



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

DIPARTIMENTO DI SCIENZE PER LA PROMOZIONE DELLA SALUTE E
MATERNO INFANTILE "G. D'ALESSANDRO"

Dottorato di Ricerca in Neuroscienze e Disturbi del Comportamento

**VARIABILI GENETICHE, BIOLOGICHE E
CLINICHE COME FATTORI PROGNOSTICI DI
PROGRESSIONE E SOPRAVVIVENZA NELLA
SCLEROSI LATERALE AMIOTROFICA**

Settore Scientifico-Disciplinare 06/D6, NEUROLOGIA

TESI DI

Dr.ssa Rossella Spataro

COORDINATORE DEL DOTTORATO

Prof.ssa Carla Cannizzaro

TUTOR

Prof. Vincenzo La Bella

XXIV Ciclo

INDICE

I.	ABSTRACT.....	p. 4
II.	INTRODUZIONE.....	p. 5
III.	LA DIAGNOSI DI SLA.....	p. 7
IV.	EPIDEMIOLOGIA DELLA SLA.....	p.12
	IV.I. FATTORI DI RISCHIO AMBIENTALE.....	p.16
	IV.I.I. Esercizio fisico.....	p.18
	IV.I.II. Gioco del calcio.....	p.21
	IV.I.III. Fumo di tabacco.....	p.22
	IV.I.IV. Metalli pesanti.....	p.23
	IV.I.V. Pesticidi e sostanze chimiche.....	p.23
	IV.I.VI. Il rischio occupazionale.....	p. 24
	IV.I.VII. Servizio di leva ed arruolamento militare.....	p.24
	IV.I.VIII. Shock elettrico.....	p.25
	IV.I.IX. Clusters geografici.....	p.26
	IV.I.X. Cianotossine.....	p.28
	IV.II. FATTORI DI RISCHIO GENETICO.....	p.29
	IV.II.I. <i>SOD1</i>	p.31
	IV.II.II. <i>ALS2/alsin</i>	p.32
	IV.II.III. <i>ALS4/SETX</i>	p.33
	IV.II.IV. <i>ALS4/spatacsin</i>	p.33
	IV.II.V. <i>ALS6/fused in sarcoma (FUS)</i>	p.34
	IV.II.VI. Vesicle Ass. memb Protein ass. protein B (VAPB).....	p.35
	IV.II.VII. <i>ALS9/angiogenin (ANG)</i>	p.35
	IV.II.VIII. <i>ALS10/TARDBP</i>	p. 36
	IV.II.IX. <i>ALS12/optineurin</i>	p.37
	IV.II.X. <i>ALS14/VCP</i>	p.37
	IV.II.XI. <i>ALS15/UBQLN2</i>	p.38
	IV.II.XII. ALS FTD1 e ALS FTD2.....	p.38
V.	CENNI DI FISIOPATOLOGIA.....	p.40

VI.	CENNI DI TERAPIA.....	p.44
VII.	ATTIVITA' DI RICERCA.....	p.45
	VII.I. GLI STUDI EPIDEMIOLOGICI.....	p.45
	VII.I.I. Il ritardo diagnostico.....	p.45
	VII.I.II. Incidenza e prevalenza della SLA in Sicilia.....	p.47
	VII.I.III. Conclusioni.....	p.48
	VII.II. GLI STUDI GENETICI.....	p.49
	VII.II.I. Il gene <i>FUS</i>.....	p.49
	VII.II.II. Il gene <i>VCP</i>.....	p.54
	VII.II.III. <i>C9ORF72</i>.....	p.57
	VII.II.IV. <i>ATXN-1</i> e <i>ATXN-2</i>.....	p.62
	VII.II.V. Conclusioni.....	p.65
	VI.III. GLI STUDI DI MANAGEMENT E ANALISI DELLE VARIABILI DI SOPRAVVIVENZA.....	p.67
	VI.III.I. La nutrizione e la PEG.....	p.67
	VI.III.II. La ventilazione invasiva.....	p.70
	VI.III.III. I disturbi del sonno.....	p.74
	VI.IV.IV. La comunicazione aumentativa alternativa.....	p.78
	VI.IV.V. Conclusioni.....	p.81
VIII.	CONCLUSIONI.....	p.83
IX.	BIBLIOGRAFIA.....	p. 85

I. ABSTRACT

La Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA) è una patologia degenerativa del Sistema Nervoso Centrale caratterizzata dalla degenerazione del I e II neurone di moto. Dal punto di vista clinico essa esprime un corteo sintomatologico complesso che include deficit di forza ed alterazioni del tono e del trofismo muscolare, insufficienza respiratoria, deficit delle funzioni deglutitoria e fonatoria, e, infine, sintomi non motori, quali disturbi cognitivi e del comportamento, che rappresentano una acquisizione recente rispetto alla descrizione classica della patologia che Jean Martin Charcot elaborò nel XIX secolo.

La SLA si presenta in forme cliniche eterogenee, determinate dalla variabilità di sede di esordio (motoneuroni bulbari o spinali), età d'esordio, presenza e gravità di alterazioni neuropsicologiche e, infine, tasso di progressione e di sopravvivenza.

Dal punto di vista dell'ereditarietà, circa il 10% dei casi presenta una chiara familiarità, mentre una percentuale significativa di casi sporadici, compresa attualmente tra il 5 ed il 20%, è stata associata negli ultimi anni ad alterazioni di tipo genetico.

Il Progetto di Dottorato che qui si presenta si è articolato in diverse linee di ricerca di ambito clinico e biologico, convergenti nella analisi di variabili genetiche, biologiche e cliniche responsabili della variabilità di progressione e sopravvivenza nella SLA.

II. INTRODUZIONE

La SLA è una patologia neurodegenerativa dei neuroni di moto che determina una paralisi inesorabilmente progressiva. La più frequente causa di morte è rappresentata dalla insufficienza respiratoria¹ ed incorre dopo 3-5 anni dalla diagnosi. I primi casi di SLA probabilmente sono stati descritti da Aran nel 1848² e Cruveilhier nel 1853³, sebbene solo nel 1869 l'entità clinica che oggi viene riconosciuta come SLA venne per la prima volta descritta da Jean Martin Charcot⁴.

La descrizione classica di Charcot escludeva l'ereditarietà della SLA e solo nel 1950, per la prima volta, Kurland e Mulder riportarono una serie di 58 pazienti, il 10% dei quali presentava una forma familiare di malattia⁵⁻⁶. Ad oggi, le ricerche in campo genetico hanno permesso di identificare 17 geni determinanti il 70 % dei casi familiari di SLA, ed una lunga serie di geni di suscettibilità⁷.

L'osservazione della alta frequenza di casi di SLA nell'isola di Guam e nella penisola giapponese di Kii, ritenuta correlata alle abitudini alimentari delle popolazioni indigene, ha suggerito l'ipotesi di una patogenesi ambientale della malattia. Ciò nonostante, le evidenze raccolte a sostegno di questa essa sono state finora poco riproducibili⁸.

Dal punto di vista clinico, fino all'epoca recente, la SLA è stata considerata una degenerazione pura dei sistemi motori, sebbene già

alcuni contemporanei di Charcot avessero descritto la coesistenza di disturbi cognitivi in alcuni dei casi di SLA da lui riportati. Il riconoscimento scientifico di disturbi cognitivi nella SLA è giunto solo alla fine del XX secolo⁹. In epoca attuale si raccolgono al contrario sempre maggiori evidenze di tipo neuropsicologico, epidemiologico, di imaging, patologico e genetico che sostengono una significativa sovrapposizione clinico-biologica tra la SLA e la degenerazione fronto-temporale.

III. LA DIAGNOSI DI SLA

In neurologia clinica, sono universalmente condivisi i criteri diagnostici di El Escorial, che sono stati elaborati nel 1994 e si fondano sulla diagnosi clinica, sulla base degli assunti della World Federation of Neurology¹⁰. Queste linee guida hanno subito diverse revisioni, delle quali la più recente è rappresentata dai criteri di Awaji-Shima, che hanno ottenuto un miglioramento della sensibilità diagnostica senza ridurre comunque il tasso di falsi-positivi¹¹.

I criteri diagnostici si fondano sulla presentazione clinica, ad esordio spinale o bulbare, e sul grado di coinvolgimento del primo e secondo neurone di moto. Essi, tuttavia, sono stati oggetto di critica perché presuppongono l'idea che la SLA sia una degenerazione omogenea e coerente dei sistemi di moto, con una progressione prevedibile e definita.

I risultati degli studi epidemiologici su popolazione e l'avvento di nuove tecnologie che includono le neuroimmagini, la genetica avanzata e la bioinformatica, hanno reso sempre più evidente l'esistenza di diversi sottotipi di malattia, che disegnano un ampio spettro clinico e patologico. Queste evidenze suggeriscono la necessità di ulteriori subclassificazioni, che dovrebbero considerare il coinvolgimento extramotorio ed in particolare il grado ed il tipo di deterioramento cognitivo e comportamentale. A questo scopo sono stati di recente suggeriti dei criteri per la stadiazione clinica, che

possono essere utili per comparare sensibilità e specificità della classificazione in stadi diversi¹².

Gli studi di popolazione hanno ripetutamente dimostrato che la mediana di sopravvivenza dei pazienti SLA è di 2-3 anni dall'esordio clinico¹³. La maggior parte degli autori riporta un ritardo diagnostico compreso tra 9 e 12 mesi dall'esordio clinico alla diagnosi.

I fattori che sono considerati associati ad una rapida progressione sono la maggiore età d'esordio, la sede bulbare d'esordio, un breve intervallo diagnostico, la presenza di disturbi cognitivi ed il genotipo. Il fenotipo caratterizzato da simmetria dei disturbi con prevalente coinvolgimento del I neurone di moto o del II neurone di moto generalmente progrediscono più lentamente, mentre i fenotipi asimmetrici con coinvolgimento misto del I e II neurone di moto sembrano progredire più rapidamente¹⁴. I soggetti con declino cognitivo, particolarmente con disfunzioni esecutive, tendono ad avere una prognosi peggiore, con rapida progressione e ridotta sopravvivenza¹⁵. I fenotipi di malattia del motoneurone in cui si riconosce un coinvolgimento isolato del I o del II neurone di moto vengono definiti come Sclerosi Laterale Primaria (PLS) e Atrofia Muscolare Progressiva (PMA) rispettivamente. Entrambe queste forme cliniche si accompagnano ad una prognosi migliore rispetto alla SLA tipica. La diagnosi di tali patologie viene formulata per esclusione e richiede una osservazione protratta nel tempo, dal momento che non disponiamo di specifici test diagnostici. Nel caso

nella PLS, la diagnosi richiede che il coinvolgimento isolato del solo I motoneurone sia protratto per almeno 4 anni¹⁶. Sebbene la atrofia muscolare progressiva consista primariamente nella degenerazione del II neurone di moto, il fenotipo può essere molto eterogeneo e sovrapporsi in parte con la SLA. Si può affermare comunque che i pazienti con coinvolgimento esclusivo del II neurone di moto ed una storia di malattia più lunga di quattro anni in genere beneficiano di una prognosi migliore, soprattutto se il deficit muscolare ha una distribuzione segmentaria¹⁷.

Le maggiori conoscenze in ambito genetico hanno permesso di condurre alcuni studi di correlazione tra genotipo e fenotipo⁷ nella SLA. Ad esempio, le mutazioni del gene *fused in sarcoma (FUS)* sono associate con un esordio giovanile, rapida progressione e coinvolgimento motoneuronale prevalentemente bulbare. La variante Ala4Val del gene della superossido-dismutasi 1 (*SOD1*), che ha mostrato un effetto fondatore negli Stati Uniti, determina una patologia rapidamente progressiva, mentre la variante recessiva Asp90Ala, che è stata ritrovata quasi totalmente in Scandinavia, è associata ad un decorso lento, talvolta con disturbi sensitivi. La espansione esanucleotidica del gene *C9ORF72*, recentemente descritta, è stata ritrovata più frequentemente in popolazioni di origine europea, ed è associata alla presenza di disturbi cognitivi e comportamentali e breve sopravvivenza⁶.

La tabella seguente presenta i differenti fenotipi clinici delle malattie dei motoneuroni, con il possibile effetto prognostico.

Tabella 1 Fenotipi clinici della SLA		
Nome	Fenotipo	Possibili effetti prognostici
SLA	Segni misti del I e II motoneurone agli arti ed alla regione bulbare	Sopravvivenza mediana di circa 3 anni dai primi sintomi
Atrofia muscolare progressiva	Sindrome del motoneurone inferiore isolata, generalmente asimmetrica	Simile alla SLA
Sclerosi Laterale Primaria	La sindrome del motoneurone superiore isolata. Spesso simmetrica	Lentamente progressiva, spesso simmetrica. Sopravvivenza tipica di oltre 10 anni. Può progredire in SLA, ma è inusuale dopo 4 anni
Paralisi Bulbare Progressiva	Isolati segni di motoneurone superiore o inferiore, o entrambi, confinati muscolatura bulbare	Se resta isolato, la prognosi può essere favorevole. Spesso progredisce in SLA. Più frequente nelle donne che negli uomini.
Sindrome flail arm	Simmetrica, prossimale, prevalentemente deficit del motoneurone inferiore agli arti superiori	Progressione relativamente lenta. Probabile sopravvivenza media di circa 8 anni. Più frequente nelle donne che negli uomini.
Sindrome flail leg	Simmetrica, distale, prevalentemente deficit del motoneurone inferiore agli arti inferiori	Progressione relativamente lenta. Probabile sopravvivenza media superiore a 8 anni.

Oltre ai sottotipi di SLA basati sui caratteristiche fenotipiche o genetiche, vi sono sottotipi di SLA basati sulle diverse lesioni di tipo patologico. La maggior parte dei pazienti con SLA ha inclusioni ubiquitinate che si colorano per la TAR DNA-binding protein 43 (TDP- 43)¹⁸. I pazienti con mutazioni del gene *SOD1* o *FUS* hanno

caratteristiche patologiche differenti, con inclusioni che si colorano per la proteina mutata rilevante e non per TDP-43¹⁹.

L'espansione ripetuta di *C9ORF72* si associa ad una caratteristica deposizione di TDP-43 e p62 in regione frontale e nella area CA4 dell'ippocampo.

Sia dal punto di vista clinico che genetico, distinguere diversi fenotipi può contribuire a comprendere le relazioni tra presentazione clinica, background genetico e espressione patologica, e, di conseguenza, aiutare a predire la prognosi.

IV. EPIDEMIOLOGIA DELLA SLA

La maggior parte degli studi epidemiologici sulla SLA è stato condotto su popolazioni di origine europea, con risultati relativamente sovrapponibili.²⁰

La patologia è generalmente più frequente nel maschio, con un rapporto femmina/maschio compreso tra 1:1.2 e 1:1.5²¹. L'incidenza della SLA nella popolazione europea è di 2-3 individui su 100.000, considerando la popolazione in età superiore a 15 anni, ed il rischio di incorrere nella malattia nel corso della vita è di 1:350 per gli uomini e 1:400 per le donne²². Tale disparità è legata maggiormente ad una maggiore frequenza di casi maschili di SLA spinale.

L'età è considerata un fattore di rischio per la SLA. Mentre nelle altre due più frequenti patologie neurodegenerative, la Malattia di Parkinson e la Demenza di Alzheimer, il rischio individuale aumenta con l'età, questo non è così chiaro per la SLA. Dai molti studi di popolazione condotti è emerso che dopo un picco di incidenza, intorno a 75 anni, il rischio raggiunge un plateau, per poi anche ridursi. Questo dato potrebbe essere spiegato considerando che la SLA è più rara della malattia di Alzheimer e di Parkinson e, poiché la popolazione si riduce con l'accrescersi dell'età, la registrazione dei casi può essere più difficile. E' necessario considerare anche che i pazienti più anziani vengono inviati più probabilmente a servizi non-neurologici e, inoltre, segni clinici come

l'ipostenia possono essere non riconosciuti in soggetti costituzionalmente fragili o affetti da molteplici patologie, come sono essi frequentemente. Se la riduzione del rischio individuale nella SLA con l'età è reale, essa suggerisce che il processo degenerativo in questa patologia è differente da quello della malattia di Alzheimer e di Parkinson, almeno nei soggetti anziani.

Nelle popolazioni diverse da quelle europee, le caratteristiche epidemiologiche sono state definite meno bene, essendo stati condotti solo pochi studi epidemiologici²³.

La recente identificazione dell'espansione nucleotidica di *C9ORF72* come causa di SLA nell'11% dei casi in popolazioni di origine europea, e molto meno nelle popolazioni asiatiche, è a sostegno di una distribuzione non uniforme della malattia a livello mondiale^{24,25}.

Nella regione del Sud-America, soltanto in Uruguay, la cui popolazione è primariamente di origine europea, si riscontrano tassi di incidenza della malattia simili a quelli dei Paesi a Sud dell'Europa²⁶.

Alcune evidenze suggeriscono che la frequenza della malattia è più bassa in popolazioni con alto grado di mescolanza genica. Ad esempio, è stato riportato un gradiente Nord-Sud in Spagna²⁷ e negli Stati Uniti ²⁸, e un basso tasso di incidenza è stato rilevato nella popolazione di origine multigenica a Cuba²⁹.

Inoltre, i tassi riportati di incidenza della malattia a Hong Kong sono più bassi che nelle popolazioni europee³⁰.

Purtroppo, per larga parte del mondo, che include l’Africa, la Russia, l’India e buona parte del Continente Asiatico e del Sud America, non disponiamo dei dati necessari a stabilire i tassi di incidenza³¹.

Nel 1945 è stata per la prima volta descritta una frequenza particolarmente alta della malattia, in una forma accompagnata spesso da demenza e parkinsonismo, nella tribù Chamorro, che vive nell’Isola di Guam, nel Pacifico³². Gli indigeni dell’isola consumavano una dieta molto ricca di cianotossine. Ciò ha suggerito l’ipotesi che questa forma di malattia venisse determinata dalle stesse cianotossine. Tuttavia, gli studi epidemiologici e tossicologici condotti hanno smentito tale ipotesi e, ad oggi, non è stata isolata nessuna tossina ambientale con certezza legata ad un aumento dell’incidenza di SLA in questa regione³³.

Una simile frequenza di SLA è stata riportata in due aree separate della penisola Kii dell’Isola di Honshu, in Giappone, sebbene un alto tasso in quest’area può essere parzialmente attribuibile ad un effetto fondatore dell’espansione ripetuta di *C9ORF72*³⁴.

