



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Corso di Laurea Magistrale in Medicina e Chirurgia

Dipartimento di Medicina - DIMED

Direttore: Prof. Roberto Vettor

UOC di Medicina Nucleare

Direttore: Prof. Diego Cecchin

TESI DI LAUREA

Biomarker d'inflammation precoce nella Sclerosi Laterale Amiotrofica

Relatore: Prof. Diego Cecchin

Laureando: Davide Fabris

ANNO ACCADEMICO 2022/2023

INDICE

1	RIASSUNTO	1
2	ABSTRACT.....	3
3	INTRODUZIONE.....	5
3.1	GENERALITÀ SULLA SCLEROSI LATERALE AMIOTROFICA	5
3.1.1	<i>Epidemiologia</i>	5
3.1.2	<i>Fattori di rischio e genetica.....</i>	6
3.1.3	<i>Fisiopatologia</i>	6
3.1.4	<i>Anatomia patologica</i>	8
3.1.5	<i>Criteri diagnostici</i>	10
3.1.6	<i>Studi di neuroimaging.....</i>	15
3.1.7	<i>Biopsia muscolare e nervosa</i>	18
3.1.8	<i>Esami di laboratorio</i>	18
3.1.9	<i>Analisi del liquido spinale.....</i>	19
3.1.10	<i>Neurofilamenti</i>	20
3.1.11	<i>Chitinasi</i>	21
3.1.12	<i>Genetica</i>	21
3.1.13	<i>Presentazione clinica</i>	22
3.1.14	<i>Diagnosi differenziale.....</i>	26
3.1.15	<i>Sopravvivenza e fattori prognostici</i>	27
3.1.16	<i>Trattamento e management.....</i>	29
3.2	PET-RM e PET-TC.....	31
3.3	METABOLISMO DEL SNC NELLA SLA	36
4	SCOPO DELLO STUDIO.....	39
5	MATERIALI E METODI.....	41
5.1	POPOLAZIONE DELLO STUDIO	41
5.2	DATI PET-RMN.....	42
5.2.1	<i>Protocollo di acquisizione PET- RMN.....</i>	42
5.2.2	<i>Elaborazione e analisi delle immagini.....</i>	42

5.3	ANALISI DEL LIQUIDO CEFALORACHIDIANO	43
5.3.1	<i>Tecnica ELISA per la ricerca delle chitinasi</i>	44
5.3.2	<i>Tecnica ELISA per la ricerca dei neurofilamenti</i>	45
5.3.3	<i>Metodo immunometrico in chemiluminescenza</i>	45
6	RISULTATI	47
7	DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	59
8	BIBLIOGRAFIA	63

1 RIASSUNTO

Introduzione: La Sclerosi Laterale Amiotrofica è una patologia neurodegenerativa che colpisce i motoneuroni, causando la perdita del controllo muscolare. Nei pazienti affetti, sono state osservate diverse alterazioni nel metabolismo del [18]FDG in diverse aree del sistema nervoso, comprendenti il tronco encefalico e il mesencefalo.

I neurofilamenti sono proteine strutturali dei neuroni e parte del citoscheletro che vengono rilasciati dopo la morte cellulare. Le chitinasi invece sono enzimi il cui compito è rompere i legami glicosidici della chitina: si crede che tali molecole abbiano un importante ruolo nell'infiammazione, angiogenesi e tumorigenesi. Lo scopo del presente studio è valutare se sia presente una correlazione tra l'aumento della concentrazione di questi due biomarker e l'aumento del SUV a livello di midollo allungato, ponte e mesencefalo, misurato tramite una [18]FDG PET-MRI.

Metodi: La popolazione esaminata è composta da 25 pazienti con diagnosi di SLA, i quali hanno eseguito una [18]FDG PET-MRI cerebrale (Siemens Healthcare Biograph mMR) con prelievo del liquor per la misurazione dei livelli di chitinasi e neurofilamenti. Le scansioni PET-MRI sono state elaborate per mezzo del software PMOD (PMOD Technologies LLC). È stato utilizzato il coefficiente di correlazione di Pearson per testare l'ipotesi di correlazione dello studio.

Risultati: Le concentrazioni normalizzate di neurofilamenti e chitinasi sono risultate maggiori nei pazienti affetti da SLA, con aumentato uptake di [18]FDG nel midollo allungato, ponte e mesencefalo. I pazienti con la forma di SLA bulbare sembrano avere un più alto metabolismo nel midollo allungato nonché più alte concentrazioni di neurofilamenti, anche se la correlazione statistica non è statisticamente significativa.

Conclusioni: I risultati ottenuti mostrano come l'ipermetabolismo del [18]FDG nel tronco encefalico e nel midollo allungato sia associato a un incremento delle concentrazioni di neurofilamenti e chitinasi. Questi risultati possono essere usati per predire la severità della patologia, anche se è certamente necessario disporre di un maggior numero di casi per confermare questi risultati.

2 ABSTRACT

Introduction: Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) is a neurodegenerative disease that affects motor neurons causing loss of muscle control. In affected patients, [18F]FDG metabolic abnormalities have been observed in many areas of the nervous system including brainstem and mesencephalus. Neurofilaments are structural proteins of the neurons and part of the cytoskeleton released after cellular death. Chitinases are enzymes that break down glycosidic bonds in chitin, believed to have an important role in inflammation, angiogenesis, and tumorigenesis. The aim of the present study is to evaluate if there is a correlation between the increase of concentration of these markers and the increase of SUV in the mid-brain, pons and medulla oblongata, measured with [18F]FDG PET-MRI.

Methods: The population under examination is composed of 25 patients diagnosed with ALS, who underwent a cerebral [18F]FDG PET-MRI (Siemens Healthcare Biograph mMR) with blood sampling for chitinases and neurofilaments. PET-MRI images have been processed (reoriented and segmented) with the PMOD (PMOD Technologies LLC) software. Pearson correlation coefficient has been used to test the hypothesis.

Results: The average, normalized concentrations of neurofilaments and chitinases were higher in patients which showed higher [18F]FDG uptake in mid-brain, pons and medulla. Patients with bulbar amyotrophic lateral sclerosis (ALS) seem to have higher hypermetabolism in medulla oblongata and higher concentrations of neurofilaments although the statistic correlation is not clearly significant

Conclusions: Obtained results show that [18F]FDG hypermetabolism in brainstem and medulla oblongata is associated with increased concentrations of neurofilaments and chitinases. Neurofilaments, chitinases and [18F]FDG hypermetabolism may be used to predict the severity of the disease, although studies with an increased sample number are mandatory to confirm our results .

3 INTRODUZIONE

3.1 GENERALITÀ SULLA SCLEROSI LATERALE AMIOTROFICA

La Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA) è la più frequente patologia dei motoneuroni. Conduce a paralisi progressiva e la morte è quasi sempre dovuta a insufficienza respiratoria, che insorge di solito entro tre/cinque anni dall'esordio ¹.

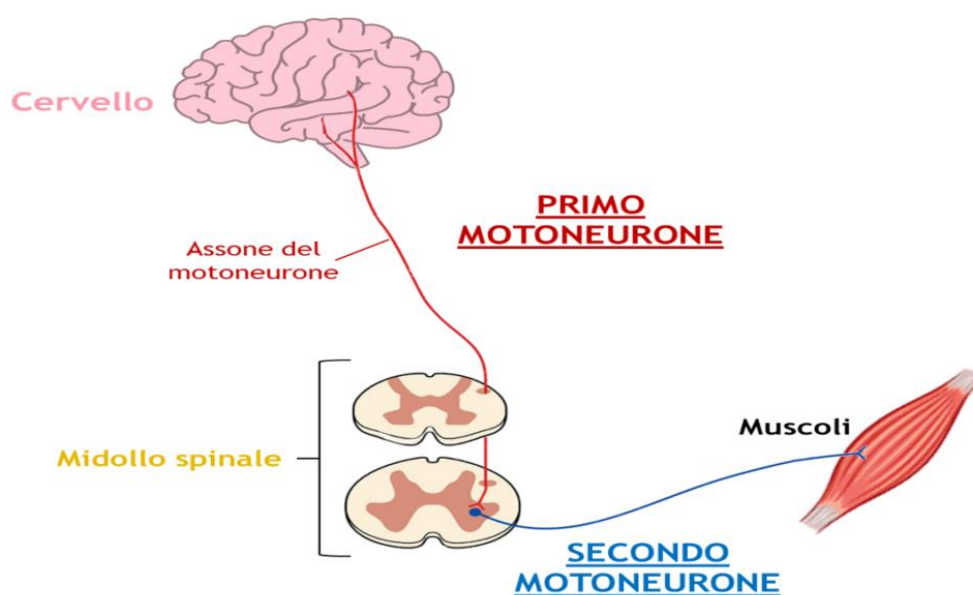


Figura 1². La via motoria connette i motoneuroni superiori, i motoneuroni inferiori e il sistema muscolo-scheletrico.

I primi casi di SLA furono probabilmente descritti da Aran, nel 1848³, e Cruveilhier, nel 1853⁴, anche se è stato Charcot nel 1869 a darne una prima vera spiegazione in ambito medico. Egli era pienamente convinto che questa patologia non fosse mai ereditaria, tuttavia qualche decina di anni dopo Kurland e Mulder misero a punto uno studio nel quale venne dimostrato che circa il 10% degli affetti da SLA presenta una forma familiare^{5,6}.

3.1.1 Epidemiologia

Recenti studi riportano un'incidenza globale della SLA tra 0.6 e 3.8 per 100 000 persone all'anno. Nel continente europeo, preso singolarmente, i numeri sono però leggermente maggiori (da 2.1 a 3.8 per 100 000 persone all'anno). La prevalenza della patologia si attesta tra 4.1 e 8.4 per 100 000 persone, tuttavia va considerato

che la tendenza è in leggero aumento nel corso degli anni. Non va dimenticato che tra diverse regioni geografiche ed etnie il rischio di sviluppo della patologia è differente, probabilmente a causa sia di fattori genetici che ambientali⁷.

3.1.2 Fattori di rischio e genetica

Il sesso maschile è considerato un importante fattore di rischio per lo sviluppo della patologia, così come hanno una certa rilevanza l'età adulta e la familiarità.

Tra i fattori ambientali, un recente studio ha identificato come l'esposizione ad acido nitrico, styrene, chromio, nickel e diclorometano possa contribuire allo sviluppo della malattia⁸.

Più di venti geni sono stati ricollegati allo sviluppo della SLA: appare però complesso stabilire con certezza tutte le sequenze coinvolte, al punto che singole mutazioni monogeniche riescono attualmente a giustificare la patologia in solo il 15% dei pazienti. Globalmente, l'ereditarietà della SLA è elevata, attestandosi tra il 30 e il 60%⁹.

3.1.3 Fisiopatologia

Da un punto di vista neuropatologico la SLA è caratterizzata dalla perdita di connessioni neuromuscolari, da una forte retrazione assonale e dalla conseguente morte cellulare dei motoneuroni superiori e inferiori. Oltre a ciò, si osserva astrogliosi e microgliosi, con inclusioni ubiquitina-positiva nei neuroni che non vanno incontro a morte: in più del 95% dei pazienti con SLA, tali inclusioni sono costituite dalla proteina TDP-43¹⁰.

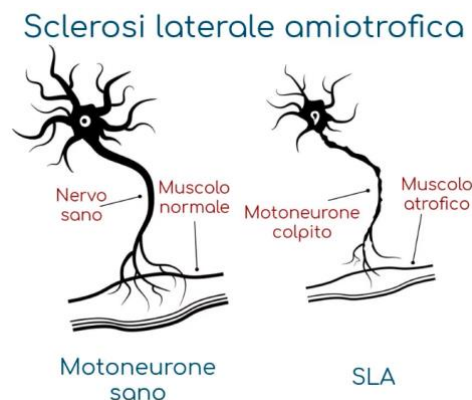


Figura 2¹¹. Comparazione tra motoneurone sano e motoneurone patologico.

TDP-43 è una proteina legante l'RNA/DNA ed è coinvolta in vari processi cellulari, quali la trascrizione, lo splicing, la maturazione e il trasporto dell'RNA e la formazione di granuli. La localizzazione di TDP-43 è prevalentemente nucleare, sebbene in piccola parte possa trovarsi anche nel citoplasma. L'aumento dei livelli di questa molecola nel citoplasma, associato alla riduzione della concentrazione nel nucleo, è proprio un indicatore della patologia¹².

Gli aggregati proteici, o più semplicemente i loro precursori oligomerici, disturbano la normale omeostasi proteica e inducono stress cellulare.

Numerose proteine leganti l'RNA sono coinvolte nella patogenesi della SLA. Le principali, in questo senso, sono TDP-43 e FUS; ci sono poi altre proteine meno conosciute, come l'angiogenina (ANG), la senataxin (STX), la matrin-3 (MATR3), oppure diverse ribonucleoproteine (come A1 e A2B1)¹³.

In normali condizioni, queste proteine sono allocate soprattutto nel nucleo, dove hanno importanti funzioni nella trascrizione, nello splicing, nel metabolismo dell'RNA non codificante e nella biogenesi del micro-RNA. Di conseguenza, una riduzione dei livelli di queste proteine nel nucleo può portare a grossi problemi per quanto concerne la qualità del trascrittoma. Allo stesso modo, anche la traslocazione nel citoplasma di questi aggregati può portare a effetti tossici nella cellula.

Numerosi aspetti patologici della SLA sono da ricondurre all'importanza dell'integrità del citoscheletro e del normale funzionamento del trasporto assonale¹⁴: mutazioni nella profilina-1 (PFN1) e nella tubulina alpha-4A (TUBA4A) solo raramente causano la SLA, ma quando accade si è visto che destabilizzano il network della tubulina e causano deficit nel trasporto assonale.

Mutazioni nell'estremità C-terminale della Kinesina-1, codificato dalla isoforma 5A della catena pesante della kinesina (KIF5A), potrebbero invece danneggiare il trasporto anterogrado delle proteine cargo lungo i microtubuli^{15,16}.

Il complesso della dinactina è un importante attivatore della dineina che stabilizza il legame delle proteine cargo e modula la funzione motoria. Anche in questo caso, mutazioni puntiformi che colpiscono il gene che codifica per la subunità del

complesso della dinactina (dinactina1) possono portare a SLA o FTD (frontotemporal dementia).

Trattare la SLA come singola patologia è un approccio quasi certamente sbagliato: è molto più probabile invece che SLA e FTD rappresentino gli estremi opposti di un'unica patologia. Questo deriva dal possibile accumulo intracellulare (in entrambi i casi) della proteina TDP-43, nonché dalla comune espansione di un esanucleotide caratteristico all'interno del gene C9orf72¹⁷.

3.1.4 Anatomia patologica

Aspetti macroscopici

Nella maggioranza dei pazienti affetti da SLA non si riscontrano anomalie macroscopiche a livello cerebrale. Il midollo spinale spesso va incontro ad atrofia nelle radici nervose anteriori. In alcuni rari casi si riscontra anche atrofia del giro precentrale¹⁸. Nei pazienti con demenza, potrebbe essere presente atrofia della corteccia frontale e/o temporale; per quanto riguarda l'atrofia, essa potrebbe essere più importante nel cervello dei pazienti con overlap SLA-FTD¹⁸⁻²¹.

Aspetti microscopici

I principali cambiamenti consistono nella perdita neuronale e assonale. Si osserva infatti la perdita di assoni mielinizzati nelle colonne anteriori e laterali del midollo spinale, nonché una diminuzione delle dimensioni del corno anteriore del midollo spinale, particolarmente evidente con la colorazione luxol fast blue che permette di evidenziare le macchie di mielina^{18,22}.

C'è degenerazione e perdita dei grandi motoneuroni del corno anteriore del midollo spinale, dei nuclei motori inferiori del tronco encefalico, così come delle cellule di Betz nella corteccia motoria (ben visibile con colorazioni standard quale l'ematossilina ed eosina)^{18,23-25}. Gli studi morfometrici del corno anteriore del midollo spinale evidenziano una globale riduzione delle dimensioni dei neuroni nel corno anteriore, non solo dei più grandi motoneuroni α ²⁶. C'è evidenza di riduzione delle dimensioni del neurone, così come perdita e atrofia delle fibre nervose. Altri aspetti da menzionare della SLA includono sia vacuolizzazione (grandi spazi vuoti

a fianco dei neuroni) che spongiosi (piccoli spazi vuoti che portano a formare una trama simile a quella di una spugna).

I corpi di Bunina sono piccole inclusioni eosinofile intracellulari (le cui dimensioni oscillano tra i 3 e i 6 micron) di forma rotondeggiante/ovale, presenti nei motoneuroni del midollo spinale e nel tronco encefalico dei pazienti con SLA, siano essi affetti da una forma familiare o sporadica. Sono ben visibili con ematossilina ed eosina^{27,28}. Tali inclusi sono più frequentemente localizzati nel citoplasma dei motoneuroni, anche se occasionalmente potrebbero essere rinvenuti a livello dei dendriti²⁹. Il loro numero per ciascun neurone è molto variabile, inoltre potrebbero spesso organizzarsi in catene e clusters. I corpi di Bunina sono stati riscontrati raramente nelle cellule di Betz, nei neuroni dei nuclei oculomotori e nei nuclei di Onuf³⁰⁻³². A livello immunohistochimico, i corpi di Bunina dimostrano positività per la cistatina C, per la transferrina e con la peripherina^{33,34} hanno una parziale colocalizzazione. Sono tuttavia negativi per molte proteine comunemente associate con la neurodegenerazione, come ad esempio tau, α e β tubulina, sinaptofisina, proteine precursori dell'amiloide, proteina gliale fibrillare acida, α sinucleina e p62^{33,35-37}. È tuttora controverso però se i corpi di Bunina siano positivi per l'ubiquitina oppure no³⁸. Il loro significato biologico è sconosciuto.

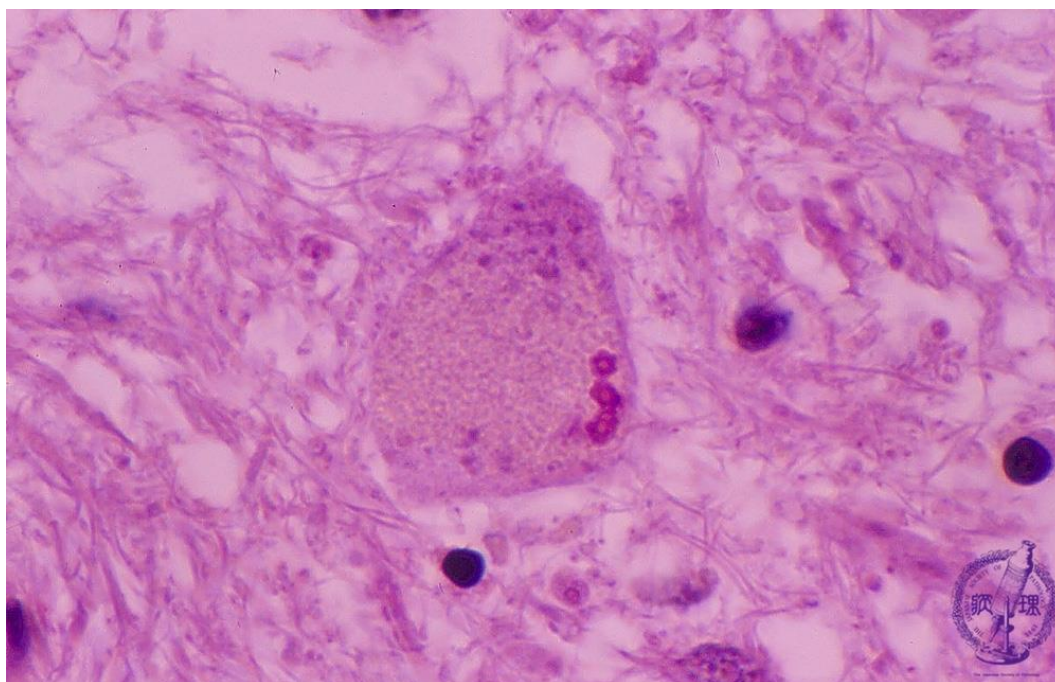


Figura 3³⁹. Riscontro di corpi di Bunina in paziente con SLA.

La complessità delle cellule gliali è tale che recenti studi hanno dimostrato il loro ruolo cruciale nella neurodegenerazione tipica della SLA⁴⁰. L'astrogliosi reattiva circonda i motoneuroni degenerati sia nei pazienti con SLA che nei modelli animali sperimentali⁴¹⁻⁴³. Gli astrociti reattivi, invece, mostrano un'aumentata immunoreattività per il GFAP e per la proteina legante il calcio S100 β ed esprimono markers infiammatori come COX-2, l'ossido nitrico sintetasi inducibile (iNOS) e anche NOS neuronale. Un aumento degli astrociti GFAP-immunoreattivi è particolarmente evidente nella materia grigia del corno anteriore del midollo spinale, dove normalmente gli astrociti esprimono GFAP a bassi livelli. Le inclusioni citoplasmatiche ialine e i markers dello stress ossidativo e nitrativo accompagnano l'evoluzione patologica astrocitaria^{44,45}.

L'attivazione della microglia è un aspetto critico della neuropatologia della glia. È stato correlato, nella SLA, alla degenerazione dei motoneuroni superiori⁴⁶. La microglia attivata, in risposta al distress neuronale, rilascia varie citochine pro-infiammatorie, portando a un alto grado di infiammazione nel cervello dei pazienti con SLA. La microglia rilascia anche specie reattive dell'ossigeno come il superossido e l'ossido nitrico, così come chemochine e fattori neurotrofici⁴⁷. Sembra che la neuroinfiammazione sia un'arma a doppio taglio: in parte protegge dalla neurodegenerazione e in parte la guida.

3.1.5 Criteri diagnostici

Sostanzialmente, non esiste un vero e proprio test per fare diagnosi di SLA. Perciò, la diagnosi è principalmente clinica con il supporto dell'elettroencefalografia, mentre altre indagini vengono eventualmente effettuate per escludere tutte quelle patologie che mimano la SLA a livello sintomatologico.

