



UNIVERSITÀ DI PISA

Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale
Direttore Prof. Mario Petri

Dipartimento di Patologia Chirurgica, Medica, Molecolare e dell'Area Critica
Direttore Prof. Paolo Miccoli

Dipartimento di Ricerca Traslazionale e delle Nuove Tecnologie in Medicina e
Chirurgia
Direttore Prof. Giulio Guido

CORSO DI LAUREA SPECIALISTICA IN MEDICINA E CHIRURGIA

“Malattia del motoneurone e stress ossidativo: studio
in doppio cieco dopo supplementazione alimentare
con donatore di curcumina”

RELATORE
CHIAR.MO PROF. Gabriele Siciliano

CANDIDATO
Costanza Bisordi

ANNO ACCADEMICO 2014/2015

INDICE

RIASSUNTO	5
1. INTRODUZIONE	7
1.1 Sclerosi Laterale Amiotrofica – definizione	7
1.2 Anatomia delle vie del controllo motorio volontario	8
1.3 SLA: epidemiologia e fattori di rischio	13
1.4 SLA sporadica: ipotesi patogenetiche	15
1.5 SLA familiare: geni coinvolti	29
1.6 SLA: neuropatologia	32
1.7 SLA: forme cliniche	33
1.8 SLA: diagnosi	38
1.9 SLA: terapia e gestione	45
2. RAZIONALE DELLO STUDIO	51
2.1 La curcumina come agente antiossidante	51
2.2 Esercizio fisico e biomarcatori di stress ossidativo	59
2.3 Curcumina e biodisponibilità	62
3. SCOPO DELLA TESI	65
4. MATERIALI E METODI	66
4.1 Casistica	66
4.2 Protocollo dello studio	70
4.2.1 Disegno dello studio	70
4.2.2 Modalità di somministrazione dell'integratore/placebo	72
4.2.3 Valutazione clinica	73
4.2.4 Eventi avversi	74
4.2.5 L'esercizio test	75
4.2.6 Parametri biochimici dello stress ossidativo	76
4.3 Analisi statistica dei risultati	79
5. RISULTATI	80

5.1 Parametri biochimici	80
5.1.1 AOPP	80
5.1.2 FRAP	84
5.1.3 Tioli	87
5.1.4 Acido lattico	90
5.2 Parametri clinici	94
5.2.1 ALS-FRS-r	94
5.2.1 MRC	95
5.2.3 Contrazione Volontaria Massimale	95
5.2.4 BMI	96
6. DISCUSSIONE	97
7. CONCLUSIONI	113

RIASSUNTO

La SLA (Sclerosi Laterale Amiotrofica) è la forma più comune e aggressiva delle Malattie del Motoneurone, gruppo di condizioni morbose caratterizzate da degenerazione delle cellule motorie localizzate in corteccia e/o nel midollo spinale e nuclei motori del tronco encefalico. La SLA è una malattia neurodegenerativa che interessa in modo selettivo e spesso sincrono i due tipi di motoneurone (superiore o I, situato a livello corticale nell'area motoria primaria, e inferiore o II, situato segmentariamente a livello dei nuclei motori del tronco cerebrale e corna anteriori del midollo spinale), determinando una paralisi muscolare progressiva e a prognosi infausta in 3-5 anni dalla diagnosi.

La SLA ha una incidenza di 1,5-2,5 casi su 100.000 abitanti/anno, interessa prevalentemente i soggetti adulti ed è, nel 90% dei casi, una patologia sporadica, le forme familiari rappresentando il 10% dei casi.

La malattia è attualmente incurabile e la patogenesi resta, ad oggi, sconosciuta, nonostante numerose ipotesi siano state avanzate. Tra queste, la più accreditata vede, al centro, il ruolo di una condizione di eccesso di stress ossidativo, condizione in cui le difese antiossidanti cellulari non riescono a mantenere i livelli delle specie radicaliche ossidanti libere al di sotto della soglia di tossicità. Il sistema nervoso centrale è estremamente sensibile a questo tipo di danno. Numerose evidenze sono a favore anche di un ruolo della disfunzione mitocondriale. Stress ossidativo e disfunzione mitocondriale sono legati in un circolo vizioso, per cui il primo fattore può alterare la funzione mitocondriale, soprattutto mediante un danno ossidativo al DNA mitocondriale, mentre il secondo, attraverso una alterata catena di trasporto degli elettroni, può favorire l'accumulo di specie reattive dell'ossigeno.

La curcumina è un pigmento giallo-arancio, insolubile in acqua, estratto dalla pianta *Curcuma longa*, isolata per la prima volta nel 1815. Il principale effetto biologico della curcumina è la sua attività antiossidante. Essa si comporta da potente *scavenger* di varie specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto, oltre ad inibire la perossidazione lipidica. Da altre evidenze emerge anche una azione trofica da parte di questo composto nei confronti dei mitocondri. Per questi motivi, la curcumina potrebbe avere un potenziale significativo nel trattamento di patologie che sono il risultato di stress ossidativo e disfunzione mitocondriale, tra cui la SLA.

Questa tesi analizza la prima delle due fasi di una sperimentazione clinica terapeutica condotta presso la Clinica Neurologica e basata sulla supplementazione alimentare di

curcumina ad elevata biodisponibilità in un campione di 42 pazienti affetti da SLA. Il protocollo prevede una durata complessiva di 6 mesi, con utilizzo di placebo, in doppio cieco per i primi 3 mesi, a braccio unico ed aperto nei successivi 3 mesi.

Nella prima fase della sperimentazione, oggetto di questo lavoro di tesi, il campione è stato randomizzato in due gruppi, di cui uno ha assunto curcumina, l'altro placebo.

Sono stati presi in considerazione due tipi principali di parametri, clinici e laboratoristici. I parametri clinici analizzati sono stati: la scala ALS-FRS-r (ALS Functional Rating Scale revised), la scala MRC (Medical Research Council), la forza massima teorica media (FMTM), il BMI (Body Mass Index). I parametri biochimici analizzati hanno compreso marcatori circolanti di stress ossidativo e di difesa antiossidante: AOPP (Advanced Oxidation Protein Products), FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power), Tioli (-SH) e acido lattico.

La curcumina ha dimostrato di non influire sul decorso dei parametri clinici presi in considerazione. Diversamente, i dati di laboratorio hanno mostrato risultati contrastanti: mentre su AOPP e tioli il composto sperimentato non ha nessun effetto, sulla FRAP ha un'azione stabilizzante (impedisce la riduzione che si ha inevitabilmente con il progredire della patologia). L'effetto più significativo è quello che la curcumina svolge sull'acido lattico: nei soggetti che hanno assunto l'integratore alimentare è stata osservata una riduzione nell'incremento di lattato durante il test da sforzo utilizzato che richiedeva una contrazione muscolare intermittente a carico incrementale nei muscoli flessori dell'avambraccio, all'arto superiore, suggerendo, pertanto, un effetto della curcumina sulla disfunzione mitocondriale.

Il completamento della seconda fase dello studio, tuttora in corso, a braccio aperto, permetterà una eventuale ulteriore conferma di quanto rilevato in questa prima fase di sperimentazione.

1. INTRODUZIONE

1.1 Sclerosi Laterale Amiotrofica – definizione

La Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA), descritta per la prima volta da Jean-Martin Charcot nel 1869, è la più grave delle Malattie del Motoneurone (Motor Neuron Diseases - MND). Essa è anche nota come Malattia di Lou Gehrig, dal nome del famoso giocatore di baseball che ne fu colpito alla fine della prima metà del '900.

Le MND sono un gruppo di condizioni morbose caratterizzate da degenerazione delle cellule motorie localizzate in corteccia e/o nel midollo spinale e nuclei motori del tronco encefalico. Tra queste, la SLA è la forma più comune e aggressiva, poiché la neurodegenerazione interessa in modo sincrono i due tipi di motoneurone, determinando una paralisi muscolare rapidamente progressiva e a prognosi infausta in 3-5 anni dalla diagnosi (1). La SLA è caratterizzata da una degenerazione selettiva, che risparmia i sistemi sensitivi e i sistemi della coordinazione motoria, e che lascia relativamente intatti i motoneuroni che controllano la motilità oculare e quella degli sfinteri striati ureterali e anorettali, localizzati nel midollo sacrale a livello di S2-S4.

Il nome della malattia deriva proprio dal connubio tra la presenza di una *sclerosi*, dovuta alla gliosi cicatriziale, *laterale*, in quanto la atrofia gliotica riguarda i cordoni laterali del midollo spinale, e l'*amiotrofia* neurogena, perché nell'avanzare della patologia c'è una riduzione della massa muscolare.

1.2 Anatomia delle vie del controllo motorio volontario

Le vie del controllo motorio rappresentano le vie nervose attraverso le quali il Sistema Nervoso Centrale (SNC) controlla le funzioni dell'apparato locomotore.

Le strutture anatomiche coinvolte sono organizzate su più livelli e comprendono: le aree motorie corticali, i sistemi discendenti, i nuclei della base, il cervelletto e il midollo spinale.

La via finale comune è rappresentata dai neuroni somatomotori (o motoneuroni propriamente detti), che sono gli unici a mettersi in contatto con le cellule muscolari striate. Si distinguono i motoneuroni superiori (o **I motoneurone**), situati nel SNC. Questi modulano, in senso eccitatorio o inibitorio, i motoneuroni inferiori (o **II motoneurone**), che sono situati nel corno anteriore del midollo spinale, a livello della lamina IX, e nei nuclei mediali dei nervi cranici del tronco encefalico. Il II motoneurone innerva i muscoli, terminando a livello delle placche motrici; rappresenta quindi il tramite tra SNC e muscoli. Il complesso dato da un II motoneurone (o motoneurone α) insieme alle fibre muscolari da esso innervate costituisce una unità motoria. Ogni fibra muscolare riceve un'innervazione esclusiva da parte di un solo motoneurone e il rapporto neurone/fibre muscolari è caratteristico per ciascun muscolo (2, 3).

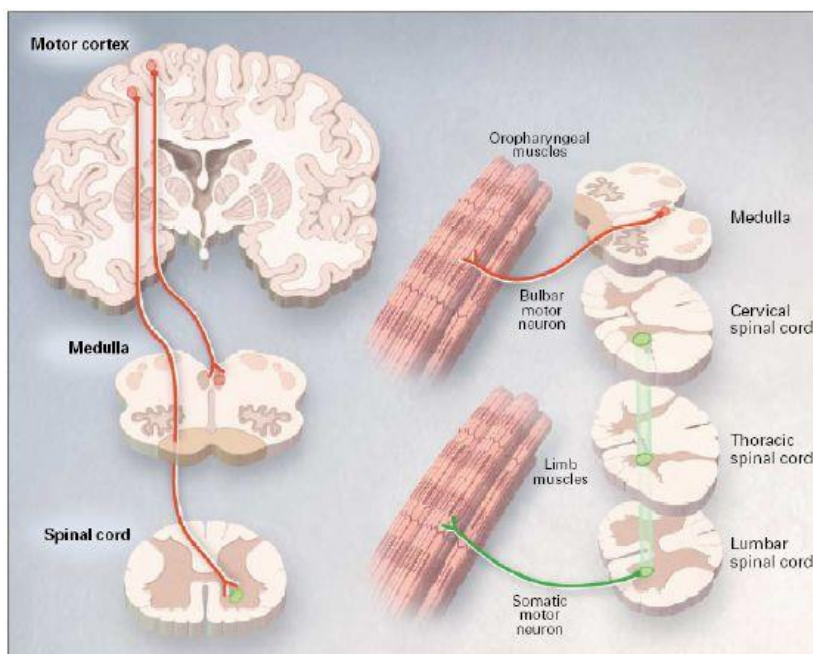


Fig.1 Motoneuroni selettivamente affetti nella SLA.

Aree motorie corticali

La corteccia cerebrale presenta diverse aree deputate al controllo del movimento.

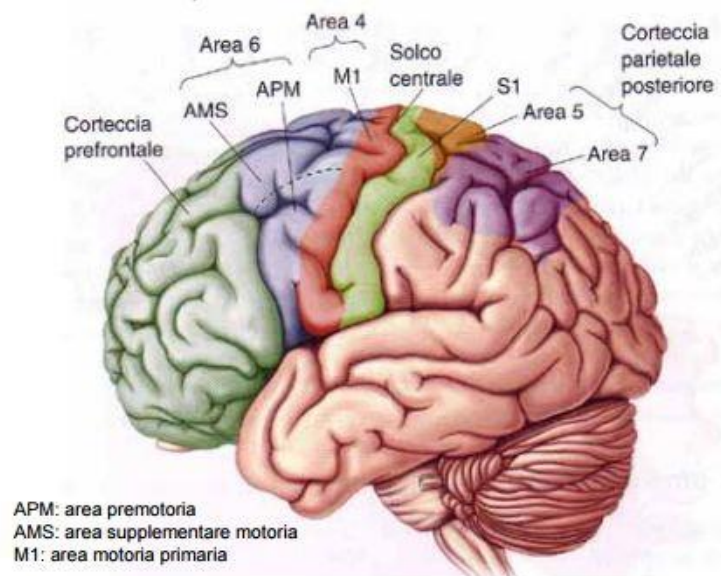


Fig.2 Aree motorie corticali.

L'**area motoria primaria**, MI, (area 4 di Brodmann) è situata nel lobo frontale e corrisponde alla circonvoluzione prerolandica o precentrale. In questa area si possono individuare le rappresentazioni corticali motorie delle diverse parti del corpo. L'estensione corticale non è proporzionale alle dimensioni reali delle varie parti del corpo, ma al diverso rapporto numerico tra fibre muscolari e cellule nervose che le innervano. Ne risulta il cosiddetto homunculus motorio, deforme rispetto alla realtà. L'area motoria primaria sembra avere un ruolo nella regolazione diretta dei movimenti volontari fini e rapidi, soprattutto delle zone distali del corpo.

Questa corteccia è divisibile in sei strati di cellule sovrapposti. Procedendo dalla superficie in profondità, il quinto strato (strato piramidale interno) rappresenta lo strato motorio per eccellenza della corteccia cerebrale. Contiene cellule piramidali di medie e grandi dimensioni ed è la principale uscita verso le strutture sottocorticali (cellule radicolari, cervelletto, nuclei della base). In particolare, nell'area motoria primaria, troviamo le cellule piramidali giganti del Betz, cioè i motoneuroni provvisti di un lungo assone che penetra nella sostanza bianca del midollo spinale (2,3).

L'**area motoria secondaria** o associativa, MII, riceve informazioni da aree corticali associative, partecipa alla pianificazione dei movimenti e proietta infine alla corteccia motoria primaria. Comprende l'area premotoria, l'area motoria supplementare e l'area motoria del cingolo. L'**area premotoria** (aree 6 e 8 di Brodmann) è situata nel lobo

frontale, sulla superficie laterale dell'emisfero, subito al davanti dell'area motoria primaria. Controlla i movimenti dei muscoli assiali e delle radici degli arti; in più ha un ruolo nei movimenti volontari guidati da stimoli sensitivi. L'*area motoria supplementare* (area 6s di Brodmann), localizzata soprattutto sulla faccia mediale dell'emisfero, ha un ruolo nella pianificazione dei movimenti volontari che vengono generati internamente (anziché di quelli che sono generati da uno stimolo). L'*area motoria del cingolo* (aree 6, 23, 24 di Brodmann, sulla faccia mediale dell'emisfero) è localizzata in una regione della corteccia che fa parte del sistema limbico ed ha un ruolo nei movimenti che vengono indotti dalle emozioni (2, 3).

Vie discendenti

Dalla corteccia cerebrale e dal tronco encefalico originano numerose vie motorie che decorrono parallelamente verso il basso. Complessivamente, le vie motorie che originano dalla corteccia cerebrale vengono distinte in vie piramidali e vie extrapiramidali.

Il fascio piramidale rappresenta una via diretta, in quanto nasce dalle aree motorie corticali e proietta alle cellule radicolari senza stazioni intermedie. Esso è essenziale per lo svolgimento di attività motorie qualitativamente più raffinate.

Le vie extrapiramidali comprendono invece un insieme di vie indirette, costituite da fibre che raggiungono i nuclei del tronco encefalico, tramite le quali la corteccia svolge un controllo sulla muscolatura assiale e prossimale.

Le **vie piramidali** comprendono le fibre corticospinali, destinate ai centri somatomotori dei nervi spinali, situati nelle corna anteriori del midollo spinale, e le fibre corticonucleari (corticobulbari, corticopontine, corticomesencefaliche) destinate ai centri somatomotori dei nervi cranici, posti nel tronco encefalico.

Le fibre del fascio corticospinale nascono dalle aree motorie corticali: per il 30% dall'area 4, per il 30% dall'area 6, per il 40% dall'area somestesica primaria (aree 3,1,2) e dalle aree 5 e 7 del lobo parietale. Dalla corteccia, mantenendo un'organizzazione somatotopica, scendono attraverso la corona radiata, dove vanno a costituire il braccio posteriore della capsula interna. In seguito, le fibre piramidali fanno ingresso nel tronco encefalico, dove decorrono nel piede del peduncolo cerebrale del mesencefalo e nel piede del ponte. Dopo il tratto pontino, le fibre giungono nel bulbo, dove si trovano ventralmente e costituiscono delle sporgenze dette piramidi bulbari. A questo livello, l'85% delle fibre decussano sul lato opposto (decussazione delle piramidi) e continuano a decorrere nella porzione dorsale del cordone laterale del midollo spinale, costituendo il fascio corticospinale crociato, che

proietta alle cellule radicolari che innervano la muscolatura della parte distale degli arti. Il restante 15% rimane invece a decorrere nel cordone anteriore, costituendo il fascio corticospinale diretto; raggiunge la commessura anteriore nei vari segmenti e decussa in quella sede, ma è limitato ai segmenti cervicali e toracici superiori, agendo su movimenti assiali di collo, spalle, tronco.

Le vie corticonucleari, invece, comprendono fibre sia crociate sia non crociate (2, 3).

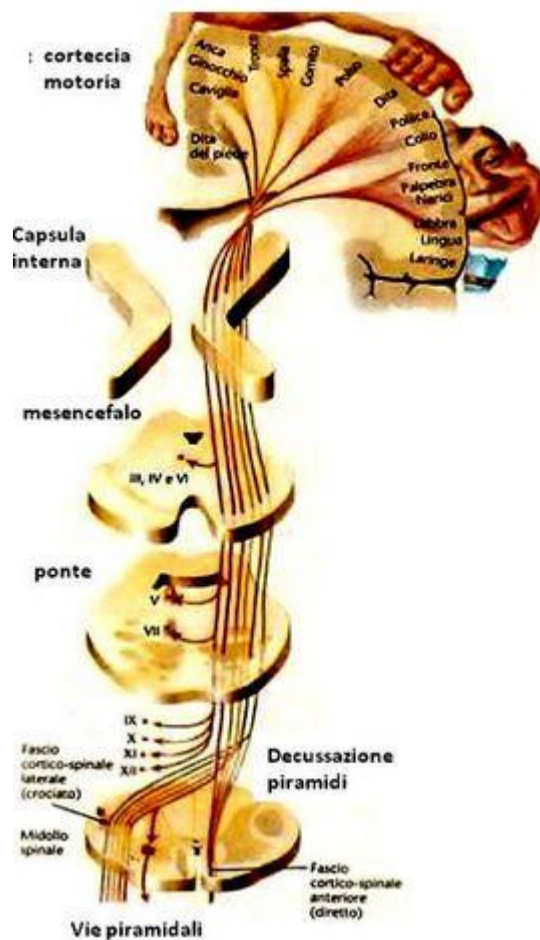


Fig.3 Vie piramidali.

Le **vie extrapiramidali** comprendono un insieme di fasci distinti.

Il *fascio corticorubrospinale*, dalla corteccia, si porta al nucleo rosso del mesencefalo, decussa a livello mesencefalico e discende nella parte dorsale del cordone laterale del midollo spinale arrestandosi a livello della seconda vertebra cervicale. È probabile, pertanto, che svolga un ruolo nella motilità dell'arto superiore ed avrebbe nell'uomo un significato vestigiale.

Il *fascio corticoreticolospinale*, dalla corteccia, raggiunge la formazione reticolare pontina e bulbare. Si distinguono un fascio reticolospinale reticolospinale pontino o mediale, che decorre nel cordone anteriore omolaterale del midollo spinale, e un fascio reticolospinale bulbare o laterale, che decorre nel cordone anteriore e nel cordone laterale sia omo- che eterolateralmente. Entrambi i fasci controllano il mantenimento della postura.

I *fasci vestibolospinali* si distinguono in un vestibolospinale laterale, che origina dal nucleo vestibolare laterale, che riceve afferenze dagli organi recettori dell'equilibrio dell'orecchio interno, e decorre nel cordone anteriore omolaterale. Il fascio vestibolospinale mediale origina dai nuclei vestibolari mediale e inferiore e discende bilateralmente fino ai segmenti cervicali e toracici del midollo spinale. Anche questi fasci contribuiscono al mantenimento della postura eretta.

I *fasci corticotettospinali e corticotettobulbari* originano dalle aree visive 18 e 19 della corteccia, vanno al tetto del mesencefalo, a livello della lamina quadrigemina, poi al bulbo, a livello della formazione reticolare posteriore, infine discendono nel midollo spinale. Coordinano i movimenti della testa e degli occhi (2, 3).

Midollo spinale

Il midollo spinale può essere diviso da un piano sagittale mediano in due metà specularmente uguali, ed è costituito da sostanza bianca alla periferia e sostanza grigia al centro.

In ciascuna metà si distinguono tre raggruppamenti di sostanza bianca: cordone anteriore, cordone laterale, cordone posteriore.

La sostanza grigia ha la forma di "H" maiuscola, è costituita da due masse laterali uguali collegate per mezzo della commessura grigia. In ciascuna delle due masse laterali si distinguono: un corno posteriore, con funzione sensitiva, in cui terminano le fibre della radice posteriore, una massa intermedia e un corno anteriore, con funzione motoria, che contiene i motoneuroni. La sostanza grigia può essere suddivisa in 10 lamine di Rexed a disposizione verticale. Il corno posteriore comprende le lamine dalla I alla IV, la zona intermedia dalla V alla VIII; la lamina X sta intorno al canale centrale del midollo; nel corno anteriore la zona motoneuronale è costituita dalla lamina IX. Anche nel contesto delle corna anteriori, i neuroni sono disposti secondo precisi criteri somatotopici (2, 3).

1.3 SLA: epidemiologia e fattori di rischio

La SLA è una malattia relativamente frequente. La sua incidenza annuale va da 1.5 a 2.5 casi su 100.000 abitanti (4). La prevalenza è di 3-5 su 100.000, valore influenzato dal breve tempo di sopravvivenza della malattia. Nel Pacifico Occidentale esistono numerosi foci di aumentata prevalenza, come nelle regioni di Guam e Papua Nuova Guinea(5) . In queste aree la malattia si presenta in una forma atipica associata a demenza, parkinsonismi, con evidenza di aggregati neurofibrillari diffusi a livello corticale (6). È stimato che in questo momento siano presenti circa 20.000 persone affette da SLA negli Stati Uniti, 28.000 in Europa (di cui 3000 in Italia) (5).

La malattia interessa prevalentemente i soggetti adulti, con una maggiore incidenza nella fascia di età tra i 50 e i 70 anni, mentre si osserva un netto abbassamento della soglia di età nelle forme familiari. Il sesso maschile è di poco più frequentemente affetto di quello femminile (M:F=1,5:1) (5).

La durata di sopravvivenza media è di 3-5 anni. Vi sono descrizioni aneddotiche di una stabilizzazione o addirittura di una regressione della patologia (5). Complessivamente, la durata di malattia varia considerevolmente da pochi mesi fino a 10-15 anni. Sono stati descritti alcuni fattori prognostici, come età, localizzazione di malattia all'esordio, stato nutrizionale e respiratorio alla diagnosi e ritardo tra insorgenza della malattia e diagnosi, ma questi risultano insufficienti a spiegare la forte variabilità di sopravvivenza (4).

Nella grande maggioranza dei casi (90%), la SLA è una malattia sporadica; le forme familiari rappresentano il 10% del totale.

Studi epidemiologici hanno chiamato in causa come fattori di rischio l'esposizione a pesticidi e insetticidi, il fumo e, in un report, il servizio militare (5). Uno studio epidemiologico svolto in Emilia Romagna tra il 2009 e il 2011 ha mostrato dei tassi di incidenza di SLA paragonabili a quelli riportati nei registri europei, ma con una certa eterogeneità microgeografica all'interno della regione italiana. Infatti, il tasso di incidenza risulta maggiore nelle aree a più bassa densità di popolazione e i pazienti con SLA sono più frequentemente impiegati in attività agricole rispetto alla popolazione generale dell'Emilia Romagna, andando a confermare precedenti studi che già riportavano tassi di incidenza superiori nelle zone rurali e tra i lavoratori impiegati in attività agricole. Quindi, sebbene la genetica stia dando il contributo maggiore nell'indagare sull'eziologia della SLA, anche studi epidemiologici volti a mettere in evidenza aree o popolazioni con più alta

incidenza possono essere un punto di partenza per identificare possibili fattori di rischio (7).

Dal punto di vista eziopatogenetico, quindi, numerosi studi condotti nel corso del tempo hanno confermato l'indubbia complessa interazione tra componenti ambientali e suscettibilità genetica (8). Sebbene siano stati fatti progressi nella comprensione delle cause genetiche della SLA, il contributo dei fattori ambientali è più difficile da stabilire. Studi su larga scala sui modelli clinici di SLA, sulla storia individuale precedente l'esordio di malattia, sui tassi di SLA in differenti popolazioni hanno contribuito a migliorare le conoscenze, ma non hanno ancora rivelato un fattore di rischio ambientale certo e replicabile. Si è comunque potuto formulare un modello in cui la SLA è considerata il risultato di un rischio ambientale e del tempo che agisce su un carico genetico preesistente, seguito da un declino che si autoperpetua fino alla morte (9).

Numerosi sono gli ipotetici fattori ambientali chiamati in causa, tra questi i traumi cranici e midollari. Dati recenti hanno mostrato che i giocatori di calcio in Italia hanno un rischio incrementato di SLA, ed i ripetuti traumi cranici potrebbero contribuire a questo aumento. In uno studio caso-controllo si è osservato che, quando comparati con persone che non hanno subito nessun trauma cranico, i soggetti che hanno sperimentato più di un trauma cranico e i pazienti che hanno avuto un trauma cranico negli ultimi 10 anni presentano un aumento statisticamente significativo del rischio di SLA. Nella popolazione studiata, i traumi in altre parti del corpo, come tronco e arti, non hanno mostrato correlazione col rischio di SLA, a supporto del concetto che i traumi cranici aumentano il rischio di SLA (10). Altri studi, invece, non portano a ritenere che i traumi cranici rappresentino un fattore di rischio significativo nello sviluppo della SLA (11). Un altro studio, eseguito su una popolazione di pazienti in Italia, UK e Irlanda, ha mostrato una correlazione tra SLA ed attività fisica strenua, sia legata allo sport sia all'attività lavorativa svolta (12). È stato indagato anche il ruolo di alcune infezioni come possibile fattore di rischio per la SLA; gli agenti infettivi presi in esame comprendono Enterovirus (13) (14), Herpesvirus 6, 7 e 8 (14), funghi (15). Anche il fumo è stato suggerito essere uno dei fattori di rischio per lo sviluppo della SLA, in probabile associazione con un aumento dello stress ossidativo (16), così come l'esposizione a radiazioni o inquinanti ambientali chimici come la formaldeide. Da studi su modelli animali ed esperimenti *in vitro* si ricava che la formaldeide induce *misfolding* e aggregazione di proteine neuronali, conducendo il neurone ad apoptosi. Inoltre la formaldeide aumenta la permeabilità della membrana mitocondriale e causa un

danno ossidativo, in parte riducendo l'attività della superossido dismutasi, meccanismo implicato nella patogenesi della SLA (17).

1.4 SLA sporadica: ipotesi patogenetiche

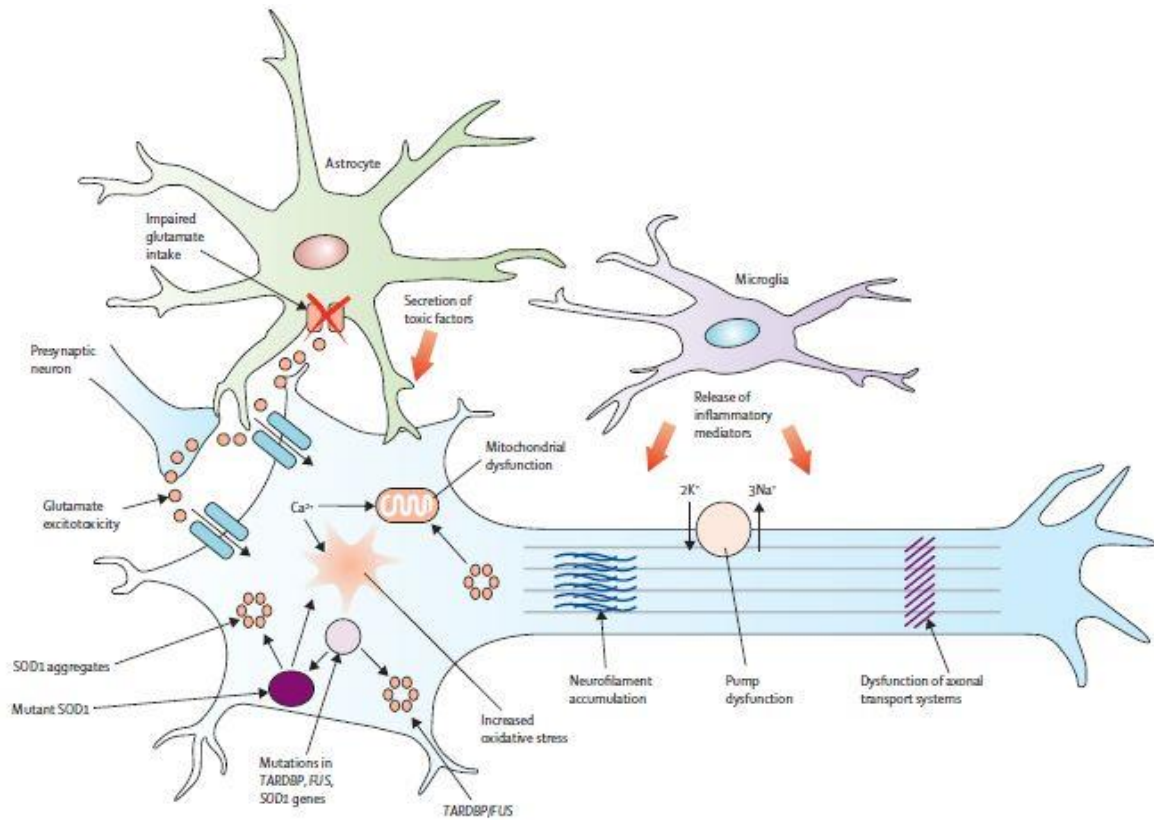


Fig.4 Meccanismi cellulari e molecolari che mediano la neurodegenerazione nella SLA. I meccanismi responsabili della degenerazione dei motoneuroni sono multifattoriali e operano attraverso vie genetiche e molecolari integrate tra loro.(18)

Eccitotossicità glutammatergica

Il glutammato è il principale neurotrasmettitore eccitatorio del sistema nervoso centrale. Il glutammato rilasciato dal neurone presinaptico attiva i recettori ionotropici presenti sul neurone postsinaptico (fig.5A). L'attivazione di questi recettori determina un influsso di ioni Na^+ e Ca^{2+} nella cellula, portandola a depolarizzazione.

L'eccitotossicità è una forma di degenerazione neuronale causata da una iperstimolazione dei recettori del glutammato (19). Sono emerse numerose evidenze che l'eccitotossicità possa contribuire al danno neuronale nello stroke, neurotrauma, epilessia e in vari disordini neurodegenerativi compresa la SLA (20, 21).

Si distinguono due tipi di eccitotossicità: classica e lenta. L'eccitotossicità classica si riferisce ad una degenerazione neuronale che si verifica dopo un aumento della concentrazione extracellulare di glutammato (fig.5B). L'eccitotossicità lenta è la morte di un neurone postsinaptico indebolito in presenza di normali livelli sinaptici di glutammato (fig.5C) (22).

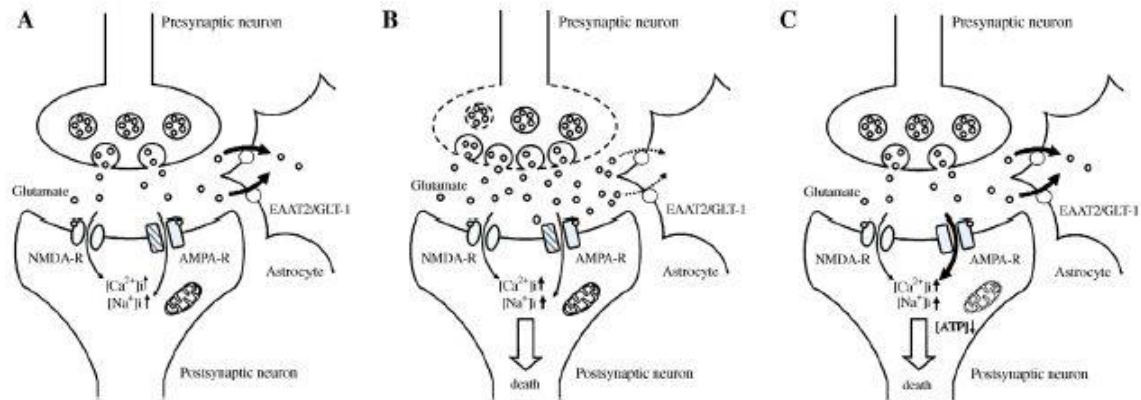


Fig.5 *Eccitotossicità classica e lenta* (23).

Per quanto riguarda l'eccitotossicità classica, un aumento della concentrazione extracellulare di glutammato si può verificare: quando è incrementato il suo rilascio dalla terminazione presinaptica, quando il contenuto intracellulare di glutammato è rilasciato da neuroni danneggiati o quando il reuptake dallo spazio sinaptico è insufficiente. Questo reuptake è assicurato dai trasportatori del glutammato, presenti in neuroni e astrociti. Il più importante trasportatore del glutammato è il EAAT2/GLT1, ampiamente espresso negli astrociti di tutto il SNC.

In entrambe le forme di eccitotossicità, la trasmissione glutammatergica gioca un ruolo fondamentale. Il glutammato rilasciato dal neurone presinaptico attiva diversi tipi di recettori del glutammato, divisi in inotropici e metabotropici. I recettori metabotropici sono accoppiati a proteine G che attivano secondi messaggeri. I recettori inotropici sono canali ionici ligando-dipendenti; questi possono a loro volta essere suddivisi in tre tipi: AMPA (che mediano la trasmissione eccitatoria rapida), NMDA (che mediano la componente tardiva della trasmissione eccitatoria) e KA (il cui ruolo è meno chiaro) (24).

Il principale mediatore del danno neuronale è l'influsso di Ca^{2+} attraverso i recettori NMDA, i recettori AMPA Ca^{2+} -permeabili o i canali del Ca^{2+} voltaggio dipendenti (25).

Un eccessivo influsso di ioni Ca^{2+} può determinare l'attivazione di numerosi enzimi, come lipasi, fosfolipasi, proteasi, endonucleasi, protein chinasi C, xantina ossidasi e NO

sintetasi. Inoltre, la disfunzione mitocondriale dovuta all'aumentato uptake di Ca^{2+} nei mitocondri e la conseguente formazione di specie reattive dell'ossigeno potrebbe contribuire alla morte della cellula per danno eccitotossico (26).

Il recettore NMDA è costituito dalle subunità NR1 e NR2. I recettori AMPA sono tetrameri costituiti da una variabile associazione di 4 subunità (GluR1-4). Il recettore NMDA è sempre permeabile al Ca^{2+} , mentre il recettore AMPA è permeabile al Ca^{2+} in modo variabile a seconda della presenza o assenza della subunità GluR2; i recettori che contengono GluR2 hanno una permeabilità al Ca^{2+} molto bassa (27).

I motoneuroni hanno delle proprietà intrinseche che rendono queste cellule particolarmente vulnerabili al danno eccitotossico, soprattutto mediato dai recettori AMPA. La capacità dei motoneuroni di tamponare l'aumento di Ca^{2+} intracellulare è limitata dalla scarsa espressione in queste cellule delle proteine che stabilizzano il Ca^{2+} . È stato osservato che i motoneuroni spinali non esprimono le proteine leganti il Ca^{2+} parvalbumina e calbindina D28K, mentre altri neuroni meno vulnerabili, come il nucleo di Onuf e oculomotore, esprimono queste proteine. Una diretta conseguenza della bassa quantità di proteine leganti il Ca^{2+} nei motoneuroni è che i mitocondri devono svolgere il ruolo maggiore nel "ripulire" dal Ca^{2+} queste cellule. Il risultato è un sovraccarico di Ca^{2+} nei mitocondri con generazione di specie reattive dell'ossigeno (28).

Inoltre i motoneuroni sembrano avere un'alta proporzione di recettori AMPA permeabili al Ca^{2+} e la stimolazione di questi recettori condurrebbe ad una selettiva morte dei motoneuroni. Ulteriori osservazioni rivelano che i motoneuroni sono relativamente carenti di GluR2 (22).

L'eccitotossicità mediata dai recettori AMPA è aggravata dall'influsso di cloro, attraverso due meccanismi: il cloro aumenta la conduttività dei recettori AMPA e il suo influsso determina una parziale ripolarizzazione che aumenta il gradiente e quindi l'ingresso del Ca^{2+} (29).

Nei pazienti malati di SLA sono state individuate sostanze esogene e endogene correlate al danno eccitotossico dei motoneuroni. Esistono specifiche forme di malattia del motoneurone provocate dall'assunzione orale di eccitotossine; ad esempio la particolare forma di SLA-parkinsonismo-demenza frequente in Guam è causata dalla eccitotossina BMAA (beta-metilamino-L-alanina), che si comporta da agonista dei recettori NMDA e attiva anche i recettori AMPA (30). Per quanto riguarda la presenza di eccitotossine endogene, questa è dimostrata da studi in cui il liquor prelevato da pazienti SLA si è

rivelato tossico su neuroni corticali in coltura e questa morte neuronale poteva essere inibita con gli antagonisti dei recettori AMPA (31).

L'eccitotossicità è conseguente anche ad una ridotta clearance del glutammato. Nei pazienti SLA è stata individuata una perdita selettiva del trasportatore del glutammato astrogliale EAAT2/GLT1 nella corteccia motoria e nel midollo spinale. La mancata espressione di EAAT2 non è accompagnata da una corrispondente riduzione dell'mRNA di EAAT2, con la possibilità quindi che la causa sia da ricercare in anomalie dei processi traduzionali e post-traduzionali (32).