Uno studio di popolazione condotto in Irlanda ha rilevato che il 13% dei pazienti SLA presenta un complesso SLA/Demenza frontotemporale, mentre un ulteriore 40% presenta alterazioni cognitive³⁵. I pazienti con espansione di *C9ORF72* rappresentano l’11% della popolazione irlandese che è stata studiata e mostrano più facilmente degli altri delle alterazioni cognitive³⁶. A ciò consegue che, essendo l’espansione non uniformemente distribuita nel

mondo, anche il tasso di deterioramento cognitivo varierà in modo concorde. Inoltre, sono stati individuati diversi fattori genetici con effetto fondatore, come in Nord Africa, dove sono segnalati molti casi recessivi, o in Sardegna, dove la maggior parte dei casi di SLA familiare sono riconducibili a varianti del gene *TARDBP* e *C9ORF72*, in Finlandia, dove buona parte dei casi di SLA sono dovuti a *C9ORF72* e in Svezia, dove si osserva una alta frequenza della variante recessiva Asp90Ala del gene *SOD1*⁷.

Infine, è stata descritta l'aggregazione di altre patologie neurodegenerative tra i familiari di pazienti SLA. La variabilità fenotipica di *C9ORF72* spiega gran parte di tali aggregazioni, ma l'aumento di incidenza di disturbi psichiatrici come psicosi o di eventi indice come il suicidio sono riportati anche in casi non portatori dell'espansione, suggerendo che alcune popolazioni di pazienti SLA possono condividere una suscettibilità genetica con patologie puramente psichiatriche³⁶.

IV.I. FATTORI DI RISCHIO AMBIENTALE

La ricerca dei fattori di rischio ambientale è di per sé difficoltosa, per molte ragioni. Innanzitutto, mentre il genoma è finito e quindi identificabile, il complesso dei fattori cui si è stati esposti è indefinito, sia nello spazio che nel tempo. Ad esempio, gli studi sulla dieta possono esplorare le caratteristiche generali delle esposizioni dietetiche e, in genere, in un breve intervallo temporale. L'esposizione a sostanze specifiche, come la pectina o la cianide, che si possono accumulare attraverso ripetute minime esposizioni a certe noccioline o semi di mele, non possono essere riscontrate se non perseguendo una ipotesi a priori. Ci sono alcune evidenze circostanziali che suggeriscono un ruolo delle cianotossine nella SLA, ma i risultati a conferma di tale ipotesi rimangono molto deboli³³.

Inoltre, mentre il profilo genetico viene definito alla nascita e può essere studiato in qualunque momento nel corso della vita, il quadro di esposizione ambientale cambia continuamente e può essere studiato solo mediante studi prospettici. A questo si deve aggiungere che la ricerca in campo ambientale è costosa, perché il metodo prevede lunghe interviste o l'analisi dettagliata di dati. Pertanto, per raggiungere i numeri di decine di migliaia che si osservano negli studi genetici, è necessario un investimento di personale per un lungo periodo e su diverse popolazioni. D'altronde, la ricerca sinora condotta in questo campo ha spesso

avuto carenze metodologiche, in ragione delle dimensioni e dei costi richiesti da uno studio più rigoroso.

Infine, molti fattori ambientali agiscono più frequentemente su uno specifico background genetico (interazione gene-ambiente), per cui, senza conoscere il profilo genetico dei partecipanti, è impossibile una esaustiva interpretazione dei risultati. In questo caso, se un fattore aumenta il rischio di malattia solo nei soggetti portatori di un raro gene, l'effetto può non essere individuato perché diluito su un largo numero di persone che non sono portatrici della variante genica. Lo stesso può accadere se l'esposizione ambientale è rara, rendendo più difficile isolare l'interazione gene-ambiente.

Per tutto quanto sinora detto, non stupisce che solo pochi studi in questo campo includano evidenze scientifiche di alto valore. La maggior parte degli studi è limitata da campioni piccoli, di basso potere statistico. I pazienti provenienti dai Centri e non da popolazioni, inoltre, introducono dei bias, perché tendono ad includere pazienti con forme di malattia più lunga ed a lenta progressione, mentre le coorti basate su popolazioni sono sicuramente da preferire per queste ricerche. Negli studi di popolazione i partecipanti vengono reclutati dalla popolazione generale di una data area geografica. Questo significa, per i casi, che tutte le diagnosi sono state formulate in quell'area ed in un periodo di osservazione. Se devono essere inclusi controlli nello studio, essi dovrebbero essere sottoposti a diagnosi con le stesse modalità o scelti in modo random nella stessa area geografica e nello stesso arco

di tempo. I controlli appaiati per età e sesso o altri fattori dovrebbero essere scelti in modo random all'interno della popolazione con le medesime caratteristiche. E' pur vero che controlli veri basati su popolazione possono essere difficili da reclutare, perché i volontari si auto-selezionano e possono non essere rappresentativi della popolazione generale.

La ricerca epidemiologica nella SLA si sviluppa in un ampio spazio di ricerca combinato con la ridotta comprensione dei meccanismi patogenetici. Di conseguenza, i diversi fattori ambientali che sono stati studiati per la SLA hanno espresso un approccio essenzialmente arbitrario, basato su evidenze (ad esempio il fatto che i pazienti SLA tendono ad essere più atletici), su osservazioni cliniche individuali (come l'associazione con l'impegno militare durante la Guerra del Golfo), e su idee mutate da altre malattie neurodegenerative (ad esempio, l'effetto del fumo).

Si tratteranno per cenni, si seguito, i più studiati fattori ambientali.

IV.I.I. Esercizio fisico

E' stato lungamente ritenuto che i pazienti SLA spesso hanno praticato intensa attività fisica in fase premorbosa. Questo stereotipo è stato alimentato anche dal caso del rinomato giocatore di baseball Lou Gehrig e dalla straordinaria eco mediatica che viene generata dai casi di personaggi noti del mondo dello sport che si ammalano di SLA.

Questi elementi hanno diffuso un interesse sulla possibilità che l'attività fisica sia un fattore di rischio per la SLA. Diversi studi hanno mostrato che l'habitus premorbo dei pazienti SLA è più snello dei controlli sani, con una maggiore propensione all'attività fisica³⁷. Uno studio di popolazione che ha coinvolto 636 pazienti con SLA sporadica e 2.166 controlli ha rilevato che sebbene i pazienti SLA riportassero livelli di attività fisica, nel tempo libero, lievemente superiore a quella degli altri soggetti, in questi pazienti non venivano comunque registrati livelli eccessivi di attività fisica³⁸. In ogni caso, non può essere stabilita una relazione dose-risposta tra livello di attività fisica e rischio di SLA, e ciò suggerisce che l'esercizio di per sé non aumenta il rischio di SLA ma potrebbe essere un marker del rischio stesso. Inoltre, l'associazione è stata ritrovata solo con l'esercizio fisico volontario, non professionale, quindi è la scelta dell'esercizio, e non l'esercizio in sé, che si associa alla malattia. Questi elementi suggeriscono che i pazienti SLA tendono ad essere più atletici e che la destrezza fisica ed il rischio di SLA possano essere due aspetti di una particolare organizzazione neurale all'interno del sistema motorio che conferisce sia un vantaggio atletico che un rischio di neurodegenerazione.

Sono a sostegno di tale ipotesi altri tre filoni di risultati. Innanzitutto, la SLA sembra confinata ad animali con una organizzazione motoria monosinaptica che controlla almeno alcuni movimenti, dei quali l'uomo rappresenta l'esempio principale³⁹. In secondo luogo, uno studio sulla dominanza di lato ha mostrato che

la SLA a prevalente espressione del I motoneurone esordisce più comunemente nel lato dominante, ma questa differenza non si apprezza agli arti inferiori⁴⁰. Sebbene vi siano altre possibili spiegazioni per queste osservazioni, come l'asimmetria di utilizzo o i recall bias, la possibilità di una differente organizzazione neurale tra emisfero dominante e non dominante rimane interessante. Terzo, in età giovanile la SLA rimane più frequente tra i maschi, e si associa con un marker di aumentata prodezza atletica e livelli di androgeni intrauterini, come viene evidenziato dalla misurazione di lunghezza del II e IV dito⁴¹.

Vi sono molte spiegazioni alternative per le osservazioni sin qui elencate. Ad esempio, se l'esercizio non ha effetto sul rischio di SLA ma la perdita di esercizio peggiora la sopravvivenza, gli individui che vivono abbastanza a lungo da raggiungere un centro terziario potrebbero più facilmente essere considerati come in buona forma relativa. In questo caso, la probabilità di riconoscere un effetto potrebbe essere più alta negli studi di centro piuttosto che negli studi di popolazione basati su casistiche di casi incidenti⁴².

In modo simile, riguardo ad un effetto dell'esercizio sulla SLA, questa patologia si manifesta di solito in una fase della vita in cui coincidono altre cause di morte, come le patologie cardiache ed il cancro. Di conseguenza, le persone che si ammalano di SLA sono soggetti che non sono morti né per patologia cardiaca né per cancro, e per questo è più probabile osservare in essi una forma fisica più atletica⁴³.

Questa idea è supportata dagli studi sull'indice di massa corporea ed il rischio di SLA. Per esempio, un ampio studio condotto sulla coorte di EPIC (European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition) ha messo in evidenza che l'essere magri di associa ad un rischio aumentato di SLA, confermando i risultati degli studi precedenti⁴⁴.

IV.I.II. Gioco del calcio

La possibilità che il gioco del calcio possa essere un fattore di rischio per la SLA è stata sollevata quando un magistrato italiano ha aperto un'inchiesta sulle cause di morte di alcuni giocatori italiani di calcio professionisti (di serie A, B e C)⁴⁵, sulla base dei risultati di uno studio scientifico.

L'interesse iniziale di questo studio era legato all'idea che vi fosse un eccesso di morti per droga o alcol ma, seguendo uno studio su 24.000 giocatori di calcio che esercitavano la professione tra il 1960 ed il 1996, è stato rilevato un eccesso di morti per SLA, calcolato sulla base dell'incidenza attesa. Un altro studio è stato eseguito su individui nati in Italia e di età compresa tra 18 e 69 anni. Anche in questo caso i casi di morte riscontrati erano in numero superiore a quelli attesi, determinando un apparente aumento di rischio⁴⁶.

Uno studio simile sui ciclisti non ha rilevato un aumento del tasso di incidenza, suggerendo che il rischio fosse specifico del calcio³⁷. E'

importante rilevare che negli studi effettuati la conclusione di un aumento del rischio si è basata sul numero di decessi attesi. Se viene considerato il rischio di ammalarsi nel corso della vita e non l'incidenza, si raggiungono conclusioni diverse⁴⁷.

Nel corso di un altro studio, è stato descritto un cluster apparente in cui tre amici hanno sviluppato la malattia contemporaneamente⁴⁸. Tutti e tre erano giocatori di calcio a livello amatoriale, erano cresciuti nello stesso paese e avevano giocato negli stessi campi per molti anni, e questo sosteneva l'ipotesi che il calcio fosse veramente un fattore di rischio. E' pur vero che i tre pazienti avevano condiviso anche altri fattori ambientali, come bere la stessa acqua, esporsi allo stesso ambiente rurale, uso di quantità simili di alcol e tabacco e lo shock elettrico. E' riduttivo ed arbitrario pertanto sostenere che essi fossero stati esposti soltanto al calcio.

IV.I.III. Fumo di tabacco

Una analisi di più lavori, condotta nel 2009, ha concluso che il fumo potrebbe essere considerato un reale fattore di rischio per la SLA⁴⁹.

Questo tema è stato molto studiato, tanto che nel periodo compreso tra il 1990 ed il 2012 sono stati condotti 148 studi sull'associazione tra il fumo e la SLA, di cui 24 sono stati sottoposti a revisione dettagliata⁵⁰. I risultati sono stati molto contrastanti, dal momento che 7 studi hanno mostrato un aumento del rischio di SLA, 14

nessun aumento del rischio e 3 non hanno esaminato la questione. Analisi stratificate hanno confermato che un eventuale aumento di rischio potrebbe essere limitato alle fumatrici donne. Anche in questo caso i risultati non sono univoci. Soltanto due studi hanno mostrato un effetto dose-risposta tra il fumo e la SLA, mentre cinque studi non hanno rilevato né una relazione dose-risposta né con quantità e durata del fumo. Alla luce di quanto emerso si può concludere che l'effetto del fumo sulla SLA non è stato sinora chiarito.

IV.I.IV. Metalli pesanti

Una review sistematica del 2007⁵¹ ha esaminato 50 studi sull'esposizione ai metalli pesanti. La maggior parte degli studi sull'esposizione ai metalli pesanti si è basata su analisi occupazionali e non su esposizioni auto-riportate. I metalli inclusi in questi studi sono piombo, mercurio, alluminio, cadmio, manganese e selenio. Sulla base di questi studi si può affermare che non è stata sinora dimostrata alcuna evidenza di relazione tra i metalli pesanti e la SLA.

IV.I.V. Pesticidi e sostanze chimiche

Nel 2007 una review⁵² ha esaminato i risultati di 38 studi sul rapporto tra sostanze chimiche e rischio di SLA. Le sostanze studiate

hanno incluso solventi, prodotti per l'agricoltura e pesticidi. Tre studi hanno ritrovato un piccolo aumento del rischio di SLA dovuto ai solventi, statisticamente significativo soltanto in uno studio. Due studi invece hanno concluso che i pesticidi aumentano il rischio di SLA.

IV.I.VI. Il rischio occupazionale

Degli studi sui possibili fattori di rischio occupazionale per la SLA, solo una minima parte ha avuto un sufficiente rigore metodologico. Una review pubblicata nel 2009⁵¹ ha esaminato 12 di essi.

Sulla base di questi studi, le professioni che potrebbero associarsi al rischio di SLA includerebbero il veterinario, atleti, parrucchieri, agricoltori ed operatori delle forze armate. E' opportuno però sottolineare che la pubblicazione di questo tipo di ricerche è soggetta a bias, perché i risultati negativi molto raramente vengono resi noti.

IV.I.VII. Servizio di leva ed arruolamento militare

Due studi hanno suggerito che il rischio di SLA fosse aumentato, o addirittura in alcuni casi raddoppiato, tra il personale militare reclutato nella Guerra del Golfo ^{53, 54}. Questi studi sono stati criticati perché la conclusione di un aumento del rischio si è basata

sull'accertamento di soli 7 casi in più rispetto a quelli attesi su una popolazione di 2.5 milioni di individui, mentre vi sono state un numero inferiore di diagnosi nel gruppo dei civili che costituivano i controlli. Inoltre, non si è osservato un aumento di mortalità dovuta alla SLA tra i veterani della Guerra del Golfo.

Data la rilevanza delle conseguenze di una vera associazione, l'Istituto di Medicina Statunitense ha condotto uno studio sulla Guerra del Golfo come fattore di rischio per la SLA, ed ha concluso che tale associazione è reale⁵⁵.

Inoltre, una review dei casi di SLA tra i partecipanti ad uno studio prospettico sulla prevenzione del cancro negli Stati Uniti ha messo in evidenza un aumento del rischio di SLA tra i militari dell'Esercito Americano, delle Forze Aeree, della Guardia Costiera, ma non della Marina⁵⁶. Tuttavia non disponiamo di elementi conoscitivi utili a chiarire quali meccanismi fisiopatologici potrebbero essere sottesi a questo aumento di rischio di SLA in nella categoria occupazionale che viene considerata.

IV.I.VIII. Shock elettrico

La possibilità che lo shock elettrico sia un fattore di rischio per la SLA è attraente per l'ovvio effetto dell'elettricità sul sistema neuromuscolare, e per la presunta eccitotossicità che ne conseguirebbe. In ogni caso, i dati a sostegno di questa ipotesi sono

deboli. Tra il 1906 ed il 2002, in 31 pubblicazioni sono stati riportati 52 casi di SLA o di degenerazione progressiva del I o II neurone di moto, e 44 casi di malattia dei motoneuroni non progressiva. In questi studi, shock elettrici più severi sono stati associati con un aumento di rischio di sindromi midollari motorie non progressive, ma non di SLA⁵⁷.

IV.I.IX. Clusters geografici

L'idea che l'identificazione di clusters di malattia possa condurre alle cause della stessa è ben fondata ed è la base della moderna epidemiologia: basti pensare alla scoperta della origine infettiva del colera dall'ispezione dei luoghi in cui si erano verificati i casi⁵⁸.

L'uso di una metodologia simile nella SLA è indebolito dalla latenza indefinita tra l'esposizione presunta e l'esordio della malattia. La maggior parte degli studi di cluster avevano avuto dei campioni facilmente disponibili da analizzare e si sono basati sull'analisi del luogo di residenza al momento della diagnosi. Soltanto alcune ricerche hanno anche considerato il luogo di nascita ed eventuali movimenti migratori⁵⁹. Un problema ulteriore è rappresentato dal fatto che il raggruppamento in cluster osservato dai clinici o dal pubblico può differire da quello statistico. Ad esempio, regioni dove l'età media della popolazione è più alta di quella usuale avranno

tassi più alti di SLA, cosa che potrebbe condurre ad un cluster apparente. Al contrario il dato potrebbe essere spiegato dal noto rischio legato all'età, che dovrebbe essere computato in qualunque analisi. Il cluster di casi di SLA più noto è quello osservato nell'isola di Guam (ormai sceso ai livelli medi di incidenza) e sulla penisola di Kii. Il fenotipo descritto in questi luoghi può essere alquanto atipico, e presentarsi con Parkinson e Demenza. Diversi altri studi di popolazione hanno ritrovato dei cluster di casi di SLA che superavano il numero atteso per caso. E' ovvio però che approfondire lo studio di questi clusters è molto difficoltoso, perché i numeri inclusi di solito sono piccoli mentre i possibili fattori di esposizione sono moltissimi. Uno studio spagnolo che ha esaminato un periodo di 13 anni, a partire dal 1975, ha mostrato un gradiente nord-sud nella frequenza della SLA, aggiustata per età e sesso⁶⁰. In Finlandia, uno studio ha esaminato i tassi di incidenza della SLA in relazione alla residenza all'epoca della nascita ed all'epoca della morte ed ha mostrato che le regioni centro-meridionali e a sud-est della Finlandia hanno un più alto tasso di incidenza di SLA all'epoca della morte, mentre il cluster a sud-est era presente anche quando la residenza veniva analizzata come luogo di nascita. Anche in Gran Bretagna⁶¹, Stati Uniti⁶², Italia⁶³ e Giappone⁶⁴ sono stati ritrovati dei cluster basati sulla residenza alla diagnosi o alla morte. In realtà, l'identificazione di clusters geografici di SLA sembra essere un fenomeno universale, ma non è stato ancora ritrovato un fattore comune ai diversi cluster geografici. Una possibile

spiegazione dei cluster è l'effetto di un founder genetico locale, come è stato recentemente dimostrato nella penisola di Kii in Giappone, dove l'alta frequenza di SLA è legata parzialmente dalla presenza dell'espansione ripetuta di *C9ORF72*⁶⁴.