I criteri diagnostici, detti di "El Escorial", sono stati ideati nel 1994 per standardizzare l'arruolamento dei pazienti nei trial clinici⁴⁸. Globalmente, vennero definiti quattro livelli di diagnosi: definitiva, probabile, possibile, sospetta. Essi dipendono dalla disseminazione del danno sia a livello dei motoneuroni centrali che periferici, in quattro specifiche regioni anatomiche: area bulbare, cervicale, toracica e lombare. Il problema di questi criteri risiedeva nel fatto che erano considerati

troppo stringenti, sicché vennero revisionati nel 2000 in modo da aumentare la sensibilità diagnostica. Venne perciò aggiunta l'analisi elettrofisiologica con l'introduzione anche di una nuova categoria, ossia quella della "laboratory-supported probable ALS"⁴⁹. Con questa modifica i criteri vennero denominati di "Airlie House", i quali avevano sì una buona specificità ma avevano anche in questo caso una sensibilità discutibile, specialmente nelle fasi precoci della patologia. Ne risultò pertanto un forte ritardo diagnostico con limitazione del recruitment dei pazienti per i trial clinici⁵⁰.

Nel 2006, una commissione di esperti in neurofisiologia pubblicò dei nuovi criteri diagnostici (detti di Awaji-shima), i quali raccomandavano di usare i dati elettrofisiologici per porre la diagnosi di SLA⁵¹. Questi nuovi criteri diedero ai test elettrodiagnostici lo stesso peso delle alterazioni cliniche per la diagnosi di danno dei motoneuroni inferiori, al punto che la categoria "laboratory-supported probable ALS" scomparve. Molti studi hanno illustrato la migliore sensibilità dei criteri di Awaji-shima rispetto alla revisione dei criteri di El Escorial, specialmente per quanto riguarda la SLA a manifestazione bulbare⁵²⁻⁵⁴.

I criteri di El Escorial prevedono:

Presenza di:

- Degenerazione dei motoneuroni inferiori rilevati all'esame obiettivo, esami elettrofisiologici e neuropatologici.
- Degenerazione dei motoneuroni superiori rilevati all'esame obiettivo.
- Progressiva diffusione di segni o sintomi all'interno di una regione anatomica o ad altre regioni, determinata all'anamnesi o all'esame obiettivo.

Assenza di:

- Evidenza elettrofisiologica o anatomopatologica di altri processi patologici che potrebbero spiegare i segni di degenerazione di motoneuroni superiori e/o inferiori.

- Altri processi patologici documentati da tecniche di neuroimaging che potrebbero spiegare i segni clinici ed elettromiografici osservati.

Segni di sofferenza del primo MN	Segni di sofferenza del secondo MN
Iper tono spastico	Atrofia muscolare
Perdita di destrezza muscolare	Debolezza muscolare
Sindrome pseudobulbare	Fascicolazioni
Riflessi alterati	
Segno di Babinski e di Hoffmann	

Tabella I. Segni di coinvolgimento dei motoneuroni superiori e inferiori rilevabili per porre diagnosi di SLA.

La diagnosi clinica di SLA può essere categorizzata in vari livelli di certezza in base alla presenza di segni di coinvolgimento dei motoneuroni superiori e inferiori in una o più regioni anatomiche all'esame obiettivo. La classificazione prevede una divisione del sistema motorio in quattro regioni anatomiche all'esame obiettivo. La classificazione prevede una divisione del sistema motorio in quattro regioni anatomiche: regione bulbare, cervicale, toracica, lombosacrale.

I motoneuroni inferiori che afferiscono alla regione bulbare sono i motoneuroni craniali del bulbo, mentre alle regioni cervicale, toracica e lombosacrale afferiscono i motoneuroni delle corna anteriori del midollo spinale.

Seguendo tali criteri clinici si può classificare la diagnosi di SLA in⁵⁵:

- Clinicamente possibile – presenza di segni clinici di compromissione del I e II motoneurone in un solo distretto corporeo oppure segni del II motoneurone in due o più regioni, oppure segni clinici di compromissione del I e II motoneurone in due distretti corporei senza segni del I motoneurone posti all'estremità cefalica rispetto a quelli del II;
- Clinicamente probabile, con supporto di laboratorio – presenza di segni di compromissione del I motoneurone in uno o più distretti corporei e evidenza EMG di coinvolgimento del secondo

motoneurone in almeno due regioni, con l'esclusione di altre cause tramite indagini di imaging e protocolli clinici di laboratorio;

- Clinicamente probabile – segni clinici di compromissione del I e II motoneurone in almeno due distretti corporei e segni del I motoneurone posti all'estremità cefalica rispetto a quelli del II;
- Clinicamente definita – segni clinici di compromissione del I e II motoneurone in tre regioni.

L'elettromiografia è un importante aiuto per la diagnosi di SLA. Permette di dimostrare la presenza di degenerazione a livello dei motoneuroni inferiori nei soggetti clinicamente affetti, ma supporta anche la disseminazione del disordine nelle aree clinicamente libere da malattia. Nei pazienti con sintomi dovuti al coinvolgimento dei soli motoneuroni superiori, l'elettromiografia può essere d'aiuto per scovare dei danni anche ai motoneuroni inferiori. Per poter parlare di degenerazione dei motoneuroni inferiori nei muscoli, questa deve essere sia attiva (fibrillazioni potenziali, onde acute positive, FPs) che cronica (potenziale di unità motoria neurogenica o recruitment neurogenico)⁵¹.

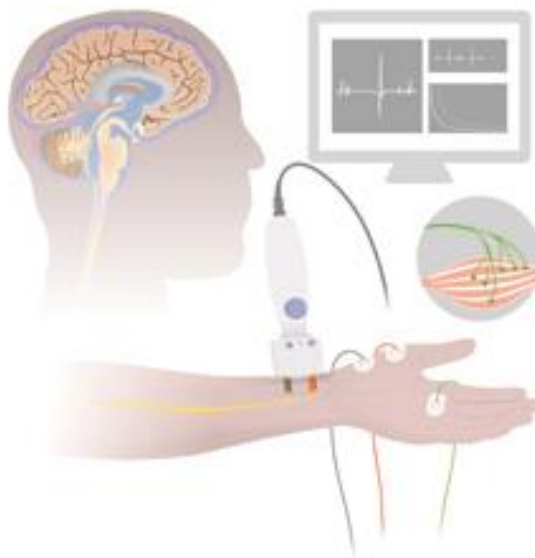


Figura 4⁵⁶. Illustrazione schematica di una elettromiografia.

L'esame tramite ago permette di analizzare fibre muscolari, in modo da registrare anomalie di attività a riposo che corrispondono alla separazione funzionale tra le fibre muscolari e i loro motoneuroni. Il tempo speso per cercare le fibrillazioni

potenziali, onde acute positive e specialmente i potenziali di fascicolazione impattano direttamente sulla sensibilità della registrazione⁵⁷. I potenziali di fascicolazione possono essere riscontrati anche in altre patologie così come anche in persone sane. Tuttavia, in un possibile quadro clinico, potrebbero rappresentare un importante elemento diagnostico. Così, numerosi autori hanno provato a differenziare i potenziali di fascicolazione benigni da quelli patologici della SLA: durante la SLA, le FP sono di solito di morfologia complessa con quattro o più fasi, aumento di durata e ampiezza. Le FP sono spesso instabili con un aumento del nervosismo del paziente⁵¹. Mills non rilevò alcuna differenza nella morfologia delle FP per distinguere la SLA da una condizione benigna, tuttavia notò una maggiore frequenza e un maggior numero di doppie FP nel caso di una patologia degenerativa dei motoneuroni⁵⁸.

Sono stati effettuati altri approcci rispetto alla valutazione con ago per individuare delle FP, come per esempio tramite elettrodi di superficie o ultrasuoni che combinano i vantaggi di un metodo non invasivo insieme al fatto di poter allargare la superficie di analisi^{59,60}.

L'analisi dei potenziali di unità motoria e il loro pattern di recruitment è la seconda fase dell'esaminazione con ago. Le anomalie che vengono registrate dipendono dalla denervazione e dai processi di reinnervazione compensatoria. La morte dei motoneuroni porta alla reinnervazione delle fibre motorie orfane da parte di unità motorie sane con, come conseguenza, MUP rimodellate le cui dimensioni, durata e numero di fasi saranno aumentati⁶¹.

Il danno dei motoneuroni inferiori viene mantenuto nelle regioni cervicali e lombari quando il pattern neurogenico attivo e cronico è presente in due muscoli di differente innervazione radicolare e truncolare. Nell'area bulbare e toracica, è necessario che sia coinvolto almeno un muscolo. Questo implica un'analisi attenta delle quattro regioni anatomiche. Sfortunatamente, i muscoli bulbari (stiloglosso, genioglosso, sternocleidomastoideo) e toracici (paraspinale, retto addominale) sono troppo spesso dimenticati, quando potrebbero essere invece di grande valore per mettere in relazione il coinvolgimento dei motoneuroni inferiori con la SLA⁶².

Le conduzioni nervose motorie devono essere sistematicamente registrate in modo da confermare la diagnosi di SLA ma anche per poter escludere gli altri disturbi

motori: in questo senso, l'esplorazione deve essere estesa oltre i territori clinicamente colpiti. Classicamente, gli studi sulla velocità di conduzione motoria sono inalterati nella SLA ad eccezione dei potenziali d'azione motoria composti (CMAP), la cui ampiezza può diminuire in base all'amiotrofia legata alla degenerazione dei motoneuroni inferiori.

Le anomalie della conduzione nervosa sensoriale non sono rare nella SLA, indipendentemente dalla neuropatia associata⁶³: nei pazienti con SOD1 ereditaria, ad esempio, si possono riscontrare disturbi sensoriali⁶⁴. Pertanto, la diagnosi complessiva di SLA non deve essere confutata sulla base delle sole anomalie dello studio della conduzione nervosa sensoriale, in particolare se limitate a una lieve diminuzione delle ampiezze del potenziale d'azione del nervo sensoriale negli arti inferiori, con sintomi sensoriali clinici assenti o limitati e la cui stabilità relativa contrasta con la progressione del coinvolgimento motorio.

Altri strumenti elettrodiagnostici come l'EMG a fibra singola, macro-EMG o MUNIX sono proposti per la comprensione della fisiopatologia e il conteggio delle unità motorie più che per la diagnosi^{65,66}.

3.1.6 Studi di neuroimaging

MRI

Recenti applicazioni della MRI nella SLA si sono focalizzate sia nell'analisi dei cambiamenti strutturali delle sequenze T1-pesate valutate mediante approcci di analisi automatica sia, in una moltitudine di studi, sull'analisi dei cambiamenti delle connessioni neuronali (microstrutturali).

La maggior parte dei recenti studi basati sulla risonanza magnetica nella SLA ha utilizzato la risonanza magnetica per diffusione, in particolare l'imaging del tensore di diffusione (DTI), che è stato ampiamente studiato per dedurre alterazioni microstrutturali all'interno del cervello e del midollo spinale⁶⁷.

Nella valutazione dell'anatomia patologica, oltre al principale riscontro di ridotta anisotropia frazionaria e aumento della diffusività media del tratto corticospinale (associato a una maggiore gravità della malattia e a un più rapido tasso di progressione), altre aree extramotorie e integrative sono state affrontate mediante

imaging pesato in diffusione (DWI)⁶⁸. In un recente studio trattografico di MRI, è stato possibile dimostrare che le alterazioni diffuse della diffusività nelle parcellazioni talamiche motorie ed extramotorie erano rilevabili al basale, mentre il declino nel tempo ha influenzato selettivamente le sottoregioni talamiche associate alla connettività del lobo frontale e temporale⁶⁹.

I risultati di una metanalisi di studi DTI trasversali e longitudinali nella SLA hanno supportato il modello della progressione della malattia assonale cortico-efferente e hanno fornito ulteriori prove per l'approccio basato sul DTI allo schema di stadiazione proposto della SLA, con diffusioni associate di inclusioni TDP-43⁷⁰.

Per quanto riguarda i nuovi approcci tecnici del DTI alla SLA, sono stati sviluppati nuovi modelli come la dispersione dell'orientamento dei neuriti e l'imaging della densità⁶⁷, con l'obiettivo di separare la densità dei neuriti dalla dispersione dell'orientamento, e questa tecnica ha dimostrato una significativa riduzione dell'indice di densità dei neuriti nella CSTs e del corpo calloso nella SLA, suggerendo la perdita di densità assonale in queste vie, insieme alla riduzione dell'indice di dispersione dell'orientamento all'interno del giro precentrale⁷¹. La combinazione multiparametrica di diverse tecniche di risonanza magnetica è stata utilizzata in un numero crescente di studi ed è della massima importanza per il settore.

Un buon esempio è la spettroscopia del tensore di diffusione (DTS) che combina la specificità compartimentale della spettroscopia RM con la sensibilità microstrutturale del DTI e consente di valutare le proprietà della microstruttura tissutale specifica della cellula sondando la diffusione dei metaboliti cerebrali intracellulari.

Questa integrazione multiparametrica delle tecniche MRI, in aggiunta agli studi multimodali con PET⁷², sarà un elemento importante delle direzioni future della MRI nella SLA. La stratificazione dei sottotipi di SLA progredirà sostanzialmente mediante l'imaging di pazienti affetti da SLA con specifiche mutazioni genetiche sottostanti. Questo approccio è stato recentemente dimostrato sia in pazienti con mutazioni di espansione nel gene C9orf72 (che hanno mostrato una diffusa riduzione dell'integrità della sostanza bianca in uno studio DTI⁷³ basato sull'intero cervello) sia in pazienti con SLA correlata a malfunzionamento dell'enzima

superossido dismutasi (SOD1), i quali hanno dimostrato alterazioni frazionali dell'anisotropia tra i controlli e la forma sporadica di SLA⁷⁴.

PET

Sono stati compiuti sforzi utilizzando la PET per generare classificazioni più moderne e basate sulla biologia della SLA e dei suoi sottotipi. La PET è una tecnica di imaging in vivo non invasiva che fornisce dati funzionali in grado di svelare piccoli cambiamenti a livello molecolare, esplorando i dati sia grazie ad analisi regionali che di network. Proprio per questo, l'imaging nella SLA è stato basato su radiotraccianti PET mirati al metabolismo dei neuroni, microglia e astrociti, densità di recettori e proteine, nonché stress ossidativo.

PET mediante [18F]FDG

Fin dalle prime indagini eseguite tramite PET, la maggior parte degli studi di neuroimaging è stata eseguita con il 18-fluorodesossiglucosio, principalmente a seguito dell'ampia disponibilità e del costo relativamente basso di questo radiotracciante. Il crescente interesse nel determinare il modello di distribuzione del metabolismo cerebrale nella SLA e nei suoi sottotipi clinici ha portato a due studi in cui, per la prima volta, sono state reclutate ampie coorti di pazienti affetti da SLA^{75,76}. I risultati di queste indagini convergono nel descrivere un pattern di distribuzione costituito da un significativo ipometabolismo nelle regioni prefrontale, frontale, precentrale e postcentrale (bilateralmente), associato a un significativo ipermetabolismo nelle regioni posteriori della corteccia occipitale e medio-temporale, cervelletto, mesencefalo e tratto corticospinale. Questa scoperta molto particolare, atipica per gli studi funzionali che indagano sulle patologie neurodegenerative, può essere considerata la firma metabolica più specifica della SLA. La ridotta densità neuronale nelle cellule piramidali nella corteccia motoria e nelle loro proiezioni al midollo spinale provoca una diffusa attivazione reattiva della microglia e astrocitosi. Tale proliferazione di astrociti sembra essere il principale determinante dell'assorbimento di glucosio dai capillari intraparenchimali e si traduce, a sua volta, in un aumento relativo del segnale correlato al [18F]FDG nei pazienti affetti da SLA rispetto ai controlli⁷⁶. Nello studio di Van Weehaeghe et al.⁷⁷, l'ipometabolismo frontale era predittivo di una minore sopravvivenza, il che indica questo dato come un potenziale fattore di

rischio per una rapida progressione della malattia. Quest'ultima variabile è stata anche indagata in uno studio in cui la diminuzione del metabolismo del glucosio in 10 pazienti affetti da SLA era inversamente correlata alla durata dei sintomi clinici⁷⁸.

La FDG-PET è stata utilizzata anche per evidenziare le differenze metaboliche tra SLA e sindromi di Parkinson positive, raggiungendo un'accuratezza fino al 90% per i diversi metodi statistici implementati. Tuttavia, quando ci si concentra sul suo valore nel discriminare i pazienti affetti da SLA con esordio spinale e bulbare, non sono state riscontrate differenze statisticamente significative⁷⁹.

Il valore attuale del [18F]FDG PET in ambito clinico è stato attentamente valutato da un gruppo di esperti nel campo della medicina nucleare e della neurologia⁸⁰. Hanno analizzato le più rilevanti indagini [18F]FDG mediante il modello Population, Intervention, Comparison, Outcome (PICO) valutando il valore incrementale fornito rispetto alle informazioni risultanti dai test clinici eseguiti di routine⁸⁰, concludendo che il [18F]FDG PET offre buone prove a supporto della diagnosi di SLA. Anche se l'uso della [18F]FDG PET in ambito SLA non è ancora giustificato come indagine di routine, potrebbe comunque rappresentare un potenziale biomarcatore utile nella valutazione trasversale e longitudinale della diffusione delle lesioni.

3.1.7 Biopsia muscolare e nervosa

Quando la clinica e le analisi elettrofisiologiche o laboratoristiche hanno esiti atipici per la SLA, per escludere una sindrome mimica come la miosite a corpi inclusi può essere utile l'esecuzione di una biopsia. Questa è di particolare utilità nel caso in cui ci sia la necessità di dimostrare una disfunzione dei motoneuroni inferiori in una regione corporea, quando i segni clinici o elettrofisiologici non sono presenti o dubbi⁸¹.

3.1.8 Esami di laboratorio

Esistono alcuni test laboratoristici che potrebbero risultare alterati nella SLA:

- Enzimi muscolari (CK, ALT, AST, LDH)
- Creatinina sierica, dovuta alla perdita di massa muscolare scheletrica

- Ipocloremia e aumento dei bicarbonati (dovuti a una compromissione respiratoria avanzata)
- Livelli aumentati di proteine nel liquido cerebro-spinale (raramente sopra i 100 mg/dL)

Al fine di escludere inoltre una sindrome mimica di SLA vanno indagati anche:

- Autoanticorpi, per patologie autoimmuni come la miastenia gravis
- Dosaggi ormonali, per ipertiroidismo o iperparatiroidismo
- Indici infiammatori e di infezione (come HIV, HTLV-1, malattia di Lyme, malattia di Creutzfeldt-Jacob, sifilide)
- Livelli ematici e urinari di piombo/mercurio, per intossicazione da metalli pesanti
- Deficit di esosaminidasi A/B, che sono deficit ereditari enzimatici⁸¹.

3.1.9 Analisi del liquido spinale

Nell'iter diagnostico della SLA è compresa anche l'analisi del liquor cerebrospinale. Il principale scopo è quello di analizzare la permeabilità della barriera ematoencefalica, che risulta alterata nel 46% dei pazienti. Dall'analisi del CSF si possono supporre i meccanismi fisiopatologici alla base della patologia, inoltre ciò permette anche una eventuale diagnosi precoce presintomatica, così come un'eventuale nuova strategia terapeutica. I marker ricercati sono di vario tipo: marker di disfunzione della barriera ematoencefalica, oppure di degenerazione neuroassonale, stress ossidativo, alterata neurotrasmissione, fattori neurotrofici alterati, marcatori di infiammazione e autoimmunità, marker di attivazione della glia⁸².

In linea con il ruolo sempre più riconosciuto degli astrociti e della microglia nella fisiopatologia della SLA⁸³, è stato anche sostenuto che la tossicità del CSF possiede una componente cellulare non autonoma. Risultati suggestivi sono emersi già nel 1987, quando esperimenti in vitro hanno dimostrato che l'esposizione a CSF di pazienti con SLA innescava un aumento delle cellule GFAP positive, coerente con la proliferazione degli astrociti⁸⁴.

La causa dell'astrogliosi non è chiara, sebbene ulteriori risultati abbiano dimostrato che potrebbe derivare dalla stimolazione di mGluRs in risposta all'esposizione a SLA-CSF, come suggerito dall'effetto antiproliferativo dell'antagonista del gruppo I mGluR, ossia l'acido 1-aminoindan-1,5-dicarbossilico (AIDA)⁸⁵. A complemento delle osservazioni in vitro, è stato anche scoperto che l'ALS-CSF promuove una maggiore immunoreattività del GFAP quando iniettato nei ratti⁸⁶.

3.1.10 Neurofilamenti

I neurofilamenti sono filamenti intermedi di 10 nm presenti a livello neuronale, composti da tre differenti catene: catena leggera (NfL), catena media (NfM) e catena pesante (NfH)⁸⁷. Tra le principali funzioni, forniscono supporto strutturale ai neuroni determinando il calibro degli assoni e la velocità di conduzione⁸⁸.

È già noto da più di due decenni che i livelli di NF sono circa 5-10 volte più alti nei pazienti affetti da SLA rispetto ai controlli sani⁸⁹. Numerosi studi da allora hanno anche dimostrato che i livelli di NF sono aumentati nei pazienti con SLA non solo nel liquido cerebrospinale, ma anche nel siero o nel plasma⁹⁰. Nonostante ci sia un notevole aumento di NF in alcuni dei disturbi che mimano la SLA, l'accuratezza diagnostica per identificare la patologia è ancora buona. È importante sottolineare che l'aumento di NF è già misurabile all'inizio del decorso della malattia⁹¹⁻⁹³; uno studio recente ha anche dimostrato che i livelli di NfL aumentano già diversi mesi prima dell'insorgenza dei sintomi nei portatori della mutazione SOD1⁹⁴.