Il più importante argomento a favore del ruolo dell'eccitotossicità nella SLA è il Riluzolo, unico farmaco che rallenta la progressione di malattia e aumenta la sopravvivenza di alcuni mesi. Questo farmaco ha proprietà antieccitotossiche e riduce il rilascio di glutammato, sia perché inibisce la liberazione del glutammato dalla terminazione presinaptica sia perché blocca gli effetti postsinaptici del neurotrasmettitore inibendo i recettori NMDA e AMPA (33).

Fenomeni autoimmunitari

Numerose evidenze suggeriscono un coinvolgimento del sistema immunitario nella patogenesi della SLA.

Una serie di dati supporta l'ipotesi che una risposta immunitaria umorale contro le terminazioni nervose dei motoneuroni possa dare inizio a modificazioni che conducono ad una alterazione dell'omeostasi del calcio; la perdita dell'omeostasi potrebbe indurre morte neuronale attraverso le vie di segnalazione della apoptosi (34).

Sono stati condotti numerosi studi esaminando gli effetti di siero o anticorpi purificati da pazienti SLA, ma le osservazioni sono contrastanti. Alcuni studi (35, 36) riportano che il siero di pazienti SLA sia capace di provocare demielinizzazione e danno/morte dei neuroni spinali e cerebellari in coltura, osservazioni tuttavia non replicate in un seguente studio (37) condotto su colture di motoneuroni; studio che tuttavia è stato volto all'osservazione del corpo cellulare dei motoneuroni ma non della terminazione nervosa motoria, oggetto di danno in un altro studio del 2004 (38). Studi elettrofisiologici su muscoli di topi trattati con siero estratto da pazienti affetti da SLA, contenente ALS-Abs, hanno rivelato modificazioni sinaptiche nei meccanismi molecolari coinvolti nella neurotrasmissione (39). Infine, è stato osservato che i motoneuroni sono suscettibili alla apoptosi attivata dalle caspasi 3 quando colture di motoneuroni sono trattate con ALS-Abs, rispetto alle IgG di controllo (40).

Gli anticorpi individuati nel 40-60% dei pazienti SLA mostrano immunoreattività contro i VDCC (canali del Ca²⁺ voltaggio-dipendenti), in particolare contro quelli di tipo L. Anche se questi canali non sono direttamente accoppiati alla trasmissione sinaptica, essi potrebbero influenzare la disponibilità di vescicole sinaptiche e, di conseguenza, il rilascio di neurotrasmettitori (41). Altri tipi di anticorpi identificati sono diretti contro neurofilamenti, recettore Fas (CD95), proteine muscolari fetali e antigeni vascolari (34).

Altre evidenze che portano a sospettare un ruolo dell'autoimmunità nella patogenesi della SLA comprendono: il fatto che il 19% dei pazienti SLA abbia patologie tiroidee autoimmunitarie (42), la frequente associazione con gli antigeni HLA-A3 e HLA-B12 (43), il riscontro di immunocomplessi a livello sierico e renale (44).

Un altro marker di autoimmunità è il riscontro di infiltrati di linfociti T nel corno anteriore del midollo spinale di pazienti affetti da SLA, comprendenti sia i T-helper sia i T-citotossici (45). Inoltre sono stati recentemente trovati livelli aumentati di IL-17 e IL-23 nel siero e nel liquido cefalorachidiano dei pazienti affetti; questo incremento è ritenuto essere un segno di attivazione della risposta di tipo Th-17, un sottotipo di cellule T correlato alla risposta autoimmune (46). Nel midollo spinale di pazienti SLA si riscontrano anche aumentati livelli di attivazione macrofagica e della microglia, cellule CD68+ attivate, cellule dendritiche immature e attivate, aumentata espressione della chemochina MCP-1, che attrae monociti e cellule dendritiche, e della citochina CSF-M. La velocità di progressione di malattia correla positivamente con la quantità di trascritti di cellule dendritiche (cellule CD1a e CD83) riscontrati (47).

Recentemente indagini PET con traccianti di attivazione microgliale hanno confermato il possibile coinvolgimento del sistema immunitario nella patogenesi della SLA, in particolare uno studio del gennaio 2015 condotto col tracciante di attivazione microgliale [11C]-PBR28, ha dimostrato un'aumentata captazione nella corteccia motoria (giro precentrale) e nei tratti corticospinali di pazienti affetti da SLA comparati con controlli sani. Tale aumentata captazione correlava con score clinici di coinvolgimento di I motoneurone come anche scale di gravità di malattia come la ALS functional rating scale (48), confermando i dati neuropatologici già descritti nel 1992 (49).

Neurofilamenti

Nei motoneuroni di pazienti affetti da SLA è possibile identificare numerose inclusioni, associate ad un alterato ripiegamento proteico e ad una aggregazione di proteine, responsabili di tossicità per la cellula. Il meccanismo, secondo alcuni dati sperimentali,

sembrerebbe essere legato ad alterazioni in alcune vie di trascrizione genica e nel sistema delle proteine *chaperone*.

Nelle forme di SLA associate a mutazione di SOD1, gli aggregati di SOD1 mutata sembrerebbero avere un ruolo nella disfunzione mitocondriale e nelle interazioni con le *heat shock proteins*, conducendo in entrambi i casi ad apoptosi (50).

Tra le componenti intracellulari identificate, abbiamo numerosi aggregati di neurofilamenti. Non è ben chiaro come questi aggregati si formino e se siano causa o conseguenza della disfunzione neuronale.

I neurofilamenti sono costituiti da 3 subunità codificate da specifici geni: NF-L, NF-M, NF-H. L'espressione di NF-L sembra essere fondamentale per il normale assemblaggio dei neurofilamenti. Nei motoneuroni di pazienti SLA si è osservata una riduzione del 60% dell'mRNA di NF-L.

All'opposto, alcuni esperimenti su topi hanno messo in evidenza come l'iperespressione di NF-H o la carenza di NF-L, che determina aggregati di neurofilamenti nel pericario, sembri essere anzi neuroprotettiva. Un'ipotesi è che i neurofilamenti possiedano multipli siti di legame per il Ca^{2+} e che quindi gli aggregati di neurofilamenti possano proteggere contro il danno neuronale dovuto ad un eccessivo ingresso di Ca^{2+} (51).

Anomalie del citoscheletro

Abbondanti aggregati di proteine citoscheletriche sono un *marker* neuropatologico di molte patologie neurodegenerative. Essi comprendono aggregati di proteine dei filamenti intermedi o inclusioni contenenti la proteina tau associata ai microtubuli. La scoperta di mutazioni nei geni per i filamenti intermedi e proteine tau conferma la loro importanza nelle malattie neurodegenerative (tra cui la SLA) (52).

In quasi il 90% delle inclusioni motoneuronali è stata riscontrata la periferina. Essa è un filamento intermedio di tipo III, che normalmente è espresso nei neuroni del sistema autonomo e nei nervi sensitivi periferici, mentre si riscontra in bassa quantità nei neuroni motori spinali. Studi sull'interazione tra periferina e neurofilamenti hanno mostrato che la periferina potrebbe autoassemblarsi a formare reti di filamenti intermedi o eterodimeri con ognuna delle subunità dei neurofilamenti. In assenza della subunità NF-L, l'interazione tra periferina e NF-H o NF-M risulta in una rete disorganizzata e un aggregato proteico. Le inclusioni di periferina sono associate con la conseguente degenerazione assonale e morte dei motoneuroni. Il meccanismo preciso che porta a morte cellulare non è chiaro, ma potrebbe essere correlato a un blocco del trasporto intracellulare a causa delle multiple

inclusioni di filamenti intermedi nell'assone o al sequestro di componenti cellulari, inclusi i mitocondri (53).

Deficit di trasporto assonale

Come detto sopra, le inclusioni di periferina sono sospettate di contribuire ad un deficit di trasporto assonale con conseguente danno neuronale. Uno studio successivo ha mostrato come, invece, nei topi con SOD1 mutata, un'iperespressione o una soppressione della periferina non avevano influenza sull'esordio della malattia. (54)

Disfunzione mitocondriale

I mitocondri sono la principale fonte di energia per la cellula. La degenerazione dei mitocondri è stata evidenziata nei motoneuroni di pazienti con SLA sporadica e in modelli murini. Qui è stato osservato un particolare tipo di vacuolizzazione mitocondriale massiva all'esordio della malattia. Mediante osservazioni morfologiche dettagliate, si è ricavato che questa vacuolizzazione si sviluppa dalla espansione dello spazio intermembrana e che coinvolge i perossisomi, mentre i lisosomi non partecipano. Si è concluso che questa vacuolizzazione non è legata né al classico aumento di permeabilità della membrana mitocondriale né è di origine autofagica. Sembra invece trattarsi di una nuova forma di vacuolizzazione mitocondriale, che è stata definita con il termine di MWISE (Mitochondrial Vacuolation by Intermembrane Space Expansion) (55).

Sappiamo che, in condizioni normali, la funzione mitocondriale si riduce con l'avanzare dell'età e ciò rappresenta un importante fattore di rischio per le malattie neurodegenerative. Tale riduzione è conseguenza di un danno ossidativo al DNA mitocondriale età-dipendente. In biopsie muscolari ed epatiche di pazienti con SLA sporadica sono state osservate, oltre a un danno al DNA mitocondriale, anche anomalie nella catena di trasporto degli elettroni. Inoltre, nel muscolo, è stata riscontrata anche una ridotta concentrazione di SOD manganese-dipendente (un altro membro della famiglia di enzimi SOD presente nella membrana mitocondriale). Questo enzima è fondamentale per la detossificazione dei ROS, quindi una sua minore concentrazione può esacerbare lo stress ossidativo (56).

La disfunzione mitocondriale può condurre ad un deficit energetico. Il neurone è particolarmente vulnerabile alle alterazioni del metabolismo aerobico. Probabilmente, la grande dimensione del motoneurone, rispetto ad altri tipi cellulari ed anche ad altri tipi di neurone, e, di conseguenza, la sua alta domanda di energia, potrebbe renderlo particolarmente vulnerabile agli effetti avversi della disfunzione mitocondriale.

I motoneuroni con metabolismo compromesso sarebbero incapaci di mantenere il potenziale di membrana, con apertura dei recettori del glutammato NMDA e influsso di Ca^{2+} . Quindi la disfunzione mitocondriale potrebbe causare la morte del motoneurone predisponendo queste cellule alla eccitotossicità, ma anche aumentando la generazione di specie reattive dell'ossigeno, così come dando avvio alla via intrinseca della apoptosi.

Evidenti anomalie morfologiche mitocondriali sono state identificate anche in modelli murini di SLA familiare con SOD1 mutata. Studi dettagliati in questi topi rivelano che le alterazioni mitocondriali cominciano prima dell'esordio clinico della malattia, suggerendo come la disfunzione mitocondriale possa essere seriamente implicata nella patogenesi della SLA (57).

Deficit dei fattori neurotrofici

Un fattore ad azione neurotrofica è, per esempio, il fattore di crescita insulino-simile (Igf1), che sembrerebbe coinvolto, oltre che nell'anabolismo muscolare, anche nella sopravvivenza del tessuto nervoso. Un suo deficit potrebbe essere quindi correlato allo sviluppo della malattia (58).

Alterazione del *pathway* pro-apoptotico

È plausibile che alla degenerazione dei motoneuroni partecipino i meccanismi molecolari della apoptosi. Uno studio svolto sul midollo spinale di topi transgenici con SOD1 mutata ha mostrato che la proteina proapoptotica Bax trasloca dal citosol ai mitocondri, mentre il citocromo c trasloca dai mitocondri al citosol; contemporaneamente la caspasi-9 viene attivata. Nelle fasi finali viene attivata anche la caspasi-7 e l'inibitore dell'apoptosi XIAP viene degradato. Queste osservazioni indicano un reclutamento sequenziale di elementi molecolari appartenenti alle vie apoptotiche mitocondrio-dipendenti nei topi transgenici.

In seguito, anche nel midollo spinale di pazienti con SLA sporadica è stata evidenziata, con metodiche immunostochimiche, una traslocazione del citocromo c.

Tutti questi dati suggeriscono che una alterazione del *pathway* pro-apoptotico mitocondrio-dipendente possa contribuire alla perdita di motoneuroni nella SLA (59).

Alterazione del meccanismo autofagico

L'autofagia è un importante processo omeostatico che funziona eliminando gli organelli difettosi e gli aggregati proteici per tutta la vita del neurone. Questo processo catabolico comincia con la formazione di un autofagosoma circondato da membrana, che fagocita

porzioni di citoplasma e successivamente si fonde con un lisosoma a formare un autolisosoma, in cui gli enzimi lisosomali digeriscono i substrati. Numerose mutazioni in geni correlati alla SLA (tra cui SOD1, p62, TDP43 e optineurina) sono state associate a difetti in vari steps del processo autofagico, suggerendo che tali difetti possano giocare un ruolo causativo nella patogenesi della malattia (60).

Inoltre, un marker patologico di SLA è l'accumulo nell'assone di vacuoli autofagici, sollevando così l'ipotesi che un sistema lisosomale disfunzionale possa determinare stress autofagico e degenerazione assonale. Studi su topi SOD1 mutati hanno mostrato una progressiva disfunzione lisosomale nei motoneuroni spinali che inizia già nelle fasi precoci e asintomatiche della malattia. Questo deficit di funzione lisosomale impedisce ai vacuoli autofagici di fagocitare i mitocondri danneggiati dall'assone distale. Questi cambiamenti patologici precoci sono stati attribuiti alla presenza di SOD1 mutato, che interferisce con il traffico endolisosomale dineina-guidato. Tale meccanismo sarebbe correlato non solo alla patogenesi della SLA, ma anche a quella di altre patologie neurodegenerative (61).

In uno studio clinico è stato dimostrato come il litio agisca da induttore dell'autofagia e possa avere un ruolo neuroprotettivo nella SLA. Questo farmaco stimola la biogenesi dei mitocondri nel sistema nervoso centrale e, solo nel midollo spinale, induce neurogenesi e differenziazione neuronale. Gli effetti indotti dal litio comprendono quindi complessivamente: rimozione di mitocondri alterati e aggregati proteici, biogenesi di mitocondri, soppressione della proliferazione gliale, differenziazione di nuovi neuroni nel midollo spinale (62).

Eccessivo stress ossidativo

Lo stress ossidativo è stato proposto come uno dei fattori che giocano un ruolo rilevante nella patogenesi delle malattie neurodegenerative, inclusa la SLA (63).

In tutti gli organismi viventi è possibile individuare l'esistenza di un delicato equilibrio tra la produzione e l'eliminazione di specie chimiche ossidanti. Queste classicamente sono distinte in radicaliche e non radicaliche, variamente centrate sull'ossigeno, sull'azoto, sul carbonio, sugli alogeni e sullo zolfo. La loro generazione può dipendere dall'esposizione ad agenti endogeni o esogeni.(64) Le specie reattive che contengono ossigeno sono prodotte durante la respirazione aerobica, il metabolismo cellulare e la difesa contro agenti patogeni. Il potenziale chimico della molecola di ossigeno risiede nella sua struttura con due elettroni spaiati, che promuove uno spostamento di elettroni. I processi chimici che comportano lo spostamento di singoli elettroni determinano la generazione di molecole

reattive, conosciute come ROS (specie reattive dell'ossigeno) e RNS (specie reattive dell'azoto). Le più conosciute tra queste sono: ossigeno singoletto ($1 O_2$), radicale anione superossido (O_2^-), radicale idrossile (HO°), perossido di idrogeno (H_2O_2), ossido nitrico (NO) e anione perossinitrito ($ONOO^-$) (65).

Una fisiologica concentrazione di ROS e RNS ha importanti funzioni regolatorie e di mediazione, mentre un aumento incontrollato porta ad una catena di reazioni radicaliche che danneggiano le molecole biologiche, reagendo con lipidi, proteine, carboidrati e acidi nucleici. Perciò, per limitare l'accumulo di ROS e RNS, è richiesta la presenza di barriere antiossidanti.

Lo stress ossidativo descrive una condizione in cui le difese antiossidanti cellulari non riescono a mantenere i livelli di ROS e RNS al di sotto della soglia di tossicità. Questo può essere il risultato o di una loro eccessiva produzione o di una perdita delle naturali difese antiossidanti o di entrambi i fattori (66).

Vivere significa produrre radicali liberi, ma quando queste molecole di scarto vengono prodotte eccessivamente, possono diventare così numerose da saturare i nostri sistemi di compenso, continuamente impegnati a rimuoverle dall'organismo.

Le specie radicaliche possono derivare da processi esogeni, come l'esposizione a xenobiotici, infezioni virali e batteriche, radiazioni ionizzanti, ultrasuoni o foto-ossidazione, consumo di alcol e fumo. I processi endogeni sono, invece, reazioni biochimiche che si svolgono normalmente nell'organismo. Ad esempio, la produzione di ROS è un effetto collaterale della respirazione aerobica che si svolge nella membrana mitocondriale interna attraverso la catena di trasporto degli elettroni. Essa consiste in una serie di complessi enzimatici associati alla membrana, in cui l'accettore finale di elettroni e protoni è una molecola di ossigeno, con produzione di una molecola di acqua (67).

Nei mitocondri, l'NO è prodotto a partire da L-arginina e L-citrullina in una reazione catalizzata dall'enzima NOS (ossido nitrico sintetasi), presente in tre isoforme. L'NO è coinvolto in molti processi nel sistema nervoso centrale, come la regolazione del flusso cerebrale e la memoria. Anche le RNS sono importanti nella generazione di stress ossidativo e contribuiscono al danno delle cellule nervose (68).

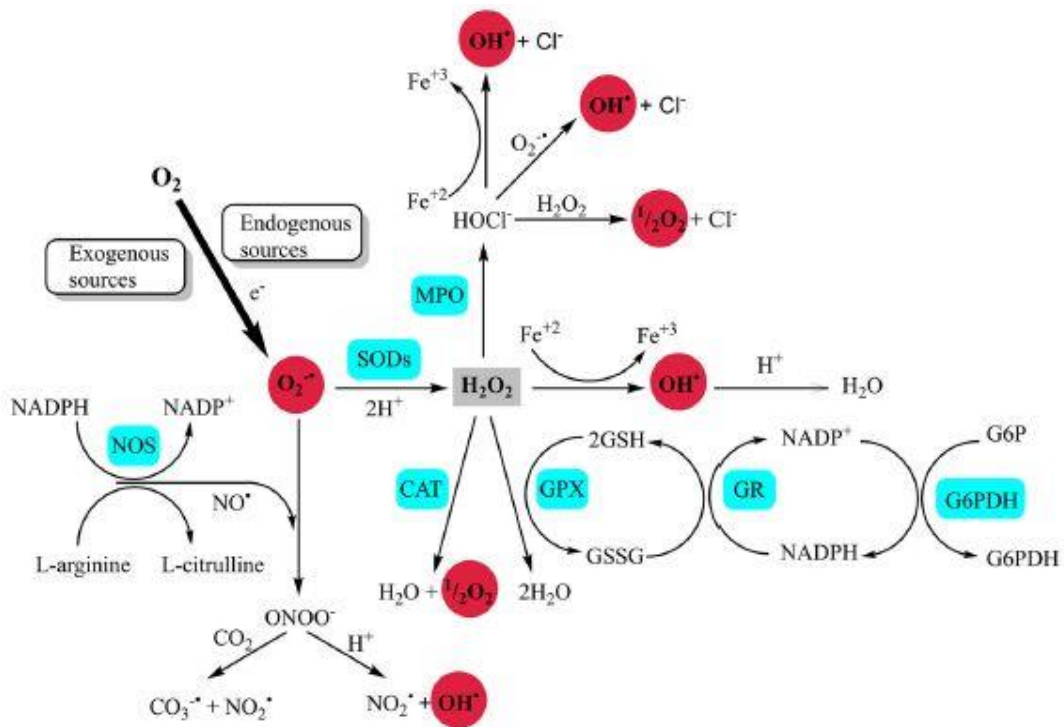


Fig.6 Generazione delle specie reattive dell'ossigeno.(63)

In condizioni normali, i livelli e le attività delle ROS e RNS sono regolati da sistemi di difesa sia enzimatici sia non enzimatici. Tra le difese antiossidanti enzimatiche si trovano: superossido dismutasi (SOD), catalasi (CAT), glutazione perossidasi (GPx) e glutazione reductasi (GR). Tra le difese antiossidanti non enzimatiche si trovano: glutazione (GSH), tioredoxina (Trx), vitamine A, E, C, flavonoidi e proteine come albumina, ceruloplasmina e metallothioneina (63).

Agents	Mechanism
Enzymatic	
Superoxide dismutases (SOD) CuZn-SOD, located in the cytoplasm Mn-SOD, located in the mitochondria EC-SOD extracellular	Scavenges superoxide anion to form H_2O_2
Catalases (CATs)	Peroxisomes remove the hydrogen peroxide
Peroxiredoxins (Prxs)	Reduce free hydrogen peroxide to water
Glutathione peroxidases (GPx)	Catalyzes the reduction of H_2O_2 and alkyl hydroperoxides to H_2O
Glutathione reductases (GRs)	Catalyzes the reduction of oxidized glutathione (GSSG) to reduced glutathione (GSH)
Glutathione S-transferases (GSTs)	Catalyze the conjugation of xenobiotics and endogenous or exogenous electrophilic compounds to reduced glutathione
Thioredoxin reductases (TrxRs)	Repair oxidative damages of proteins
Heme oxygenase-1 (HO-1)	Creation of products with antioxidant properties
Metalloproteins	
Metallothionein (MT)	Physiological metal chelation (Zn, Cu, Se) and xenobiotic metals (Cd, Hg, Ag, As)
Albumin	Chelation of metal ions (Fe, Cu)
Ceruloplasmin (CP)	Chelation of metal ions (Cu)
Ferritin	Chelation of metal ions (Fe)
Transferrin	Chelation of metal ions (Fe)
Non-enzymatic	

Vitamin C (ascorbic acid)	ROS scavenger
Vitamin E (α -tocopherol)	ROS scavenger
Vitamin A (retinol)	ROS scavenger
Carotenoids	ROS scavenger
Melatonin	ROS scavenger
Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)	Coenzyme used in anabolic reactions
Adenosine (ADO)	Endogenous activator of the cellular antioxidant defense system
Uric acid	ROS scavenger
Ubiquinol (the reduced form of coenzyme Q-10)	ROS scavenger
Polyphenols	ROS scavenger, metal chelation, induction of antioxidant enzymes
Phenolic acids	
Flavonoids	
Stilbenes	
GSH reduced glutathione	ROS scavenger
Amino acids (cysteine, homocysteine, methionine, taurine)	ROS scavenger
α -Lipoic acid	ROS scavenger
Lycopene	ROS scavenger
Carotenoids	ROS scavenger
S-adenosyl-L-methionine	ROS scavenger
Selenium	ROS scavenger

Fig.7 Agenti antiossidanti enzimatici e non enzimatici.(63)

Diverse evidenze di letteratura indicano che lo stress ossidativo gioca un ruolo patogenetico rilevante sia nell'invecchiamento precoce che in alcune gravi patologie a sfondo infiammatorio e/o degenerativo, quali l'aterosclerosi, la malattia di Alzheimer e la SLA (69).

Tessuti diversi presentano differente suscettibilità allo stress ossidativo. Il sistema nervoso centrale è estremamente sensibile a questo tipo di danno, per diverse ragioni che includono: un basso livello di antiossidanti, un elevato contenuto di substrati ossidabili e una grande quantità di ROS prodotte durante le reazioni neurochimiche (70). Il solo encefalo, infatti, pur rappresentando il 2% del peso dell'intero organismo, utilizza circa il 20% dell'ossigeno respirato, il quale costituisce elemento essenziale per la generazione delle ROS. In varie aree cerebrali sono riscontrabili, inoltre, cospicue concentrazioni di ferro, il quale contribuisce alla generazione di radicali liberi. Anche alcuni neuromediatrici, come le catecolamine, possono andare incontro a fenomeni di autossidazione e produrre quindi ROS (66).

I mitocondri, per quanto suddetto, possono quindi essere sia una causa di stress ossidativo sia uno dei maggiori meccanismi di "smaltimento" dei radicali liberi.

Essi sono un target dello stress ossidativo in quanto la loro corretta funzione dipende dall'integrità delle membrane e perché possiedono il loro DNA che può essere a sua volta danneggiato. Tuttavia sono anche la principale sede di produzione di ROS; in tessuti

prelevati da pazienti SLA, come encefalo, midollo spinale e linfociti, è stata osservata una alterazione nella catena respiratoria mitocondriale.

La disfunzione mitocondriale e lo stress ossidativo hanno entrambi come conseguenza l'aumentata produzione di ROS e RNS, lo stress del reticolo endoplasmatico, alterazioni dei processi riguardanti l'RNA. Questi processi causano, a loro volta, altri effetti dannosi, come la formazione di proteine malripiegate che formano aggregati citosolici e mitocondriali e sono correlati ad un alterato trasporto assonale.

Il confine tra cause e conseguenze di ognuno di questi eventi è difficile da tracciare, dal momento che sono tutti strettamente connessi e interdipendenti (71).

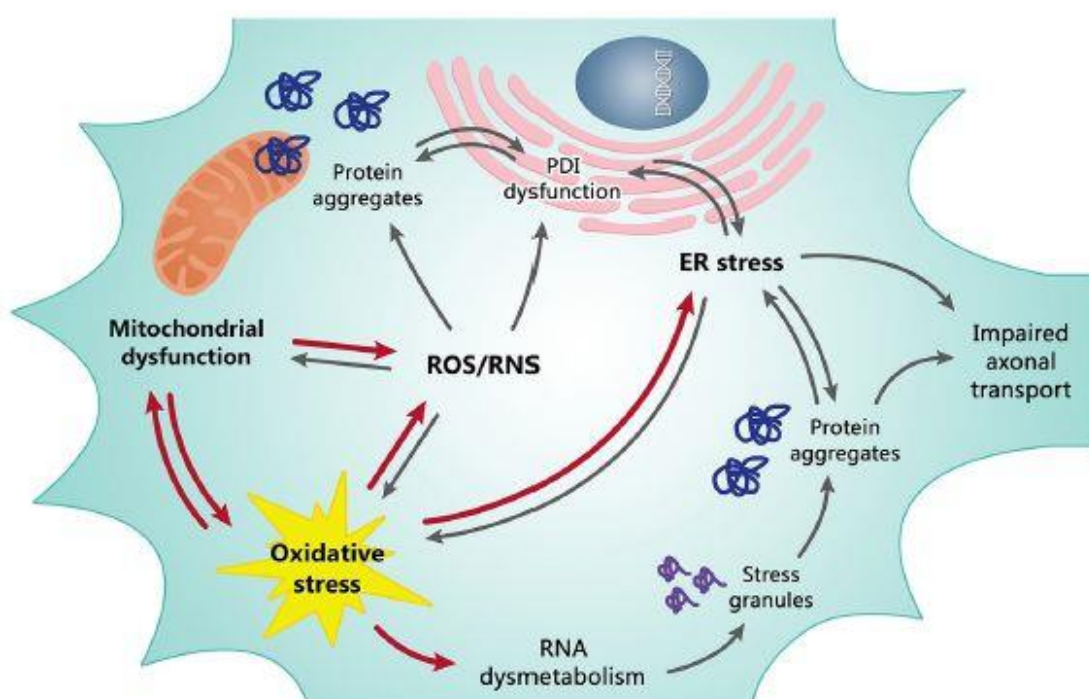


Fig.8 La disfunzione mitocondriale e lo stress ossidativo sono strettamente interdipendenti e sono la base di numerose alterazioni cellulari nella SLA. Le frecce rosse possono essere considerate cause primarie, le frecce grigie possono essere considerate effetti o cause secondarie.(71)

Le malattie neurodegenerative sono accomunate dal riscontro di alti livelli di biomarkers di stress ossidativo e bassi livelli di biomarkers di difesa antiossidante nel sistema nervoso centrale e nei tessuti periferici.

Studi eseguiti post-mortem su campioni di tessuti ricavati da pazienti con SLA sporadica o familiare supportano l'ipotesi di un danno ossidativo rivolto verso lipidi, proteine,

carboidrati e DNA, tramite il riscontro di biomarkers di stress ossidativo, di perossidazione lipidica, di danno proteico, ai carboidrati e al DNA.

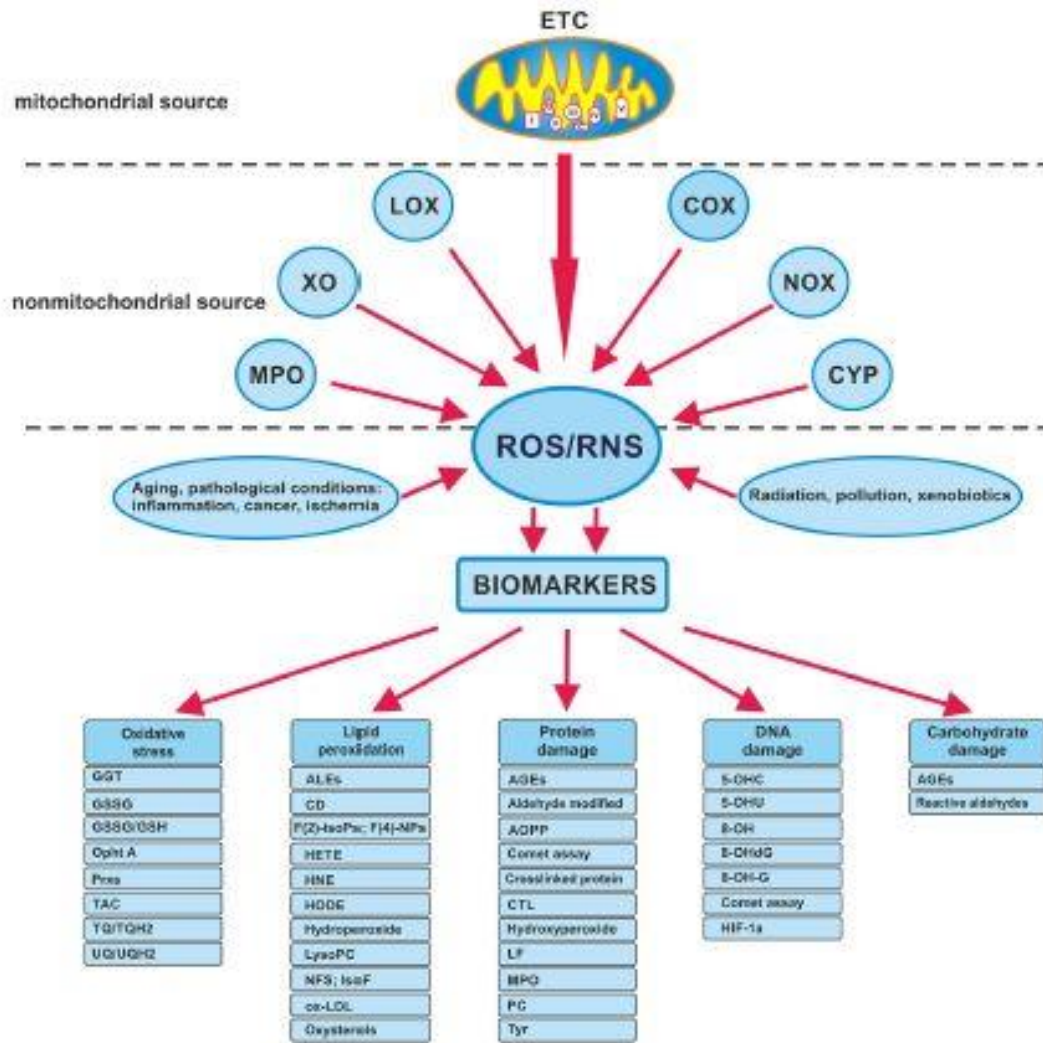


Fig.9 Biomarkers di stress ossidativo.(63)

Ad esempio, sono stati dimostrati livelli aumentati di HNE e 3-NT (3-nitrotirosina) nel liquido cefalorachidiano di pazienti con SLA sporadica, oppure un aumento di 8-OHdG sia in pazienti con SLA sporadica sia familiare. In entrambi i casi non è stata dimostrata, però, una correlazione tra questi markers e la durata o gravità di malattia. Oppure, aumentati livelli di AOPP (Advanced Oxidation Protein Products) e ridotti livelli di FRAP (Ferric-Reducing Ability of Plasma) sono stati riscontrati nel plasma o negli eritrociti di pazienti affetti da SLA sporadica, confermando un'alterazione dello stato redox. Anche le urine, nei pazienti con SLA sporadica, hanno mostrato un contenuto aumentato di isoprostanoidi (IsoPs) e 8-OHdG, markers di stress ossidativo (63).

La presenza di biomarkers di stress ossidativo in regioni del sistema nervoso centrale che sono critiche per la SLA suggerisce come essi siano implicati nella degenerazione dei motoneuroni; ciò è stato confermato da recenti studi eseguiti su pazienti affetti tramite PET. Inoltre da questo studio si è ricavato che l'entità dello stress ossidativo correla con la gravità clinica della malattia (72).

La maggior parte degli studi sui biomarkers di difesa antiossidante nei pazienti affetti da SLA ha mostrato cambiamenti nei tessuti periferici o nel liquido cefalorachidiano, ma raramente nell'encefalo.

Ad esempio, i livelli di GSH erano ridotti negli eritrociti di pazienti SLA in uno studio, mentre un altro studio di imaging ha mostrato ridotti livelli di GSH anche nella corteccia motoria. L'attività dell'enzima SOD si è rivelata ridotta nei globuli rossi e nel liquor di soggetti con SLA sia sporadica sia familiare. Lo stesso si è dimostrato anche per l'enzima CAT; inoltre, la riduzione di CAT si è visto essere correlata alla progressione di malattia. La glutatione perossidasi (GPx) tipo 3 e la glutatione reduttasi (GR) si sono mostrate ridotte rispettivamente nel plasma e nei globuli rossi.

Al contrario, i livelli di altri antiossidanti nel plasma o nel liquor (come vitamina E, beta-carotene, vitamina C, acido urico, molecole contenenti gruppi tioli) sono risultati elevati o non modificati, a seconda dello studio in questione.

I risultati divergenti possono essere spiegati con l'eterogeneità della SLA; infatti, i pazienti affetti variano nella velocità di progressione e nella durata di malattia. Uno studio ha mostrato che l'attività di GPx, GR e CuZn SOD negli eritrociti era diminuita nei pazienti che avevano una più rapida progressione di malattia e che l'attività di SOD1 diminuiva progressivamente nel corso della malattia. Tutto ciò supporta l'ipotesi che la SLA abbia molte varianti che differiscono nei meccanismi patogenetici e nel loro profilo di risposte antiossidanti enzimatiche o non enzimatiche (63).

L'ipotesi del ruolo dello stress ossidativo nella patogenesi della SLA ha portato a sperimentare varie sostanze ad attività antiossidante per cercare di rallentare la progressione della malattia, di cui la maggior parte ha fallito. La vitamina E non ha avuto influenza sulla sopravvivenza. L'edavarone, uno "spazzino" dei radicali liberi, elimina i perossidi lipidici e i radicali idrossili; il trattamento ha mostrato effetti positivi sui livelli plasmatici di acidi grassi liberi, su markers di danno ossidativo e sui cambiamenti progressivi nella scala ALSFRS-R (73).

Altri agenti antiossidanti, come acetilcisteina, creatina, selegilina, non hanno mostrato effetti significativi sulla progressione clinica e sulla sopravvivenza (63).

1.5 SLA familiare: geni coinvolti

Oltre alla forma sporadica, il 5-10% dei casi di SLA rappresenta forme ereditarie. Queste si presentano spesso con fenotipi di malattia molto simili a quelli delle forme sporadiche, ma con un'età di insorgenza tendenzialmente anticipata.

I geni implicati nella SLA familiare attualmente conosciuti comprendono:

Patologia:	Locus:	Gene coinvolto:
SLA1	21q22.1	SOD1 (superossido dismutasi-1)
SLA2	2q33	Alsina
SLA3	18q21	sconosciuto
SLA4	9q34	SETX (senataxina)
SLA5	15q15.1- 21.1	Sconosciuto
SLA6	16q12	FUS/TLS (fused in sarcoma/translated in liposarcoma)
SLA7	20p13	sconosciuto
SLA8	20q13.33	VAPB (proteina di membrana associata alle vescicole)
SLA9	14q11	ANG (angiogenina)
SLA10	1p36.2	TARDBP o TDP-43 (TAR DNA binding protein)
SLA12		OPTN (optineurina)
SLA14		VCP (proteina contenente valosina)
SLA18	17p13.2	PFN1 (profilina-1)
SLA- Demenza fronto- temporale		MAPT (proteina associata ai microtubuli Tau)
SLAX	Xp11.21	UBQLN2 (ubiquilina 2)
SLA	2p	Dinactina
SLA	17q	Paraoxonasi 1-3
SLA	mtDNA	Citocromo c ossidasi
SLA	mtDNA	tRNA per isoleucina

(74).

SLA-1 → mutazione di SOD1

Un vero e proprio passo avanti nella comprensione della patogenesi della SLA si è avuto nel 1993, quando è stato scoperto che le mutazioni a carico del gene codificante per la SOD1 erano responsabili di quadri di SLA familiare sovrapponibili, dal punto di vista fenotipico, alla forma sporadica. Tale scoperta ha portato, infatti, a investigare il ruolo dell'omeostasi ossidoriduttiva nella fisiopatologia della SLA, in seguito ad evidenze di un aumentato stress ossidativo (per una acquisizione di funzione tossica da parte della proteina mutata, piuttosto che per la sola perdita di funzione dell'enzima) (74).

La mutazione di SOD1 è la più frequente e si riscontra nel 20% delle SLA familiari.

La SOD è un enzima rame e zinco-dipendente, citoplasmatico, ubiquitario, che si trova sotto forma di omodimero. Appartiene alle difese antiossidanti di tipo enzimatico, detossificando il radicale anione superossido; permette lo smaltimento dei radicali liberi prodotti durante il processo di respirazione mitocondriale, mantenendone la concentrazione al di sotto della soglia di tossicità (8).

Attualmente si conoscono più di 70 tipi di mutazioni diverse del gene SOD1, coinvolgenti tutti e 5 gli esoni. La maggior parte dei pazienti affetti da SLA familiare sono eterozigoti per la mutazione, hanno un allele normale, suggerendo che la malattia sia il risultato di una acquisizione di funzione citotossica, piuttosto che di una perdita di attività; infatti, la maggior parte delle mutazioni di SOD1 lasciano l'attività dell'enzima intatta (32). È stato osservato che la proteina mutata ha una conformazione instabile, favorendo la formazione di aggregati proteici all'interno dei motoneuroni spinali e corticali, che condurrebbe a sua volta ad una serie di danni successivi, dall'alterazione del trasporto assonale, ad una alterazione della funzione mitocondriale (5).

La presentazione clinica non è distinguibile dalle forme sporadiche, tranne alcune mutazioni specifiche che correlano con un'età di esordio e una durata di malattia più tipiche (32).