IV.I.XI. Cianotossine

E' stato ipotizzato che l'esposizione cronica ambientale all'aminoacido neurotossico non proteico β -N-methylamino-Lalanine (BMAA) possa essere un fattore di rischio ambientale per la SLA²⁴. Questa ipotesi era inizialmente basata sull'elevato numero di casi del complesso SLA-Parkinson-Demenza in Guam, ritenuto da attribuire al BMAA presente nei semi della cicade *Cycas micronesica*. Era stato postulato che diversi animali che consumavano semi di *Cycas*, come cervi, maiali e flying foxes contribuissero alla cosiddetta "biomagnificazione" attraverso la catena alimentare in Guam⁶⁵.

Il BMAA è anche prodotto dai cianobatteri, che sono stati ritrovati in quasi tutti gli habitat terrestri ed acquatici, e l'ipotesi dell'esposizione è stata estesa in modo concorde⁶⁶.

Nonostante questi studi, non si hanno ancora evidenze certe sul ruolo delle cianotossine nella SLA.

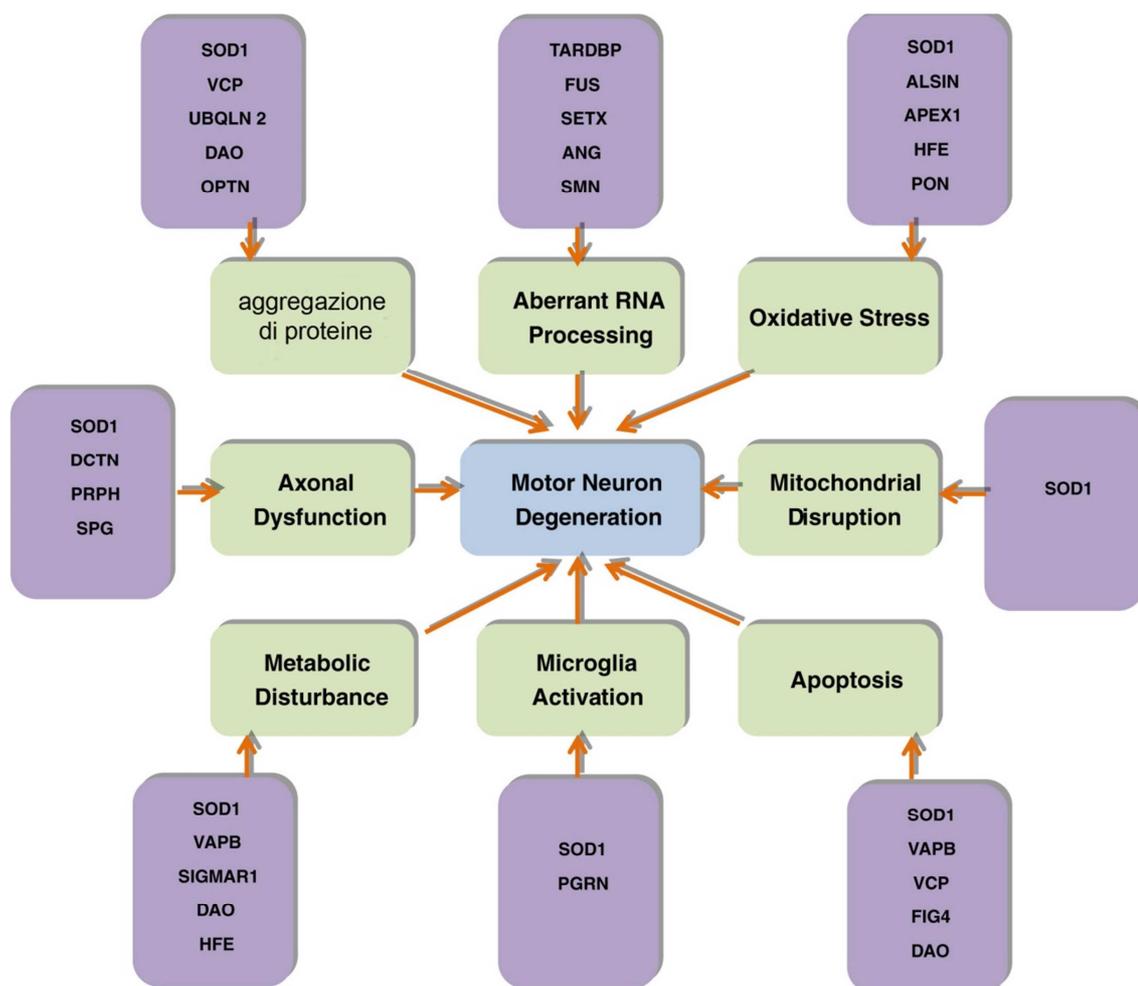
IV.II. FATTORI DI RISCHIO GENETICO

Dal punto di vista dell'ereditarietà, la SLA può essere ereditata con modalità autosomico-dominante, autosomico- recessiva e X-linked.

Nel 90 % dei casi non viene individuata una chiara familiarità, ed i casi vengono di conseguenza considerati sporadici. Nel 10 % dei casi al contrario è riconoscibile una familiarità⁶⁷.

La ricerca sui fattori di rischio genetico della SLA è in continuo fermento ed ha raggiunto importanti risultati negli ultimi anni. Oltre al gene della superossido dismutasi 1 (*SOD1*), sono state identificate mutazioni sui geni codificanti per la TAR DNA-Binding Protein (*TARDBP*), fused in sarcoma (*FUS*), Ubiquilin2 (*UBQLN2*), *C9ORF72* ed altri.

La figura seguente rappresenta i diversi fattori genici implicati nella SLA con i relativi meccanismi patogenetici.



Circa il 20% dei casi familiari di SLA è legato a mutazioni del gene *SOD1*, il 4-5% a mutazioni dei geni *TARDBP* e *FUS*, mentre più del 30% è associato a mutazioni su *C9ORF72*. I restanti casi sono legati a mutazioni sui geni dell'alsina, senatassina (*SETX*), spatacsina, vesicle associated membrane protein associated protein B (*VAPB*), angiogenina (*ANG*), factor induced gene 4(*FIG4*), optineurina (*OPTN*) ed altri geni non noti.

IV.II.I. *SOD1*

Il gene *SOD1* è stato il primo fattore di rischio genetico riconosciuto nella SLA sulla base di analisi di linkage di famiglie con SLA familiare dominante ed è localizzato sul cromosoma 21q22.1. Sinora sono state identificate 150 mutazioni (missense, non-sense, inserzioni e delezioni) nei 5 esoni che costituiscono il dominio funzionale di *SOD1*. Non è possibile definire un fenotipo caratteristico per i casi di SLA con mutazione *SOD1*, dal momento che questi casi si presentano con una ampia variabilità nell'età d'esordio, rapidità di progressione e sopravvivenza. Questa evidenza suggerisce che il fenotipo sia determinato dal concorso di fattori genetici e ambientali⁶⁷. La *SOD1* è una proteina citoplasmatica, un omodimero di 153 aminoacidi, che contiene un atomo di rame ed uno di zinco. La funzione della proteina *SOD1* è detossificare i radicali superossido, che sono prodotti dalla fosforilazione ossidativa, e convertirli in idrogeno perossido e ossigeno, convertiti in acqua e ossigeno dagli enzimi catalasi e glutazione perossidasi. L'esatto meccanismo mediante il quale le mutazioni di *SOD1* conducono alla malattia non è noto, sebbene siano stati proposti diversi processi come l'aggregazione di proteine mutate, lo stress ossidativo, la disfunzione mitocondriale, l'eccitotossicità da glutammato, l'infiammazione, l'attivazione della microglia e la alterazione del trasporto assonale. Molti topi transgenici con mutazioni *SOD1*, ed in particolare i topi portatori di

mutazione *SOD1*^{G93A} sono i più utilizzati modelli murini di SLA in diversi protocolli di ricerca, e particolarmente nei trials clinici⁶⁹.

E' interessante notare che il topo knockout per *SOD1* non sviluppa la malattia, sebbene possa ammalarsi di una forma di motoneuropatia distale. Questo sembra suggerire che le mutazioni di *SOD1* contribuiscano alla neurodegenerazione nella SLA con meccanismo di tipo gain of function⁷⁰.

IV.II.II. ALS2/ALSINA

La cosiddetta ALS2 è una forma di SLA giovanile, molto rara, caratterizzata da spasticità degli arti e del volto, disartria spastica, labilità emotiva e disfunzione vescicale⁷¹. Il locus della ALS2 è stato mappato sul cromosoma 2q33-2q35 attraverso una analisi di linkage su un'ampia famiglia tunisina. Lo splicing alternativo dell'alsina può determinare un trascritto lungo o corto. Le mutazioni sul trascritto corto determinano la ALS2, mentre le mutazioni sul trascritto più lungo determinano una forma di PLS giovanile. L'alsina sembra avere una funzione neuroprotettiva sui neuroni, mentre le mutazioni sul gene compromettono questa funzione causando una aggregazione di vescicole immature e proteine nei neuroni.

IV.II.III. ALS4 (*SETX*)

La ALS 4 è una forma di SLA autosomico-dominante, ad esordio giovanile, caratterizzata da ipostenia distale degli arti, atrofia muscolare e segni piramidali⁷². In questa rara forma di malattia la funzione respiratoria e dei muscoli bulbari è conservata e la progressione è lenta tanto da consentire una normale aspettativa di vita. Essa è mappata sul cromosoma 9q34. Le mutazioni sullo stesso locus del gene della senatacsina sono state associate anche alla atassia spino cerebellare 1 (SCA1) e alla atassia con aprassia oculare (AOA2). Il gene *SETX* codifica per una DNA/RNA elicasi coinvolta nel processamento dell'RNA, e questo meccanismo potrebbe essere implicato nella patogenesi di questa forma di malattia dei motoneuroni.

IV.II.IV. ALS5/spatacsina

La ALS5 è anche conosciuta come SLA giovanile di tipo 1 ed è la più frequente forma di SLA familiare a trasmissione recessiva ed esordio giovanile⁷³. La maggior parte dei casi esordisce prima dei 25 anni. Il decorso della malattia è lentamente progressivo e la sopravvivenza può superare 3 decenni. Gli studi di linkage che sono stati eseguiti hanno connesso l'ALS5 al cromosoma 15q15-21 e a mutazioni sul gene *SPG11*. Questo gene determina una forma di paraplegia spastica ereditaria con corpo calloso atrofico e condivide alcune caratteristiche cliniche, patologiche e genetiche con la SLA⁷⁴. La

SPG11 è una proteina con quattro domini transmembrana. Il suo accumulo negli assoni non mielinizzati determina delle alterazioni del trasporto assonale.

IV.II.V. ALS6/*fused in sarcoma* (*FUS*)

Dal punto di vista fenotipico, i pazienti con mutazione sul gene *FUS* presentano un ampio range di età d'esordio di malattia, dai 26 agli 80 anni, con una media di sopravvivenza intorno a 33 mesi. E' maggiormente presente una predominanza del II neurone di moto, senza coinvolgimento bulbare né deficit cognitivi. Il locus per la ALS6 è stato mappato sul cromosoma 16p11.2 che codifica per il gene *FUS*⁷⁵. Le mutazioni del gene *FUS* sono state identificate con studi di linkage su una ampia famiglia di Capo Verde con SLA autosomico-recessiva e in diverse famiglie inglesi con SLA dominante. Fino ad oggi sono state isolate circa 50 mutazioni del gene *FUS* che spiegano circa il 4% dei casi di SLA familiare e l'1% di SLA sporadica⁷⁶. Il gene *FUS* codifica per una DNA/RNA binding protein che ha un ruolo nell'attivazione trascrizionale del gene. Nel topo transgenico l'overespressione di *FUS* mutante determina una progressiva paralisi dovuta alla degenerazione motoria assonale ed alla perdita cellulare nella corteccia e nell'ippocampo⁷⁷.

IV.II.VI. ALS8/vesicle associated membrane protein associated protein B (VAPB)

Questa mutazione è stata descritta per la prima volta in una grande famiglia brasiliana con 28 membri affetti da SLA in 4 generazioni⁷⁸. Essa si associa ad un esordio giovanile dei disturbi e ad un quadro clinico caratterizzato da tremore posturale, fascicolazioni e deficit di forza agli arti lentamente progressivo. La storia di malattia è molto più lunga della SLA nella forma classica. VABP è una proteina del reticolo endoplasmico che è coinvolta nel traffico intracellulare delle vescicole e nel trasporto dei lipidi. Le mutazioni del gene *VABP* determinano un accumulo di VABP in aggregati, cui consegue una ridotta funzione della proteina e la degenerazione motoneuronale.

IV.II.VII. ALS9/angiogenin (*ANG*)

La SLA associata a mutazioni del gene *ANG* è chiamata ALS9, una malattia autosomica-dominante dell'adulto che si presenta con i classici segni della SLA. Alcuni pazienti hanno anche mostrato parkinsonismo ed alterazioni delle funzioni frontali⁷⁹.

Il gene *ANG* è localizzato sul cromosoma 14q11.2 ed è stato per la prima volta identificato in pazienti SLA provenienti dall'Irlanda e dalla Scozia. Nella popolazione italiana, le mutazioni dell'*ANG* non sono state associate alla SLA familiare⁸⁰. Le mutazioni del gene *ANG* determinano una alterazione della attività ribonucleotidica e di traslocazione nucleare⁸¹.

IV.II.VIII. ALS10/TAR DNA binding protein (TARDBP)

Le mutazioni del gene *TARDBP* sono state descritte per la prima volta in casi di SLA familiare nel 2008⁸². Da allora sono state identificate più di 40 mutazioni in diversi gruppi etnici, con una incidenza pari al 4-5% dei casi familiari e a più del 2 % dei casi sporadici. I pazienti con SLA legata alla *TARDBP* hanno generalmente esordio in età adulta, più frequentemente spinale, ed una ampia variabilità nell'età d'esordio (30-77 anni) e nella durata di malattia. Sono state riscontrate mutazioni del gene *TARDBP* sia in casi di SLA-FTD che di FTD. La proteina TDP-43 ubiquitinata è uno dei maggiori componenti delle inclusioni citoplasmatiche nella SLA e nella FTD. Queste inclusioni sono state ritrovate in buona parte delle patologie neurodegenerative, come la SLA sporadica, FTD, Corea di Huntington, Demenza di Alzheimer e Malattia di Parkinson⁸³.

La TDP-43 è una DNA/RNA binding protein coinvolta in diverse funzioni, come la trascrizione genica, lo splicing dell'RNA⁸⁴ etc. La maggior parte delle mutazioni identificate riguardano la regione C-terminale, che è coinvolta nelle interazioni proteina/proteina. Non è noto con quale meccanismo le mutazioni di *TARDBP* causino neurodegenerazione, dovendosi considerare sia la perdita della funzione nucleare sia un aumento della funzione tossica.

IV.II.IX. ALS12/optineurina

La ALS12 è una SLA a trasmissione autosomico-dominante o recessiva, che esordisce nell'adulto e si caratterizza per l'esordio agli arti inferiori ed una lenta progressione⁶⁸. Si localizza sul cromosoma 10p13. L'optineurina si ritrova insieme a FUS, TDP43 e SOD1 in corpi inclusi sia nella SLA familiare che sporadica. Alcuni studi hanno dimostrato che la proteina è un importante fattore nei processi di autofagia.

IV.II.X. ALS14/valosin containing protein (VCP)

La ALS14 è una forma di neuropatia motoria dell'adulto a trasmissione autosomica dominante. Clinicamente si caratterizza per l'esordio agli arti e una rapida progressione. La mutazione patogena su questo gene è stata identificata mediante exome sequencing su una famiglia italiana⁸⁵.

La proteina VCP è una ATPasi coinvolta in diverse funzioni cellulari e, tra queste, la regolazione dei meccanismi apoptotici.

IV.II.XI. ALS15/ALSX/ubiquilin (*UBQLN2*)

La ALSX è una forma di SLA ad esordio giovanile ed X-linked. Clinicamente si presenta con coinvolgimento del I e II neurone di moto, dove i segni piramidali precedono il coinvolgimento del II motoneurone, ed in alcuni casi si accompagna a demenza. Il gene si localizza sul cromosoma Xp11. Le mutazioni di *UBQLN2* alterano i processi di degradazione delle proteine, causando di conseguenza una abnorme aggregazione delle stesse e la neurodegenerazione⁸⁶.

IV.II.XII. ALS-FTD1 e ALS-FTD2

Entrambe queste forme di malattia si caratterizzano per l'esordio in età adulta e la coesistenza di SLA familiare e demenza frontotemporale. La SLA-FTD1 è stata legata, in una analisi di linkage, al cromosoma 9q21-q22⁸⁷. La ALS FTD2 è stata legata all'espansione esanucleotidica GGGGCC sul cromosoma 9 nel reading frame 72 (*C9ORF72*)⁸⁸.

L'espansione ripetuta di *C9ORF72* rappresenta la più comune causa di SLA familiare e demenza frontotemporale, perché risponde di circa il 34.2 ed il 25.9 % dei casi rispettivamente. Nei pazienti portatori di questa mutazione si ritrovano sia inclusioni positive per p/62/ubiquitina sia TDP-43.

Le mutazioni identificate negli studi sulle forme familiari si riscontrano anche in percentuale variabile nelle forme sporadiche, o apparentemente sporadiche, di malattia.

In conclusione, gli studi di linkage, di genome-wide association and exome sequencing hanno permesso di determinare la causa genetica di circa 1/3 dei casi familiari di SLA e di un piccolo numero di sporadici. Il continuo fermento di questo ambito di ricerca, insieme alle innovazioni tecnologiche che si susseguono, lasciano intuire che nei prossimi anni il numero dei geni identificati come responsabili della malattia sia destinato a crescere velocemente rendendo più chiari i meccanismi patogenetici della malattia.

V. CENNI DI FISIOPATOLOGIA

Le acquisizioni genetiche ottenute in epoca recente hanno permesso di conoscere meglio gli eventi cellulari che sottendono la degenerazione motoneuronale.