I neurofilamenti sono elevati nei pazienti con SLA sporadica e familiare, anche se i valori sono leggermente inferiori nei casi con mutazione di SOD1 e leggermente superiori nei pazienti positivi per la mutazione C9orf72^{95,96}.

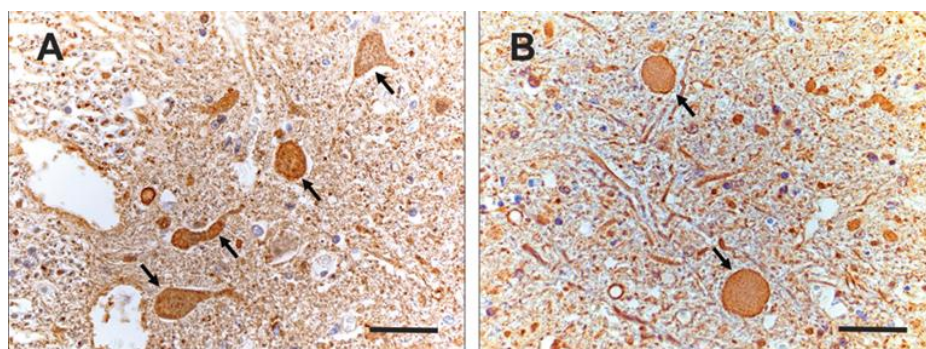


Figura 5. Neurofilamenti al microscopio⁹⁷.

3.1.11 Chitinasi

Le chitinasi sono degli enzimi appartenenti alla famiglia delle 18 glicosil idrolasi (GH18) e sono caratterizzate dalla capacità di scindere la chitina, un polisaccaride naturale che si trova nel rivestimento di vari agenti patogeni. La famiglia GH18 è espressa in modo ubiquitario in un'ampia gamma di organismi, dai batteri all'uomo; la conservazione evolutiva in quest'ultimo è particolarmente interessante, data la mancanza di chitina endogena. Le chitinasi dei mammiferi includono le chitinasi enzimaticamente attive chitotriosidasi (CHIT1) e la chitinasi acida dei mammiferi (AMCase) che possono degradare la chitina, e le chitinasi (CLs) chitinasi 3-like 1 e like-2 (CHI3L1, CHI3L2)^{98,99}. Nonostante siano in grado di legare la chitina con elevata affinità, le CL non possiedono attività chitinolitica, a causa dell'assenza del sito catalitico.

Oltre al loro evidente ruolo nel contesto dell'immunità innata, le chitinasi partecipano anche alla risposta adattativa TH2, nel rimodellamento e riparazione dei tessuti e, di più recente scoperta, nell'oligodendrogenesi¹⁰⁰⁻¹⁰².

Varghese et al.¹⁰³ furono i primi a segnalare le chitinasi nel contesto della SLA: grazie all'utilizzo della spettrometria di massa quantitativa e la convalida basata su ELISA in una coorte indipendente, riuscirono a dimostrare che i livelli di CSF di CHIT1, CHI3L1 e CHI3L2 erano significativamente elevati nei pazienti affetti da SLA rispetto ai controlli sani. Thompson et al., successivamente, studiarono tutte e tre queste chitinasi, riferendo livelli di queste significativamente più alti nel liquido cerebrospinale dei pazienti affetti da SLA rispetto ai controlli sani. Sebbene tutte e tre le isoforme fossero adeguate nel distinguere la patologia da quelle che la mimano e dai controlli, i neurofilamenti (catena pesante fosforilata (pNfh) e catena leggera (NfL)) si rivelarono tuttavia più affidabili¹⁰⁴.

3.1.12 Genetica

È bene ricordare che esistono forme "mendeliane" di SLA in cui applicare le classiche regole di ereditarietà, pertanto in questa circostanza diversi parenti di primo e secondo grado sono potenzialmente affetti dalla malattia. Il tasso di questa forma di patologia è intorno al 5% (la maggioranza dei pazienti, di conseguenza, non rientra in questa categoria)¹⁰⁵. Numerosi studi svolti sui gemelli hanno tuttavia

dimostrato che la genetica, in senso lato, spiega circa il 61% dei pazienti affetti da una forma di SLA.

Andando ad analizzare le frequenze delle 4 mutazioni più comuni nella SLA (C9orf72, SOD1, TARDBP, FUS) si possono fare importanti osservazioni. Innanzitutto, le coorti di SLA asiatiche ed europee mostrano un background genetico divergente: la mutazione più comune nei pazienti europei, sia sporadica che familiare, è l'espansione ripetuta C9orf72, mentre in Asia prevalgono le mutazioni di SOD1^{106,107}.

Oltre al tipo di popolazione (asiatico vs europeo), il tipo di coorte (popolazione generale vs popolazione ospedaliera) è un forte determinante delle frequenze di mutazione. Ciò suggerisce che le coorti basate sulla popolazione generale forniscono stime meno distorte rispetto alle coorti ospedaliere, poiché quest'ultime sono tipicamente caratterizzate da pazienti più giovani.

3.1.13 Presentazione clinica

Il segno distintivo della SLA è la progressiva debolezza muscolare, accompagnata da atrofia muscolare, fascicolazioni, crampi muscolari e lentezza dei movimenti.

L'insorgenza della debolezza muscolare nella SLA è solitamente focale e tipicamente si diffonde alle regioni corporee adiacenti. Questo modello è compatibile con la diffusione della patologia all'interno del sistema motorio, con la propagazione neuroanatomica all'interno dei segmenti del midollo spinale e della corteccia motoria¹⁰⁸. La malattia di solito si presenta con debolezza muscolare distale unilaterale e atrofia dei muscoli degli arti superiori o inferiori (SLA spinale, circa in 2/3 dei pazienti) o dei muscoli bulbari (SLA bulbare, in 1/3 dei pazienti). L'esordio dell'arto superiore è più comunemente rivolto alla mano dominante¹⁰⁹, con i muscoli dell'eminanza tenar più colpiti rispetto ai muscoli ipotenar (in questo caso si parla di sindrome della mano divisa¹¹⁰), con coinvolgimento precoce del primo muscolo interosseo e gli estensori delle dita sono più colpiti rispetto ai flessori delle dita¹¹¹. Nell'arto inferiore il muscolo tibiale anteriore è tipicamente

colpito prima rispetto al muscolo gastrocnemio, mentre i muscoli posteriori della coscia sono colpiti prima del muscolo quadricipite¹¹².

La SLA ad esordio bulbare si presenta più comunemente con disartria o disfagia, meno comunemente con disfonia o ridotta chiusura della bocca o problemi di masticazione. Debolezza muscolare assiale con testa abbassata e problemi di postura sono comuni negli stadi avanzati della malattia, ma raramente possono essere il primo sintomo di presentazione. In circa 1/3 dei pazienti, possono comparire attacchi di risate o pianti incontrollati (indicati come sindrome pseudobulbare)¹¹³.

In alcuni pazienti, la debolezza muscolare è preceduta da un periodo in cui si notano fascicolazioni, crampi muscolari o lieve calo ponderale.

All'esame neurologico, nei pazienti con SLA classica si trova una combinazione di segni di coinvolgimento dei motoneuroni superiori e inferiori. I segni del coinvolgimento dei LMN includono debolezza muscolare, atrofia, fascicolazioni e riduzione del tono muscolare. I segni di coinvolgimento dell'UMN includono invece iperriflessia (o riflessi trattenuti nei muscoli atrofici), aumento del tono muscolare (specialmente nei flessori degli arti superiori e negli estensori degli arti inferiori) e lentezza dei movimenti (ad esempio il movimento della lingua).

Sebbene la maggior parte dei pazienti possa essere etichettata come avente un classico fenotipo di SLA con esordio spinale o bulbare, è sempre più riconosciuto che la SLA è clinicamente una sindrome eterogenea con manifestazioni motorie ed extramotorie distinte. Esiste una notevole eterogeneità all'interno delle manifestazioni motorie della malattia stessa e le manifestazioni motorie possono essere accompagnate da gradi variabili di coinvolgimento frontotemporale. Ciò si traduce in diverse presentazioni fenotipiche della malattia.

Sebbene non ci siano criteri clinici ampiamente accettati per le diverse forme di SLA, vi è una crescente necessità di un nuovo sistema di classificazione che utilizzi termini universalmente accettati per spiegare l'eterogeneità della patologia¹¹⁴.

Fenotipi della sclerosi laterale amiotrofica

Esistono molti diversi fenotipi motori di SLA e sono principalmente classificati in base al coinvolgimento relativo di UMN rispetto a LMN e alla distribuzione regionale del coinvolgimento. È importante riconoscere i diversi fenotipi motori, poiché l'aspettativa di vita varia considerevolmente tra i sottotipi di SLA. Inoltre, possono essere presenti gradi variabili di compromissione cognitiva e comportamentale.

Sottotipi di SLA basati sul coinvolgimento relativo di UMN rispetto a LMN

Nella SLA classica, segni di perdita combinata di UMN e LMN sono presenti in una o più regioni corporee e la maggior parte dei pazienti che presentano una malattia del motoneurone può essere etichettata come SLA classica.

La sclerosi laterale primaria (PLS) è caratterizzata da spasticità progressiva e rallentamento dei movimenti con segni di UMN isolati all'esame clinico. Non dovrebbero esserci atrofia muscolare o fascicolazioni visibili e nessun segno di denervazione all'elettromiografia (EMG) a 4 anni dall'insorgenza dei sintomi¹¹⁵. Più comunemente, i sintomi iniziano simmetricamente negli arti inferiori ma possono anche iniziare nella regione bulbare. In termini di prevalenza, questa forma rappresenta il 3-5% di tutte le malattie dei motoneuroni. La PLS può evolvere in SLA, in genere entro 3-4 anni dall'insorgenza della malattia, con una sopravvivenza mediana dei pazienti superiore a 20 anni.

I pazienti con SLA a predominanza UMN mostrano alcune caratteristiche del coinvolgimento LMN ma molto meno pronunciate rispetto alle caratteristiche UMN. Hanno una sopravvivenza più breve rispetto alla PLS, ma una progressione della malattia più lenta rispetto alla SLA classica.

I pazienti con SLA predominante nei motoneuroni inferiori hanno segni UMN molto limitati e possono avere diversi tassi di progressione. L'atrofia muscolare progressiva è caratterizzata da segni LMN isolati progressivi senza evidenza clinica di disfunzione UMN, sebbene fino al 30% dei pazienti con atrofia muscolare progressiva svilupperà segni UMN durante il follow-up.

Sottotipi di malattia del motoneurone basati sulla distribuzione regionale del coinvolgimento

- La forma bulbare di SLA è particolarmente aggressiva, essendo caratterizzata da un rapido declino e una sopravvivenza la cui mediana è di due anni dall'insorgenza dei sintomi. Le disfunzioni dei motoneuroni bulbari portano a una disartria spastica, che è caratterizzata da un eloquio lento, laborioso e distorto. La disfunzione bulbare dei motoneuroni inferiori è caratterizzata da atrofia della lingua e fascicolazioni, accompagnata da disartria flaccida e disfagia. Nonostante solo circa il 30% dei pazienti presenti sintomi bulbari, la maggioranza di essi alla fine soffre di difficoltà di deglutizione e di parola.
- La paralisi pseudobulbare è caratterizzata da espressioni facciali assenti (viso inespressivo), disartria spastica e difficoltà nella masticazione, disfagia e protrusione della lingua dovuta alla spasticità ma nessuna fascicolazione o atrofia della lingua¹¹⁶. Siccome sono interessati gli UMN, la mandibola tende a scattare in maniera esagerata o clonica.
- La sindrome di Mills (variante emiplegica) descrive un pattern di coinvolgimento emiplegico o asimmetrico. I sintomi sono gradualmente progressivi e la progressione è spesso più ascendente che discendente; la paralisi può coinvolgere anche i muscoli facciali. I segni piramidali sono solitamente predominanti a lato dell'emiplegia.
- Circa il 3% dei pazienti presenta debolezza a livello diaframmatico, ad esempio dispnea da sforzo, dispnea a riposo, ortopnea come problemi iniziali. Va sottolineato che i pazienti con insorgenza respiratoria hanno una prognosi infausta. Nella variante assiale della SLA, la malattia inizia nei muscoli paravertebrali, con la postura curva come sintomo di presentazione.
- La Flail Arm SLA è un modello progressivo di debolezza prevalentemente a carico dei LMN negli arti superiori, un modello di debolezza per lo più simmetrico che tipicamente inizia nella parte prossimale con successivo coinvolgimento distale. I sintomi bulbari si sviluppano fino al 77%. È presente un'alta preponderanza maschile (rapporto maschi/femmine 3:1)¹¹⁷.
- La Flail Leg SLA, invece, è caratterizzata da un pattern di debolezza progressivo, asimmetrico, prevalentemente nei LMN con debolezza ad

esordio distale e atrofia degli arti inferiori. Non c'è debolezza o atrofia significativa negli arti superiori e nella regione bulbare entro 12 mesi dall'esordio e la progressione è leggermente più lenta rispetto alla SLA classica.

- La SLA pseudopolineuritica è caratterizzata da debolezza distale degli arti inferiori e assenza del riflesso del tendine di Achille, e deve essere distinta dalla neuropatia periferica.

Sottotipi di SLA basati con un coinvolgimento frontotemporale

Dopo la malattia di Alzheimer, la FTD è la causa più comune di demenza nei pazienti di età inferiore ai 65 anni. In circa il 50% dei pazienti affetti da SLA, il processo degenerativo può estendersi ai lobi frontali e temporali anteriori, dando origine a un grado variabile di disfunzione esecutiva, compromissione del linguaggio o modificazioni comportamentali. Se non ricercati in modo specifico, questi cambiamenti possono passare inosservati.

Lo screening ALS cognitivo e comportamentale di Edimburgo è un utile test di screening per identificare la disfunzione frontotemporale¹¹⁸. Circa il 50% dei pazienti avrà una cognizione normale, ma in circa il 10-15% può essere fatta diagnosi di SLA-FTD, quando i criteri per la variante comportamentale FTD o i criteri per l'afasia progressiva primaria siano soddisfatti. La compromissione comportamentale della SLA richiede solo due dei sei criteri per la variante comportamentale FTD. La SLA senza compromissione cognitiva o comportamentale è associata a disfunzione in due domini non esecutivi (memoria o funzioni visuospatiali), mentre la compromissione cognitiva della SLA è associata a compromissione in due test per la funzione esecutiva¹¹⁹.

3.1.14 Diagnosi differenziale

La diagnosi di SLA nei pazienti con una presentazione tipica è relativamente semplice, infatti si basa sul riconoscimento dei segni di degenerazione UMN e LMN, in presenza di una diffusione progressiva dei sintomi o dei segni all'interno di una regione o altre regioni.

Tuttavia, nei pazienti con manifestazioni di malattia molto precoci, con lenta progressione della malattia o con concomitanti disturbi del sistema nervoso centrale o periferico, la diagnosi può essere difficile. La probabilità di diagnosi errate, le cosiddette “sindromi che imitano la SLA” è di circa il 7-8%¹²⁰. Le sindromi che mimano la SLA devono essere escluse poiché il ritardo nel trattamento può avere un effetto sfavorevole sull’esito. Per i pazienti con coinvolgimento predominante di UMN o LMN, la diagnosi differenziale diventa più ampia: nei pazienti con interessamento predominante dell’UMN, dovrebbero essere prese in considerazione una radicolomielopatia cervicale, una paraplegia spastica ereditaria, una adrenomielloneuropatia e una xantomatosi cerebrotendinea. In caso di caratteristiche LMN pure, la diagnosi di plessopatia, neuropatia periferica (ad es. neuropatia motoria multifocale con blocco di conduzione, polineuropatia demielinizzante infiammatoria cronica, neuropatia infettiva) o miopatie (ad es. miosite da corpi inclusi) dovrebbe essere esclusa. La Flail Arm SLA dovrebbe essere distinta da patologie che la possono mimare, come l’atrofia muscolare spinale, la malattia di Kennedy, la neuropatia motoria multifocale e l’amiotrofia monomielica.

In caso di insorgenza focale di debolezza dei muscoli estensori del collo, devono essere prese in considerazione la miastenia gravis e la miopatia focale. La forma di miastenia gravis MuSK+ può essere accompagnata da debolezza e atrofia della lingua ed essere confusa con la SLA bulbare¹²¹.

3.1.15 Sopravvivenza e fattori prognostici

La sopravvivenza di un paziente con SLA è variabile. Circa il 10% dei pazienti affetti da SLA ha una forma lenta della malattia con una sopravvivenza di 10 anni o più. La stragrande maggioranza dei pazienti affetti da SLA ha tuttavia una sopravvivenza molto più limitata dopo la diagnosi. Studi recenti hanno riportato un tempo di sopravvivenza medio o mediano dall’insorgenza dei sintomi alla morte o al supporto respiratorio invasivo compreso tra 24 e 50 mesi¹²².

La tracheostomia è comunemente usata come endpoint alternativo per la morte perché la sopravvivenza dei pazienti affetti da SLA è notevolmente estesa una volta che la tracheostomia è in atto. Benjaminsens et Al. hanno mostrato nel loro studio che il tempo medio di sopravvivenza dall’insorgenza dei sintomi alla morte

potrebbe essere più lungo di cinque anni se i pazienti affetti da SLA fossero sottoposti a tracheostomia. I fattori predittivi per una migliore sopravvivenza alla SLA includono il sesso maschile, un ritardo diagnostico più lungo e la partecipazione a cliniche multidisciplinari. Studi recenti hanno anche riportato che una sopravvivenza più lunga è associata al sesso maschile¹²³, all'esordio spinale, all'età più giovane all'esordio e alla diagnosi, punteggio ALSFRS-R al basale più alto e aumento di peso dopo la diagnosi¹²². Al contrario, le comorbidità respiratorie o genito-urinarie¹²⁴, la presenza di deterioramento cognitivo o depressione¹²⁵, concentrazioni più elevate di inquinanti organici persistenti nel plasma¹²⁶ e la perdita di peso dall'esordio alla diagnosi¹²⁷ sono state tutte suggerite in grado di influenzare negativamente la sopravvivenza dei pazienti affetti da SLA.

Le associazioni di diversi indicatori prognostici con la sopravvivenza della SLA potrebbero essere universali tra i gruppi etnici. Ad esempio, i predittori di sopravvivenza prolungata sono apparsi molto simili quando si confrontano i pazienti SLA cinesi con i pazienti SLA tedeschi¹²⁸. Il tempo mediano di sopravvivenza dei pazienti africani con SLA (14 mesi dalla diagnosi) è risultato essere in accordo con i dati dei pazienti occidentali¹²⁹. Ciò è in contrasto con gli studi precedenti che suggerivano che i pazienti africani con SLA avessero una prognosi migliore rispetto ai pazienti occidentali¹³⁰⁻¹³². La rappresentatività dei pazienti affetti da SLA arruolati in diversi studi potrebbe in varia misura spiegare le differenze osservate di sopravvivenza per etnia. Ad esempio, c'è una chiara predominanza di pazienti maschi (rapporto maschi-femmine 2,9) e giovani nello studio africano¹²⁹.

Tabella II. Fattori prognostici di sopravvivenza per SLA¹³³.

	SOPRAVVIVENZA MAGGIORE	SOPRAVVIVENZA MINORE
CLINICA	Forma ad esordio spinale, variante flail arm; giovane età alla diagnosi	Forma familiare, forma ad esordio bulbare, forma ad esordio respiratorio, SLA associata a FTD; età avanzata alla diagnosi; perdita di peso; bassi livelli sanguigni di colesterolo
FATTORI GENETICI	Mutazioni di SOD1: Glu22Gly, Gly38Arg, Asp91Ala, Gly94Cys e Ile114Thr	Mutazione Ala5V al di SOD1; espansione ripetitiva di C9orf72 or ATXN2; Mutazioni di FUS (associata inoltre a esordio precoce)
FATTORI AMBIENTALI	Nessuno	Basso stato socioeconomico, fumo
TRATTAMENTO	Riluzolo; NIV; nutrizione enterale; inizio precoce di terapia	Carbamazepina, minociclina, pacing diaframmatico; inizio tardivo della terapia

3.1.16 Trattamento e management

Negli ultimi decenni, più di 40 studi controllati randomizzati in pazienti con SLA non hanno mostrato un effetto benefico sulla progressione della malattia o sulla sopravvivenza, illustrando la complessità della malattia¹³⁴. Nella maggior parte dei

paesi europei, il Riluzolo rimane l'unico farmaco modificatore della malattia approvato. Gli effetti collaterali più comuni includono nausea, diarrea, affaticamento, vertigini e problemi al fegato.

Più recentemente, è stato introdotto l'Edaravone. Uno studio di fase III randomizzato in doppio cieco di Edaravone per via endovenosa 60 mg/die per 2 settimane al mese in pazienti SLA selezionati ha mostrato un declino significativamente minore dei punteggi dell'ALSFRS-R dopo 6 mesi di trattamento¹³⁵. Lo studio è stato criticato a causa delle sue ridotte dimensioni, della sua breve durata, della selezione dei pazienti e della mancanza di dati sulla sopravvivenza¹³⁶. Ad oggi, l'edaravone è stato approvato per il trattamento della SLA negli Stati Uniti, Canada, Giappone, Corea del Sud e Svizzera, ma non nell'Unione Europea.

Un'altra terapia in fase di studio è il Masitinib, un inibitore orale della tirosin-chinasi. Uno studio controllato randomizzato che ha utilizzato 4,5 mg/kg/giorno di masitinib come terapia aggiuntiva al riluzolo ha suggerito un effetto positivo sul declino dell'ALSFRS-R, almeno nei pazienti con una tipica progressione della malattia¹³⁷, un effetto che sarà ulteriormente esplorato in uno studio di conferma.