SLA-6 → mutazione di FUS/TLS (fused in sarcoma/translated in liposarcoma)

SLA-10 → mutazione di TDP-43 o TARDBP (TAR DNA binding protein)

Ciascuna delle due mutazioni si riscontra nel 5% delle SLA familiari. La funzione di TDP-43 consiste nel regolare la maturazione e la traslocazione dell'mRNA, portando ad esempio all'alterazione dei livelli di mRNA codificanti per le catene leggere dei neurofilamenti, con conseguente alterazione del trasporto assonale. Un ruolo analogo, di

regolazione del metabolismo dell'mRNA, è svolto dalla proteina FUS/TLS. (74) Complessivamente, entrambe le proteine si spostano tra nucleo e citoplasma, regolando la proliferazione cellulare e l'espressione genica a vari livelli, sia nel citoplasma che localmente a livello delle spine dendritiche in risposta agli stimoli elettrici, modulando la plasticità sinaptica (5). La mutazione di FUS/TLS e TARDBP è associata alla formazione di aggregati proteici tossici per i motoneuroni.

c9orf72 → Numerosi studi hanno identificato il gene c9orf72 (Chromosome 9 Open Reading Frame 72), implicato nel 40% delle forme familiari di SLA, ma anche nel 10% circa delle forme sporadiche. La mutazione corrisponde all'espansione dell'esanucleotide GGGGCC, situato all'interno dell'introne 1. Il numero di ripetizioni nella popolazione sana è inferiore a 24, mentre i pazienti con SLA hanno dalle 700 alle 1600 ripetizioni. La proteina codificata dal gene c9orf72 ha una funzione ad oggi sconosciuta (75).

Una scoperta importante nell'ambito delle malattie neurodegenerative è che proteine aberranti, che nelle forme familiari di malattia originano da mutazioni genetiche, sono spesso implicate anche nella genesi delle varianti sporadiche delle stesse malattie. Ad esempio sono state riscontrate delle modificazioni post-traduzionali, non ereditarie, del gene SOD1, che hanno un ruolo nella patogenesi della SLA sporadica (5).

1.6 SLA: neuropatologia

La SLA è caratterizzata da una degenerazione selettiva dei motoneuroni inferiori e superiori. Sebbene, al suo esordio, la perdita di funzione possa riguardare solo i motoneuroni o superiori o inferiori, il coinvolgimento di entrambi è obbligato con l'evoluzione della malattia. I motoneuroni affetti vanno incontro a raggrinzimento, spesso con accumulo di pigmento lipidico; il citoscheletro viene colpito in fase precoce di malattia. Frequentemente si hanno dilatazioni a livello assonale, date da accumuli di neurofilamenti e altri aggregati proteici. Si può osservare anche una gliosi reattiva, con proliferazione della astroglia e microglia.

La perdita dei motoneuroni corticali dà luogo ad assottigliamento dei tratti corticospinali. La perdita di fibre nelle colonne laterali del midollo spinale, unita alla gliosi che conferisce loro un indurimento particolare, porta al quadro della cosiddetta sclerosi laterale.

A livello muscolare si nota il classico quadro dell'amiotrofia neurogena, con fibre normali frammiste a fibre in degenerazione e aumento del connettivo. Nelle fasi precoci di malattia, le miofibre denervate possono essere reinnervate da collaterali, acquisendo le caratteristiche della nuova unità motoria. (5)

1.7 SLA: forme cliniche

Le manifestazioni cliniche della SLA variano a seconda dell'interessamento prevalente del I o del II motoneurone e in base al distretto corporeo colpito.

I segni di interessamento del I motoneurone comprendono, per degenerazione del tratto corticospinale:

- ipertono spastico (i pazienti lamentano una rigidità muscolare spesso sproporzionata rispetto al grado effettivo di ipostenia),
- riflessi osteotendinei (ROT) vivaci,
- positività del segno di Babinski,
- clono,
- labilità emotiva (riso e pianto spastici).

I segni di interessamento del II motoneurone comprendono:

- deficit di forza,
- amiotrofia,
- crampi muscolari,
- fascicolazioni,
- riflessi osteotendinei (ROT) ridotti o assenti,
- riduzione della capacità ventilatoria.

I sintomi e segni bulbari sono più difficilmente riconducibili all'interessamento del solo I o II motoneurone. Generalmente la degenerazione delle proiezioni corticobulbari (I motoneurone) dà luogo a disartria, a un'esagerazione della mimica espressiva degli stati emotivi e a labilità emotiva (episodi di riso e pianto spastici).

Quando la denervazione iniziale interessa la muscolatura bulbare (II motoneurone), all'esordio si avrà una difficoltà nella masticazione, nella deglutizione e nei movimenti della faccia e della lingua.

È caratteristico della SLA che, indipendentemente dal fatto che la malattia colpisca inizialmente i motoneuroni superiori o inferiori, entrambi i tipi neuronali verranno alla fine coinvolti dalla patologia.

Anche in fase tardiva, le funzioni sensitive e sfinteriche sono preservate. La motilità oculare è risparmiata fino alle ultimissime fasi di malattia (5).

A seconda del distretto corporeo interessato all'esordio vengono riconosciute diverse forme cliniche di SLA. L'identificazione di uno specifico fenotipo ha importanti implicazioni per i pazienti, soprattutto dal punto di vista della velocità di progressione di malattia e della prognosi.

Forma classica o di Charcot o spinale. È la forma più frequente, si ritrova nel 40% dei casi sporadici. In questa forma c'è un interessamento già misto fin dall'inizio, con segni di I e II motoneurone, che comincia con una difficoltà di movimento e perdita di destrezza manuale. Il quadro si caratterizza per amiotrofia e fascicolazioni, che esordiscono soprattutto a livello delle mani (muscoli interossei, dell'eminenza tenar e ipotenar). Si configura il quadro della cosiddetta "mano a scimmia". La distribuzione è asimmetrica all'esordio. Progressivamente, la limitazione funzionale aumenta in parallelo al peggioramento dell'amiotrofia, che si estende sempre più prossimalmente.



Fig.10 Ipotrofia/atrofia dei muscoli della mano.(76)

Una caratteristica tipica della SLA è la distribuzione non proporzionata dell'atrofia, che coinvolge maggiormente l'eminenza tenar e il primo interosseo, dando la cosiddetta "split hand". Il motivo di questo interessamento non proporzionato non è del tutto chiaro, ma si pensa che sia dovuto al fatto che l'eminenza tenar e il primo interosseo ricevono

connessioni corticospinali più estese e potrebbero essere soggetti ad una maggiore eccitotossicità mediata dal glutammato.

Si riscontra anche iperreflessia osteotendinea diffusa. Soprattutto a livello degli arti inferiori, possono comparire crampi dolorosi, si ha ipostenia spastica, iperreflessia, clono achilleo o rotuleo inesauribile. Può essere presente il segno di Babinski. La compromissione bulbare è in genere più tardiva; ciò spiega la sopravvivenza più prolungata di questi pazienti rispetto a quelli con esordio bulbare.

Forma bulbare. Si ritrova nel 25% dei casi. È la forma più aggressiva, che porta rapidamente a disartria, disfagia e dispnea. Esordisce con difficoltà nella pronuncia di alcuni fonemi, con ipotrofia e fascicolazioni della lingua, seguite da paralisi del velo pendulo, rinolalia, impossibilità a protrudere la lingua, fino al quadro franco di disartria o anartria.



Fig.11 Atrofia linguale e assenza di elevazione del palato.(76)

Il deficit motorio coinvolge anche la deglutizione, portando a disfagia. La disfagia e la difficoltà ad aprire la bocca spesso richiedono che il paziente si alimenti in modo supplementare mediante gastrostomia endoscopica percutanea (PEG).

Infine il deficit riguarda anche i muscoli respiratori, portando a dispnea. Un precoce coinvolgimento dei muscoli respiratori può portare a morte prima che la malattia sia diventata avanzata in altri distretti. La morte avviene in genere per ab ingestis o per insufficienza respiratoria.

Anche i muscoli del collo vengono colpiti, con conseguente caduta del capo. Spesso si associano anche sintomi emotivi, con episodi di riso e pianto spastici, che delineano la “sindrome pseudobulbare”.

Le forme bulbari sono quelle che presentano sopravvivenze più limitate.

Forma pseudopolinevritica. Si ritrova nel 30% dei casi. È caratterizzata da un progressivo deficit di forza distale, a livello degli arti inferiori, con riduzione o abolizione dei riflessi profondi.

Flail Arm Syndrome (FAS) o forma di Vulpian-Bernhardt. È caratterizzata da una netta prevalenza di interessamento del II motoneurone, che porta a diplegia brachiale ingravescente. L'atrofia prossimale e simmetrica dell'arto superiore conduce ad una incapacità di sollevare l'arto contro gravità, configurando il quadro del cosiddetto "uomo nel barile".

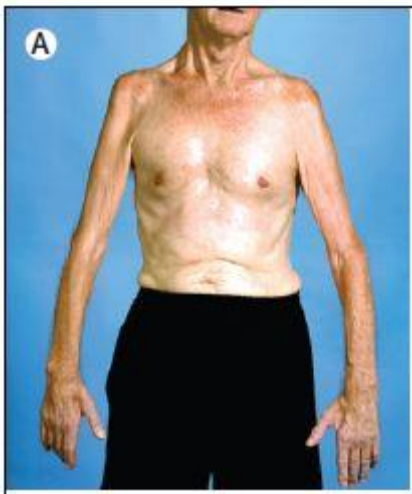


Fig.12 "Uomo nel barile" (76)

Il coinvolgimento del I motoneurone, dei muscoli bulbari e respiratori compare più tardivamente.

Flail Leg Syndrome (FLS). Analogamente alla FAS, c'è un prevalente interessamento del II motoneurone con deficit di forza ingravescente agli arti inferiori. Anche in questo caso, il coinvolgimento del I motoneurone, dei muscoli bulbari e respiratori compare più tardivamente.

Entrambe le forme, FAS e FLS, hanno un decorso più benigno.

Sclerosi Laterale Primaria. È caratterizzata da un interessamento esclusivo o quasi del I motoneurone, con segni di II motoneurone che sono assenti almeno per i primi 4 anni. È una forma rara a lentissima progressione (32, 76).

Modalità di presentazione atipiche della SLA includono: calo ponderale (indicatore di prognosi negativa), crampi e fascicolazioni in assenza di atrofia muscolare, labilità emotiva e disturbi cognitivi di tipo frontale.

Astenia e ridotta capacità di esercizio sono sintomi comuni nella SLA e, con la progressione della malattia, la maggior parte dei pazienti necessita di assistenza per le attività quotidiane.

La disfagia, che sviluppano molti pazienti, con conseguente calo ponderale e malnutrizione, è un fattore negativo di prognosi.

L'interessamento respiratorio si presenta frequentemente, portando a dispnea, ortopnea, ipoventilazione con conseguente ipercapnia, cefalea mattutina al risveglio. La morte diviene imminente quando il paziente sviluppa dispnea a riposo. La progressiva atrofia dei muscoli respiratori conduce a insufficienza respiratoria, che può essere precipitata da polmoniti intercorrenti (76).

Un deterioramento cognitivo, fino ad una vera e propria demenza, può essere presente fino al 20% dei pazienti con SLA. In particolare, si riscontra un overlap fra SLA e demenza frontotemporale (Frontotemporal dementia - FTD). La recente identificazione di inclusioni citoplasmatiche ubiquitinate TDP-43 positive in quasi tutti i casi di SLA e in più della metà dei pazienti con FTD ha risollevato l'interesse nello studio dell'overlap tra queste due malattie neurodegenerative. Inoltre ci sono dei raggruppamenti familiari di entrambe le patologie, con casi a ricorrenza familiare di SLA, di FTD o di forme SLA-FTD.

La FTD è caratterizzata da deficit che riguardano le funzioni esecutive, il linguaggio, la personalità, con problemi nella capacità di giudizio e un deterioramento della capacità di svolgere le attività quotidiane. Tutto ciò porta a difficoltà nella gestione di questi pazienti. Per i soggetti con alterazioni del linguaggio, soprattutto quando in associazione a sindrome pseudobulbare, diventa difficile comunicare i propri bisogni. Inoltre, il deficit esecutivo, ma in particolar modo quello cognitivo, possono influire con la compliance dei pazienti al trattamento e con la capacità di prendere decisioni, con risvolti di tipo etico e medico-legale (76).

1.8 SLA: diagnosi

Non esiste un marcatore specifico della malattia.

La diagnosi di SLA è basata su criteri clinici, esami elettrofisiologici, esami di laboratorio e neuroimmagini. Nei casi dubbi, è l'evoluzione dei segni e dei sintomi che consente di differenziare la SLA da altre condizioni patologiche del sistema nervoso centrale o periferico.

Il normale percorso diagnostico prevede una serie di steps.

Anamnesi. È importante indagare su una eventuale familiarità per malattie neurologiche (neuromuscolari in particolare) e psichiatriche.

Esame obiettivo. Nel paziente con sospetta SLA, l'esame obiettivo deve focalizzarsi sulla ricerca di segni di compromissione di I e II motoneurone, studiando i 4 distretti descritti nei criteri diagnostici (bulbare, cervicale, toracico e lombosacrale).

La diagnosi clinica di SLA si basa, infatti, sulla identificazione di una combinazione di segni di I e II motoneurone nello stesso distretto corporeo, con una successiva evidenza di progressione di malattia in altri distretti.

I segni di compromissione del II motoneurone da ricercare comprendono:

- l'amiotrofia, valutando in particolare l'eminanza tenar, ipotenar e i muscoli interossei agli arti superiori;
- le fascicolazioni, presenti anche a riposo, segno di rapida e transitoria contrazione di una o più fibrocellule muscolari, in assenza di movimento articolare.

La compromissione del I motoneurone si evidenzia tramite:

- la spasticità,
- l'iperreflessia osteotendinea, spesso diffusa,
- l'eventuale positività del segno di Babinski e di Hoffmann.

L'ipostenia, che può essere un sintomo di presentazione, viene valutata sia mediante le manovre di Mingazzini sia mediante le prove segmentarie di forza muscolare (scala MRC).

È bene valutare sempre il possibile coinvolgimento del distretto bulbare, includendo anche:

- l'esame della lingua (amiotrofia, fascicolazioni, stenia);
- l'esame dei muscoli masticatori (massetere, temporale, pterigoidei);
- l'esame della forza a livello del collo (flesso-estensione del capo e sternocleidomastoidei);

- la ricerca del riflesso mandibolare, che è spesso vivace in questi pazienti. (74)

Elettromiografia (EMG). È uno degli esami diagnostici più importanti. Permette di mettere in evidenza segni di sofferenza di II motoneurone, che includono:

- segni di denervazione acuta o attiva, rappresentati da potenziali di fibrillazione (fibs) e onde aguzze positive;
- segni di denervazione cronica, rappresentati da potenziali di unità motoria (PUMs) di durata e ampiezza aumentata e polifasici, riduzione in frequenza di scarica del tracciato interferenziale;
- segni di sofferenza del corpo cellulare, rappresentati dai potenziali di fascicolazione (FPs) (74).



Fig.13 Potenziali di unità motoria ampi e polifasici, con componenti tardive che indicano alcune reinnervazioni.(76)



Fig.14 Onde positive.



Fig.15 Fibrillazioni.

I segni di denervazione sia acuta sia cronica sono richiesti in almeno 2 delle 4 regioni anatomiche esplorate: distretto cranico (almeno un muscolo alterato tra linguali, facciali o masticatori), distretto cervicale (almeno due muscoli innervati da due radici di nervi cranici diversi), distretto toracico (muscoli paraspinali a livello o sotto T6 o muscoli addominali) e distretto lombosacrale (almeno due muscoli innervati da due nervi periferici differenti).

Queste anomalie elettromiografiche sono state recentemente incorporate nei criteri diagnostici El Escorial rivisti, per aiutare nella diagnosi di SLA, a complemento dei segni clinici di interessamento di II motoneurone.

I potenziali di fibrillazione e le onde aguzze positive si possono riscontrare, infatti, non solo nei distretti corporei clinicamente affetti, ma anche in quelli non sintomatici. Per questo motivo l'elettromiografia può rappresentare un aiuto nella diagnosi precoce, riconoscendo la presenza di un coinvolgimento subclinico del II motoneurone (77).

Con l'elettromiografia è possibile evidenziare anche la reinnervazione collaterale delle fibre muscolari scheletriche denervate da parte dei motoneuroni superstiti.

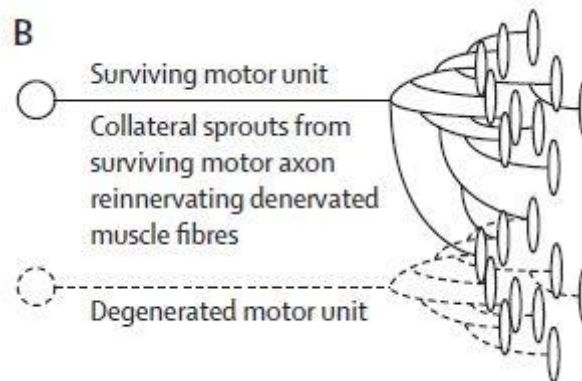


Fig.16 Degenerazione e reinnervazione dell'unità motoria. (77)

Le unità motorie che sopravvivono possono scaricare spontaneamente sotto forma di potenziali di fascicolazione, visibili clinicamente come contrazioni muscolari involontarie, che sono un segno tipico di SLA. Quando osservate nella lingua, le fascicolazioni sono altamente specifiche per SLA.

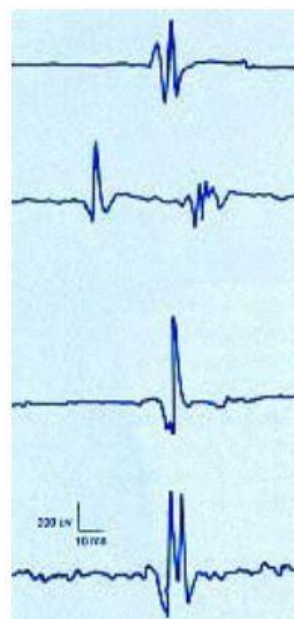


Fig.17 Fascicolazioni.

Il riscontro di potenziali di fascicolazione nella registrazione EMG è utile nella diagnosi di SLA, particolarmente se frequenti e polifasici, e quando vi è evidenza di denervazione attiva o cronica. La loro assenza può far sorgere un dubbio diagnostico, ma non preclude la diagnosi di SLA.

Inoltre, potenziali di fascicolazione si possono ritrovare anche in soggetti normali, in assenza di altri segni elettromiografici; si parla in questo caso di fascicolazioni benigne (78).

Neurografia motoria e sensitiva. Gli studi di conduzione nervosa hanno lo scopo di escludere altri disturbi che possono simulare la SLA, soprattutto le neuropatie motorie demielinizzanti. La conduzione nervosa motoria può essere normale nelle fasi iniziali di malattia, mentre in una fase più avanzata l'ampiezza del potenziale d'azione motorio composto (CMAP) diventa ridotta, indicando denervazione. La conduzione nervosa sensitiva è tipicamente normale nei pazienti affetti da SLA (79).

Potenziali evocati motori. Documentano l'interessamento del I motoneurone, con un aumento fino al 30% del tempo di conduzione motoria centrale.

Risonanza magnetica (RMN). Nonostante il neuroimaging nella SLA abbia attualmente un ruolo ancillare, rilevante soprattutto nella diagnosi differenziale della SLA, potendo escludere patologie potenzialmente in grado di "mimare" i disturbi presenti nella SLA, recenti studi hanno dimostrato l'importanza di queste metodiche, soprattutto di risonanza magnetica, anche come possibili marker precoci di malattia. Il segno più importante che si può riscontrare alla RM è una iperintensità in T2 a livello dei tratti corticospinali (soprattutto parte intracerebrale e tronco) con assottigliamento della corteccia motoria e delle aree premotorie. Inoltre si può evidenziare una lieve atrofia cerebrale, soprattutto in pazienti affetti da SLA associata ad impairment cognitivo. Questi segni non sono comunque specifici di SLA (80).

Biopsia muscolare. Può essere utile per escludere alcune miopatie oppure per confermare la presenza di SLA, quando evidenzia atrofia di fibre di tipo misto (81) con pattern di danno neurogeno.

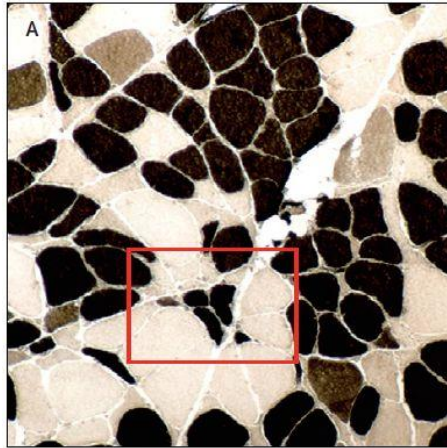


Fig.18 Biopsia muscolare del muscolo vasto laterale sinistro in un paziente con SLA. Si osservano gruppi di fibre di tipo I e II (miste) atrofiche. (76)

Rachicentesi. Nel liquor si effettua il dosaggio delle proteine (si riscontra una concentrazione proteica aumentata, ma raramente superiore a 100 mg/dl), la valutazione del quoziente albumino-citologico e la ricerca di sintesi intratecale di Ig. Tali analisi risultano solitamente nella norma. Può anche essere eseguito il dosaggio delle proteine di degenerazione (Tau, fosfo tau, amiloide), con dati di letteratura contrastanti.

Analisi di laboratorio

Vengono eseguite di routine, in un percorso diagnostico e di diagnosi differenziale alcune analisi di laboratorio, in particolare;

- dosaggio dei parametri di funzionalità muscolare: CPK, LDH, aldolasi;
- dosaggio dell'acido lattico e ammonio basale, curva da sforzo ischemico e curva da sforzo incrementale con cicloergometro o miometro, per valutare il profilo metabolico muscolare e escludere patologie primitive del muscolo;
- esami sierologici per escludere patologie autoimmuni, infettive o paraneoplastiche: Ab anti-gangliosidi, Ab anti-decarbossilasi dell'acido glutammico, Ab anti-Yo, Ab anti-Hu, Ab anti-Ri, Ab anti-muscolo liscio e Ab anti-recettore per l'acetilcolina (per escludere sindromi miasteniche), Ab anti-glicoproteina associata alla mielina (per escludere una neuropatia sensitivo-motoria demielinizzante), Ab anti-Borrelia (per la diagnosi di malattia di Lyme), markers paraneoplastici;
- dosaggio dei marcatori di stress ossidativo: AOPP (prodotti di ossidazione avanzata delle proteine), FRAPP (attività ferro riducente del plasma) e tioli;

- in casi selezionati, dopo opportuna consulenza genetica e dopo ottenimento del consenso informato scritto, vengono eseguiti esami molecolari per ricercare mutazioni nei principali geni causativi di SLA (SOD1, TDP-43, FUS, C9ORF72).

Spesso c'è un certo ritardo prima che sia raggiunta la diagnosi definitiva, in parte per l'esordio insidioso dei sintomi, con un ritardo diagnostico medio di 14 mesi. Una presentazione clinica atipica, l'esordio insidioso dei sintomi, una errata interpretazione di segni neurofisiologici o neuroradiologici sono cause comuni di incertezza diagnostica. Questo ritardo diagnostico può portare al ricorso a terapie inappropriate e ad un ritardo nell'instaurare appropriate terapie farmacologiche e sintomatiche (82).

Nel 1994 la World Federation of Neurology a El Escorial ha definito per la prima volta i criteri per la diagnosi della SLA, con lo scopo di incentivare studi clinici e sperimentali. Nel 1998 la stessa commissione, a Airlie House, ha rivisto i criteri fornendo linee guida per il disegno di trial clinici.

Questi criteri risultano formalmente precisi, ma sono talora troppo restrittivi, soprattutto per un uso clinico di routine (83).

I criteri di inclusione sono:

- a- Segni di degenerazione del II motoneurone (clinici, neurofisiologici, neuropatologici) in uno o più distretti corporei (bulbare, cervicale, toracico, lombosacrale);
- b- Segni di degenerazione del I motoneurone evidenziati da dati clinici in uno o più distretti corporei;
- c- Progressiva evoluzione dei segni di degenerazione all'interno di un distretto e/o da un distretto all'altro.

I criteri di esclusione sono:

- a- Evidenza neurofisiologica o neuropatologica di altri processi che possano spiegare i segni clinici di degenerazione del I e del II motoneurone;
- b- Evidenza neuroradiologica di Evidenza neuroradiologica di altre malattie che possano spiegare i segni clinici e/o neurofisiologici osservati.

Sulla base di queste evidenze vengono distinti i gradi di certezza diagnostica, in relazione al numero di regioni interessate dai segni di interessamento di I e II motoneurone:

- *SLA clinicamente definita*: segni di I e II motoneurone in almeno 3 distretti corporei;

- *SLA clinicamente definita con conferma di laboratorio*: segni di I e II motoneurone in un distretto corporeo e il paziente è portatore di una mutazione patogenetica per la SLA;
- *SLA clinicamente probabile*: segni di I e II motoneurone in almeno 2 distretti corporei e segni di I motoneurone in un distretto rostrale ai segni di II motoneurone;
- *SLA clinicamente probabile con conferma di laboratorio*: segni di I motoneurone in uno o più distretti corporei e segni di II motoneurone documentati con l'EMG in almeno 2 distretti;
- *SLA clinicamente possibile*: segni di I e II motoneurone in un solo distretto corporeo; oppure segni di I motoneurone in almeno 2 distretti corporei; oppure segni di I e II motoneurone in 2 distretti corporei senza segni di I motoneurone rostrali ai segni di II motoneurone.

In sintesi, indipendentemente dai criteri ufficiali da rispettare rigorosamente ai fini dei trials terapeutici, la diagnosi di SLA nella pratica clinica si fonda sulla dimostrazione del coinvolgimento del motoneurone periferico (clinica, elettrofisiologica o neuropatologica) e del motoneurone centrale (clinica, elettrofisiologica o radiologica), sulla osservazione della progressiva diffusione dei sintomi e segni in più regioni corporee e sulla esclusione di altre patologie che possono simularne il quadro clinico (84).

Nella diagnosi differenziale vi sono:

- altre malattie del motoneurone
 - Atrofia muscolare spinale
 - Atrofia muscolare spinobulbare X-linked (malattia di Kennedy)
 - Poliomielite o sindrome post-polio
 - Deficit di esosaminidasi A
- disturbi dei nervi di moto
 - Neuropatia motoria multifocale
 - Neuropatia infiammatoria cronica demielinizzante
 - Neuromiotonia
 - Neuropatia motoria ereditaria con segni piramidali
 - Sindrome paraneoplastica
 - Avvelenamento da metalli pesanti
- disturbi della giunzione neuromuscolare

- Miastenia gravis
- Sindrome miastenica di Lambert-Eaton
- lesioni strutturali del SNC e midollo spinale
 - Siringomielia o siringobulbia
 - Tabe dorsale
 - Sclerosi multipla
 - Malattia di Lyme
 - Infezione da HIV
- miopatie
 - Miosite a corpi inclusi
 - Polimiosite
 - Dermatomiostite
- disordini endocrini
 - Tireotossicosi
 - Iperparatiroidismo (76)

1.9 SLA: terapia e gestione

Non esiste al momento alcuna terapia risolutiva della SLA.

Nonostante la terapia farmacologica della SLA non sia cambiata in maniera sostanziale negli anni, importanti cambiamenti si sono verificati nella modalità di gestire i pazienti.

Trattamento farmacologico

L'unico farmaco ad oggi approvato dalla Food and Drug Administration (1996) per il trattamento della SLA è il Riluzolo (nome commerciale Rilutek).

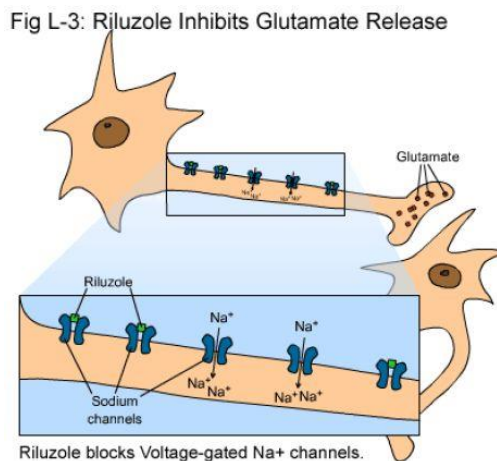


Fig.19 Meccanismo d'azione del Riluzolo.

Si tratta di un composto ad attività antilutammatergica, che agisce in tre modi: inibisce il rilascio di glutammato, attiva i recettori postsinaptici del glutammato, inibisce i canali al Na²⁺ voltaggio dipendenti.

In studi randomizzati si è visto che i pazienti che assumono Riluzolo sopravvivono di più rispetto ai pazienti che assumono placebo e la durata di sopravvivenza è allungata di circa 2-3 mesi. Si è dimostrato un modesto ma significativo effetto benefico sul rallentamento della progressione dei sintomi bulbari, sui disturbi degli arti, ma non sull'incremento della forza. Gli effetti benefici sono, quindi, molto modesti e il farmaco è costoso. Gli effetti avversi sono poco rilevanti (astenia, tossicità epatica) e quasi sempre reversibili dopo la sospensione del farmaco.

Il Riluzolo è stato approvato per il trattamento della SLA nella maggior parte dei Paesi, ma non in tutti. Infatti, rimangono dubbi circa la sua utilità, in relazione all'alto costo del farmaco, alla modesta efficacia e alla presenza di effetti collaterali, seppur modesti (85).

Trattamento sintomatico

Il trattamento sintomatico rimane il caposaldo nella gestione dei pazienti affetti da SLA. Per molti soggetti questo tipo di trattamento non solo allevia i sintomi, ma migliora anche la qualità di vita e la sopravvivenza. La gestione deve essere multidisciplinare, richiedendo la collaborazione, oltre che del neurologo, anche dello pneumologo, del nutrizionista, del gastroenterologo, del fisiatra/fisioterapista, dell'otorinolaringoiatra, del logopedista e dello psicologo. Queste figure dovrebbero essere in comunicazione reciproca tra loro, in modo da tracciare una strategia comune di trattamento. Infine, la gestione ambulatoriale del paziente dovrebbe essere integrata con quella territoriale (86).

I principali sintomi associati alla SLA comprendono:

- sintomi respiratori,
- disfagia,
- scialorrea,
- secrezioni bronchiali,
- crampi,
- spasticità e dolore,
- depressione e ansia,
- insonnia e fatica,
- labilità emotiva pseudobulbare.

In particolare hanno un ruolo cruciale la funzione respiratoria e nutrizionale. Tutti questi sintomi dovrebbero essere trattati prontamente non appena si presentano e diventano clinicamente significativi.

La funzione respiratoria deve essere monitorata strettamente, considerando che le principali cause di morte nei malati di SLA sono le complicanze respiratorie, conseguenza di un indebolimento del diaframma associato ad aspirazioni e infezioni (87). L'insufficienza respiratoria è il risultato di una combinazione tra degenerazione dei centri del respiro e degenerazione dei motoneuroni che compongono il nervo frenico. Ipossia notturna, con associati letargia, riduzione della capacità di concentrazione, cefalea mattutina e sonno non ristoratore, sono conseguenze della disfunzione centrale. L'indebolimento del diaframma può essere monitorato con la spirometria, che dimostra un progressivo declino della capacità vitale. La misurazione della forza dei muscoli inspiratori, ricavata dalla massima pressione inspiratoria, è un predittore di disfunzione respiratoria più accurato della capacità vitale. Per identificare episodi di ipossia notturna, nonostante la polisonnografia sia l'approccio ottimale, è di solito adeguata anche la pulsossimetria notturna.

Il ricorso alla ventilazione non invasiva (NIV) e, meno frequentemente, alla ventilazione meccanica invasiva (IMV) è richiesto per alleviare i sintomi dell'insufficienza respiratoria e prolungare la sopravvivenza. Le linee guida per istituire la NIV si basano su una combinazione di sintomi conseguenti all'ipostenia dei muscoli respiratori (come dispnea e ortopnea) e di anomalie nei test di funzione respiratoria.

Symptoms/signs related to respiratory muscle weakness. At least one of the following

- Dyspnoea
- Tachypnoea
- Orthopnoea
- Disturbed sleep due to nocturnal desaturation/arousals
- Morning headache
- Use of auxiliary respiratory muscles at rest
- Paradoxical respiration
- Daytime fatigue
- Excessive daytime sleepiness (ESS > 9)

Abnormal respiratory function tests. At least one of the following

- Forced vital capacity < 80% of predicted value
- Sniff nasal pressure < 40 cmH₂O
- PI max < 60 mmH₂O
- Significant nocturnal desaturation on overnight oximetry
- Morning blood gas pCO₂ > 45 mmHg

Fig.20 Criteri richiesti per la NIV secondo le linee guida 2012 della European Federation of Neurological Societies EFNS (87).

Il dispositivo BIPAP (Pressione Positiva Bimodale delle vie aeree) può essere consigliato inizialmente nelle ore notturne, ma, col progredire dell'insufficienza respiratoria, può essere richiesto anche nelle ore diurne, fino a coprire quasi interamente le 24 ore.

I pazienti con importante interessamento bulbare e scialorrea potrebbero non tollerare la NIV. Quando questa forma di ventilazione non è tollerata o non è sufficiente, deve essere presa in considerazione la ventilazione invasiva tramite tracheostomia. La ventilazione invasiva può prolungare la sopravvivenza, a volte anche di alcuni anni, ma spesso non migliora la qualità di vita. Perciò, in molti Paesi, anche in relazione a fattori economici e culturali, questo approccio è raramente utilizzato.

Infine, l'utilizzo della morfina per via sottocutanea dà sollievo ai pazienti con dispnea a riposo (87).

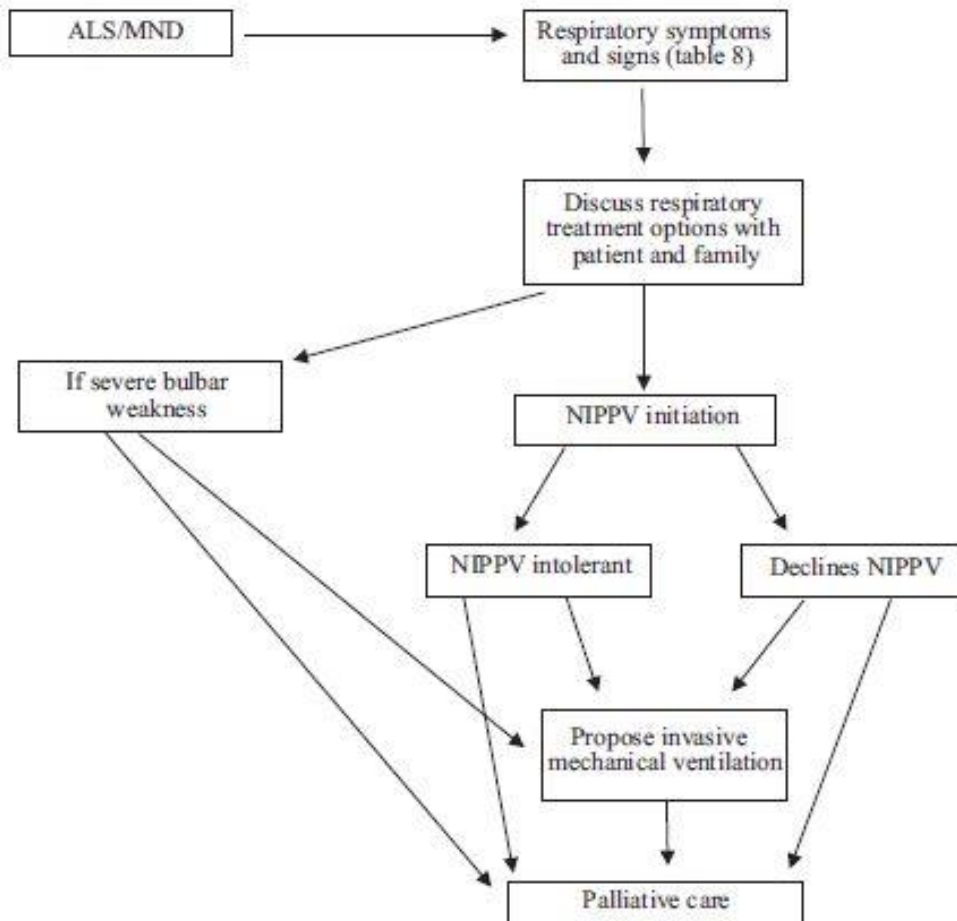


Fig.21 Algoritmo per il management della disfunzione respiratoria nella SLA secondo le linee guida 2012 della European Federation of Neurological Societies EFNS. (87)

La malnutrizione è un determinante fondamentale della prognosi. Nella SLA, lo sviluppo di malnutrizione è multifattoriale, conseguente soprattutto ad un ridotto apporto di cibo per la disfagia, ma anche ad uno stato di ipermetabolismo.

Il management della disfagia prevede, inizialmente, una educazione del paziente, modificazioni della consistenza del cibo o supplementi calorici. Quando questi approcci non sono più sufficienti, è possibile ricorrere al posizionamento di una PEG (Gastrostomia Endoscopica Percutanea) o, in alternativa, è possibile il ricorso alla alimentazione tramite sondino nasogastrico. Il posizionamento di PEG non è una procedura esente da rischi; per questo dovrebbe essere programmata prima che il paziente abbia sviluppato una disfunzione respiratoria importante o si trovi in uno stato avanzato di malattia (87).

