology* 2005;25:129-134
14. Compston A, Sadovnick AD. Epidemiology and genetics of multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol Neurosurg* 1992;5:175-181
15. McFarland HF. Twins studies and multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1992;32:722-723

Autore: Maria Alessandra Sotgiu

- 64 -

Titolo tesi: Metalli pesanti e Sclerosi Multipla

Tesi di Dottorato in Fisiologia, Morfologia, Farmacologia e Fisiopatologia del Sistema Nervoso
Università degli Studi di Sassari

16. Sadovnick AD, Armstrong H, Rice GP, et al. A population-based of multiple sclerosis in twins: update. *Ann Neurol* 1993;33:281-285
17. Ebers GC, Sadovnick AD. The role of genetic factors in multiple sclerosis susceptibility. *J Neuroimmunol* 1994;54:1-17
18. Sadovnick AD, Dyment D, Ebers GC. *Genetic Epidemiology of Multiple Sclerosis*. *Epidemiol Rev* 1997;19:99-104
19. Oksenberg JR, Steinman L. The role oh the MHC and T-cell receptor in susceptibility to multiple sclerosis. *Curr Opin Immunol* 1990;2:619-621
20. Marrosu MG, Murru MR, Costa G, et al. Multiple sclerosis in Sardinia is associated and in linkage disequilibrium with HLA-DR3 and -DR4 alleles. *Am J Hum Genet* 1997;61:454-457
21. Cucca F, Goy JV, Kawaguchi Y, et al. A male-female bias in type 1 diabetes and linkage to chromosome Xp in MHC HLA-DR3-positive patients. *Nat Genet* 1998;19:301–302
22. Congia M, Frau F, Lampis R, , et al. A high frequency of the A30, B18, DR3, DRw52, DQw2 extended haplotype in Sardinian celiac disease patients: further evidence that disease susceptibility is conferred by DQ A1*0501, B1*0201. *Tissue Antigens* 1992;39:78-83.

23. Ebers GC, Kukay K, Bulman DE, et al. A full genome search in multiple sclerosis. *Nat Genet* 1996;13:472-476
24. Sawcer S, Jones HB, Feakes R, et al. A genome screen in multiple sclerosis reveals susceptibility loci on chromosome 6p21 and 17q22. *Nat Genet* 1996;13:464-468
25. Compston A. The genetic epidemiology of multiple sclerosis. *Philos Trans R Soc Lond b Biol Sci* 1999;354:1623-1634
26. Becker KG, Simon RM, Bailey-Wilson JE, et al. Clustering of non-major histocompatibility complex susceptibility candidate loci in humanum autoimmune disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:9979-9984
27. Lassmann H, Bruck W, Lucchinetti C. Heterogeneity of multiple sclerosis pathogenesis: implications for diagnosis and therapy. *Trends Molec Med* 2001;7:115-121
28. Lassmann H, Raine CS, Antel J, Prineas JW. Immunopathology of multiple sclerosis: report of an international meeting held at Institute of Neurology of the University of Vienna. *J Neuroimmunol* 1998;86:213-217
29. Bruck W, Porada P, Poser S et al. Monocytes/macrophage differentiation in early multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol* 1995;38: 788-796

Autore: Maria Alessandra Sotgiu

- 66 -

Titolo tesi: Metalli pesanti e Sclerosi Multipla

Tesi di Dottorato in Fisiologia, Morfologia, Farmacologia e Fisiopatologia del Sistema Nervoso
Università degli Studi di Sassari