La pietra angolare della gestione della malattia per i pazienti affetti da SLA rimane l'assistenza multidisciplinare, che ha un effetto positivo sulla soddisfazione del paziente e sull'esito. Diversi sintomi fastidiosi della SLA possono essere gestiti con opzioni di trattamento sintomatico, inclusi interventi farmacologici e non farmacologici¹³⁸. Ad esempio, la spasticità può essere trattata con baclofen, tizanidina, cannabinoidi e allungamento muscolare, e la scialorrea può essere trattata con farmaci anticolinergici (amitriptilina, glicopirronio bromuro e ossibutinina) e iniezioni di tossina botulinica nelle ghiandole salivari. I crampi muscolari possono rispondere agli integratori di magnesio, chinino solfato, gabapentin o carbamazepina. Inibitori selettivi della ricaptazione della serotonina, amitriptilina, benzodiazepine e destrometorfano bromidrato/chinidina solfato, possono essere utilizzati in caso di labilità emotiva. I cambiamenti nella dieta possono aiutare a migliorare la nutrizione e l'utilizzo della PEG è un'opzione valida, nel momento in cui l'apporto calorico sia insufficiente o quando la deglutizione

rischi di diventare pericolosa. La logopedia è spesso necessaria e può essere utilizzata anche la comunicazione assistita (tramite software personalizzato).

3.2 PET-RM e PET-TC

Introduzione¹³⁹

La fusione software tra immagini PET e RM è una procedura che si esegue da molti anni: chiaramente, il risultato ottenuto contiene le informazioni complementari e sinergiche di entrambe le tecniche.

D'altro canto, l'applicazione della TC alla PET consente una perfetta correzione dell'attenuazione e una migliore localizzazione delle lesioni rilevate in PET, grazie alla migliore risoluzione del contrasto.

3.2.1 PET

La Tomografia a emissione di Positroni (PET) è una tecnica di imaging funzionale/metabolica non invasiva, basata sulla rilevazione, in coincidenza, dei due fotoni emessi durante il processo di annichilazione di un positrone con un elettrone. Questa tecnica di imaging utilizza come traccianti molecole dotate di attività biologica, marcate con radionuclidi che nel loro decadimento emettono positroni (β^+). Nel decadimento del radioisotopo che marca la biomolecola è emesso un positrone che, dopo aver percorso un piccolo tratto ("positron range", nell'ordine del millimetro per il [18F]FDG) nel tessuto, annichila con un elettrone, emettendo radiazioni γ sotto forma di due fotoni da 511 keV con direzioni opposte. La distribuzione delle molecole di tracciante emittenti i positroni può essere quindi tradotta in un'immagine ad alta sensibilità tramite tomografo PET. Quest'ultimo consiste in un sistema di rilevatori contrapposti localizzati attorno al paziente, ed è costituito da cristalli scintillatori e fotomoltiplicatori (PMTs) che rilevano e amplificano l'arrivo di fotoni di coincidenza convertendoli in segnali elettrici, poi elaborati per ricostruire le immagini PET.

Nel caso dello studio del metabolismo glucidico, il radiotracciante utilizzato è il fluoro-desossi-glucosio, o FDG, un analogo della molecola del glucosio in cui il secondo gruppo ossidrilico è sostituito da un atomo instabile di fluoro [18F]. Il

[18F]FDG si accumula nello spazio intracellulare in modo proporzionale al fabbisogno cellulare metabolico glucidico¹⁴⁰.

3.2.2 RM

Negli ultimi tre decenni, la risonanza magnetica è diventata una modalità di imaging ampiamente disponibile e utilizzata, sia nella ricerca che nell'imaging clinico. L'imaging RM, in sostanza, funziona attraverso l'applicazione di onde di radiofrequenza e campi magnetici. Il principio guida della moderna risonanza magnetica si basa sull'utilizzo delle proprietà magnetiche dei nuclei di idrogeno all'interno delle molecole d'acqua, che fortunatamente compongono la maggior parte delle molecole all'interno di vari compartimenti tissutali nel corpo umano. Il segnale MRI è essenzialmente generato dall'abile manipolazione del momento magnetico di un protone, con cicli alternati di eccitazione e rilassamento causati da campi magnetici esterni e potenza a radiofrequenza applicata, che producono tutti un piccolo segnale rilevabile all'esterno del corpo. Fortunatamente, tessuti diversi hanno proprietà di eccitazione e rilassamento leggermente diverse, pertanto gli ingegneri hanno capito come amplificare questo segnale e creare "immagini parametriche" di queste proprietà¹⁴⁰.

Con la risonanza magnetica è possibile rilevare minuscole differenze di contrasto dei tessuti molli in una varietà di campi visivi (FOV) piccoli o grandi manipolando l'ambiente del campo magnetico all'interno dello scanner e studiando le proprietà di rilassamento T1 e T2 dell'atomo di idrogeno all'interno delle molecole d'acqua. Spesso, agenti di contrasto endovenosi che influenzano le proprietà magnetiche dei tessuti vengono utilizzati per studiare le caratteristiche di potenziamento della patologia sia negli spazi intra che extracellulari.

Hybrid PET/TC

Sebbene la PET con FDG abbia mostrato una sensibilità ottima nel dimostrare l'attività biologica di un tumore, ha denotato spesso grandi difficoltà nel fornire informazioni sulla posizione e le dimensioni esatte della neoplasia^{141,142}. Inoltre, poiché l'FDG è un analogo del glucosio, c'era un'elevata imprecisione rispetto alla valutazione se una particolare regione di assorbimento sulla scansione fosse una variante anatomica (es. grasso bruno), un assorbimento fisiologico (es. intestino),

un artefatto della scansione (es. contaminazione della pelle), oppure una vera e propria patologia sottostante (es. tumore). Da questa esigenza, è nata l'idea di una TC di accompagnamento con correzione dell'attenuazione (o ACCT) che potesse essere sovrapposta all'immagine PET. ACCT, sostanzialmente, è una mappa di trasmissione TC a basso dosaggio, il cui scopo principale è correggere l'attenuazione tissutale.

Tale sistema ha mostrato una precisione relativamente buona nel neuroimaging, tuttavia la retrofusione in due tempi separati delle scansioni PET con la TC e la RM (specialmente nel torace, addome e pelvi) è risultata spesso inesatta, a causa di artefatti dovuti al diverso posizionamento del paziente, a un suo movimento, alla respirazione, al cambiamento temporale dei visceri e al movimento degli organi.

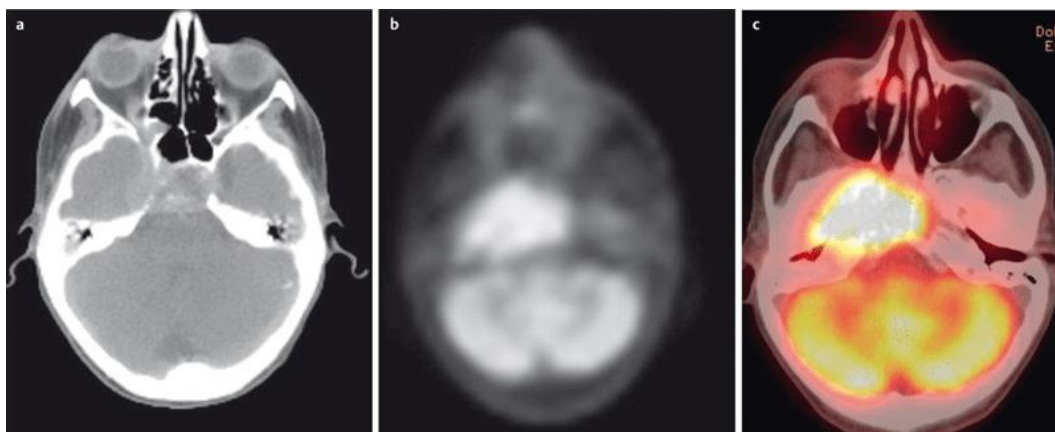


Figura 6¹⁴³. Fusione di immagini PET e RM.

Hybrid PET/RM¹⁴⁰

A differenza della PET/TC, la creazione di una PET ibrida e di una risonanza magnetica si è rivelata una sfida tecnica difficile. In passato, le macchine PET e MRI erano virtualmente esclusive l'una dell'altra per un importante motivo: il problema fondamentale con la realizzazione di una macchina ibrida è l'incompatibilità del forte campo magnetico dello scanner MRI con i tubi fotomoltiplicatori in uno scanner PET. Il tubo fotomoltiplicatore, accoppiato con gli scintillatori, è il mezzo più sensibile per rilevare i fotoni γ ed era una tecnologia onnipresente nella progettazione di scanner PET.

Sono state quindi proposte varie soluzioni: ad esempio, mantenere la PET e la RM sufficientemente separate per evitare diafonia e interferenza di segnale. Si tratta essenzialmente di due risorse separate alloggiare in stanze adiacenti con un tavolo paziente comune che può essere agganciato a ciascuno dei sistemi PET/TC e MRI¹⁴⁴. Il paziente può essere quindi scansionato sullo scanner PET/TC e portato tramite carrello allo scanner MRI situato in una stanza adiacente senza cambiare posizione, con fusione di immagini di tutto il corpo post-scansione di PET, TC e MRI.

Un altro progetto ha cercato di aggirare il problema dell'incompatibilità fotomoltiplicatore/RM interrompendo il campo magnetico durante l'acquisizione PET¹⁴⁵. Lo svantaggio di quel progetto era che il campo magnetico utilizzato era relativamente debole. La soluzione che alla fine ha avuto successo è stata quella di eliminare del tutto i tubi fotomoltiplicatori e sostituirli con fotorivelatori basati su fotodiodo a valanga (APD), unità semiconduttrici compatibili con la RM che tollerano forti campi magnetici.

Per ottenere la migliore qualità possibile e consentire la quantificazione delle immagini PET, è necessario eliminare o controllare l'artefatto più importante che si potrebbe presentare, ossia l'attenuazione. La correzione dell'attenuazione è semplice in PET/TC, poiché è facile convertire i dati di attenuazione dei raggi X in mappe di attenuazione dei fotoni da 511 KeV della radiazione di annichilazione PET. Con la RM, invece, la correzione dell'attenuazione è più complessa¹³⁹.

Vantaggi della PET/RM

Il primo e più importante vantaggio della PET/RM rispetto alla PET/TC è la significativa riduzione dell'esposizione alle radiazioni ionizzanti, che deriva dalla sostituzione della TC con la RM. Questa riduzione può arrivare fino all'80%, il che rende la PET/RM la tecnica di scelta in oncologia pediatrica¹⁴⁶. La PET/RM è l'unica tecnica multimodale veramente simultanea, poiché l'acquisizione dei dati da entrambe le modalità avviene contemporaneamente e quindi nella stessa posizione del paziente. Acquisisce perciò molta importanza nelle piccole lesioni, ma anche quando si esegue la segmentazione in RM e si trasferiscono alla PET i volumi o le aree di interesse. In questo modo è possibile misurare i biomarcatori

PET in strutture anatomiche molto piccole e difficili da identificare nelle immagini PET, e ricercare relazioni e differenze tra biomarcatori PET e RM funzionale.

La risonanza magnetica offre una risoluzione del contrasto e una capacità di differenziazione dei tessuti molto più elevate rispetto alla TC. Questo a volte consente una diagnosi precoce della patologia rispetto alla TC, diagnosi più accurate e una migliore differenziazione tra i vari tessuti sani e patologici. Si può dedurre che se la RM è superiore alla TC, allora anche la PET/RM è superiore alla PET/TC¹⁴⁷.

La risonanza magnetica offre una grande ricchezza e diversità di sequenze, che consentono di affinare e personalizzare la diagnosi e la prognosi e valutare la risposta alla terapia, comprese le sequenze RM di diffusione e perfusione. Lo stesso vale per la PET con i suoi biomarcatori, come il valore di assorbimento standardizzato nelle sue varie varianti, i volumi metabolici, il tasso glicolitico, i parametri di consistenza ed eterogeneità, etc...

Indicazioni

In generale le indicazioni alla PET/RM sono le stesse della PET/TC (con eccezione, per ora, del comparto polmonare), in particolar modo nei settori dell'oncologia, delle neuroscienze e della cardiologia. Hanno un ruolo, inoltre, anche nella valutazione delle patologie infiammatorio-infettive sistemiche di difficile gestione clinica. In tutti questi campi, la PET/RM dovrebbe essere la tecnica di scelta per ridurre l'esposizione alle radiazioni ionizzanti¹⁴⁶. Nella comprensione della fisiologia del cervello e nella diagnosi delle malattie del sistema nervoso centrale, la PET/RM offre numerosi vantaggi, specialmente nella demenza, nelle malattie neurodegenerative¹⁴⁸ e nei tumori cerebrali¹⁴⁹.

Limitazioni della PET/RM

Lo studio PET/RM è più lungo dello studio PET/TC, quindi la performance in termini di "numero di studi/giorno" è inferiore. Poiché anche il prezzo dell'apparecchiatura PET/RM è superiore a quello della PET/TC, l'allocazione dei costi per ogni studio è molto più elevata, il che rende necessario ottimizzare i vari

protocolli di studio in ogni situazione clinica, in particolare quelli della componente RM per evitare di allungare inutilmente lo studio¹⁵⁰⁻¹⁵².

Infine, va ricordato che la PET/RM ha le stesse controindicazioni e limitazioni della RM (dispositivi metallici incompatibili con il campo magnetico, claustrofobia) e della PET (gravidanza, allattamento).

3.3 METABOLISMO DEL SNC NELLA SLA

Un recente studio¹⁵³, condotto presso l'università di Padova, ha avuto il primato di essere stato il primo a sfruttare la [18F]FDG PET/MRI per studiare i modelli metabolici dei pazienti con SLA e FTD. In tale studio si è segnalata l'importanza della risonanza magnetica, potenzialmente utile per differenziare i soggetti SLA da soggetti FTD-MND, in quanto le iperintensità del tratto corticospinale sembrano essere più frequenti nel primo gruppo (40% contro 8% del secondo gruppo). Si è anche rilevato un aumento della captazione del mesencefalo/ponte e del midollo allungato nei pazienti rispetto ai controlli, confermando i precedenti studi sull'argomento^{154,155}.

Teoricamente, l'effetto atteso di una malattia neurodegenerativa è una riduzione del tasso metabolico tissutale, causata dalla perdita neuronale; infatti, l'ipometabolismo frontale è una delle firme corticali delle malattie dello spettro ALS/FTD¹⁵⁶⁻¹⁵⁸. Tuttavia, è stata portata una forte evidenza a favore della neuroinfiammazione come uno dei passaggi chiave nella cascata patogena che porta alla SLA/FTD. Inizialmente descritta in studi patologici, l'infiltrazione gliale è stata successivamente confermata in vivo sia nei modelli che nell'uomo^{159,160}.

Una possibile spiegazione, che collega la neuroinfiammazione alla neurodegenerazione, coinvolge due tipi di cellule gliali, ossia la microglia attivata e gli astrociti. Le microglie attivate, che sono state trovate nella corteccia motoria, nel ponte e nel talamo di pazienti affetti da SLA, contribuiscono alla patogenesi propagando e sostenendo il danno tissutale attraverso il rilascio di radicali liberi e altre sostanze neurotossiche come il glutammato. Gli astrociti, invece, rappresentano fisiologicamente una quota consistente del consumo di glucosio del sistema nervoso centrale. Successivamente, iniziano la glicolisi per fornire lattato ai neuroni; di fatto, gli astrociti svolgono un ruolo chiave nell'accoppiare il

metabolismo del glucosio con l'attività sinaptica. Inoltre, durante il decorso della malattia, gli astrociti sostituiscono i neuroni e gli assoni degenerati seguendo i tratti corticospinale e corticobulbare, aumentando ulteriormente l'assorbimento metabolico della regione degenerativa del cervello.

Dal punto di vista metabolico, questi fenomeni si traducono in un aumento relativo dell'assorbimento di [18F]FDG nelle regioni di degenerazione neuronale negli individui affetti rispetto ai controlli. Tuttavia, quando si valuta il peso relativo dei due tipi cellulari si deve considerare che la microglia sembra essere più correlata alle aree ipometaboliche, come mostrato nelle aree frontotemporale dei pazienti con FTD^{160,161}, mentre l'astrocitosi guida il consumo di glucosio ed è, quindi, più probabilmente associato al carico ipermetabolico¹⁶².

4 SCOPO DELLO STUDIO

Al momento dello studio la ricerca nel campo della sclerosi laterale amiotrofica (SLA) è in continua evoluzione, al fine di individuare nuovi biomarker dotati di potenziale diagnostico, validità prognostica e che apportino nuove conoscenze sulla fisiopatologia alla base della malattia.

Lo scopo del presente studio è valutare se sia presente una correlazione tra l'aumento della concentrazione di due biomarker (Neurofilamenti e Chitinasi) nel liquor e l'aumento del SUV (Standardized Uptake Value) ratio a livello di regioni quali midollo allungato, ponte e mesencefalo. È previsto l'utilizzo della tecnica ibrida PET-RMN con tracciante [18F]FDG in un gruppo di pazienti affetti da SLA, seguiti all'Ambulatorio per le Malattie del Motoneurone dell'Azienda Ospedaliera di Padova.

In particolare, in questo studio sono stati esaminati midollo allungato, ponte e mesencefalo, che secondo la letteratura più recente presentano nei pazienti affetti da SLA un pattern di ipermetabolismo rispetto ai controlli sani, evidenziandone un certo potenziale come nuovo marcatore strumentale di malattia.

Dei soggetti in esame in questo studio sono stati indagati la storia clinica, i parametri clinici e i parametri strumentali, al fine di indagare la relazione che intercorre tra i valori di neurochitinasi e filamenti e il valore del SUV nelle zone studiate.

5 MATERIALI E METODI

5.1 POPOLAZIONE DELLO STUDIO

Per lo studio si è ricercata una popolazione di pazienti con diagnosi di SLA che siano stati sottoposti ad una PET-RMN cerebrale con tracciante [18F]FDG, nonché a una rachicentesi (mandatoria per ottenere le concentrazioni di chitinasi e neurofilamenti).

È stata considerata una popolazione finale di 25 soggetti.

Tutti i pazienti reclutati sono stati sottoposti ad una PET-RMN cerebrale con FDG tramite tomografo integrato Siemens Healthcare Biograph mMR, nel periodo tra 2017 e 2021. Lo stato funzionale dei pazienti è stato valutato tramite lo score ALSFRS-R. I pazienti inclusi nello studio sono 13 maschi e 12 femmine. L'età media dei pazienti al momento dell'esame era di circa 65 anni. Ulteriori dati clinici considerati sono stati:

- Età di esordio della malattia
- Età alla diagnosi
- ALSFRS-R alla diagnosi
- Età al momento della PET-RMN
- ALSFRS-R al momento della PET-RMN
- Tabagismo
- Familiarità per SLA, demenza, malattia di Parkinson o patologie psichiatriche
- Mutazioni genetiche (specialmente dei geni C9orf72, SOD1, TARDBP, FUS, VCP)
- Trattamento farmacologico
- Durata del follow-up
- ALSFRS-R al follow-up
- Sopravvivenza al follow-up

I dati sono stati anonimizzati tramite il sistema 'DICOM Anonymizer'.

5.2 DATI PET-RMN

5.2.1 Protocollo di acquisizione PET- RMN

L'esame è stato eseguito seguendo il protocollo per l'acquisizione di immagini cerebrali tramite PET con FDG descritto nelle linee guida dell'European Association of Nuclear Medicine (EANM). I pazienti hanno dovuto osservare precedentemente all'esame un digiuno di almeno 4h. Il livello sierico di glucosio è stato testato prima di eseguire l'esame per assicurare che il valore fosse inferiore a 160 mg/dl. Al paziente disteso è stata data l'indicazione di non muoversi o parlare. È stato quindi somministrato un bolo endovenoso di tracciante [18F]FDG (in dose 3 MBq/kg di peso corporeo). È stato acquisito dopo circa 60 minuti dalla somministrazione del tracciante uno scan in 3D usando un tomografo PET-RMN integrato Siemens Healthcare Biograph mMR, dotato di un campo magnetico principale di 3 Tesla.

5.2.2 Elaborazione e analisi delle immagini

Successivamente all'acquisizione, le immagini PET-RMN vengono elaborate dal software dedicato syngo.via collegato al sistema Biograph mMR.

Tutte le immagini sono state salvate con il protocollo DICOM.

È stato creato nel software PMOD un database anonimizzato contenente gli studi RMN T1 e PET UTE AC (Ultrashort Echo Time-based Attenuation Correction) di pazienti e controlli.

In modalità 'Image Fusion' di PMOD, per ogni soggetto dello studio è stata selezionata la RMN T1 come studio di riferimento (studio 'Reference'); la PET UTE AC (selezionata come studio 'Reslice') è stata quindi adattata all'immagine di riferimento per quanto riguarda dimensione dei pixel e spessore delle sezioni tomografiche, in un processo detto di 'reslice'. Come risultato di questo processo i due studi hanno ottenuto una risoluzione identica ed è stato possibile quindi generare immagini riallineate.

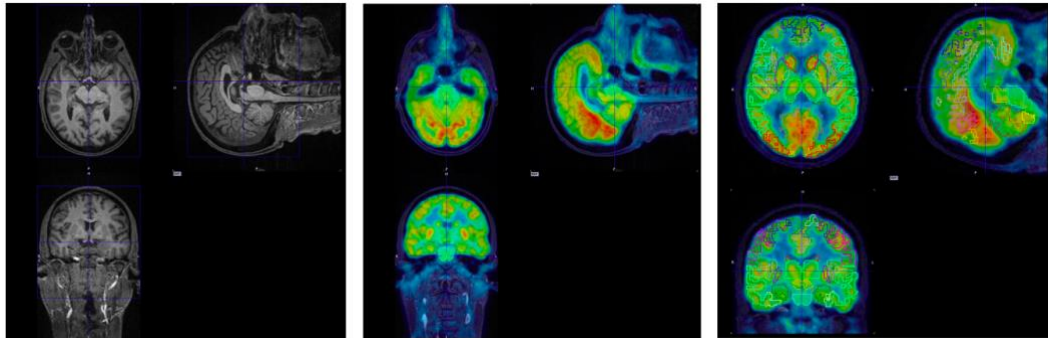


Figura 7. Fusione di una scansione PET e RM mediante software PMOD (da sinistra: RM; PET; PET con segmentazione).

