



A.D. MDLXII

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE BIOMEDICHE

Direttore della Scuola: Prof. Andrea Fausto Piana

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

XXVIII CICLO

Studio genetico della sclerosi laterale amiotrofica in Sardegna

Direttore:

Prof. Andrea Fausto Piana

Tutor:

Prof.ssa Maura Pugliatti

Tesi di Dottorato di:

Dott.ssa Leslie D. Parish

Anno Accademico 2014-2015

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

Indice

Introduzione	3
Malattie del motoneurone: definizione e classificazione	3
Sclerosi laterale amiotrofica	6
Definizione	6
Quadro clinico	8
Classificazione fenotipica.....	8
Decorso.....	15
Caratteristiche atipiche e interessamento sistemico	15
Demenza frontotemporale	16
Eziopatogenesi.....	17
Fattori di rischio	24
Neuropatologia	25
Diagnosi della SLA	26
Criteri di diagnosi di SLA (di El Escorial e di Airlie House)	30
Terapia.....	32
Prognosi.....	33
Epidemiologia	34
Obiettivi dello studio.....	35
Metodi	36
Pazienti.....	36
Controlli.....	37
Raccolta dei dati.....	37
Screening delle mutazioni	38
Analisi dell'aplotipo.....	38
Analisi statistica	38
Aspetti etici	39
Risultati.....	40
Mutazioni genetiche nei pazienti	40
Mutazioni genetiche nei controlli	41
Analisi dell'aplotipo.....	41
Distribuzione geografica dei pazienti portatori di mutazioni.....	42
Caratteristiche cliniche dei pazienti.....	42
Discussione.....	44
Conclusioni	48
Bibliografia	49
Ringraziamenti.....	56

Introduzione

Malattie del motoneurone: definizione e classificazione

Le malattie del motoneurone costituiscono un gruppo eterogeneo di patologie neurodegenerative caratterizzate dalla progressiva degenerazione dei motoneuroni del midollo spinale, del tronco encefalico e della corteccia motoria, che si manifestano con quadri clinici differenti, in relazione ai distretti colpiti o alle varie combinazioni di essi.

I termini “Malattia del Motoneurone” e “Sclerosi Laterale Amiotrofica” (SLA) sono spesso utilizzati indistintamente, il primo soprattutto nel Regno Unito e il secondo nell’Europa continentale e nel Nord America.¹

MALATTIE DEL MOTONEURONE DELL’ADULTO

Malattie del primo e secondo motoneurone

Sclerosi Laterale Amiotrofica

- ◆ SLA classica “di Charcot”
- ◆ Variante emiplegica di Mills
- ◆ Flail arm syndrome (variante prossimale di Vulpian – Bernard)
- ◆ Variante pseudopolinevritica (forma di Patrikios)
- ◆ SLA associata a Demenza frontotemporale

Paralisi Bulbare Progressiva

Malattie del secondo motoneurone

Atrofia Muscolare Progressiva

Malattie del primo motoneurone

Sclerosi Laterale Primaria

La definizione di malattia del motoneurone fu introdotta da Lord Russell Brain per raggruppare tutte quelle patologie accomunate dalla degenerazione dei motoneuroni.^{2;3}

A seconda che sia coinvolto il primo, il secondo motoneurone o entrambi si osservano diverse malattie che confluiscono in uno spettro ampio ed eterogeneo di entità cliniche e patologiche, sporadiche e familiari (fig. 1).

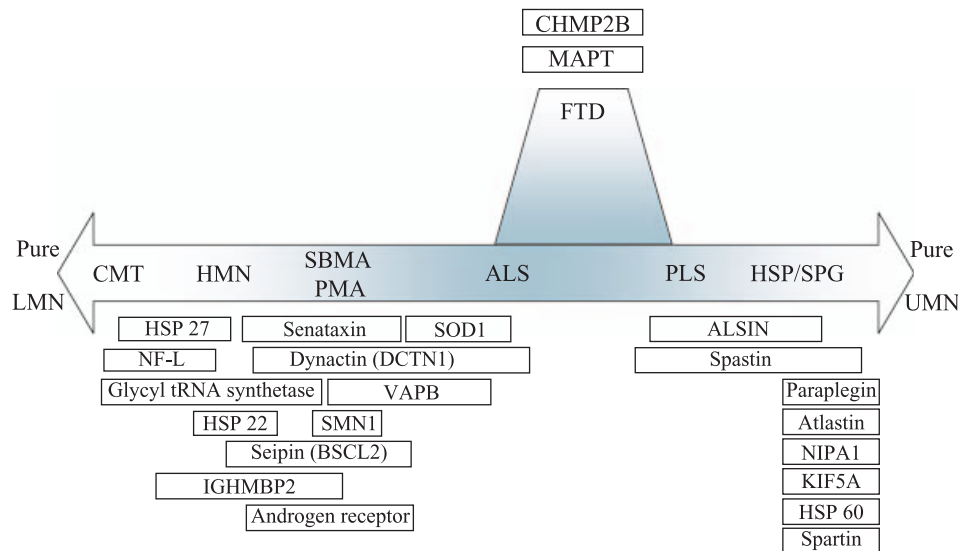


Figura 1 Spettro clinico delle malattie del motoneurone, neuropatie motorie e demenze frontotemporali. A sinistra, le sindromi caratterizzate da compromissione del secondo motoneurone e/o dell'assone motorio periferico; a destra, le sindromi che coinvolgono il primo motoneurone e/o il tratto corticospinale e corticobulbare. Al di sotto della barra sono illustrate alcune mutazioni dei geni associati alle malattie del motoneurone o alle neuropatie. Le mutazioni più recenti sono indicate nel testo. CMT, Charcot-Marie-Tooth; HMN, Neuropatie motorie distali ereditarie; SBMA, atrofia muscolare spino-bulbare; PMA, atrofie muscolari spinali progressive; PLS, sclerosi laterale primaria; HSP, paraplegie spastiche ereditarie. Da Andersen et al., 2007.

È ipotizzato che tutte queste patologie rappresentino la manifestazione sindromica di una cascata patogenetica simile, il cui fenotipo clinico dipende dai distretti anatomicamente colpiti in ciascun individuo. Infatti, lo stress ossidativo, l'abnorme neurotrasmissione glutamatergica nella SLA e la presenza di anomali aggregati proteici intracellulari (inclusioni *skein-like* ubiquitinate, corpi di Bunina, conglomerati ialini) hanno un ruolo fondamentale nella patogenesi di queste sindromi e sono stati uno degli elementi per ritenere che esistessero significative somiglianze fra loro.

I fattori che predispongono l'individuo allo sviluppo di una determinata forma appartenente allo spettro clinico delle malattie del motoneurone non sono del tutto noti, ma necessitano di una componente di suscettibilità genetica.

La sclerosi laterale primaria e l'atrofia muscolare progressiva, caratterizzate dalla compromissione del primo e del secondo motoneurone rispettivamente, sono considerate varianti fenotipiche della SLA e, durante riscontri autoptici, sono state individuate alterazioni sia del primo che del secondo motoneurone.⁴

Sclerosi laterale amiotrofica

Definizione

Tra le malattie del motoneurone quella più conosciuta e frequente è la sclerosi laterale amiotrofica (SLA). A essa, tuttavia, ci si riferisce talora impropriamente per indicare anche le altre patologie del motoneurone.

La SLA è una patologia neurodegenerativa rara, dall'eziologia sconosciuta, caratterizzata da paralisi muscolare progressiva causata dalla continua e inesorabile degenerazione dei motoneuroni del quinto strato della corteccia motoria, del tronco encefalico e del midollo spinale (fig. 2). Il termine "amiotrofica" descrive la tipica atrofia muscolare causata dalla denervazione delle fibre muscolari che deriva dalla degenerazione delle cellule delle corna anteriori del midollo spinale.

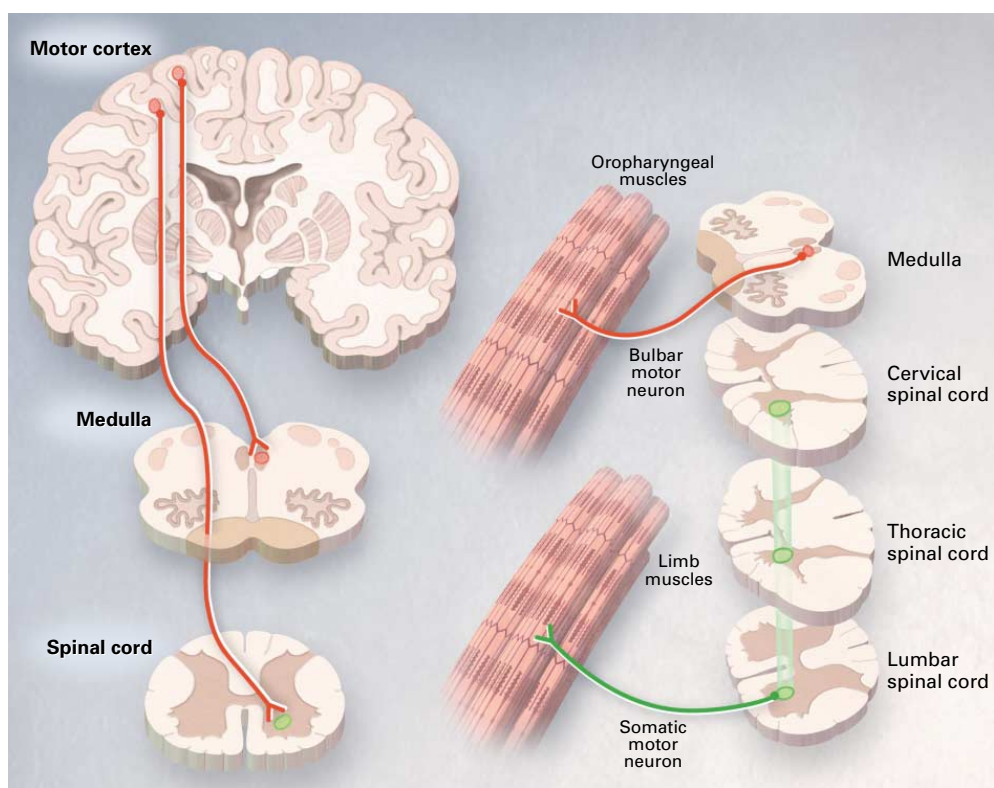


Figura 2 Motoneuroni selettivamente colpiti nella SLA. Da Rowland and Shneider, 2001.

I termini “sclerosi laterale” sono stati utilizzati per descrivere la durezza alla palpazione delle colonne laterali del midollo spinale al riscontro autoptico, causata dalla gliosi nelle zone di degenerazione.

Il concetto di SLA risale a oltre 100 anni fa quando Jean Martin Charcot (1825-1893), presso l’Hôpital de la Salpêtrière a Parigi, distinse per primo la SLA dal gruppo eterogeneo delle atrofie muscolari spinali. Fra il 1872 e il 1874, nella sua opera *Leçons sur les maladies du système nerveux*, descrisse magistralmente le caratteristiche cliniche e anatomopatologiche della patologia che porta il suo nome (*Maladie de Charcot*).⁵

La forma tipica di SLA si manifesta generalmente con riduzione del trofismo muscolare, ipostenia e spasticità dei muscoli delle regioni bulbare, cervicale, toracica, lombosacrale. L’esordio, spesso subdolo, con sintomi che frequentemente sono sottovalutati e ignorati, è generalmente segmentario prima di diffondersi e portare al decesso per insufficienza respiratoria che avviene in media da 3 a 5 anni dopo l’esordio.^{4;6;7}

Sempre descritta come una patologia progressiva che colpisce il sistema motorio a tutti i livelli, coinvolge anche altri distretti del sistema nervoso centrale, come è stato riportato dai rilievi post mortem. Può essere presente una sovrapposizione con altre patologie neurodegenerative e alcuni pazienti presentano associazione con la demenza frontotemporale.⁸

L’ampia variabilità delle manifestazioni cliniche, associata all’assenza di un marcatore biologico diagnostico, rende difficoltosa una diagnosi di certezza.

Quadro clinico

Le caratteristiche cliniche della SLA sono molto eterogenee e variano in funzione della prevalenza e della distribuzione topografica della compromissione del primo e del secondo motoneurone.

I distretti in cui si possono manifestare i sintomi sono quattro: bulbare; cervicale; toracico (raramente preso in considerazione nella pratica clinica di routine, tranne che per l'elettromiografia della muscolatura paraspinale); lombare (tab. 1).

Distretto	Segni di PMN	Segni di SMN Ipostenia Atrofia Fascicolazioni
Bulbare	Riflesso masseterino vivace Clono della mandibola Ipertono spastico Riflesso faringeo ipereccitabile Riflesso del muso Caratteristiche pseudobulbari	Faccia Palato Lingua Laringe Mandibola
Cervicale	Riflessi propriocettivi vivaci arti superiori Ipertono spastico arti superiori Riflessi presenti nell'arto ipostenico Segno di Hoffman, segno di Tromner	Collo Mano Braccio Diaframma
Toracico	Riflessi addominali superficiali assenti Riflessi propriocettivi vivaci Ipertono spastico	Dorso Addome
Lombare	Riflessi propriocettivi vivaci arti inferiori Ipertono spastico arti inferiori Riflessi presenti nell'arto ipostenico Segno di Babinski	Dorso Addome Gamba Piede

Tabella 1 Segni di primo (PMN) e secondo motoneurone (SMN) suddivisi per distretti.

Classificazione fenotipica

Negli ultimi anni sono stati definiti otto fenotipi clinici di SLA:⁹

- Classico
- Bulbare
- Flail arm

- Flail leg
- Piramidale
- Respiratorio
- Atrofia muscolare progressiva
- Sclerosi laterale primaria

FENOTIPO CLASSICO

È una forma di frequente riscontro, definita anche “di Charcot”, che esordisce con una sintomatologia agli arti superiori o agli arti inferiori, con segni piramidali chiari, anche se non predominanti.