Già nel 1993 l'identificazione della mutazioni del gene SOD1 ha generato un'onda di ricerca molecolare sulla SLA. La proteina SOD1, come detto, catalizza la detossificazione del perossido. La tossicità della proteina SOD1 mutata è mediata da vari meccanismi, tra cui, principalmente, il misfolding e l'aggregazione. Gli effetti di tossicità includono un alterato metabolismo mitocondriale, la degenerazione assonale, il deficit del trasporto assonale, l'eccitotossicità, la distruzione del proteosoma e lo stress del reticolo endoplasmico. Nonostante siano state raccolte queste evidenze, la ricerca sul ruolo di SOD1 nella SLA non ha ottenuto risultati clinicamente applicabili. La degenerazione motoneuronale mediata dalla SOD1 mutante, infatti, ha rappresentato una barriera insormontabile nei trials terapeutici sui modelli murini nei quali, solitamente, è stato utilizzato come endpoint la sopravvivenza. E' interessante notare che la proteina SOD1 wild-type è stata implicata nella patogenesi della SLA sporadica⁸⁹. In questi pazienti, infatti, la proteina wild-type assume conformazioni aberranti che si avvicinano nell'aspetto a quelle dei soggetti con SLA mutante e, al contempo, la SOD1 wild-type, se presenta alterazioni della struttura terziaria, può riprodurre le stesse forme di citotossicità indotte dalla

SOD1 mutata E' stato anche ipotizzato che la proteina SOD1, una volta disorganizzata, può propagare le alterazioni patologiche tra le cellule in maniera simile ad un prione, con induzione di tossicità sulla proteina normale⁹⁰. Una importante implicazione di queste ricerche sarebbe che le terapie che mirano a ridurre la tossicità della SOD1 mutante possono essere efficaci anche sulle forme sporadiche di SLA, in assenza di mutazioni del gene *SOD1*.

Dalla scoperta nel 2006 delle inclusioni di TDP-43 sui tessuti di cervello e midollo spinale dei pazienti SLA si è aperto un ampio campo di ricerca sui meccanismi patogenetici. La proteina TDP43 nella malattia viene ubiquitinata, iperfosforilata e clivata a formare aggregati intranucleari e citoplasmatici. Sono state identificate sinora più di 40 mutazioni missense di *TDP-43*, che determinano una aumentata tendenza della proteina al clivaggio⁹¹ ed una maggiore resistenza alla degradazione⁹².

Nel 2009 sono state identificate mutazioni del gene *FUS/TLS* come fattori causali del 4% dei casi di SLA familiare. La proteina FUS condivide simili domini funzionali con TDP-43 ed è anche maggiormente rappresentata nel nucleo. In seguito a stress FUS può uscire nel nucleo e successivamente rientrare. Le mutazioni del gene *FUS* determinano una alterazione dell'ingresso nei neuroni, con conseguente perdita della funzione nucleare e aggregazione intracitosolica di FUS⁹². Sia TDP-43 che FUS hanno domini funzionali prion-like. Inoltre, la TDP43 insolubile induce l'aggregazione di TDP43⁹³. Questo meccanismo ha suggerito

l'ipotesi che vi possa essere una propagazione della proteina TDP43 o FUS mutata su quella wild-type, spiegando la patogenesi, lo spreading spaziale e la disfunzione motoneuronale nella SLA.

C9ORF72, come detto, è il più frequente determinante genetico della SLA. Sono stati proposti 4 modelli di patogenesi della malattia mediata dall'espansione di *C9ORF72*. Il primo si basa sull'aploinsufficienza⁹⁴, suggerita dal fatto che si ritrovano ridotti livelli di trascritto proteico nei tessuti cerebrali dei soggetti affetti. In secondo luogo, gli studi neuropatologici mostrano che le trascrizioni abnormi del DNA determinano dei foci nucleari di RNA⁸⁸, che sequestrano proteine utili ai meccanismi di rimodellamento genico. Terzo, le ripetizioni esanucleotidiche possono legare dei fattori trascrizionali⁹⁵. Il quarto potenziale meccanismo per la neurotossicità delle espansioni di *C9ORF72* è una particolare traslazione proteica che viene definita "repeat associated, non ATG". In seguito a questo meccanismo si formano dei polipeptidi RAN che vengono sequestrati in aggregati insolubili⁹⁶. Non è ancora stato verificato se queste proteine esercitano una citotossicità.

Per la maggior parte, la ricerca sulla SLA si è focalizzata sui meccanismi patogenetici che avvengono nel corpo cellulare, ma appare chiaro che si verificano degli eventi critici nella patogenesi anche alla periferia neuronale. I primissimi cambiamenti patologici nella SLA si verificano negli assoni, nei dendriti e nelle sinapsi.

Gli studi patologici infatti suggeriscono che la degenerazione periferica precede quella del corpo cellulare⁹⁷. Nel midollo spinale di

pazienti SLA si ritrovano alterazioni infiammatorie e rigonfiamenti assonali che suggeriscono una degenerazione assonale distale⁹⁸. Inoltre, anche alcune scoperte genetiche includono l'assone nella patogenesi della SLA. Per esempio, le mutazioni della profilina, che causa alcune forme di SLA familiare, intervengono nella polimerizzazione dell'actina⁹⁹

E' stato di recente evidenziato che la SOD1 mutata altera il trasporto assonale nel topo transgenico¹⁰⁰ e questo suggerisce un ruolo del trasporto assonale nella patogenesi della malattia. Il principale valore delle ricerche sulla cascata responsabile della morte degli assoni risiede nel fatto che esse potrebbero individuare nuovi target terapeutici per la malattia.

Negli ultimi anni è stato sempre più chiaro che anche cellule non neuronali modulano il fenotipo di SLA nel modello animale. La SOD1 mutata nella microglia e negli astrociti accelera il corso della malattia dopo l'esordio mentre nei precursori dell'oligodendroglia accelera la morte neuronale nel topo transgenico¹⁰¹. Risultati simili sono stati ottenuti negli astrociti del ratto TDP-43¹⁰². I meccanismi mediante i quali queste cellule non autonome intervengono nella patogenesi non sono conosciuti ma è noto che gli oligodendrociti danno un significativo supporto metabolico agli assoni durante il trasporto del lattato¹⁰³.

VI. CENNI DI TERAPIA

L'unico trattamento farmacologico approvato per la SLA è il Riluzolo, una piccola molecola con diversi meccanismi d'azione tra cui l'inibizione della eccessiva eccitazione motoneuronale. Il beneficio sul corso della malattia e sulla sopravvivenza è modesto (un incremento di sopravvivenza pari al 10-20%) ma è stato replicato in diversi studi¹⁰⁴.

Gli interventi di management che vengono messi in atto nella pratica clinica hanno l'obiettivo di trattare i sintomi legati alla malattia, con beneficio sulla qualità di vita e sulla sopravvivenza. La gestione multidisciplinare del paziente affetto da SLA, che viene operata nei Centri di Riferimento, nel mondo occidentale, prevede l'interazione di figure diverse che intervengono sulle difficoltà di deglutizione, sull'insufficienza respiratoria, i disturbi del sonno, il miglioramento dell'autonomia e delle possibilità di comunicazione. Negli ultimi anni si sta ponendo sempre maggiore attenzione ai percorsi di cure palliative che si ritiene debbano accompagnare il paziente sin dalla presa in carico da parte del Centro e che hanno l'obiettivo di alleviare le sofferenze, gestire i sintomi (tra questi, il dolore) ed offrire assistenza spirituale al paziente ed ai familiari.

VII. ATTIVITA' DI RICERCA

VII.I. GLI STUDI EPIDEMIOLOGICI

Studi pubblicati su questo tema nel corso del Dottorato:

VII.I.I. Il ritardo diagnostico

Cellura E, Spataro R, Taiello AC, La Bella V. FACTOR AFFECTING THE DIAGNOSTIC DELAY IN AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS. *Clinical Neurology and Neurosurgery* 2011; 114(6):550-4. Epub 2011 Dec 14.

Questa analisi dei fattori che hanno determinato un ritardo nella diagnosi di malattia è stata condotta su una coorte di pazienti SLA seguiti presso il Centro di Riferimento Regionale per le Malattie dei Motoneuroni di Palermo. Di questa pubblicazione la sottoscritta ha curato in particolare le analisi statistiche dei dati raccolti¹⁰⁵.

Lo studio ha messo in evidenza che la formulazione di una diagnosi errata è il fattore principalmente responsabile di un ritardo nella diagnosi di SLA.

Il ritardo diagnostico medio è stimato considerando il tempo trascorso tra la comparsa dei primi sintomi di malattia e la diagnosi. Il valore medio di ritardo diagnostico nella nostra popolazione è stato di 11 mesi, sostanzialmente sovrapponibile a quello riportato da studi eseguiti su altre popolazioni, a livello internazionale, che hanno riportato valori di ritardo diagnostico compreso tra 8 e 15 mesi. A determinare più frequentemente un ritardo nella diagnosi di malattia dei motoneuroni è la formulazione di una diagnosi errata.

Le condizioni patologiche di ernia cervicale e mielopatia spondilogenetica sono le più frequenti diagnosi di errore formulate sui pazienti ad esordio spinale di SLA, mentre la sindrome pseudobulbare vascolare è la più frequente diagnosi di errore sui pazienti ad esordio bulbare di malattia.

La tabella di seguito riportata, estratta da questa pubblicazione, rappresenta le più comuni diagnosi errate che sono state formulate nella popolazione considerata.

Tabella 2

Più comuni diagnosi sbagliate all'esordio della SLA

Diagnosi (n=81)	Generale n(%)	Da un medico n (%) ^a	Da un neurologo n(%) ^a
Artrosi	2(2.4)	1(50)	1(50)
Demenza di Alzheimer ^b	4(5.0)	3(75)	1(25)
Depressione	5(6.2)	3(60)	2(40)
Discal ernia/ mielopatia cervicale	26(32.0)	12(46)	14(54)
Paralisi vascolare pseudobulbare	16(20.0)	12(75)	4(25)
Miastenia	6(7.4)	3(50)	3(50)
Neuropatia/ Miopatia	7(8.6)	4(57)	3(50)
Malattia di Parkinson	4(5.0)	2(50)	2(50)
Disfunzione della tiroide	2(2.4)	2(100)	0(0)
Sindrome del tunnel carpale	5(6.2)	3(60)	2(40)
Sclerosi multipla	2(2.4)	0(0)	2(100)
Stroke	1(1.2)	0(0)	1(100)
Tremore essenziale	1(1.2)	0(0)	1(100)

^a Valore percentuale in relazione al numero di diagnosi nella categoria specifica

^b Due dei pazienti erano stati inizialmente diagnosticati dai neurologi come affetti da Demenza di Alzheimer

Il ritardo nella diagnosi non è associato in modo significativo alla sede d'esordio della malattia (spinale vs bulbare), sebbene i pazienti che hanno avuto un esordio bulbare dei disturbi tendano ad avere un ritardo diagnostico inferiore. Allo stesso modo il ritardo nella diagnosi non è significativamente correlato alla competenza specifica del primo medico che ha visitato il paziente, nonostante i dati raccolti suggeriscano che i pazienti visitati in prima istanza da un neurologo tendono ad avere un ritardo diagnostico più breve.

Dai risultati che questa ricerca ha ottenuto emerge inoltre come, nonostante la migliore informazione sulla malattia e lo sviluppo dei centri di riferimento, è tuttora diffuso un significativo ritardo nella diagnosi di SLA, principalmente correlato ad errori medici di tipo cognitivo che inducono la formulazione di diagnosi errate.

VII.I.II. Prevalenza ed incidenza della SLA in Sicilia

Ragonese P, Cellura E, Aridon P, D'Amelio M, **Spataro R**, Taiello AC, Maimone D, La Bella V and Savettieri G. INCIDENCE OF AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS IN SICILY: A POPULATION BASED STUDY. *Amyotrophic Lateral Sclerosis*, 2012; 13: 284–287

Questo studio ha ricercato l'incidenza della SLA nella popolazione di cinque province siciliane nel periodo compreso tra il 2005 ed il 2006¹⁰⁶. La ricerca ha riguardato pertanto una popolazione di 3.481.096 abitanti. I dati di incidenza sono stati raccolti in prima istanza considerando le informazioni fornite dalle Schede di Dimissione Ospedaliera (SDO). Alla SLA corrisponde infatti uno

specifico codice della Classificazione Internazionale delle patologie (ICD-10). Ulteriori dati sono stati raccolti dal registro regionale di prescrizione del Riluzolo, cui è seguita una valutazione neurologica mirata a confermare la diagnosi prima dell'inclusione nello studio. La diagnosi di SLA è stata posta in accordo ai criteri di El Escorial, che prevedono quattro livelli di accertamento diagnostico: possibile, probabile, probabile con supporto di laboratorio e definita.

I risultati hanno mostrato una incidenza di 97 casi in due anni (1.4/100000 per anno), con un rapporto maschi/femmine di 1.4:1 ed un'età media all'esordio di 58.3 anni. Tre pazienti sono stati riconosciuti affetti da SLA-FTD. Il tasso di prevalenza calcolato è stato di 6/100000 abitanti.

I dati di incidenza e prevalenza raccolti sono lievemente inferiori a quelli riportati da studi precedenti in Italia e questa differenza potrebbe essere spiegata dalla particolare composizione genetica della popolazione siciliana, che deriva da molteplici origini etniche

VII.I.III. Conclusioni:

Gli studi di tipo epidemiologico cui la sottoscritta ha partecipato hanno contribuito a verificare le caratteristiche demografiche e cliniche della popolazione di pazienti SLA seguita presso il Centro di Riferimento e, nel caso dello studio di incidenza, della popolazione siciliana. Le prospettive future di questo ambito di ricerca sono rappresentate dall'individuazione di clusters geografici

e da studi di correlazione tra genotipo e fenotipo di malattia in diverse aree territoriali.

VII.II. GLI STUDI GENETICI

VII.II.I. Il gene FUS

Studi pubblicati su questo tema nel corso del Dottorato:

- a. Chiò A, Restagno G, Brunetti M, Ossola I, Calvo A, Mora G, Sabatelli M, Monsurrò MR, Battistini S, Mandrioli J, Salvi F, **Spataro R**, Schymick J, Traynor BJ, La Bella V, the ITALSGEN Consortium. TWO ITALIAN KINDREDS WITH FAMILIAL AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS DUE TO FUS MUTATION. *Neurobiology of Aging* 2009; 30: 1272-1275
- b. Lai SL, Abramzon Y, Schymick JC, Stephan DA, Dunckley T, Dillman A, Cookson M, Calvo A, Battistini S, Giannini F, Caponnetto C, Mancardi GL, **Spataro R**, Monsurrò MR, Tedeschi G, Marinou K, Sabatelli M, Conte M, Mandrioli J, Sola P, Salvi F, Bartolomei I, Lombardo F, the ITALSGEN Consortium, Mora G, Restagno G, Chiò A, Traynor BJ. FUS MUTATIONS IN SPORADIC AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS. *Neurobiology of Aging* 2011;32:550.e1-4
- c. Sproviero W, La Bella V, Mazzei R, Valentino P, Rodolico C, Simone IL, Logroscino G, Ungaro C, Magariello A, Patitucci A, Tedeschi G, **Spataro R**, Condino F, Bono F, Citrigno C, Monsurrò MR, Muglia M, Gambardella A, Quattrone A, Conforti FL. FUS MUTATIONS IN SPORADIC AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS: CLINICAL AND GENETIC ANALYSIS. *Neurobiology of aging* 2012; 33: 837 e1-5

Nel corso del 2009 il gene *fused in sarcoma/translated in liposarcoma* (*FUS/TLS*) è stato riconosciuto come gene patogeno nella SLA¹⁰⁷.

Il gene è localizzato sul cromosoma 16p11.2 e codifica per una proteina di 526 aminoacidi che lega l'RNA ed è coinvolta nel suo processamento. Quasi tutte le mutazioni note, legate alla SLA, sono

localizzate nella porzione C-terminus della proteina. Nella maggior parte delle cellule, la proteina FUS è presente sia nel nucleo che nel citoplasma, nei neuroni è più presente, in proporzione, nel nucleo che nel citoplasma, mentre nella glia è esclusivamente nucleare¹⁰⁸. Le analisi neuropatologiche su tessuti di cervello e midollo spinale di pazienti SLA che portavano la mutazione ha mostrato la ritenzione citoplasmatica e la formazione di aggregati neuronali di FUS ubiquitina-positivi¹⁰⁹. Nel 2009 il Consorzio Italsgen, in collaborazione con l'Istituto di Neurogenetica dell'Università di Bethesda, USA, ha eseguito una analisi del gene FUS/TLS su una coorte di 52 casi familiari di SLA, negativi per mutazioni sul gene *SOD-1* e *TARDBP*, provenienti da 7 regioni italiane, per definire lo spettro di frequenza in Italia di mutazioni di questi gene¹¹⁰. L'analisi ha permesso di identificare due mutazioni del gene FUS: una mutazione missense, eterozigote, c.G1542C, in una famiglia piemontese, ed una mutazione missense eterozigote c. C1574T in una famiglia seguita presso il Centro di Riferimento per le malattie dei Motoneuroni di Palermo.

Il caso piemontese è stato caratterizzato da un esordio clinico all'età di 36 anni, con ipostenia degli arti inferiori, e da una rapida progressione, con una sopravvivenza di 22 mesi dall'esordio clinico. Oltre al probando, erano state affette nella famiglia due zie paterne, il nonno ed una sorella del nonno. Il padre del probando, portatore obbligato, era morto di patologia neoplastica all'età di 69 anni.

Il caso seguito presso il Centro di Palermo ha riguardato una giovane donna che ha presentato all'età di 21 anni un esordio di progressiva sindrome bulbare. Per il peggioramento delle sue condizioni cliniche e la comparsa di insufficienza respiratoria, la paziente è deceduta 12 mesi dopo l'esordio clinico. Nella famiglia esaminata erano state affette da SLA la madre della probanda, una sorella della madre e la nonna materna.

Entrambi i casi, pertanto, si sono connotati per l'esordio giovanile e la rapida progressione.

Nel corso dell'anno successivo, lo stesso gruppo di lavoro ha eseguito l'analisi del gene *FUS* su 436 pazienti italiani e 1087 pazienti statunitensi, affetti tutti da SLA in forma sporadica¹¹¹.

Lo screening ha messo in evidenza sei casi di SLA, portatori di 6 distinte mutazioni del gene, di cui due già descritte in precedenza e quattro nuove. Queste ultime, sono state ritenute patogene perché non presenti in un ampio numero di campioni di controllo né nel database dbSNP del National Center for Biotechnology Information. Due terzi delle mutazioni sono state identificate sull'esone 15 del gene *FUS*. Dal punto di vista clinico, i probandi sono stati rappresentati da cinque maschi ed una femmina, con esordio clinico mediamente prima dei 50 anni di età e in sede spinale.