In seguito, si è passati alla modalità di utilizzo di PMOD ‘View’. A partire dall’immagine RMN T1, che permette una migliore visualizzazione delle strutture anatomiche, sono state create e posizionate VOI (Volume of Interest), poi visualizzate alla PET riallineata alla RMN T1 per poter ricavare le informazioni metaboliche delle aree definite dalle VOI. Lo scopo principale di un’analisi tramite VOI è di calcolare la distribuzione dei valori dei pixel contenuti nella struttura tissutale delineata. Le VOI sono state inizialmente create da un utente non esperto, ed un utente esperto (medico di medicina nucleare) ne ha successivamente confermato il corretto posizionamento.

Una volta definite le VOI, i dati da esse ricavati possono essere usati per analizzare la distribuzione dei valori dei pixel contenuti nella VOI. Come metodo di calcolo è stato utilizzato Pixel Dump. Quest’ultimo permette di estrarre i valori dei pixel delle VOI di una determinata immagine PET riallineata alla RMN (in questo caso VOI nel ponte - P, VOI nel midollo spinale cervicale - L e VOI nei tessuti molli cervicali - G) e li salva assieme alle coordinate dei pixel in un file. Questa procedura fornisce i dati grezzi con cui fare l’analisi statistica. I dati di distribuzione dei valori dei pixel nelle VOI contenuti nei file possono essere visualizzati tramite due grafici, un istogramma o un grafico Kernel Density.

5.3 ANALISI DEL LIQUIDO CEFALORACHIDIANO

Un campione di liquido cefalorachidiano è stato prelevato per ciascun paziente tramite rachicentesi, tra aprile 2017 e maggio 2021. Su questi campioni sono stati poi eseguiti il test ELISA e il metodo commerciale immunometrico in chemiluminescenza.

5.3.1 Tecnica ELISA per la ricerca delle chitinasi

Il kit ELISA Circulex Human Chitotriosidase e Circulex Human YKL-39 della MBL Research Product è progettato per misurare la concentrazione di chitotriosidasi e YKL-39 umana nel liquido cefalorachidiano. Utilizzando la tecnica di dosaggio immunoenzimatico quantitativo a sandwich, un anticorpo specifico per la chitinasi viene pre-rivestito su una micropiastra. Gli standard e i campioni vengono pipettati nei pozzetti, dove l'anticorpo immobilizzato lega qualsiasi chitinasi umana presente. Dopo il lavaggio per rimuovere le sostanze non legate, viene aggiunto un anticorpo coniugato con HRP specifico per la chitotriosidasi o YKL-39 umana. Dopo un ulteriore lavaggio, il coniugato rimanente reagisce con un substrato H₂O₂-tetrametilbenzidina. La reazione viene fermata con una soluzione acida e l'assorbanza del prodotto giallo risultante viene misurata a 450 nm. L'assorbanza è proporzionale alla concentrazione di chitinasi. Una curva standard viene costruita tracciando i valori di assorbanza rispetto alle concentrazioni di chitinasi umane dei calibratori, e le concentrazioni dei campioni sconosciuti vengono determinate utilizzando questa curva standard.

Il procedimento per i kit Circulex Human Chitotriosidase e Circulex Human YKL-39 è simile, ma la diluizione dei campioni è diversa. Per la Chitotriosidase, i campioni vengono diluiti 1:5 con il Dilution Buffer, mentre per la YKL-39 la diluizione è 1:25 con il Dilution Buffer appropriato.

Nel procedimento specifico per il kit Human Chitotriosidase MBL, il kit viene portato a temperatura ambiente e i campioni vengono diluiti 1:5 con il Dilution Buffer. Lo Human Chitotriosidase Standard viene ricostituito e la curva standard viene preparata. Vengono pipettati standard, dilution buffer e campioni diluiti in duplicato e l'incubazione avviene a temperatura ambiente per 60 minuti con agitazione. Successivamente, si effettuano quattro lavaggi con il Wash Buffer, si aggiunge il coniugato e si incuba nuovamente a temperatura ambiente per 60 minuti con agitazione. Dopo altri quattro lavaggi con il Wash Buffer, si aggiunge il substrato e si incuba a temperatura ambiente per 10-20 minuti, proteggendo la piastra dalla luce solare diretta. Infine, si aggiunge la soluzione di stop e si misura l'assorbanza a 450 nm entro 30 minuti dall'aggiunta della soluzione di stop.

5.3.2 Tecnica ELISA per la ricerca dei neurofilamenti

Il test NF-light di UmanDiagnostics è un test immunoenzimatico utilizzato per misurare quantitativamente il livello di NF-L (neurofilamenti leggeri) nel liquido cerebrospinale umano. Il test impiega due anticorpi monoclonali altamente specifici per rilevare e quantificare il NF-L. L'analisi viene eseguita tramite una reazione enzimatica che trasforma un substrato incolore in un prodotto colorato, proporzionale alla quantità di NF-L presente nel campione. Il range di misura del test è compreso tra 100 pg/mL e 10000 pg/mL, con un limite di rilevamento di 33 pg/mL. Il test ha una precisione elevata, con un coefficiente di variazione inferiore al 5% all'interno del singolo saggio e inferiore al 10% tra saggi differenti. Il tempo di incubazione richiesto è di 2,5 ore e il volume di campione necessario è di 50 µL per replica. Il procedimento del test prevede la preparazione del tampone di lavaggio, la ricostituzione dei punti standard, la diluizione dei campioni di liquido cerebrospinale e l'aggiunta dei reagenti nei pozzetti della piastra. Dopo le opportune fasi di incubazione e lavaggio, viene misurata l'assorbanza a 450 nm per determinare la concentrazione di NF-L nel campione.

5.3.3 Metodo immunometrico in chemiluminescenza

Sono stati utilizzati metodi commerciali immunometrici in chemiluminescenza completamente automatizzati per misurare IL-6 e TNF- α nel liquido cefalorachidiano: nel procedimento, il campione viene miscelato con un anticorpo monoclonale marcato e con microsferi ricoperte da un anticorpo monoclonale. Questa reazione a sandwich forma complessi che vengono successivamente precipitati in un campo magnetico, inoltre la concentrazione dell'analita è direttamente correlata al segnale luminoso misurato dopo lo sviluppo di una reazione chemiluminescente. Sebbene i test siano destinati all'uso su siero o plasma, esperimenti preliminari hanno dimostrato risultati soddisfacenti utilizzando il liquido cefalorachidiano come matrice non validata. I valori di riferimento per una popolazione sana indicati dai produttori sono ≤ 7 ng/l per IL-6 e $\leq 8,1$ ng/l per TNF- α .

5.4 ANALISI STATISTICA

I coefficienti di correlazione sono tra gli strumenti statistici più noti e utilizzati, tuttavia la scelta di un coefficiente adeguato non è sempre facile da attuare.

L'indice di correlazione di Pearson e il coefficiente di correlazione di Spearman sono entrambi misure statistiche utilizzate per valutare la relazione tra due variabili. Tuttavia, differiscono nella loro applicazione e nell'interpretazione dei dati.

L'indice di correlazione di Pearson, indicato come "r", misura la forza e la direzione della relazione lineare tra due variabili continue. È basato sulla covarianza tra le variabili divisa per il prodotto dei loro scarti standard. Il coefficiente di Pearson può variare da -1 a +1, dove +1 indica una correlazione positiva perfetta, -1 indica una correlazione negativa perfetta e 0 indica assenza di correlazione. La correlazione di Pearson è sensibile solo alle relazioni lineari e assume che le variabili seguano una distribuzione normale.

D'altra parte, il coefficiente di correlazione di Spearman, indicato come " ρ " (rho), misura la relazione monotona tra due variabili ordinali o basate su ranghi. Invece di utilizzare i valori effettivi delle variabili, calcola la correlazione tra i loro ranghi. Il coefficiente di Spearman può variare da -1 a +1, dove +1 indica una correlazione monotona positiva perfetta, -1 indica una correlazione monotona negativa perfetta e 0 indica assenza di correlazione monotona.

Le differenze principali sono le seguenti:

- Tipo di dati: Il coefficiente di Pearson è adatto per dati continui, mentre il coefficiente di Spearman è adatto per dati ordinali o basati su ranghi.
- Tipo di relazione: Il coefficiente di Pearson misura la correlazione lineare, mentre il coefficiente di Spearman misura la correlazione monotona (includendo sia la correlazione lineare che la correlazione non lineare monotona).
- Sensibilità ai valori anomali: Il coefficiente di Pearson è sensibile ai valori anomali, poiché si basa su una misura di covarianza che può essere influenzata da valori estremi. Il coefficiente di Spearman è meno influenzato dai valori anomali perché si basa sui ranghi delle variabili.

In generale, entrambi i coefficienti di correlazione sono utili strumenti statistici per valutare la relazione tra le variabili, ma la scelta tra il coefficiente di Pearson e il coefficiente di Spearman dipende dal tipo di dati e dalla natura della relazione tra le variabili.

6 RISULTATI

I dati grezzi ottenuti sono stati normalizzati per la sostanza bianca occipitale di ogni paziente, attraverso la definizione di una VOI in quest'area e rapportandone il SUVmean con i SUV ottenuti dalle VOI delle altre zone cerebrali prese in esame.

Le aree cerebrali sono state esaminate bilateralmente e sono: il giro precentrale, l'opercolo rolandico, l'area supplementare motoria, la corteccia olfattoria, il giro frontale superiore, medio ed inferiore, la circonvoluzione retta, il lobo dell'insula, il cingolo anteriore, medio e posteriore, la formazione dell'ippocampo e il giro paraippocampale, l'amigdala, il solco calcarino, il cuneo, la lingua, il lobo occipitale, la circonvoluzione fusiforme, la circonvoluzione postcentrale, la circonvoluzione sopramarginale, la circonvoluzione angolare, il precuneo, il lobulo paracentrale, i nuclei caudati, il putamen, il globo pallido, il talamo, le circonvoluzioni di Heschl, il lobo parietale, il lobo temporale, il verme, il crus cerebri, il cervelletto, il midollo allungato, il mesencefalo ed il ponte.

I valori normalizzati ottenuti sono riportati in tabella III.

	PAT001	PAT002	PAT003	PAT004	PAT005	PAT006	PAT007	PAT008	PAT009	PAT010	PAT011	PAT012	PAT013	PAT014	PAT015	PAT016	PAT017	PAT018	PAT019	PAT020	PAT021	PAT022	PAT023	PAT024	PAT025
Precentral_I	2,43	2,24	2,26	2,76	2,52	2,53	2,54	2,46	2,19	2,46	2,3	2,92	2,75	2,36	2,47	2,38	2,67	2,21	1,92	2,27	2,54	2,3	2,35	2,32	2,53
Precentral_r	2,53	2,15	2,33	2,89	2,61	2,46	2,44	2,57	2,49	2,55	2,29	2,94	2,96	2,5	2,44	2,43	2,88	2,4	1,8	2,16	2,49	2,42	2,7	2,4	2,54
Rolandic_Oper_I	2,33	2,36	2,39	2,39	2,31	2,43	2,24	2,49	2,58	2,35	2,22	2,79	2,54	2,2	2,33	2,53	2,27	2,55	1,98	2,01	2,31	2,5	2,58	2,26	2,29
Rolandic_Oper_r	2,45	2,15	2,56	2,64	2,55	2,79	2,26	2,54	2,84	2,34	2,25	2,98	2,84	2,41	2,36	2,69	2,59	2,41	1,89	2,11	2,26	2,65	3,02	2,29	2,35
Supp_Motor_Area_I	2,47	2,14	2,33	3,37	2,6	2,46	2,61	2,57	2,48	2,45	2,32	3,16	2,91	2,41	2,48	2,33	2,75	2,28	2,12	2,31	2,67	2,45	2,84	2,43	2,7
Supp_Motor_Area_r	2,39	2,07	2,31	3,22	2,63	2,42	2,53	2,54	2,48	2,5	2,34	3,24	2,75	2,49	2,44	2,51	2,86	2,4	2,27	2,22	2,61	2,4	2,94	2,36	2,6
Olfactory_I	2,2	2,13	1,96	2,28	2,31	2,47	2,21	2,34	1,68	2,39	2,24	2,53	2,21	2,09	2,44	2,14	2,35	2,12	2,18	2,06	2,27	2,12	1,66	2,07	2,32
Olfactory_r	2,25	1,97	1,9	2,31	2,11	2,56	2,21	2,25	1,84	2,27	2,24	2,61	2,21	2,06	2,41	2,17	2,15	2,28	2,01	2,08	2,32	2,19	1,61	2,05	2,39
Frontal_Sup_I	2,3	2,19	2,14	3,01	2,37	2,56	2,53	2,52	2,16	2,52	2,44	3,06	2,84	2,33	2,62	2,21	2,59	2,27	2,21	2,24	2,56	2,57	2,32	2,35	2,65
Frontal_Sup_r	2,45	1,96	2,32	3,2	2,39	2,58	2,51	2,48	2,38	2,58	2,44	3,07	2,9	2,45	2,51	2,32	2,58	2,26	2,12	2,22	2,57	2,6	2,38	2,4	2,64
Frontal_Mid_I	2,54	2,32	2,26	3,1	2,47	2,82	2,65	2,64	2,21	2,69	2,53	3,16	2,85	2,42	2,76	2,29	2,81	2,43	2,28	2,44	2,67	2,67	2,42	2,44	2,8
Frontal_Mid_r	2,56	2,09	2,26	3,39	2,57	2,85	2,65	2,65	2,41	2,75	2,6	3,2	3,04	2,58	2,73	2,35	2,8	2,48	2,19	2,35	2,62	2,77	2,44	2,58	2,78
Frontal_Inf_I	2,41	2,08	2,22	2,85	2,38	2,88	2,61	2,54	2,01	2,64	2,51	2,91	2,83	2,29	2,64	2,38	2,56	2,27	2,17	2,36	2,6	2,71	2,25	2,33	2,7
Frontal_Inf_r	2,45	1,83	2,16	3,23	2,55	2,97	2,7	2,63	2,26	2,74	2,61	3,08	3,02	2,46	2,69	2,31	2,71	2,44	2,09	2,39	2,65	2,8	2,4	2,5	2,71
Rectus_I	2,55	2,23	2,33	2,99	2,62	2,83	2,69	2,7	2,44	2,84	2,68	3,11	2,58	2,38	2,9	2,44	2,66	2,55	2,31	2,45	2,63	2,87	1,99	2,35	2,76
Rectus_r	2,42	2,11	2,25	2,89	2,44	2,87	2,6	2,7	2,49	2,69	2,55	3,05	2,65	2,31	2,79	2,49	2,64	2,88	2,29	2,41	2,6	2,8	1,85	2,21	2,69
Insula_I	2,17	2,1	2,23	2,48	2,25	2,66	2,3	2,51	2,19	2,45	2,33	2,64	2,54	2,12	2,54	2,24	2,27	2,3	1,98	2,18	2,41	2,4	2,26	2,18	2,52
Insula_r	2,41	1,86	2,26	2,61	2,47	2,94	2,43	2,5	2,38	2,62	2,48	2,84	2,6	2,34	2,63	2,34	2,38	2,41	1,95	2,27	2,5	2,63	2,22	2,42	2,61
Cingulum_Ant_I	2,3	2	2,06	2,66	2,42	2,59	2,43	2,38	2,07	2,58	2,55	2,66	2,37	2,14	2,67	2,06	2,38	1,65	2,09	2,28	2,4	2,31	1,68	2,33	2,6
Cingulum_Ant_r	1,99	1,84	1,78	2,61	2,47	2,56	2,49	2,43	2	2,36	2,41	2,87	2,38	2,1	2,64	2,11	2,38	2,19	2,07	2,22	2,5	2,23	1,65	2,33	2,54
Cingulum_Mid_I	2,78	2,43	2,64	3,15	2,85	2,95	2,84	2,69	2,67	2,75	2,77	3,34	2,99	2,57	2,89	2,37	2,81	2,73	2,2	2,45	2,83	2,92	2,46	2,56	2,91
Cingulum_Mid_r	2,56	2,3	2,41	3,09	2,85	3	2,82	2,71	2,68	2,81	2,89	3,48	3,01	2,56	2,93	2,51	2,79	2,62	2,22	2,5	2,91	2,8	2,11	2,69	2,89
Cingulum_Post_I	3,36	3,04	2,55	3,77	3,11	3,63	3,45	3,24	3,45	3,62	3,27	3,98	3,47	3,2	3,6	2,64	3,38	3,6	2,77	3,05	3,64	3,42	3,23	3	3,81
Cingulum_Post_r	2,89	2,73	2,38	3,52	3,14	3,5	3,32	3,2	3,46	3,35	3,1	3,99	3,2	3	3,4	2,73	3,17	2,64	2,55	2,88	3,53	3,41	3,49	2,87	3,69
Hippo_Parahippo_I	1,83	1,78	1,78	1,98	1,92	1,97	1,88	2,1	1,97	1,88	1,89	2,17	1,89	1,76	2	1,88	1,75	2,05	1,57	1,71	1,83	2	1,99	1,76	1,94
Hippo_Parahippo_r	1,99	1,63	1,84	2,08	1,93	2	1,89	2,18	2,22	1,93	1,89	2,25	2	1,85	2,01	1,92	1,69	2,06	1,57	1,73	1,84	2,07	1,96	1,77	1,9
Amygdala_I	1,9	1,61	1,77	2,01	1,76	1,98	1,89	2,07	1,74	1,87	1,94	1,96	1,7	1,68	2,01	1,83	1,76	2,04	1,73	1,79	1,69	1,96	2,79	1,74	1,98
Amygdala_r	1,78	1,46	1,64	1,95	1,74	1,91	1,83	1,95	1,86	1,73	1,89	1,95	1,61	1,59	2,01	1,68	1,71	1,83	1,54	1,79	1,63	1,71	2,76	1,68	1,84
Calcaine_I	3,08	2,74	2,56	3,09	3,01	3,13	2,85	3	2,93	3,22	2,82	3,13	3,04	2,66	2,74	2,74	2,86	2,65	2,53	2,56	2,78	2,85	2,75	2,87	3,06
Calcaine_r	2,95	2,8	2,6	3,08	2,84	3,05	2,73	3,14	3,04	3,25	2,72	3,08	2,89	2,63	2,67	2,76	2,79	2,41	2,51	2,48	2,73	2,76	2,82	2,77	3,06
Cuneus_I	2,76	2,44	2,36	2,71	3,01	3,03	2,63	2,62	3,08	2,67	2,57	3,12	3,27	2,51	2,61	2,71	3,01	2,41	2,18	2,39	2,54	2,65	3,43	2,59	2,94
Cuneus_r	2,64	2,32	2,37	2,53	2,74	2,95	2,51	2,66	2,83	2,62	2,37	2,82	2,94	2,34	2,5	2,59	2,84	2,5	2,24	2,1	2,42	2,36	3,05	2,28	2,8
Lingual_I	2,82	2,68	2,43	2,93	2,93	2,94	2,76	3,07	2,8	2,88	2,79	3,28	2,85	2,6	2,75	2,77	2,84	2,69	2,3	2,43	2,6	2,64	2,51	2,59	2,84
Lingual_r	2,86	2,7	2,39	2,83	2,87	2,97	2,7	2,96	2,62	2,91	2,76	3,24	2,78	2,6	2,74	2,76	2,74	2,82	2,33	2,51	2,56	2,66	2,63	2,55	2,76

Tabella III. Valori dei SUV delle aree cerebrali prese in esame normalizzati per la sostanza bianca occipitale di ogni paziente.