30. Canella B, Raine CS. The adesion molecule and cytokine profile of multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol* 1995;37:424-435
31. Navikas V, Link H. Cytokines and pathogenesis of multiple sclerosis. *J Neurosci Res* 1996;45:322-333
32. Lucchinetti C, Bruck W, Rodriguez M, Lassmann H. Mutiple sclerosis: lessons learned from neuropathology. *Sem Neurol* 1998;18:337-349
33. Kermode AG, Thompson AJ, Tofts P, et al. Breakdown of the blood-brain barrier precedes symptoms and other MRI signs of new lesions in multiple sclerosis. *Brain* 1990;113:1477-1489
34. Lucchinetti C, Bruck W, Parisi J, et al. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol* 2000;47:707-717
35. Gentleman SM, Nash MJ, Sweeting CJ, et al. Beta-amyloid precursor protein (beta APP) as a marker for axonal injury after head injury. *Neurosci Lett* 1993;160:139-144
36. Ferguson B, Matyszak MK, Esiri M, Perry VH. Axonal damage in acute multiple sclerosis lesions. *Brain* 1997;120:393-399
37. Kornek B, Lassmann H. Axonal pathology in multiple sclerosis: a historical note. *Brain Pathol* 1999;9:651-656

40. Wolfson C, Wolfson DB. The latent period of multiple sclerosis: a critical review. *Epidemiology* 1993;4:464-470
41. Dean G, Kurtzke JF. On the risk of multiple sclerosis according to age at immigration to South Africa. *Br Med J* 1971;3:725-729
42. Alter M, Okihiro M, et al. Multiple sclerosis among Orientals and Caucasians in Hawaii. *Neurol* 1971;21:122-130
43. Alter M, Leibowitz U, et al. Risk of multiple sclerosis related to age at immigration. *Arch Neurol* 1996;15:234-237
44. Kurtzke JF, Bui Quoc. Multiple sclerosis in a migrant population.2. Half-Orientals immigrating in childhood. *Ann Neurol* 1980;8:256-260
45. Kurtzke JF, Heltberg A. Multiple sclerosis in the Faroe Islands: an epitome. *J Clin Epidem* 2001;54:1-22
46. Wucherpfennig KW, Strominger JL. Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell* 1995;80:695-705
47. Talbot PJ, Paquette JS, Ciurli C. Myelin basic protein and human coronavirus 229e cross-reactive T cells in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1996;39:233-240
48. Kimberlin DW, Whitley RJ. HHV-6: neurological implications of a newly described viral pathogen. *J Neurovir* 1998;4:474-485

49. Bray PF, Luka J, et al. Antibodies against Epstein- Barr nuclear antigen (EBNA) in multiple sclerosis CSF and two pentapeptide sequence identities between EBNA and myelin basic protein. *Neurol* 1992;42:1798-1804
50. Perron H, Garson JA, Bedin F. Molecular identification of a novel retrovirus repeatedly isolated from patients with multiple sclerosis. The Collaborative Research Group on Multiple Sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94:7583-7588
51. Serra C, Sotgiu S, Mameli G, et al. Multiple sclerosis and multiple sclerosis-associated retrovirus in Sardinia. *Neurol Sci* 2001;22:171-173
52. Sotgiu S, Serra C, Mameli G et al. Multiple sclerosis-associated retrovirus and MS prognosis: an observational study. *Neurol* 2002;59:1071-1073
53. Dolei A, Serra C, Mameli G et al. Multiple sclerosis-associated retrovirus (MSRV) in Sardinian MS patients. *Neurol* 2002,12;58:471-473
54. Johnson RT. Viral Aspects of Multiple Sclerosis. *Handbook of Clinical Neurology: Demyelinating Disorders*, vol. 3. Amsterdam/New York: Elsevier Science 1985;259-287