I dati di questo studio permettono di concludere che le mutazioni del gene *FUS* determinano l'1% dei casi sporadici. Il locus 16p11.2 del gene non è stato identificato nei precedenti studi di wide-genome screening sui pazienti SLA sporadici, e questo suggerisce

che le varianti comuni di questo locus non sono fattori di rischio per la malattia in forma sporadica. Non è possibile determinare se i casi di SLA con mutazioni di *FUS* rappresentano dei casi sporadici “veri” o “apparenti”. L’attuale classificazione in casi familiari o sporadici è resa poco applicabile da una serie di fattori che includono diagnosi errate formulate in passato, la scarsa conoscenza della storia familiare, la morte di soggetti portatori della mutazione, in generazioni precedenti, prima di sviluppare la malattia, ed anche variabili manifestazioni cliniche, di tipo motorio e cognitivo, tra portatori della mutazione all’interno della stessa famiglia¹¹². Gli studi di genome-wide permettono di affrontare in modo alternativo questa problematica ed incoraggiare la diffusione pubblica dei dati genotipici. Lo studio ha inoltre confermato che le mutazioni del gene *FUS* determinano fenotipi clinici piuttosto omogenei, con esordio giovanile e rapida progressione. E’ emerso inoltre che tali mutazioni sono più frequenti nella popolazione italiana che in quella statunitense.

Nei primi due anni che hanno seguito l’identificazione del gene *FUS* come fattore di rischio per la SLA, sono state identificate 35 diverse mutazioni patogeniche del gene *FUS*, che sono responsabili del 4% dei casi familiari di SLA e meno dell’1% dei casi sporadici¹¹³. La maggior parte di queste mutazioni (21) si raccolgono nella regione NLS, codificata dagli esoni 14 e 15, e potrebbero esercitare il loro effetto patogeno alterando la distribuzione subcellulare della

proteina, con un aumento tossico della funzione¹¹⁴. Le mutazioni restanti si collocano negli esoni 3, 5, 6 e 12.

Nel 2011, il gruppo di neurogenetica del Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR) di Cosenza, in collaborazione con il nostro Centro e con altri quattro Centri clinici del Sud Italia, ha condotto uno screening mutazionale del gene *FUS* su una coorte di 327 casi sporadici di SLA, negativi ai test per mutazioni su *SOD-1*, *ANG*, *VABP*, e *TARDBP*¹¹⁵.

La diagnosi di SLA è stata posta in accordo ai criteri rivisti di El Escorial¹¹⁶. Oltre ai dati demografici, sono stati raccolti di tutti i pazienti anche i dati clinici inerenti la sede d'esordio, i segni clinici indicativi di compromissione del I e II neurone di moto, la progressione di malattia, i disturbi dell'umore e lo stato cognitivo, con particolare riferimento alle funzioni del lobo frontale. Sono stati inclusi nello studio, come controlli, i campioni appartenenti a 100 soggetti sani, con familiarità negativa per patologie neurodegenerative.

Lo screening ha portato all'identificazione di 3 diverse mutazioni in 4 pazienti, due maschi e due femmine, tutti con esordio clinico agli arti inferiori. In merito all'età d'esordio, tre avevano avuto un esordio dei disturbi entro il 42° anno di età, ed il quarto a 60 anni, età che è comunque più bassa di quella media nelle popolazioni italiane studiate. Nessuno dei quattro pazienti ha presentato disturbi cognitivi.

In conclusione, lo studio ha messo in evidenza che, nella nostra coorte di pazienti affetti da SLA sporadica, l'1,25 % è portatore di mutazioni del gene *FUS*, ed ha confermato, come già descritto negli studi condotti in precedenza, che le mutazioni di questo gene si associano a fenotipi clinici caratterizzati da precoce età d'esordio dei sintomi e breve sopravvivenza¹¹⁷.

VII.II.II. Il gene VCP

Studio pubblicato su questo tema nel corso del Dottorato:

Johnson JO, Mandrioli J, Benatar Michael, Abramzon Y, Van Deerlin VM, Trojanowski JQ, Gibbs JR, Brunetti M, Gronka S, Wu J, Ding J, McCluskey L, Martines-Lage M, Falcone D, Hernandez DG, Arepalli S, Chong S, Schymick JC, Rothstein J, Landi F, Wang Y-D, Calvo A, Mora G, Sabatelli M, Monsurrò MR, Battistini S, Salvi F, **Spataro R**, Sola P, Borghero G, The ITALSGEN Consortium, Galassi G, Scholz SW, Taylor JP, Restagno G, Chiò A, and Traynor BJ. EXOME SEQUENCING REVEALS VCP MUTATIONS AS A CAUSE OF FAMILIAL ALS. *Neuron* 2010; 66: 857-864

Questo importante studio, che ha consentito l'identificazione di un nuovo gene patogeno per la SLA, ha avuto origine da una analisi di exome sequencing su una famiglia italiana con SLA familiare a trasmissione autosomica dominante. L'exome sequencing è una tecnica innovativa di sequenziamento massivo parallelo che permette di identificare rapidamente piccole varianti geniche nella porzione (circa 1%) del genoma che codifica per le proteine. La forza

dell'exome sequencing deriva dal fatto che la maggior parte delle malattie monogeniche viene determinata da mutazioni all'interno di questa piccola porzione del genoma. La capacità di questa tecnica di identificare nuovi geni patogeni è stata già ampiamente dimostrata¹¹⁸. Nella famiglia italiana descritta erano stati identificati quattro casi di SLA in quattro diverse generazioni. Essendo disponibile il materiale genetico di due di questi soggetti, appartenenti alla III e IV generazione considerata, è stata prima eseguita la ricerca di mutazioni sui geni *SOD-1*, *TDP-43* e *FUS*. Avendo questa avuto esito negativo, sugli stessi campioni è stata eseguita una analisi di exome sequencing. L'analisi ha permesso di isolare un numero limitato di varianti geniche, che i due campioni condividevano e che non risultavano presenti nei database genetici "1000 Genomes" e "dbSNP". Ulteriori analisi, eseguite comparando le variabili con quelle presenti in altri campioni di soggetti affetti e con quelle di un ampio database di controlli sani, hanno consentito di restringere il numero di variabili a 4. Ognuna di queste variabili segrega con la malattia all'interno della famiglia e rappresenta un plausibile gene candidato a risultare patogeno. Tra le quattro mutazioni è stata riconosciuta una sostituzione aminoacidica (p.R191Q) sul gene che codifica per la valosin containing protein (VCP). Questa mutazione è stata in precedenza descritta come responsabile di una sindrome caratterizzata da Miopatia a corpi inclusi, malattia di Paget giovanile del midollo e Demenza Frontotemporale (IBMPFD)¹¹⁹. Tale patologia si caratterizza

patologicamente per la presenza di inclusioni che si colorano per TDP-43 nei muscoli e nei neuroni della corteccia frontale⁸¹. Poiché anche la SLA è caratterizzata dalla deposizione di inclusioni di TDP-43 e le mutazioni che sono state identificate alterano la struttura della VCP, compromettono la sua funzione, e sono patogeni che nell'uomo¹²⁰, è stato ipotizzato che queste mutazioni potrebbero anche determinare un fenotipo SLA.

Per verificare questa ipotesi e stabilire la frequenza delle mutazione di VCP nella SLA, è stato quindi sequenziato il genoma di 210 casi di SLA e 78 casi patologicamente confermati, identificando altre quattro mutazioni in cinque individui con diagnosi di SLA. Nessuna di queste mutazioni è stata ritrovata in un ampio gruppo di controllo, composto da 569 soggetti dagli Stati Uniti, 636 dall'Italia, 364 Africani e Asiatici, tutti inclusi nel Human Gene Diversity Panel (HGDP) né nei database "dbSNP" e "1000 Genomes".

Lo studio condotto ha consentito, pertanto, di identificare un nuovo gene patogeno per la SLA e di accertarne la frequenza nei casi di SLA familiare, che si attesta intorno al 1-2 %, simile a quella delle mutazioni *FUS* e *TDP-43* in precedenza descritte.

In considerazione, inoltre, del fatto che le mutazioni del gene VCP in precedenza descritte determinano la sindrome IBMPFD, si deve ipotizzare che lo spettro fenotipico di questa sindrome possa essere ancora più complesso, ed includere anche la SLA¹²¹.

VII.II.III. Espansione esanucleotidica in *C9ORF72*

Studi pubblicati su questo tema durante il Corso di Dottorato:

- a. Chiò A, Borghero G, Restagno G, Mora G, Drepper C, Traynor BJ, Sendtner M, Brunetti M, Ossola I, Calvo A, Pugliatti M, Sotgiu MA, Murru MR, Marrosu MG, Marrosu F, Marinou K, Mandrioli J, Sola P, Caponnetto C, Mancardi G, Mandich P, La Bella V, **Spataro R**, Conte A, Monsurrò MR, Tedeschi G, Pisano F, Bartolomei I, Salvi F, Lauria Pinter G, Simone I, Logroscino G, Gambardella A, Quattrone A, Lunetta C, Volanti P, Zollino M, Penco S, Battistini S, The ITALSGEN Consortium, Renton AE, Majounie E, Abramzon Y, Conforti FL, Giannini F, Corbo M and Sabatelli M. CLINICAL CHARACTERISTICS OF PATIENTS WITH FAMILIAL AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS CARRYING THE PATHOGENIC GGGGCC HEXANUCLEOTIDE REPEAT EXPANSION OF *C9ORF72*. *Brain* 2012; 135: 784-793
- b. Sabatelli M, Conforti FL, Zollino M, Mora G, Monsurrò MR, Volanti P, Marinou K, Salvi F, Corbo M, Giannini F, Battistini S, Penco S, Lunetta C, Quattrone A, Gambardella A, Logroscino G, Simone I, Bartolomei I, Pisano F, Tedeschi G, Conte A, **Spataro R**, La Bella V, Caponnetto C, Mancardi G, Mandich P, Sola P, Mandrioli J, Renton AE, Majounie E, Abramzon Y, Marrosu F, Marrosu MG, Murru MR, Sotgiu A, Pugliatti M, Rodolico C, the ITALSGEN consortium, Moglia C, Calvo A, Ossola I, Brunetti M, Traynor BJ, Borghero G, Restagno G, Chiò A. *C9ORF72* HEXANUCLEOTIDE REPEAT EXPANSIONS IN THE ITALIAN SPORADIC ALS POPULATION. *Neurobiology of Aging* 2012; 33: 1848.e15-e20

La evidenza, sempre più chiara, di un continuum clinico e patologico tra la SLA e la Demenza Frontotemporale ha motivato delle analisi di linkage genetico su famiglie in cui erano presenti casi di SLA, FTD e SLA-FTD. Questi studi hanno permesso di identificare un locus importante per la malattia nel braccio corto del cromosoma 9¹²².

Attraverso uno studio di genome-wide association¹²³, è stato scoperto che tale locus 9p21 risponde di quasi la metà dei casi familiari e di circa un quarto di tutti i casi di SLA di una coorte di

405 pazienti finlandesi e 497 controlli. Nel 2011, l'istituto di neurogenetica di Bethesda, in collaborazione con molti gruppi di ricerca, tra cui il Consorzio Italsgen, ha eseguito una analisi di sequenziamento della regione cromosomica 9p21 per identificare il gene responsabile della malattia. E' stato così rilevato il ruolo della ripetizione della tripletta esanucleotidica di *C9ORF72* nella SLA. Come detto, nella popolazione finlandese, da cui ha avuto origine lo studio, questa mutazione spiega la metà dei casi di SLA familiare e, pertanto, insieme alla mutazione D90A del gene *SOD1* spiega circa il 90 % dei casi di SLA familiare in Finlandia. A dimostrare la patogenicità della espansione per la neurodegenerazione è il fatto che essa segrega con la malattia in alberi genealogici multigenerazionali ed è associata alla malattia nelle coorti di pazienti SLA e FTD esaminate. Essa potrebbe determinare la malattia o mediante una aploinsufficienza, in cui vengono danneggiati l'espressione o lo splicing del gene, oppure attraverso la generazione di abnormi quantità di RNA tossico, che altera il funzionamento delle cellule.

Dopo la descrizione della mutazione, il Consorzio Italsgen ha operato una analisi delle caratteristiche fenotipiche dei casi di SLA familiare associati a questa alterazione genetica. A questo scopo è stato condotto uno screening per l'espansione su 120 casi di SLA familiare (non imparentati) provenienti da diverse regioni d'Italia e 21 casi di SLA familiare (non imparentati) sardi. L'espansione è stata identificata nel 37.5% dei casi italiani e nel 57.1 % dei casi sardi.

Nella popolazione tedesca, che era stata descritta nel precedente lavoro di Renton, la frequenza dell'espansione era del 22%. Per quanto riguarda le caratteristiche cliniche dei pazienti portatori di questa alterazione genetica, confrontando le popolazioni originarie dalle diverse regioni italiane, dalla Sardegna e quella tedesca, non sono state rilevate differenze statisticamente significative nell'età d'esordio, il genere, la sede d'esordio e la frequenza di FTD. Circa la metà dei pazienti portatori dell'espansione ha sviluppato deficit cognitivi. Tutti questi casi hanno esordito con una variante comportamentale della FTD. Più in particolare, dopo somministrazione della Frontal Systems Behavioural Scale¹²⁴, tutti i pazienti hanno mostrato alterazioni nei domini dell'apatia e delle funzioni esecutive, mentre il dominio relativo alla disinibizione era alterato solo in una piccola percentuale di pazienti.

In alcune patologie da espansione di triplette il genere del genitore che trasmette la mutazione influenza il fenotipo del figlio affetto¹²⁵. Per determinare un simile effetto nel caso dell'espansione di *C9ORF72* abbiamo confrontato l'età all'esordio dei casi indice con quella dei genitori affetti, per i quali vi erano dati disponibili. I casi con trasmissione parentale sono stati 55, 28 per via materna e 27 paterna. In media, i figli hanno sviluppato la malattia 7 anni prima dei loro genitori. La trasmissione materna o paterna sembra non avere effetto sull'età all'esordio del figlio affetto. Al contrario, il fenotipo del genitore influenza il tipo di sintomi clinici presentati dal figlio affetto. Dei 13 casi in cui il genitore ha presentato SLA-

FTD o FTD, in 9 casi anche il figlio si è ammalato di FTD. La relazione non è univoca, dal momento che diversi casi indice hanno presentato FTD senza che ne fosse affetto il genitore che ha trasmesso loro la mutazione.

In merito alla sede d'esordio, è più comune l'esordio bulbare di malattia tra i pazienti SLA con mutazione di *C9ORF72* rispetto a quelli portatori di altre mutazioni. L'età media d'esordio di questi pazienti non è dissimile da quella dei pazienti che sono portatori di mutazioni che coinvolgono altri geni, ad eccezione dei portatori di mutazioni sul gene *FUS* che, come detto, presentano una più precoce età d'esordio della malattia.

Nel complesso, le alterazioni cognitive e comportamentali sono state molto più presenti nei pazienti SLA con mutazione di *C9ORF72* rispetto ad altre mutazioni e tra questi pazienti sono stati più spesso riscontrati dei sintomi psichiatrici, come deliri e allucinazioni.

La mediana di sopravvivenza dei pazienti portatori di espansione di *C9ORF72* nella nostra coorte è stata di 3,2 anni, simile alla sopravvivenza osservata nei casi con mutazione di *SOD1*. I pazienti portatori di mutazioni del gene *FUS* hanno avuto al contrario una più breve sopravvivenza, mentre i pazienti portatori di mutazioni di *TARDBP* hanno avuto una sopravvivenza relativamente più lunga.

Questo lavoro, oltre a chiarire le correlazioni tra genotipo e fenotipo dei pazienti affetti dall'espansione esanucleotidica di *C9ORF72*, ha contribuito alla ricerca sul continuum clinico, patologico e genetico tra SLA e FTD. Entrambe queste condizioni patologiche,

cl clinicamente distinte, sono caratterizzate dalla dislocazione e dall'accumulo citoplasmatico di TDP-43, che determina un gruppo di patologie definite come TDP-43 patie¹²⁶.

Allo studio sul gene *C9ORF72* sui pazienti con SLA familiare è seguito, nel 2012, lo studio sulla popolazione di sporadici, cui la sottoscritta ha contribuito, nell'ambito del Consorzio Italsgen¹²⁷.

Lo studio ha raccolto 1757 casi di SLA sporadica provenienti da 15 centri italiani aderenti al Consorzio, tutti senza storia familiare di SLA e negativi per mutazioni sui geni *SOD1*, *TARDBP* e *FUS*. Sono stati inclusi come controlli nello studio 402 soggetti neurologicamente sani raccolti in diverse regioni d'Italia.

E' stata ricercata su questi campioni la presenza dell'espansione esanucleotidica GGGGCC nel primo introne del gene *C9ORF72*, considerando come patologico un numero di espansioni superiore a 30. I risultati hanno mostrato che l'espansione è presente nel 3.6% della popolazione italiana di SLA sporadici, nel 4,9% dei pazienti siciliani e nel 6.8% dei pazienti sardi. Al contrario, nessun soggetto di controllo è risultato portatore della mutazione.

In merito alla correlazione genotipo-fenotipo, il 36,2% dei pazienti SLA sporadici portatori dell'espansione presentava FTD in aggiunta ai disturbi motori. In tutti i casi la demenza si presentava con alterazioni del comportamento.

Lo studio ha quindi mostrato che l'espansione esanucleotidica di *C9ORF72* rappresenta la più comune mutazione nei casi sporadici di SLA. La frequenza dell'espansione è minore rispetto a quanto

descritto nelle popolazioni Finlandese, Irlandese e Tedesca suggerendo che la stessa abbia avuto origine in NordEuropa. In Sardegna la mutazione è più frequente che nel resto d'Italia, sebbene rimanga meno frequente della mutazione missense A382T del gene *TARDBP*, che risponde del 23% dei casi sporadici di SLA¹²⁸.

E' probabile che l'alta frequenza della espansione di *C9ORF72* in Sardegna sia da attribuire al fenomeno della "magnificazione" dei geni patologici nelle popolazioni isolate.

Dal punto di vista fenotipico, i pazienti SLA portatori dell'espansione sono significativamente più giovani, presentano una forma più aggressiva di malattia, con una più breve sopravvivenza, indipendentemente dall'età e dalla sede d'esordio. Inoltre, gli alberi genealogici dei pazienti portatori dell'espansione mostrano frequentemente diversi casi di FTD o altra demenza. Da ciò deriva che la definizione di SLA familiare dovrebbe essere estesa ed includere anche i pazienti SLA con familiarità positiva per FTD. D'altronde, è stato dimostrato che SLA e FTD condividono uno stesso aplotipo e pertanto tutti i casi derivano da uno stesso founder¹²⁹.

VII.II.IV. ATXN-1 E ATXN-2

Studio pubblicato su questo tema nel corso del Dottorato:

Conforti FL, Spataro R, Sproviero W, Mazzei RL, Cavalcanti F, Condino F, Simone IL, Logroscino G, Patitucci A, Magariello A, Muglia M, Rodolico C, Valentino P, Bono F, Colletti T, Monsurrò MR, Gambardella A, La Bella V.