	PAT001	PAT002	PAT003	PAT004	PAT005	PAT006	PAT007	PAT008	PAT009	PAT010	PAT011	PAT012	PAT013	PAT014	PAT015	PAT016	PAT017	PAT018	PAT019	PAT020	PAT021	PAT022	PAT023	PAT024	PAT025	
Occipital_l	2.48	2.26	2.04	2.49	2.63	2.69	2.3	2.45	2.57	2.35	2.31	2.87	2.79	2.3	2.39	2.52	2.63	2.36	2.23	2.05	2.32	2.33	2.22	2.24	2.43	
Occipital_r	2.45	2.21	2.15	2.5	2.68	2.71	2.39	2.44	2.55	2.32	2.31	3.05	2.9	2.46	2.4	2.44	2.63	1.87	2.2	2.09	2.36	2.19	2.16	2.29	2.46	
Fusiform_l	2.35	2.3	2.1	2.55	2.53	2.52	2.41	2.55	2.41	2.32	2.41	2.97	2.44	2.24	2.47	2.42	2.4	2.35	2.1	2.06	2.26	2.49	2.31	2.18	2.48	
Fusiform_r	2.42	2.27	2.05	2.59	2.51	2.76	2.43	2.53	2.37	2.4	2.32	3.14	2.57	2.33	2.44	2.46	2.32	2.43	2.1	2.11	2.27	2.53	2.26	2.19	2.44	
Postcentral_l	2.35	2.31	2.17	2.53	2.43	2.46	2.39	2.43	2.31	2.37	2.24	2.95	2.7	2.25	2.23	2.39	2.74	2.26	2.12	2.15	2.32	2.36	2.69	2.22	2.42	
Postcentral_r	2.34	2.27	2.09	2.78	2.46	2.39	2.4	2.49	2.48	2.37	2.23	3.02	2.82	2.35	2.29	2.28	2.84	2.2	1.98	2.07	2.25	2.44	2.93	2.23	2.41	
SupraMarginal_l	2.17	2.16	2.04	2.48	2.17	2.37	2.28	2.34	2.36	2.17	2.35	2.76	2.47	1.95	2.37	2.28	2.39	2.28	2.02	2.14	2.31	2.49	2.95	2.15	2.21	
SupraMarginal_r	2.31	2.06	2.12	2.77	2.33	2.7	2.44	2.39	2.52	2.27	2.45	3.02	2.77	2.23	2.45	2.27	2.58	2.1	1.87	2.18	2.48	2.67	3.18	2.32	2.4	
Angular_l	2.48	2.1	2.08	3	2.29	2.7	2.58	2.54	2.6	2.92	2.66	2.93	2.95	2.19	2.89	2.13	2.78	2.27	2.29	2.42	2.64	2.85	3.02	2.32	2.87	
Angular_r	2.51	2.1	2.14	2.95	2.27	2.83	2.63	2.62	2.9	2.73	2.53	3.02	3.19	2.52	2.81	2.09	2.69	2.39	1.99	2.43	2.59	2.73	2.98	2.42	2.79	
Precuneus_l	2.73	2.54	2.61	2.98	2.89	2.89	2.91	2.72	3.22	2.7	2.76	3.24	3.29	2.7	2.86	2.41	3.12	2.68	2.34	2.51	2.73	3.02	3.89	2.6	2.93	
Precuneus_r	2.74	2.43	2.61	2.91	2.82	3.1	2.94	2.78	3.4	2.74	2.72	3.33	3.36	2.62	2.97	2.53	3.04	2.52	2.25	2.55	2.8	3.08	3.56	2.6	2.98	
Paracentral_Lobule_l	2.2	2.27	2.22	2.84	2.58	2.22	2.38	2.35	2.32	2.36	1.95	3.21	2.79	2.44	2.16	2.47	2.85	2.27	2.08	1.92	2.43	2.01	3.31	2.15	2.29	
Paracentral_Lobule_r	2.36	2.15	2.37	2.77	2.57	2.3	2.31	2.43	2.57	2.26	2.01	3.2	3.02	2.33	2.19	2.56	2.96	2.28	2.25	1.77	2.11	2.2	3.14	2.31	2.27	
CaudateNucl_l	1.87	1.87	2.02	2.38	1.86	2.4	2.18	2.53	2.1	1.99	2.1	2.5	2.67	2.02	2.22	2.04	1.95	2.29	1.62	1.83	2.54	2.58	2.5	1.9	2.19	
CaudateNucl_r	2.34	1.66	2.12	2.72	2.07	2.47	2.25	2.35	2.54	2.07	2.17	2.62	2.68	2.1	2.26	2.26	2.01	2.32	1.87	2.05	2.45	2.49	2.75	1.91	2.25	
Putamen_l	2.85	2.51	2.7	3.42	2.8	2.73	2.94	2.93	3.05	2.66	2.61	3.19	3.24	2.62	2.69	3	2.9	2.64	2.81	3.09	2.93	2.79	2.46	2.6	2.78	
Putamen_r	2.53	2.32	2.53	3.2	2.74	2.63	2.91	2.89	3.11	2.62	2.5	3.04	3.02	2.42	2.61	2.83	2.87	2.64	2.83	2.91	2.72	2.76	2.75	2.43	2.58	
Pallidum_l	2.14	2.09	2.07	2.52	2.29	2.38	2.48	2.47	2.35	2.27	2.07	2.62	2.53	2.08	2.32	2.3	2.52	1.78	2.57	2.63	2.39	1.99	1.79	2.12	2.18	
Pallidum_r	2.83	2.08	2.37	2.82	2.53	2.54	2.73	2.46	2.67	2.62	2.25	2.82	2.7	2.35	2.26	2.79	2.82	2.1	2.91	2.78	2.41	2.47	2.21	2.45	2.39	
Thalamus_l	2.48	2.41	2.5	2.54	2.33	2.47	2.66	2.28	2.66	2.42	2.49	2.82	2.6	2.44	2.44	2.44	2.56	2.27	2.04	1.98	2.42	2.6	2.54	2.47	2.38	2.55
Thalamus_r	2.48	2.3	2.44	2.53	2.39	2.59	2.77	2.24	2.75	2.45	2.53	2.92	2.72	2.48	2.52	2.54	2.34	2.11	1.98	2.5	2.61	2.57	2.4	2.38	2.51	
Heschl_l	2.56	2.75	2.76	2.96	2.83	3.21	2.76	3.07	2.73	2.83	2.8	3.26	2.78	2.47	2.87	2.56	2.46	2.59	2.02	2.46	2.79	2.84	1.75	2.92	3.02	
Heschl_r	3.03	2.65	2.7	3.1	3.01	3.68	2.96	3.22	2.97	3.11	3.13	3.52	3.17	2.9	3.08	2.78	2.69	3.15	2.18	2.55	3.02	3	2.72	2.97	3.36	
Panial_l	2.41	2.21	2.16	2.74	2.32	2.62	2.58	2.52	2.58	2.42	2.36	3.01	2.92	2.14	2.4	2.19	2.8	2.47	1.86	2.21	2.42	2.57	3.07	2.19	2.59	
Panial_r	2.43	2.07	2.18	2.75	2.33	2.63	2.6	2.52	2.81	2.22	2.29	2.91	3	2.28	2.46	2.11	2.84	2.38	1.84	2.19	2.39	2.69	3.48	2.27	2.58	
Temporal_l	2.3	2.17	2.11	2.54	2.24	2.59	2.34	2.36	2.3	2.35	2.36	2.66	2.49	2.11	2.46	2.12	2.32	2.25	2.04	2.05	2.28	2.56	2.05	2.12	2.42	
Temporal_r	2.38	1.96	2.03	2.69	2.38	2.78	2.38	2.43	2.57	2.45	2.48	3.01	2.65	2.3	2.47	2.23	2.38	2.23	1.98	2.16	2.36	2.56	2.09	2.25	2.48	
Vermis	2.24	2.39	2.07	2.04	2.41	2.29	2.26	2.32	2.32	2.1	2.37	2.54	1.96	2.14	2.33	2.63	2.19	2.3	2.31	2	2.1	2.43	2.65	2.21	2.33	
Cerebellum_Crus_l	2.36	2.19	2	2.31	2.36	2.63	2.22	2.43	2.27	1.67	2.81	2.65	2.01	2.16	2.56	2.74	2.31	1.92	2.69	2.08	2.25	2.72	1.68	2.31	2.58	
Cerebellum_Crus_r	2.26	2.26	1.82	2.34	2.41	2.51	2.26	2.48	2.1	1.82	2.68	2.59	1.95	2.19	2.47	2.52	2.21	1.89	2.67	2.15	2.18	2.57	1.31	2.29	2.6	
Cerebellum_l	2.34	2.51	2.15	2.31	2.45	2.62	2.44	2.57	2.32	1.84	2.66	2.62	1.93	2.18	2.55	2.83	2.48	2.14	2.6	2.27	2.16	2.77	2.08	2.22	2.59	
Cerebellum_r	2.35	2.53	1.98	2.38	2.43	2.67	2.38	2.56	2.1	1.71	2.68	2.69	1.86	2.2	2.56	2.68	2.41	2.29	2.57	2.3	2.21	2.68	2.05	2.29	2.63	
Medulla	1.83	1.86	1.59	1.96	1.91	1.8	1.97	2.05	1.81	1.85	2.12	2.23	1.38	1.72	2.06	1.89	1.92	1.96	1.86	1.76	1.94	2.07	1.39	1.84	2.05	
Midbrain	2.17	1.9	1.94	2.19	2.23	2.22	2.35	2.25	2.03	2.14	2.39	2.54	1.89	2.02	2.27	2.26	2.11	1.91	2.11	2.27	2.09	2.34	2.04	2.17	1.99	
Pons	1.86	1.82	1.72	1.85	1.86	1.72	1.93	2.08	1.84	2.01	1.47	1.83	1.94	2.47	1.87	2.06	1.97	1.89	1.72	1.71	1.86	1.86	2.03	1.69	1.99	
Occipital WM	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	

Tabella III (continua). Valori dei SUV delle aree cerebrali prese in esame normalizzati per la sostanza bianca occipitale di ogni paziente.

I valori così ottenuti sono stati rapportati ai valori dei singoli biomarker misurati nel liquido cefalorachidiano e i due gruppi di parametri sono stati studiati mediante analisi statistica con coefficiente di correlazione di Spearman e con indice di correlazione di Pearson.

CHI3L2 (YKL-39) MBL_P

	Vermis	Cerebellum_Crus_l	Cerebellum_Crus_r	Cerebellum_l	Cerebellum_r	Medulla	Midbrain	Pons	CHI3L2 (YKL-39) MBL
Vermis		8	12	0.0009	0.0009	30	57	0.0002	50
Cerebellum_Crus_l	8		5,605E-10	2.0241e-011	8.3060e-010	2	103	0.0393	22
Cerebellum_Crus_r	12	5,605E-10		3.5926e-010	3.7958e-011	4,352E-01	163	0.0892	26
Cerebellum_l	1	2,024E-08	3,593E-07		1.0667e-014	2	105	0.0176	3
Cerebellum_r	1	8,306E-07	3,796E-08	1.0667e-014		1,154E-01	42	0.0145	4
Medulla	30	2	4,352E-01	0.0016	0.0001		9	0.0025	32
Midbrain	57	103	163	0.1052	0.0421	9		4,8207e-005	408
Pons	2,293E-01	39	89	0.0176	0.0145	2	4,821E-02		76
CHI3L2 (YKL-39) MBL	50	22	26	0.0033	0.0041	32	408	0.0761	

Tabella IV. Coefficiente di correlazione di Spearman per CHI3L2.

CHI3L2 (YKL-39) MBL

	Vermis	Cerebellum_Crus_l	Cerebellum_Crus_r	Cerebellum_l	Cerebellum_r	Medulla	Midbrain	Pons	CHI3L2 (YKL-39) MBL
Vermis	1.000	520	492	620	622	435	385	673	395
Cerebellum_Crus_l	520	1.000	949	929	901	593	334	415	455
Cerebellum_Crus_r	492	949	1.000	908	925	650	288	347	446
Cerebellum_l	620	929	908	1.000	964	598	332	471	564
Cerebellum_r	622	901	925	964	1.000	695	409	483	553
Medulla	435	593	650	598	695	1.000	513	578	431
Midbrain	385	334	288	332	409	513	1.000	721	173
Pons	673	415	347	471	483	578	721	1.000	361
CHI3L2 (YKL-39) MBL	395	455	446	564	553	431	173	361	1.000

Tabella V. Indice di correlazione di Pearson per CHI3L2.

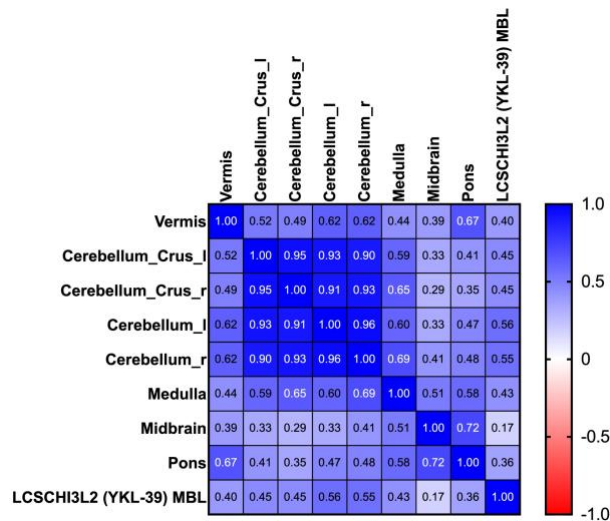


Tabella VI. Matrice di correlazione per CHI3L2.

CHIT1 CHITOTRIOSIDASEMBL_P

	Vermis	Cerebellum_Crus_l	Cerebellum_Crus_r	Cerebellum_l	Cerebellum_r	Medulla	Midbrain	Pons	CHIT1 CHITOTRIOSIDASEMBL
Vermis		8	12	0.0009	0.0009	30	57	0.0002	258
Cerebellum_Crus_l	8		5,605E-10	2.0241e-011	8.3060e-010	2	103	0.0393	40
Cerebellum_Crus_r	12	5,605E-10		3.5926e-010	3.7958e-011	4,352E-01	163	0.0892	40
Cerebellum_l	1	2,024E-08	3,593E-07		1.0667e-014	2	105	0.0176	72
Cerebellum_r	1	8,306E-07	3,796E-08	1,0667e-014		1,154E-01	42	0.0145	31
Medulla	30	2	4,352E-01	0.0016	0.0001		9	0.0025	35
Midbrain	57	103	163	0.1052	0.0421	9		4,8207e-005	101
Pons	2,293E-01	39	89	0.0176	0.0145	2	4,821E-02		24
CHIT1 CHITOTRIOSIDASEMBL	258	40	40	0.0716	0.0309	35	101	0.0243	

Tabella VII. Coefficiente di correlazione di Spearman per CHIT1.

CHIT1 CHITOTRIOSIDASEMBL

	Vermis	Cerebellum_Crus_l	Cerebellum_Crus_r	Cerebellum_l	Cerebellum_r	Medulla	Midbrain	Pons	CHIT1 CHITOTRIOSIDASEMBL
Vermis	1.000	520	492	620	622	435	385	673	235
Cerebellum_Crus_l	520	1.000	949	929	901	593	334	415	413
Cerebellum_Crus_r	492	949	1.000	908	925	650	288	347	413
Cerebellum_l	620	929	908	1.000	964	598	332	471	366
Cerebellum_r	622	901	925	964	1.000	695	409	483	432
Medulla	435	593	650	598	695	1.000	513	578	424
Midbrain	385	334	288	332	409	513	1.000	721	335
Pons	673	415	347	471	483	578	721	1.000	449
CHIT1 CHITOTRIOSIDASEMBL	235	413	413	366	432	424	335	449	1.000

Tabella VIII. Indice di correlazione di Pearson per CHIT1.

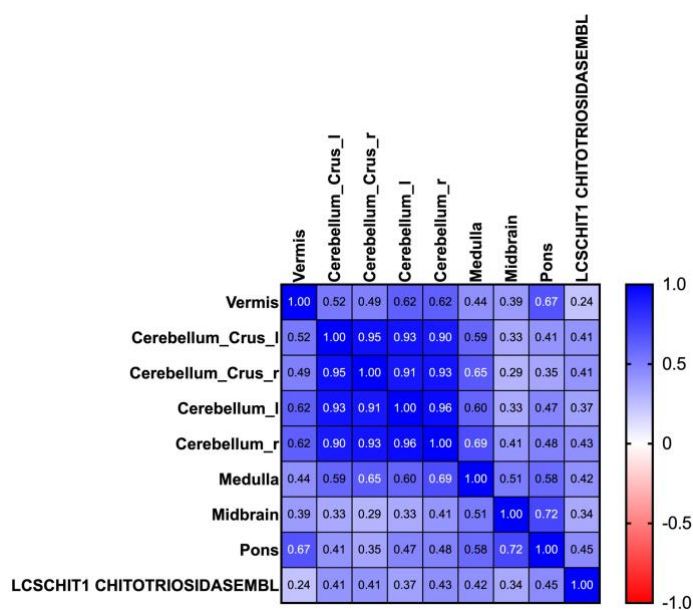


Tabella IX. Matrice di correlazione per CHIT1.

IL-6_p

	Vermis	Cerebellum_Crus_l	Cerebellum_Crus_r	Cerebellum_l	Cerebellum_r	Medulla	Midbrain	Pons	IL-6
Vermis		8	12	0.0009	0.0009	30	57	0.0002	358
Cerebellum_Crus_l	8		5,605E-10	2.0241e-011	8.3060e-010	2	103	0.0393	751
Cerebellum_Crus_r	12	5,605E-10		3.5926e-010	3.7958e-011	4,352E-01	163	0.0892	937
Cerebellum_l	1	2,024E-08	3,593E-07		1.0667e-014	2	105	0.0176	528
Cerebellum_r	1	8,306E-07	3,796E-08	1.0667e-014		1,154E-01	42	0.0145	637
Medulla	30	2	4,352E-01	0.0016	0.0001		9	0.0025	661
Midbrain	57	103	163	0.1052	0.0421	9		4.8207e-005	177
Pons	2,293E-01	39	89	0.0176	0.0145	2	4,821E-02		88
IL-6	358	751	937	0.5276	0.6368	661	177	0.0875	

Tabella X. Coefficiente di correlazione di Spearman per IL-6.

IL-6

	Vermis	Cerebellum_Crus_l	Cerebellum_Crus_r	Cerebellum_l	Cerebellum_r	Medulla	Midbrain	Pons	IL-6
Vermis	1.000	520	492	620	622	435	385	673	196
Cerebellum_Crus_l	520	1.000	949	929	901	593	334	415	68
Cerebellum_Crus_r	492	949	1.000	908	925	650	288	347	-17
Cerebellum_l	620	929	908	1.000	964	598	332	471	136
Cerebellum_r	622	901	925	964	1.000	695	409	483	102
Medulla	435	593	650	598	695	1.000	513	578	94
Midbrain	385	334	288	332	409	513	1.000	721	285
Pons	673	415	347	471	483	578	721	1.000	356
IL-6	196	68	-17	136	102	94	285	356	1.000

Tabella XI. Indice di correlazione di Pearson per IL-6.

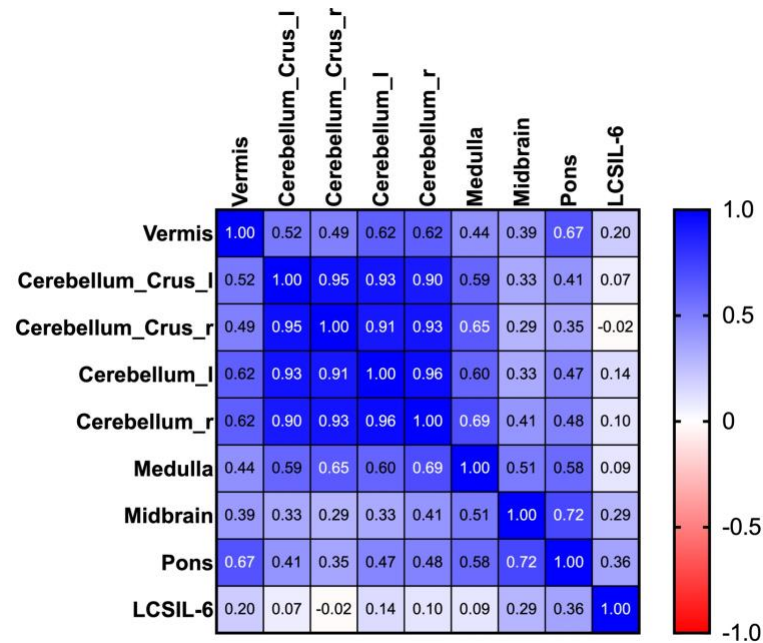


Tabella XII. Matrice di correlazione per IL-6.

NF Light_P

	Vermis	Cerebellum_Crus_l	Cerebellum_Crus_r	Cerebellum_l	Cerebellum_r	Medulla	Midbrain	Pons	NF Light	
Vermis			8	12	0.0009	0.0009	30	57	0.0002	167
Cerebellum_Crus_l	8		5,605E-10	2.0241e-011	8.3060e-010	2	103	0.0393		287
Cerebellum_Crus_r	12	5,605E-10		3.5926e-010	3.7958e-011	4,352E-01	163	0.0892		341
Cerebellum_l	1	2,024E-08	3,593E-07		1.0667e-014	2	105	0.0176		157
Cerebellum_r	1	8,306E-07	3,796E-08	1.0667e-014		1,154E-01	42	0.0145		129
Medulla	30	2	4,352E-01	0.0016	0.0001		9	0.0025		13
Midbrain	57	103	163	0.1052	0.0421	9		4.8207e-005		878
Pons	2,293E-01	39	89	0.0176	0.0145	2	4,821E-02			142
NF Light	167	287	341	0.1567	0.1295	13	878	0.1423		

Tabella XIII. Coefficiente di correlazione di Spearman per NF-L.

NF Light

	Vermis	Cerebellum_Crus_l	Cerebellum_Crus_r	Cerebellum_l	Cerebellum_r	Medulla	Midbrain	Pons	NF Light
Vermis	1	0.52	0.49	0.62	0.62	0.44	0.39	0.67	0.29
Cerebellum_Crus_l	0.52	1	0.95	0.93	0.90	0.59	0.33	0.41	0.22
Cerebellum_Crus_r	0.49	0.95	1	0.91	0.93	0.65	0.29	0.35	0.20
Cerebellum_l	0.62	0.93	0.91	1	0.96	0.60	0.33	0.47	0.29
Cerebellum_r	0.62	0.90	0.93	0.96	1	0.69	0.41	0.48	0.31
Medulla	0.44	0.59	0.65	0.60	0.69	1	0.51	0.58	0.49
Midbrain	0.39	0.33	0.29	0.33	0.41	0.51	1	0.72	-0.03
Pons	0.67	0.41	0.35	0.47	0.48	0.58	0.72	1	0.30
NF Light	0.29	0.22	0.20	0.29	0.31	0.49	-0.03	0.30	1

Tabella XIV. Indice di correlazione di Pearson per NF-L.

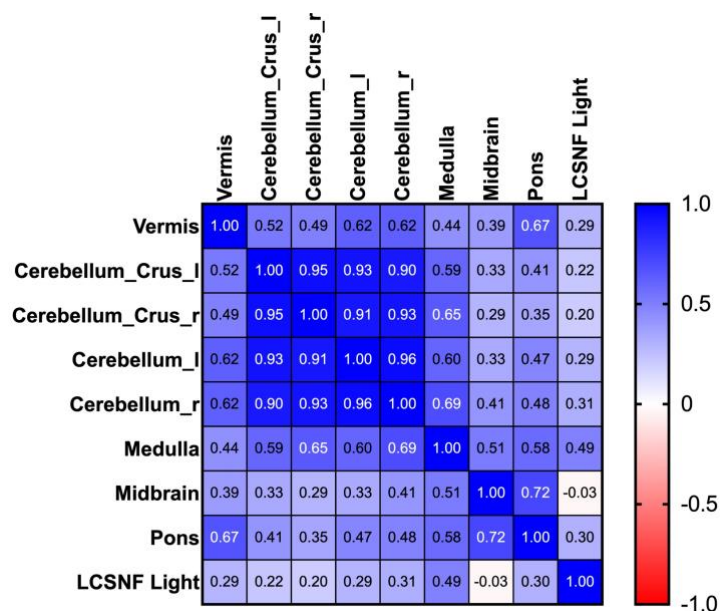


Tabella XV. Matrice di correlazione per NF-L.