ARTI SUPERIORI

I sintomi agli arti superiori possono essere sia bilaterali sia unilaterali e solitamente sono asimmetrici.

I pazienti con esordio all’arto superiore spesso riferiscono una debolezza a carico della mano, con impaccio nei movimenti fini delle dita, avvertendo difficoltà per semplici compiti che richiedono destrezza manuale, come allacciare le scarpe, abbottonare i vestiti, scrivere o girare la chiave nella serratura, accompagnata da ipotrofia dei muscoli intrinseci della mano.

I muscoli flessori dell’avambraccio sono colpiti più tardivamente degli estensori e questo causa un tipico atteggiamento di “mano ad artiglio” (fig. 3).

Un’ipostenia prossimale si può presentare, invece, con difficoltà nei compiti associati con l’abduzione e l’elevazione delle spalle, ad esempio lavarsi i capelli, spazzolarsi, pettinarsi.

Oltre ai segni di secondo motoneurone sono presenti anche segni di degenerazione del primo motoneurone. Possono essere così presenti il segno di Hoffmann, indicativo di una sofferenza delle vie piramidali e spesso presente nelle fasi precoci, e riflessi propriocettivi vivaci.^{2;8}

ARTI INFERIORI

Nei pazienti con esordio a livello dell'arto inferiore i sintomi frequenti sono i crampi muscolari e l'impaccio nella deambulazione, con difficoltà nel salire o scendere le scale. Il paziente si lamenta di inciampare più spesso e di cadere inaspettatamente. Oltre alla debolezza, viene riferita una sensazione di rigidità degli arti inferiori che è l'espressione dell'ipertono muscolare, caratteristico di una sofferenza del primo motoneurone.^{2;8}

Rientrano in questa categoria i pazienti con ipotrofia e ipostenia prossimali in assenza di un coinvolgimento distale all'esordio.

FENOTIPO BULBARE

La forma a esordio bulbare, presente nel 20-30% dei casi, coinvolge i motoneuroni e la muscolatura deputati all'articolazione verbale, alla fonazione, masticazione e deglutizione. Anche in questa sede vi può essere il coinvolgimento selettivo del primo o del secondo motoneurone, caratterizzando rispettivamente la paralisi pseudobulbare

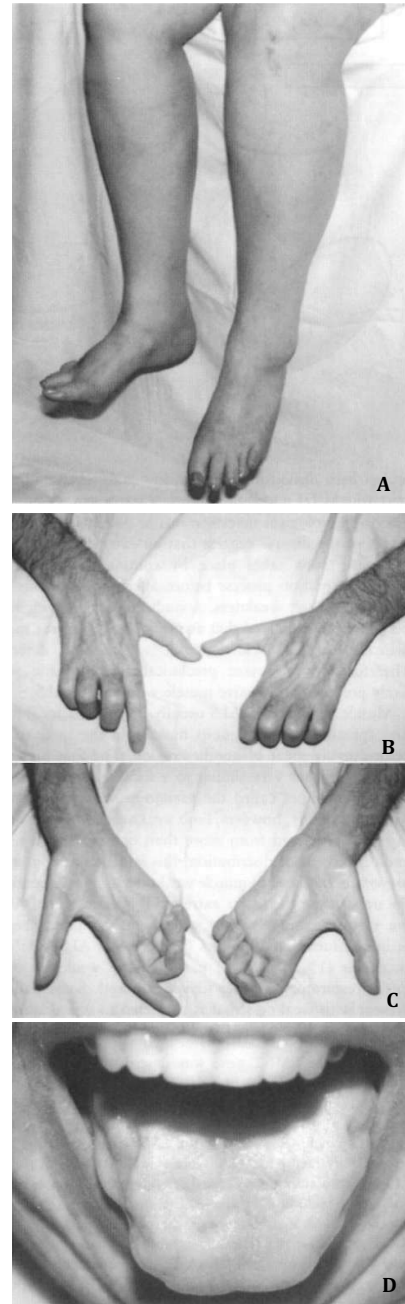


Figura 3 Piede cadente (A) a sinistra. Importante atrofia della muscolatura intrinseca delle mani (B e C). Notare la “mano ad artiglio” e l’atrofia dei muscoli innervati dai nervi ulnare e mediano. Atrofia linguale (D). Da Bradley, pag. 2250.

(labilità emotiva, riso e pianto spastico, riflesso masseterino vivace, disartria spastica) e la paralisi bulbare (debolezza del distretto facciale superiore ed inferiore, difficoltà nella motilità del palato, fascicolazioni della lingua).⁸

Le alterazioni della fonazione si manifestano spesso come primo sintomo di coinvolgimento bulbare e sono causate dall'ipostenia della lingua, labbra e palato molle, da alterata motilità delle corde vocali e dalla ridotta funzionalità polmonare. Consistono in iniziale disfonia e i cambiamenti precoci della qualità della voce sono: intensità ridotta, sforzo vocale e ipernasalizzazione. In seguito compare una franca disartria sino all'anartria completa.²

Anche le turbe della deglutizione possono essere presenti nelle fasi iniziali della malattia. Dapprima l'ipostenia della lingua limita lo spostamento del cibo dalla cavità orale alla faringe, in seguito l'ipostenia dei muscoli faringei causa disfagia per i liquidi e per i solidi con importante limitazione della nutrizione fino al manifestarsi di episodi di aspirazione e penetrazione di cibo nelle vie aeree.

In alcuni studi è stato stimato che, nei pazienti con esordio bulbare, la disartria sia otto volte più frequente della disfagia come sintomo iniziale. È stato ipotizzato che la muscolatura della lingua sia più vulnerabile al processo neurodegenerativo di quella deputata alla deglutizione. Una seconda interpretazione potrebbe essere che la disartria sia segnalata più frequentemente dai pazienti e dai loro caregiver poiché è più facile da riconoscere, anche precocemente, rispetto a una lieve difficoltà nella deglutizione.¹¹

La masticazione può essere difficoltosa per l'ipostenia dei masseteri, ma anche per il coinvolgimento delle vie corticobulbari che si manifesta con clono della mandibola e trisma, con conseguente difficoltà all'apertura della bocca e all'alimentazione.

Altri segni che possono comparire sono la labilità emotiva, il riso e il pianto spastico, caratterizzati da un'involontaria tendenza a ridere o piangere per stimoli emotivi, causati dal coinvolgimento bilaterale delle proiezioni corticobulbari.

Altro sintomo comune, soprattutto nelle fasi avanzate, è la scialorrea, causata dalla difficoltà nella deglutizione e dalla ridotta chiusura delle labbra.²

Questo fenotipo è caratterizzato dalla presenza di segni di interessamento bulbare in assenza di segni spinali periferici per almeno sei mesi dall'esordio di malattia. I segni piramidali, causati dal coinvolgimento delle vie corticobulbari, possono non essere presenti nei primi sei mesi di malattia, ma lo sono in seguito.

FENOTIPO FLAIL ARM

Merita attenzione anche il fenotipo più recentemente nominato *Flail Arm* e descritto inizialmente da Vulpian nel 1886 come una sindrome di ipostenia prossimale e ipotrofia degli arti superiori (variante scapolo-omerale dell'atrofia muscolare progressiva o forma scapolo-omerale). La patologia è stata variamente nominata sindrome di Vulpian-Bernard, *Hanging arm syndrome*, sindrome dell'uomo nel barile, diplegia amiotrofica brachiale. Si manifesta tipicamente con ipostenia progressiva agli arti superiori e ipotrofia che spesso è simmetrica e prossimale, con la comparsa di segni di coinvolgimento di primo motoneurone, ma senza il manifestarsi di ipertonìa o clono. Il coinvolgimento funzionale è limitato agli arti per almeno dodici mesi dopo l'esordio dei sintomi.

Molti pazienti hanno, o sviluppano tardivamente, segni elettromiografici (EMG) di interessamento degli arti inferiori e un coinvolgimento bulbare si manifesta nel 27-77% dei casi. Gli studi elettrofisiologici indicano che è presente un'ipereccitabilità corticale e periferica, così come nella forma tipica di SLA.¹²

FENOTIPO FLAIL LEG

È stato inizialmente definito come forma ad esordio pseudopolinevritico (*forme pseudopolynevritique de la sclérose latérale amyotrophique*), individuato da Pierre Marie e descritto dal suo allievo Patrikios nel 1918 e conosciuto anche come forma di Marie–Patrikios, forma peroneale di SLA. Venne denominato così poiché il quadro clinico potrebbe essere scambiato per una neuropatia.

Si tratta di una paraparesi a esordio asimmetrico e progressione lenta, che spesso si manifesta con piede cadente (fig. 3). Questo fenotipo è caratterizzato prevalentemente da un'ipostenia distale e un'ipotrofia degli arti inferiori. I riflessi propriocettivi, spesso ipovalidi, possono essere patologici durante l'evoluzione della malattia, ma in assenza di ipertonìa o clono.

Sono stati riportati dolore e parestesie come sintomi transitori e moderati. La sopravvivenza mediana e a cinque anni è elevata. I tempi di conduzione motoria centrale sono ridotti, anche se non sono presenti segni di primo motoneurone. Vi è un'estesa perdita di fibre dai fasci corticospinali laterali dei segmenti midollari toracici e lombari.^{12;13}

FENOTIPO PIRAMIDALE

I segni piramidali sono predominanti e il paziente presenta spesso un quadro di paraparesi spastica grave associata ad altri segni di coinvolgimento di primo motoneurone. La paresi spastica può essere presente sin dall'esordio o manifestarsi durante una fase più avanzata della malattia. I pazienti mostrano allo stesso tempo anche segni di disfunzione del secondo motoneurone, come ipotrofia, debolezza muscolare e segni di denervazione cronica e recente in almeno due diversi distretti all'esame elettromiografico.

FENOTIPO RESPIRATORIO

I pazienti che sviluppano tale fenotipo presentano un maggiore deficit respiratorio (ortopnea, dispnea a riposo o dopo sforzo) all'esordio con solo modesti segni di interessamento spinale o bulbare nei primi sei mesi dopo l'inizio della sintomatologia. Sono inoltre presenti segni di interessamento del primo motoneurone.

ATROFIA MUSCOLARE PROGRESSIVA

Questa manifestazione fenotipica è caratterizzata unicamente dalla presenza di segni clinici ed elettrofisiologici di coinvolgimento progressivo del secondo motoneurone. Da questa categoria devono essere esclusi tutti i pazienti con neuropatia con blocchi di conduzione, pazienti con segni clinici di primo motoneurone, pazienti con storia familiare di atrofia muscolare spinale. Gli esami neuroradiologici sono in questo caso fondamentali per escludere lesioni strutturali del rachide.

SCLEROSI LATERALE PRIMARIA

Contrariamente al precedente, questo fenotipo è caratterizzato unicamente dalla presenza di segni clinici di coinvolgimento del primo motoneurone come, ad esempio, una grave para-tetraparesi spastica, riflessi propriocettivi vivaci, segni di Babinski e di Hoffmann, riflesso masseterino vivace, disartria spastica, labilità emotiva, riso e pianto spastico. Da questa categoria sono esclusi tutti i pazienti con segni clinici ed elettromiografici di secondo motoneurone e storia familiare di paraparesi spastica ereditaria.

Decorso

Con il trascorrere dei mesi il coinvolgimento muscolare progredisce e l'atrofia e l'ipostenia interessano altri distretti, indipendentemente dalla sede di esordio.

Sebbene la sequenza dei sintomi e il tasso di progressione di malattia varino da persona a persona, col tempo i pazienti sviluppano difficoltà crescenti nel movimento, non sono in grado, quindi, di stare in piedi e camminare, sdraiarsi e alzarsi dal letto autonomamente, usare le mani e le braccia. Le difficoltà nel masticare e deglutire riducono le capacità del paziente di alimentarsi e aumentano il rischio di polmoniti ab ingestis e soffocamento. Il controllo del peso corporeo diventa così un problema.

La comunicazione è sempre più compromessa con l'avanzare della gravità della patologia, in particolare nei pazienti che sviluppano deficit cognitivi di tipo frontale.

I disturbi respiratori insorgono in genere più tardivamente e sono causati dal deficit della muscolatura intercostale e dall'atrofia del diaframma, che conducono progressivamente all'insufficienza respiratoria. Nelle fasi tardive della malattia i pazienti perdono la capacità di respirare autonomamente e devono dipendere da un supporto ventilatorio per la sopravvivenza. I pazienti presentano inoltre un rischio aumentato di polmoniti durante le fasi finali della malattia.²

Caratteristiche atipiche e interessamento sistemico

Sebbene nella forma classica di SLA siano stati considerati nel passato come criteri di esclusione, esistono altri sintomi, seppure rari, che possono associarsi a questa patologia. Queste caratteristiche atipiche comprendono: deficit cognitivi; alterazioni sensitive (parestesie nel 25% dei casi); alterazioni della motilità oculare; disfunzione intestinale/vescicale.

Esperienze cliniche dai Paesi che fanno un costante e frequente uso del supporto ventilatorio per i pazienti che altrimenti morirebbero per insufficienza respiratoria,

hanno consentito di rilevare un coinvolgimento multisistemico molto esteso nella SLA avanzata, con sviluppo di sintomi a carico di distretti del sistema nervoso tradizionalmente risparmiati dalla malattia, inclusi i nuclei oculomotori.¹⁴

Demenza frontotemporale

La demenza frontotemporale (DFT) è la seconda causa più comune di demenza a insorgenza precoce, caratterizzata da degenerazione dei lobi frontali e della porzione anteriore dei lobi temporali. Nella popolazione generale la sua incidenza varia fra 3,5 e 4,1 per 100.000 abitanti l'anno negli individui al di sotto dei 65 anni.^{15;16} Si manifesta con vari gradi di alterazioni comportamentali e turbe del linguaggio.