55. Ingalls TH. Clustering of multiple sclerosis in Galion, Ohio, 1982-1985. *Am J Forensic Med Pathol.* 1989;10:213-215.
56. Schiffer RB, McDermott MP, Copley C. A multiple sclerosis cluster associated with a small, north-central Illinois community. *Arch Environ Health.* 2001;56:389-395
57. Siblingud RL, Kienholz E. Evidence that mercury from silver dental fillings may be an etiological factor in multiple sclerosis. *Sci Total Environ.* 1994;142:191-205.
58. Prochazkova J, Sterzl I, Kucerova H, Bartova J, Stejskal VD. The beneficial effect of amalgam replacement on health in patients with autoimmunity. *Neuro Endocrinol Lett.* 2004;25:211-218.
59. Clausen J. Mercury and multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand.* 1993;87:461-464.
60. Melø TM, Larsen C, White LR, Aasly J, Sjøbakk TE, Flaten TP, Sonnewald U, Syversen T. Manganese, copper, and zinc in cerebrospinal fluid from patients with multiple sclerosis. *Biol Trace Elem Res.* 2003;98:1-8.
61. Borkakoti N. Matrix metalloproteases: variations on a theme. *Prog Biophys Mol Biol.* 1998;70:73-94. Review.
62. Borkakoti N. Matrix metalloprotease inhibitors: design from structure. *Biochem Soc Trans.* 2004;32:17-20. Review.

63. Penkowa M, Quintana A, Carrasco J, Giralt M, Molinero A, Hidalgo J. Metallothionein prevents neurodegeneration and central nervous system cell death after treatment with gliotoxin 6-aminonicotinamide. *J Neurosci Res.* 2004;77:35-53.
64. Riise T, Nortvedt MW, Ascherio A. Smoking is a risk factor for multiple sclerosis. *Neurology.* 2003;61:1122-1124.
65. Riise T, Moen BE, Kyvik KR. Organic solvents and the risk of multiple sclerosis. *Epidemiology.* 2002;13:718-720.
66. Weinshenker BG, Bass B, Rice GP, et al. The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study 1. Clinical course and disability. *Brain* 1989;112:133-146
67. Weinshenker BG, Bass B, Rice GP, et al. The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study 2. Predictive value of the early clinical course. *Brain* 1989;112:1419-1428
68. Runmarker B, Andersen O. Prognostic factors in a multiple sclerosis incidence cohort with twenty-five years of follow-up. *Brain* 1993;116:117-134
69. Poser CM, Paty DW, Scheinberg L, et al. New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. *Ann Neurol* 1983;13:227-231

70. McDonald WI, Compston A, Edan G, et al. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the Diagnosis of Multiple Sclerosis. *Ann Neurol* 2001;50:121-127
71. Censimento popolazione 2001. <http://www.istat.it/> Accesso 23.11.2005
72. Dinamica demografica 1995. <http://www.istat.it/> Accesso 23.11.2005
73. Pugliatti M, Solinas G, Sotgiu S, et al. Multiple sclerosis distribution in northern Sardinia: spatial cluster analysis of prevalence. *Neurol* 2002, 22;58:277-282
74. Palm R, Hallmans G. Zinc and copper in multiple sclerosis. *Neurol Neurosurg Psychiatry* 1982;45:691-698
75. Smith DK, Feldman EB, Feldman DS. Trace element status in multiple sclerosis. *Am J Clin Nutr* 1989 Jul;50:136-140
76. Barańkiewicz D, Gramowska H, Kanecka A, Krzyzaniak I, Gołdyn R. Spatial distribution of major and trace elements in the water of Swarzedzkie Lake (Poland). *Environ Monit Assess.* 2008;143:327-336
77. Ettler V, Sebek O, Grygar T, Klementová M, Bezdicka P, Slavíková H. Controls on metal leaching from secondary Pb

smelter air-pollution-control residues. Environ Sci Technol. 2008;42:7878-7884

78. Pan K, Wang WX. The subcellular fate of cadmium and zinc in the scallop *Chlamys nobilis* during waterborne and dietary metal exposure. Aquat Toxicol. 2008;90:253-260

79. Alimonti A, Ristori G, Giubilei F et al. Serum chemical elements and oxidative status in Alzheimer's disease, Parkinson disease and multiple sclerosis. Neurotoxicology. 2007;28:450-456.