TNF alfa_p

	Vermis	Cerebellum_Crus_l	Cerebellum_Crus_r	Cerebellum_l	Cerebellum_r	Medulla	Midbrain	Pons	TNF alfa
Vermis		8	12	0.0009	0.0009	30	57	0.0002	704
Cerebellum_Crus_l	8		5,605E-10	2.0241e-011	8.3060e-010	2	103	0.0393	401
Cerebellum_Crus_r	12	5,605E-10		3.5926e-010	3.7958e-011	4,352E-01	163	0.0892	528
Cerebellum_l	1	2,024E-08	3,593E-07		1.0667e-014	2	105	0.0176	701
Cerebellum_r	1	8,306E-07	3,796E-08	1.0667e-014		1,154E-01	42	0.0145	822
Medulla	30	2	4,352E-01	0.0016	0.0001		9	0.0025	667
Midbrain	57	103	163	0.1052	0.0421	9		4,8207e-005	217
Pons	2,293E-01	39	89	0.0176	0.0145	2	4,821E-02		549
TNF alfa	704	401	528	0.7011	0.8221	667	217	0.5492	

Tabella XVI. Coefficiente di correlazione di Spearman per TNF alfa.

TNF alfa

	Vermis	Cerebellum_Crus_l	Cerebellum_Crus_r	Cerebellum_l	Cerebellum_r	Medulla	Midbrain	Pons	TNF alfa
Vermis	1.000	520	492	620	622	435	385	673	80
Cerebellum_Crus_l	520	1.000	949	929	901	593	334	415	176
Cerebellum_Crus_r	492	949	1.000	908	925	650	288	347	132
Cerebellum_l	620	929	908	1.000	964	598	332	471	81
Cerebellum_r	622	901	925	964	1.000	695	409	483	47
Medulla	435	593	650	598	695	1.000	513	578	90
Midbrain	385	334	288	332	409	513	1.000	721	-256
Pons	673	415	347	471	483	578	721	1.000	126
TNF alfa	80	176	132	81	47	90	-256	126	1.000

Tabella XVII. Indice di correlazione di Pearson per TNF alfa.

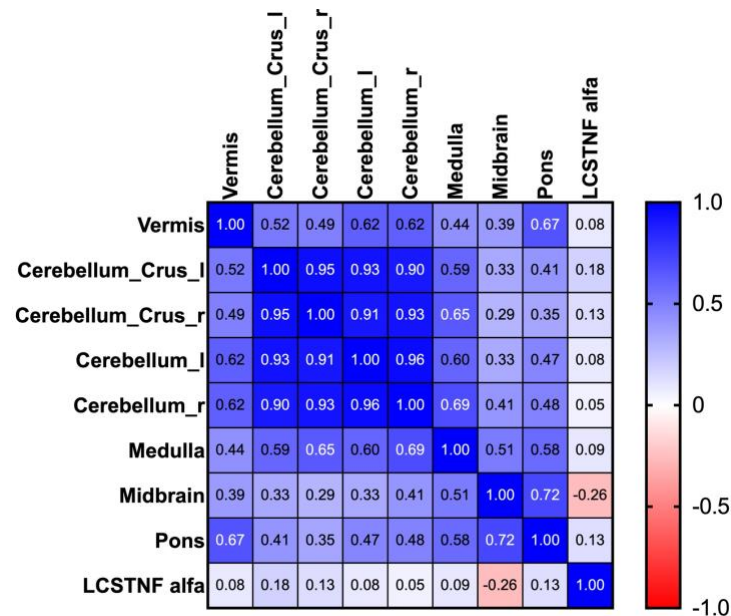


Tabella XVIII. Matrice di correlazione per TNF alfa.

I valori così ottenuti sono stati rapportati ai valori dei biomarker misurati nel liquido cefalorachidiano e i due gruppi di parametri sono stati studiati mediante analisi statistica con coefficiente di correlazione di Spearman (Tabella XIX).

	CH13L2 (YKL-39) MBL	CHIT1 CHITOTRIOSIDASEMBL	NF Light	IL-6	TNF alfa	
Precentral_l	0,666		0,216	0,347	0,6	0,467
Precentral_r	0,202		0,465	0,463	0,776	0,961
Rolandic_Oper_l	0,143		0,537	0,812	0,784	0,841
Rolandic_Oper_r	0,119		0,506	0,252	0,579	0,424
Supp_Motor_Area_l	0,334		0,679	0,498	0,805	0,778
Supp_Motor_Area_r	0,372		0,383	0,338	0,385	0,692
Olfactory_l	0,295	0,027	0,549	0,998	0,304	
Olfactory_r	0,459	0,057	0,44	0,748	0,297	
Frontal_Sup_l	0,644		0,426	0,641	0,797	0,645
Frontal_Sup_r	0,755		0,92	0,905	0,68	0,693
Frontal_Mid_l	0,834		0,444	0,721	0,475	0,259
Frontal_Mid_r	0,83		0,807	0,969	0,457	0,523
Frontal_inf_l	0,826		0,613	0,888	0,731	0,211
Frontal_inf_r	0,774		0,972	0,861	0,441	0,33
Rectus_l	0,426		0,301	0,323	0,866	0,386
Rectus_r	0,737		0,385	0,334	0,658	0,785
Insula_l	0,916		0,737	0,956	0,49	0,284
Insula_r	0,801		0,687	0,626	0,4	0,312
Cingulum_Ant_l	0,581		0,196	0,867	0,675	0,382
Cingulum_Ant_r	0,466		0,114	0,762	0,804	0,555
Cingulum_Mid_l	0,908		0,82	0,983	0,614	0,745
Cingulum_Mid_r	0,962		0,453	0,917	0,441	0,465
Cingulum_Post_l	0,979		0,707	0,481	0,44	0,565
Cingulum_Post_r	0,73		0,989	0,788	0,819	0,563
Hippo_Parahippo_l	0,962		0,623	0,433	0,573	0,808
Hippo_Parahippo_r	0,33		0,822	0,756	0,588	0,859
Amygdala_l	0,816		0,407	0,54	0,567	0,889
Amygdala_r	0,967		0,384	0,58	0,569	0,49
Calcarine_l	0,293		0,683	0,693	0,053	0,372
Calcarine_r	0,389		0,472	0,828	0,079	0,525
Cuneus_l	0,569		0,902	0,571	0,879	0,993
Cuneus_r	0,434		0,823	0,437	0,904	0,835
Lingual_l	0,802		0,091	0,978	0,313	0,381
Lingual_r	0,846	0,061	0,921	0,256	0,12	
Occipital_l	0,989		0,084	0,798	0,965	0,835
Occipital_r	0,728		0,168	0,483	0,783	0,887
Fusiform_l	0,733		0,124	0,694	0,823	0,924
Fusiform_r	0,996		0,225	0,929	0,689	0,537
Postcentral_l	0,566		0,58	0,432	0,921	0,575
Postcentral_r	0,515		0,988	0,845	0,887	0,935
SupraMarginal_l	0,971		0,909	0,675	0,735	0,627
SupraMarginal_r	0,643		0,564	0,661	0,717	0,613
Angular_l	0,671		0,613	0,951	0,402	0,411
Angular_r	0,405		0,333	0,868	0,433	0,395
Precuneus_l	0,624		0,335	0,88	0,834	0,897
Precuneus_r	0,719		0,268	0,851	0,902	0,828
Paracentral_Lobule_l	0,129		0,564	0,102	0,214	0,739
Paracentral_Lobule_r	0,005		0,894	0,048	0,568	0,158
CaudateNucl_l	0,691		0,447	0,834	0,696	0,502
CaudateNucl_r	0,201		0,598	0,385	0,753	0,735
Putamen_l	0,39		0,611	0,43	0,449	0,617
Putamen_r	0,268		0,747	0,604	0,711	0,908
Pallidum_l	0,65		0,56	0,495	0,7	0,783
Pallidum_r	0,236		0,809	0,251	0,567	0,56
Thalamus_l	0,335		0,308	0,157	0,447	0,895
Thalamus_r	0,647		0,32	0,264	0,528	0,305
Heschl_l	0,943		0,506	0,767	0,109	0,734
Heschl_r	0,722		0,397	0,828	0,083	0,31
Parietal_l	0,508		0,541	0,984	0,408	0,59
Parietal_r	0,482		0,461	0,965	0,807	0,98
Temporal_l	0,719		0,686	0,436	0,261	0,35
Temporal_r	0,838		0,924	0,852	0,272	0,548
Vermis	0,05		0,258	0,167	0,358	0,704
Cerebellum_Crus_l	0,022	0,04	0,287	0,751	0,401	
Cerebellum_Crus_r	0,026	0,04	0,341	0,937	0,528	
Cerebellum_l	0,003	0,072	0,157	0,528	0,701	
Cerebellum_r	0,004	0,031	0,129	0,637	0,822	
Medulla	0,032	0,035	0,013	0,661	0,667	
Midbrain	0,408		0,101	0,878	0,177	0,217
Pons	0,076	0,024	0,142	0,088	0,549	

Tabella XIX. Analisi statistica con coefficiente di correlazione di Spearman tra i biomarkers e tutte le aree esaminate. I valori di p significativi ($p < 0,05$) sono stati

evidenziati in verde. I valori di p quasi significativi ($0,08 < p < 0,05$) sono stati evidenziati in giallo.

Sono state esaminate in particolare le aree del verme, della crus cerebri, del cervelletto, del midollo allungato e del mesencefalo (Tabella XX).

	Vermis	Cerebellum Crus l	Cerebellum Crus r	Cerebellum l	Cerebellum r	Medulla	Midbrain	Pons
TNF alfa	0,704	0,401	0,528	0,701	0,822	0,667	0,217	0,549
IL-6	0,358	0,751	0,937	0,528	0,637	0,661	0,177	0,088
NF Light	0,167	0,287	0,341	0,157	0,130	0,013	0,878	0,142
CHI3L2 (YKL-39) MBL	0,050	0,022	0,026	0,003	0,004	0,032	0,408	0,076
CHIT1 CHITOTRIOSIDASEMBL	0,258	0,040	0,040	0,072	0,031	0,035	0,101	0,024

Tabella XX. Analisi statistica con coefficiente di correlazione di Spearman tra i biomarkers e le aree di interesse. I valori di p significativi ($p < 0,05$) sono stati evidenziati in verde. I valori di p quasi significativi ($0,08 < p < 0,05$) sono stati evidenziati in giallo.

Individuata la correlazione statistica ne è stata misurata la forza con indice di correlazione di Pearson (Tabella XXI).

	Vermis	Cerebellum Crus l	Cerebellum Crus r	Cerebellum l	Cerebellum r	Medulla	Midbrain	Pons
NF Light						0,4891		
CHI3L2 (YKL-39) MBL	0,3955	0,4548	0,4458	0,5644	0,553	0,4307		0,3611
CHIT1 CHITOTRIOSIDASEMBL		0,4128	0,4134	0,3665	0,4322	0,4242		0,4492

Tabella XXI. Indice di correlazione di Pearson tra i biomarkers e le aree di interesse.

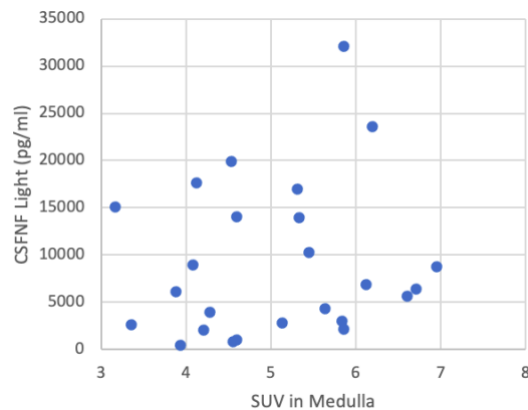
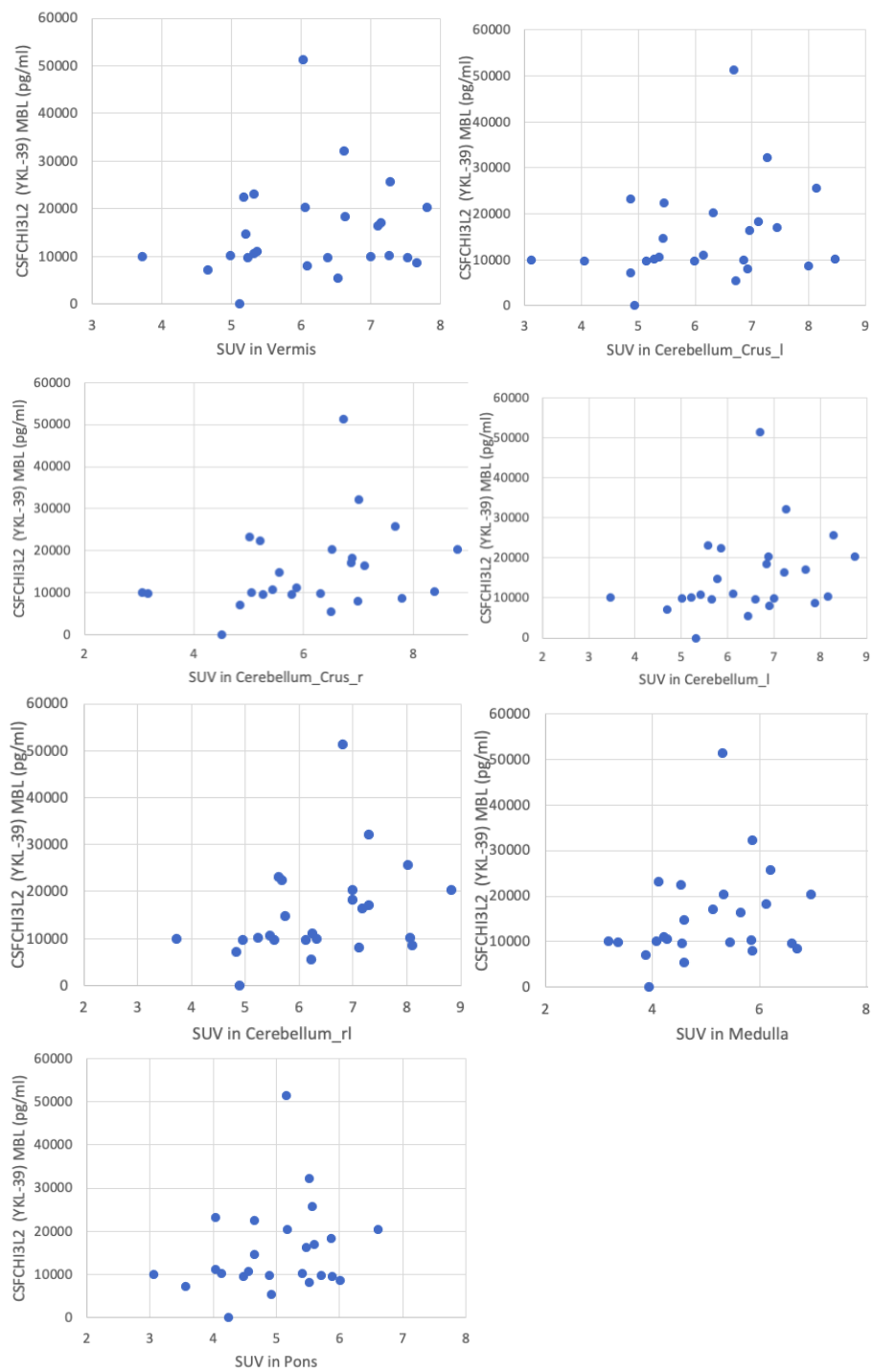
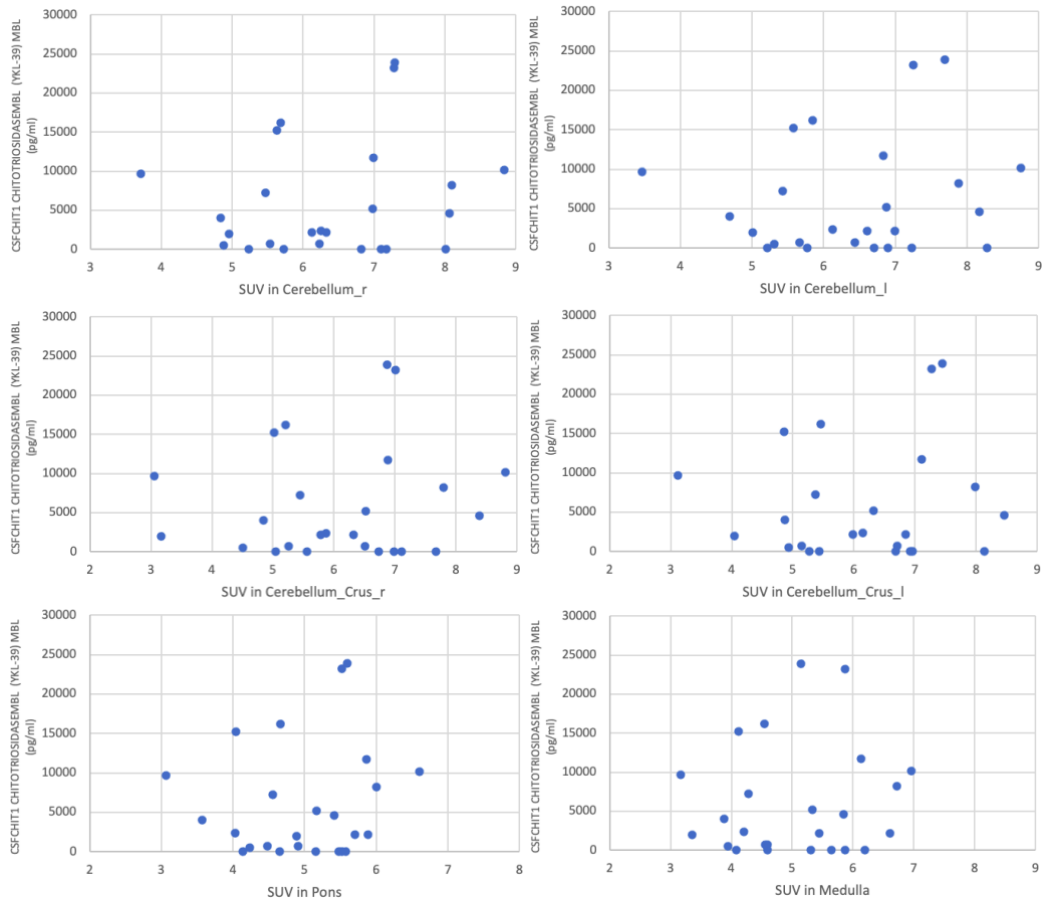


Grafico 1. Correlazione tra i livelli di NF-L nel liquor e SUV ratio nel bulbo.



Grafici 2-8. Correlazione tra i livelli di CHI3L2 nel liquor e SUV ratio nel bulbo, ponte, cervelletto di destra e di sinistra, crus cerebri di destra e di sinistra, verme.



Grafici 9-14. Correlazione tra i livelli di CHIT1 nel liquor e SUV ratio nel bulbo, ponte, cervelletto di destra e di sinistra, crus cerebri di destra e di sinistra.

7 DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Un precedente studio, condotto presso l'Università di Padova, aveva consentito di porre le basi per dimostrare l'aumento di [18F]FDG nelle regioni di bulbo, ponte e mesencefalo dei pazienti con SLA¹⁶³.

L'aumento del metabolismo glucidico osservato a livello di tali regioni si pone in contrasto con l'ipometabolismo che ci si aspetterebbe di riscontrare in base alla degenerazione e morte dei motoneuroni superiori e inferiori, che contraddistinguono tipicamente la patologia. Questo potrebbe essere messo in relazione con il meccanismo di neuroinfiammazione, che è stato dimostrato prendere parte alla patogenesi della SLA¹⁶⁴. Da biopsie post-mortem di pazienti affetti, infatti, è stata evidenziata la presenza di microglia infiammatoria attivata, astrociti e altre cellule dell'infiammazione nel contesto del midollo spinale^{165,166}, le quali sembrerebbero responsabili della maggior parte dell'accumulo di FDG nel sistema nervoso.

Tra i vari pazienti del presente studio, considerando le regioni di maggior interesse, il valore medio del SUV ratio normalizzato per la sostanza bianca occipitale è stato di:

- 1,87 g/ml nel bulbo;
- 1,86 g/ml nel ponte;
- 2,16 g/ml nel mesencefalo;
- 2,37 g/ml nel cervelletto di destra;
- 2,38 g/ml nel cervelletto di sinistra;
- 2,25 g/ml nel crus cerebri di destra;
- 2,32 g/ml nel crus cerebri di sinistra;
- 2,28 g/ml nel verme.

Un ulteriore studio, condotto anche in questo caso presso l'Università di Padova, aveva invece permesso di correlare l'aumento di determinati biomarker nel liquor dei pazienti affetti da SLA: da un lato i neurofilamenti, marker di danno neuronale, dall'altro le chitinasi, prodotte dalla microglia e dagli astrociti reattivi. Anche

quest'ultime sono aumentate nel CSF dei pazienti affetti da SLA a causa del processo neuroinfiammatorio che contribuisce alla neurodegenerazione, di cui gli attori principali sono proprio la microglia e gli astrociti.

I valori medi dei biomarker analizzati sono stati i seguenti:

- Per CHI3L2 15 942,69 pg/ml;
- Per CHIT1 10 003,96 pg/ml;
- Per NF-L 9142,28 pg/ml;
- Per IL-6 5,59 pg/ml;
- Per TNF alfa 6,36 pg/ml.

Per quanto riguarda i dosaggi dei biomarcatori, i risultati ottenuti per i neurofilamenti sono in linea con i dati presenti nella recente letteratura. Il valore medio per i dosaggi dei neurofilamenti a catena leggera è stato di circa 9 142 pg/ml, indicando una grossa differenza di concentrazione rispetto ai valori ben più bassi di una persona sana. Si può quindi affermare che i livelli di NF-L trovati siano significativamente aumentati nei pazienti con sclerosi laterale amiotrofica, confermando gli NF-L come biomarcatori di neurodegenerazione, essendo proteine strutturali rilasciate dopo un danno neuronale.