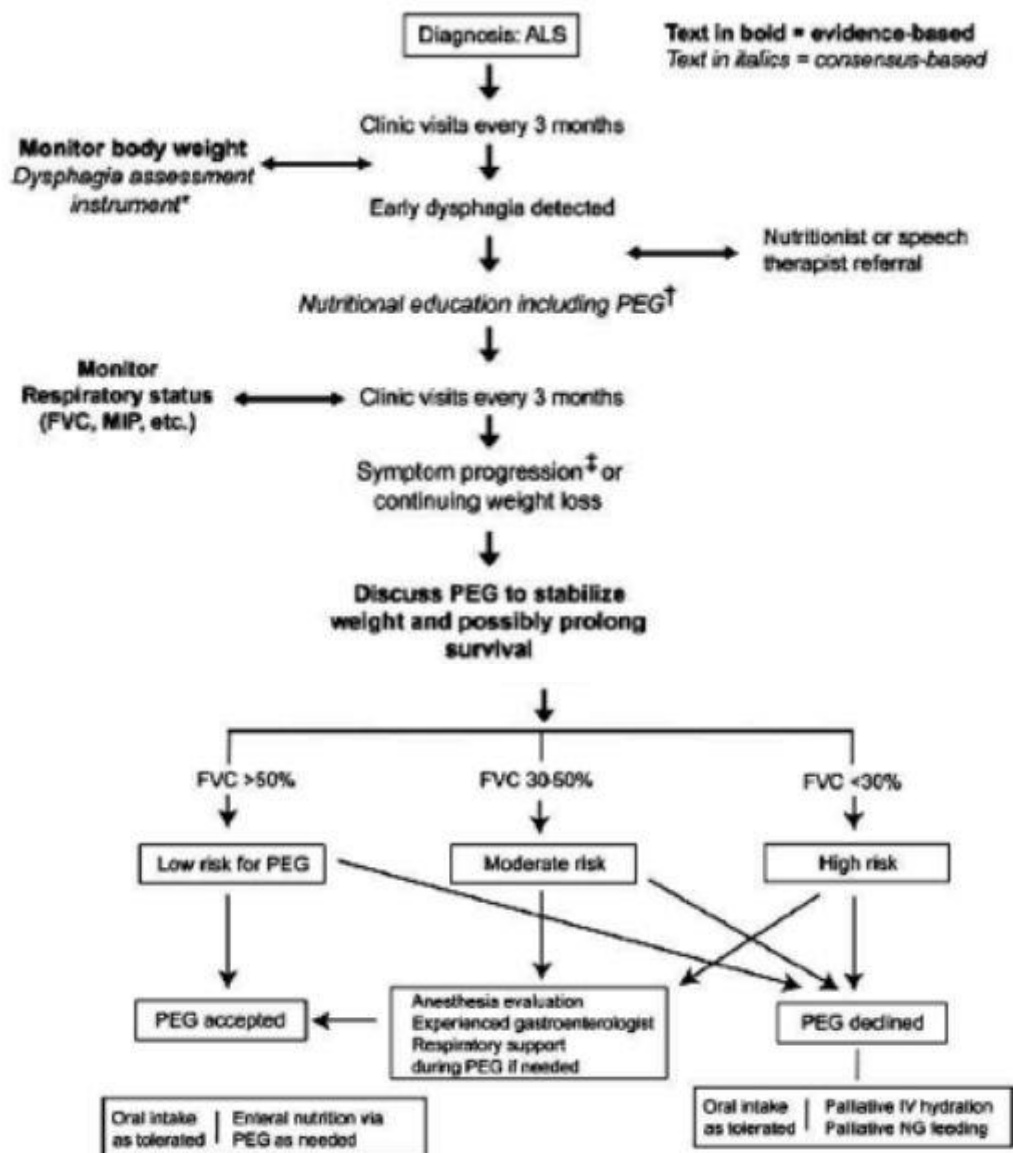


Fig.22 Algoritmo per il management nutrizionale nella SLA. (AAN Practice Guidelines 2009)

La scialorrea si riscontra frequentemente e può variare da un eccesso di saliva nel cavo orale fino ad una perdita più o meno marcata. Sono disponibili numerosi farmaci che contrastano la scialorrea (agenti mucolitici, anticolinergici...) fino alle iniezioni di tossina botulinica nelle ghiandole salivari (87).

Gestione ambulatoriale

Una volta diagnosticata la malattia, il paziente inizia ad essere seguito presso l'ambulatorio specialistico neurologico. Il follow-up prevede che vengano svolte visite ripetute in media ogni 3 mesi. Nel corso di ogni visita di controllo vengono effettuati aggiornamenti anamnestici e viene svolto l'esame obiettivo neurologico, affiancato dalla valutazione della progressione di malattia attraverso due scale parametriche (la scala MRC e la scala ALS-FRS). Inoltre il malato viene indirizzato a svolgere una serie di visite specialistiche (pneumologica, otorinolaringoiatrica, nutrizionistica, fisioterapica...) al fine di evidenziare precocemente e gestire tutte le complicanze associate alla malattia, con l'intento di prolungare la sopravvivenza del paziente, ma soprattutto di migliorarne la qualità di vita.

2. RAZIONALE DELLO STUDIO

2.1 La curcumina come agente antiossidante

La curcumina, derivata dalla pianta *Curcuma longa* (specie che appartiene alla famiglia delle Zingiberaceae), è una spezia di colore giallo-arancio comunemente usata in India, non solo a scopo curativo, ma anche come conservante per alimenti e come colorante per tessuti.

La curcumina è un pigmento insolubile in acqua estratto dalla *Curcuma longa*, di cui è il principale componente, nonché il responsabile della colorazione gialla. È stata isolata per la prima volta nel 1815 da Vogel e Pelletier, mentre la sua struttura (diferuloilmetano) è stata determinata nel 1910 da J. Milobedzka e V. Lampe. (88)

Chimicamente la curcumina è un diferuloilmetano [1,7-bis(4-idrossi-3-metossifenil)-1,6-eptadiene-3,5-dione], mentre la forma disponibile in commercio contiene anche un 17% di dimetossicurcumina (DMC) e un 3% di bisdemetossicurcumina (BDMC). (89)

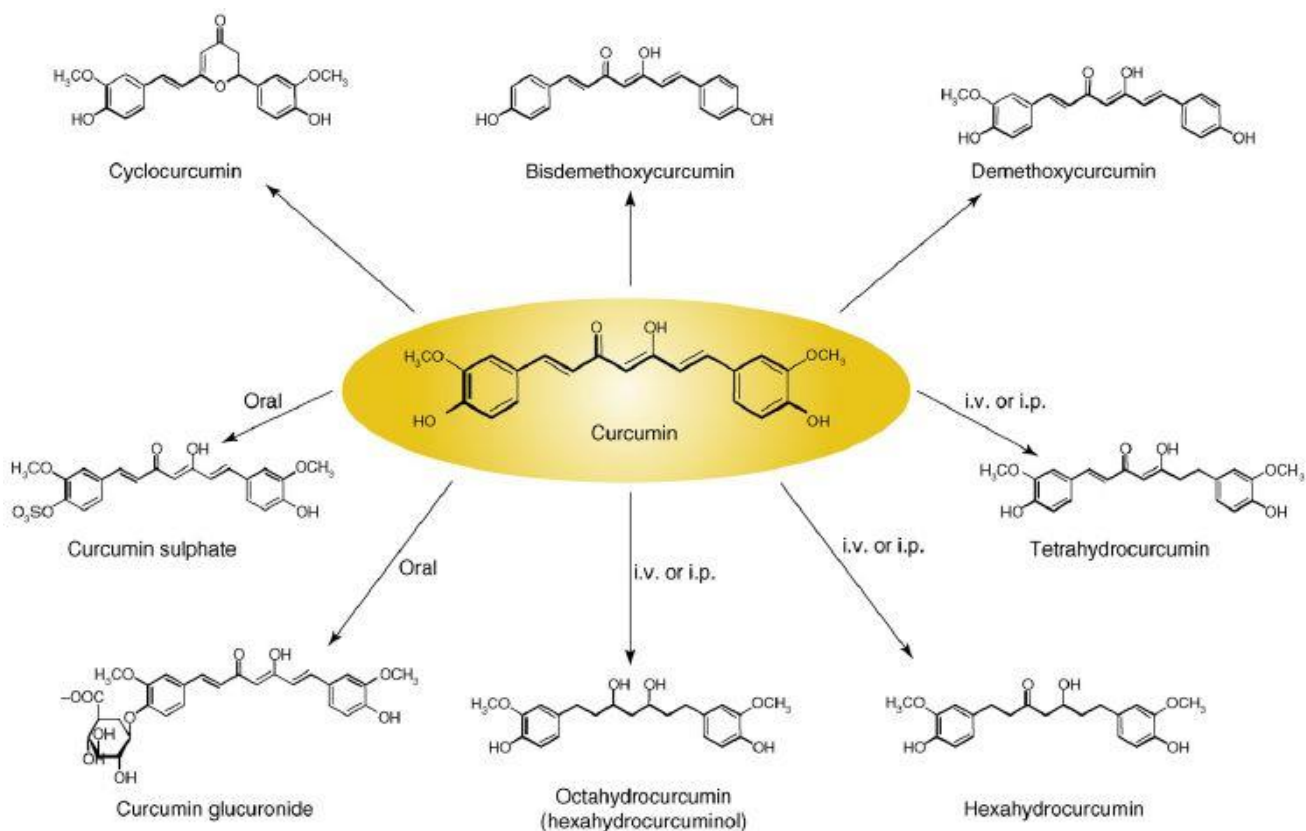


Fig.23 Struttura chimica della curcumina, dei suoi analoghi e dei più importanti metaboliti. (89)

Dal punto di vista farmacocinetico, la curcumina viene scarsamente assorbita a livello intestinale dopo assunzione orale. Quando somministrata oralmente, subisce

glucuronazione e solfatazione; quando la somministrazione è intravenosa o intraperitoneale, la curcumina viene ridotta con la formazione di tetraidrocurcumina, esaidrocurcumina e octaidrocurcumina (o esaidrocurcuminolo) (89).

La curcumina ha dimostrato di svolgere un gran numero di attività farmacologiche: antinfiammatoria, antioncogena, antiossidante, riparazione delle ferite, antimicrobica (90)...

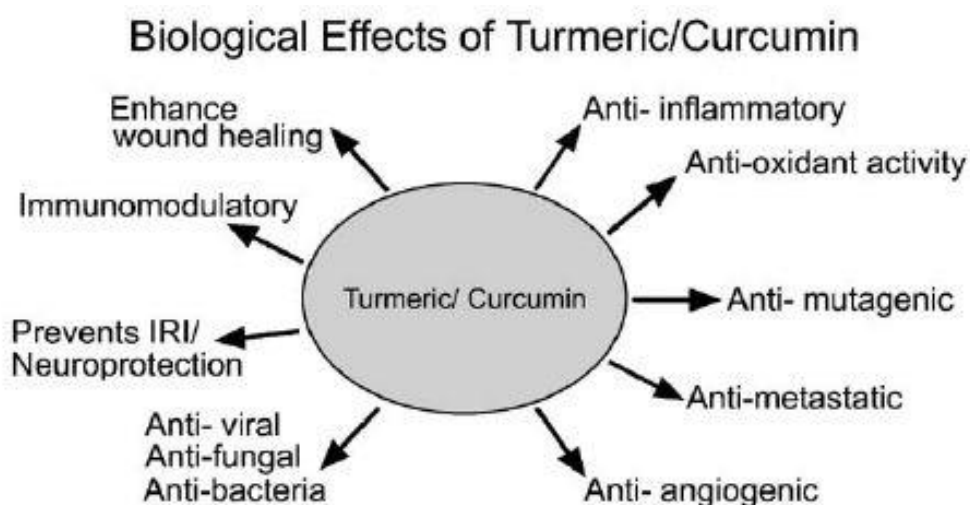


Fig.24 Effetti biologici della curcumina. (90)

Tutte queste attività sono da attribuire alla particolare struttura chimica della molecola, che possiede un gruppo O-metossifenolico ad entrambe le estremità. Tali gruppi aromatici aiutano la curcumina ad interagire con le catene laterali delle proteine attraverso contatti idrofobici, che danno flessibilità a questi legami.

Il principale effetto biologico della curcumina è comunque la sua attività antiossidante, di entità paragonabile a quella delle vitamine C ed E. Si comporta da potente *scavenger* di varie specie reattive dell'ossigeno e specie reattive dell'azoto, oltre ad inibire la perossidazione lipidica. Lo stress ossidativo gioca un ruolo fondamentale nella patogenesi di una varietà di condizioni, tra cui il danno da ischemia-riperfusiona a livello miocardico e cerebrale, emorragia e shock, danno neuronale, ipossia e cancro. La somministrazione di curcumina ha dimostrato di ridurre le modificazioni biochimiche cardiache indotte dall'ischemia in un modello felino (91), di prevenire il danno ossidativo a livello endoteliale vascolare (92). In un modello murino di ischemia cerebrale focale, la sostanza

ha dimostrato di svolgere una neuroprotezione attraverso la inibizione della perossidazione lipidica e l'aumento di enzimi endogeni antiossidanti (93).

Quindi la curcumina potrebbe avere un potenziale significativo nel trattamento di un gran numero di patologie che sono il risultato dello stress ossidativo.

Gli utilizzi terapeutici della curcumina sono rivolti ad un'ampia varietà di condizioni patologiche: cutanee, polmonari, gastrointestinali, epatiche, neurologiche, cardiovascolari, metaboliche, autoimmuni e neoplastiche.

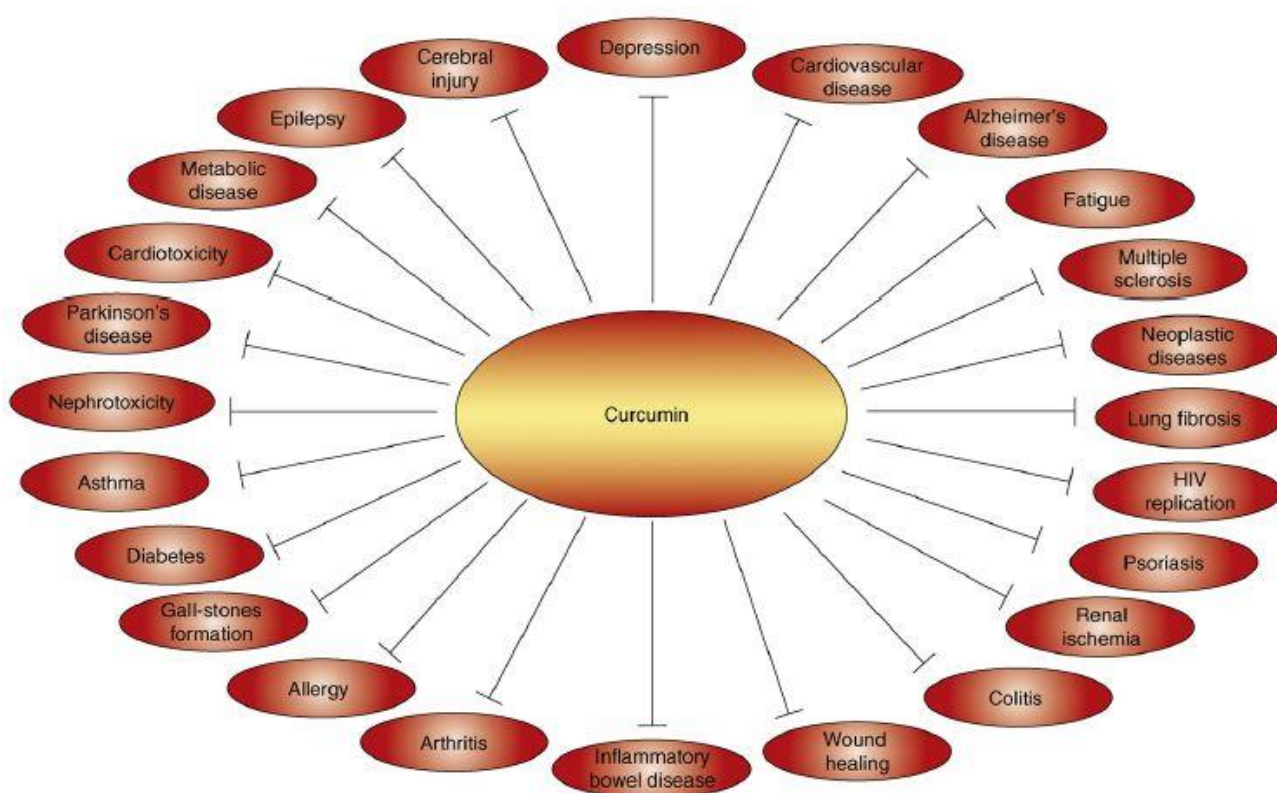


Fig.25 Effetti della curcumina in numerose condizioni patologiche. (89)

Il motivo per cui una sola molecola possa avere così tanti effetti diversi può essere spiegato dai numerosi targets molecolari della curcumina, che includono fattori di trascrizione, fattori di crescita, citochine infiammatorie, protein-chinasi e altri enzimi.

Transcription factors

- ATF3
- AP-1
- β -catenin
- CHOP
- HIF-1 α
- NF- κ B
- Nrf2
- p53
- PPAR- γ
- STAT-3
- SP-1

Protein kinases

- PKA
- PKC
- Src
- FAK
- CSN-associated kinase

Enzymes

- p300 histone acetyl transferase
- GST
- NQO
- Hemeoxygenase-1
- Glutathione reductase

Growth factors

- EGFR
- HER2

Anti-apoptotic proteins

- cFLIP
- IAP
- XIAP
- Bcl-2
- Bcl-xL

Inflammatory mediators

- TNF
- IL-1
- IL-6
- COX-2
- 5-LOX
- PSA
- CRP

Chemokines and chemokine receptor

- CXCL1
- CXCL2
- CXCR4

Cell-cycle regulatory proteins

- Cyclin D1
- Cyclin E
- c-myc
- p21

Invasion and angiogenesis biomarkers

- MMP-9
- VEGF
- uPA

Others

- DR5
- Transferrin receptor 1
- Iron regulatory protein
- Ferritin H and L
- CREB

In particolare si distinguono due categorie di targets:

- targets a cui la curcumina si lega direttamente e di cui modula l'attività
- targets la cui modulazione dell'attività da parte della curcumina è indiretta o secondaria.

Al primo gruppo appartengono, ad esempio, ciclossigenasi (COX-2), lipossigenasi (LOX), GSK3beta, xantina ossidasi, DNA polimerasi, glutatione, beta-amiloide, topoisomerasi II, albumina, toll-like receptor (TLR-4)...

Al secondo gruppo appartengono numerosi targets che possono essere modulati indirettamente dalla curcumina verso una upregulation o una downregulation.

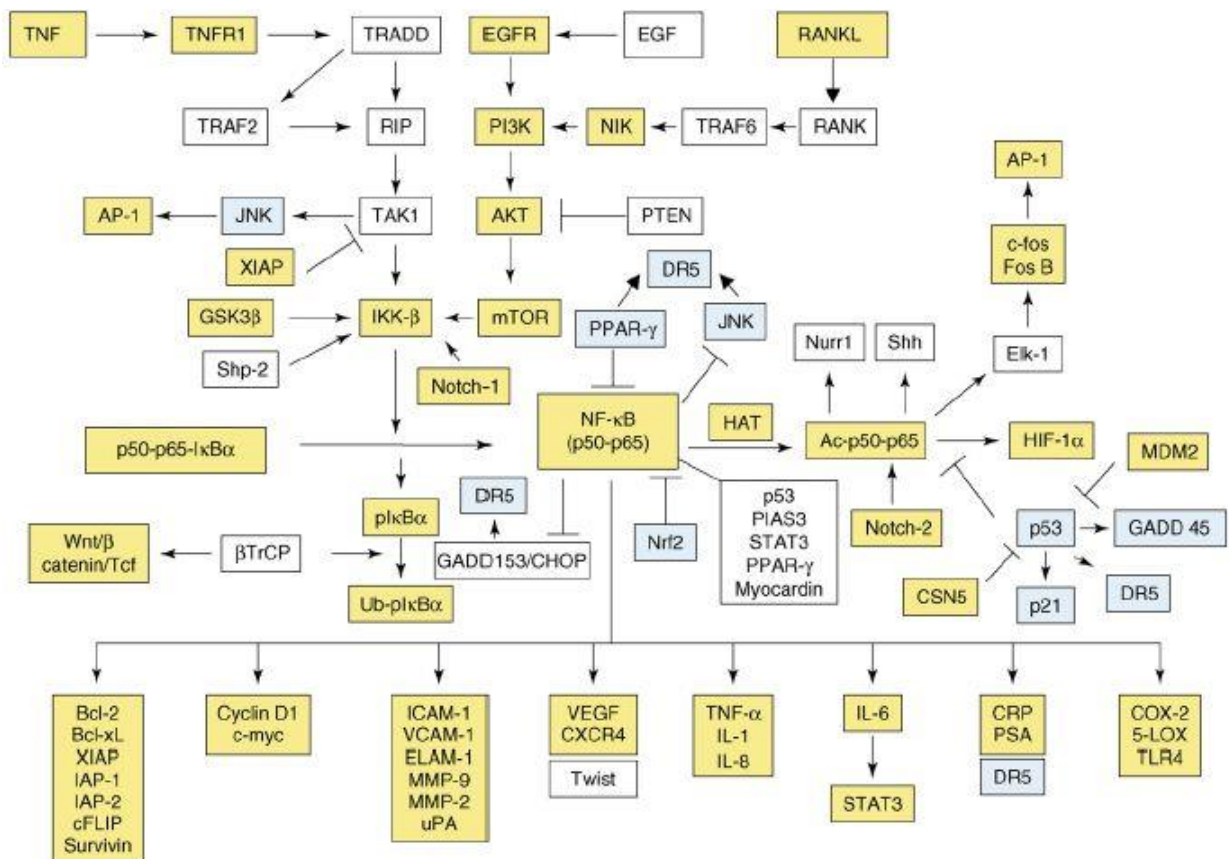


Fig.26 Modulazione di numerose vie di segnalazione cellulare da parte della curcumina. In azzurro sono rappresentati i targets che vengono attivati, in giallo i targets che vengono inibiti (89).

Studi recenti hanno evidenziato alcune interessanti interazioni della *Curcuma longa* con meccanismi cellulari che, a livello neurologico, potrebbero risultare molto importanti per migliorare il quadro clinico in alcuni contesti patologici, tra cui la SLA.

Ad esempio, Xu et al. (94), in uno studio recente, hanno dimostrato come la curcumina sia in grado di interagire con la proteina TDP-43 coinvolta nel processo di formazione delle inclusioni intracellulari nella SLA. TDP-43 è una proteina nucleare implicata in molti aspetti concernenti l'RNA, come la regolazione della trascrizione e lo splicing alternativo. Mutazioni di TDP-43 si riscontrano nelle forme sia familiare sia sporadica di SLA. In

questi casi si ritrovano inclusioni citoplasmatiche positive per TDP-43 in cellule neuronali e gliali. Nei pazienti con SLA familiare e sporadica è stata evidenziata una ipereccitabilità corticale; perciò è stata studiata l'azione di TDP-43 wild-type o mutata sulla eccitabilità dei motoneuroni. L'eccitabilità è stata valutata analizzando le proprietà dei potenziali d'azione e dei canali del sodio voltaggio-dipendenti in un modello cellulare costituito da linee di motoneuroni transfettate con TDP-43 wild-type e con TDP-43 mutata (Q331K).

Studi precedenti (95) avevano dimostrato che TDP-43 mutata induce stress ossidativo e disfunzione mitocondriale, in cui l'accumulo di ROS poteva essere un importante determinante di danno mitocondriale. Inoltre i ROS sono coinvolti nella modulazione della funzione dei canali del Na. Dal momento che i canali del Na sono critici per l'inizio e la propagazione dei potenziali d'azione, che sono la base dell'eccitabilità neuronale, il primo scopo dello studio di Xu et al. è stato indagare l'effetto di TDP-43 mutata sui potenziali d'azione e sui canali del Na nelle linee cellulari motoneuronali. In particolare è stato osservato che, in questo caso, la frequenza di scarica dei potenziali d'azione è aumentata e la soglia del potenziale è diminuita. In più, la velocità di recupero dall'inattivazione dei canali del Na è maggiore. Tutto ciò conferma come la presenza di TDP-43 mutata risulti in una ipereccitabilità neuronale. Inoltre, l'attività dei canali del Na può essere aumentata direttamente da varie specie reattive dell'ossigeno.

Oltre a questo, l'aumento di eccitabilità può facilitare lo stress ossidativo, consentendo un eccessivo ingresso di ioni Ca^{2+} durante ogni potenziale d'azione attraverso i canali del Ca^{2+} voltaggio-dipendenti. L'aumento di eccitabilità può anche contribuire all'alterazione dei mitocondri e del metabolismo cellulare determinando uno stato di deplezione energetica cronico. Anche la anormale localizzazione di TDP-43 nei mitocondri provoca disfunzione mitocondriale.

Di conseguenza, l'aumento di eccitabilità, lo stress ossidativo e la disfunzione mitocondriale si trovano in un circolo vizioso tale per cui la presenza di TDP-43 mutata conduce alla fine, in ogni modo, alla degenerazione dei motoneuroni.

Per questo, sapendo che lo stress ossidativo e la disfunzione mitocondriale aumentano il livello dei ROS, che attivano i canali del Na portando a ipereccitabilità, è stato supposto che la riduzione dello stress ossidativo e della disfunzione mitocondriale possano potenzialmente migliorare le anomalie nella eccitabilità prevenendo il danno neuronale correlato alla mutazione di TDP-43.

In questo senso, la curcumina mostra attività antiossidante (dieci volte più potente della vitamina E come scavenger di radicali liberi) e di protezione mitocondriale. Così il

secondo scopo dello studio è stato di determinare se le anomalie nei potenziali d'azione e nei canali del Na causati da TDP-43 mutata fossero migliorate dall'effetto protettivo della dimetossicurcumina (DMC), un derivato della curcumina. La DMC si è dimostrata più efficace della curcumina, soprattutto per una maggiore biodisponibilità. La curcumina può attraversare la barriera ematoencefalica, detossifica le ROS, protegge l'encefalo dalla perossidazione lipidica e protegge i neuroni dalla morte indotta da insulti di tipo ossidativo. A parte la diretta eliminazione delle ROS, la curcumina contribuisce alla funzione antiossidante anche aumentando i livelli di glutazione, aumentando l'attività della glutazione perossidasi, della glutazione reduttasi e catalasi e della superossido dismutasi e catalasi. Quindi l'ipotesi dello studio è stata che l'assunzione di curcumina permettesse una effettiva protezione dallo stress ossidativo e dalla disfunzione mitocondriale nelle linee cellulari motoneuronali transfettate con TDP-43 mutata e che la somministrazione di DMC alla dose di 15 $\mu\text{mol/L}$ potesse migliorare la disfunzione mitocondriale aumentando il potenziale di membrana mitocondriale. In questo studio, dopo la somministrazione di DMC per 24 ore, le anomalie dei potenziali d'azione e dei canali del Na indotti da TDP-43 mutata sono completamente abolite; l'aumento di eccitabilità correlato a TDP-43 è riportato alla normalità. Questi effetti della DMC sono probabilmente dovuti alla sua funzione antiossidante e di protezione mitocondriale.

In conclusione, la DMC potrebbe essere potenzialmente utile nelle malattie neurodegenerative correlate alla mutazione di TDP-43, quale la SLA (94).

Un altro studio di Lu et al. (96) conferma come la dimetossicurcumina potrebbe essere utile per le malattie neurodegenerative correlate con la mutazione di TDP-43. Infatti, in linee cellulari motoneuronali transfettate con TDP-43 mutata sono state osservate varie modificazioni a livello mitocondriale, tra cui anomalie morfologiche, riduzione dell'attività del complesso I e del potenziale transmembrana e un'aumentata espressione della proteina UCP2. In topi transgenici sono stati osservati aggregati iuxtannucleari di mitocondri ed è stato dimostrato che elevati livelli di TDP-43 sono capaci di alterare il traffico intracellulare dei mitocondri portando ad una anormale distribuzione di tali organelli nei motoneuroni (97). Lu et al. hanno dimostrato un effetto protettivo della DMC nei confronti di queste alterazioni mitocondriali causate dalla mutazione di TDP-43. In particolare hanno osservato come la DMC aumenti i livelli di UCP2, migliori il potenziale transmembrana, aumenti l'attività del complesso I e la morfologia dei mitocondri (96).

Gli astrociti contribuiscono a proteggere i neuroni dal danno ossidativo e una alterazione dei meccanismi antiossidanti al loro interno è ritenuta essere implicata in varie patologie neurodegenerative, inclusa la SLA. L'attivazione della funzione antiossidante negli astrociti potrebbe rappresentare una strategia terapeutica in tali patologie. Nrf2 (Nuclear factor erythroid 2-related factor 2) è un importante regolatore della trascrizione di geni per la fase II dei processi antiossidanti. La curcumina ha dimostrato di attivare notevolmente i geni target di Nrf2 negli astrociti del midollo spinale, riducendo i livelli intracellulari di ROS e attenuando il danno ossidativo e la disfunzione mitocondriale (98).

La struttura simmetrica e compatta della curcumina le consente di legarsi specificamente alla β -amiloide, inibendo la formazione di fibrille amiloidi. Tale molecola ha dimostrato la capacità di inibire la formazione di fibrille amiloidi, non solo di β -amiloide, ma anche di α -sinucleina e di proteina prionica. La capacità di questo pigmento di attraversare la barriera ematoencefalica, unita al suo basso costo e alla sicurezza farmacologica, rendono questa molecola un promettente candidato da utilizzare come agente antiamiloidogenetico (99).

Nelle forme di SLA causate dalla mutazione di SOD1, le inclusioni patologiche contenenti aggregati di SOD1 esibiscono proprietà di tipo amiloide. Queste inclusioni inducono infiammazione e sono citotossiche. Perciò uno studio ha esaminato il ruolo della curcumina come potenziale inibitore della aggregazione e della formazione di fibrille di SOD1(100). In questo studio si è osservato come la curcumina moduli le prime fasi della aggregazione di SOD1, portando alla formazione di aggregati più piccoli, disordinati e non fibrillari, con ridotta tossicità. Il sito di legame della curcumina sembra essere rappresentato dalle regioni amiloidogenetiche di SOD1. Inoltre, la maggiore tossicità degli aggregati di SOD1 che si riscontra in fase pre-fibrillare e fibrillare, non si riscontra negli aggregati contenenti curcumina. Tutto questo suggerisce che la curcumina riduca la tossicità legando le regioni amiloidogenetiche di SOD1 durante il processo di aggregazione e bloccando la formazione di aggregati tossici. Anche questo studio conferma il potenziale ruolo della curcumina nel trattamento della SLA.

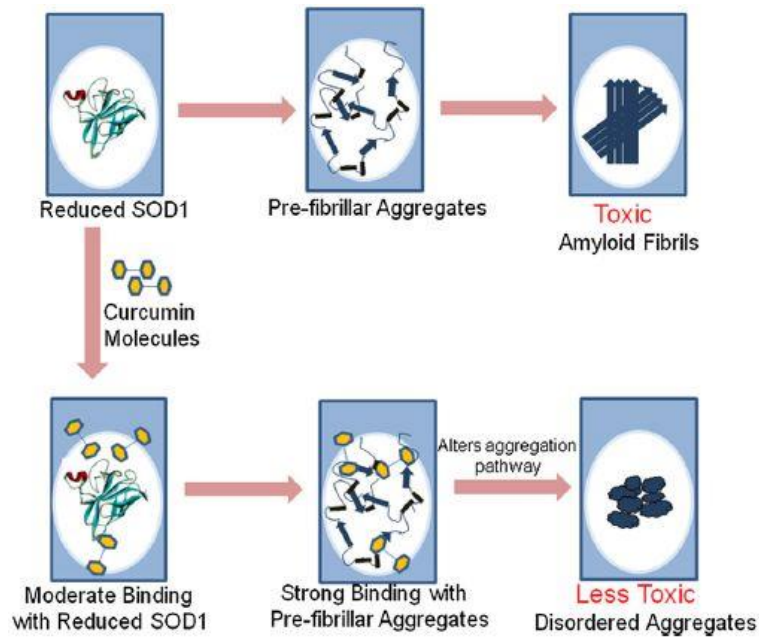


Fig.27 Rappresentazione schematica dell'effetto della curcumina nella via amiloidogenetica di SOD1 (100).

Il sistema immunitario gioca un ruolo importante nella clearance degli accumuli di β -amiloide nella malattia di Alzheimer e di SOD1 nella SLA, prevenendo o controllando l'esordio di queste patologie. La bisdemetossicurcumina ed altri analoghi hanno dimostrato di essere capaci di stimolare i monociti, aumentando la fagocitosi della β -amiloide nei pazienti con malattia di Alzheimer. Questo effetto è ottenuto grazie alla stimolazione della trascrizione di geni chiave codificanti per MGAT3, per il recettore della vitamina D e per i Toll-like receptors (TLR). In seguito è stato documentato un effetto analogo della curcumina sui monociti anche in pazienti affetti da SLA, per quanto riguarda la clearance degli accumuli di SOD1 mutata (101).

L'autofagia è il meccanismo deputato alla degradazione sia delle proteine misfolded sia di componenti citoplasmatici danneggiati in seguito a stress cellulare (102, 103). Numerosi studi evidenziano come la curcumina abbia effetti sull'inibizione di mTOR e sul conseguente aumento dell'autofagia. In particolare, uno studio condotto da Forman e collaboratori nel 2007 ha dimostrato in linee cellulari di glioma trattate con curcumina l'aumento di vacuoli autofagici intracellulari (103).

2.2 Esercizio fisico e biomarcatori di stress ossidativo

Negli anni recenti è stata posta sempre più attenzione alla relazione tra esercizio fisico e stress ossidativo, con quasi 300 studi pubblicati negli ultimi 30 anni. Sia l'esercizio aerobico sia quello anaerobico possono indurre uno stato acuto di stress ossidativo; ciò è dimostrato dall'aumentata presenza di molecole ossidate in vari tessuti. Il tipo di esercizio, l'intensità e la durata influenzano l'entità dello stress ossidativo; allo stesso tempo, anche il supplemento con sostanze antiossidanti può influenzare questi rilievi (104).

I principali meccanismi responsabili della produzione di specie reattive dell'ossigeno durante l'esercizio fisico comprendono: perdita di elettroni nella catena di trasporto mitocondriale, ischemia/riperfusion e attivazione della xantina ossidasi endoteliale, risposta infiammatoria e autossidazione delle catecolamine. È stato visto anche che l'esercizio fisico cronico conduce ad una *upregulation* dei meccanismi di difesa antiossidante dell'organismo, che aiutano a minimizzare lo stress ossidativo che si verifica dopo un'attività fisica intensa (105).

Il monitoraggio di alcuni biomarcatori di stress ossidativo durante un test da sforzo può essere utile per migliorare la comprensione dei meccanismi alla base della risposta cellulare all'insulto ossidativo ipossia mediato e allo sviluppo di nuove strategie terapeutiche.

I biomarcatori sono prodotti o sostanze usate come indicatori di uno stato biologico, per misurare oggettivamente nell'organismo processi fisiologici o patogeni, che si verificano in condizione di salute, durante il decorso di una patologia oppure in risposta a trattamenti o in seguito ad uno sforzo fisico (106). La maggior parte degli studi che, nell'uomo, misurano i biomarcatori di stress ossidativo sono effettuati sul plasma o sul siero, in quanto può essere raccolto facilmente e riflette lo stato ossido-riduttivo meglio di altri fluidi biologici (107).

Un *marker* di danno ossidativo, che permette di valutare la quantità di proteine modificate da processi di ossidazione, a livello di specifici residui amminoacidici, è rappresentato dai prodotti di ossidazione avanzata delle proteine (AOPP, Advanced Oxidation Protein Products). Le proteine interessate comprendono soprattutto l'albumina, la mioglobina, la γ -globulina, la tireoglobulina. Dal momento che il danno ossidativo modifica le caratteristiche spettroscopiche delle proteine, ad esempio attraverso l'ossidazione di residui amminoacidici, lo studio delle caratteristiche spettrali delle proteine plasmatiche ha permesso di individuare due picchi di assorbanza visibili ai raggi UV a 340 nm, che

corrispondono agli AOPP a basso peso molecolare (LMW-AOPPs, Low Molecular Weight AOPP) e agli AOPP ad alto peso molecolare (HMW-AOPPs, High Molecular Weight AOPP). Gli AOPP a basso peso molecolare sono prevalentemente costituite da albumina in forma monomerica, mentre le AOPP ad alto peso molecolare sono prevalentemente dovute all'albumina sotto forma di aggregati, probabilmente derivate da processi di *cross-linking* (108).

Gli AOPP possono formarsi in seguito ad esposizione ad acido ipocloroso (HOCl), che agisce sulle proteine plasmatiche determinando la produzione di proteine clorinate e clorammine (109).

Inoltre è stato dimostrato che, in vivo, i livelli plasmatici degli AOPP sono strettamente correlati con i livelli dei dimeri di tirosina e con i livelli di pentossidina, un *marker* degli Advanced Glycation End products (AGEs). Gli AOPP presentano analogie strutturali con gli AGEs ed entrambi questi prodotti eserciterebbero delle attività biologiche simili, come l'induzione di citochine proinfiammatorie (108). È stato recentemente dimostrato che le reazioni biochimiche responsabili della glicazione proteica coinvolgono vie pro-ossidanti (110). La relazione tra AOPP e prodotti di perossidazione lipidica rimane invece poco chiara (108).

A livello tissutale ed ematico, la difesa nei confronti dell'attacco lesivo delle specie ossidanti e dei radicali liberi è garantita dalla presenza di agenti antiossidanti, che possono essere enzimatici o non enzimatici.

Un test per la valutazione della capacità antiossidante del plasma è il saggio FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power), che valuta la capacità del plasma di ridurre il complesso Fe(III)-2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) a complesso Fe(II)-TPTZ (cioè di ridurre lo ione ferrico a ione ferroso) (111). Al valore dell'attività ferro riducente del plasma contribuiscono: l'acido urico (per il 60%), l'acido ascorbico (per il 15%), le proteine (per il 10%), l' α -tocoferolo (per il 5%), la bilirubina (per il 5%) ed altre sostanze non identificate per un ulteriore 5% (111).

Una componente significativa della barriera antiossidante è rappresentata dai tioli. Si tratta di un gruppo di composti organici che sono accomunati dal possedere un comune gruppo funzionale, il gruppo sulfidrilico (-SH). I gruppi -SH si oppongono alla propagazione dei processi perossidativi. In particolare, una coppia di gruppi tiolici può ossidare una coppia di radicali alcossilici (RO \cdot) o idrossilici (HO \cdot), cedendo due elettroni sotto forma di due atomi di idrogeno, formando, rispettivamente, due molecole di alcol o di acqua. I due gruppi tiolici ossidati, invece, reagiscono tra loro generando ponti disolfuro (112).

Il glutatione ridotto (GSH) è il più importante antiossidante tiolico presente a livello intracellulare, le cui proprietà antiossidanti sono dovute alla presenza del gruppo sulfidrilico della cisteina. Il glutatione allo stato ridotto (GSH) espleta la sua attività riducendo i radicali liberi e convertendosi in glutatione ossidato (GSSG), composto da due molecole di glutatione unite da un ponte disolfuro. Il GSH interviene nei processi di perossidazione lipidica. Inoltre, può agire ripristinando la forma ridotta di altri antiossidanti, come la vitamina E e la vitamina C (112).

L'esercizio fisico sembra essere coinvolto nell'attivazione anche di agenti antiossidanti di tipo enzimatico, come la Sod, la Cat e la GPx (113).

Anche la forte produzione di acido lattico, tipica delle attività anaerobiche, è nota essere una fonte di stress ossidativo. Il prodotto finale della glicolisi è il piruvato, che, a seconda della richiesta energetica e delle condizioni cellulari, può essere ridotto a lattato o ossidato a CO₂ e H₂O (114). Il muscolo scheletrico è il principale produttore di acido lattico. Per questo, la valutazione cinetica del lattato durante la contrazione muscolare è utile per investigare indirettamente eventuali danni del metabolismo ossidativo nel muscolo scheletrico durante l'esecuzione di un esercizio fisico. Nei pazienti affetti da SLA, è stato dimostrato che la disfunzione mitocondriale si verifica sia nel sistema nervoso centrale sia nei tessuti periferici, perciò l'analisi della curva del lattato durante esercizio muscolo-scheletrico risulta una valida indagine in questi soggetti (115).

È dimostrato che l'acido lattico influenza lo stato ossidativo della cellula. In particolare, la concentrazione di lattato correla positivamente con la presenza di *markers* di perossidazione lipidica, come TBARS (Specie Reattive all'Acido Barbiturico) (116). Inoltre, alte concentrazioni di lattato sono direttamente responsabili della formazione di radicali idrossili attraverso la reazione di Fenton (117).