Tradizionalmente considerata una malattia completamente distinta dalla SLA per le sue caratteristiche cliniche discordanti, nel corso degli anni è stato spesso osservato un collegamento fra queste due patologie. Infatti, una compromissione motoria è stata descritta nel 15% dei pazienti affetti da DFT^{17;18} e una DFT è presente in 15–18% dei pazienti affetti da SLA.¹⁹ I disturbi cognitivi possono seguire, precedere o coincidere con l'esordio della SLA e alcuni pazienti presentano un quadro clinico unico SLA-DFT.

Ormai è sempre più chiaro come queste due patologie condividano caratteristiche patologiche e genetiche comuni, così SLA e DFT sono adesso considerate parti di un continuum genetico-neuropatologico. Questo concetto di spettro di malattia può aiutare nell'identificazione di nuovi geni e di altri fattori che influenzano questi fenotipi di malattia.²⁰

Eziopatogenesi

Negli ultimi anni abbondante è stata la ricerca sulla patogenesi della SLA, ma l'eziologia resta ancora sconosciuta. Si indaga sul ruolo individuale di fattori causali ambientali o genetici multipli, ma numerosi gruppi di ricerca sostengono l'ipotesi che sia la complessa interazione fra geni e ambiente a innescare il processo che conduce alla degenerazione neuronale.

IPOTESI PATOGENETICHE

Sono diversi i meccanismi patogenetici attualmente ritenuti responsabili del danno biologico motoneuronale e si ritiene che sia l'interazione fra questi ad alterare l'omeostasi dei motoneuroni e delle cellule gliali, causandone la morte (fig. 4).

Questi includono:³

- Eccitotossicità
- Stress ossidativo
- Disfunzione mitocondriale
- Trasporto assonale ridotto
- Accumulo di proteine anomale all'interno della cellula
- Meccanismi di eliminazione di proteine intracellulari deficitari
- Aggregazione di neurofilamenti
- Aggregazione di proteine
- Disfunzione immunitaria e contributo delle cellule non-neuronali
- Deficit di fattori di crescita e disfunzione delle vie di trasmissione del segnale

Tali eventi molecolari sono strettamente correlati fra loro al punto di sovrapporsi e sono indotti da substrati genetici e da insulti esogeni.

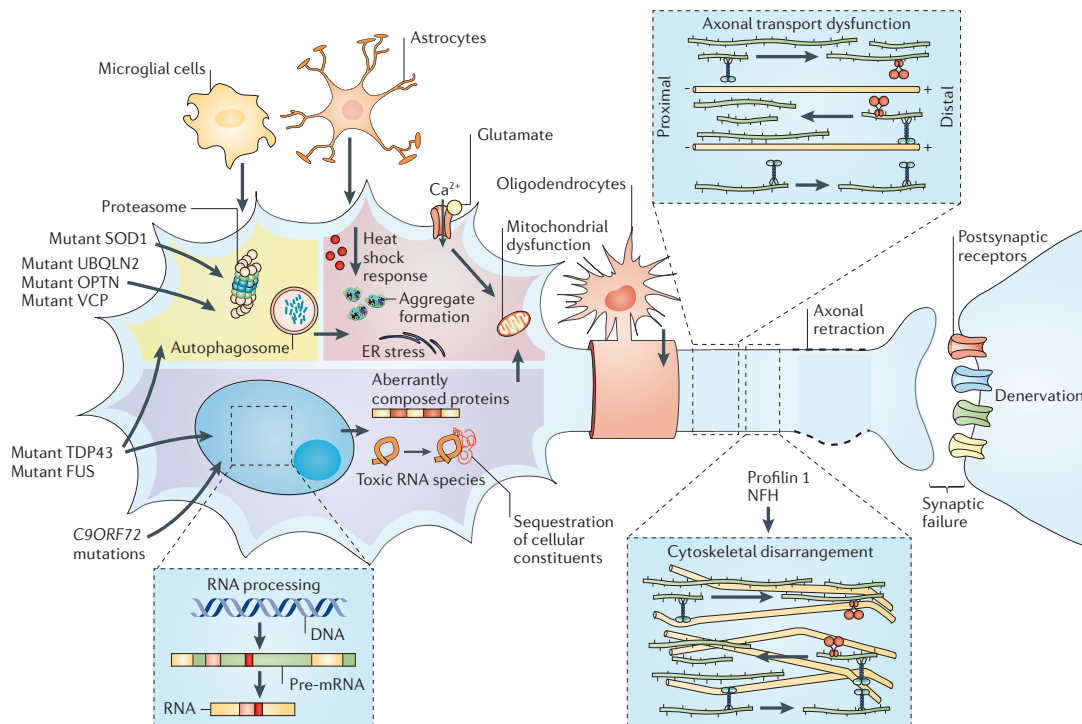


Figura 4 Panoramica degli eventi nella patogenesi della SLA. Alterazioni della normale degradazione delle proteine per mutazioni dei geni SOD1, VCP, UBQLN2, CHMP2B, OPTN e potenzialmente TDP43 e FUS (la SLA come una proteinopatia; in giallo). Alterazioni della maturazione dell'RNA, che portano alla produzione di proteine erranee e specie tossiche di RNA, causate da mutazioni del gene C9ORF72 e potenzialmente TARDBP e FUS (la SLA come patologia dell'RNA; in viola). Attraverso questi meccanismi di perdita o acquisto di funzione, queste alterazioni patogenetiche conducono ad un danno cellulare progressivo (in rosso) che è caratterizzato da accumulo di proteine, formazione di aggregati proteici, stress del reticolo endoplasmatico (ER) e malfunzionamento mitocondriale e dell'apparato del Golgi. Il danno del citoscheletro e del trasporto assonale causa la degenerazione del motoneurone. Le altre cellule non neuronali modificano questo processo attraverso la perdita della loro normale azione sui neuroni e con l'acquisizione di un effetto tossico. I fattori di vulnerabilità, come la capacità di risposta allo stress (ad es. attivazione delle heat shock protein) e la suscettibilità all'eccitotossicità (ad es. caratteristiche di permeabilità del recettore del glutamato) determinano quali neuroni sono suscettibili a questi processi. Da Robberecht and Philips, 2013.

GENETICA

La maggior parte dei casi di SLA è sporadica, non presentando quindi una chiara familiarità, e costituisce circa il 90% dei casi.⁴ Una proporzione inferiore, invece, è familiare e più frequentemente si presenta con una trasmissione autosomica dominante, ma può essere di tipo recessivo o X-linked.

Diversi studi hanno tuttavia riportato il ruolo di mutazioni genetiche e geni di suscettibilità nel predisporre all'insorgenza di malattia. È sempre più crescente, infatti,

l'ipotesi che una componente genetica soggiaccia a tutte le forme di SLA e che i fattori ambientali e stocastici agiscano come fattori precipitanti in individui geneticamente suscettibili, piuttosto che essere direttamente causativa di malattia.²²

Nonostante gli sforzi finora compiuti dai ricercatori, resta ancora molto da comprendere e definire riguardo ai meccanismi molecolari della patologia.²³

Negli ultimi anni, grazie anche agli avanzamenti nella ricerca genetica e nelle tecnologie di sequenziamento e genotipizzazione, sono stati scoperti numerosi nuovi geni correlati alla SLA e attualmente è nota l'eziologia dei due terzi dei casi di SLA familiare e di circa il 10% delle forme sporadiche (fig. 5).²²

I geni più frequentemente coinvolti nella SLA sono C9ORF72, SOD1, TARDBP, e FUS²² con differenze nei vari gruppi etnici e regioni geografiche (tab. 2). Qui di seguito vengono descritti in dettaglio alcuni di essi.

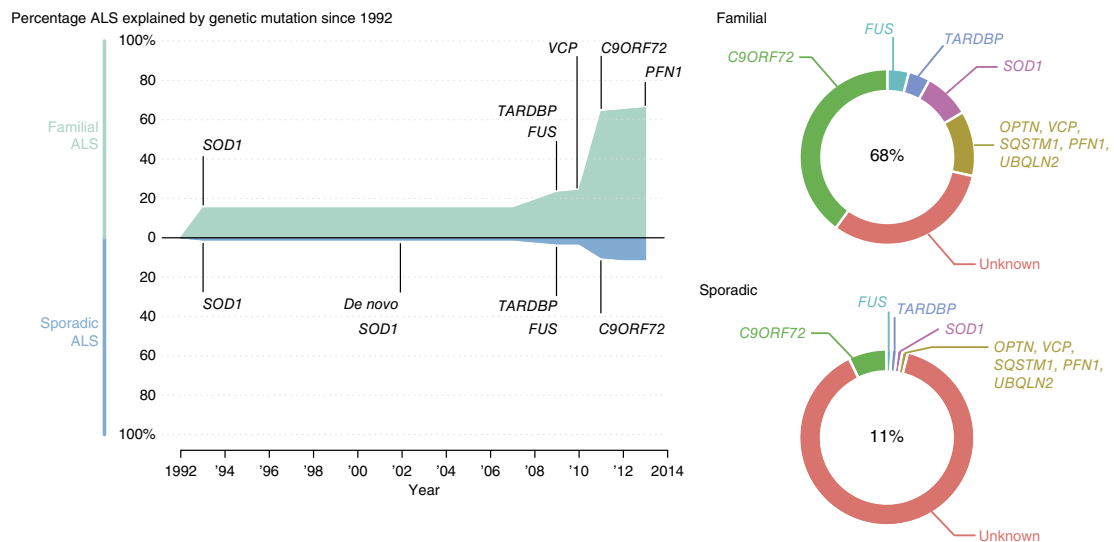


Figura 5 Cronologia delle scoperte genetiche nelle forme di SLA familiare e sporadica. I valori rappresentano la proporzione di casi di SLA spiegati da ciascun gene nella popolazione europea. Da Renton et al., 2014.

Gene	Location	Inheritance	Percentage explained		Putative protein function
			Familial ALS	Sporadic ALS	
<i>TARDBP</i>	1p36	AD	4	1	RNA metabolism
<i>SQSTM1</i>	5q35	AD	1	<1	Ubiquitination; autophagy
<i>C9ORF72</i>	9p21	AD	40	7	DENN protein
<i>VCP</i>	9p13	AD	1	1	Proteasome; vesicle trafficking
<i>OPTN</i>	10p13	AR and AD	<1	<1	Vesicle trafficking
<i>FUS</i>	16p11	AD and AR	4	1	RNA metabolism
<i>PFN1</i>	17p13	AD	<1	<1	Cytoskeletal dynamics
<i>SOD1</i>	21q22	AD and AR	12	1-2	Superoxide metabolism
<i>UBQLN2</i>	Xp11	XD	<1	<1	Proteasome

Values represent the percentage of ALS explained by each gene in populations of European ancestry. References are provided in the main text. AD, autosomal dominant; AR, autosomal recessive; XD, X-linked dominant; DENN, differentially expressed in normal and neoplasia.

Tabella 2 Geni più frequentemente associati alla SLA. Da Renton et al., 2014.

SUPEROSSIDO DISMUTASI 1 (SOD1)

Nel 1993 venne scoperta una mutazione del gene che codifica l'enzima SOD1. Questo enzima è un potente antiossidante che protegge l'organismo dal potenziale danno dei radicali liberi. Gli aggregati della proteina SOD1 mutata hanno attività eccitotossica glutamatergica, causano aumento del calcio intracellulare e possono causare disfunzioni mitocondriali e apoptosi (fig. 4).

Esistono oltre cento mutazioni di questo gene, ma solo per una parte di esse sono presenti evidenze scientifiche di patogenicità²⁴ e sembra che costituiscano circa il 12% dei casi familiari di malattia e circa l'1% delle forme sporadiche di SLA.^{4;25}

Una notevole eterogeneità fenotipica viene attribuita alle varie mutazioni del gene SOD1: la mutazione A4V è la più frequente nel Nord America e conduce ad una forma aggressiva di SLA che porta a morte dopo un anno dall'esordio dei sintomi; la presenza della mutazione D90A in omozigosi è associata a un decorso lento e il paziente sviluppa disturbi respiratori solo dopo circa dieci anni dall'esordio.²⁶

Le alterazioni cognitive non sono frequenti in presenza di mutazioni del gene SOD1, sebbene i pazienti con la mutazione D90A manifestino un decadimento cognitivo durante le fasi avanzate della malattia, probabilmente a causa della lunga sopravvivenza che consentirebbe alla malattia di colpire le aree prefrontali.^{22;27}

TAR DNA-BINDING PROTEIN (TARDBP)

Un altro passo significativo nella ricerca genetica sulla SLA risale al 2006, quando venne scoperta la *TAR DNA-binding protein 43* (TDP-43) come proteina patologica in molti casi di SLA SOD1 negativa.²⁸ La TDP-43 è stata individuata come principale componente degli aggregati proteici ubiquitinati citoplasmatici in molti casi di SLA sporadica e familiare; è inoltre associata alla demenza da degenerazione lobare frontotemporale e alla fibrosi cistica. Questo indica come il gene TARDBP contribuisca a creare uno spettro di malattia piuttosto che singole entità cliniche separate.