ATAXIN-1 AND ATAXIN-2 INTERMEDIATE-LENGTH POLY-Q EXPANSIONS IN AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS. *Neurology* 2012doi: 10.1212/WNL.0b013e318278b618

E' stato dimostrato¹³⁰ nel 2010 che una piccola percentuale di pazienti con SLA è portatrice di espansione intermedia (27-33 triplette) del gene *ATXN-2*. A questa scoperta ha fatto seguito una serie di studi che hanno confermato che l'espansione intermedia CAG di *ATXN-2* è un fattore di rischio per la SLA¹³¹. In particolare, un numero di triplette superiore a 30 unità è stato associato ad un aumento del rischio di SLA nella popolazione europea. Questo effetto sembra essere specifico, dal momento che non è stato riscontrato in popolazioni di pazienti con Demenza di Alzheimer, Malattia di Parkinson e degenerazione frontotemporale¹³².

Nel 2012 il nostro gruppo di ricerca, in collaborazione con il CNR di Cosenza ed altri Centri Clinici del Sud Italia, ha analizzato la presenza dell'espansione nucleotidica di *ATXN-1* e *ATXN-2* su una ampia coorte di pazienti affetti da SLA sporadica e familiare seguiti presso il Centro di Riferimento per le Malattie dei Motoneuroni di Palermo¹³³.

Sono stati inclusi in questo studio 405 pazienti affetti da SLA sporadica e 13 pazienti da SLA familiare. Su tutti i campioni era stata precedentemente esclusa la presenza di mutazioni sui geni *SOD1*, *TARDBP*, *ANG* e *FUS* e dell'espansione esanucleotidica di

C9ORF72. Sono stati inclusi come controlli 296 soggetti sani di origine italiana.

I risultati hanno mostrato una espansione di *ATXN-1* nel 7.07 % dei casi di SLA sporadica e una espansione di *ATXN-2* nel 2.72 % dei casi di SLA sporadica. In merito al primo dei due geni, è stata considerata significativamente associata al rischio di SLA una espansione intermedia, con numero di triplette superiore a 32.

Soltanto su un paziente è stata ritrovata l'espansione di entrambi i geni e ciò suggerisce che i due fattori genetici siano indipendentemente correlati al rischio di SLA. L'espansione ripetuta dei due geni è stata ritrovata anche nei controlli, ma in una percentuale significativamente inferiore ai casi di SLA.

La tabella n.3 mostra la frequenza dell'espansione intermedia di *ATXN-1* e *ATXN-2* nei casi di SLA sporadica e familiare e nei controlli.

Dal punto di vista della correlazione genotipo-fenotipo, non è stata ritrovata alcuna correlazione tra variabili come il sesso, l'età all'esordio o la sede d'esordio e l'espansione di *ATXN-1* e *ATXN-2*.

In termini fisiopatologici, l'espansione di *ATXN-2* incrementa l'interazione tra l'atassina 2 e TDP-43 e promuove la dislocazione della TDP-43 nel citoplasma. A ciò consegue l'alterazione del metabolismo dell'RNA e un aumento della tossicità sui motoneuroni¹³⁴. Inoltre, la Poly-Q binding protein 1, una proteina che interagisce con il gene *ATXN-1*, se overespressa nel topo

incrementa l'accumulo nucleare di ubiquitina ed induce un processo di degenerazione motoneuronale.

Questo studio ha dimostrato per la prima volta che l'espansione del gene *ATXN-1* è un fattore di rischio per la SLA ed ha confermato il ruolo, già sostenuto da ricerche precedenti, di *ATXN-2*. Sono state raccolte molteplici evidenze della presenza di segni di degenerazione dei motoneuroni spinali e bulbari nelle atassie spino cerebellari (SCA)¹³⁵ e sono state identificate mutazioni responsabili di SCA in pazienti affetti da malattia dei motoneuroni¹³⁶. Questi risultati, insieme ai dati raccolti sull'espansione intermedia di *ATXN-1* e *ATXN-2* suggeriscono che possa esistere un continuum genetico, clinico e patologico tra le atassie spino cerebellari e la SLA.

Tabella 2 Frequenza di ripetizioni intermedie di Poly-q ≥ 32 ATXN-1 e ≥ 28 ATXN-2 nei casi sporadici (sALS) e familiari (fALS)

Alleli	sSLA	Controlli	pValore	OR(95%CI)
ATXN-1, n(%)				
≥ 32 ripetizioni	57(7.07)	13(2.4)	0.0001	2.396(1.26-4.56)
<32 ripetizioni	749(92.9)	531(97.6)		
ATXN-2, n(%)				
≥ 28 ripetizioni	22(2.7)	3(0.5)	0.001	
<28 ripetizioni	786(97.3)	583(99.5)		
	fSLA	Controlli	pValore	OR(95%CI)
ATXN-1, n (%)				
≥ 30 ripetizioni	8(33.3)	94(17.3)	0.056	1.56(0.42-9.67)
<30 ripetizioni	16(66.7)	450(82.7)		
ATXN-2, n(%)				
≥ 22 ripetizioni	26(100)	574(97.9)	1.0	NA
<22 ripetizioni	0(0.0)	12(2.1)		

VII.II.V. Conclusioni

Gli studi di genetica cui la sottoscritta ha collaborato si sono inseriti in un ampio dibattito sui presupposti genetici della malattia e sulle correlazioni tra genotipo e fenotipo. Questo ambito raccoglie in questo momento il maggiore interesse dei ricercatori perché sembra prospettare in futuro l'individuazione di target terapeutici per la malattia.

VII.III. GLI STUDI DI MANAGEMENT E VARIABILI DI SOPRAVVIVENZA

VII.IIII.I. La nutrizione e la PEG

Studio pubblicato su questo tema nel corso del Dottorato: Spataro R, Ficano L, Piccoli F, La Bella V. PERCUTANEOUS ENDOSCOPIC GASTROSTOMY IN AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS: EFFECT ON SURVIVAL. *Journal of Neurological Sciences* 2011. 304: 44-48.

Le difficoltà di deglutizione rappresentano uno degli aspetti più complessi del management dei pazienti con SLA, hanno rilevante incidenza sulla qualità di vita e un ruolo determinante sulla prognosi, sia per gli effetti sullo stato nutrizionale sia per le possibili complicanze respiratorie (i.e. polmoniti ab ingestis). Il lavoro di ricerca che qui si presenta è stato condotto nel 2011 ed ha avuto un disegno retrospettivo, includendo l'analisi delle informazioni raccolte in sette anni, dal 2000 al 2007, su 150 pazienti disfagici seguiti presso il Centro Regionale di Riferimento per le malattie dei Motoneuroni di Palermo¹³⁷. La gastrostomia endoscopica percutanea (PEG) viene proposta ai pazienti con SLA quando le difficoltà di deglutizione sono di gravità tale da non potere essere compensate da modifiche dietetiche. In questo lavoro è stata comparata la sopravvivenza dei pazienti che si erano sottoposti a PEG con quella di pazienti, affetti anch'essi da severa disfagia, che avevano negato il proprio consenso alla procedura. Il desiderio di conservare la modalità naturale di alimentarsi e, con essa, gli aspetti sociali della

condivisione del pasto, sono tra le motivazioni più importanti che spingono i pazienti a rifiutare di sottoporsi all'impianti di PEG¹³⁸. Come mostrano le curve di Kaplan-Meyer rappresentate in Fig. 1, l'impianto di PEG conferisce ai pazienti con SLA un guadagno in termini di sopravvivenza (mediana: 6 mesi). Se si dividono i pazienti in accordo alla sede di esordio, tale effetto sulla sopravvivenza è più evidente nei pazienti con esordio spinale (mediana: 8 mesi).

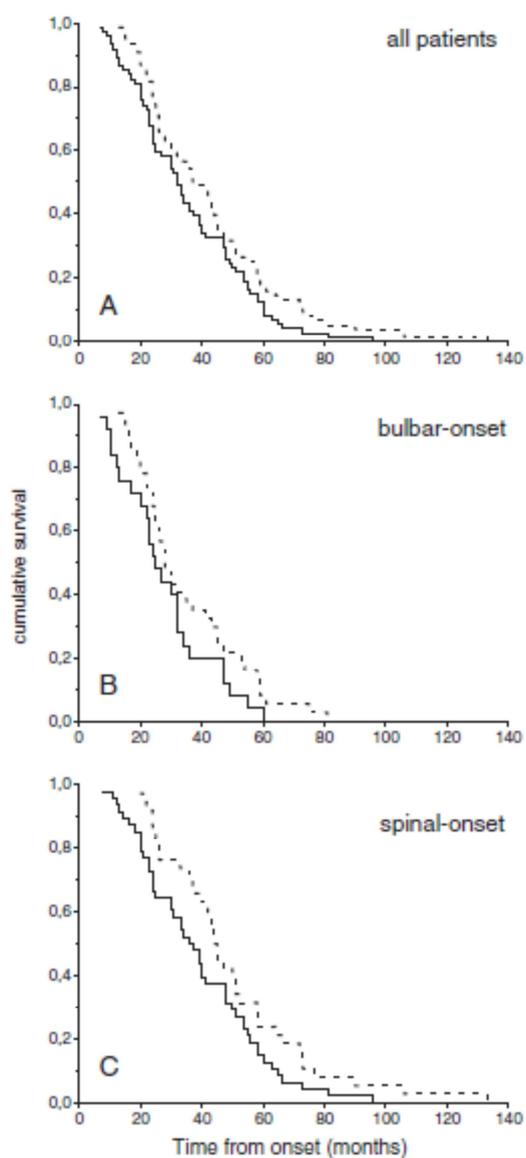


Fig. 1: Curve di sopravvivenza di Kaplan-Meyer sui pazienti SLA disfagici con (linea tratteggiata) e senza (linea continua) la nutrizione enterale per PEG.

A: tutti i pazienti (mediana di sopravvivenza: PEG si 38 mesi, PEG no 32 mesi, $p=0.05$)

B: pazienti bulbari (mediana di sopravvivenza: PEG si 28 mesi, PEG no 25 mesi, $p=0.14$)

C: pazienti spinali (mediana di sopravvivenza: PEG si 44 mesi, PEG no 36 mesi, $p=0.046$)

I risultati dello studio hanno inoltre confermato che la gastrostomia è una procedura sicura, con trascurabile tasso di eventi avversi non letali (emorragie, sepsi). Rispetto a quanto suggerito dalle linee guida internazionali¹³⁹, e in accordo ad alcune serie cliniche in precedenza pubblicate¹⁴⁰, il nostro lavoro suggerisce che l'impianto PEG può essere eseguito senza significative complicanze anche in pazienti con insufficienza respiratoria (Capacità Vitale Forzata [FVC] <50%), sebbene certamente questo richieda una equipe chirurgica esperta in questa procedura endoscopica.

Le prospettive future di questa ricerca mirano a valutare gli effetti del management nutrizionale sulla qualità di vita dei pazienti che, insieme alla sopravvivenza, è un ambito fondamentale di intervento.

VII.III.II La ventilazione invasiva

Studi pubblicati su questo tema nel corso del Dottorato

- a. **Spataro R**, Bono V, Marchese S, La Bella V. TRACHEOSTOMY MECHANICAL VENTILATION IN PATIENTS WITH AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS: CLINICAL FEATURES AND SURVIVAL ANALYSIS. *J Neurol Sci.* 2012 Dec 15;323(1-2):66-70. doi: 10.1016/j.jns.2012.08.011. Epub 2012 Sep 16
- b. **Spataro R**, Marchese S, La Bella V. TRACHEOSTOMY MECHANICAL VENTILATION IN AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS. *J Neurol Sci.* 2013 May 15;328(1-2):103-4. doi: 10.1016/j.jns.2013.01.030. Epub 2013 Feb 18.
- c. **Spataro R**, La Bella V. ETHICAL ISSUES: INVASIVE VENTILATION IN AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS. *BMJ Supportive & Palliative Care* 2012;2:2 85-86

L'insufficienza respiratoria rappresenta uno degli aspetti più complessi del management del paziente affetto da SLA e la più

frequente causa di morte. L'approccio di trattamento dell'insufficienza respiratoria più diffuso nel mondo occidentale è rappresentato dalla ventilazione non invasiva (NIV), che si avvale di un ventilatore meccanico e dell'interfaccia di una maschera. Quando la compromissione della funzione respiratoria è di severità tale da non essere più compensata da questa modalità di trattamento o quando la gestione delle secrezioni mucofaringee non è più adeguata con i mezzi più comuni, si propone al paziente il trattamento di ventilazione invasiva per via tracheostomica (Tracheostomy mechanical ventilation- TMV).

Nel 2012¹⁴¹ la sottoscritta ha coordinato un'analisi retrospettiva sulla coorte di pazienti affetti da SLA che nel periodo 2001-2010 sono stati seguiti presso il Centro di Riferimento per le Malattie dei Motoneuroni di Palermo. La coorte è stata divisa in due gruppi, sulla base dell'aver praticato oppure no il trattamento di TMV. E' stata condotta pertanto una analisi delle caratteristiche cliniche e di sopravvivenza.

Nel periodo considerato, sono stati seguiti presso il Centro, dalla diagnosi fino all'exitus, 279 pazienti affetti da SLA. Di questi, 87 (il 31.3%) si sono sottoposti a TMV. Le informazioni demografiche e cliniche sono state raccolte in un database elettronico. Tutti i pazienti sono stati sottoposti a valutazioni cliniche (neurologiche, respiratorie, funzionali) ogni 3-4 mesi. In particolare, il deficit funzionale è stato valutato mediante la ALS Functional Rating Scale (ALS FRS).

I risultati hanno mostrato che i pazienti che si sottopongono a TMV sono più spesso di sesso maschile, mentre non vi sono significative differenze nell'età e nella sede d'esordio tra i due gruppi.

L'analisi di sopravvivenza ha mostrato che il trattamento di ventilazione invasiva prolunga la malattia oltre a storia naturale, con una differenza nel valore di mediana di sopravvivenza di 16 mesi. La fig. 2 mostra le curve di sopravvivenza dei due gruppi considerati.

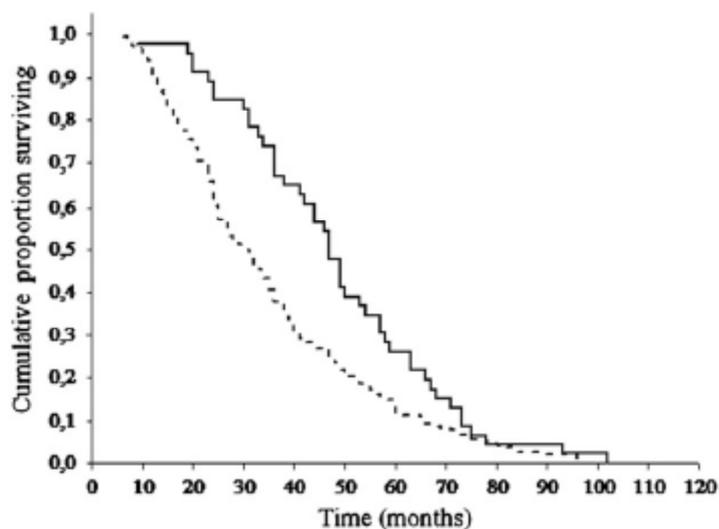


Fig.2 Curve di sopravvivenza di Kaplan-Meier dei pazienti sottoposti a tracheostomia (linea continua, mediana di sopravvivenza 47 mesi) e dei pazienti che non si sono sottoposti a tracheostomia (linea tratteggiata, mediana di sopravvivenza 31 mesi)

Tra i fattori che si correlano ad una più breve sopravvivenza nel paziente con tracheostomia figurano la funzione respiratoria all'epoca dell'intervento e l'età d'esordio più avanzata.

Questo studio trova un intrinseco pregio nella rarità della popolazione considerata. La ventilazione invasiva, infatti, è praticata nei Paesi Occidentali, inclusa l'Italia, nel 2-10% dei casi. Nella nostra coorte il 30% dei pazienti ha intrapreso la TMV, probabilmente per ragioni legate all'effetto nella comunità di caratteristiche peculiari del Centro. Questi valori sono simili a quelli riportati nelle serie retrospettive condotte in paesi culturalmente molto lontani, come il Giappone.

L'analisi di una così ampia coorte di pazienti in trattamento con TMV, ed i dati relativi all'effetto sulla sopravvivenza, hanno motivato una interessante corrispondenza¹⁴² con il Dr. Bach, dell'Università del New Jersey, US, riconosciuto a livello internazionale come uno tra i massimi esperti nella ventilazione non invasiva. Tale confronto ha messo in rilievo come l'accesso e la gestione dei trattamenti della fase avanzata delle malattie neuromuscolari sono influenzati da diversi fattori tra cui possiamo annoverare l'expertise del gruppo medico di riferimento, la accessibilità delle cure più complesse e le caratteristiche culturali della popolazione considerata.

In Italia la ventilazione invasiva presenta degli aspetti etici estremamente complessi¹⁴³, legati alle norme legislative, in materia di consenso alle cure, che prevedono che il paziente possa essere

sottoposto a TMV sia che abbia fornito il proprio consenso sia che il medico lo ritenga un trattamento di necessità in condizioni di pericolo di vita. Dal momento che non è consentita, dalla legge, la sospensione della ventilazione invasiva, la diffusione dell'informazione tra i pazienti ed i caregivers e la promozione delle direttive anticipate rappresentano uno degli obiettivi fondamentali del medico che accompagna il paziente nella fase avanzata di malattia, allo scopo di garantire al paziente la facoltà di aderire ai diversi trattamenti in accordo ai propri valori.

VII.III.III. I disturbi del sonno

Studio pubblicato su questo tema nel corso del Dottorato

Lo Coco D, Mattaliano P, **Spataro R**, Mattaliano A, La Bella V. SLEEP-WAKE DISTURBANCES IN PATIENTS WITH AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2011; 82(8):839-42. Epub 2011 Jan 8.

Questo studio clinico osservazionale ha avuto l'obiettivo di valutare la frequenza, severità e le cause dei disturbi nel sonno in una coorte di 100 pazienti affetti da SLA seguiti presso il Centro di Riferimento Regionale per le malattie dei Motoneuroni di Palermo¹⁴⁴. Il ruolo della sottoscritta nello studio è stato di valutare la presenza di disturbi dell'umore mediante la somministrazione di uno specifico test (Beck Depression Inventory). Tra i risultati più importanti della ricerca, che si è pregiata di assoluta originalità, vi è che la maggioranza dei pazienti con SLA (59%) soffre di una bassa qualità

del sonno notturno, comparsa, il più delle volte, dopo l'esordio della malattia.