2.3 Curcumina e biodisponibilità

La principale limitazione nell'uso della curcumina è la sua scarsa biodisponibilità. Quando somministrata oralmente, la curcumina subisce coniugazione, con formazione di curcumina glucuronide e curcumina solfato nell'intestino e nel fegato. Quando viene somministrata a livello intraperitoneale o sistemico, subisce riduzione con la formazione di tetraidrocurcumina, esaidrocurcumina e octaidrocurcumina. Tutti questi metaboliti risultati dalla coniugazione e dalla riduzione sono biologicamente inattivi. La bassa biodisponibilità della curcumina è dovuta anche alla natura idrofobica della molecola.

Per questo motivo sono stati sperimentati numerosi approcci per incrementare la biodisponibilità del composto. (89)

Il primo metodo consiste nell'uso di adiuvanti, come la piperina, che interferiscono con la glucuronidazione. La piperina è un alcaloide che, inibendo gli enzimi epatici CYP3A4 e P-glicoproteina, è in grado di aumentare del 2000% la biodisponibilità della curcumina. Infatti, non solo la limitata capacità di assorbimento intestinale, ma anche il rapido metabolismo epatico contribuisce a ridurre notevolmente la biodisponibilità di questa sostanza. Shoba et al. hanno esaminato l'effetto della piperina nella farmacocinetica della curcumina in animali ed esseri umani. Lo studio ha dimostrato che, ai dosaggi utilizzati, la piperina aumenta la concentrazione sierica di curcumina (rispetto alla assunzione della sola curcumina), aumenta l'assorbimento e la biodisponibilità della curcumina sia nei topi sia negli esseri umani, senza la comparsa di effetti avversi (118).

Altri approcci per migliorare la biodisponibilità della curcumina comprendono la formulazione di liposomi, di complessi fosfolipidici e lo sviluppo di analoghi strutturali (89).

Inoltre, la curcumina ha una bassa biodisponibilità anche a causa della sua struttura idrofobica, per cui ha una scarsa solubilità in acqua. Un modo per superare questo limite è quello di utilizzare la curcumina in nanoparticelle, che hanno una aumentata solubilità in acqua (100, 119).

Brainoil (Laboratori Aliveda SRL, Cecina) è un integratore alimentare a base di curcumina, la cui formulazione è stata progettata e prodotta in modo tale da garantire un'alta biodisponibilità del principio attivo. Tale biodisponibilità viene ottenuta, in parte, con l'ausilio della piperina, in parte grazie ad una tecnologia produttiva esclusiva e con brevetto depositato di Laboratori Aliveda, che consiste nell'unire a calore moderato la curcumina e le altre erbe di Brainoil al burro di cacao e granulare il composto così ottenuto.

Nella composizione di Brainoil sono presenti altri principi attivi oltre alla curcumina (1500 mg/bustina):

- coenzima Q10 (100mg/bustina): un potente fattore antiossidante che agisce potenziando l'attività mitocondriale

- estratti di *Bacopa Monnieri* (400 mg/bustina): pianta con effetti neuroprotettivi, che induce miglioramenti cognitivi e nella memoria. Il costituente attivo responsabile di questi effetti è il bacoside A. (120)
- estratti di *Centella Asiatica* o *Hydrocotyle asiatica* (240 mg/bustina): tradizionalmente usata per problemi circolatori agli arti inferiori, questa pianta ha dimostrato avere effetti anche sul Sistema Nervoso Centrale, in particolare effetti cognitivi e sulla memoria (per cui è stato suggerito l'utilizzo nella malattia di Alzheimer), ma anche azione antiossidante e sulla disfunzione mitocondriale nelle cellule nervose (121)
- estratti di *Ashwagandha* o *Withania Somnifera* (240 mg/bustina): pianta medicinale contenente circa 80 principi attivi con svariate attività biologiche, antinfiammatorie, antimicrobiche, antitumorali e neuroprotettive. In più, ha dimostrato la capacità di ridurre le specie reattive dell'ossigeno, modulare la funzione mitocondriale, regolare l'apoptosi, per cui è stato candidato al trattamento di varie condizioni cliniche, particolarmente correlate al sistema nervoso. (122)
- estratti di Tè verde (200 mg/bustina).

Brainoil non deve essere assunto in gravidanza e allattamento. Non è adatto ai bambini al di sotto dei 12 anni di età. La curcumina ad alti dosaggi può avere lievi effetti anticoagulanti piastrinici. Se si assumono contemporaneamente farmaci anticoagulanti, si raccomanda di assumere Brainoil esclusivamente sotto controllo medico.

3. SCOPO DELLA TESI

Tenuto conto delle proprietà biologiche della molecola naturale in questione, scopo della presente tesi è stata la valutazione, clinica e laboratoristica, dell'effetto della supplementazione alimentare con prodotto farmaceutico ad elevata biodisponibilità di curcumina (Brainoil, Laboratori Aliveda SRL, Cecina) su un campione di 42 pazienti affetti da SLA. A tale fine è stato messo a punto un protocollo di studio della durata complessiva di 6 mesi e schematicamente suddiviso in due fasi, rispettivamente con controllo in doppio cieco con placebo per i primi 3 mesi, a braccio unico in aperto per i successivi 3 mesi.

Lo studio dell'effetto dell'integratore ha previsto di prendere in considerazione, nelle due categorie di parametri considerati, il cambiamento ai tempi di valutazione T0, T1 e T2 della sperimentazione clinica.

Gli obiettivi dello studio sono, nello specifico, pertanto stati:

- valutazione dell'efficacia del prodotto farmaceutico utilizzato in relazione al cambiamento di parametri clinici:
 - o di funzionalità nella vita quotidiana, tramite la ALS Functional Rating Scale revised (ALS-FRS-r);
 - o di funzione muscolare, tramite la scala Medical Research Council (MRC), eseguita su 15 gruppi muscolari degli arti superiori e inferiori, e tramite la misurazione della forza massima media alla contrazione volontaria massimale (CVM) dell'arto superiore;
 - o dello stato nutrizionale e del trofismo muscolare, tramite il BMI (Body Mass Index);
- valutazione dell'efficacia del prodotto farmaceutico utilizzato in relazione al cambiamento di parametri laboratoristici connessi all'equilibrio pro-ossidanti/anti-ossidanti nel sangue e al metabolismo ossidativo mitocondriale, mediante il dosaggio ematico, durante test da sforzo incrementale aerobico all'avambraccio, di:
 - o di marcatori periferici di stress ossidativo (AOPP, FRAP, Tioli);
 - o di acido lattico

4. MATERIALI E METODI

4.1 Casistica

Lo studio descritto in questa tesi ha previsto l'arruolamento di 42 pazienti, di entrambi i sessi, affetti da SLA, seguiti presso il Centro delle Malattie Neuromuscolari del Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale dell'Università di Pisa.

I criteri di inclusione che devono essere soddisfatti dai pazienti per poter rientrare nello studio comprendono:

- diagnosi di SLA definitiva, probabile, possibile/supportata da esami di laboratorio, secondo i criteri di El Escorial (1998) stabiliti dalla World Federation of Neurology (WFN);
- età compresa tra i 18 e gli 85 anni;
- capacità di intendere e di volere;
- firma del consenso informato.

I criteri di esclusione dallo studio sono invece rappresentati da:

- presenza di tracheotomia;
- pazienti con gravi disturbi psichiatrici (Asse 1 o 2 del DSM IV);
- stato di gravidanza o allattamento.

I criteri di uscita, per cui i pazienti inizialmente reclutati si trovano a sospendere lo studio, comprendono:

- eventi avversi seri;
- ritiro del consenso;
- deviazioni dallo schema del protocollo in oggetto.

Poiché la curcumina ad alti dosaggi può avere lievi effetti anticoagulanti piastrinici, verranno monitorati (attraverso esami ematici di routine) quei pazienti in trattamento con anticoagulanti, che usciranno qualora dovessero verificarsi tali effetti.

Durante lo studio, i pazienti continueranno ad assumere la terapia indicata nella SLA (Riluzolo) e qualsiasi altro trattamento in corso, senza variazioni.

COGNOME E NOME (iniziali)	GRUPPO RANDOMIZZAZIONE	SESSO	DATA DI NASCITA	ETA'	FAMILIARITA'	FORMA CLINICA ALL'ESORDIO	EPOCA ESORDIO (mese-anno)	ETA' ALL'ESORDIO	MESI DI MALATTIA (datati marzo-2015)	EPOCA DIAGNOSI	ETA' ALLA DIAGNOSI	ALS-FRS-r
BG	a	M	20/09/1964	50	-	bulbar	giu-08	43	81	giu-11	46	15
BD	b	F	03/12/1964	50	-	upper limbs	apr-10	45	59	mar-11	46	13
BA	a	M	26/08/1949	65	-	upper limbs	ago-13	64	19	mar-14	64	40
BN	b	F	13/11/1947	67	-	bulbar	lug-09	61	68	mag-10	62	15
BS	b	M	01/09/1939	75	+	lower limbs	lug-13	73	20	dic-14	75	31
BC	a	M	07/10/1957	57	-	lower limbs	set-13	55	18	apr-14	56	43
CF1	a	M	20/05/1943	71	-	lower limbs	set-09	66	66	feb-11	67	34
CG	b	F	17/02/1954	61	-	lower limbs	gen-14	59	14	feb-15	61	46
CS	a	F	16/10/1952	62	+	lower limbs	mar-12	59	36	ago-13	60	39
CF2	b	M	12/09/1951	63	-	lower limbs	mag-08	56	82	mag-11	59	25
CG	b	F	05/01/1945	70	-	lower limbs	mar-06	61	108	feb-12	67	37
CF3	a	M	21/09/43	72	-	upper limbs	ott-09	66	65	ott-14	70	38
DCA	b	M	11/06/1965	49	-	upper limbs	mar-13	47	24	set-14	49	33
CL	a	M	28/05/43	72	-	lower limbs	dic-10	67	63	dic-12	69	26
FR	a	F	19/02/42	73	-	upper limbs	mag-06	64	106	mag-10	68	42
GM1	b	M	23/10/1950	64	-	lower limbs	dic-10	60	63	dic-11	61	24
GM2	a	F	23/12/1935	79	-	bulbar	mar-14	78	12	ott-14	78	34
GA	a	F	02/09/44	71	-	upper limbs	apr-09	64	71	apr-10	63	20
GR	a	M	07/02/1964	51	-	lower limbs	ott-11	47	41	gen-13	48	27
GM3	b	M	21/09/72	43	-	bulbar	dic-13	41	15	mar-14	41	13
LA	a	F	30/04/1954	60	+	bulbar	mag-14	60	10	feb-15	60	37
LVA	a	F	27/12/1960	54	-	lower limbs	dic-10	50	51	dic-11	51	15
MA1	a	F	08/04/1937	77	-	lower limbs	giu-12	75	33	apr-15	78	34
MA2	a	M	01/01/1938	77	-	upper limbs	apr-12	74	35	feb-13	75	32
MM	b	F	13/06/1972	42	-	bulbar	lug-08	36	80	giu-11	39	40
NM	a	F	10/09/31	83	-	lower limbs	mar-14	82	12	dic-14	83	27
PS	b	F	16/04/66	49	-	lower limbs	giu-12	46	33	mag-14	48	32
PM1	a	M	03/09/1947	67	-	lower limbs	apr-13	65	23	apr-14	66	22
PP	a	M	11/08/1957	57	-	lower limbs	gen-14	56	14	gen-15	56	42
PR	b	F	10/10/59	56	-	lower limbs	lug-13	54	20	lug-14	55	41
PM2	a	F	03/04/1957	57	-	lower limbs	feb-12	54	37	mag-13	56	21
PMT	b	F	15/10/1954	60	-	bulbar	lug-14	59	8	nov-14	60	11
PD	b	F	27/12/43	72	-	upper limbs	dic-12	69	27	dic-13	70	45
PM3	a	F	24/09/1951	63	-	lower limbs	lug-11	59	44	giu-13	61	36
RL	a	M	02/05/1975	39	-	lower limbs	ago-12	37	31	dic-12	37	20
SG1	b	F	06/05/1953	61	-	lower limbs	feb-14	60	13	ott-14	60	18
SA	b	M	08/04/52	63	-	upper limbs	gen-14	61	15	lug-14	62	42
SMT	b	F	21/04/1956	58	-	lower limbs	mar-11	54	48	mag-12	56	36

SG2	a	M	06/02/1947	68	-	lower limbs	lug-14	68	8	ago-14	68	36
TS	b	M	17/10/71	44	-	lower limbs	feb-13	42	25	ott-13	43	25
VA	a	M	27/12/1944	70	-	lower limbs	giu-11	66	45	nov-12	67	42
VE	a	F	20/05/35	79	-	lower limbs	dic-12	77	27	dic-13	74	31

I pazienti arruolati nello studio sono stati 42.

Di questi:

- 20 sono maschi (M),
- 22 sono femmine (F).

L'età media dei malati è 62,41 anni ($\pm 11,05$), ed è compresa tra i due estremi di 39 anni (RL) e 83 anni (NM).

Tre di questi soggetti presentano familiarità per Malattia del Motoneurone.

La forma clinica all'esordio della malattia è stata:

- bulbare (*bulbar*) in 7 pazienti;
- con interessamento prettamente degli arti superiori (*upper limbs*) in 9 pazienti;
- con interessamento prettamente degli arti inferiori (*lower limbs*) in 26 pazienti.

Complessivamente, la durata media di malattia dei pazienti rientranti nello studio (calcolata rispetto a marzo 2015, mese in cui è iniziato l'arruolamento) è di 39,76 mesi ($\pm 26,88$). L'età media dei pazienti al momento in cui sono comparsi i primi segni o sintomi di SLA era di 59,05 anni ($\pm 11,19$); mentre l'età media al momento della diagnosi era di 60,36 anni ($\pm 11,09$).

Successivamente, i soggetti candidati alla sperimentazione sono stati randomizzati in due gruppi (Brainoil/placebo) appaiati per sesso, età ed entità di malattia (stabilita tramite la scala ALS-FRS-r):

- gruppo **a**, comprendente 24 pazienti;
- gruppo **b**, comprendente 18 pazienti.

Per tutta la durata della sperimentazione, trattandosi di uno studio in doppio cieco, né i pazienti né i ricercatori sono a conoscenza di quale prodotto sia stato assunto dai soggetti appartenenti al gruppo **a** né dai soggetti appartenenti al gruppo **b**.

La disparità numerica tra **a** e **b** è dovuta al fatto che l'arruolamento si è svolto dalle 4 alle 2 settimane prima dell'inizio della sperimentazione e, durante questo arco temporale, alcuni pazienti inizialmente arruolati e randomizzati si sono persi (per decesso, uscita dai criteri di inclusione o un non consenso allo studio). Tale disparità numerica, tuttavia, non pregiudica l'omogeneità dei campioni confrontati.

Il gruppo **a** comprende quei pazienti che hanno assunto il placebo e risulta costituito da 13 maschi (M) e 11 femmine (F), con una età media di 65,58 anni ($\pm 10,87$).

La forma clinica all'esordio della malattia è stata:

- *bulbar* in 3 pazienti;
- *upper limbs* in 5 pazienti;
- *lower limbs* in 16 pazienti.

La durata media di malattia nei pazienti rientranti nello studio è di 39,5 mesi ($\pm 25,29$), con un'età media al momento della comparsa dei segni o sintomi di SLA di 62,33 anni ($\pm 11,13$). L'età media al momento della diagnosi era di 63,38 anni ($\pm 11,02$).

Il gruppo **b** comprende quei pazienti che hanno assunto Brainoil e risulta costituito da 6 maschi (M) e 11 femmine (F), con un'età media di 58,17 anni ($\pm 10,07$).

La forma clinica all'esordio della malattia è stata:

- *bulbar* in 4 pazienti;
- *upper limbs* in 4 pazienti;
- *lower limbs* in 10 pazienti.

La durata media di malattia nei pazienti rientranti nello studio è di 40,11 mesi ($\pm 29,61$), con un'età media al momento della comparsa dei segni o sintomi di SLA di 54,67 anni ($\pm 9,45$). L'età media al momento della diagnosi era di 56,33 anni ($\pm 10,11$).

Durante i primi 3 mesi di sperimentazione, 6 pazienti si sono ritirati dallo studio per comparsa di effetti avversi o per ritiro del consenso; perciò al T1 il campione si è ridotto da 42 a 36 soggetti.

Al tempo T1, sulla base della randomizzazione iniziale, i pazienti sono risultati così distribuiti:

- al gruppo **a** appartengono 21 soggetti;
- al gruppo **b** appartengono 15 soggetti.

Di seguito è riportata una tabella riassuntiva riguardo ai principali dati sul campione in esame.

		N. PAZIENTI	M	F	ETA' MEDIA	FORMA CLINICA ALL'ESORDIO			ETA' MEDIA ALL'ESORDIO	MESI MEDI DIMALATTIA	ETA' MEDIA ALLA DIAGNOSI
						bulbar	upper limbs	lower limbs			
T0	totali	42	20	22	62,41	7	9	26	59,05	39,76	60,36
	a	24	13	11	65,58	3	5	16	62,33	39,5	63,38
	b	18	6	11	58,17	4	4	10	54,67	40,11	56,33
T1	totali	36	18	18	62,06	6	8	22	58,47	42,19	59,78
	a	21	12	9	65,62	3	4	14	62,24	40,24	63,24
	b	15	6	9	57,07	3	4	8	53,2	44,93	54,93

4.2 Protocollo dello studio

4.2.1 Disegno dello studio

Il presente studio di tesi ha analizzato la prima fase di uno studio pilota no-profit. Il trattamento proposto ha una durata complessiva di 6 mesi, in doppio cieco per i primi 3 mesi, a braccio unico ed aperto nei successivi 3 mesi. Il presente studio di tesi ha analizzato i dati relativi alla prima fase in doppio cieco del trial.

La SLA è una malattia neurodegenerativa progressivamente ingravescente, che porta a morte, in media, in 3-5 anni dall'esordio. Un periodo di trattamento di 6 mesi, quindi, può essere considerato idoneo per fornire indicazioni sull'eventuale risposta terapeutica dell'integratore confrontato con un placebo, sostanza di aspetto identico al farmaco sperimentale, ma priva di principio attivo e di effetto farmacologico.

La decisione di suddividere lo studio in due bracci, in doppio cieco nei primi 3 mesi e a braccio unico in aperto per i 3 mesi successivi, è stata dettata dalla volontà di aumentare la potenza statistica di uno studio svolto su un limitato numero di pazienti.

Sono, infatti, stati reclutati 42 pazienti, poi suddivisi in 2 gruppi.

Nei primi 3 mesi:

- il primo gruppo è stato trattato con Brainoil per 90 giorni consecutivi, salvo insorgenza di effetti avversi;
- il secondo gruppo ha ricevuto un placebo.

Nei 3 mesi successivi, entrambi i gruppi hanno assunto Brainoil.

Nello studio sono stati individuati 4 tempi, di cui i primi tre sono descritti e analizzati nel presente studio di tesi .

T -1

In questa fase è avvenuto l'arruolamento dei pazienti, che si è svolto da 4 a 2 settimane prima dell'inizio del trattamento con Brainoil/placebo. La valutazione per il reclutamento di ciascun soggetto ha compreso una accurata anamnesi, la verifica dei criteri di inclusione e di esclusione dallo studio. A questo punto, ogni paziente potenzialmente eleggibile è stato informato riguardo allo studio, ai suoi obiettivi e requisiti. Nelle valutazioni pre-studio è, infatti, necessario leggere il Foglio Informativo e il Consenso Informato, spiegando in modo completo al paziente il disegno, le finalità e il protocollo dello studio. Infine, se il paziente ha accettato di partecipare allo studio, una volta firmato il modulo di consenso informato, ha ricevuto una copia del documento.

Eseguito l'arruolamento, si è proceduto alla randomizzazione dei pazienti. È stato, infatti, necessario dividere i soggetti in due gruppi, uno dei quali nei primi 3 mesi di trattamento avrebbe assunto Brainoil, mentre l'altro avrebbe assunto il placebo. I due gruppi sono stati appaiati per sesso, età ed entità di malattia, secondo la scala ALS-FRS-r. Il ricercatore che ha effettuato la randomizzazione è stato responsabile esclusivamente della gestione del prodotto sperimentale/placebo, rimanendo al di fuori della sperimentazione, in quanto si tratta di uno studio in doppio cieco.

Successivamente è stato organizzato il calendario della sperimentazione, stabilendo, per ogni paziente, le date delle tre fasi sperimentali T0, T1, T2, in modo tale che tra una visita e l'altra trascorressero 3 mesi.

T0

In occasione della visita T0 sono stati eseguiti:

- la valutazione clinica del paziente, comprendente
 - o l'esame obiettivo neurologico (EON) con valutazione quantitativa della funzione motoria tramite la scala MRC (Medical Research Council, 1943),
 - o la valutazione del peso corporeo e il calcolo del Body Mass Index (BMI),
 - o la valutazione dello stadio di malattia con la scala ALS Functional Rating Scale rivista (ALS-FRS-r);

- un test da sforzo anaerobico sui muscoli dell'avambraccio, con l'ausilio di un miometro connesso ad un "hand-grip", con determinazione sequenziale di acido lattico e dei parametri biochimici di stress ossidativo (AOPP, FRAP, Tioli);
- la fornitura al paziente dell'integratore o del placebo sotto forma di bustine, in numero sufficiente per essere assunte quotidianamente fino alla visita successiva;
- la programmazione della visita di controllo T1.

T1

In occasione della visita T1, a 90 giorni dalla visita T0, sono stati eseguiti nuovamente:

- la valutazione clinica del paziente, comprendente sempre l'EON con compilazione della scala MRC, la valutazione del peso corporeo e del BMI, la compilazione della scala ALS-FRS-r;
- la valutazione di eventuale comparsa di eventi avversi;
- il test da sforzo anaerobico, con determinazione degli stessi parametri biochimici;
- la fornitura al paziente dell'integratore, in numero di bustine sufficiente per essere assunte quotidianamente fino alla visita successiva;
- la programmazione della visita di controllo T2.

T2 (i cui dati non sono oggetto del presente studio di tesi)

In occasione della visita T2, a 180 giorni dalla visita T0, saranno eseguiti:

- la valutazione clinica del paziente, comprendente l'EON con compilazione della scala MRC, la valutazione del peso corporeo e del BMI, la compilazione della scala ALS-FRS-r;
- la valutazione di eventuale comparsa di eventi avversi;
- il test da sforzo anaerobico, con determinazione degli stessi parametri biochimici.

4.2.2 Modalità di somministrazione dell'integratore/placebo

L'integratore viene fornito ai pazienti sotto forma di bustine da 12 ml. È stata scelta la formulazione in gel in modo da facilitarne l'assunzione orale da parte dei pazienti con problemi di disfagia e in modo da rendere possibile la somministrazione anche ai pazienti che si alimentano tramite PEG.

Il placebo, anch'esso in forma di gel, è stato prodotto in modo da simulare perfettamente l'integratore, nella formulazione chimica più opportuna, purché biologicamente inattiva, ed è stato presentato in confezioni uguali all'integratore in studio.

Le bustine di Brainoil o di placebo devono essere assunte per via orale, da sole oppure sciolte in acqua. La dose è di 1 bustina/die, sufficiente ad ottenere la biodisponibilità del principio attivo, possibilmente sempre alla stessa ora del giorno.

Qualora il paziente un giorno dimenticasse o non potesse assumere una bustina, è tenuto a riprendere l'assunzione dal giorno successivo secondo le normali modalità.

4.2.3 Valutazione clinica

Il presente studio di tesi, inserendosi nel contesto di un trial che prevede due fasi, una prima in doppio cieco e una seconda in aperto, come detto in precedenza, analizza e discute i dati relativi ai tempi T-1, T0 e T1. Il trial prevede tuttavia un T2 in cui saranno eseguite analoghe valutazioni cliniche.

La valutazione clinica dei pazienti, al momento dell'arruolamento (T -1), è stata effettuata tramite anamnesi, esame obiettivo e verifica dei criteri di inclusione e di esclusione dallo studio.

Nel corso della sperimentazione, per ciascun paziente, ad ogni visita (T0, T1, T2), sono stati ripetuti:

- **Esame obiettivo neurologico (EON), con compilazione della scala MRC.**

La scala MRC (Medical Research Council) è un metodo semplice e veloce che permette la valutazione del grado di stenia di un singolo muscolo mediante una prova di forza contrastata da parte dell'esaminatore, che assegna un punteggio secondo una scala che va da 5 a 0:

- 5 – normale forza muscolare contro resistenza
- 4 – deficit di forza muscolare alle prove contro resistenza
- 3 – movimento attivo possibile contro gravità, ma non contro resistenza
- 2 – movimento attivo possibile solo in assenza di gravità
- 1 – contrazione muscolare in assenza di movimento
- 0 – assenza di contrazione muscolare, paralisi completa.

Quasi ogni muscolo è potenzialmente testabile, desumendo informazioni utili sul coinvolgimento dei corrispondenti nervi. In particolare, i movimenti testati in questo studio sono stati, per l'arto superiore, l'abduzione del braccio, la flessione e

l'estensione dell'avambraccio sul braccio, la flessione e l'estensione del polso, la flessione e l'estensione delle dita e l'opposizione del pollice, tutti eseguiti comparativamente sia a destra sia a sinistra. Per l'arto inferiore, i movimenti testati, sempre sia a destra sia a sinistra, sono stati la flessione della coscia sul bacino, la flessione e l'estensione della gamba sulla coscia, la flessione dorsale e plantare del piede, la flessione e l'estensione delle dita. Infine è stata valutata anche la flessione e l'estensione del collo.

Durante l'esecuzione delle prove di forza segmentale è importante immobilizzare l'articolazione a monte, in maniera tale da implicare nel movimento solo il muscolo specificamente da testare. È inoltre necessario applicare una dose di forza relativamente proporzionata al soggetto che ci si trova ad esaminare, in modo da evitare errori di valutazione.

- **Valutazione del peso corporeo e calcolo del Body Mass Index (BMI)**

Il BMI o Indice di Massa Corporea (IMC) è un parametro molto utilizzato per ottenere una valutazione generale del peso corporeo di un soggetto in relazione ad un peso considerato ideale. Esso mette in relazione con una semplice formula matematica l'altezza con il peso del soggetto: in particolare si ottiene dividendo il peso in Kg del soggetto con il quadrato dell'altezza espressa in metri.

- **Compilazione della scala ALS-FRS-r.**

La scala ALS-FRS-r (Amyotrophic Lateral Sclerosis – Functional Rating Scale revised) permette di stimare la funzionalità globale del paziente e il suo grado di autosufficienza, tramite la valutazione di alcuni parametri che vengono ricavati ponendo domande specifiche al paziente o ai familiari o ai tutori. Tre domande indagano l'eventuale coinvolgimento bulbare (linguaggio, salivazione, deglutizione); altre sei domande indagano il livello di autosufficienza correlato alla funzione motoria a vari livelli (scrivere a mano, tagliare il cibo e usare utensili, vestirsi e lavarsi, girarsi nel letto e aggiustare le coperte, camminare, salire le scale); infine, tre domande valutano la funzione respiratoria, l'ortopnea e la necessità di assistenza ventilatoria.

4.2.4 Eventi avversi

Un evento avverso è qualsiasi modificazione delle condizioni cliniche del paziente non imputabile al decorso previsto della malattia e che ha un potenziale significato clinico

oppure qualsiasi evento clinico presentato dal paziente che sta partecipando allo studio. Sono pertanto incluse lesioni, effetti tossici, reazioni da ipersensibilità, malattie non correlate al disturbo in studio, interventi chirurgici svolti durante lo studio, per tutta la durata del trattamento, correlati o meno al trattamento stesso.

Per eventi avversi gravi si intendono: il decesso, una condizione pericolosa per la vita, un evento che determina il ricovero del paziente o il prolungamento di un ricovero, un evento che determina una disabilità grave o permanente.

Cinque pazienti, dei sei che si sono ritirati dallo studio durante i primi tre mesi di sperimentazione, hanno presentato eventi avversi, che hanno motivato la sospensione dell'assunzione delle bustine. Quattro soggetti hanno presentato eventi assimilabili come reazioni avverse alla sostanza assunta. In particolare:

- tre hanno sviluppato gastralgia, risoltasi con la sospensione dell'assunzione delle bustine,
- uno ha sviluppato rush cutanei, trattati con corticosteroidi e antistaminici.

L'ultima paziente, invece, ha presentato un evento avverso non considerato correlabile all'assunzione dell'integratore (infarto miocardio STEMI).

4.2.5 L'esercizio test

L'esercizio test ha previsto l'esecuzione di uno sforzo dinamico incrementale sui muscoli dell'avambraccio, tramite un miometro connesso ad un "*hand-grip*", nel corso del quale sono stati effettuati dei prelievi ematici sequenziali da una vena antecubitale.

L'esercizio muscolare e i prelievi devono essere effettuati sullo stesso arto superiore, che possibilmente corrisponde a quello in cui il soggetto ha maggiore forza. Nel corso delle visite T1 e T2, la prova deve essere svolta sullo stesso arto su cui è stata effettuata al tempo T0.

Il test da sforzo ha previsto una serie di steps.

- a. Esecuzione del prelievo basale.
- b. Valutazione della forza massima media. Si chiede al paziente, per 3 volte consecutive, di stringere l'*hand-grip* del miometro con la massima forza possibile, appuntando i valori raggiunti, misurati in Newton (N). Si calcola la media dei 3 valori e si considera questa misura la forza massima teorica del soggetto in esame.

- c. 1° step: si chiede al paziente di stringere l'*hand-grip* del miometro ad intermittenza (alla velocità di circa 1 contrazione/secondo), al 30% della forza massima teorica, per 1 minuto. Al termine si esegue un prelievo ematico.
- d. 2 minuti di riposo.
- e. 2° step: si chiede al paziente di stringere l'*hand-grip* del miometro ad intermittenza (alla velocità di circa 1 contrazione/secondo), al 50% della forza massima teorica, per 1 minuto. Al termine si esegue un prelievo ematico.
- f. 2 minuti di riposo.
- g. 3° step: si chiede al paziente di stringere l'*hand-grip* del miometro ad intermittenza (alla velocità di circa 1 contrazione/secondo), al 70% della forza massima teorica, per 1 minuto. Al termine si esegue un prelievo ematico.
- h. 15 minuti di recupero.
- i. Al termine si esegue l'ultimo prelievo ematico.

Non tutti i pazienti affetti da SLA sono in grado di stringere l'*hand-grip* del miometro, a causa dell'ipostenia conseguente alla malattia. In tal caso lo studio si affida all'esecuzione del solo prelievo basale.

4.2.6 Parametri biochimici dello stress ossidativo

In ogni prelievo sequenziale viene dosata una serie di parametri biochimici, in particolare gli AOPP (Advanced Oxidation Protein Products), la FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power), i gruppi tiolici (-SH) e l'acido lattico.

Per il dosaggio di AOPP e Tioli, vengono prelevati circa 3 cc di sangue venoso, raccolto in una provetta contenente l'anticoagulante K⁺-EDTA (acido etilendiamminotetraacetico). Per il dosaggio della FRAP, invece, viene utilizzata una provetta da 4 cc contenente l'anticoagulante litio-eparina.

I campioni prelevati sono stati prontamente centrifugati a 3000 rpm per 10 minuti ad una temperatura di 4°C; il plasma così ottenuto è stato congelato a -80°C per un periodo massimo di un mese prima del dosaggio.

AOPP

I prodotti di ossidazione avanzata delle proteine sono un marcatore che indica la quantità di proteine modificate dai processi di ossidazione.

La determinazione degli AOPP permette di stimare la quantità di proteine che hanno subito un processo di ossidazione, a livello di specifici residui amminoacidici, da parte di specie chimiche reattive. Essa è stata eseguita secondo il protocollo descritto da Witko-Sarsat e collaboratori (1996).

Questo protocollo prevede, in una prima fase, la preparazione delle soluzioni necessarie per effettuare l'analisi: tampone fosfato di Dulbecco (PBS, Phosphate Buffered Saline), ioduro di potassio (KI) e standard di Cloramina T (100X). Quest'ultimo si ottiene sciogliendo 2,27g di cloramina T su 1litro di PBS, dopodiché è prevista la preparazione di standard a diverse concentrazioni, mediante diluizioni scalari, da 1mM fino a 0mM (bianco).

Nella fase successiva, la determinazione delle AOPP è stata eseguita su una piastra da 96 pozzetti (Costar). A 200 µl di plasma diluiti 1:5 in tampone fosfato di Dulbecco (PBS) sono stati aggiunti 20 µl di acido acetico e 10 µl di ioduro di potassio (KI) 1,16 M. Il valore di assorbanza di tale miscela di reazione è stato determinato tramite uno spettrofotometro. La lettura allo spettrofotometro è stata eseguita ad una lunghezza d'onda di 340 nm. Al valore ottenuto è stato sottratto il valore di assorbanza di un bianco costituito da 200 µl di PBS contenente 20 µl di acido acetico e 10 µl di ioduro di potassio 1,16 M. La curva di calibrazione è stata allestita utilizzando diluizioni scalari della soluzione di cloramina T 0,1 mM in PBS e i valori di AOPP sono stati espressi come nmol/ml di equivalenti di cloramina T. Il valore normale basale di riferimento del laboratorio è 124,5-190,5 nmoli/ml.

FRAP

Al valore dell'attività ferro riducente del plasma contribuiscono, principalmente, l'acido urico, e, in misura minore, l'acido ascorbico, l' α -tocoferolo, le proteine e la bilirubina. La determinazione della FRAP è una metodica che permette di valutare la capacità antiossidante del plasma stesso mediante la riduzione dello ione ferrico, presente nel reattivo FRAP, in ione ferroso (111).

La determinazione della FRAP è stata eseguita seguendo il protocollo descritto da Benzie e Strain (1996).

Questo protocollo prevede, in una prima fase, la preparazione delle soluzioni necessarie per effettuare l'analisi: soluzione di acido acetico, soluzione di acetato di sodio, tampone sodio acetato (pH 3,6), acido cloridrico (HCl), standard di solfato di ferro eptaidrato 4 mM, tripiridiltriaina (TPTZ) 10 mM, cloruro ferrico (FeCl₃) 20 mM. Infine, per la preparazione

del reattivo FRAP sono stati miscelati: 10 volumi di tampone sodio acetato (pH 3,6), 1 volume di TPTZ e 1 volume di FeCl₃; il reattivo così preparato è stato incubato a 37°C per 10 minuti.

Nella fase successiva, è stata effettuata la semina su una piastra da 96 pozzetti (Costar), utilizzando 8 µl di bianco, 8 µl di standard e 8 µl di plasma dei campioni da analizzare. A questi sono stati aggiunti 250 µl di reattivo FRAP e, dopo un'incubazione di 4 minuti, sono stati letti i valori di assorbanza ad una lunghezza d'onda di 620 nm. È stata allestita una curva di calibrazione utilizzando i valori di assorbanza delle diluizioni scalari di solfato di ferro eptaidrato. Dalla media dei valori di assorbanza di ciascun campione è stato sottratto il valore di assorbanza del bianco. La FRAP dei campioni analizzati è stata calcolata utilizzando l'equazione ottenuta dalla regressione lineare della curva standard. I dati sono stati espressi in mmol/l. Il valore normale basale di riferimento del laboratorio è >0,7 mmol/l.

Tioli

I tioli sono composti organici che possiedono un gruppo sulfidrilico (-SH).

La determinazione dei gruppi tiolici plasmatici totali (dosaggio del contenuto delle proteine plasmatiche allo stato ridotto) è stato effettuato seguendo il protocollo descritto da Hu nel 1994 (112).

Questo protocollo prevede, in una prima fase, la preparazione delle soluzioni necessarie per effettuare l'analisi: EDTA 50 M, EDTA 20 mM, TRIS 25 mM, Tris Base [25 mM] – EDTA [20 mM] pH 8,2, DTNB.

Nella fase successiva, sono stati prelevati 50 µl di plasma di ciascun paziente, ai quali sono stati aggiunti nell'ordine: 150 µl di TRIS [25 mM] – EDTA [20 mM], 800 µl di metanolo, 10 µl di DTNB.

I campioni sono stati vortexati ed incubati per 20 minuti a temperatura ambiente. Trascorso questo lasso di tempo, sono stati centrifugati a temperatura ambiente per 10 minuti a 5315 rpm e 250 µl di supernatante di ciascun campione sono stati seminati in doppio, su piastra. L'assorbanza di ciascun campione e del bianco, costituito solo da DTNB, è stata misurata ad una lunghezza d'onda di 412 nm. Ai valori medi di assorbanza dei campioni sono stati sottratti i valori di assorbanza del bianco. I dati sono stati espressi in µmol/l. Il valore normale basale di riferimento del laboratorio è 0,4-0,6 µmol/l.

Acido lattico.

L'acido lattico è il prodotto finale della glicolisi anaerobica; è un metabolita coinvolto nel mantenimento del pH del sangue ed è una fonte di stress ossidativo.

La tecnica impiegata per la determinazione dell'acido lattico si basa su una metodica colorimetrica enzimatica (Metodo Trinder) e il campione impiegato è il plasma raccolto con eparina o EDTA.

La lattato ossidasi libera perossido di idrogeno che, in presenza di perossido e con 4-aminoantipirina (4-AAP) e N-etil-N-sulfopropil-m-amisidina (ESPAS), può produrre un composto colorato. L'intensità della colorazione è proporzionale alla quantità di lattato presente nel campione e viene misurata mediante uno spettrofotometro.

4.3 Analisi statistica dei risultati

Per ogni parametro clinico e per ogni parametro laboratoristico, sono stati calcolati, a ciascun tempo di valutazione (T0 e T1), valore medio e deviazione standard (media \pm DS).

Per ogni parametro laboratoristico preso in considerazione, per mezzo del “*test t di Student*” per dati appaiati a due code, sono stati eseguiti una serie di confronti:

- confronto del parametro nel gruppo **a** fra T0 e T1;
- confronto del parametro nel gruppo **b** fra T0 e T1;
- confronto del parametro nel gruppo **a** al T0 con lo stesso parametro nel gruppo **b** al T0;
- confronto del parametro nel gruppo **a** al T1 con lo stesso parametro nel gruppo **b** al T1.

Per ogni parametro clinico preso in considerazione, per mezzo del “*test t di Student*” per dati appaiati a due code, è stato eseguito un confronto tra la variazione del parametro tra i tempi T0 e T1 nel gruppo **a** e la variazione dello stesso parametro tra i tempi T0 e T1 nel gruppo **b**.

La significatività statistica è stata considerata ad un livello di $p < 0,05$.

5. RISULTATI

5.1 Parametri biochimici

In ciascun gruppo, **a** e **b**, si distinguono a loro volta:

- pazienti che hanno eseguito la prova da sforzo completa, per cui disponiamo di tutti i valori dei parametri esaminati: basale, 30%, 50%, 70%, recupero (15 soggetti nel gruppo **a**, 12 soggetti nel gruppo **b**);
- pazienti che sono stati incapaci di eseguire la prova da sforzo, in quanto, per ipostenia dell'arto superiore, non in grado di stringere l'*hand-grip* del miometro, per cui disponiamo del solo valore basale del parametro in studio (7 soggetti nel gruppo **a**, 5 soggetti nel gruppo **b**).