La presenza della mutazione del gene TARDBP risulta meno frequente del riscontro di alterazioni neuropatologiche della proteina TDP-43 osservate nelle autopsie.²²

FUSED IN SARCOMA (FUS)

Poco dopo la scoperta di TARDBP è stata identificata un'altra *DNA/RNA binding protein* chiamata FUS o TLS (*fused in sarcoma/translocation in liposarcoma*) che ha definite funzioni di riparazione del DNA e di mantenimento dell'integrità del genoma. La mutazione di questo gene è stata identificata come causa della forma familiare di SLA legata al cromosoma 16p. Solo in due anni, sono state identificate 35 differenti mutazioni per il gene FUS, responsabili del 4% della SLA familiare e di circa l'1% della forma sporadica.^{23;28-30}

OPTINEURINA (OPTN)

Mutazioni del gene OPTN sono state inizialmente descritte nel 2010 come causa di una forma di SLA autosomica recessiva nelle famiglie giapponesi e in seguito è stato chiarito che la presenza di mutazioni in eterozigosi raramente è causa di SLA familiare nelle popolazioni di origine europea.³¹ Questo potrebbe indicare l'esistenza di differenti fattori eziologici che sottendono la degenerazione motoneuronale nei vari gruppi etnici.

Mutazioni di questo gene sono state descritte anche come causa di glaucoma ad angolo aperto e, più di recente, studi di associazione genome-wide hanno correlato il locus OPTN con il morbo di Paget dell'osso.²²

ESPANSIONE ESANUCLEOTIDICA IN C9ORF72

È stato recentemente descritto che l'espansione esanucleotidica nel gene C9ORF72 è la causa della SLA e della DFT legate al cromosoma 9p21.^{32;33} Infatti tale mutazione è responsabile di un'elevata percentuale di casi di SLA familiare (~40%) e di DFT familiare (~25%) e spiega dal punto di vista genetico la sovrapposizione esistente fra queste due entità cliniche.³⁴

Esiste molto interesse e molti sono ancora i dubbi che ruotano intorno a questa mutazione. Ci si chiede quale sia lo spettro fenotipico completo associato, quale sia il suo ruolo nelle malattie neuropsichiatriche e perché alcuni pazienti sviluppino una disfunzione motoria e altri una compromissione dei lobi frontali.²²

ALTRI GENI

Nel corso degli anni sono state descritte mutazioni in numerosi geni come causa rara di SLA o sindromi simili alla SLA (tab. 3). Questi sono: il gene della Proteina Contenente la Valosina (VCP), il gene dell'Ubiquilina 2 (UBQLN2), il gene

Sequestosoma 1 (SQSTM1), il gene Profilina 1 (PFN1), il gene dell'Alsina (ALS2), il gene della Senataxina (SETX), il gene della Dinactina (DCTN1), il gene della Proteina Associata alla Sinaptobrevina (VAPB), il gene Angiogenina (ANG).^{2;22}

Gene	Location	Inheritance	Predominant clinical syndromes	Putative protein function
<i>DCTN1</i>	2p13	AD	PMA; Perry syndrome	Axonal transport
<i>ALS2</i>	2q33	AR	Juvenile PLS; infantile HSP	Vesicle trafficking
<i>CHMP2B</i>	3p11	AD	Familial ALS; sporadic ALS; FTD	Vesicle trafficking
<i>FIG4</i>	6q21	AD and AR	CMT; familial ALS	Vesicle trafficking
<i>HNRNPA2B1</i>	7p15	AD	Multisystem proteinopathy; ALS	RNA metabolism
<i>ELP3</i>	8p21	Undefined	Sporadic ALS	RNA metabolism
<i>SETX</i>	9q34	AD	Juvenile ALS; ataxia with oculomotor apraxia	RNA metabolism
<i>HNRNPA1</i>	12q13	AD	Multisystem proteinopathy; ALS	RNA metabolism
<i>ATXN2</i>	12q24	Undefined	Sporadic ALS; ataxia	Endocytosis; RNA translation
<i>ANG</i>	14q11	AD	Familial ALS; sporadic ALS	Angiogenesis
<i>SPG11</i>	15q14	AR	Juvenile ALS; HSP	DNA damage repair
<i>VAPB</i>	20q13	AD	PMA; FALS	Vesicle trafficking
<i>NEFH</i>	22q12	AD	Familial ALS; sporadic ALS	Axonal transport

AD, autosomal dominant; AR, autosomal recessive; CMT, Charcot-Marie-Tooth disease; HSP, hereditary spastic paraplegia; PLS, primary lateral sclerosis; PMA, progressive muscular atrophy.

Tabella 3 Altri geni implicati nella patogenesi della SLA. Da Renton et al., 2014.

Fattori di rischio

Numerosi studi caso-controllo hanno mostrato un'associazione, seppur debole, con lo sviluppo della malattia. Tra i fattori analizzati e di incerta interpretazione, i seguenti:

- Età alla menopausa³⁵
- Dieta e fattori alimentari³⁶
- Danno elettrico³⁷
- Storia familiare di patologie neurodegenerative differenti dalla SLA (malattia di Parkinson e di Alzheimer)³⁸
- Area geografica di residenza (zone rurali, urbane)³⁹
- Attività militari durante la guerra del Golfo^{40;41}
- Campi elettromagnetici⁴²
- Età della madre al parto⁴³
- Numero di parti,⁴³⁻⁴⁵ aborti⁴⁶
- Professione (agricoltori, saldatori)^{44;47}
- Attività fisica e sportiva^{48;49}
- Gioco del calcio professionale⁵⁰⁻⁵²
- Pregresse poliomieliti⁵³
- Etnia⁵⁴
- Fumo di tabacco^{44;55;56}
- Esposizione a tossine (sostanze chimiche usate nell'agricoltura, piombo, metalli pesanti, pesticidi, erbicidi, solventi)⁴⁷
- Traumi meccanici (es. traumi cranici)^{50;57}
- Anni di scolarità⁴⁴

Recenti lavori presenti in letteratura sul ruolo dei fattori di rischio ambientali, hanno concluso che non c'è ancora significativa associazione fra il singolo fattore ambientale e il rischio di sviluppare la malattia. Molti autori preferiscono l'ipotesi che esista una complessa interazione fra ambiente e genetica come causa della degenerazione motoneuronale.³

Neuropatologia

La neuropatologia della SLA potrebbe derivare da una complessa interazione fra vari meccanismi cellulari.

Diversi studi di patologia molecolare hanno dimostrato, come elemento comune a tutte le forme di SLA, la presenza di anomali aggregati proteici all'interno dei motoneuroni (inclusioni *skein-like* ubiquitinate, corpi di Bunina, conglomerati ialini, tab. 4). Sono state formulate varie ipotesi per spiegarne la presenza, che potrebbe dipendere dagli effetti tossici dello stress ossidativo. I maggiori effetti dannosi degli aggregati proteici intracellulari sono correlati all'alterazione delle funzioni degli organuli cellulari e ai disturbi del trasporto assonale.

INCLUSION	FEATURES	COMMENT
Bunina bodies	Eosinophilic Hyaline Intracytoplasmic Positive for cystatin (an inhibitor of cysteine protease)	Found in about 70 percent of patients at autopsy Rarely seen in other conditions, so both the sensitivity and specificity of this finding are high
Ubiquitinated inclusions*	Do not react with antibodies against neurofilament or tau, unlike the ubiquitinated inclusions of other neurodegenerative diseases	Found in skein-like inclusions in patients with ALS Found in several other neurodegenerative diseases including Alzheimer's disease (neurofibrillary tangles) and Parkinson's disease (Lewy bodies)
Lewy-like bodies	Resemble Lewy bodies but may contain neurofilaments	May be related to skein-like inclusions, but are less common
Conglomerate hyaline inclusions	Stain intensely for phosphorylated and nonphosphorylated neurofilaments Weakly positive for ubiquitin	In some patients with familial ALS, inclusions contain immunoreactive superoxide dismutase 1 or neurofilaments
Advanced glycated end products	Insoluble proteins in neuronal hyaline inclusions Contain ubiquitin, phosphorylated neurofilament, and superoxide dismutase 1 Deposited by a process of glycation and oxidation	Found in patients with familial ALS with the A4V mutation in the gene for superoxide dismutase 1

*Ubiquitin is thought to form covalent bonds with other proteins in order to mark them for degradation by an ATP-dependent, nonlysosomal, proteolytic system.

Tabella 4 Inclusioni intracellulari nella SLA. Da Rowland and Shneider, 2001.

Diagnosi della SLA

La diagnosi di SLA è relativamente semplice se il paziente si trova in una fase avanzata di malattia o i sintomi sono generalizzati. Formulare una diagnosi nelle fasi precoci, quando il paziente presenta una sintomatologia focale e limitata a uno o due distretti (bulbare, arti superiori, tronco, arti inferiori), può essere complicato e dipende dall'accuratezza del medico nel cercare segni nelle regioni apparentemente non colpite.

Il tempo medio fra l'esordio dei sintomi e la diagnosi è stimato tra i 13 e i 18 mesi. Tempi superiori possono dipendere da un quadro più complesso o i sintomi precoci sono spesso intermittenti e aspecifici e possono essere sottovalutati o non percepiti dal paziente.^{58;59}

La diagnosi precoce è molto importante per ragioni etiche, psicologiche, cliniche e anche socioeconomiche.

Lo strumento migliore resta, ancora oggi, l'esame obiettivo accurato, mentre gli esami ematochimici, la neurofisiologia e la neuroradiologia sono considerati obbligatori e servono soprattutto per escludere patologie che mimano la SLA (tab. 5).

Le linee guida per la diagnosi e la gestione dei pazienti affetti dalla SLA vennero prodotte nel 2005 da una task force dell'*European Federation of the Neurological Societies* (EFNS),⁵⁸ successivamente rielaborate nel 2007⁵⁹ e nel 2010 (tab. 6).⁶⁰

La diagnosi di SLA richiede la presenza di:

- segni di degenerazione del secondo motoneurone riscontrati attraverso l'esame clinico, neurofisiologico o neuropatologico;
- segni clinici di degenerazione del primo motoneurone;
- progressiva diffusione dei segni nella stessa regione o in altre regioni (bulbare, cervicale, toracica, lombare);

Tabella 5 Patologie che possono mimare una SLA. Da Andersen et al., 2012.

<p>Anomalie anatomiche/sindromi compressive Arnold-Chiari I e altre malformazioni del tronco encefalico Tumori cervicali, del forame magno o della regione della fossa cranica posteriore Osteocondrosi con ernia cervicale Meningioma cervicale Tumore retrofaringeo Cisti epidurale spinale Mielopatia spondilolitica e/o radicolopatia motoria Siringomielia</p> <p>Difetti enzimatici acquisiti Gangliosidosi GM2 dell'adulto (deficienza di esosaminidasi A o B) Glicogenosi tipo IV</p> <p>Malattie autoimmuni Gammopatia monoclonale con neuropatia motoria Neuropatia motoria multifocale con/senza blocchi multipli di conduzione (MMN) Sindromi disimmuni del secondo motoneurone (con anticorpi anti GM1, anti GD1b, asialo-GM1) Altre patologie del secondo motoneurone incluse le CIDP Sclerosi multipla Miastenia gravis (in particolare la variante con anti-MuSK)</p> <p>Patologie endocrine Sindrome di Allgrove Amiotrofia diabetica Neuropatia secondaria a insulinoma Ipertiroidismo con miopatia Ipotiroidismo con miopatia Iperparatiroidismo primitivo Iperparatiroidismo (secondario a carenza di vitamina D) Ipokaliemia (sindrome di Conn)</p> <p>Tossici esogeni Piombo (?), mercurio (?), cadmio, alluminio, arsenico, tallio, manganese, pesticidi organici, neuro latirismo, konzo</p> <p>Infezioni Poliomielite acuta Atrofia muscolare progressiva post-polio HIV-1 (con mielopatia vacuolare) Mielopatia da HTLV-1 (HAM, paraplegia spastica tropicale) Neuroborreliosi Pachimeningite ipertrofica sifilitica Encefalite letargica spinale, Varicella-Zoster Trichinosi Brucellosi, sindrome da graffio di gatto Malattia da prioni</p>	<p>Miopatie Miopatia cachettica Miopatia da carcinoide Miopatia da carenza di distrofina Miosite da corpi inclusi Miopatie infiammatorie Miopatia nemalinica Polimiosite Miosite granulomatosa</p> <p>Sindromi neoplastiche Leucemia linfocitica cronica Glioma intramidollare Disordini linfoproliferativi Con paraproteinemia e/o bande oligoclonali nel liquor Sindrome di Pancoast Encefalomielite paraneoplastica con coinvolgimento delle corna anteriori Stiff person plus syndrome</p> <p>Traumi da agenti fisici Neuropatia da shock elettrico Radicolo-plessopatie indotte da radiazioni</p> <p>Patologie vascolari Malformazioni arterovenose Sindrome dell'arteria bulbare anteriore Ictus Vasculiti</p> <p>Altre patologie neurologiche Forme atipiche del Pacifico occidentale di SLA/malattia del motoneurone (Guam, Nuova Guinea, Penisola di Kii) Forme caraibiche atipiche di malattia del motoneurone-demenza-PSP (Guadalupa) Forma di Madras giovanile di SLA/malattia del motoneurone (India meridionale) Demenza frontotemporale associata a SLA/malattie del motoneurone Atrofia multisistemica Atrofia olivopontocerebellare Sclerosi laterale primaria Encefalomielite progressiva con rigidità Paralisi sopranucleare progressiva Paraplegia spastica ereditaria Atrofia muscolare spinale progressiva Atrofia muscolare spino bulbare SMA I-IV Sindrome di Brown - Vialetto - van Laere Sindrome di Fazio - Londe Sindrome di Harper - Young Atrofia muscolare spinale sporadica monomelica Polineuropatie con sintomi motori prevalenti Polineuropatia amiloidea familiare Sindrome delle fascicolazioni benigne Miochimie</p>
---	---

e richiede inoltre che vengano escluse:

- l'evidenza elettrofisiologica di altre patologie che potrebbero spiegare i segni di degenerazione di primo e secondo motoneurone;
- la presenza, agli esami neuroradiologici, di altri processi patologici che potrebbero spiegare i segni clinici ed elettrofisiologici.