La tabella seguente è estratta dal lavoro e rappresenta le caratteristiche cliniche dei pazienti inclusi nello studio, divisi in due gruppi sulla base della qualità del sonno.

Tabella 3 Caratteristiche dei pazienti con sclerosi laterale amiotrofica (SLA) con o senza disturbi del sonno

	Senza problemi ad addormentarsi (n=41)	Con problemi ad addormentarsi (n=59)	Valore p
Età, anni	56.73 ± 10.6	61.98 ± 12.5	NS
Genere, maschio/femmina	24/17	36/23	NS
Durata dei sintomi (mesi)	25.10±17.4	25.02±13.9	NS
Esordio bulbare	11(26.8%)	16(27.1%)	NS
Coinvolgimento bulbare	9.76±2.47	8.29±3.21	NS
Capacità vitale forzata, percentuale del predetto	82.50±20.4	68.19±26.7	NS
Punteggio ALSFRS-rev	36.93±6.9	30.54±9.0	<0.001
Punteggio scala sonnolenza Epworth	5.85±2.1	7.71±3.1	0.002
Punteggio Beck Depression Inventory	7.95±5.4	11.63±6.7	0.003
Pulsosimmetria notturna alterata	13(31.7%)	29(49%)	NS
Uso di ventilazione notturna	5(12,5%)	16(27.1)	NS
Difficoltà ad addormentarsi	2(4.9%)	30(50.8%)	<0.001
Difficoltà a mantenere il sonno	9(22%)	39(66.1%)	<0.001
Sonno non ristoratore	7(17.1%)	22(37.3%)	NS
Russare	11(26.8%)	22(37.3%)	NS
Nicturia	17(41.5%)	37(62.7%)	NS
Disagio posturale	14(34.1%)	38(64.4%)	0.003
Sindrome delle gambe senza riposo	5(12.2%)	17(28.8%)	NS
Crampi muscolari	19(46.3%)	26(44.1%)	NS
Uso di ipnoind	2(18.6%)	11(4.9%)	NS
Uso di antidepressivi	5(12.2%)	6(10.2%)	NS

Tra i fattori che sono stati indicati dai pazienti come maggiormente lesivi della qualità del sonno figurano disturbi correlati strettamente alla malattia, come i crampi muscolari, la difficoltà nei cambiamenti di postura o semplicemente a rigirarsi nel letto.

A sostegno della relazione tra la malattia e la qualità del sonno è anche l'evidenza che i pazienti con più gravi disturbi del sonno sono affetti da una disabilità maggiore, misurata mediante la scala ALS Functional Rating Scale (ALSFRS) e più gravi sintomi depressivi, sebbene tra i due gruppi non vi fosse differenza nel tempo trascorso dall'esordio clinico (in media 25 mesi). E' stato interessante inoltre rilevare che l'indicatore di funzione respiratoria utilizzato, la Capacità Vitale Forzata (FVC), non ha mostrato differenze significative tra i due gruppi, suggerendo che la funzione respiratoria non è il fattore principale nella comparsa e nel peggioramento dei disturbi del sonno nei pazienti SLA. E' opportuno comunque precisare che la Capacità Vitale Forzata non rappresenta un indicatore univoco di funzione respiratoria e che, pertanto, lo studio delle relazioni tra deficit della funzione respiratoria e qualità del sonno nei pazienti SLA richiede l'integrazione di strumenti di valutazione differenti utilizzati in studi di disegno longitudinale.

Il 22 % dei pazienti, inoltre, è stato riconosciuto affetto da Restless Leg Syndrome, un disturbo del sonno che si caratterizza per la necessità, nella posizione supina, di muovere continuamente le gambe. Tale disturbo causa disagio particolarmente nei pazienti con

disabilità ed ha evidente influsso sulla possibilità di iniziare e mantenere il sonno.

Questo studio ha contribuito pertanto alla conoscenza di un aspetto clinico sinora non affrontato dalla letteratura scientifica, i disturbi del sonno nei pazienti SLA, mettendo in evidenza come la disabilità e la crescente sofferenza che il progredire della patologia determina hanno un impatto significativo sulla qualità del sonno dei pazienti. I risultati ottenuti aprono anche alcune prospettive in termini di trattamento dei disturbi che riducono la qualità del sonno, come i crampi, il dolore o la Restless Leg Syndrome.

VII.III.IV. La comunicazione aumentativa alternativa

Studio pubblicato su questo tema nel corso del dottorato

Spataro R, Ciriaco M, Manno C, La Bella V. THE EYE-TRACKING COMPUTER DEVICE FOR COMMUNICATION IN AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS. Acta Neurol Scand. DOI: 10.1111/ane.12214

La sclerosi laterale amiotrofica determina, come sinora esposto, un complesso corteo sintomatologico che riduce progressivamente l'autonomia del paziente anche nei più semplici gesti. Uno degli aspetti a più grave impatto psicologico è rappresentato dalla disartria che, nel progredire, rende il linguaggio del paziente sempre meno comprensibile.

Allo scopo di rendere possibile la comunicazione a questi pazienti che, nella maggior parte dei casi, conservano integre funzioni cognitive, sono disponibili diversi ausili di comunicazione aumentativa alternativa, a grado variabile di complessità tecnologica.

I pazienti che si trovano in una condizione di anartria e tetraplegia, assimilabile alla sindrome "locked-in", conservano soltanto la motilità oculare come unico canale di comunicazione. A questo scopo sono stati recentemente concepiti e gradualmente diffusi nella pratica clinica, i comunicatori a controllo oculare. Si tratta di dispositivi ad altissima tecnologia che consentono, con l'uso dei movimenti oculari, di interfacciarsi con un computer sia per la comunicazione con sintesi vocale sia per attività di lavoro o svago (internet, social network etc).

Nel corso del 2013 la sottoscritta ha condotto uno studio sull'uso e sull'efficacia comunicativa di tali dispositivi ad alta tecnologia tra i pazienti SLA in stato locked-in¹²⁶.

Sono stati reclutati nello studio 30 pazienti in stato locked-in, cui era stato assegnato dalla Regione Sicilia un comunicatore a controllo oculare. I requisiti per la prescrizione medica dell'ausilio erano l'integrità delle funzioni cognitive, della visione e della motilità oculare ed un livello di istruzione adeguato all'uso di strumenti informatici. Ai caregivers dei pazienti arruolati è stata somministrata una intervista telefonica inerente a dati socio-demografici, variabili cliniche ed informazioni inerenti l'uso del

comunicatore. In particolare, è stato richiesto il tempo di utilizzo medio nella giornata ed il tipo di applicazioni preferite. E' stato chiesto infine ai pazienti di valutare l'efficacia nella comunicazione del sistema ad alta tecnologia, comparato ad altri eventuali ausili utilizzati.

I risultati hanno mostrato che i pazienti SLA cui viene prescritto e assegnato un comunicatore a controllo oculare sono mediamente più giovani ed istruiti rispetto alla coorte complessiva di pazienti SLA seguita presso il nostro Centro. Il 70 % di essi praticava ventilazione per via tracheostomica. Dopo un tempo medio di circa un anno dall'istallazione del comunicatore, il 63.4% dei pazienti utilizzava il comunicatore per buona parte della giornata (in media 7 ore), il 23, 3% lo utilizzava molto poco (circa un'ora al giorno), mentre il 13,3% aveva smesso di utilizzare del tutto il comunicatore. Tra i fattori principali che hanno determinato un uso ridotto del comunicatore sono stati riportate le difficoltà posturali e la faticabilità dello sguardo. Parte dei pazienti ha sviluppato un deficit della motilità oculare, che ha reso impossibile la comunicazione anche con strumenti più semplici, come le tavole alfabetiche.

In merito alle applicazioni più utilizzate, è emerso un uso molto diffuso di internet, sia per la navigazione che per lo scambio di e-mail, e dei social network. Queste funzioni si aggiungono a quella più semplice, della comunicazione, che viene spesso mutuata da strumenti elementari, come le citate tavole alfabetiche, che buona parte dei pazienti utilizza per la loro immediatezza.

Lo studio ha messo in evidenza che i dispositivi informatici a controllo oculare rappresentano un importante avanzamento tecnologico che manifesta la sua maggiore utilità sui pazienti più giovani ed istruiti. I risultati hanno confermato l'evidenza di una compromissione dei movimenti oculari in fase avanzata di malattia, che conducono il paziente ad uno stato di completo locked-in. In genere i pazienti raggiungono questo stadio quando la loro sopravvivenza si spinge oltre la storia naturale della malattia, mediante la ventilazione invasiva. Questo aspetto dovrebbe essere esposto nel momento in cui si presenta al paziente la procedura, anche in considerazione del fatto che gli strumenti che potrebbero consentire la comunicazione in queste condizioni sono rappresentati solo dalle interfacce cervello-computer, che in atto sono soltanto di tipo sperimentale.

VII.III.V. Conclusioni

Le ricerche sui diversi aspetti del management della sclerosi laterale amiotrofica sono nate dalla attività clinica presso il Centro SLA di Palermo. L'approccio transdisciplinare che caratterizza il Centro si esprime nella presa in carico globale del paziente, dall'esordio clinico sino alla fase terminale di malattia. Questo implica la cura di aspetti molto diversi tra loro, come gli interventi mirati al trattamento dei sintomi ed al miglioramento della sopravvivenza e gli interventi volti, invece, alla qualità di vita ed al sollievo della sofferenza. Il ruolo del medico, in questo percorso, è di offrire una

comunicazione quanto più possibile efficace ed il coordinamento degli interventi che il paziente giudicherà coerenti con i propri valori esistenziali.

VIII.CONCLUSIONI

Il percorso di questo Corso di Dottorato si è articolato su più filoni di ricerca di tipo clinico e genetico.

L'attività di ricerca condotta è frutto della frequentazione di un Centro di Ricerche sulla SLA di lunga esperienza, che ha seguito negli ultimi quattordici anni buona parte dei pazienti siciliani affetti dalla malattia. Il Centro dispone di una cospicua banca biologica che rende possibili gli studi sulle variabili genetiche e molecolari della malattia. Inoltre, nel corso degli ultimi anni, e con il contributo della sottoscritta, è stato creato un database informatico molto complesso, che raccoglie i dati demografici e clinici dei pazienti e dal quale hanno avuto origine diverse ricerche retrospettive su una ampia coorte di pazienti affetti da SLA.

Rispetto agli studi di tipo epidemiologico ed a quelli sui fattori di rischio genetico della malattia, gli studi di management hanno particolarmente coinvolto la sottoscritta in prima persona, esprimendo in modo peculiare le proprie attitudini cliniche e di ricerca. La gestione transdisciplinare della malattia è l'unico approccio di trattamento della SLA che si rivela efficace nell'epoca attuale e che consente di realizzare una "cura" del paziente in termini di sollievo delle sofferenze e miglioramento della qualità di vita e della sopravvivenza.

Sicuramente di grande interesse sono da considerarsi anche gli studi di tipo genetico condotti, ed in particolare quelli che hanno

riguardato le mutazioni dei geni FUS e C9ORF72, cui mediante il Consorzio Italsgen è stato dato un importante contributo, e del ruolo di ATXN-1 e ATXN-2 come modifier genetico. L'identificazione delle alterazioni geniche che sono fattori di rischio per la malattia ha già fatto luce sulla continuità tra condizioni patologiche sinora nosologicamente distinte, come la SLA la Demenza Frontotemporale e la SLA e le atassie spinocerebellari. Queste scoperte aprono nuovi orizzonti nella conoscenza delle patologie neurodegenerative. Alla scoperta di nuovo geni si accompagna un approfondimento continuo sui meccanismi molecolari che sono sottesi alla patogenicità delle mutazioni geniche e la ricerca di possibili target terapeutici.

Pertanto, seppure nel nostro tempo la neurodegenerazione sia ancora un processo non contrastabile, la ricerca apre continui bagliori di conoscenza che speriamo possano condurci ad una nuova comprensione della malattia.

IX. BIBLIOGRAFIA

1. Spataro R, Lo Re M et al. Causes and place of death in Italian patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neurol. Scand* 2010; 122: 217-23
2. Aran FA. Research on an as yet undescribed disease of the muscular system (progressive muscular atrophy). *Arch. Gen. Med* 1848; 24: 15-35
3. Cruveilhier J. Sur la paralysie musculaire progressive, atrophique. *Bull. Acad. Med* 1852; 18: 490-502, 546-583
4. Charcot JM & Joffroy A. Deux cas d'atrophie musculaire progressive avec lesions de la substance grise et des faisceaux antero-lateraux de la moelle epiniere. *Arch Physiol. Neurol. Pathol.* 1869; 2: 744.
5. Kurland LT & Mulder DW. Epidemiologic investigations of amyotrophic lateral sclerosis. 2. Familial aggregations indicative of dominant inheritance. I. *Neurology* 1955; 5: 182-196
6. Kurland LT & Mulder DW. Epidemiologic investigations of amyotrophic lateral sclerosis. 2 Familial aggregations indicative of dominant inheritance. II. *Neurology* 1955; 5: 249-268
7. Andersen PM, AL Chalabi A. Clinical genetics of amyotrophic lateral sclerosis: what we really know? *Nat. Rev. Neurol.* 2011; 7: 603-615
8. Steele JC & McGeer PL. The ALS/PDC syndrome of Guam and the Cycad hypothesis. *Neurology* 2008; 70: 1984-1990.
9. Kew JJ, Goldstein LH. Et al. The relationship between abnormalities of cognitive function and cerebral activation in amyotrophic lateral sclerosis: A neuropsychological and positron emission tomography study. *Brain* 1993; 116: 1399-1423 doi:10.1093/brain/116.6.1399

10. Brooks BR. El Escorial World Federation of Neurology criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. Subcommittee on Motor Neuron Diseases/Amyotrophic Lateral Sclerosis of the World Federation of Neurology Research Group on Neuromuscular Diseases and the El Escorial "Clinical limits of amyotrophic lateral sclerosis" workshop contributors. *J. Neurol. Sci.* 1994; 124: 96-107
11. Nodera H, Izumi Y et al. New diagnostic criteria of ALS (Awaji criteria) *Brain nerve* 2007; 59: 1023-1029.
12. Roche Jc, Rojas-Garcia R. A proposed staging system for amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 2012; 135: 847-852
13. Huisman MH, de Jong SW Population based epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis using capture-recapture methodology. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 2011; 82: 1165-1170.
14. Wijesekera LC, Mathers S. Natural history and clinical features of the flail arm and the flail leg ALS variants. *Neurology* 2009; 72: 1087-1094
15. Byrne S, Ekamin M et al. Cognitive and clinical characteristics of patients with amyotrophic lateral sclerosis carrying a C9ORF72 repeat expansion: a population-based cohort study. *The Lancet Neurology* 2012; 11 : 232-240
16. Gordon PH, Cheng B. et al. The natural history of primary lateral sclerosis. *Neurology* 2006; 66: 647-653.
17. Van den Berg-vos RM, Visser J. et al. A long-term prospective study of the natural course of sporadic adult-onset lower motor neuron syndromes. *Arch. Neurol.* 2009; 66: 751-757.
18. Neumann M, Sampathu DM et al. Ubiquitinated TDP-43 in Frontotemporal Lobar Degeneration and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Science* 2006; 314: 1205-1208

19. Kwiatkowski TJ Jr, Bosco DA et al. Mutations in the FUS/TLS Gene on Chromosome 16 Cause Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Science* 2009; 323: 1205-1208
20. Wittie M, Nelson LM et al. Utility of capture-recapture methodology to assess completeness of amyotrophic lateral sclerosis case ascertainment. *Neuroepidemiology* 2013; 40: 133-141
21. Manjaly ZR, Scott KM et al. The sex ratio in amyotrophic lateral sclerosis: a population based study. *Amyotroph. Lateral Scler.* 2010; 11: 439-442.
22. Johnston CA, Stanton BR et al. Amyotrophic lateral sclerosis in an urban setting: a population based study of inner city London. *J Neurol.* 2006; 253: 1642-1643
23. Gordon PH, Mehal JM. Er al. Incidence of Amyotrophic Lateral Sclerosis among American Indians and Alaska natives. *JAMA Neurol.* 2013; 70: 476-480.
24. Kenna KP, McLaughlin RL et al. Delineating the genetic heterogeneity of ALS using targeted high-throughput sequencing. *J. Med. Genet.* doi:10.1136/jmedgenet-2013-101795
25. Jang JH, Kwon MJ et al. Analysis of the C9orf72 hexanucleotide repeat expansion in Korean patients with familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiology of Aging* 2013; 34: 1311.e7-1311.e9
26. Gil J, Vazquez MC et al. Prognosis of ALS: Comparing data from the Limousin referral centre, France, and a Uruguayan population. *Amyotrophic Lateral Sclerosis Jan 2009, Vol. 10, No. 5-6: 355-360*
27. Alonso V, Villaverde Hueso A et al. Increase in moto neuron disease mortality in Spain: temporal and geographic analysis (1990-2005). *Amyotrophic Lateral Sclerosis* 2011; 12: 192-198

28. Mehal JM, Holman RC et al. Amyotrophic Lateral Sclerosis/Motor Neuron Disease deaths in the United States, 1999-2009. *Amyotroph. Lateral Scler. Frontotemporal Degener* 2013; 14: 346-352.
29. Zaldivar T., Montejo A et al. Reduced frequency of ALS in an ethnically mixed population: a population-based mortality study. *Neurology* 2009; 72: 1640-1645.
30. Fong GC, Cheng TS. Et al. An epidemiologic study of motor neuron disease in Hong Kong. *Amyotroph. Lateral Scler. Other Motor Neuron Disord.* 2005; 6: 164-168.
31. Cronin S., Hardiman O. et al. Ethnic variation in the incidence of ALS: a systematic review. *Neurology* 2007; 68: 1002-1007.
32. Koerner DR. Amyotrophic Lateral Sclerosis on Guam. *Ann. Intern. Med.* 1952; 37: 1204-1220
33. Bradley WG & Mash DC. Beyond Guam: the cyanobacteria/BMAA hypothesis of the cause of ALS and other neurodegenerative diseases. *Amyotroph. Lateral Scler.* 2009; 10: 7-20
34. Ishiura H, Takahashi Y et al. C9ORF72 repeat expansion in amyotrophic lateral sclerosis in the Kii peninsula of Japan. *Arch. Neurol.* 2012; 69: 1154-1158.
35. Phukan J, Elamin M. The syndrome of cognitive impairment in amyotrophic lateral sclerosis: a population-based study. *J Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 2012; 83: 102-108
36. Byrne S, Heverin M et al. Aggregation of neurologic and neuropsychiatric disease in ALS kindreds: a population-based case controlled cohort study of familial and sporadic ALS. *Ann. Neurol.*, DOI: 10.1002/ana.23969
37. Scarmeas N, Shih T et al. Premorbid weight, body mass, and varsity athletics in ALS. *Neurology* 2002; 59: 773-775

38. Huisman MH, Seelen M et al. Lifetime physical activity and the risk of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 2013; 84: 976-981.
39. Eisen A, Kim S et al. Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS): a phylogenetic disease of the corticomotoneuron? *Muscle Nerve* 1992; 15: 219-224.
40. Turner MR, Wicks P et al. Concordance between site of onset and limb dominance in amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 2011; 82: 853-854.
41. Vivekananda U, Manjalay ZR et al. Low index-to-ring finger length ratio in sporadic ALS supports prenatally defined motor neuronal vulnerability. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 2011
42. De Jong SW, Huisman MH et al. Smoking, alcohol consumption, and the risk of amyotrophic lateral sclerosis: a population-based study. *Am J. Epidemiol.* 2012; 176: 233-239
43. Sutedja NA, van der Schouw YT et al. Beneficial vascular risk profile is associated with amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 2011; 82: 638-642.
44. Gallo V, Wark PA et al. Prediagnostic body fat and risk of death from amyotrophic lateral sclerosis: the EPIC cohort. *Neurology* 2013; 80: 829-838.
45. Beretta S, Carri M et al. The sinister side of Italian soccer. *Lancet Neurol.* 2003; 2: 656-657
46. Chiò A, Benzi G et al. Severely increased risk of amyotrophic lateral sclerosis among Italian Professional football players. *Brain* 2005; 128: 472-476.
47. Armon C. Sports and trauma in amyotrophic lateral sclerosis revisited. *J. Neurol. Sci.* 2007; 262: 45-53.