Nel gruppo **a**, sono state calcolate, sia per il tempo T0 sia per il tempo T1:

- media e deviazione standard del valore del parametro esaminato a riposo, considerando tutti i pazienti, sia quelli che hanno eseguito la prova da sforzo sia quelli che non la hanno eseguita;
- media e deviazione standard di ogni valore (basale, 30%, 50%, 70%, recupero), considerando solo i pazienti che hanno eseguito la prova da sforzo.

Gli stessi calcoli, sia per il tempo T0 sia per il tempo T1, sono stati svolti anche per il gruppo **b**.

5.1.1 AOPP

Nel gruppo **a**, al tempo T0, i valori riportati sono i seguenti:

- a riposo

	basale
media	514,9064
DS	201,6309

- con test da sforzo

	basale	30%	50%	70%	recupero
media	543,8433	530,8642	599,2514	553,2745	526,2725
DS	172,6389	204,3342	227,7183	197,5931	213,4216

Nel gruppo **a**, al tempo T1, i valori riportati sono i seguenti:

- a riposo

	basale
media	436,8172
DS	203,7727

- con test da sforzo

	basale	30%	50%	70%	recupero
media	429,0293	477,9136	411,3607143	442,5173	381,4621
DS	208,5182	159,155	170,7600771	137,8692	202,3162

Nel gruppo **b**, al tempo T0, i valori riportati sono i seguenti:

- a riposo

	basale
media	534,0988
DS	213,2017

- con test da sforzo

	basale	30%	50%	70%	recupero
media	499,1951	603,0336	418,6967	487,3309	413,3092
DS	192,577	227,4713	165,0798	180,3053	158,8803

Nel gruppo **b**, al tempo T1, i valori riportati sono i seguenti:

- a riposo

	basale
media	483,0164
DS	189,0778

- con test da sforzo

	basale	30%	50%	70%	recupero
media	502,3222	430,27	553,5144444	529,1313	524,5678
DS	204,6651	206,5761	237,2893795	219,9961	201,7324

Dal confronto del valore a riposo degli AOPP tra i tempi T0 e T1 all'interno di uno stesso gruppo, non risulta una differenza significativa né nel gruppo **a** ($p=0,233$) né nel gruppo **b** ($p=0,601$).

Sempre a riposo, anche dal confronto del valore basale degli AOPP al tempo T1, tra **a** e **b**, non risulta una differenza significativa ($p=0,419$), che non era stata riscontrata nemmeno al tempo T0 ($p=0,731$).

Per quanto riguarda i soggetti che hanno eseguito la prova da sforzo, nel gruppo **b**, il confronto dei valori degli AOPP tra i tempi T0 e T1 non ha dato risultati significativi ($p=0,972$ basale, $p=0,108$ al 30%, $p=0,140$ al 50%, $p=0,655$ al 70%, $p=0,173$ al recupero). L'assunzione dell'integratore non ha migliorato il profilo della produzione delle proteine modificate dai processi di ossidazione.

Nel gruppo **a**, invece, lo stesso confronto non ha dato risultati significativi per quanto riguarda il valore basale ($p=0,117$), al 30% ($p=0,499$), al 70% ($p=0,143$) e al recupero

($p=0,089$). Al 50% dello sforzo massimale, il valore degli AOPP dal tempo T0 al tempo T1 si è ridotto in maniera significativa ($p=0,020$).

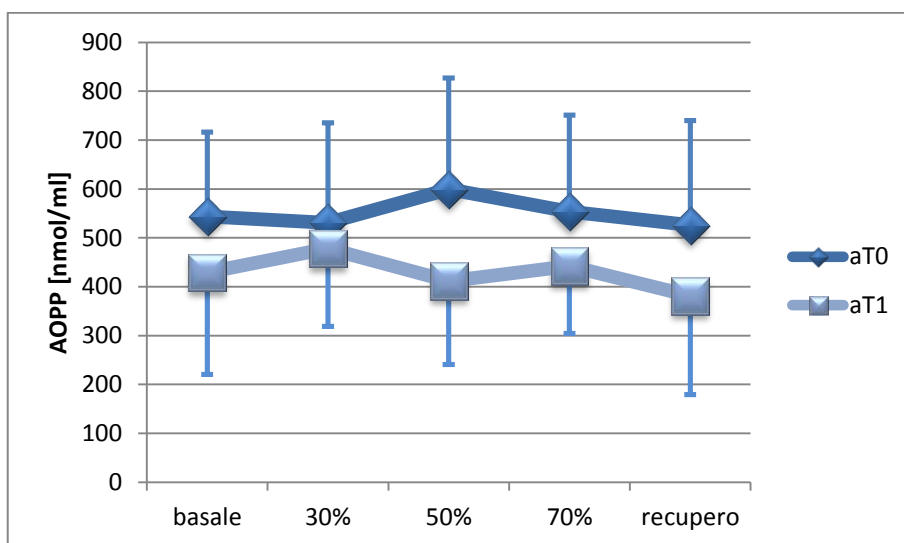


Grafico. Confronto AOPP durante sforzo $aT0 < aT1$.

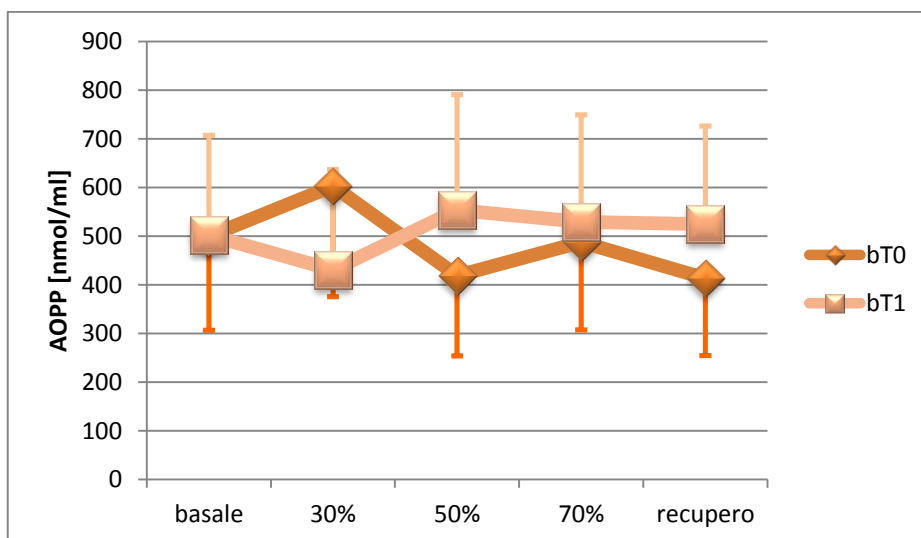


Grafico. Confronto AOPP durante sforzo $bT0 < bT1$.

Anche dal confronto dei valori degli AOPP, durante prova da sforzo, tra i gruppi **a** e **b**, mentre al tempo T1 non è emersa nessuna differenza significativa ($p=0,417$ basale, $p=0,577$ al 30%, $p=109$ al 50%, $p=0,305$ al 70%, $p=0,112$ al recupero), al tempo T0 è emersa una differenza significativa al 50% ($p=0,032$); gli AOPP, al tempo T0, sono molto maggiori nel gruppo **a** rispetto al gruppo **b**.

Al tempo T0, dal confronto degli altri valori di AOPP tra i gruppi **a** e **b** non risultano altre differenze significative (p=0,532 basale, p=0,432 al 30%, p=0,423 al 70%, p=0,155 al recupero).

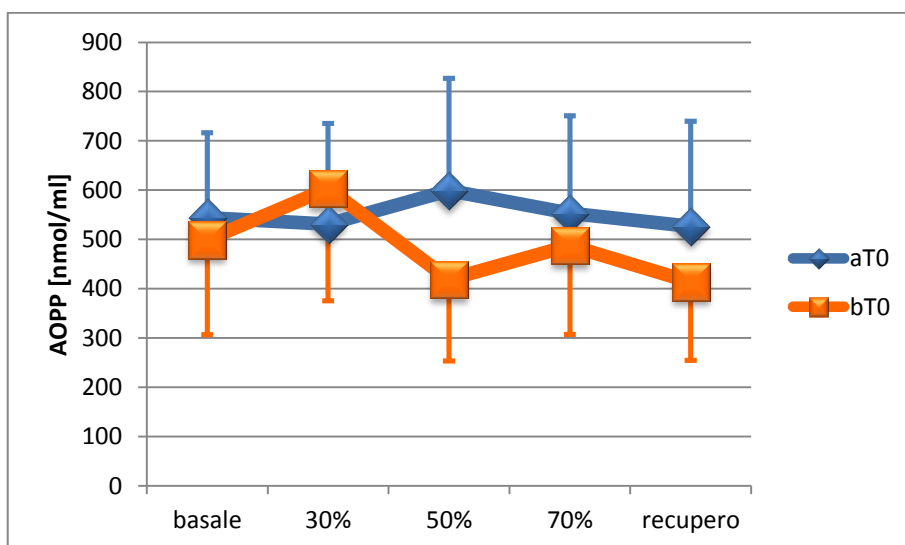


Grafico. Confronto tra le curve degli AOPP aT0 < bT0 durante prova da sforzo.

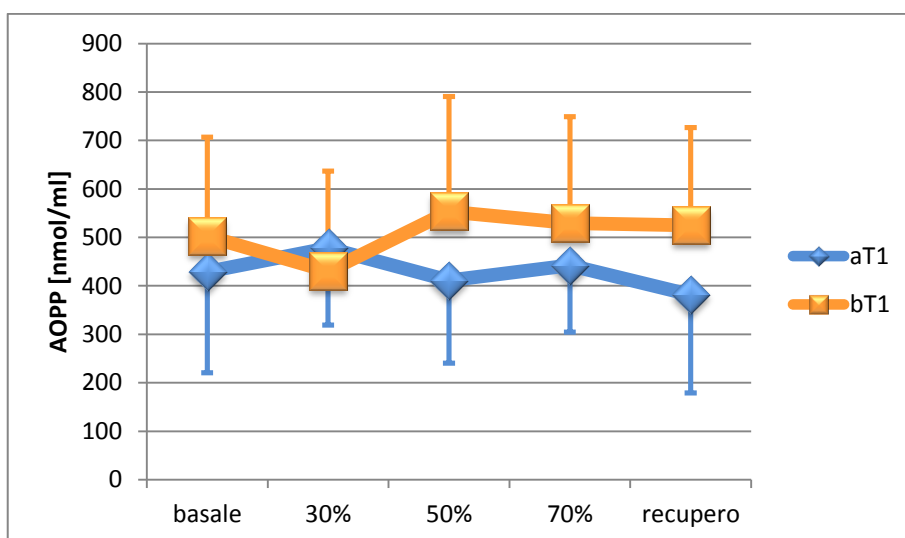


Grafico. Confronto tra le curve degli AOPP aT1 < bT1 durante prova da sforzo.

L'analisi degli AOPP rivela valori di significatività poco giustificabili, sia perché sono presenti al T0, quando non è stata ancora iniziata l'assunzione di integratore/placebo, sia perché la significatività è evidenziata solo al 50% dello sforzo, mentre non è presente né al basale, né al 30%, né al 70%, né al recupero. Un'analisi attenta del campione in studio ha rilevato, nel gruppo **a** al tempo T0, due misurazioni i cui valori si sono dimostrati molto superiori rispetto alla media dei valori di AOPP. Tale differenza può essere considerata

legata al caso (l'estensione ridotta del campione in studio potrebbe non essere in grado di correggere i "bias" intrinseci) oppure una spiegazione alternativa, più probabile data l'entità della differenza di tali valori rispetto alla media, è l'occorrenza imprevista di una variabile metodologica laboratoristica nella processazione del campione ematico.

Ripetendo l'analisi statistica con l'esclusione di queste due misure che si discostano enormemente dalla media dei valori degli AOPP, le due significatività precedentemente riscontrate vengono perse: il confronto dei valori di AOPP al 50% dello sforzo tra il tempo T0 e il T1 all'interno del gruppo **a** non è più significativo ($p=0,075$), così come il confronto al tempo T0 tra il gruppo **a** e il gruppo **b** ($p=0,101$).

5.1.2 FRAP

Nel gruppo **a**, al tempo T0, i valori riportati sono:

- a riposo

	basale
media	0,86075
DS	0,169484

- con test da sforzo

	basale	30%	50%	70%	recupero
media	0,9428	0,86075	0,927357	0,881818	0,977923
DS	0,295293	0,169484	0,333259	0,163234	0,381435

Nel gruppo **a**, al tempo T1, i valori riportati sono:

- a riposo

	basale
media	0,701909
DS	0,148134

- con test da sforzo

	basale	30%	50%	70%	recupero
media	0,739786	0,701909	0,720071	0,707909	0,697714
DS	0,135486	0,148134	0,137789	0,137358	0,152141

Nel gruppo **b**, al tempo T0, i valori riportati sono:

- a riposo

	basale
Media	0,943273
DS	0,320865

- con test da sforzo

	basale	30%	50%	70%	recupero
media	1,0305	0,943273	1,021667	0,927545	1,004917
DS	0,408239	0,320865	0,440562	0,340272	0,406923

Nel gruppo **b**, al tempo T1, i valori riportati sono:

- a riposo

	basale
media	0,748125
DS	0,1236

- con test da sforzo

	basale	30%	50%	70%	recupero
media	0,799111	0,748125	0,746222	0,68425	0,687667
DS	0,162141	0,1236	0,169877	0,116093	0,150591

Dal confronto del valore a riposo della FRAP tra i tempi T0 e T1 all'interno di uno stesso gruppo, non risulta una differenza significativa né nel gruppo **a** ($p=0,110$) né nel gruppo **b** ($p=0,124$).

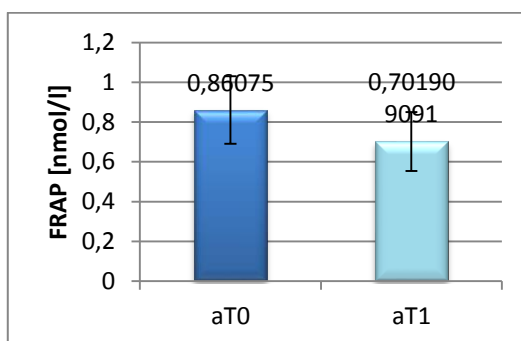


Grafico. Confronto FRAP a riposo $aT0 < aT1$

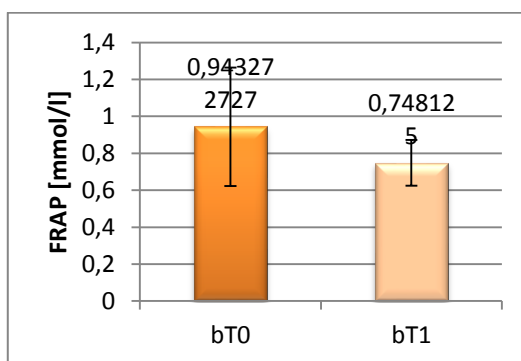


Grafico. Confronto FRAP a riposo $bT0 < bT1$.

Per quanto riguarda i pazienti che hanno eseguito la prova da sforzo, il risultato è stato diverso.

Nel gruppo **a**, nel confronto tra il tempo T0 e il tempo T1 è stata osservata una differenza significativa dei valori della FRAP basale ($p=0,0263$), al 30% dello sforzo massimale

($p=0,0267$), al 50% ($p=0,0410$), al 70% ($p=0,0137$) e al recupero ($p=0,0176$). La variazione è nel senso di una riduzione dell'attività ferro riducente del plasma dal tempo T0 al tempo T1, concludendo che, nei soggetti che hanno assunto placebo, c'è stato un peggioramento di questo parametro.

Diversamente, nel gruppo **b**, sempre per quanto riguarda i pazienti che hanno eseguito la prova da sforzo, nel confronto tra il tempo T0 e il tempo T1 non è stata osservata una differenza significativa dei valori della FRAP basale ($p=0,126$), al 30% dello sforzo massimale ($p=0,122$), al 50% ($p=0,093$) e al 70% ($p=0,071$); invece, è stata osservata, anche in questo caso, una variazione significativa dei valori della FRAP al recupero ($p=0,0391$), sempre nel senso di una riduzione dell'attività ferro riducente del plasma dal tempo T0 al tempo T1.

Ciò è indicativo del fatto che l'assunzione dell'integratore non ha portato ad un miglioramento sotto il profilo dell'attività ferro riducente del plasma durante l'esecuzione di uno sforzo muscolare, ma ha comunque evitato quel peggioramento che è stato registrato nel gruppo di soggetti che hanno assunto il placebo. Nella fase di recupero dopo l'attività di contrazione muscolare dell'avambraccio, invece, nemmeno l'assunzione dell'integratore ha evitato il peggioramento dei valori della FRAP.

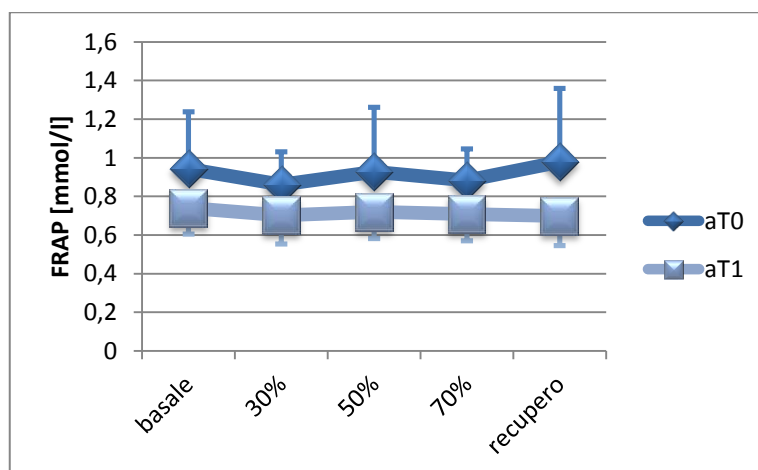


Grafico. Confronto FRAP durante sforzo $aT0 < aT1$.

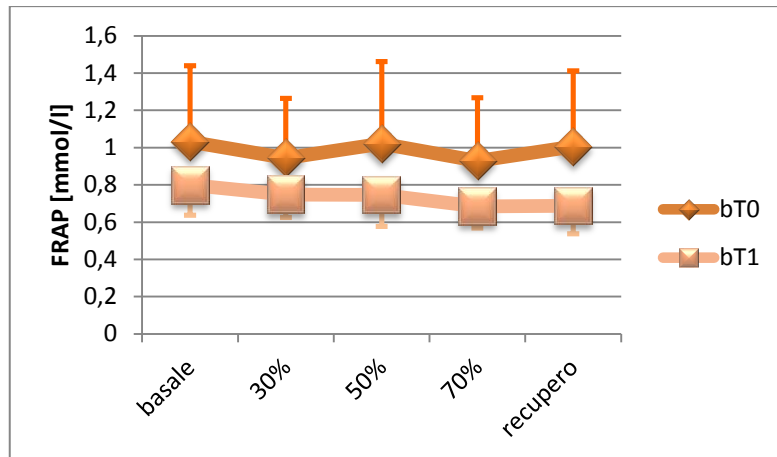


Grafico. Confronto FRAP durante sforzo $bT0 < bT1$.

Sia per quanto riguarda il prelievo effettuato a tutti i pazienti a riposo, sia nei soggetti che hanno eseguito la prova da sforzo, dal confronto dei valori delle FRAP al tempo T1 tra il gruppo **a** e il gruppo **b**, non risulta una differenza significativa (a riposo: $p=0,955$; durante sforzo: $p=0,353$ basale, $p=0,483$ al 30%, $p=0,689$ al 50%, $p=0,698$ al 70%, $p=0,878$ al recupero). Nemmeno al tempo T0 era presente una differenza significativa tra **a** e **b** (a riposo: $p=0,601$; durante sforzo: $p=0,523$ basale, $p=0,444$ al 30%, $p=0,541$ al 50%, $p=0,692$ al 70%, $p=0,866$ al recupero).

5.1.3 Tioli

Nel gruppo **a**, al tempo T0, i valori riportati sono i seguenti:

- a riposo

	basale
media	0,205333
DS	0,054545

- con test da sforzo

	basale	30%	50%	70%	recupero
media	0,231267	0,205333	0,208214	0,203818	0,198667
DS	0,104777	0,054545	0,046335	0,039387	0,056548

Nel gruppo **a**, al tempo T1, i valori riportati sono i seguenti:

- a riposo

	basale
media	0,276818
DS	0,061257

- con test da sforzo

	basale	30%	50%	70%	recupero
media	0,267571	0,276818	0,2795	0,252273	0,2525
DS	0,054209	0,061257	0,059923	0,063632	0,042246

Nel gruppo **b**, al tempo T0, i valori riportati sono i seguenti:

- a riposo

	basale
media	0,185273
DS	0,052838

- con test da sforzo

	basale	30%	50%	70%	recupero
media	0,186667	0,185273	0,190417	0,176364	0,18475
DS	0,101958	0,052838	0,051502	0,052225	0,063636

Nel gruppo **b**, al tempo T1, i valori riportati sono i seguenti:

- a riposo

	basale
media	0,24525
DS	0,042118

- con test da sforzo

	basale	30%	50%	70%	recupero
media	0,252444	0,24525	0,271	0,260375	0,270222
DS	0,044165	0,042118	0,045354	0,038608	0,066317

Nei pazienti a cui è stato effettuato il prelievo basale a riposo, dal confronto del valore dei tioli tra i tempi T0 e T1, nel gruppo **a** non risulta una differenza significativa ($p=0,058$), tutta via molto vicina al limite di significatività. I tioli sono aumentati leggermente al tempo T1 ($0,277 \mu\text{mol/l}$) rispetto al tempo T0 ($0,205 \mu\text{mol/l}$).

Diversamente, sempre a riposo, dal confronto del valore dei tioli tra il tempo T0 e il tempo T1, nel gruppo **b** risulta essere presente una differenza altamente significativa ($p=0,0068$). Il limite di significatività in questo caso, non solo oltrepassa il valore stabilito di $p<0,05$, ma è addirittura minore di $0,001$. I tioli sono aumentati al tempo T1 ($0,245 \mu\text{mol/l}$) rispetto al valore che hanno al tempo T0 ($0,185 \mu\text{mol/l}$).

L'assunzione dell'integratore ha portato ad un aumento del valore a riposo di tali molecole dotate di attività antiossidante, migliorando quindi il profilo dell'equilibrio pro-ossidante/anti-ossidante.

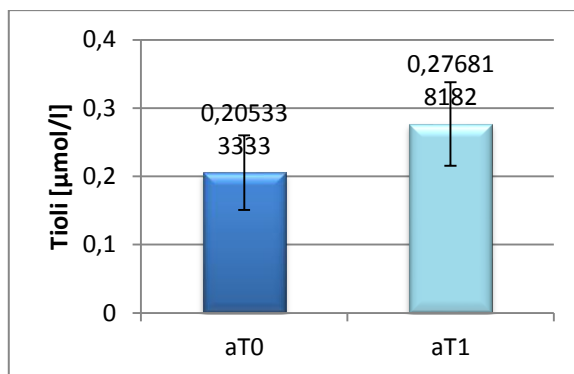


Grafico. Confronto tioli a riposo $aT0 < aT1$.

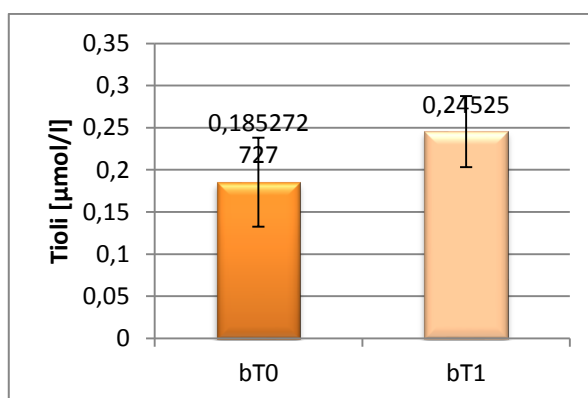


Grafico. Confronto tioli a riposo $bT0 < bT1$.

Per quanto riguarda i pazienti che hanno eseguito la prova da sforzo, invece, nel confronto tra i tempi T0 e T1, sia nel gruppo **a** sia nel gruppo **b** è stata riscontrata una differenza significativa nei valori dei tioli al 30% ($p=0,07$ in **a**; $p=0,017$ in **b**), al 50% ($p=0,02$ in **a**; $p=0,001$ in **b**), al 70% ($p=0,044$ in **a**; $p=0,001$ in **b**) e al recupero ($p=0,011$ in **a**; $p=0,007$ in **b**). L'unico dato non significativo, sia nel gruppo **a** sia nel gruppo **b**, è la differenza del valore basale dei tioli ($p=0,257$ in **a**; $p=0,087$ in **b**).

In entrambi i gruppi il valore dei tioli è aumentato al tempo T1 rispetto al T0.

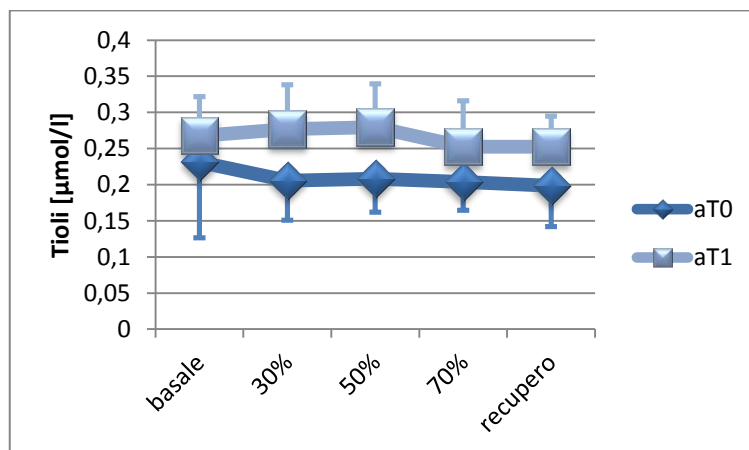


Grafico. Confronto tioli durante sforzo $aT0 < aT1$.

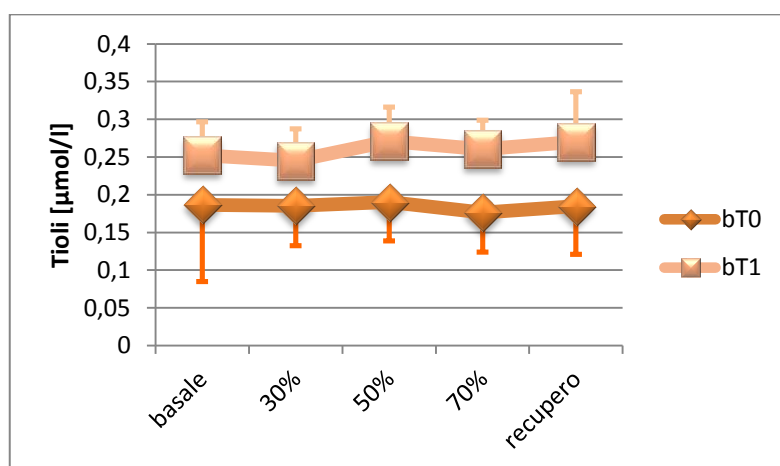


Grafico. Confronto tioli durante sforzo $bT_0 < bT_1$.

Sia per quanto riguarda il prelievo che è stato effettuato a tutti i pazienti a riposo, sia nei soggetti che hanno eseguito la prova da sforzo, dal confronto dei valori dei tioli al tempo T1 tra il gruppo **a** e il gruppo **b**, non risulta una differenza significativa (a riposo: $p=0,702$; durante sforzo: $p=0,492$ basale, $p=0,227$ al 30%, $p=0,720$ al 50%, $p=0,754$ al 70%, $p=0,440$ al recupero). Nemmeno al tempo T0 era presente una differenza significativa tra **a** e **b** (a riposo: $p=0,352$; durante sforzo: $p=0,277$ basale, $p=0,381$ al 30%, $p=0,363$ al 50%, $p=0,179$ al 70%, $p=0,577$ al recupero).

5.1.4 Acido lattico

Nel gruppo **a**, al tempo T0, i valori riportati sono i seguenti:

- a riposo

	basale
media	16,14285714
DS	6,411362681

- con test da sforzo

	basale	30%	50%	70%	Recupero
Media	15,69333333	23	22,39333	25,68	14,4
DS	5,563589112	6,277738	11,05942	13,85167	9,64528

Nel gruppo **a**, al tempo T1, i valori riportati sono i seguenti:

- a riposo

	basale
media	18,15714286
DS	10,29157769

- con test da sforzo

	basale	30%	50%	70%	Recupero
media	17,62	21,2	25,44667	31,17333	15,08667
DS	9,826727402	7,888056	11,23202	11,30793	3,944411

Nel gruppo **b**, al tempo T0, i valori riportati sono i seguenti:

- a riposo

	basale
media	13,28666667
DS	3,472723646

- con test da sforzo

	basale	30%	50%	70%	Recupero
media	13,66	18,37	19,9	22,11	14,38
DS	3,177070628	8,94316	9,074751	11,38483	4,739386

Nel gruppo **b**, al tempo T1, i valori riportati sono i seguenti:

- a riposo

	basale
media	13,76666667
DS	4,687165861

- con test da sforzo

	basale	30%	50%	70%	Recupero
media	14,57	16,35	16,6	17,27	12,31
DS	5,329175463	6,924072	6,476453	11,78842	6,845996

Sia per quanto riguarda il prelievo che è stato effettuato a tutti i pazienti a riposo, sia nei soggetti che hanno eseguito la prova da sforzo, dal confronto dei valori dell'acido lattico tra i tempi T0 e T1 all'interno di uno stesso gruppo, non risulta una differenza significativa, né nel gruppo **a** (a riposo $p=0,451$; durante sforzo $p=0,514$ basale, $p=0,495$ al 30%, $p=0,459$ al 50%, $p=0,244$ al 70%, $p=0,800$ al recupero) né nel gruppo **b** (a riposo $p=0,752$; durante sforzo $p=0,648$ basale, $p=0,579$ al 30%, $p=0,362$ al 50%, $p=0,363$ al 70%, $p=0,442$ al recupero).

Dal confronto dei valori a riposo dell'acido lattico al tempo T1 tra il gruppo **a** e il gruppo **b**, non risulta una differenza significativa ($p=0,133$). Nemmeno al tempo T0 era presente una differenza significativa tra **a** e **b** ($p=0,127$).

Per quanto riguarda i pazienti che hanno eseguito la prova da sforzo, dal confronto dei valori di acido lattico al tempo T1 tra i soggetti appartenenti al gruppo **a** e al gruppo **b**, un dato che mostra significatività statistica è la differenza presente al 70% dello sforzo massimale tra **a** e **b** ($p=0,022$), con un valore minore nei soggetti appartenenti al gruppo **b**. Anche al 50% dello sforzo massimale è possibile osservare una differenza importante nel valore dell'acido lattico tra **a** e **b**, ma questa non raggiunge la significatività statistica ($p=0,099$).

Anche i restanti confronti dei valori di acido lattico al tempo T1 tra **a** e **b** non sono significativi ($p=0,381$ basale, $p=0,228$ al 30%, $p=0,483$ al recupero).

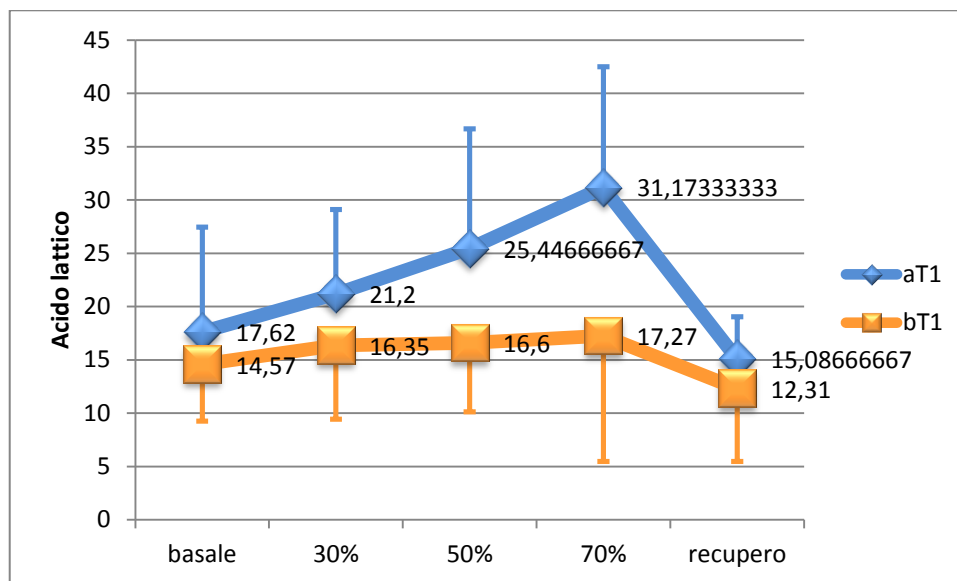


Grafico. Confronto tra le curve dell'acido lattico aT1 < bT1 nel corso della prova da sforzo.

Dall'osservazione del grafico si evince che la differenza dei valori di acido lattico tra **a** e **b** al tempo T1, quasi nulla a riposo, aumenta progressivamente nel corso dell'esecuzione della prova da sforzo, raggiungendo infatti una significatività statistica nella fase del test in cui il paziente contrae il miometro con la forza più alta (70% della forza massimale), per poi tornare ad essere quasi nulla dopo i 15 minuti di recupero.

I livelli di acido lattico risultano sempre minori nel gruppo di pazienti che hanno assunto l'integratore, suggerendo come la supplementazione alimentare con Brainoil abbia migliorato il profilo di produzione di lattato (e conseguentemente lo stato ossidativo del paziente) durante contrazione muscolare, miglioramento che si accentua sempre di più man mano che aumenta l'entità dello sforzo muscolare.

A sostegno di tale effetto positivo dell'integratore c'è l'osservazione che, nel corso dell'esecuzione della prova da sforzo al tempo T0, il confronto dei valori di acido lattico tra i gruppi **a** e **b** non aveva raggiunto significatività statistica (p=0,308 basale, p=0,141 al 30%, p=0,560 al 50%, p=0,506 al 70%, p=0,995 al recupero).

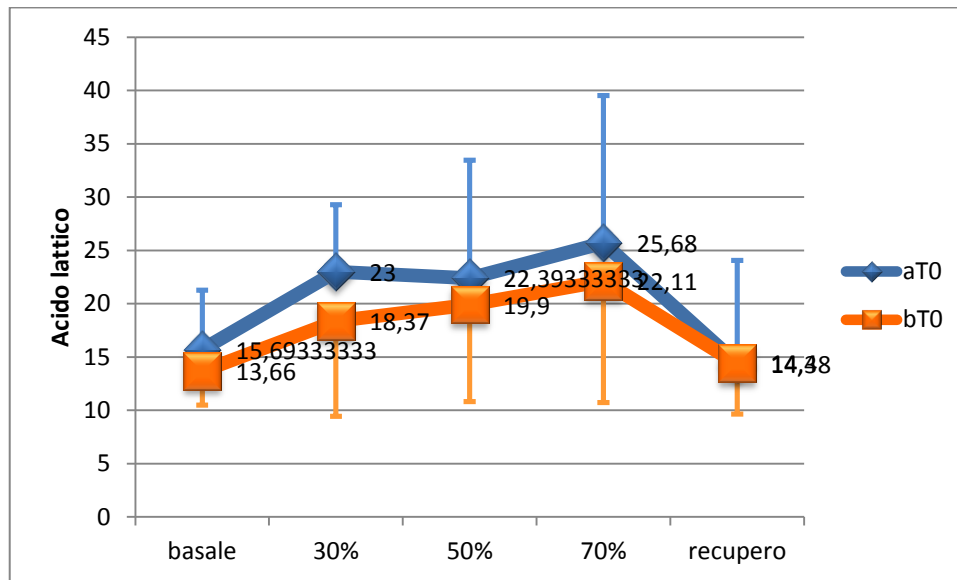


Grafico. Confronto tra le curve dell'acido lattico aT0<bT0 nel corso della prova da sforzo.

Dal confronto degli ultimi due grafici è possibile osservare come, nel gruppo **b**, i valori assoluti di acido lattico al 30%, al 50%, al 70% e al recupero si siano ridotti al tempo T1 rispetto al T0. Al contrario, nel gruppo **a**, i valori assoluti di lattato basali, al recupero, ma soprattutto al 50% e al 70% sono aumentati al tempo T1 rispetto al T0. I pazienti che hanno assunto il placebo hanno visto peggiorare leggermente il loro profilo di produzione di acido lattico sotto sforzo, rispetto ai soggetti che hanno assunto l'integratore, che hanno visto invece migliorare il loro profilo di produzione di lattato sotto sforzo. Questa differente tendenza ha portato all'allargamento della forbice al T1 tra i valori di acido lattico nel gruppo di pazienti che hanno assunto il placebo e i corrispondenti valori nel gruppo di pazienti che hanno assunto Brainoil.

5.2 Parametri clinici

Complessivamente, nessun confronto tra le variazioni di ciascun parametro, nei tempi T0 e T1, tra i gruppi **a** e **b**, ha dato un risultato significativo.

Mentre il punteggio della scala ALS-FRS-r, tra i tempi T0 e T1, si è ridotto maggiormente nel gruppo **a** rispetto al gruppo **b**, il punteggio della scala MRC e i valori della CVM sono ridotti maggiormente nel gruppo **b**, ma nessuna di queste variazioni è comunque significativa. Il valore del BMI si è ridotto leggermente nel gruppo **a** ed è aumentato leggermente nel gruppo **b**, rimanendo comunque pressoché invariato.

5.2.1 ALS-FRS-r

I valori medi della scala ALS-FRS-r ai tempi T0 e T1 per i gruppi **a** e **b** sono risultati i seguenti:

	aT0	aT1	bT0	bT1
media	32,14286	30,09524	28,93333	28
DS	8,23581	10,12376	11,64638	11,49534

Per il gruppo **a**, tra i tempi T0 e T1, è stata registrata una riduzione media del punteggio ALS-FRS-r del $7,91\% \pm 12,94\%$.

Per il gruppo **b**, tra i tempi T0 e T1, è stata registrata una riduzione media del punteggio ALS-FRS-r del $3,25\% \pm 7,24\%$.

Il confronto tra la riduzione del punteggio ALS-FRS-r nel gruppo **a** e nel gruppo **b** non ha dato un risultato significativo ($p=0,2166$).