I punti fondamentali nel processo diagnostico comprendono:⁵⁸

1. anamnesi, esame obiettivo generale e neurologico appropriato, per individuare segni che potrebbero suggerire una forma di SLA sospetta, possibile, probabile o definitiva;
2. esami neurofisiologici per confermare la degenerazione del secondo motoneurone nelle regioni clinicamente coinvolte e identificarne la presenza in quelle apparentemente risparmiate, indispensabili per escludere altre patologie;
3. esami neuroradiologici per escludere altri processi patologici in atto;
4. esami di laboratorio, effettuati secondo giudizio clinico, per escludere patologie che mimano la SLA;
5. esami neuropatologici, se appropriati, per verificare reperti clinici che potrebbero confermare o escludere una SLA sporadica, varianti della SLA o sindromi che mimano la SLA;
6. ripetizione dell'esame clinico ed elettrofisiologico almeno sei mesi dopo per documentare una progressione di malattia.

Tabella 6 Esami raccomandati per la diagnosi di SLA. Da Andersen et al., 2012.

Test	Evidence class	Recommended mandatory tests	Recommended additional tests in selected cases
<i>Clinical chemistry</i>			
Blood			
Erythrocyte sedimentation rate	IV	x	–
C-reactive protein	IV	x	–
Haematological screen	IV	x	–
ASAT, ALAT, lactate dehydrogenase	IV	x	–
Thyroid-stimulating hormone, free T ₄ , free T ₃ hormone assays	IV	x	–
Vitamin B ₁₂ and folate	IV	x	–
Serum protein electrophoresis	IV	x	–
Serum immunoelectrophoresis	IV	x	–
Creatine kinase	IV	x	–
Creatinine	IV	x	–
Electrolytes (Na ⁺ , K ⁺ , Cl ⁻ , Ca ²⁺ , HPO ₄ ²⁻)	IV	x	–
Glucose	IV	x	–
Angiotensin-converting enzyme	IV	–	x
Lactate	IV	–	x
Hexoaminidase A and B assay	IV	–	x
Ganglioside GM-1 antibodies	IV	–	x
Anti-Hu, anti-MAG	IV	–	x
RA, antinuclear antibodies, anti-DNA	IV	–	x
Anti-acetylcholine receptor and anti-muscle-specific receptor tyrosine kinase antibodies	IV	–	x
Serology (<i>Borrelia</i> , virus including HIV)	IV	–	x
DNA analysis (for SOD1, SMN, SBMA, TDP43, FUS)	IV	–	x
CSF			
Cell count	IV	–	x
Cytology	IV	–	x
Total protein concentration	IV	–	x
Glucose, lactate	IV	–	x
Protein electrophoresis including IgG index	IV	–	x
Serology (<i>Borrelia</i> , virus)	IV	–	x
Ganglioside antibodies	IV	–	x
Urine			
Cadmium	IV	–	x
Lead (24-h secretion)	IV	–	x
Mercury	IV	–	x
Manganese	IV	–	x
Urine immunoelectrophoresis	IV	–	x
Neurophysiology			
Electromyography	III	x	–
Nerve conduction velocity	III	x	–
tcMEP (TMS)	IV	–	x
Radiology			
Magnetic resonance imaging/computed tomography (cranial/cervical, thoracic, lumbar)	IV	x	–
Chest X-ray	IV	x	–
Mammography	IV	–	x
Biopsy			
Muscle	III	–	x
Nerve	IV	–	x
Bone marrow	IV	–	x
Lymph node	IV	–	x

Criteri di diagnosi di SLA (di El Escorial e di Airlie House)

I criteri di El Escorial (EEC) furono stabiliti durante una *consensus conference* internazionale tenutasi a El Escorial, in Spagna, dal 29 al 31 maggio 1990, per facilitare la collaborazione nei trial clinici e in altri studi di ricerca sulla SLA. I criteri, poi approvati dalla *World Federation of Neurology* nel 1994, prevedono quattro categorie diagnostiche (definita, probabile, possibile, sospetta) determinate sulla presenza della distribuzione di segni di primo e secondo motoneurone nei distretti bulbare, cervicale, toracico e lombosacrale (tab. 7).⁶¹

La conferma diagnostica richiede la progressione dei sintomi per un periodo di almeno sei mesi e l'esclusione delle patologie che mimano la SLA.

I criteri di El Escorial furono approvati dalla *World Federation of Neurology* nel 1994 e subirono alcune modifiche nel 1998. Sono ritenuti sensibili e altamente specifici (basso numero di falsi positivi) per la diagnosi di SLA, se applicati correttamente, e vengono ampiamente usati nella ricerca genetica ed epidemiologica.

I criteri furono poi rivisti durante un *workshop* all'*Airlie Conference Center* in Virginia nell'aprile del 1998 per l'esigenza di aumentarne la sensibilità. Venne eliminata la categoria di SLA sospetta e aggiunta l'EMG come strumento diagnostico importante per la diagnosi, nella categoria "probabile con supporto di laboratorio". Questi criteri sono conosciuti come criteri di Airlie House o criteri di El Escorial rivisti (tab. 7).⁶²

Tabella 7 Criteri diagnostici di El Escorial e criteri di Airlie House.

CRITERI DI EL ESCORIAL 1990		CRITERI DI AIRLIE HOUSE 1998	
Definita	Segni di PMN e di SMN nella regione bulbare e in almeno due regioni spinali Segni di PMN e di SMN in tre regioni spinali	Segni di PMN e di SMN nella regione bulbare e in almeno due regioni spinali Segni di PMN e di SMN in tre regioni spinali	Definita
Probabile	Segni di PMN e di SMN in almeno due regioni, con alcuni dei segni di PMN rostrali ai segni di SMN	Segni di PMN e di SMN in almeno due regioni, con alcuni dei segni di PMN rostrali ai segni di SMN	Probabile
Possibile	Segni di PMN e di SMN in una regione, o solo segni di PMN in almeno due regioni, o segni di SMN rostrali ai segni di PMN	Segni di PMN e di SMN in una regione, o solo segni di PMN in una regione e segni EMG di SMN in almeno due regioni (con esclusione di altre cause secondo protocolli neuroradiologici o di laboratorio)	Probabile con supporto di laboratorio
Sospetta	Segni di SMN in almeno due regioni	Segni di PMN e di SMN in una sola regione, o solo segni di PMN in almeno due regioni, o segni di SMN rostrali ai segni di PMN e no supporto di laboratorio (neuroimaging, neurofisiologia, bioumorali)	Possibile

Terapia

L'unico farmaco approvato per la terapia della SLA è il riluzolo, la cui efficacia sull'evoluzione della malattia è assai modesta. I suoi meccanismi di azione sono noti solo parzialmente, ma si basano principalmente sull'inibizione del rilascio di glutamato dal terminale presinaptico. Le altre terapie farmacologiche sintomatiche sono molto importanti, poiché il loro scopo è di migliorare la qualità di vita del paziente e di ridurre i sintomi associati alla patologia come il dolore, i disturbi del sonno, la spasticità, la scialorrea, la labilità emotiva, la depressione, le turbe digestive.^{23;63}

La gestione del paziente affetto da SLA verte principalmente sugli interventi di supporto multidisciplinare e comprende il sostegno delle funzioni vitali. È molto importante la gestione della nutrizione (nutrizione enterale tramite gastrostomia endoscopica percutanea, PEG) e della ventilazione (ventilazione meccanica non invasiva, apparecchio di assistenza alla tosse, ventilazione invasiva). Altri interventi altrettanto importanti riguardano la fisioterapia respiratoria, la gestione foniatrico-logopedica, la comunicazione aumentativa alternativa, la mobilizzazione e la prescrizione di ausili.²

L'approccio al paziente affetto dalla SLA deve essere basato su un intervento multidisciplinare, coordinato e tempestivo, che tenga conto delle esigenze del malato e della famiglia. È importante formare e informare il paziente e la famiglia, rispettare il principio di autodeterminazione del malato, facilitarne l'accesso ai servizi e aiutarlo nell'utilizzo di quelli disponibili. L'obiettivo finale è quello di migliorare la qualità di vita del paziente e del *caregiver*.

Prognosi

La SLA ha un decorso progressivo e fatale, in media porta al decesso in 24-48 mesi dall'esordio dei primi sintomi. Si è visto che molti fattori possono influenzare la durata di malattia e alcuni di questi possono essere usati come fattori prognostici. Uno di questi è la sede di esordio. È condiviso da numerosi gruppi di ricerca che l'esordio bulbare si associa a una prognosi peggiore rispetto all'esordio spinale, con una progressione clinica più rapida.⁶⁴⁻⁶⁶ In particolare, la presenza di sintomi respiratori all'esordio della malattia è risultata essere un fattore prognostico altamente negativo.⁶⁷ Attraverso alcuni studi epidemiologici si è visto che anche l'età di esordio, l'età alla diagnosi e il periodo di tempo fra l'esordio dei sintomi e la diagnosi di SLA sono fattori prognostici utili.

Sembra che un'età di esordio più giovane determini una sopravvivenza maggiore. La prognosi peggiora con l'avanzare dell'età: nei pazienti che presentano i primi sintomi entro i 40 anni, la sopravvivenza mediana è di 6 anni circa, contro i 3,2 anni per i pazienti il cui esordio avviene nella fascia di età fra i 40 e i 70 anni, rispetto a 2,9 anni per i pazienti con un'età superiore ai 70 anni. La spiegazione di questo fenomeno è sconosciuta, ma si ipotizza che possa dipendere da un migliore adattamento dei pazienti più giovani alla compromissione motoneuronale.⁶⁶ Anche l'età avanzata alla diagnosi è un fattore prognostico negativo.⁶⁸

È stato osservato inoltre, che un breve periodo di tempo fra l'esordio dei sintomi e la diagnosi di SLA si associa ad una prognosi peggiore. Questo lasso di tempo, definito anche ritardo diagnostico, è un fattore predittivo di sopravvivenza: più è lungo il ritardo e più è lunga la sopravvivenza. L'ipotesi è che il tempo che trascorre fra la comparsa dei sintomi e la prima visita medica possa essere un indicatore della rapidità di progressione della malattia. Infatti, i pazienti con un decorso rapidamente

progressivo tendono a consultare il medico più precocemente e hanno un tempo di sopravvivenza relativamente breve dopo la diagnosi, rispetto a quelli con una forma meno aggressiva.^{2;65-66;68-69}

Epidemiologia

La SLA è considerata una patologia rara: l'incidenza riportata dagli studi prospettici per la popolazione europea varia fra 1,1 e 3,6 per 100.000/anno^{70;71} mentre la prevalenza stimata varia fra 4,9 e 8,2 per 100.000.^{71;72}

I risultati riportati in un recente studio sull'epidemiologia della SLA nella popolazione della Sardegna centro-settentrionale per il periodo 1995-2009 mostrano un'incidenza di 2,5/100.000/anno (3,4 negli uomini e 1,6 nelle donne), con un rapporto M:F di 2,07 e un'età media all'esordio di 61,7 anni. La prevalenza riportata al 31 dicembre 2009 era 10,8 per 100.000 (13,8 negli uomini e 8,0 nelle donne). La sopravvivenza media dall'esordio dei sintomi era 37 mesi.⁷³

Obiettivi dello studio

Questo studio fa parte di un progetto di ricerca epidemiologica più ampio e ancora in corso, svolto in collaborazione con l'Università di Torino (Prof. Adriano Chiò e collaboratori) e l'Unità Operativa di Neurologia dell'A.O.U. di Cagliari (Dott. Giuseppe Borghero e collaboratori).

L'obiettivo del presente studio è stato quello di studiare le varianti cliniche e genetiche della SLA nella popolazione sarda. La Sardegna, infatti, rappresenta un territorio adatto per analisi epidemiologiche e genetiche di questo tipo poiché geograficamente e demograficamente ben definito. La popolazione è considerata quasi isolata, con riferimento alle caratteristiche etniche e genetiche, e stabile poiché generalmente pochi pazienti cercano assistenza diagnostico-terapeutica fuori dal territorio regionale. Ciò è ancor più vero nel caso di patologie a elevata disabilità e a decorso clinico rapidamente progressivo come la SLA.

Precedenti lavori, pubblicati su riviste scientifiche internazionali, hanno riportato che i pazienti di origine sarda affetti da SLA hanno una frequenza più elevata di SLA familiare e della mutazione p.A382T del gene TARDBP.^{74;75} Nonostante ciò, l'incidenza di SLA nei sardi riportata in un nostro recente studio epidemiologico di tipo retrospettivo, sebbene nettamente aumentata rispetto a quanto riportato per gli anni 1957-90, sembra essere in linea con le altre popolazioni europee.⁷³

Metodi

Il presente studio è stato condotto grazie alla partecipazione a network internazionali per la ricerca genetica (consorzio ITALSGEN, consorzio SARDINIALS) sulla SLA. I centri partecipanti comprendono i seguenti:

- Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università degli Studi di Sassari
 - Prof.ssa Maura Pugliatti;
- Dipartimento di Neurologia, Università degli Studi di Cagliari – Dott. Giuseppe Borghero;
- Centro regionale esperto per la SLA, Dipartimento di Neuroscienze “Rita Levi Montalcini”, Università degli Studi di Torino – Prof. Adriano Chiò;
- Neuromuscular Diseases Research Group, Laboratory of Neurogenetics, NIA, NIH, Bethesda, USA - Dott. Bryan Traynor.