48. Wicks P, Ganesalingham J et al. Three soccer playing friends with simultaneous amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph. Lateral Scler.* 2007; 8: 177-179
49. Armon C et al. Smoking may be considered an established risk factor for sporadic ALS. *Neurology* 2009; 73: 1693-1698
50. Alonso A, Logroschino G et al. Association of smoking with amyotrophic lateral sclerosis risk and survival in men and women: a prospective study. *BMC Neurol.* 2010; 10: 6
51. Sutedja NA, Fischer K et al. What we really know about occupation as a risk factor for ALS: a critical and systematic review. *Amyotrophic Lateral Scler.* 2009; 10: 295-301.
52. Sutedja NA, Veldnik JK et al. Exposure to chemicals and metals and risk of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review. *Amyotroph. Lateral Scler.* 2009; 10: 302-309
53. Coffman CJ, Horner RD et al. Estimating the occurrence of amyotrophic lateral sclerosis among Gulf War (1990-1991) veterans using capture-recapture methods. *Neuroepidemiology* 2005; 24: 141-150.
54. Horner RD, Kamins KG et al. Occurrence of amyotrophic lateral sclerosis among Gulf War veterans. *Neurology* 2003; 61: 742-749.
55. Department of Veterans Affairs. Presumption of service connection for amyotrophic lateral sclerosis. Final Rule. *Fed. Reg.* 2009; 74: 57072-57074
56. Weisskopf MG, O'Reilly EJ et al. Prospective study of military service and mortality from ALS. *Neurology* 2005; 64: 32-37.
57. Abhinav K, Al-Chalabi A et al. Electrical injury and amyotrophic lateral sclerosis: a systemic review of the literature. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 2007; 78: 450-453.

58. Snow J. The cholera near Golden square, and at Deptford. The John Snow Archive and Research Companion [online], <http://johnsnow.matrix.msu.edu/work.php?id=15-78-45> (1854)
59. Sabel CE, Boyle PJ et al. Spatial clustering of amyotrophic laterale sclerosis in Finland at place of birth and place of death. *Am. J. Epidemiol.* 2003; 157: 898-905
60. Veiga-Cabo J, Almazan-Isla et al. Differential features of motor neuron disease mortality in Spain. *Int. J. Epidemiol.* 1997; 26: 1024-1032
61. Scott KM, Abhinav K et al. Geographical clustering of amyotrophic lateral sclerosis in South-East England: a population study. *Neuroepidemiology* 2009; 32: 81-88.
62. Turabelidze G, Zhu BP et al. An epidemiologic investigation of amyotrophic lateral sclerosis in Jefferson County, Missouri, 1998-2002. *Neurotoxicology* 2008; 29: 81-86.
63. Uccelli R, Binazzi A et al. Geographic distribution of amyotrophic lateral sclerosis through motor neuron disease mortality data. *Eur. J. Epidemiol.* 2007; 22: 781-790.
64. Doy Y, Yokoyama T et al. Temporal trends and geographic clusters of mortality from amyotrophic lateral sclerosis in Japan, 1995-2004. *J. Neurol. Sci.* 2010; 298:78-84.
65. Cox PA, Banack SA et al. Biomagnification of cyanobacteria neurotoxins and neurodegenerative disease among the Chamorro people of Guam. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2003; 100: 13380-13383
66. Bienfang PK, Defelice Sv et al. Prominent human health impacts from several marine microbes: history, ecology, and public health implications. *Int. J. Microbiol.* 2011; 2011: 152815
67. Turner MR, Hardiman O et al. Controversies and priorities in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet Neurol* 2013; 12: 310-22

68. Maruyama H, Morino H et al. Mutations of optineurin in amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 2010; 465: 223-26.
69. Gurney ME. The use of transgenic mouse models of amyotrophic lateral sclerosis in preclinical drug studies. *J. Neurol. Sci* 1997; 152: S67-S73.
70. Massimalany C, Gangaplara A et al. Copper-zinc superoxide dismutase-deficient mice show increased susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis induced with myelin oligodendrocyte glycoprotein 35-55. *J. Neuroimmunol* 2013; 256: 19-27.
71. Hadano S, Hand CK et al. A gene encoding a putative GTPase regulator is mutated in familial amyotrophic lateral sclerosis 2. *Nature Genet* 2001; 29: 166-173
72. Chance PF, Rabin BA et al. Linkage of the gene for an autosomal dominant form of juvenile amyotrophic lateral sclerosis to chromosome 9q34. *Am J. Hum. Genet.* 1998; 62: 633-40
73. Hentati A, Ouahchi K et al. Linkage of a commoner form of recessive amyotrophic lateral sclerosis to chromosome 15q15-q22 markers. *Neurogenetics* 1998; 2: 55-60.
74. Stevanin G, Santorelli FM et al. Mutations in SPG11, encoding spatascin, are a major cause of spastic paraplegia with thin corpus callosum. *Nat. genet.* 2007; 39: 366-372.
75. Sapp PC, Hosler BA et al. Identification of two novel loci for dominantly inherited familial amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Hum Genet* 2003; 73: 397-403.
76. Lanson NA Jr, Pandey UB. FUS-related proteinopathies: lessons from animal models. *Brain Res* 2012; 1462: 3-15.

77. Haung C, Zhou H et al. FUS transgenic rats develop the phenotypes of amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal lobar degeneration. *Plos Genet* 2011; 7: e100.
78. Nishimura AL, Mitne-Neto M et al. A mutation in the vesicle trafficking protein VAPB causes late-onset spinal muscular atrophy and amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Hum Genet.* 2004; 75: 822-831.
79. Greenway MJ, Alexander MD et al. A novel candidate region for ALS on chromosome 14q11.2. *Neurology* 2004; 63: 1936-38
80. Corrado L, Battistini S et al. Variations in the coding and regulatory sequences of the angiogenin (ANG) gene are not associated to ALS (amyotrophic lateral sclerosis) in the Italian population. *J Neurol Sci.* 2007; 258: 123-7.
81. Padhi AK, Kumar H et al. Mechanism of loss of functions of human angiogenin variants implicated in amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One* 2012; 7: e32479.
82. Sreedharan J, Blair IP et al. TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 2008; 319: 1668-72
83. Da Cruz S, Cleveland DW. Understanding the role of TDP-43 and FUS/TLS in ALS and beyond. *Curr Opin Neurobiol* 2011; 21: 904-19.
84. Buratti E, Baralle FE. The multiple roles of TDP-43 in pre-RNA processing and gene expression regulation. *RNA Biol* 2010; 7: 420-9
85. Johnson JO, Mandrioli J et al. Exome sequencing reveals VCP mutations as a cause of familial ALS. *Neuron* 2010; 66: 857-864
86. Daoud H, Rouleau GA. Motr neuron disease: a role for ubiquilin 2 mutations in neurodegeneration. *Nat Rev Neurol* 2011; 7: 599-600

87. Hosler BA, Siddique T et al. Linkage of familial amyotrophic lateral sclerosis with frontotemporal dementia to chromosome 9q21-q22- *JAMA* 2000; 284: 1664-9.
88. De Jesus-Hernandez M, Mackenzie IR et al. Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron* 2011; 72: 245-56.
89. Synofzik M, Ronchi D et al. Mutant superoxide dismutase-1 indistinguishable from wild-type causes ALS. *Hum Mol Genet* 2012; 21: 3568-74
90. Munch C, O'Brien J et al. Prion-like propagation of mutant superoxide dismutase-1 misfolding in neuronal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108: 3548-53
91. Kabashi E, Valdmanis PN et al. TARDBP mutations in individuals with sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet* 2008; 40: 572-574
92. Ling SC, Albuquerque CP et al. ALS-associated mutations in TDP-43 increase its stability and promote TDP-43 complexes with FUS/TLS. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107: 13318-23
93. Nonaka T, Masuda-Suzukake M et al. Prion-like properties of pathological TDP43 aggregates from diseased brains. *Cell Rep* 2013; 4: 124-34
94. Couthouis J, Hart MP et al. A yeast functional screen predicts new candidate ALS disease genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108: 20881-90
95. Mori K, Lammich S et al. hnRNP A3 binds to GGGGCC repeats and is a constituent of p62-positive/TDP43-negative inclusions in the hippocampus of patients with C9ORF72 mutations. *Acta Neuropathol* 2013; 125: 413-23
96. Mori K, Weng SM et al. The C9orf72 GGGGCC repeat is translated into aggregating dipeptide-repeat proteins in FTLN/ALS. *Science* 2013; 339: 1335-8

97. Fischer LR, Culver DG et al. Amyotrophic lateral sclerosis is a distal axonopathy: evidence in mice and man. *Exp Neurol* 2004; 185: 232-40
98. Okamoto K, Hirai S et al. Axonal swellings in the corticospinal tracts in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropath* 1990; 80: 222-6
99. Wu CH, Fallini C et al. Mutations in the profilin 1 gene cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 2012; 488: 499-503
100. De Vos KJ, Chapman AL et al. Familial amyotrophic lateral sclerosis-linked SOD1 mutants perturb fast axonal transport to reduce axonal mitochondria content. *Hum Mol Genet* 2007; 16: 2720-8
101. Yamanaka K, Boilee S et al. Mutant SOD1 in cell types other than motor neurons and oligodendrocytes accelerates onset of disease in ALS mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 7594-9
102. Tong J, Huang C et al. Expression of ALS-linked TDP-43 mutant in astrocytes causes non-cell-autonomous motor neuron death in rats. *EMBO J* 2013; 32: 1917-26
103. Lee Y, Morrison BJ et al. Oligodendroglia metabolically support axons and contribute to neurodegeneration. *Nature* 2012; 487: 443-8
104. Miller RG, Mitchell JD et al. Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/motor neuron disease (MND). *Cochrane Database Syst Rev* 2012; 3: CD001447
105. Cellura E, Spataro R. et al. Factors affecting the diagnostic delay in amyotrophic lateral sclerosis. *Clinical Neurology and Neurosurgery* 2011; 114(6):550-4. *Epub* 2011 Dec 14

106. Ragonese P, Cellura E, et al. .Incidence of amyotrophic lateral sclerosis in Sicily: a population based study. *Amyotrophic Lateral Sclerosis*, 2012; 13: 284–287
107. Kwiatkowski TR Jr, Bosco DA et al. Mutations in FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 2009; 323: 1205-1208
108. Vance C, Rogelj B et al. Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6. *Science* 2009; 323: 1208-1211.
109. Neumann M, Roeber S et al. Abundant FUS-immunoreactive pathology in neuronal intermediate filament inclusion disease. *Acta Neuropathol.* 2009; 118: 605-616.
110. deJesus-Hernandez M, Kocerha J et al. De novo truncating FUS gene mutation as a cause of sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Hum. Mutat.* 2010; 31: E1377-E1389.
111. Chiò A, Restagno G et al. Two Italian kindreds with familial amyotrophic lateral sclerosis due to FUS mutation. *Neurobiology of Aging* 2009; 30: 1272-1275
112. Lai SL, Abramzon Y et al. FUS mutations in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiology of Aging* 2011;32:550.e1-4
113. Traynor BJ & Singleton AB. What's the FUS! *Lancet Neurol.* 2009; 8: 418-419
114. Hewitt C, Kirby J et al. Novel FUS/TLS mutations and pathology in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Arch. Neurol.* 2010; 67: 455-461.
115. Sproviero W, La Bella V et al. FUS mutations in sporadic amyotrophic lateral sclerosis: clinical and genetic analysis. *Neurobiology of aging* 2012; 33: 837 e1-5

116. Brooks BR, Swash M et al. World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases. El Escorial Revisited: revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotrophic Lateral Scler. Other Mot. Neuron. Disord.* 2000; 1: 293-299
117. Yan J, Deng HX et al. Frameshift and novel mutations in FUS in familial amyotrophic lateral sclerosis and ALS/dementia. *Neurology* 2010; 75: 807-814.
118. Choi M, Scholl UI et al. Genetic diagnosis by whole exome capture and massively parallel DNA sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2009; 106: 19096-19101
119. Watts GD, Wymer J et al. Inclusion body myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia is caused by mutant valosin-containing protein. *Nat. Genet.* 2004; 36: 377-381.
120. Ju JS, Weihl CC. Inclusion body myopathy, Paget's disease of the bone and fronto-temporal dementia: a disorder of autophagy. *Hum Mol. Genet.* 2010; 19: R38-R45
121. Custer SK, Neumann M et al. Transgenic mice expressing mutant forms VCP/p97 recapitulate the full spectrum of IBMPFD including degeneration in muscle, brain and bone. *Hum Mol. Genet.* 2010; 19: 1741-1755.
122. Boxer AL, Mackenzie IR et al. Clinical, neuroimaging and neuropathological features of a new chromosome 9p-linked FTD-ALS family. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 2011; 82: 196-203.
123. Renton AE, Majounie E et al. A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-Linked ALS-FTD. *Neuron* 2011; 72: 1-12.
124. Grace J, Malloy P. Frontal Systems Behavioural Scale (FrSBe): Professional Manual. *Lutz, Fla: Psychological Assessment Resources, 2001.*

125. Machuca-Tzili L, Brook D et al. Clinical and molecular aspects of the myotonic dystrophies: a review. *Muscle Nerve* 2005; 32: 1-18.
126. Geser F, Martinez-Lage M et al. Clinical and pathological continuum of multisystem TDP-43 proteinopathies. *Arch. Neurol* 2009; 66: 180-9
127. Sabatelli M, Conforti FL et al. C9ORF72 hexanucleotide repeat expansions in the Italian sporadic ALS population. *Neurobiology of Aging* 2012; 33: 1848 e-15-e20
128. Chiò A, Borghero G et al. Large proportion of amyotrophic lateral sclerosis cases in Sardinia due to a single founder mutation of the TARDBP gene. *Arch Neurol* 2011; 68: 594-8
129. Mok K, Traynor BJ et al. Chromosome 9 ALS and FTD locus is probably derived from a single founder. *Neurobiology of Aging* 2012; 33: 209 e3-8.
130. Elden AC, Kim H-J et al. Ataxin-2 intermediate length polyglutamine expansions are associated with increased risk for ALS. *Nature* 2010; 466: 1069-75
131. Van Damme P, Veldink JH et al. Expanded CAG repeat size in ALS identifies genetic overlap between ALS and SCA2. *Neurology* 2011; 76: 2066-72
132. Ross OA, Rutherford NJ et al. Ataxin-2 repeat-length variation and neurodegeneration. *Hum Mol Genet* 2011; 20: 3207-12
133. Conforti FL, Spataro R, et al. Ataxin-1 and ataxin-2 intermediate-length poly-q expansions in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 2012 doi: 10.1212/WNL.0b013e318278b618
134. Lagier-Tourenne C, Cleveland DW. An expansion in ALS genetics. *Nature* 2010; 466: 1052-3

135. Goldfarb LG, Vasconcelos O et al. Unstable Triplet Repeat and Phenotypic Variability of Spinocerebellar ataxia Type 1. *Annals Neurol* 1996; **39**:500-506.
136. Nanetti L, Fancellu R et al. Rare association of motor neuron disease and spinocerebellar ataxia type 2 (SCA2): a new case and review of the literature. *J Neurol* 2009; 256: 1926-1928
137. Spataro R, Ficano L et al. Percutaneous endoscopic gastrostomy in amyotrophic lateral sclerosis: effect on survival. *Journal of Neurological Sciences* 2011. 304: 44-48.
138. Stavroulakis T, O Baird W et al. Factors influencing decision-making in relation to timing of gastrostomy insertion in patients with motor neuron disease. *BMJ Support Palliat Care* doi:10.1136/bmjspcare-2013-000497
139. Miller RG, Jackson CE et al. Practice parameter update: the care of the patient with amyotrophic lateral sclerosis: drug, nutritional, and respiratory therapies (an evidence-based review). *Neurology* 2009; 73: 1218-26.
140. Gregory S, Siderowf A et al. Gastrostomy insertion in ALS patients with low vital capacity: respiratory support and survival. *Neurology* 2002; 58: 485-7
141. Spataro R, Bono V, Marchese S, La Bella V. Tracheostomy mechanical ventilation in patients with amyotrophic lateral sclerosis: clinical features and survival analysis. *J Neurol Sci.* 2012 Dec 15;323(1-2):66-70. doi: 10.1016/j.jns.2012.08.011. Epub 2012 Sep 16
142. Spataro R, Marchese S, La Bella V. Tracheostomy mechanical ventilation in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci.* 2013 May 15;328(1-2):103-4. doi: 10.1016/j.jns.2013.01.030. Epub 2013 Feb 18.
143. Spataro R, La Bella V. Ethical issues: invasive ventilation in amyotrophic lateral sclerosis. *BMJ Supportive & Palliative Care* 2012;2:2 85-86.

144. Lo Coco D, Mattaliano P, Spataro R, Mattaliano A, La Bella V. Sleep-wake disturbances in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2011; 82(8):839-42. Epub 2011 Jan 8.