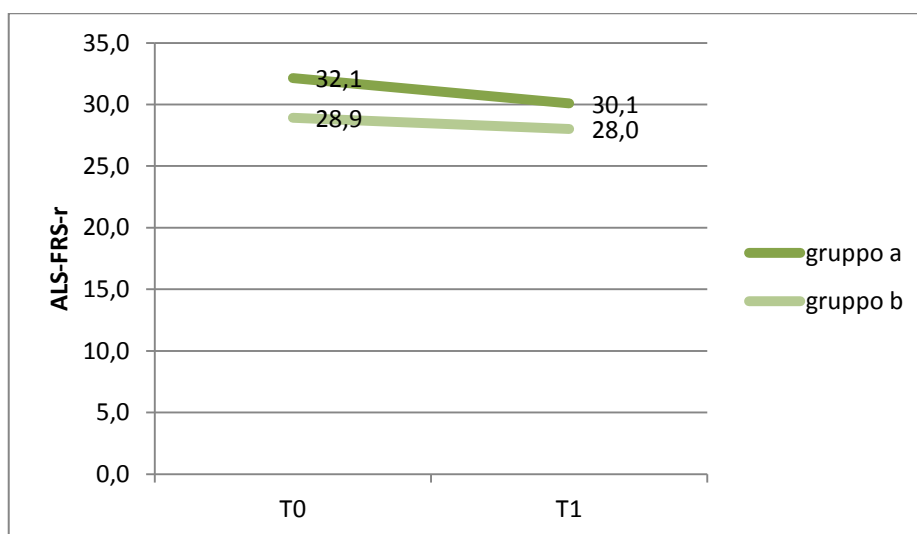


Grafico. Rette di andamento del punteggio ALS-FRS-r, tra i tempi T0 e T1, nei gruppi a e b.

5.2.2 MRC

I valori medi della scala MRC ai tempi T0 e T1 per i gruppi **a** e **b** sono risultati i seguenti:

	aT0	aT1	bT0	bT1
media	125,2381	118,8571	110,2	103,8
DS	33,89529	35,87379	34,35986	38,81494558

Per il gruppo **a**, tra i tempi T0 e T1, è stata registrata una riduzione media del punteggio MRC del $5,66\% \pm 8,59\%$.

Per il gruppo **b**, tra i tempi T0 e T1, è stata registrata una riduzione media del punteggio MRC del $6,54\% \pm 17,65\%$.

Il confronto tra la riduzione del punteggio MRC nel gruppo **a** e nel gruppo **b** non ha dato un risultato significativo ($p=0,8448$).

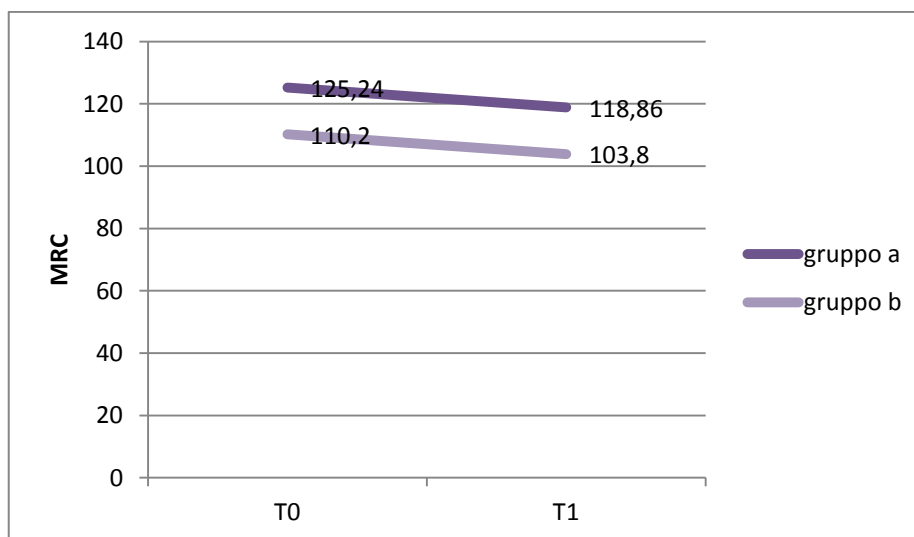


Grafico. Rette di andamento del punteggio MRC, tra i tempi T0 e T1, nei gruppi a e b.

5.2.3 Contrazione Volontaria Massimale

I valori medi della contrazione massimale volontaria (CVM) ai tempi T0 e T1 per i gruppi **a** e **b** sono i seguenti:

	aT0	aT1	bT0	bT1
media	136	137,619	73,4	57,06667
DS	142,3039	152,8105	71,04305	61,8933

Per il gruppo **a**, tra i tempi T0 e T1, è stata registrata un aumento medio della FMTM del $4,32\% \pm 49,18\%$.

Per il gruppo **b**, tra i tempi T0 e T1, è stata registrata una riduzione media della FMTM del $19,5\% \pm 26,5\%$.

Il confronto tra la riduzione della FMTM nel gruppo **a** e nel gruppo **b** non ha dato un risultato significativo ($p=0,3865$).

5.2.4 BMI

I valori medi del BMI ai tempi T0 e T1 per i gruppi **a** e **b** sono i seguenti:

	aT0	aT1	bT0	bT1
media	24,78286	24,54857	24,82933	25,05933
DS	4,036346	3,819923	4,420654	4,167134

Per il gruppo **a**, tra i tempi T0 e T1, è stata registrata una riduzione media del BMI dello $0,8\% \pm 2,92\%$.

Per il gruppo **b**, tra i tempi T0 e T1, è stato registrato un aumento medio del BMI dell' $1,16\% \pm 3,69\%$.

Il confronto tra la variazione del BMI nel gruppo **a** e nel gruppo **b** non ha dato un risultato significativo ($p=0,0847$).

6. DISCUSSIONE

La SLA è la forma più comune e aggressiva delle Malattie del Motoneurone, gruppo di condizioni morbose caratterizzate da degenerazione delle cellule motorie localizzate in corteccia e/o nel midollo spinale e nuclei motori del tronco encefalico. La SLA è una malattia neurodegenerativa che interessa in modo selettivo e sincrono i due tipi di motoneurone (superiore o I, situato a livello corticale, e inferiore o II, situato a livello del midollo spinale), determinando una paralisi muscolare progressiva e a prognosi infausta in 3-5 anni dalla diagnosi (1).

Il nome della malattia deriva dal connubio tra la presenza di una *sclerosi*, dovuta alla gliosi cicatriziale, *laterale*, in quanto la atrofia gliotica riguarda i cordoni laterali del midollo spinale, e l'*amiotrofia* neurogena, perché nell'avanzare della patologia c'è una riduzione della massa muscolare (74).

La SLA ha una incidenza di 1,5-2,5 casi su 100.000 abitanti/anno, interessa prevalentemente i soggetti adulti (con una maggiore incidenza nella fascia d'età tra 50 e 70 anni), con un rapporto maschi/femmine di 1,5:1 (5). La durata di malattia varia considerevolmente da pochi mesi fino a 10-15 anni, con una sopravvivenza media di 3-5 anni. Nella grande maggioranza dei casi (90%), la SLA è una malattia sporadica; le forme familiari rappresentano il 10% del totale (4).

Ad oggi l'eziopatogenesi della SLA rimane sconosciuta, sebbene siano state avanzate numerose ipotesi. Complessivamente, i meccanismi cellulari e molecolari responsabili della degenerazione dei motoneuroni sembrano essere multifattoriali e sembrano operare attraverso vie genetiche e molecolari integrate tra loro (18). Una ipotesi avanzata è quella della eccitotossicità glutammatergica. L'eccitotossicità è una forma di degenerazione neuronale causata da una iperstimolazione dei recettori del glutammato (il principale neurotrasmettitore eccitatorio del SNC) (19). Il principale mediatore del danno neuronale è l'influsso di Ca^{2+} attraverso i recettori del glutammato (soprattutto NMDA e AMPA) (25). I motoneuroni hanno delle proprietà intrinseche che rendono queste cellule particolarmente vulnerabili al danno eccitotossico, soprattutto mediato dai recettori AMPA, in quanto la loro capacità di tamponare l'aumento di Ca^{2+} intracellulare è limitata dalla scarsa espressione in queste cellule di proteine che stabilizzano il Ca^{2+} . Una diretta conseguenza della bassa quantità di proteine leganti il Ca^{2+} nei motoneuroni è che i mitocondri devono svolgere il ruolo maggiore nel "ripulire" dal Ca^{2+} queste cellule; il risultato è un sovraccarico di Ca^{2+} nei mitocondri con generazione di specie reattive dell'ossigeno (28).

L'eccitotossicità è conseguente anche ad una ridotta clearance del glutammato dopo il suo rilascio nello spazio sinaptico. Nei pazienti SLA è stata individuata una perdita selettiva del trasportatore del glutammato astrogliale EAAT2/GLT1 nella corteccia motoria e nel midollo spinale (32). Il più importante argomento a favore del ruolo dell'eccitotossicità nella SLA è il Riluzolo, unico farmaco che rallenta la progressione di malattia aumentando la sopravvivenza di alcuni mesi e che ha proprietà anti-eccitotossiche (33).

Nella patogenesi della SLA è ipotizzato anche il ruolo di fenomeni autoimmunitari, in particolare di una risposta immunitaria umorale diretta contro le terminazioni nervose dei motoneuroni (34). Gli anticorpi individuati sarebbero diretti soprattutto contro i VDCC (canali del Ca^{2+} voltaggio-dipendenti) (41). Inoltre, il possibile coinvolgimento del sistema immunitario nella patogenesi della SLA è stato recentemente confermato da indagini PET che, con un tracciante di attivazione microgliale, hanno dimostrato una aumentata captazione nella corteccia motoria e nei tratti corticospinali di pazienti affetti da SLA rispetto ai controlli sani (48).

Nei motoneuroni di pazienti affetti da SLA è possibile identificare numerose inclusioni, associate ad un alterato ripiegamento proteico e ad una aggregazione di proteine, responsabili di tossicità per la cellula. Tra le componenti intracellulari identificate, abbiamo numerosi aggregati di neurofilamenti (50) e abbondanti aggregati di proteine citoscheletriche, in particolare di periferina, un filamento intermedio che tende ad autoassemblarsi a formare reti di filamenti intermedi o eterodimeri con ognuna delle subunità dei neurofilamenti. Queste inclusioni sono associate con la degenerazione assonale e la morte dei motoneuroni, probabilmente correlata ad un deficit di trasporto intracellulare assonale (53).

Tra le ipotesi patogenetiche è chiamata in causa anche la disfunzione mitocondriale, che è stata evidenziata nei motoneuroni di pazienti con SLA sporadica e in modelli murini (55). La disfunzione mitocondriale è conseguenza di anomalie nella catena di trasporto degli elettroni e di un danno ossidativo al DNA mitocondriale. Essendo i mitocondri la principale fonte di energia per la cellula, la degenerazione mitocondriale può condurre ad un deficit energetico. Probabilmente, la grande dimensione del motoneurone, rispetto ad altri tipi cellulari ed anche ad altri tipi di neurone, e, di conseguenza, la sua alta domanda di energia, potrebbe renderlo particolarmente vulnerabile agli effetti avversi della disfunzione mitocondriale. I motoneuroni con metabolismo compromesso sarebbero incapaci di mantenere il potenziale di membrana, con apertura dei recettori del glutammato NMDA e ingresso di Ca^{2+} . Quindi la disfunzione mitocondriale potrebbe causare la morte

dei motoneuroni predisponendo queste cellule alla eccitotossicità, ma anche aumentando la generazione di specie reattive dell'ossigeno, così come dando avvio alla via intrinseca della apoptosi (57).

Alcuni dati, ricavati da studi sul midollo spinale di topi transgenici e successivamente anche di pazienti affetti da SLA sporadica, suggeriscono che una alterazione della via pro-apoptotica mitocondrio-dipendente possa contribuire alla perdita di motoneuroni nella SLA (59).

Altre evidenze sono a favore di una alterazione del meccanismo autofagico. L'autofagia è un importante processo omeostatico che funziona eliminando gli organelli difettosi e gli aggregati proteici per tutta la vita del neurone. Un marker patologico di SLA è l'accumulo nell'assone di vacuoli autofagici, sollevando così l'ipotesi che un sistema lisosomale disfunzionale possa determinare stress autofagico e degenerazione assonale. Da studi su topi SOD1 mutati è stato osservato che questo deficit di funzione lisosomale impedisce ai vacuoli autofagici di fagocitare i mitocondri danneggiati dall'assone distale (61).

L'ipotesi fondamentale nella patogenesi della SLA, come delle altre malattie neurodegenerative, resta quella di un eccessivo stress ossidativo. I processi chimici che comportano lo spostamento di singoli elettroni determinano la generazione di molecole reattive, conosciute come ROS (specie reattive dell'ossigeno) e RNS (specie reattive dell'azoto). Le specie radicaliche (ROS e RNS) possono derivare da processi esogeni o endogeni (65). In tutti gli organismi viventi è possibile individuare l'esistenza di un delicato equilibrio tra la produzione e l'eliminazione di specie chimiche ossidanti. Una fisiologica concentrazione di ROS e RNS ha importanti funzioni regolatorie e di mediazione, mentre un aumento incontrollato porta ad una catena di reazioni radicaliche che danneggiano le molecole biologiche, reagendo con lipidi, proteine, carboidrati e acidi nucleici. Perciò, per limitare l'accumulo di ROS e RNS, è richiesta la presenza di barriere antiossidanti. Lo stress ossidativo descrive una condizione in cui le difese antiossidanti cellulari non riescono a mantenere i livelli di ROS e RNS al di sotto della soglia di tossicità. Questo può essere il risultato o di una loro eccessiva produzione o di una perdita delle naturali difese antiossidanti o di entrambi i fattori (66).

In condizioni normali, i livelli e le attività delle ROS e RNS sono regolati da sistemi di difesa sia enzimatici, come superossido dismutasi (SOD) e catalasi (CAT), sia non enzimatici, come glutatione (GSH), vitamine A, E, C (63).

Tessuti diversi presentano differente suscettibilità allo stress ossidativo. Il sistema nervoso centrale è estremamente sensibile a questo tipo di danno, per diverse ragioni che

includono: un basso livello di antiossidanti, un elevato contenuto di substrati ossidabili e una grande quantità di ROS prodotte durante le reazioni neurochimiche (70).

I mitocondri sono un target dello stress ossidativo, in quanto la loro corretta funzione dipende dall'integrità delle membrane e perché possiedono il loro DNA che può essere a sua volta danneggiato. Tuttavia sono anche la principale sede di produzione di ROS.

La disfunzione mitocondriale e lo stress ossidativo hanno entrambi come conseguenza l'aumentata produzione di ROS e RNS, lo stress del reticolo endoplasmatico, alterazioni dei processi riguardanti l'RNA. Questi processi causano, a loro volta, altri effetti dannosi, come la formazione di proteine malripiegate che formano aggregati citosolici e mitocondriali e sono correlati ad un alterato trasporto assonale. Il confine tra cause e conseguenze di ognuno di questi eventi è difficile da tracciare, dal momento che sono tutti strettamente connessi e interdipendenti (71).

Le malattie neurodegenerative sono accomunate dal riscontro di alti livelli di biomarcatori di stress ossidativo e bassi livelli di biomarcatori di difesa antiossidante nel sistema nervoso centrale e nei tessuti periferici. Studi eseguiti post-mortem su campioni di tessuti ricavati da pazienti con SLA sporadica o familiare supportano l'ipotesi di un danno ossidativo rivolto verso lipidi, proteine, carboidrati e DNA, tramite il riscontro di biomarkers di stress ossidativo, di perossidazione lipidica, di danno proteico, ai carboidrati e al DNA. Ad esempio, aumentati livelli di AOPP (Advanced Oxidation Protein Products) e ridotti livelli di FRAP (Ferric-Reducing Ability of Plasma) sono stati riscontrati nel plasma o negli eritrociti di pazienti affetti da SLA sporadica, confermando un'alterazione dello stato redox (63).

La presenza di biomarkers di stress ossidativo in regioni del sistema nervoso centrale che sono critiche per la SLA suggerisce come essi siano implicati nella degenerazione dei motoneuroni; ciò è stato confermato da recenti studi eseguiti su pazienti affetti tramite PET. Inoltre da questo studio si è ricavato che l'entità dello stress ossidativo correla con la gravità clinica della malattia (72).

L'attività dell'enzima SOD si è rivelata ridotta nei globuli rossi e nel liquor di soggetti con SLA sia sporadica sia familiare. Lo stesso si è dimostrato anche per l'enzima CAT; inoltre, la riduzione di CAT si è visto essere correlata alla progressione di malattia. Al contrario, i livelli di altri antiossidanti nel plasma o nel liquor (come vitamina E, beta-carotene, vitamina C, acido urico, molecole contenenti gruppi tioli) sono risultati elevati o non modificati, a seconda dello studio in questione. I risultati divergenti possono essere spiegati con l'eterogeneità della SLA. Tutto ciò supporta l'ipotesi che la SLA abbia molte varianti

che differiscono nei meccanismi patogenetici e nel loro profilo di risposte antiossidanti enzimatiche o non enzimatiche (63).

L'ipotesi del ruolo dello stress ossidativo nella patogenesi della SLA ha portato a sperimentare varie sostanze ad attività antiossidante per cercare di rallentare la progressione della malattia. La sostanza sperimentata in questo lavoro di tesi è la curcumina.

La curcumina è un pigmento giallo-arancio, insolubile in acqua, estratto dalla pianta *Curcuma longa*, isolata per la prima volta nel 1815. Chimicamente si tratta di un diferuloilmetano (88). Questo composto ha dimostrato di svolgere un gran numero di attività farmacologiche: antinfiammatoria, antioncogena, antimicrobica... Il principale effetto biologico della curcumina è comunque la sua attività antiossidante, dieci volte più potente di quella delle vitamine C ed E. Si comporta da potente *scavenger* di varie specie reattive dell'ossigeno e specie reattive dell'azoto, oltre ad inibire la perossidazione lipidica (90). Quindi la curcumina potrebbe avere un potenziale significativo nel trattamento di un gran numero di patologie che sono il risultato dello stress ossidativo. Gli utilizzi terapeutici della curcumina sono rivolti ad un'ampia varietà di condizioni patologiche: cutanee, polmonari, gastrointestinali, epatiche, neurologiche, cardiovascolari, metaboliche, autoimmuni e neoplastiche. Il motivo per cui una sola molecola possa avere così tanti effetti diversi può essere spiegato dai numerosi targets molecolari della curcumina, che includono fattori di trascrizione, fattori di crescita, citochine infiammatorie, protein-chinasi e altri enzimi (89).

Il razionale della sperimentazione della curcumina in pazienti affetti da SLA si fonda su studi svolti su modelli cellulari che hanno dimostrato come questo composto agisca su meccanismi (stress ossidativo e disfunzione mitocondriale) che si presuppongono essere coinvolti nella patogenesi della malattia. Ad esempio, uno studio del 2014 è stato svolto su linee di motoneuroni transfettate con TDP-43 mutata. TDP-43 è una proteina nucleare implicata nella regolazione dell'RNA, la cui mutazione è riscontrata nelle forme sia familiari sia sporadiche di SLA. È dimostrato che TDP-43 mutata induce stress ossidativo e disfunzione mitocondriale, con una aumentata produzione di ROS, che a loro volta sono coinvolti nella modulazione della funzione dei canali del Na. Dal momento che i canali del Na sono critici per l'inizio e la propagazione dei potenziali d'azione, base dell'eccitabilità neuronale, la presenza di TDP-43 mutata risulta in una ipereccitabilità neuronale. Inoltre, l'aumento di eccitabilità può facilitare lo stress ossidativo, consentendo un eccessivo

ingresso di ioni Ca^{2+} durante ogni potenziale d'azione attraverso i canali del Ca^{2+} voltaggio-dipendenti, e può anche contribuire all'alterazione dei mitocondri e del metabolismo cellulare determinando uno stato di deplezione energetica cronico. Di conseguenza, l'aumento di eccitabilità, lo stress ossidativo e la disfunzione mitocondriale si trovano in un circolo vizioso tale per cui la presenza di TDP-43 mutata conduce alla fine, in ogni modo, alla degenerazione dei motoneuroni. Sulla base di tali presupposti, l'ipotesi dello studio qui condotto è stata che l'assunzione di curcumina potesse permettere una effettiva protezione dallo stress ossidativo e dalla disfunzione mitocondriale nelle linee cellulari motoneuronali transfettate con TDP-43 mutata. In questo studio, dopo la somministrazione di curcumina per 24 ore, l'aumento di eccitabilità correlato a TDP-43 mutata è riportato alla normalità; questo effetto si presuppone che sia dovuto alla funzione antiossidante e di protezione mitocondriale della curcumina (94).

Uno studio precedente, sempre svolto su linee cellulari motoneuronali transfettate con TDP-43 mutata, era andato più nello specifico ad analizzare gli effetti protettivi della curcumina nei confronti delle alterazioni mitocondriali causate dalla mutazione di TDP-43, dimostrando come questo composto agisca migliorando la morfologia dei mitocondri e l'attività della catena di trasporto degli elettroni (96).

Un altro studio, svolto su un modello cellulare di astrociti del midollo spinale di topo, ha dimostrato come la curcumina sia in grado di migliorare la funzione antiossidante negli astrociti, attenuando il danno ossidativo e la disfunzione mitocondriale, considerando che gli astrociti contribuiscono a proteggere i neuroni dal danno ossidativo e una alterazione dei meccanismi antiossidanti al loro interno è ritenuta essere implicata in varie patologie neurodegenerative, inclusa la SLA (98).

La principale limitazione nell'uso della curcumina è la sua scarsa biodisponibilità. Quando somministrata oralmente, la curcumina, oltre ad essere scarsamente assorbita a livello intestinale, subisce coniugazione a livello epatico, con formazione di metaboliti biologicamente inattivi.

Lo studio oggetto di questa tesi si basa sulla supplementazione alimentare di curcumina, tramite l'assunzione di Brainoil. Brainoil è un integratore alimentare a base di curcumina (1500mg/bustina), la cui formulazione è stata progettata in modo tale da aumentare del 2000% la biodisponibilità del principio attivo, che viene ottenuta con l'uso della piperina come adiuvante, che inibisce la glucuronidazione.

Lo studio ha analizzato un campione di 42 pazienti affetti da SLA, durante un protocollo terapeutico della durata complessiva di 6 mesi, in doppio cieco, con utilizzo di placebo, per i primi 3 mesi, a braccio unico ed aperto nei successivi 3 mesi. Questa tesi analizza i dati relativi alla prima fase in doppio cieco del trial.

La decisione di suddividere il trial in due bracci, in doppio cieco nei primi 3 mesi e a braccio unico in aperto per i 3 mesi successivi, è dettata dalla necessità di aumentare la significatività di uno studio svolto su un limitato numero di pazienti.

Sono stati, pertanto, reclutati 42 pazienti, poi suddivisi in 2 gruppi. Nei primi 3 mesi, il primo gruppo è stato trattato con Brainoil per 90 giorni consecutivi, salvo insorgenza di effetti avversi, mentre il secondo gruppo ha ricevuto un placebo. Nei 3 mesi successivi, entrambi i gruppi hanno assunto Brainoil.

Nello studio si individuano 4 tempi, di cui i primi tre sono descritti e analizzati nel presente lavoro di tesi. Al tempo T-1 è avvenuto l'arruolamento dei pazienti, dopo aver verificato i criteri di inclusione e di esclusione dallo studio. Successivamente i soggetti sono stati randomizzati in due gruppi, appaiati per sesso, età ed entità di malattia, secondo la scala ALS-FRS-r.

Al tempo T0, nel corso della visita, per ciascun paziente è stata eseguita la valutazione clinica. Inoltre è stato eseguito un test da sforzo incrementale sui muscoli dell'avambraccio con ausilio di un miometro. La prova da sforzo prevede vari steps, nel corso dei quali sono stati effettuati dei prelievi ematici sequenziali da una vena antecubitale: un prelievo basale, uno dopo l'esecuzione dello sforzo al 30% della forza massima teorica per quel paziente, uno dopo l'esecuzione dello sforzo al 50% della forza massima teorica, uno dopo l'esecuzione dello sforzo al 70% della forza massima teorica, infine, uno dopo 15 minuti di recupero dall'ultimo sforzo. Non tutti i pazienti affetti da SLA sono in grado di stringere l'*hand-grip* del miometro, a causa dell'ipostenia conseguente alla malattia; in tal caso lo studio si è affidato all'esecuzione del solo prelievo basale. Infine, ai pazienti sono state fornite le bustine da assumere quotidianamente fino alla visita successiva: ai soggetti appartenenti al gruppo **a** è stato fornito il placebo, ai soggetti appartenenti al gruppo **b** è stato fornito l'integratore.

Al tempo T1, nel corso della visita, sono stati ripetuti valutazione clinica e test da sforzo; a tutti i pazienti sono state fornite le bustine di integratore da assumere fino alla visita successiva.

Al tempo T2, i cui dati non sono oggetto del presente studio di tesi, saranno ripetuti test da sforzo e valutazione clinica.

Lo scopo del trial è stato, quindi, quello di studiare l'effetto della supplementazione alimentare con curcumina tramite la valutazione di due tipi principali di parametri: clinici e laboratoristici.

Dal punto di vista dei parametri clinici analizzati (il punteggio della scala ALS-FRS-r, il punteggio della scala MRC, la forza massima media alla contrazione volontaria massimale, CVM, e il BMI), i risultati del confronto tra integratore e placebo non sono stati incoraggianti.

Complessivamente, nessun confronto tra le variazioni di ciascun parametro, nei tempi T0 e T1, tra i gruppi **a** e **b**, ha dato un risultato significativo.

Mentre il punteggio della scala ALS-FRS-r, tra i tempi T0 e T1, si è ridotto maggiormente nel gruppo **a** rispetto al gruppo **b**, il punteggio della scala MRC e la forza massima media sono ridotti maggiormente nel gruppo **b**, ma nessuna di queste variazioni è comunque significativa. Il valore del BMI si è ridotto leggermente nel gruppo **a** ed è aumentato leggermente nel gruppo **b**, rimanendo comunque pressoché invariato.

Ciò significa che, dal punto di vista della funzionalità del paziente nella vita quotidiana (valutata tramite la scala ALS-FRS-r), la supplementazione alimentare di curcumina non ha rallentato la progressione della malattia rispetto al placebo. Anche per quanto riguarda i parametri espressione della funzione muscolare e della forza muscolare dei pazienti (valutati tramite la scala MRC e la misurazione della forza alla CVM) non c'è stato nessun vantaggio derivante dalla assunzione dell'integratore. Relativamente al BMI, indice dello stato nutrizionale e del trofismo muscolare, questo è rimasto più o meno stabile in entrambi i gruppi di soggetti.

Complessivamente, quindi, non è stata rilevata una differenza nelle curve di peggioramento clinico tra i pazienti che hanno assunto Brainoil e i pazienti che hanno assunto placebo.

La SLA è una malattia neurodegenerativa progressivamente ingravescente, che porta a morte, in media, in 3-5 anni dall'esordio. Un tempo di trattamento di 6 mesi, quindi, si presuppone che possa, a seconda del livello di efficacia atteso per un determinato farmaco, essere sufficiente a fornire indicazioni sull'eventuale risposta terapeutica dell'integratore confrontato con un placebo. Tuttavia, il fatto che a 3 mesi non siano state riscontrate significatività statistiche dal confronto Brainoil/placebo può significare che l'integratore non ha dato effettivamente una risposta sul piano clinico; lascia però aperto il dubbio se un

tempo maggiore di studio avrebbe permesso di mettere in evidenza un diverso andamento nelle varie curve di peggioramento clinico. In questo senso, osservare i risultati della seconda fase del trial, a 6 mesi, fornirà ulteriori prove, che potranno confermare o meno l'andamento dei parametri clinici rilevato nei primi 3 mesi.

Anche un allargamento del campione permetterebbe di ottenere informazioni maggiori. Ad esempio, potrebbe consentire anche una stratificazione dello studio per forma clinica (coinvolgimento prettamente bulbare, coinvolgimento prettamente degli arti superiori o inferiori), che non è stata possibile nel presente lavoro a causa dell'esiguo numero di soggetti che sarebbero risultati in ogni sottogruppo, soprattutto in quello con coinvolgimento clinico bulbare. Anche presupponendo che una sostanza ad azione antiossidante, quale l'integratore sperimentato, possa avere un ruolo neuroprotettivo indipendentemente dalla forma clinica di malattia, il fatto che esistano presentazioni cliniche diverse della SLA presuppone una suscettibilità diversa in diversi distretti coinvolti nella patologia. In tal senso, lo studio dell'eventuale differente comportamento della curcumina nelle varie forme cliniche potrebbe dare maggiori informazioni o spunti per ulteriori indagini e studi sull'eziopatogenesi della malattia.

Il monitoraggio di alcuni biomarcatori di stress ossidativo durante un test da sforzo può essere utile per migliorare la comprensione dei meccanismi alla base della risposta cellulare all'insulto ossidativo ipossia mediato e allo sviluppo di nuove strategie terapeutiche.

I biomarcatori, molecole usate come indicatori di uno stato biologico, misurano oggettivamente nell'organismo processi fisiologici o patogeni, che si verificano in condizione di salute, durante il decorso di una patologia oppure in risposta a trattamenti o in seguito ad uno sforzo fisico (106). La maggior parte degli studi che, nell'uomo, misurano i biomarcatori di stress ossidativo sono effettuati sul plasma o sul siero, in quanto può essere raccolto facilmente e riflette lo stato ossido-riduttivo meglio di altri fluidi biologici (107).

Tra i parametri di laboratorio analizzati, AOPP (Advanced Oxidation Protein Products) e acido lattico sono indici di attività ossidante, mentre FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) e tioli sono indici di attività antiossidante.

I prelievi ematici, per analizzare tali parametri biochimici, sono stati effettuati nel corso del test da sforzo incrementale con miometro, mediante più prelievi sequenziali: basale, al 30% della forza massima, al 50%, al 70% e dopo recupero.

Dalle valutazioni eseguite sono emersi risultati contrastanti. Brainoil ha agito positivamente sul profilo di produzione di acido lattico durante uno sforzo muscolare. Anche per quanto riguarda l'andamento della FRAP, i risultati sono a favore dell'integratore, rispetto al placebo. Invece, su AOPP e tioli la curcumina non sembra avere effetto, i risultati non hanno mostrato differenze tra i soggetti che hanno assunto l'integratore e i soggetti che hanno assunto placebo.

Tra i parametri analizzati, FRAP e tioli sono i due marcatori di attività antiossidante. Avendo la curcumina proprietà antiossidanti, come indicatore di una sua efficacia ci dovremmo aspettare un incremento di entrambi i parametri al tempo T1 nel gruppo di soggetti che hanno assunto l'integratore (gruppo **b**).

Il saggio FRAP è un test per la valutazione della capacità antiossidante del plasma. Esso valuta la capacità del plasma stesso di ridurre il complesso Fe(III)-2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) a complesso Fe(II)-TPTZ (cioè di ridurre lo ione ferrico, presente nel reattivo FRAP, a ione ferroso). Al valore dell'attività ferro riducente del plasma contribuiscono: l'acido urico (per il 60%), l'acido ascorbico (per il 15%), le proteine (per il 10%), l' α -tocoferolo (per il 5%), la bilirubina (per il 5%) ed altre sostanze non identificate per un ulteriore 5% (111).

Per quanto riguarda i pazienti che hanno eseguito la prova da sforzo, il risultato delle FRAP è stato diverso tra gruppo **a** e gruppo **b**. Nel gruppo **a**, nel confronto tra il tempo T0 e il tempo T1 è stata osservata una differenza statisticamente significativa dei valori della FRAP basale, al 30% dello sforzo massimale, al 50%, al 70% e al recupero. La variazione è nel senso di una riduzione dell'attività ferro riducente del plasma dal tempo T0 al tempo T1, concludendo che, nei soggetti che hanno assunto placebo, c'è stato un peggioramento di questo parametro, in accordo con la progressione di malattia. Diversamente, nel gruppo **b**, nel confronto tra il tempo T0 e il tempo T1 non è stata osservata una differenza statisticamente significativa dei valori della FRAP basale, al 30% dello sforzo massimale, al 50% e al 70%; invece, è stata osservata, anche in questo caso, una variazione significativa dei valori della FRAP al recupero, sempre nel senso di una riduzione dell'attività ferro riducente del plasma dal tempo T0 al tempo T1.

Ciò è indicativo del fatto che l'assunzione dell'integratore non ha portato ad un miglioramento sotto il profilo dell'attività ferro riducente del plasma durante l'esecuzione di uno sforzo muscolare, ma ha comunque evitato quel peggioramento che è stato registrato nel gruppo di soggetti che hanno assunto il placebo. Nella fase di recupero dopo

l'attività di contrazione muscolare dell'avambraccio, invece, nemmeno l'assunzione dell'integratore ha evitato il peggioramento dei valori della FRAP.

Il risultato è comunque da considerare a favore di Brainoil rispetto al placebo.

Tuttavia, questo dato a sostegno di un'azione antiossidante della curcumina non è confermato dai risultati ottenuti dall'analisi dei tioli.

I tioli rappresentano una componente significativa della barriera antiossidante. Si tratta di una classe di composti organici che sono accomunati dal possedere uno stesso gruppo funzionale, il gruppo sulfidrilico (-SH). I gruppi -SH si oppongono alla propagazione dei processi perossidativi, in quanto possono cedere elettroni e, una volta ossidati, due gruppi tiolici reagiscono tra loro generando ponti disolfuro. Il glutatione ridotto (GSH) è il più importante antiossidante tiolico, le cui proprietà sono dovute alla presenza del gruppo sulfidrilico della cisteina (112).

Nei pazienti a cui è stato effettuato il prelievo basale a riposo, dal confronto del valore dei tioli tra i tempi T0 e T1, nel gruppo **a** non risulta una differenza significativa, tuttavia molto vicina al limite di significatività. I tioli sono aumentati leggermente al tempo T1 rispetto al tempo T0. Diversamente, sempre a riposo, dal confronto del valore dei tioli tra il tempo T0 e il tempo T1, nel gruppo **b** risulta essere presente una differenza altamente significativa statisticamente. Il limite di significatività in questo caso, non solo oltrepassa il valore stabilito di $p < 0,05$, ma è addirittura minore di 0,001. I tioli sono aumentati al tempo T1 rispetto al valore che hanno al tempo T0. Sarebbe possibile ritenere che l'assunzione dell'integratore abbia portato ad un aumento del valore a riposo di tali molecole dotate di attività antiossidante, migliorando quindi il profilo dell'equilibrio pro-ossidante/anti-ossidante.

In realtà, andando ad osservare i pazienti che hanno eseguito la prova da sforzo, il risultato ottenuto è inaspettato. Nel confronto tra i tempi T0 e T1, sia nel gruppo **a** sia nel gruppo **b** è stata riscontrata una differenza significativa nei valori dei tioli al 30%, al 50%, al 70% e al recupero. L'unico dato non significativo, sia nel gruppo **a** sia nel gruppo **b**, è la differenza del valore basale dei tioli. In entrambi i gruppi il valore dei tioli è aumentato al tempo T1 rispetto al T0; tale aumento non è significativamente diverso tra il gruppo **a** e il gruppo **b**.

Presupponendo che lo stress ossidativo sia implicato nella patogenesi della SLA, appare contraddittorio come, sotto sforzo, ci sia stato un incremento dei valori al tempo T1 rispetto al T0, considerando che nel frattempo la malattia è progredita. Infatti, nonostante i

dati di letteratura riportino che la SLA e le altre malattie neurodegenerative sono accomunate dal riscontro di alti livelli di biomarcatori di stress ossidativo e bassi livelli di biomarcatori di difesa antiossidante nel sistema nervoso centrale e nei tessuti periferici, rispetto ad una popolazione di controllo, in realtà, da alcuni studi sono emerse evidenze in contrasto con tali risultati, relativamente al dosaggio dei tioli/residui cisteinici. Infatti, i livelli plasmatici, ma anche nel liquor, dei tioli sono risultati, a seconda dei casi, non modificati (123, 124) o addirittura aumentati (63). Il presente studio di tesi non confronta i dati con un gruppo di controllo, bensì confronta i dosaggi relativi allo stesso campione in due tempi diversi di malattia, rilevando un aumento statisticamente significativo dei tioli con il progredire della malattia, dato che risulta essere non dipendente dall'assunzione del farmaco sperimentale. Tale studio osservazionale longitudinale non è a tutt'oggi stato mai riportato in letteratura, e conferma il coinvolgimento di queste molecole antiossidanti nella patogenesi della SLA, anche se con ruolo non chiaro (se protettivo/tossico o come mero epifenomeno). Nel presente lavoro di tesi, dal momento che l'aumento del valore dei tioli, col progredire della patologia, è parallelo ad un peggioramento del quadro clinico di malattia, è possibile sospettare che tali molecole svolgano una qualche azione neurotossica. Una simile ipotesi è stata sostenuta anche da Woolsey, che, nel 2008, ha riportato un caso clinico di SLA familiare associato ad alti livelli plasmatici di cisteina, amminoacido che rientra nel dosaggio dei tioli, e glutammato (entrambi precursori del glutatione), oltre che di solfiti, metaboliti della cisteina. In tale caso clinico fu osservato come, un trattamento volto a ridurre i livelli sierici di cisteina, si accompagnò ad una stabilizzazione transitoria del quadro clinico (125). Una possibile spiegazione di tale tossicità può essere data dalla capacità della cisteina di interagire sia con i recettori di NMDA sia con i recettori EAAT, responsabili dell'equilibrio del *reuptake* del glutammato nel vallo sinaptico, e quindi dell'eccitotossicità glutammatergica (126, 127). Queste considerazioni dimostrano come la SLA sia una patologia eterogenea e supportano l'ipotesi che la SLA abbia diverse varianti fenotipiche che potrebbero differire anche nei meccanismi patogenetici e nel loro profilo di risposta antiossidante (63).

Un tale riscontro crea spunti per ulteriori approfondimenti in merito al comportamento dei tioli nella SLA. La rivalutazione dei valori di questo parametro che sarà svolta al tempo T2, quindi a 6 mesi dall'inizio dello studio, nel corso della seconda fase (in aperto) del trial, sarà sicuramente utile per poter discutere meglio questo dato. Infatti permetterà un'osservazione longitudinale più prolungata e, conseguentemente, una migliore analisi del comportamento dei tioli. Infine, la rivalutazione a 6 mesi permetterà di confermare o meno

l'effetto nullo della curcumina sui tioli, come anche su tutti gli altri parametri laboratoristici presi in considerazione in questo studio.

Gli altri due parametri analizzati, AOPP e acido lattico, sono marcatori di attività ossidante.

Gli AOPP permettono di valutare la quantità di proteine modificate da processi di ossidazione, a livello di specifici residui amminoacidici. Le proteine interessate comprendono soprattutto l'albumina, la mioglobina, la γ -globulina, la tireoglobulina (108). Per quanto riguarda i soggetti che hanno eseguito la prova da sforzo, nel gruppo **b**, il confronto dei valori degli AOPP tra i tempi T0 e T1 non ha dato risultati significativi. L'assunzione dell'integratore non ha migliorato il profilo della produzione delle proteine modificate dai processi di ossidazione. Nel gruppo **a**, invece, lo stesso confronto non ha dato risultati significativi per quanto riguarda il valore basale, al 30%, al 70% e al recupero, mentre, al 50% dello sforzo massimale, il valore degli AOPP dal tempo T0 al tempo T1 si è ridotto in maniera statisticamente significativa.