Hanno inoltre, collaborato i seguenti centri:

- Unità Operativa di Neurologia, Ospedale A. Segni, Ozieri – Dott. Sebastiano Traccis;
- Unità Operativa di Neurologia, Ospedale S. Francesco, Nuoro – Dott.ssa Anna Ticca.

Pazienti

Nello studio sono stati inclusi pazienti di origine sarda affetti dalla SLA e per i quali sono state escluse altre forme di malattia del motoneurone, identificati fra il 2008 e il 2013 attraverso i gruppi ITALSGEN, che comprende 16 centri SLA in Italia, e SARDINIALS.⁷⁶

Tutti i pazienti sono stati classificati attraverso l'utilizzo dei criteri diagnostici di El Escorial rivisti (versione modificata di Airlie House del 1998):⁶² forme di SLA definita, SLA probabile, SLA probabile con supporto di laboratorio e SLA possibile. Sono state quindi raccolte le informazioni cliniche e sullo stato cognitivo dei pazienti.

Controlli

I controlli, 962 in totale, sono stati reclutati presso il Dipartimento di Neurologia dell'Università di Cagliari fra i coniugi o altri familiari non consanguinei dei pazienti con diagnosi di SLA o sclerosi multipla.

Campioni di DNA da un gruppo di 700 controlli sardi e non affetti da patologie neurodegenerative sono stati esaminati alla ricerca di mutazioni del gene TARDBP.

Campioni di DNA ottenuti da un secondo gruppo di 262 soggetti sardi e non affetti da patologie neurodegenerative sono stati analizzati alla ricerca di mutazioni dei geni SOD1, FUS e C9ORF72.

Raccolta dei dati

Tutti i dati clinici e strumentali disponibili sono stati esaminati per confermare la diagnosi di SLA e classificarla.

Sono state realizzate, appositamente per lo studio, delle schede di raccolta dei dati per raccogliere accuratamente tutte le informazioni di rilievo: dati anagrafici; dati clinici fra cui data, luogo e tipo di esordio clinico; data di diagnosi; classificazione secondo i criteri di El Escorial rivisti.

È stata ottenuta una classificazione fenotipica dettagliata, con la ricerca di alterazioni cognitive e di segni e caratteristiche extrapiramidali.

La costruzione di un albero genealogico è stata fatta con particolare attenzione alle patologie neurodegenerative.

I campioni di sangue sono stati raccolti e inviati al Laboratorio di Genetica Molecolare dell'Azienda Ospedaliero Universitaria "Città della Scienza e della Salute" a Torino. Il DNA estratto è stato poi inviato presso il laboratorio di neurogenetica del National Institute of Aging a Bethesda negli Stati Uniti, dove è stata completata l'analisi genetica.

Screening delle mutazioni

Mediante amplificazione con PCR sono stati analizzati i seguenti esoni alla ricerca di mutazioni: i cinque esoni del gene SOD1; l'esone 6 del gene TARDBP; gli esoni 14 e 15 del gene FUS. La repeat-primed PCR è stata utilizzata per rilevare la presenza dell'espansione esanucleotidica GGGGCC del primo introne del gene C9ORF72.^{32;33} È stato considerato patologico un cutoff ≥ 30 ripetizioni combinato ad un pattern a denti di sega.

Analisi dell'aplotipo

Sono stati analizzati i dati dei polimorfismi a singolo nucleotide mediante studio genome-wide nei pazienti portatori della stessa mutazione.

Analisi statistica

Le differenze fra i gruppi sono state analizzate mediante il test t di Student per variabili continue (come età all'esordio dei sintomi) e il test χ^2 è stato usato per le variabili discrete (come sesso, tipo di esordio, presenza di demenza frontotemporale).

Il confronto fra le serie delle medie è stato eseguito mediante analisi della varianza. La sopravvivenza è stata calcolata utilizzando le curve di Kaplan-Meier e il test dei ranghi logaritmici è stato utilizzato per confrontare la sopravvivenza fra i gruppi.

La significatività è stata considerata per $p < 0,05$, 2-tailed test.

L'analisi statistica è stata effettuata usando il software SPSS (Statistical Package for the Social Sciences), versione 21.0 per Windows (SPSS Inc., IBM, Somers, New York, USA).

Aspetti etici

Il protocollo dello studio è stato approvato dal Comitato di Bioetica delle ASL dell'area di studio e condotto in linea con la Legge Italiana sulla raccolta dei dati personali sensibili per scopi scientifici o statistici (*D.L. 30 giugno 2003, n. 196: Codice in materia di protezione dei dati personali – Capo III: Trattamento per scopi statistici o scientifici*). I pazienti e i controlli hanno firmato relativo consenso informato.

Risultati

Sono stati identificati 375 pazienti di origine sarda affetti da SLA, 236 uomini e 139 donne. L'età media (SD) all'esordio dei sintomi era 61,1 (12,1) anni. La maggior parte dei pazienti, 276 (73,6%) casi, aveva un esordio dei sintomi di tipo spinale, mentre 99 pazienti (26,4%) riportavano un esordio bulbare.

In 100 casi (26,7%) è stata segnalata una familiarità per SLA, DFT o entrambe le malattie.

Mutazioni genetiche nei pazienti

Attraverso lo studio genetico sono state identificate mutazioni di uno o più geni in 155 casi (41,3%) fra i pazienti affetti da SLA, mentre nei restanti 220 casi (58,7%) non è stata identificata alcuna mutazione. Dei 78 pazienti portatori della mutazione p.A382T del gene TARDBP, 75 (20,0%) erano eterozigoti per la mutazione, mentre 3 (0,8%) erano omozigoti. La mutazione p.G295S del gene TARDBP era presente in 11 pazienti, di cui 10 (2,7%) erano eterozigoti, mentre 1 caso (0,3%) era omozigote. Un paziente (0,3%) è risultato portatore di entrambe le mutazioni p.A382T e p.G295S del gene TARDBP.

L'espansione esanucleotidica GGGGCC del gene C9ORF72 è stata riscontrata in 51 (13,6%) casi. In 8 pazienti (2,1%) erano presenti sia la mutazione p.A382T del gene TARDBP che l'espansione del gene C9ORF72. La mutazione missenso del gene SOD1 era presente in 4 pazienti (1,1%), tutti con una forma familiare di SLA, di cui 3 con la mutazione p.A95G e 1 con la mutazione p.A4T. Due pazienti erano portatori di una mutazione missenso p.T622A del gene MATR3. Non sono state trovate mutazioni del gene FUS (tab. 8; fig. 6).

Mutazione	FALS	SALS	FALS+SALS
Wild type	26 (26.0%)	194 (70.5%)	220 (58.7%)
TARDBP (p.A382T, eterozigoti e omozigoti)	25 (25.0%)	53 (19.3%)	78 (20.8%)
TARDBP (p.G295S, eterozigoti e omozigoti)	3 (3.0%)	8 (2.9%)	11 (2.9%)
TARDBP (p.A382T e p.G295S doppia mutazione)	1 (1.0%)	-	1 (0.3%)
C9ORF72	33 (33.0%)	18 (6.5%)	51 (13.6%)
C9ORF72 e TARDBP (p.A382T)	6 (6.0%)	2 (0.7%)	8 (2.1%)
SOD1	4 (4.0%)	-	4 (1.1%)
MATR3	2 (2.0%)	-	2 (0.5%)
Totale	100	275	375

Tabella 8 Frequenza delle mutazioni nelle forme familiari (FALS), sporadiche (SALS) di SLA e nel totale dei pazienti (FALS + SALS) in Sardegna. Non sono state trovate mutazioni per il gene FUS. Tratta e modificata da Borghero et al., 2014.

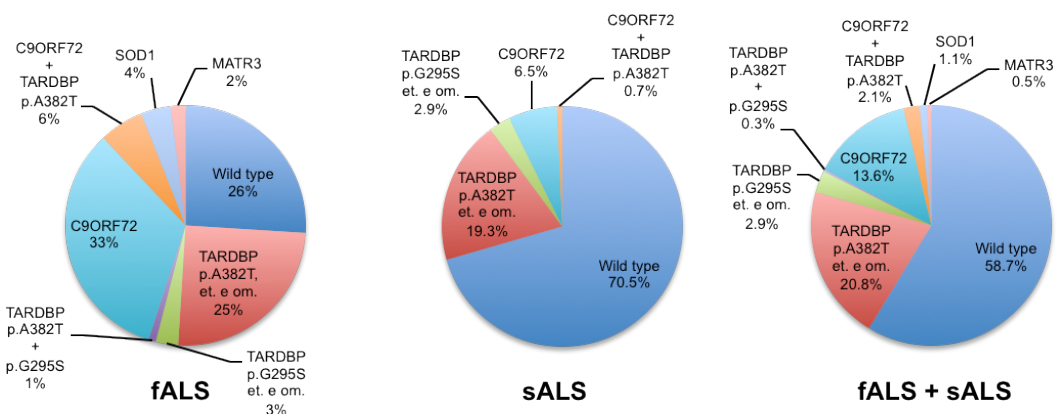


Figura 6 Frequenza delle mutazioni nelle forme familiari (fALS), sporadiche (sALS) di SLA e nel totale dei pazienti (fALS + sALS) in Sardegna (et. e om. presenza della mutazione in eterozigosi e omozigosi rispettivamente).

Mutazioni genetiche nei controlli

La mutazione missenso p.A382T del gene TARDBP è stata identificata in eterozigosi in 8 dei 700 controlli (1,1%, fascia d'età 60-86 anni). Invece, la mutazione p.G295S del gene TARDBP, l'espansione esanucleotidica del gene C9ORF72 e mutazioni dei geni FUS e SOD1 non sono state trovate fra i controlli.

Analisi dell'aplotipo

I dati sul genotipo hanno mostrato che pazienti affetti da SLA e portatori della mutazione p.A382T del gene TARDBP, della mutazione p.G295S del gene TARDBP e l'espansione del gene C9ORF72 dividevano distinti aplotipi lungo questi loci.

Distribuzione geografica dei pazienti portatori di mutazioni

È stata osservata una diversa distribuzione geografica delle due più comuni mutazioni associate alla SLA ($p = 0,0001$, fig. 7). La mutazione missenso p.A382T del gene TARDBP era più frequente nelle due province del Medio Campidano (39,0%) e di Oristano (29,3%), costituendo circa il 30% dei casi. La mutazione C9ORF72 era più frequente nelle province di Nuoro (20,9%), Sassari (19,1%) e Olbia-Tempio (18,8%) rappresentando circa il 20% dei casi. Non sono stati osservati cluster geografici per la mutazione missenso p.G295S del gene TARDBP.

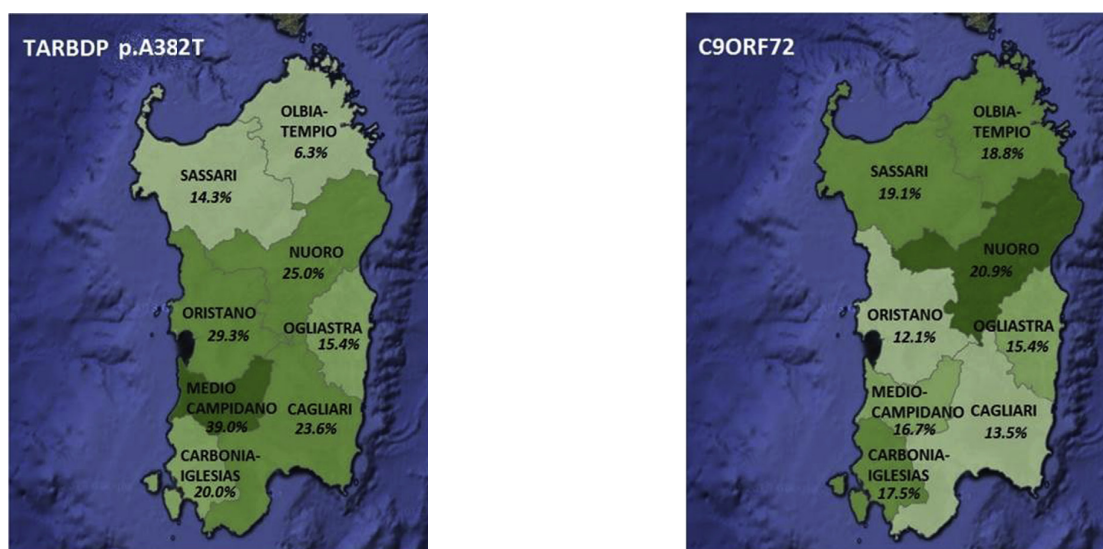


Figura 7 Distribuzione geografica dell'area di origine dei genitori dei pazienti affetti da SLA secondo le due mutazioni più comuni. I 2 pazienti omozigoti per la mutazione p.A382T di TARDBP e il paziente con la doppia mutazione p.A382T e p.G295S di TARDBP sono inclusi nell'immagine TARDBP a sinistra. Gli 8 pazienti con la doppia mutazione C9ORF72 e p.A382T di TARDBP sono stati inclusi in entrambe le immagini. Tratta e modificata da Borghero et al., 2014.

Caratteristiche cliniche dei pazienti

I soggetti portatori dell'espansione esanucleotidica del gene C9ORF72 avevano una maggiore frequenza di malattia ad esordio bulbare. L'età all'esordio differiva fra i sottogruppi genetici: i pazienti portatori della mutazione C9ORF72 e della mutazione missenso p.A382T del gene TARDBP e i pazienti con la mutazione del gene SOD1

avevano un'età d'esordio significativamente più bassa. La DFT è stata identificata in 51 casi (13,6%) ed era più frequente nei pazienti portatori della mutazione C9ORF72, mentre era più rara nei pazienti con la mutazione SOD1 e in quelli senza alcuna mutazione rilevata (tab. 9).

In 10 pazienti (2,7%) sono stati identificati segni extrapiramidali fra cui rigidità muscolare e tremore a riposo. Di questi, 2 pazienti avevano la mutazione C9ORF72, 3 avevano la mutazione missenso p.A382T del gene TARDBP in eterozigosi, 1 paziente aveva la mutazione missenso p.A382T del gene TARDBP in omozigosi, e 4 non avevano alcuna mutazione nota. Otto di questi pazienti (80,0%) avevano anche una comorbidità per DFT ($p = 0,0001$).

La sopravvivenza mediana totale dei pazienti sardi affetti da SLA era di 4,2 anni (range interquartile [IQR] 2,3-10,0) con variazioni in presenza delle varie mutazioni genetiche ($p = 0,0001$). I pazienti con la mutazione di C9ORF72 avevano una sopravvivenza mediana di 2,7 anni (IQR 1,9-3,8), i pazienti portatori di entrambe le mutazioni di C9ORF72 e p.A382T di TARDBP avevano una sopravvivenza mediana di 3,1 anni (IQR 1,8-3,9), e i pazienti con la mutazione p.A382T di TARDBP in eterozigosi avevano la sopravvivenza mediana di 6,5 anni (IQR 3,3-10,5).

	Number of cases ^a	Gender, F (%)	Site of onset, bulbar (%)	Age at onset, median (IQR)	FALS (%)	FTD (%)
Wild type	220	85 (38.6)	55 (25.0)	63.2 (55.9–71.4)	26 (11.8)	19 (8.6)
TARDBP (p.A382T)	75	25 (33.3)	18 (24.0)	61.5 (53.6–68.6)	23 (30.7)	9 (12.0)
C9ORF72	51	20 (39.2)	18 (35.3)	62.3 (55.0–67.4)	33 (64.7)	16 (31.4)
TARDBP (p.A382T) and C9ORF72	8	1 (12.5)	3 (37.5)	43.8 (38.2–46.4)	6 (75.0)	5 (62.5)
TARDBP (p.G295S)	10	6 (60)	5 (50)	62.8 (56.2–74.9)	3 (30.0)	1 (10.0)
SOD1	4	0	0	57.1 (45.7–64.5)	4 (100)	0
Overall	368	137 (37.2)	99 (26.9)	62.5 (54.4–69.2)	96 (26.1)	50 (13.6)
<i>p</i>	—	n.s.	n.s.	0.0001	0.0001	0.0001

Tabella 9 Caratteristiche cliniche e demografiche dei casi affetti da SLA. ALS, sclerosi laterale amiotrofica; FALS, sclerosi laterale amiotrofica familiare; F, donne; FTD, demenza frontotemporale; IQR, range interquartile; n.s., non significativo.

^a Sette casi non sono stati inclusi: 1 caso con la doppia mutazione di TARDBP (p.G295S e p.A382T), 3 casi omozigoti per la mutazione p.A382T di TARDBP, 1 caso omozigote per la mutazione p.G295S di TARDBP, 2 casi con la mutazione del gene MATR3. Da Borghero et al., 2014.

Discussione

La SLA è una malattia rara, multifattoriale, per la cui diagnosi non sono ancora disponibili biomarcatori specifici. Mentre il 10% circa dei pazienti riferisce familiarità per la patologia, il restante 90% presenta una forma di SLA sporadica.⁴

Gli studi genetici per comprendere meglio l'eziopatogenesi di questa malattia hanno consentito di scoprire alcuni meccanismi cellulari che sottendono la degenerazione dei motoneuroni.

Negli ultimi anni, grazie anche agli avanzamenti nella ricerca genetica e nelle tecnologie di sequenziamento e genotipizzazione, sono stati identificati numerosi nuovi geni correlati alla SLA e attualmente è nota l'eziologia dei due terzi dei casi di SLA familiare e di circa il 10% delle forme sporadiche.²²

I geni più frequentemente coinvolti nella SLA sono C9ORF72, SOD1, TARDBP, e FUS²² con differenze nei vari gruppi etnici e regioni geografiche.

La Sardegna, che rappresenta un isolato genetico, ha una popolazione che presenta una ridotta eterogeneità genetica e allelica. Nei pazienti sardi affetti da SLA la frequenza di storia familiare per malattia del motoneurone o demenza frontotemporale è più alta rispetto ad altre popolazioni caucasiche,^{74;75} con l'eccezione della Finlandia e della Svezia settentrionale.³⁴ Inoltre, si registra anche una maggiore frequenza di pazienti portatori di mutazioni di uno o più geni correlati alla SLA.⁷⁴

Nonostante ciò, un nostro recente studio sull'epidemiologia della SLA nella popolazione della Sardegna centro-settentrionale per il periodo 1995-2009 mostra un'incidenza di malattia in linea con quanto osservato in altri Paesi europei per lo stesso periodo. Tuttavia il carico di SLA appare nettamente aumentato rispetto a quanto riportato, sempre per la popolazione sarda, per gli anni 1957-90. La

distribuzione dell'incidenza di SLA nella Sardegna centro-settentrionale presenta un certo grado di eterogeneità a livello geografico per cui, data la peculiarità delle caratteristiche genetiche, sociali e antropologiche, nonché la possibile diversa concentrazione di fattori ambientali di rischio, si rende necessario approfondire la ricerca eziologica di questa malattia, inclusa la ricerca di mutazioni genetiche e interazioni gene-ambiente.⁷³

Il presente studio si è occupato di studiare dal punto di vista genetico un'ampia coorte di pazienti di origine sarda affetti da SLA. Mutazioni dei geni correlati alla malattia sono state identificate in più del 40% di tutti i pazienti e questo dato costituisce la più alta percentuale di casi geneticamente spiegati rispetto alle altre popolazioni caucasiche al di fuori della Scandinavia.^{31;34;77;78}

Sono state trovate mutazioni nel 74% delle forme familiari di SLA e nel 30% delle forme apparentemente sporadiche. Le mutazioni più frequentemente riscontrate sono state la p.A382T di TARDBP, l'espansione esanucleotidica di C9ORF72 e la mutazione p.G295S di TARDBP. In alcuni pazienti sono state identificate doppie mutazioni, più frequentemente la combinazione di p.A382T di TARDBP e C9ORF72. Un piccolo numero di casi è risultato omozigote per le mutazioni del gene TARDBP.

Una proporzione così grande di casi di SLA portatori di mutazioni genetiche probabilmente riflette un effetto fondatore che opera nella popolazione sarda. La distribuzione geografica di queste mutazioni può fornire indizi sulla possibile origine dei fondatori. La concentrazione dei casi mutati per p.A382T di TARDBP nella Sardegna centro-occidentale suggerisce che probabilmente la mutazione ha avuto origine in quell'area, mentre la mutazione di C9ORF72 probabilmente ha avuto origine nella parte settentrionale dell'isola. È inoltre emerso che i pazienti con la mutazione del gene C9ORF72 presentano l'aplotipo finlandese.⁷⁹ Altri studi hanno già

descritto come questa mutazione sembra essersi verificata circa 1500 anni fa e la sua distribuzione geografica suggerisce che è apparsa nel nord dell'Europa e si è in seguito diffusa da lì. L'alta frequenza in Finlandia e in altre popolazioni isolate potrebbe essere spiegata dalla storia di queste comunità. La Finlandia e la Sardegna sono regioni relativamente isolate e hanno popolazioni geneticamente omogenee originate da un piccolo numero di fondatori. La deriva genetica ha avuto una grossa influenza sulle frequenze alleliche in queste popolazioni e potrebbe spiegare l'alta manifestazione della mutazione in questi isolati geografici.³⁴

La condivisione di un aplotipo comune nella regione del gene C9ORF72 del cromosoma 9p21 in pazienti con forme di SLA familiare e sporadica suggerisce che questi casi apparentemente sporadici sono in realtà casi familiari associati fra loro inconsapevolmente. Questo potrebbe dipendere da molteplici ragioni, fra cui una non completa conoscenza sulla familiarità sia da parte dei pazienti che dei neurologi che li hanno in cura, oppure perché gli individui delle generazioni precedenti potrebbero essere deceduti a una giovane età e prima della manifestazione della sintomatologia.³⁴

Abbiamo inoltre notato come la frequenza di familiarità per malattia del motoneurone o demenza frontotemporale nei casi vari secondo il tipo di mutazione presente: la frequenza più alta è stata osservata nei pazienti con la mutazione SOD1 (100%) e con la mutazione del gene C9ORF72 (64,7%), mentre era più bassa in quelli con le mutazioni p.A382T e p.G295S di TARDBP (rispettivamente 32,1% e 27,3%). Ciò potrebbe indicare una differente penetranza delle mutazioni nella popolazione sarda, suggerendo che quelle per i geni SOD1 e C9ORF72 sono più penetranti, mentre quelle per il gene TARDBP sono state identificate anche in circa l'1% dei controlli sani, molti dei quali erano nella sesta decade di vita senza presentare alcun sintomo della malattia.

Inoltre, fra i pazienti che presentano familiarità per SLA il 26% non è risultato portatore di alcuna mutazione nota, a suggerire che nella popolazione sarda devono ancora essere scoperti altri fattori genetici correlati alla malattia.

Dall'analisi dei fenotipi associati alle varie mutazioni genetiche riscontrate, sono emersi alcuni tratti caratteristici, ma il riscontro di un'eterogeneità fra le famiglie, e persino all'interno delle famiglie con la stessa mutazione, suggerirebbe il ruolo di altri fattori genetici e non genetici che concorrerebbero alla manifestazione della malattia, così come di eventuali interazioni genetiche complesse nei casi di mutazioni doppie. I pazienti con la doppia mutazione C9ORF72/TARDBP hanno un'età di esordio significativamente più bassa, un decorso più aggressivo e più frequentemente un esordio di tipo bulbare.

Conclusioni

I dati del presente studio mostrano un'alta frequenza di mutazioni genetiche fra i pazienti sardi affetti da SLA. Inoltre, sono stati identificati casi che riportano una familiarità per malattia del motoneurone che non risultano portatori di alcuna mutazione genetica nota. Questo indicherebbe la presenza di uno o più nuovi geni ancora da scoprire.

Tutto ciò, anche in considerazione delle caratteristiche fenotipiche distintive, sottolinea la necessità di approfondire la ricerca eziologica di questa malattia, non solo con la ricerca di mutazioni genetiche e interazioni gene-ambiente, ma anche sulla possibile diversa concentrazione di fattori ambientali di rischio.

Bibliografia

1. Bak TH, Hodges JR. The effects of motor neurone disease on language: further evidence. *Brain Lang* 2004; **89**:354-361.
2. Chiò A. La sclerosi laterale amiotrofica. 2008; 180.
3. Wijesekera LC, Leigh PN. Amyotrophic lateral sclerosis. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 2009; **4**:3.
4. Rowland LP, Shneider NA. Amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med* 2001; **344**:1688-1700.
5. Román GC. Neuroepidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: clues to aetiology and pathogenesis. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 1996; **61**:131-137.
6. Lomen-Hoerth C, Murphy J, Langmore S, Kramer JH, Olney RK, Miller B. Are amyotrophic lateral sclerosis patients cognitively normal? *Neurology* 2003; **60**:1094-1097.
7. Beghi E, Logroscino G, Chiò A et al. The epidemiology of ALS and the role of population-based registries. *Biochim Biophys Acta* 2006; **1762**:1150-1157.
8. Mitchell JD, Borasio GD. Amyotrophic lateral sclerosis. *The Lancet* 2007; **369**:2031-2041.
9. Chiò A, Calvo A, Moglia C, Mazzini L, Mora G, group PARALSs. Phenotypic heterogeneity of amyotrophic lateral sclerosis: a population based study. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 2011; **82**:740-746.
10. Bradley W. *Neurology in Clinical Practice: Principles of diagnosis and management*. Taylor & Francis, 2004.
11. Traynor BJ, Codd MB, Corr B, Forde C, Frost E, Hardiman OM. Clinical features of amyotrophic lateral sclerosis according to the El Escorial and Airle House diagnostic criteria: A population-based study. *Arch Neurol* 2000; **57**:1171-1176.
12. Wijesekera LC, Mathers S, Talman P et al. Natural history and clinical features of the flail arm and flail leg ALS variants. *Neurology* 2009; **72**:1087-1094.
13. Cappellari A, Ciammola A, Silani V. The pseudopolyneuritic form of amyotrophic lateral sclerosis (Patrikios' disease). *Electromyogr Clin Neurophysiol* 2008; **48**:75-81.

14. Ince PG, Lowe J, Shaw PJ. Amyotrophic lateral sclerosis: current issues in classification, pathogenesis and molecular pathology. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1998; **24**:104-117.
15. Harvey RJ, Skelton-Robinson M, Rossor MN. The prevalence and causes of dementia in people under the age of 65 years. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 2003; **74**:1206-1209.
16. Ratnavalli E, Brayne C, Dawson K, Hodges JR. The prevalence of frontotemporal dementia. *Neurology* 2002; **58**:1615-1621.
17. Burrell JR, Kiernan MC, Vucic S, Hodges JR. Motor neuron dysfunction in frontotemporal dementia. *Brain* 2011; **134**:2582-2594.
18. Lomen-Hoerth C, Anderson T, Miller B. The overlap of amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Neurology* 2002; **59**:1077-1079.
19. Ringholz GM, Appel SH, Bradshaw M, Cooke NA, Mosnik DM, Schulz PE. Prevalence and patterns of cognitive impairment in sporadic ALS. *Neurology* 2005; **65**:586-590.
20. Lattante S, Ciura S, Rouleau GA, Kabashi E. Defining the genetic connection linking amyotrophic lateral sclerosis (ALS) with frontotemporal dementia (FTD). *Trends in Genetics* 2015; **31**:263-273.
21. Robberecht W, Philips T. The changing scene of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Neurosci* 2013; **14**:248-264.
22. Renton AE, Chiò A, Traynor BJ. State of play in amyotrophic lateral sclerosis genetics. *Nat Neurosci* 2014; **17**:17-23.
23. Perry JJ, Shin DS, Tainer JA. Amyotrophic lateral sclerosis. *Adv Exp Med Biol* 2010; **685**:9-20.
24. Andersen PM. Amyotrophic lateral sclerosis associated with mutations in the CuZn superoxide dismutase gene. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2006; **6**:37-46.
25. Chiò A, Traynor BJ, Lombardo F et al. Prevalence of SOD1 mutations in the Italian ALS population. *Neurology* 2008; **70**:533-537.
26. Andersen PM, Forsgren L, Binzer M et al. Autosomal recessive adult-onset amyotrophic lateral sclerosis associated with homozygosity for Asp90Ala CuZn-superoxide dismutase mutation. A clinical and genealogical study of 36 patients. *Brain* 1996; **119**:1153-1172.