Anche dal confronto dei valori degli AOPP tra i gruppi **a** e **b**, mentre al tempo T1 non è emersa nessuna differenza significativa, al tempo T0 è emersa una differenza significativa al 50% dello sforzo; qui gli AOPP, al tempo T0, sono molto maggiori nel gruppo **a** rispetto al gruppo **b**. Sempre al tempo T0, dal confronto degli altri valori di AOPP tra i gruppi **a** e **b** non risultano altre differenze significative.

L'analisi degli AOPP rivela valori di significatività poco giustificabili, sia perché sono presenti al T0, quando non è stata ancora iniziata l'assunzione di integratore/placebo, sia perché la significatività è evidenziata solo al 50% dello sforzo, mentre non è presente né al basale, né al 30%, né al 70%, né al recupero. Un'analisi attenta del campione in studio ha rilevato, nel gruppo **a** al tempo T0, due misurazioni i cui valori si sono dimostrati molto superiori rispetto alla media dei valori di AOPP. Tale differenza può essere considerata casuale (la dimensione del campione in studio potrebbe non essere in grado di correggere il "bias" intrinseco) oppure una spiegazione alternativa, più probabile data l'entità della differenza di tali valori rispetto alla media, è l'occorrenza imprevista di una variabile metodologica laboratoristica nella processazione del campione ematico.

Ripetendo l'analisi statistica con l'esclusione di queste due misure che si discostano enormemente dalla media dei valori degli AOPP, le due significatività statistiche precedentemente riscontrate vengono perse: il confronto dei valori di AOPP al 50% dello

sforzo tra il tempo T0 e il T1 all'interno del gruppo **a** non è più significativo, così come il confronto al tempo T0 tra il gruppo **a** e il gruppo **b**.

Anche la forte produzione di acido lattico, tipica delle attività fisiche anaerobiche, è nota essere una fonte di stress ossidativo.

Negli anni recenti è stata posta sempre più attenzione alla relazione tra esercizio fisico e stress ossidativo. Sia l'esercizio aerobico sia quello anaerobico possono indurre uno stato acuto di stress ossidativo; ciò è dimostrato dall'aumentata presenza di molecole ossidate in vari tessuti. Il tipo di esercizio, l'intensità e la durata influenzano l'entità dello stress ossidativo; allo stesso tempo, anche il supplemento con sostanze antiossidanti può influenzare questi rilievi (104). È stato visto anche che l'esercizio fisico cronico conduce ad una *upregulation* dei meccanismi di difesa antiossidante dell'organismo, che aiutano a minimizzare lo stress ossidativo che si verifica dopo un'attività fisica intensa (105).

Durante un esercizio fisico intenso, quando il metabolismo aerobico non è più in grado di soddisfare le aumentate richieste energetiche, il metabolismo anaerobico porta alla produzione di acido lattico. Il prodotto finale della glicolisi è il piruvato, che, a seconda della richiesta energetica e delle condizioni cellulari, può essere ossidato a CO₂ e H₂O oppure ridotto a lattato (114). Il muscolo scheletrico è il principale produttore di acido lattico. Per questo, la valutazione cinetica del lattato durante la contrazione muscolare è utile per investigare indirettamente eventuali danni del metabolismo ossidativo nel muscolo scheletrico durante l'esecuzione di un esercizio fisico. Nei pazienti affetti da SLA, è stato dimostrato che la disfunzione mitocondriale si verifica sia nel sistema nervoso centrale sia nei tessuti periferici, perciò l'analisi della curva del lattato durante esercizio muscolo-scheletrico risulta una valida indagine in questi soggetti (115).

È dimostrato che l'acido lattico influenza lo stato ossidativo della cellula. In particolare, la concentrazione di lattato correla positivamente con la presenza di *markers* di perossidazione lipidica, come TBARS (Specie Reattive all'Acido Barbiturico) (116). Inoltre, alte concentrazioni di lattato sono direttamente responsabili della formazione di radicali idrossili attraverso la reazione di Fenton (117).

Per quanto riguarda i pazienti che hanno eseguito la prova da sforzo, dal confronto dei valori di acido lattico al tempo T1 tra i soggetti appartenenti al gruppo **a** e al gruppo **b**, un dato che mostra significatività statistica è la differenza presente al 70% dello sforzo massimale tra **a** e **b**, con un valore minore nei soggetti appartenenti al gruppo **b**. Anche al

50% dello sforzo massimale è possibile osservare una differenza importante nel valore dell'acido lattico tra **a** e **b**, ma questa non raggiunge la significatività statistica.

La differenza dei valori di acido lattico tra **a** e **b** al tempo T1, quasi nulla a riposo, aumenta progressivamente nel corso dell'esecuzione della prova da sforzo, raggiungendo infatti una significatività statistica nella fase del test in cui il paziente contrae il miometro con la forza più alta (70% della forza massimale), per poi tornare ad essere quasi nulla dopo i 15 minuti di recupero.

I livelli di acido lattico risultano sempre minori nel gruppo di pazienti che hanno assunto l'integratore, suggerendo come la supplementazione alimentare con Brainoil abbia migliorato il profilo di produzione di lattato (e conseguentemente lo stato ossidativo del paziente) durante contrazione muscolare, miglioramento che si accentua sempre di più man mano che aumenta l'entità dello sforzo muscolare.

A sostegno di tale effetto positivo dell'integratore c'è l'osservazione che, al tempo T0, quindi prima della terapia, il confronto dei valori di acido lattico tra i gruppi **a** e **b** non aveva raggiunto significatività statistica.

Nel gruppo **b**, i valori assoluti di acido lattico al 30%, al 50%, al 70% e al recupero si sono ridotti al tempo T1 rispetto al T0. Al contrario, nel gruppo **a**, i valori assoluti di lattato basali, al recupero, ma soprattutto al 50% e al 70% sono aumentati al tempo T1 rispetto al T0. I pazienti che hanno assunto il placebo hanno visto peggiorare leggermente il loro profilo di produzione di acido lattico sotto sforzo, rispetto ai soggetti che hanno assunto l'integratore, che hanno visto invece migliorare il loro profilo di produzione di lattato sotto sforzo. Questa differente tendenza ha portato all'allargamento della forbice al T1 tra i valori di acido lattico nel gruppo di pazienti che hanno assunto il placebo e i corrispondenti valori nel gruppo di pazienti che hanno assunto Brainoil.

Le forze esercitate dai pazienti di entrambi i gruppi all'*hand-grip* sono risultate paragonabili, quindi le differenze nella produzione di acido lattico tra i soggetti appartenenti al gruppo **a** e quelli appartenenti al gruppo **b** non possono essere attribuite ad un minore sforzo compiuto dai pazienti del gruppo **b**.

È possibile concludere che Brainoil ha avuto un effetto positivo sul profilo di produzione di acido lattico nei pazienti affetti da SLA e tale effetto, riferibile ad un miglioramento del metabolismo aerobico, può essere attribuito ad un miglioramento nelle prestazioni dei mitocondri. Infatti, la disfunzione mitocondriale è un meccanismo patogenetico ritenuto rilevante in numerose malattie neurodegenerative, tra cui la SLA. La disfunzione mitocondriale include alterazioni nella catena di trasporto degli elettroni, stress ossidativo e

danno al DNA mitocondriale, variazioni morfologiche di questi organelli (vacuolizzazione), apertura dei pori delle membrane mitocondriali e, infine, attivazione dei meccanismi della apoptosi (128). Vari studi preclinici testimoniano l'effetto positivo della curcumina sui mitocondri, in particolare sul mantenimento delle funzioni respiratorie e sul controllo dello stress ossidativo (129), sulla cascata di attivazione della apoptosi (130).

Nella composizione di Brainoil, oltre al principio attivo curcumina (1500 mg/bustina), è presente, in quantità molto minore, coenzima Q10 (100 mg/bustina). Il coenzima Q10 è localizzato nella membrana mitocondriale interna, dove agisce come cofattore per i complessi I, II e III della catena di trasporto degli elettroni, ed è necessario per la produzione di ATP (131). Questo cofattore esercita un'azione mitocondriotropica ed antiapoptotica (inibendo l'aumento di permeabilità mitocondriale) (132).

Anche il coenzima Q10 influisce sulla produzione di acido lattico durante l'esercizio, come dimostrato in uno studio svolto su un campione di *runners* maschi, di età e peso paragonabili, successivamente randomizzati in due gruppi (coenzima Q10/placebo). Nello studio è stato osservato come, dosando l'acido lattico plasmatico dopo due prove di corsa (esercizio fisico intenso), di cui la seconda effettuata dopo un periodo di supplementazione con coenzima Q10/placebo, nei soggetti che avevano assunto coenzima Q10 i livelli di lattato erano ridotti rispetto al gruppo che aveva assunto placebo (133).

Se ne deduce che anche il coenzima Q10 presente nella composizione di Brainoil può aver contribuito ad abbassare i livelli di acido lattico al tempo T1 nel gruppo che ha assunto l'integratore; tuttavia, la dose di coenzima Q10 assunta quotidianamente nel presente studio (100 mg/die) è molto minore rispetto alla dose di curcumina (1500 mg/die), oltre che alla dose di coenzima Q10 assunta nello studio sopracitato (circa 350 mg/die). Conseguentemente, si suppone che il ruolo della curcumina sia stato preponderante, rispetto a quello del coenzima Q10, nel ridurre la produzione di lattato.

I risultati del presente lavoro di tesi, relativamente agli effetti della curcumina sull'acido lattico, sono in linea con due recenti studi, di cui il primo, svolto su modello murino, giunge alla conclusione che la somministrazione di questa sostanza riduce la produzione di lattato durante esercizio fisico (134). Il secondo dimostra come la somministrazione di curcumina, insieme ad un esercizio fisico costante, accelera la biogenesi dei mitocondri nel muscolo scheletrico di topo (135).

7. CONCLUSIONI

Complessivamente, la supplementazione alimentare con curcumina in pazienti affetti da SLA, mentre dal punto di vista dei parametri clinici non ha dato risultati positivi, dal punto di vista dei parametri biochimici ha dato alcune risposte incoraggianti:

- l'attività ferro riducente del plasma viene stabilizzata, impedendo quel calo che si verifica inevitabilmente con la progressione della malattia, indice di un peggioramento del quadro di stress ossidativo;
- il profilo di produzione di acido lattico durante uno sforzo muscolare risulta ridotto, soprattutto per una azione della curcumina a livello mitocondriale.

I risultati incoraggianti sono quindi rivolti soprattutto alla riduzione della disfunzione dei mitocondri, organelli che sappiamo essere implicati nella patogenesi della SLA.

Con il completamento della seconda fase, in aperto, dello studio, sarà eventualmente possibile confermare ulteriormente tali risultati.

Alla luce di questi riscontri positivi, una proposta interessante sarebbe quella di aumentare la casistica della popolazione in studio in modo da poter creare campioni sempre più omogenei da confrontare (per età, forma clinica di esordio, durata di malattia...). Questa linea di studio viene adottata sempre più frequentemente nelle sperimentazioni svolte attualmente in Italia e nel mondo, dove si stanno creando network multicentrici. Lo scopo è quello di migliorare la comprensione di questa devastante patologia, che ha un solo nome, ma tanti fenotipi diversi, con l'obiettivo di giungere infine ad una cura.

BIBLIOGRAFIA

1. Strong M, Rosenfeld J, **Amyotrophic lateral sclerosis: a review of current concepts.** *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 2003; 4(3):136-43.
2. Anastasi G, Capitani S et al, *Vie nervose, Trattato di anatomia umana.* Edi-Ermes 2009. Vol.3 203-216.
3. Martin JH, *Neuroanatomy: Text and Atlas.* McGraw-Hill 2005; 231-261.
4. Soriani MH, Desnuelle C, **Epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis.** *Rev Neurol (Paris)* 2009; 165(8-9): 627-640.
5. Brown RH, *Amyotrophic Lateral Sclerosis and other motor neuron diseases,* **Harrison: Principles of Internal Medicine.** Casa editrice Ambrosiana 2012; 3309-3313
6. Logroscino G, Traynor BJ et al, **Descriptive epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: new evidence and unsolved issues.** *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2008; 79(1):6-11.
7. Mandrioli J, Biguzzi S. et al, **Epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis in Emilia Romagna Region (Italy): a population based study.** *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener* 2014;15(3-4): 262-268.
8. Majoor-Krakauer D, Willems PJ, Hofman A, **Genetic epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis.** *Clin Genet* 2003; 63(2): 83-100.
9. Al-Chalabi A, Hardiman O, **The epidemiology of ALS: a conspiracy of genes, environment and time.** *Nature Review Neurology* 2013; 9(11): 617-628.
10. **Chen H, Richard M.** et al, **Head injury and amyotrophic lateral sclerosis.** *Am J Epidemiol* 2007; 166(7): 810-816.
11. Turner MR, Abisgold J. et al, **Head and other physical trauma requiring hospitalization is not a significant risk factor in the development of ALS.** *J Neurol Sci* 2010; 288(1-2): 45-48.
12. Beghi E., Logroscino G. et al, **Amyotrophic lateral sclerosis, physical exercise, trauma and sports: results of a population-based pilot case-control study.** *Amyotroph Lateral Scler* 2010; 11(3): 289-292.
13. Vandenberghe N, Levegue N. et al, **Cerebrospinal fluid detection of enterovirus genome in ALS: a study of 242 patients and 354 controls.** *Amyotroph Lateral Scler* 2010; 11(3): 277-282.

14. Cermelli C, Vinceti M. et al, **Risk of sporadic amyotrophic lateral sclerosis associated with seropositivity for herpesviruses and echovirus-7.** Eur J Epidemiol 2003; 18(2): 123-127.
15. Alonso R, Pisa D. et al, **Evidence for fungal infection in cerebrospinal fluid and brain tissue from patients with Amyotrophic lateral sclerosis.** International Journal of Biological Sciences 2015; 11(5): 546-558.
16. Anand A, Gupta PK et al, **Analysis of smoking and LPO in ALS.** Neurochem Int 2014; 71: 47-55
17. Roberts AL, Johnson NJ et al, **Job-related formaldehyde exposure and ALS mortality in the USA.** J Neurol Neurosurg Psychiatry 2015; [Epub ahead of print]
18. Kiernan MC, Turner MR et al, **Amyotrophic lateral sclerosis.** Lancet 2011; 377:942-955.
19. Olney JW, **Neurotoxicity of excitatory aminoacids.** Raven Press, New York,1978; 95-121.
20. Coyle JT, Puttfarcken P, **Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders.** Science 1993; 689-695.
21. Doble A, **The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: implications for therapy.** Pharmacol Ther 1999; 163-221.
22. Van Den Bosch L, Vandenberghe W. et al, **Ca²⁺-permeable AMPA receptors and selective vulnerability of motor neurons.** J Neurol Sci 2000; 29-34.
23. Van Den Bosch L, Van Damme P et al, **The role of excitotoxicity in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis.** Biochimica et Biophysica Acta 2006; 1068-1082.
24. Seeburg PH, **The molecular biology of mammalian glutamate receptor channels.** Trends Neurosci 1993; 359-365.
25. Choi DW, **Ionic dependence of glutamate neurotoxicity.** J Neurosci 1987; 369-397.
26. Carriedo SG, Sensi SL et al, **AMPA exposures induce mitochondrial Ca²⁺ overload and ROS generation in spinal motor neurons in vitro.** J Neurosci 2000; 240-250.
27. Rosenmund C, Stern-Bach Y. et al, **The tetrameric structure of a glutamate receptor channel.** Science 1998; 1596-1599.
28. Von Lewinski F, Keller BU, **Ca²⁺, mitochondria and selective motoneuron vulnerability: implication for ALS.** Trends Neurosci 2005; 494-500.

29. Van Damme P, Callewaert G. et al, **Chloride influx aggravates Ca²⁺-dependent Ampa receptor-mediated motoneuron death.** J Neurosci 2003; 4942-4950.
30. Spencer PS, Nunn PB et al, **Motorneurone disease on Guam: possible role of a food neurotoxin.** Lancet 1986; 965.
31. Couratier P, Hugon J. et al, **Cell culture evidence for neuronal degeneration in amyotrophic lateral sclerosis being linked to glutamate AMPA/kainite receptors.** Lancet 1993; 265-268.
32. Cluskey S, Ramsden DB, **Mechanism of neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis.** J Clin Pathol 2001; 54:386-392.
33. Doble A, **The pharmacology and mechanism of action of riluzole.** Neurology 1996; S233-S241.
34. Pagani MR, Gonzalez LE, Uchitel OD, **Autoimmunity in Amyotrophic Lateral Sclerosis: past and present.** Neurology Research International 2011; Epub 2011
35. Roisen FJ, Bartfeld H. et al, **Neuron specific in vitro cytotoxicity of sera from patients with amyotrophic lateral sclerosis.** Muscle and nerve 1982; 5(1):48-53.
36. Smith RG, Alexianu ME et al, **Cytotoxicity of immunoglobulins from amyotrophic lateral sclerosis patients on a hybrid motoneuron cell line.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1994; 91(8):3393-3397.
37. Horwich MS, Engel WK et al, **Amyotrophic lateral sclerosis sera applied to cultured motor neurons.** Archives of Neurology 1974; 30(4):332-333.
38. Fischer LR, Culver DG et al, **Amyotrophic lateral sclerosis in a distal axonopathy: evidence in mice and man.** Experimental Neurology 2004; 185(2):232-240.
39. Fratantoni SA, Weisz G et al, **Amyotrophic lateral sclerosis IgG-treated neuromuscular junctions develop sensitivity to L-type calcium channel blocker.** Muscle and nerve 2000; 23(4):543-550.
40. Demestre M, Pullen A et al, **ALS-IgG-induced selective motor neurone apoptosis in rat mixed primary spinal cord cultures.** Journal of Neurochemistry 2005; 94(1):268-275.
41. Smith RG, Hamilton S et al, **Serum antibodies to L-type calcium channels in patients with amyotrophic lateral sclerosis.** New England Journal of Medicine 1992; 327(24):1721-1728.

42. Appel SH, Stockton-Appel V et al, **Amyotrophic lateral sclerosis. Associated clinical disorders and immunological evaluations.** Archives of Neurology 1986; 43(3):234-238.
43. Antel JP, Arnason BG et al, **Histocompatibility typing in amyotrophic lateral sclerosis.** Archives of Neurology 1976; 33(6):423-425.
44. Oldstone MB, Wilson CB et al, **Evidence for immune-complex formation in patients with amyotrophic lateral sclerosis.** Lancet 1976; 2(7978): 169-172.
45. Troost D, Van den Oord JJ et al, **Lymphocytic infiltration in the spinal cord of patients with amyotrophic lateral sclerosis.** Clinical Neuropathology 1989; 8(6):289-294.
46. Rentzos M, Rombos A et al, **Interleukin-17 and interleukin-23 are elevated in serum and cerebrospinal fluid of patients with ALS: a reflection of Th17 cells activation?.** Acta Neurologica Scandinavica 2010; 122(6):425-429.
47. Henkel JS, Engelhardt JI et al, **Presence of dendritic cells, MCP-1, and activated microglia/macrophages in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord tissue.** Annals of Neurology 2004; 55(2):221-235.
48. Zürcher NR, Loggia ML et al, **Increased in vivo glial activation in patients with amyotrophic lateral sclerosis: assessed with [(11)c]-PBR28.** Neuroimage Clin 2015; 7:409-414.
49. Kawamata T, Akiyama H et al, **Immunologic reactions in amyotrophic lateral sclerosis brain and spinal cord tissue.** Am J Pathol 1992; 140(3):691-707.
50. Wood JD, Beaujeux TP, Shaw PJ, **Protein aggregation in motor neurone disorders.** Neuropathol Appl Neurobiol 2003; 29(6):529-45.
51. Julien JP, Beaulieu JM, **Cytoskeletal abnormalities in amyotrophic lateral sclerosis: beneficial or detrimental effects?** J Neurol Sci 2000; 180:7-14.
52. Cairns NJ, Lee V, Trojanowski JQ, **The cytoskeleton in neurodegenerative diseases.** J Pathol 2004; 204(4):438-449.
53. Beaulieu JM, Nguyen MD, Julien JP, **Late onset death of motor neurons in mice overexpressing wild-type peripherin.** J Cell Biol 1999; 147:531-544.
54. Lariviere RC, Beaulieu JM, Nguyen MD, Julien JP, **Peripherin is not a contributing factor to motor neuron disease in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis caused by mutant superoxide dismutase.** Neurobiol Dis 2003; 13(2):158-66.

55. Xu Z1, Jung C et al, **Mitochondrial degeneration in amyotrophic lateral sclerosis**. *J Bioenerg Biomembr* 2004; 36(4):395-399.
56. Vielhaber S, Kunz D et al, **Mitochondrial DNA abnormalities in skeletal muscle of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis**. *Brain* 2000; 123: 1339-1348.
57. Mandfredi G, Xu Z, **Mitochondrial dysfunction and its role in motor neuron degeneration in ALS**. *Mitochondrion* 2005; 5(2):77-87.
58. Malaspina A, Puentes F, Amor S, **Disease origin and progression in amyotrophic lateral sclerosis: an immunology perspective**. *Int Imm* 2014; 5-8.
59. Guègan C, Vila M et al, **Recruitment of the mitochondrial-dependent apoptotic pathway in amyotrophic lateral sclerosis**. *The Journal of Neurosciences* 2001; 21(17):6569-6576.
60. Lee JK, Shin JH et al, **Role of autophagy in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis**. *Biochim Biophys Acta* 2015; S0925-4439(15):00226-4.
61. Xie Y, Zhou B et al, **Progressive endolysosomal deficits impair autophagic clearance beginning at early asymptomatic stages in fALS mice**. *Autophagy* 2015 [Epub ahead of print]
62. Fornai F, Longone P, Ferrucci M, Lenzi P, Isidoro C, Ruggieri S, Paparelli A, **Autophagy and amyotrophic lateral sclerosis: the multiple roles of lithium**. *Autophagy* 2008; 4(4):527-530.
63. Niedzielska E, Smaga I et al, **Oxidative stress in neurodegenerative diseases**. *Mol Neurobiol* 2015; [Epub ahead of print]
64. Gardès-Albert M, **Physico-chemical aspects of reactive oxygen species**. *Ann Pharm Fr* 2006; 64(6):365-372.
65. Metodiewa D, Koska C, **Reactive oxygen species and reactive nitrogen species: relevance to cyto(neuro)toxic events and neurologic disorders. An overview**. *Neurotox Res* 2000; 1:197-233.
66. Siciliano G, Piazza S, et al, **Antioxidant capacity and protein oxidation in cerebrospinal fluid of amyotrophic lateral sclerosis**. *J Neurol* 2007; 254(5):575-580.
67. Venditti P, Di Stefano L, Di Meo S, **Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species**. *Mitochondrion* 2013; 13:71-82.
68. Forstermann U, Sessa WC, **Nitric oxide synthases: regulation and function**. *Eur Heart J* 2012; 33:829-837.

69. Dalle-Donne I, Rossi R et al, **Biomarkers of oxidative damage in human disease.** Clin Chem 2006; 52(4):601-623.
70. Carrì MT, Ferri A et al, **Neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis: the role of oxidative stress and altered homeostasis of metals.** Brain Res Bull 2003; 61(4):365-374.
71. Carrì MT, Valle C et al, **Oxidative stress and mitochondrial damage: importance in non-SOD1 ALS.** Front Cell Neurosci 2015; 9:41.
72. Ikawa M, Okazawa H et al, **Increased oxidative stress is related to disease severity in the ALS motor cortex: a PET study.** Neurology 2015; 84(20):2033-2039.
73. Nagase M, Yamamoto Y et al, **Increased oxidative stress in patients with amyotrophic lateral sclerosis and the effect of edaravone administration.** Redox Rep 2015; [Epub ahead of print]
74. Tremolizzo L, Ferrarese C et al, Malattie del motoneurone, **Core Curriculum: malattie del sistema nervoso.** McGraw-Hill 2011; 313-318
75. DeJesus-Hernandez M, Mackenzie IR et al, **Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS.** Neuron 2011; 72:245-256.
76. Kiernan MC, Vucic S et al, **Amyotrophic lateral sclerosis.** Lancet 2011; 377:942-955.
77. Eisen A, Swash M, **Clinical neurophysiology of ALS.** Clin Neurophysiol 2001; 112:2190-2201.
78. Hart IK, Maddison P et al, **Phenotypic variants of autoimmune peripheral nerve hyperexcitability.** Brain 2002; 125:1887-1895.
79. Daube JR, **Electrodiagnostic studies in amyotrophic lateral sclerosis and other motor neuron disorders.** Muscle Nerve 2000; 23:1488-1502.
80. Ellis CM, Suckling J et al, **Volumetric analysis reveals corticospinal tract degeneration and extramotor involvement in ALS.** Neurology 2001; 57:1571-1578.
81. Baloh RH, Rakowicz W et al, **Frequent atrophic groups with mixed-type myofibers is distinctive to motor neuron syndromes.** Muscle Nerve 2007; 36:107-110.
82. Chio A, **ISIS Survey: an international study on the diagnostic process and its implications in amyotrophic lateral sclerosis.** J Neurol 1999; 246(suppl 3):III1-5.

83. Brooks BR, **Problems in shortening the time to confirmation of ALS diagnosis: lessons from the 1st Consensus Conference, Chicago, May 1998.** Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord 1 Suppl 2000; 1:S3-7.
84. Barone P, Brunetti A et al, Malattie del motoneurone, **Sistema nervoso. Neurologia. Neurochirurgia. Neuroradiologia.** Casa Editrice Ildeson-Gnocchi 2012; 275-280.
85. Miller RG, Mitchell JD et al, **Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/ motor neuron disease (MND).** Cochrane Database Syst Rev 2007; 1:CD001447.
86. Van den Berg JP, Kalmijn S et al, **Multidisciplinary ALS care improves quality of life in patients with ALS.** Neurology 2005; 65:1264-1267.
87. Andersen PM, Abrahams S 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(3):360-375.
88. Aggarwal BB, Sundaram C et al, **Curcumin: the Indian solid gold.** Adv Exp Med Biol 2007; 595:1-75.
89. Aggarwal BB, Sung B, **Pharmacological basis for the role of curcumin in chronic diseases: an age-old spice with modern targets.** Trends Pharmacol Sci 2009; 30(2):85-94.
90. Maheshwari RK, Singh AK et al, **Multiple biological activities of curcumin: a short review.** Life Science 2006; 78(18):2081-2087.
91. Dikshit M, Rastogi L et al, **Prevention of ischaemia-induced biochemical changes by curcumin & quinidine in the cat heart.** Indian J Med Res 1995; 101:31-35.
92. Motterlini R, Foresti R et al, **Curcumin, an antioxidant and anti-inflammatory agent, induces heme oxygenase-1 and protects endothelial cells against oxidative stress.** Free Radic Biol Med 2000; 28(8):1303-1312.
93. Thiagarajan M, Sharma SS, **Neuroprotective effect of curcumin in middle cerebral artery occlusion induced focal cerebral ischemia in rats.** Life Sci 2004; 74(8):969-985.
94. Dong H, Xu L et al, **Curcumin abolishes mutant TDP-43 induced excitability in a motoneuron-like cellular model of ALS.** Neurosciences 2014; 272:141-153.
95. Duan W, Li X et al, **Mutant TAR DNA-binding protein-43 induces oxidative injury in motor neuron-like cell.** Neuroscience 2010; 169(4):1621-1629.

96. Lu J, Duan W et al, **Mitochondrial dysfunction in human TDP-43 transfected NSC34 cell lines and the protective effect of dimethoxy curcumin.** Brain Res Bull 2012; 89(5-6):185-190.
97. Shan X, Price DL et al, **Altered distribution of Gemini of coiled bodies and mitochondria in motor neurons of TDP-43 transgenic mice.** Proc Natl Acad Sci USA 2010; 107(37):16325-16330.
98. Jiang H, Tian X et al, **Activation of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 cytoprotective signaling by curcumin protect primary spinal cord astrocytes against oxidative toxicity.** Biol Pharm Bull 2011; 34(8):1194-1197.
99. Yamada M, Ono K et al, **Curcumin has potent anti-amyloidogenic effects for Alzheimer's beta-amyloid fibrils in vitro.** Neurosci Res 2004; 75:742-750.
100. Bhatia NK, Srivastava A et al, **Curcumin binds to the pre-fibrillar aggregates of Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) and alters its amyloidogenic pathway resulting in reduced cytotoxicity.** Biochim Biophys Acta 2015; 1854(5):426-436.
101. Cashman JR, Gagliardi S et al, **Curcumins promote monocytic gene expression related to β -amyloid and superoxide dismutase clearance.** Neurodegener Dis 2012; 10(1-4):274-276.
102. Mudher A, Shepherd D et al, **GSK-3beta inhibition reverses axonal transport defects and behavioural phenotypes in Drosophila.** Mol Psychiatry 2004; 9(5):522-530.
103. Forman MS, Trojanowski JQ, Lee VM, **TDP-43: a novel neurodegenerative proteinopathy.** Curr Opin Neurobiol 2007; 17(5):548-555.
104. Fisher-Wellman K, Bloomer RJ, **Acute exercise and oxidative stress: a 30 year history.** Dyn Med 2009; 8:1.
105. Gomes EC, Silva AN, de Oliveira MR, **Oxidants, antioxidants, and the beneficial roles of exercise-induced production of reactive species.** Oxid Med Cell Longev 2012; 2012:756132.
106. Finsterer J, **Biomarkers of peripheral muscle fatigue during exercise.** BMC Musculoskelet Disord 2012; 13:218.
107. Mrakic-Sposta S, Gussoni M et al, **Training effects on ROS production determined by electron paramagnetic resonance in master swimmers.** Oxid Med Cell Longev 2015; 2015:804794.

108. Witko-Sarsat V, Friedlander M et al, **Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia.** *Kidney Int* 1996; 49(5):1304-1313.
109. Witko-Sarsat V, Nguyen Khoa T et al, **Advanced oxidation protein products: oxidative stress markers and mediators of inflammation in uremia.** *Adv Nephrol Necker Hosp* 1998; 28:321-341.
110. Miyata T, Wada Y et al, **Implication of an increased oxidative stress in the formation of advanced glycation end products in patients with end-stage renal failure.** *Kidney Int* 1997; 51:1170-1181.
111. Benzie IF, Strain JJ, **The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay.** *Anal Biochem* 1996; 239(1):70-76.
112. Hu ML, **Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma.** *Methods Enzymol* 1994; 233:380-385.
113. Radak Z, Chung HY, Goto S, **Systemic adaptation to oxidative challenge induced by regular exercise.** *Free Radic Biol Med* 2008; 44(2):153-159.
114. Cabrera ME, Saidel GM, Kalhan SC, **Lactate metabolism during exercise: analysis by an integrative system model.** *Am J Physiol* 1999; 277(5 Pt 2):R1522-1536.
115. Siciliano G, Pastorini E et al, **Impaired oxidative metabolism in exercising muscle from ALS patients.** *J Neurol Sci* 2001; 191(1-2):61-65.
116. Kayatekin BM, Gönenç S et al, **Effects of sprint exercise on oxidative stress in skeletal muscle and liver.** *Eur J Appl Physiol* 2002; 87(2):141-144.
117. Ali MA, Yasui F et al, **The lactate-dependent enhancement of hydroxyl radical generation by the Fenton reaction.** *Free Radic Res* 2000; 32(5):429-438.
118. Shoba G, Joy D et al, **Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers.** *Planta Med* 1998; 64:353-356.
119. Yallapu MM, Nagesh PK et al, **Therapeutic applications of curcumin nanoformulations.** *AAPS J* 2015; [Epub ahead of print]
120. Ramasamy S, Chin SP et al, **In silico and in vitro analysis of bacoside A aglycones and its derivatives as the constituents responsible for the cognitive effects of *Bacopa monnieri*.** *PLoS One* 2015; 10(5):e0126565.

121. Gray NE, Sampath H et al, **Centella asiatica attenuates β -amyloid-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction.** J Alzheimers Dis 2015; 45(3):933-946.
122. Dar NJ, Hamid A, Ahmad M, **Pharmacologic overview of Withania somnifera, the Indian Gingseng.** Cell Mol Life Sci 2015; [Epub ahead of print]
123. Oteiza PI, Uchitel OD et al, **Evaluation of antioxidants, protein, and lipid oxidation products in blood from sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients.** Neurochem Res 1997; 22:535-539.
124. LoGerfo A, Chico L et al, **Lack of association between nuclear factor erythroid-derived 2-like 2 promoter gene polymorphisms and oxidative stress biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis patients.** Oxid Med Cell Longev 2014; ID 432626, 9 pages.
125. Woolsey PB, **Cysteine, sulfite, and glutamate toxicity: a cause of ALS?** J Altern Complement Med 2008; 14(9):1159-1164.
126. Bhatia P, Singh N, **Homocysteine excess: delineating the possible mechanism of neurotoxicity and depression.** Fundam Clin Pharmacol 2015; [Epub ahead of print]
127. Aoyama K, Nakaki T, **Neuroprotective properties of the excitatory amino acid carrier 1 (EAAC1).** Amino Acids 2013; 45(1):133-42.
128. Kumar A, Singh A, **A review on mitochondrial restorative mechanism of antioxidants in Alzheimer's disease and other neurological conditions.** Front Pharmacol 2015; 6:206.
129. Raza H, John A et al, **Alterations in mitochondrial respiratory functions, redox metabolism and apoptosis by oxidant 4-hydroxynonenal and antioxidants curcumin and melatonin in PC12 cells.** Toxicol Appl Pharmacol 2008; 226(2):161-8.
130. Zhu YJ, Chen XC et al, **Curcumin protects mitochondria from oxidative damage and attenuates apoptosis in cortical neurons.** Acta Pharmacol Sin 2004; 25(12):1606-12.
131. Hargreaves IP, **Coenzyme Q10 as a therapy for mitochondrial disease.** Int J Biochem Cell Biol 2014; 49:105-11.
132. Matthews RT, Yang L et al, **Coenzyme Q10 administration increases brain mitochondrial concentrations and exerts neuroprotective effects.** Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95(15):8892-7.

133. Armanfar M, Jafari A et al, **Effect of coenzyme Q10 supplementation on exercise-induced response of inflammatory indicators and blood lactate in male runners.** Med J Islam Repub Iran 2015; 29-202.
134. Huang WC, Chiu WC et al, **Effect of curcumin supplementation on physiological fatigue and physical performance in mice.** Nutrients 2015; 7(2):905-21.
135. Ray Hamidie RD, Yamada T et al, **Curcumin treatment enhances the effect of exercise on mitochondrial biogenesis in skeletal muscle by increasing cAMP levels.** Metabolism 2015; 64(10):1334-47.

RINGRAZIAMENTI

È giunto il momento del capitolo conclusivo, non solo della tesi di laurea, ma anche di un percorso di studi e di crescita. È un momento in cui il ritmo incalzante che ha segnato gli ultimi anni cede il posto ad un attimo di pausa, la frenesia dello studio si allenta e la corsa in salita si arresta, per dare modo di voltarsi e di osservare il tragitto finora compiuto. A questo punto, la mia soddisfazione non è realizzare la distanza percorsa dal giorno del faticoso test d'ingresso, ma è rendermi conto che non ho corso da sola, ma che ogni tappa, dagli insuccessi ai piccoli traguardi, è stata condivisa con altri.

Il mio riconoscimento va inevitabilmente a tutte quelle mani invisibili che mi hanno sostenuta e incoraggiata nei momenti di sconforto, che mi hanno spinto ad affrontare le varie difficoltà e che hanno esultato insieme a me quando è stato il momento di festeggiare.

Un sentito ringraziamento va al Prof. Gabriele Siciliano, che mi ha permesso di iniziare a frequentare il reparto di Malattie Neuromuscolari e di inserirmi nel progetto che ho poi affrontato come argomento di tesi. Ringrazio il Prof. anche per la competenza con cui ha saputo ascoltare le mie esigenze e preferenze, per gli insegnamenti trasmessi, le iniziative a cui ho potuto partecipare, che hanno accresciuto il mio interesse nella neurologia, ma soprattutto per la pazienza e la grande disponibilità.

Ringrazio tantissimo la Dottoressa Elena Caldarazzo Ienco, il mio angelo custode in questo ultimo sforzo, non solo per la pazienza, il sostegno ed il grandissimo aiuto, ma anche perché è per me un modello di medico a cui aspirare.

Un ringraziamento anche alla Dottoressa Michela Rossi, per i preziosi consigli, e alla Dottoressa Monica Fabbrini.

Ringrazio Federica Agricola, la “vampira”, per le mattinate condivise e la nostra sintonia, e perché apprezzo la sua capacità di interagire col malato e di avere sempre la parola giusta quando serve.

Ringrazio le Dottoresse Annalisa LoGerfo e Lucia Chico, per il supporto dato per quanto riguarda la componente di laboratorio della mia tesi e per la gestione della parte statistica. Un ringraziamento anche al Dottor Daniele Orsucci per l'aiuto nella gestione della parte statistica.

Ringrazio anche la Dottoressa Erika Schirinzi, per l'aiuto che ha offerto ed i consigli.

Un immenso ringraziamento va alla mia famiglia, che mi ha affiancata in ogni fase ed ha sofferto e sudato, se non quanto me, quasi come me. Grazie al babbo e alla mamma, perché è come se avessero sostenuto gli esami insieme a me; e, anche se alla fine, nonostante questo, non otterranno la laurea, meritano sicuramente il premio di maggiore sopportazione. Grazie per avermi incoraggiata, anche silenziosamente quando non potevo essere disturbata, e per aver assecondato la mia follia pre-esame; per le vacanze poco gustate durante le mie clausure estive, per le giornate in macchina ad aspettarmi, il messaggino di comunicazione “esame passato” e tutto il resto... Grazie alla nonna, per la visita a metà mattina e il pensiero della sera prima; ad Abra, per la fedele compagnia ai piedi della scrivania; allo zio, per aver fatto sembrare ogni esame più “facile” di quanto non fosse in realtà.

Ringrazio tutti gli amici che mi hanno ricordato che non esiste solo l’università e che, se va bene, si esce per festeggiare, se va male, per dimenticare.

Grazie soprattutto a Marco, che, da storico compagno di banco, non ha mai smesso di affiancarmi, per il suo ascolto e per i miei “sono in crisi!”.

Grazie alle compagne di avventure Annalisa, Laura, agli amici del liceo, al gruppo del mare e alla recente scoperta della “carica delle 101”.

Un ringraziamento ai “colleghi” dell’università, pesciatini, viareggini e non solo, ma in generale a tutto il canale AK, per la solidarietà e il clima di collaborazione che hanno alleggerito non poco questo tortuoso percorso universitario.

Ringrazio anche tutte le persone che ho incontrato in questi anni, chi è stato vicino a me e non lo è più, chi lo è da tanto e chi da poco.

Tutti, anche inconsapevolmente, hanno dato un importante contributo al raggiungimento di questo traguardo, che spero essere non un punto di arrivo, ma un nuovo punto di partenza.

Un pensiero finale, ma non per importanza, è rivolto ai pazienti affetti da SLA che ho incontrato nel corso di questo lavoro di tesi, per l’umanità che mi hanno trasmesso, oltre alla forte motivazione a proseguire la strada che ho intrapreso.