27. Turner MR, Hammers A, Al-Chalabi A et al. Distinct cerebral lesions in sporadic and 'D90A' SOD1 ALS: studies with [11C]flumazenil PET. *Brain* 2005; **128**:1323-1329.
28. Mackenzie I, Rademakers R, Neumann M. TDP-43 and FUS in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *The Lancet Neurology* 2010; **9**:995-1007.
29. Vance C, Rogelj B, Hortobágyi T et al. Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6. *Science* 2009; **323**:1208-1211.
30. Kwiatkowski TJ, Bosco DA, Leclerc AL et al. Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 2009; **323**:1205-1208.
31. Chiò A, Calvo A, Mazzini L et al. Extensive genetics of ALS: a population-based study in Italy. *Neurology* 2012; **79**:1983-1989.
32. Renton AE, Majounie E, Waite A et al. A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron* 2011; **72**:257-268.
33. DeJesus-Hernandez M, Mackenzie IR, Boeve BF et al. Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron* 2011; **72**:245-256.
34. Majounie E, Renton AE, Mok K et al. Frequency of the C9orf72 hexanucleotide repeat expansion in patients with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia: a cross-sectional study. *Lancet Neurol* 2012; **11**:323-330.
35. Popat RA, Van Den Eeden SK, Tanner CM et al. Effect of reproductive factors and postmenopausal hormone use on the risk of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroepidemiology* 2006; **27**:117-121.
36. Morozova N, Weiskopf M, McCullough M et al. Diet and amyotrophic lateral sclerosis. *Epidemiology* 2008; **19**:324.
37. Abhinav K, Al-Chalabi A, Hortobágyi T, Leigh P. Electrical injury and amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review of the literature. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 2007; **78**:450.

38. Cruz DC, Nelson LM, McGuire V, Longstreth WT. Physical trauma and family history of neurodegenerative diseases in amyotrophic lateral sclerosis: a population-based case-control study. *Neuroepidemiology* 1999; **18**:101-110.
39. Govoni V, Granieri E, Fallica E, Casetta I. Amyotrophic lateral sclerosis, rural environment and agricultural work in the Local Health District of Ferrara, Italy, in the years 1964-1998. *J Neurol* 2005; **252**:1322-1327.
40. Miranda M, Alicia Overstreet Galeano M, Tassone E, Allen K, Horner R. Spatial analysis of the etiology of amyotrophic lateral sclerosis among 1991 Gulf War veterans. *Neurotoxicology* 2008; **29**:964-970.
41. Horner R, Kamins K, Feussner J et al. Occurrence of amyotrophic lateral sclerosis among Gulf War veterans. *Neurology* 2003; **61**:742.
42. Noonan C, Reif J, Yost M, Touchstone J. Occupational exposure to magnetic fields in case-referent studies of neurodegenerative diseases. *Scandinavian Journal of Work Environment and Health* 2002; **28**:42-48.
43. Fang F, Kamel F, Sandler D, Sparen P, Ye W. Maternal age, exposure to siblings, and risk of amyotrophic lateral sclerosis. *American journal of epidemiology* 2008; **167**:1281-1286.
44. Sutedja N, Veldink J, Fischer K et al. Lifetime occupation, education, smoking, and risk of ALS. *Neurology* 2007; **69**:1508.
45. Vivekananda U, Johnston C, McKenna-Yasek D et al. Birth order and the genetics of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol* 2008; **255**:99-102.
46. Fang F, Ye W, Fall K et al. Loss of a Child and the Risk of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *American journal of epidemiology* 2008; **167**:203.
47. Armon C, Kurland L, Daube J, O'Brien P. Epidemiologic correlates of sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 1991; **41**:1077.
48. Longstreth WT, McGuire V, Koepsell TD, Wang Y, Van Belle G. Risk of amyotrophic lateral sclerosis and history of physical activity: a population-based case-control study. *Arch Neurol* 1998; **55**:201-206.
49. Veldink JH, Kalmijn S, Groeneveld GJ, Titulaer MJ, Wokke JH, van den Berg LH. Physical activity and the association with sporadic ALS. *Neurology* 2005; **64**:241-245.
50. Armon C. Sports and trauma in amyotrophic lateral sclerosis revisited. *J Neurol Sci* 2007; **262**:45-53.

51. Chiò A, Benzi G, Dossena M, Mutani R, Mora G. Severely increased risk of amyotrophic lateral sclerosis among Italian professional football players. *Brain* 2005; **128**:472-476.
52. Al-Chalabi A, Leigh PN. Trouble on the pitch: are professional football players at increased risk of developing amyotrophic lateral sclerosis? *Brain* 2005; **128**:451-453.
53. Okumura H, Kurland L, Waring S. Amyotrophic Lateral Sclerosis and Polio: Is There an Association? *Annals of the New York Academy of Sciences* 1995; **753**:245-256.
54. Cronin S, Hardiman OH, Traynor BJ. Ethnic variation in the incidence of ALS: a systematic review. *Neurology* 2007; **68**:1002-1007.
55. Weiskopf M, McCullough M, Calle E, Thun M, Cudkowicz M, Ascherio A. Prospective study of cigarette smoking and amyotrophic lateral sclerosis. *American journal of epidemiology* 2004; **160**:26.
56. Nelson L, McGuire V, Longstreth W, Matkin C. Population-based case-control study of amyotrophic lateral sclerosis in western Washington State. I. Cigarette smoking and alcohol consumption. *American journal of epidemiology* 2000; **151**:156.
57. Chen H, Richard M, Sandler D, Umbach D, Kamel F. Head injury and amyotrophic lateral sclerosis. *American journal of epidemiology* 2007; **166**:810.
58. Andersen PM, Borasio GD, Dengler R et al. EFNS task force on management of amyotrophic lateral sclerosis: guidelines for diagnosing and clinical care of patients and relatives. *Eur J Neurol* 2005; **12**:921-938.
59. Andersen PM, Borasio GD, Dengler R et al. Good practice in the management of amyotrophic lateral sclerosis: clinical guidelines. An evidence-based review with good practice points. EALSC Working Group. *Amyotroph Lateral Scler* 2007; **8**:195-213.
60. Andersen PM, Abrahams S, Borasio G et al. EFNS guidelines on the clinical management of amyotrophic lateral sclerosis (MALS)--revised report of an EFNS task force. *Eur J Neurol* 2012; **19**:360-375.
61. 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 Suppl**:96-107.
62. Brooks BR, Miller R, Swash M, Munsat T. El Escorial revisited: revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler* 2000; **1**:293-299.
 63. Soriani MH, Desnuelle C. Epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis. *Rev Neurol (Paris)* 2009; **165**:627-640.
 64. Chiò A, Mora G, Leone M et al. Early symptom progression rate is related to ALS outcome: a prospective population-based study. *Neurology* 2002; **59**:99.
 65. Del Aguila M, Longstreth Jr WT, McGuire V, Koepsell TD, Van Belle G. Prognosis in amyotrophic lateral sclerosis: a population-based study. *Neurology* 2003; **60**:813.
 66. Czaplinski A, Yen AA, Appel S. Amyotrophic lateral sclerosis: early predictors of prolonged survival. *J Neurol* 2006; **253**:1428-1436.
 67. Bourke S, Tomlinson M, Williams T, Bullock R, Shaw P, Gibson G. Effects of non-invasive ventilation on survival and quality of life in patients with amyotrophic lateral sclerosis: a randomised controlled trial. *The Lancet Neurology* 2006; **5**:140-147.
 68. Lee J, Annegers J, Appel S. Prognosis of amyotrophic lateral sclerosis and the effect of referral selection. *J Neurol Sci* 1995; **132**:207-215.
 69. Haverkamp L, Appel V, Appel S. Natural history of amyotrophic lateral sclerosis in a database population Validation of a scoring system and a model for survival prediction. *Brain* 1995; **118**:707.
 70. Argyriou AA, Polychronopoulos P, Papapetropoulos S et al. Clinical and epidemiological features of motor neuron disease in south-western Greece. *Acta Neurol Scand* 2005; **111**:108-113.
 71. Joensen P. Incidence of amyotrophic lateral sclerosis in the Faroe Islands. *Acta Neurol Scand* 2012; **126**:62-66.
 72. Donaghy C, Clarke J, Patterson C, Kee F, Hardiman OH, Patterson V. The epidemiology of motor neuron disease in Northern Ireland using capture-recapture methodology. *Amyotrophic lateral sclerosis: official publication of the*

- World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases* 2010; **11**:374-378.
73. Pugliatti M, Parish LD, Cossu P et al. Amyotrophic lateral sclerosis in Sardinia, insular Italy, 1995-2009. *J Neurol* 2013; **260**:572-579.
 74. Chiò A, Borghero G, Pugliatti M 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**:594-598.
 75. Orrù S, Manolakos E, Orrù N et al. High frequency of the TARDBP p.Ala382Thr mutation in Sardinian patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Clinical Genetics* 2012; **81**:172-178.
 76. Chiò A, Borghero G, Restagno G et al. Clinical characteristics of patients with familial amyotrophic lateral sclerosis carrying the pathogenic GGGGCC hexanucleotide repeat expansion of C9ORF72. *Brain* 2012; **135**:784-793.
 77. Kenna KP, McLaughlin RL, Byrne S et al. Delineating the genetic heterogeneity of ALS using targeted high-throughput sequencing. *J Med Genet* 2013; **50**:776-783.
 78. van Blitterswijk M, van Es MA, Hennekam EA et al. Evidence for an oligogenic basis of amyotrophic lateral sclerosis. *Human Molecular Genetics* 2012; **21**:3776-3784.
 79. Mok K, Traynor BJ, Schymick J et al. Chromosome 9 ALS and FTD locus is probably derived from a single founder. *Neurobiology of Aging* 2012; **33**:209.e3-209.e8.

Ringraziamenti

Si ringraziano tutti i pazienti e le loro famiglie per la grande disponibilità avuta nei confronti di questa ricerca e per aver acconsentito alla raccolta dei campioni.

Per l'opportunità alla partecipazione al presente lavoro si ringrazia inoltre: Prof. Adriano Chiò (Centro regionale esperto per la SLA, Università di Torino); Dott. Giuseppe Borghero (Dipartimento di Neurologia, Università di Cagliari); Prof.ssa Maura Pugliatti (Dipartimento di Scienze Biomediche e Chirurgico-Specialistiche, Università degli Studi di Ferrara); Dott. Bryan Traynor (Neuromuscular Diseases Research Group, Laboratory of Neurogenetics, NIA, NIH, Bethesda, USA).

Si ringrazia per supporto finanziario la Regione Autonoma della Sardegna (Assessorato all'Igiene, Sanità e Assistenza Sociale) e il P.O.R. Sardegna F.S.E. 2007-2013 - Obiettivo competitività regionale e occupazione, Asse IV Capitale umano, Linea di Attività L.3.1.

Questo lavoro è stato in parte supportato da: Ministero della Salute (Ricerca Sanitaria Finalizzata, 2010, grant RF-2010e2309849); Commissione Europea (Seventh Framework Programme - FP7/2007-2013 - grant n° 259867); Joint Programme Neurodegenerative Disease Research (Sophia Project, supportato dal Ministero della Salute, Strength Project, supportato dal Ministero dell'Istruzione, dell'Università e della Ricerca); Agenzia Italiana per la Ricerca sulla SLA (ARISLA) (SARDINIANS Project); Fondazione Vialli e Mauro per la SLA onlus; Fondazione Mauro e Anna Mabetto; Associazione Piemontese per l'Assistenza alla SLA; Assessorato alla Sanità, dell'Igiene e dell'Assistenza della Regione Autonoma della Sardegna; Intramural Research Programs of the US National Institutes of Health; National Institute on Aging (Z01-AG000949-02); National Institute of Neurological Disorder

and Stroke; Center for Disease Control and Prevention/Agency for Toxic Substances and Disease Registry.

I risultati del presente lavoro sono stati pubblicati su una rivista scientifica internazionale e *peer-reviewed*:

Borghero G, Pugliatti M, Marrosu F, Marrosu MG, Murru MR, Floris G, Cannas A, Parish LD, Occhineri P, Cau TB, Loi D, Ticca A, Traccis S, Manera U, Canosa A, Moglia C, Calvo A, Barberis M, Brunetti M, Pliner HA, Renton AE, Nalls MA, Traynor BJ, Restagno G, Chiò A, for the ITALSGEN and SARDINALS consortia. *Genetic architecture of ALS in Sardinia*. *Neurobiology of Aging* 2014 Dec;35(12):2882.e7-2882.e12. Epub 2014 Jul 18.