I risultati ottenuti per i dosaggi delle chitinasi nel CSF sono anch'essi in linea con i dati presenti in letteratura. È stata vista infatti una differenza di distribuzione dei dosaggi sia di CHIT1 che di CHI3L2 tra i pazienti SLA, i cui valori medi sono stati rispettivamente di 10 004 pg/ml e di circa 15 942 pg/ml. Le chitinasi, prodotte dalla microglia (soprattutto CHIT1) e dagli astrociti reattivi, si confermano notevolmente aumentate nel CSF dei pazienti affetti da SLA a causa del processo neuroinfiammatorio che contribuisce alla neurodegenerazione, di cui gli attori principali sono proprio la microglia e gli astrociti.

Il presente studio, condotto con lo scopo di indagare se vi sia correlazione tra l'aumento del metabolismo glucidico in specifiche regioni del SNC e l'aumento di determinati biomarker (Neurofilamenti e Chitinasi) a livello del liquor, ha infatti

confermato che nei pazienti con SLA gli elevati valori del SUV ratio correlano in maniera statisticamente significativa con un altrettanto elevata concentrazione di Neurofilamenti e Chitinasi nel CSF.

La correlazione più forte si è avuta in particolare nelle regioni di midollo allungato, ponte e cervelletto (soprattutto la regione del crus cerebri). Tra i biomarker studiati, CHIT1 e CHI3L2 sono stati quelli di maggior interesse, mentre NF-L ha avuto una certa significatività solamente nella regione del midollo allungato. IL-6 e TNF alfa, invece, non hanno mai dimostrato alcun tipo di correlazione con il SUV ratio delle regioni esaminate.

Più nel dettaglio:

- Una certa significatività per NF-Light si è avuta solamente a livello del bulbo (Grafico 1).
- Per le chitinasi CHI3L2, la forza dell'associazione è sicuramente più importante, trovando riscontro in bulbo, ponte, cervelletto di destra e di sinistra, crus cerebri di destra e di sinistra, verme (Grafici 2-8).
- Un'ottima correlazione si è avuta anche per un'altra Chitinasi (CHIT1), in particolar modo in bulbo, ponte, cervelletto di destra e di sinistra, crus cerebri di destra e di sinistra (grafici 9-14).
- Si è potuta osservare inoltre una corrispondenza tra l'aumento di alcuni biomarker e l'aumento del SUV ratio in regioni non del tutto attese, come ad esempio:
 - Interessamento del tratto olfattivo di destra e di sinistra, per quanto concerne il biomarcatore CHIT1.
 - Interessamento del lobulo paracentrale di destra, in questo caso correlato a CHI3L2 e NF-L.

Un risultato come quello ottenuto da questo studio pone grandi aspettative per un miglior inquadramento prognostico dei pazienti. È quasi certo che, alla base di ciò che è stato studiato e analizzato, sia presente un meccanismo fisiopatologico comune, facente capo ai meccanismi di neurodegenerazione e infiammazione. Tuttavia, dato il ristretto numero di casi coinvolti, sono necessari ulteriori studi che includano una popolazione più ampia di pazienti e di controlli, in modo da

verificare la validità della metodica nel differenziare i pazienti affetti dai soggetti sani, così come per valutare il pattern metabolico di queste e altre zone del sistema nervoso nella patologia. Il fine ultimo, chiaramente, è ampliare le conoscenze riguardo alla fisiopatologia della malattia e delle alterazioni che vi si riscontrano.

8 BIBLIOGRAFIA

1. Al-Chalabi, A. & Hardiman, O. The epidemiology of ALS: a conspiracy of genes, environment and time. *Nat Rev Neurol* **9**, 617–628 (2013).
2. <https://www.medicalimaging.it/patologie-e-diagnosi/malattia-motoneurone-cause-aspettative-vita/3188>.
3. Cruveilhier, J. Sur la paralysie musculaire, progressive, atrophique [French]. *Bull. Acad. Med. (Paris)* **18**, 490–502, 546–583 (1852). in.
4. Charcot, J. M. & Joffroy, A. Deux cas d'atrophie musculaire progressive avec lesions de la substance grise et des faisceaux antero-lateraux de la moelle epiniere [French]. *Arch. Physiol. Neurol. Pathol.* **2**, 744 (1869).
5. Kurland, L. T. & Mulder, D. W. Epidemiologic investigations of amyotrophic lateral sclerosis. 2. Familial aggregations indicative of dominant inheritance. I. *Neurology* **5**, 182-196 (1955).
6. Kurland, L. T. & Mulder, D. W. Epidemiologic investigations of amyotrophic lateral sclerosis. 2. Familial aggregations indicative of dominant inheritance. I. *Neurology* **5**, 249-268 (1955).
7. Longinetti, E. & Fang, F. Epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: an update of recent literature. *Curr Opin Neurol* **32**, 771–776 (2019).
8. Andrew, A. *et al.* ALS risk factors: Industrial airborne chemical releases. *Environmental Pollution* **295**, 118658 (2022).
9. Masrori, P. & Van Damme, P. Amyotrophic lateral sclerosis: a clinical review. *European Journal of Neurology* vol. 27 Preprint at <https://doi.org/10.1111/ene.14393> (2020).
10. Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, *et al.* Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 2006; **314**: 130–133.
11. <https://healthy.thewom.it/salute/sclerosi-laterale-amiotrofica/>. in.
12. Mackenzie IR, Rademakers R, Neumann M. TDP-43 and FUS in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Lancet Neurol* 2010; **9**: 995–1007.
13. Boeynaems S, Bogaert E, Van Damme P, Van Den Bosch L. Inside out: the role of nucleocytoplasmic transport in ALS and FTL. *Acta Neuropathol* 2016; **132**: 159–173.
14. De Vos KJ, Hafezparast M. Neurobiology of axonal transport defects in motor neuron diseases: opportunities for translational research? *Neurobiol Dis* 2017; **105**: 283–299.

15. Nicolas A, Kenna KP, Renton AE, et al. Genome-wide analyses identify *KIF5A* as a novel ALS gene. *Neuron* 2018; 97: 1268–1283 e1266.
16. Brenner D, Yilmaz R, Muller K, et al. Hot-spot *KIF5A* mutations cause familial ALS. *Brain* 2018; 141: 688–697.
17. Swinnen B, Robberecht W (2014) The phenotypic variability of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Neurol* 10:661–670
18. Ellison, D.; Love, S.; Chimelli, LMC., et al. *Neuropathology: a reference text of CNS pathology*. Elsevier Health Sciences; 2012.
19. Chang J, Lomen-Hoerth C, Murphy J, et al. A voxel-based morphometry study of patterns of brain atrophy in ALS and ALS/FTLD. *Neurology*. 2005; 65:75–80. [PubMed: 16009889]
20. Abrahams S, Goldstein L, Suckling J, et al. Frontotemporal white matter changes in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol*. 2005; 252:321–331. [PubMed: 15739047].
21. Murphy JM, Henry RG, Langmore S, Kramer JH, Miller BL, Lomen-Hoerth C. Continuum of frontal lobe impairment in amyotrophic lateral sclerosis. *Archives of Neurology*. 2007; 64:530– 534. [PubMed: 17420314].
22. Ellison, D.; Love, S.; Chimelli, LMC., et al. *Neuropathology: a reference text of CNS pathology*. Elsevier Health Sciences; 2012.
23. Hammer RP, Tomiyasu U, Scheibel AB. Degeneration of the human Betz cell due to amyotrophic lateral sclerosis. *Experimental neurology*. 1979; 63:336–346. [PubMed: 437007].
24. Nihei K, McKee AC, Kowall NW. Patterns of neuronal degeneration in the motor cortex of amyotrophic lateral sclerosis patients. *Acta neuropathologica*. 1993; 86:55–64. [PubMed: 8396837].
25. Dickson, D.; Weller, RO. *Neurodegeneration: the molecular pathology of dementia and movement disorders*. John Wiley & Sons; 2011.
26. Stephens B, Guiloff RJ, Navarrete R, Newman P, Nikhar N, Lewis P. Widespread loss of neuronal populations in the spinal ventral horn in sporadic motor neuron disease. A morphometric study. *Journal of the Neurological Sciences*. 2006; 244:41–58. [PubMed: 16487542].
27. Piao YS, Wakabayashi K, Kakita A, et al. Neuropathology with clinical correlations of sporadic amyotrophic lateral sclerosis: 102 autopsy cases examined between 1962 and 2000. *Brain pathology*. 2003; 13:10–22. [PubMed: 12580541].
28. Tomonaga M, Saito M, Yoshimura M, Shimada H, Tohgi H. Ultrastructure of the Bunina bodies in anterior horn cells of amyotrophic lateral sclerosis. *Acta neuropathologica*. 1978; 42:81–86. [PubMed: 654889].

29. Kuroda S, Ishizu H, Kawai K, Otsuki S. Bunina bodies in dendrites of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Acta medica Okayama*. 1990; 44:41–45. [PubMed: 2158740].
30. Okamoto K, Mizuno Y, Fujita Y. Bunina bodies in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropathology*. 2008; 28:109–115. [PubMed: 18069968].
31. Sasaki S, Maruyama S. Immunocytochemical and ultrastructural studies of the motor cortex in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta neuropathologica*. 1994; 87:578–585. [PubMed: 8091950].
32. Okamoto K, Hirai S, Ishiguro K, Kawarabayashi T, Takatama M. Light and electron microscopic and immunohistochemical observations of the Onuf's nucleus of amyotrophic lateral sclerosis. *Acta neuropathologica*. 1991; 81:610–614. [PubMed: 1882637].
33. Okamoto K, Hirai S, Amari M, Watanabe M, Sakurai A. Bunina bodies in amyotrophic lateral sclerosis immunostained with rabbit anti-cystatin C serum. *Neuroscience letters*. 1993; 162:125–128. [PubMed: 8121614].
34. Mizuno Y, Fujita Y, Takatama M, Okamoto K. Peripherin partially localizes in Bunina bodies in amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences*. 2011; 302:14–18. [PubMed: 21241994].
35. Mizuno Y, Amari M, Takatama M, Aizawa H, Mihara B, Okamoto K. Transferrin localizes in Bunina bodies in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta neuropathologica*. 2006; 112:597–603. [PubMed: 16896902].
36. Sasaki S, Komori T, Iwata M. Neuronal inclusions in sporadic motor neuron disease are negative for alpha-synuclein. *Neuroscience letters*. 2006; 397:15–19. [PubMed: 16406315].
37. Mizuno Y, Amari M, Takatama M, Aizawa H, Mihara B, Okamoto K. Immunoreactivities of p62, an ubiquitin-binding protein, in the spinal anterior horn cells of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of the neurological sciences*. 2006; 249:13–18. [PubMed: 16820172].
38. Murayama S, Mori H, Ihara Y, Bouldin TW, Suzuki K, Tomonaga M. Immunocytochemical and ultrastructural studies of lower motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of neurology*. 1990; 27:137–148. [PubMed: 2156479].
39. <https://pathology.or.jp/corepicturesEN/17/c07/03.html>.
40. Boillée S, Vande Velde C, Cleveland Don W. ALS: A Disease of Motor Neurons and Their Nonneuronal Neighbors. *Neuron*. 2006; 52:39–59. [PubMed: 17015226].
41. McGeer PL, McGeer EG. Inflammatory processes in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle & Nerve*. 2002; 26:459–470. [PubMed: 12362410].

42. Boillée S, Yamanaka K, Lobsiger CS, et al. Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia. *Science*. 2006; 312:1389–1392. [PubMed: 16741123].
43. Yamanaka K, Chun SJ, Boillee S, et al. Astrocytes as determinants of disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Nature neuroscience*. 2008; 11:251–253. [PubMed: 18246065].
44. Schiffer D, Fiano V. Astrogliosis in ALS: possible interpretations according to pathogenetic hypotheses. *Amyotrophic Lateral Sclerosis*. 2004; 5:22–25. [PubMed: 15204020].
45. Barbeito LH, Pehar M, Cassina P, et al. A role for astrocytes in motor neuron loss in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Research Reviews*. 2004; 47:263–274. [PubMed: 15572176].
46. Lasienne J, Yamanaka K. Glial cells in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol Res Int*. 2011; 2011:718987. [PubMed: 21766027].
47. Henkel J, Beers D, Zhao W, Appel S. Microglia in ALS: The Good, The Bad, and The Resting. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2009; 4:389–398. [PubMed: 19731042].
48. Brooks BR. El Escorial World Federation of Neurology criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. Subcommittee on Motor Neuron Diseases/Amyotrophic Lateral Sclerosis of the World Federation of Neurology Research Group on Neuromuscular Diseases and the El Escorial “Clinical limits of amyotrophic lateral sclerosis” workshop contributors. *J Neurol Sci* 1994;124(Suppl.):96–107.
49. Brooks BR, Miller RG, Swash M, Munsat TL. El Escorial revisited: revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 2000;1:293–9.
50. Aggarwal S, Cudkowicz M. ALS drug development: reflections from the past and a way forward. *Neurotherapeutics* 2008;5:516–27. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nurt.2008.08.002>.
51. de Carvalho M, Dengler R, Eisen A, England JD, Kaji R, Kimura J, et al. Electrodiagnostic criteria for diagnosis of ALS. *Clin Neurophysiol* 2008;119:497–503. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinph.2007.09.143>.
52. Costa J, Swash M, de Carvalho M. Awaji criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review. *Arch Neurol* 2012;69:1410–6. <http://dx.doi.org/10.1001/archneurol.2012.254>.
53. Noto Y, Misawa S, Kanai K, Shibuya K, Iose S, Nasu S, et al. Awaji ALS criteria increase the diagnostic sensitivity in patients with bulbar onset. *Clin Neurophysiol* 2012;123: 382–5. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinph.2011.05.030>.

54. Bresch S, Delmont E, Soriani M-H, Desnuelle C. [Electrodiagnostic criteria for early diagnosis of bulbar-onset ALS: a comparison of El Escorial, revised El Escorial and Awaji algorithm]. *Rev Neurol (Paris)* 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neurol.2013.10.004>.
55. Wijesekera LC, Leigh PN (2009) Amyotrophic lateral sclerosis. *Orphanet J Rare Dis* 4:3.
56. <https://www.issalute.it/index.php/la-salute-dalla-a-alla-z-menu/e/elettromiografia-esami-di-accertamento>.
57. Attarian S, Verschueren A, Pouget J. Magnetic stimulation including the triple-stimulation technique in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 2007;36:55–61. <http://dx.doi.org/10.1002/mus.20789>.
58. Mills KR. Characteristics of fasciculations in amyotrophic lateral sclerosis and the benign fasciculation syndrome. *Brain* 2010;133:3458–69. <http://dx.doi.org/10.1093/brain/awq290>.
59. Drost G, Kleine BU, Stegeman DF, van Engelen BGM, Zwarts MJ. Fasciculation potentials in high-density surface EMG. *J Clin Neurophysiol* 2007;24:301–7. <http://dx.doi.org/10.1097/WNP.0b013e31803bba04>.
60. Misawa S, Noto Y, Shibuya K, Iose S, Sekiguchi Y, Nasu S, et al. Ultrasonographic detection of fasciculations markedly increases diagnostic sensitivity of ALS. *Neurology* 2011;77:1532–7. <http://dx.doi.org/10.1212/WNL.0b013e318233b36a>.
61. de Carvalho M, Turkman A, Swash M. Sensitivity of MUP parameters in detecting change in early ALS. *Clin Neurophysiol* 2014;125:166–9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinph.2013.06.014>.
62. Jenkins TM, Alix JJP, Kandler RH, Shaw PJ, McDermott CJ. The role of cranial and thoracic electromyography within diagnostic criteria for amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 2016;54:378–85. <http://dx.doi.org/10.1002/mus.25062>.
63. Pugdahl K, Fuglsang-Frederiksen A, Johnsen B, de Carvalho M, Fawcett PRW, Labarre-Vila A, et al. A prospective multicentre study on sural nerve action potentials in ALS. *Clin Neurophysiol* 2008;119:1106–10. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinph.2008.01.010>.
64. Nishiyama A, Warita H, Takahashi T, Suzuki N, Nishiyama S, Tano O, et al. Prominent sensory involvement in a case of familial amyotrophic lateral sclerosis carrying the L8V SOD1 mutation. *Clin Neurol Neurosurg* 2016;150:194–6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clineuro.2016.08.008>.
65. Pouget J. [Electroneuromyographic criteria of amyotrophic lateral sclerosis]. *Rev Neurol (Paris)* 2006. 4S34–4S42.

66. Furtula J, Johnsen B, Christensen PB, Pugdahl K, Bisgaard C, Christensen M-K, et al. *MUNIX and incremental stimulation MUNE in ALS patients and control subjects. Clin Neurophysiol* 2013;124:610–8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinph.2012.08.023>. 66.
67. Barritt AW, Gabel MC, Cercignani M, Leigh PN. *Emerging magnetic resonance imaging techniques and analysis methods in amyotrophic lateral sclerosis. Front Neurol* 2018; 9:1065.
68. Chio` A, Pagani M, Agosta F, et al. *Neuroimaging in amyotrophic lateral sclerosis: insights into structural and functional changes. Lancet Neurol* 2014; 13:1228–1240.
69. Tu S, Menke RA, Talbot K, et al. *Regional thalamic MRI as a marker of widespread cortical pathology and progressive frontotemporal involvement in amyotrophic lateral sclerosis. J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2018; 89:1250 – 1258.
70. Gorges M, Del Tredici K, Dreyhaupt J, et al. *Corticoefferent pathology distribution in amyotrophic lateral sclerosis: in vivo evidence from a meta-analysis of diffusion tensor imaging data. Sci Rep* 2018; 8:15389.
71. Broad RJ, Gabel MC, Dowell NG, et al. *Neurite orientation and dispersion density imaging (NODDI) detects cortical and corticospinal tract degeneration in ALS. J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2019; 90:404–411.
72. Ratai EM, Alshikho MJ, Zu€rcher NR, et al. *Integrated imaging of [11C]-PBR28 && PET, MR diffusion and magnetic resonance spectroscopy 1H-MRS in amyotrophic lateral sclerosis. Neuroimage Clin* 2018; 20:357–364.
73. Floeter MK, Danielian LE, Braun LE, Wu T. *Longitudinal diffusion imaging across the C9orf72 clinical spectrum. J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2018; 89:53 – 60.
74. Agosta F, Spinelli EG, Marjanovic IV, et al. *Unraveling ALS due to SOD1 && mutation through the combination of brain and cervical cord MRI. Neurology* 2018; 90:e707 – e716.
75. Van Laere K, Vanhee A, Verschueren J, et al. *Value of 18fluorodeoxyglucose- positron-emission tomography in amyotrophic lateral sclerosis: a prospective study. JAMA Neurol* 2014; 71:553 – 561.
76. Pagani M, Chio` A, Valentini MC, et al. *Functional pattern of brain FDG-PET in amyotrophic lateral sclerosis. Neurology* 2014; 83:1067 – 1074.
77. Van Weehaeghe D, Ceccarini J, Delva A, et al. *Prospective validation of 18F- FDG brain PET discriminant analysis methods in the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. J Nucl Med* 2016; 57:1238 – 1243.
78. Endo H, Sekiguchi K, Ueda T, et al. *Regional glucose hypometabolic spread within the primary motor cortex is associated with amyotrophic lateral*

sclerosis disease progression: a fluoro-deoxyglucose positron emission tomography study. eNeurol Sci 2017; 6:74 – 79.

79. Sala A, Iaccarino L, Fania PC, et al. Testing the diagnostic accuracy of [18F]FDG-PET in discriminating spinal- and bulbar-onset amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2019; 46:1117 – 1131.
80. Agosta F, Altomare D, Festari C, et al. Clinical utility of FDG-PET in amyotrophic lateral sclerosis and Huntington's disease. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2018; 45:1546 – 1556.
81. Brooks BR, Miller RG, Swash M, Munsat TL, World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases (2000) El Escorial revisited: revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 1:293–9.
82. Tarasiuk J, Kulakowska A, Drozdowski W, Kornhuber J, Lewczuk P (2012) CSF markers in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neural Transm* 119:747–57.
83. Philips, T., and Rothstein, J. D. (2014). Glial cells in amyotrophic lateral sclerosis. *Exp. Neurol.* 262(Pt B), 111–120. doi: 10.1016/j.expneurol.2014.05.015.
84. Silani, V., Pizzuti, A., Redaelli, L. M., Bassani, R., Causarano, I. R., Buscaglia, M., et al. (1987). ALS cerebrospinal fluid enhances human foetal astroglial cell proliferation in vitro. *Adv. Exp. Med. Biol.* 209, 79–81. doi: 10.1007/978-1-4684-5302-7_13.
85. Anneser, J. M. H., Chahli, C., Ince, P. G., Borasio, G. D., and Shaw, P. J. (2004). Glial proliferation and metabotropic glutamate receptor expression in amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 63, 831–840. doi: 10.1093/jnen/63. 8.831.
86. Shahani, N., Nalini, A., Gourie-Devi, M., and Raju, T. R. (1998). Reactive astrogliosis in neonatal rat spinal cord after exposure to cerebrospinal fluid from patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Exp. Neurol.* 149, 295–298. doi: 10.1006/exnr.1997.6651.
87. Lee MK, Cleveland DW. Neuronal intermediate filaments. *Ann Rev Neurosci.* (1996) 19:187–217. doi: 10.1146/annurev.ne.19.030196.001155.
88. Yuan A, Rao MV, Veeranna, Nixon RA. Neurofilaments and neurofilament proteins in health and disease. *Cold Spring Harbor Perspect Biol.* (2017) 9:4. doi: 10.1101/cshperspect.a018309.
89. Rosengren LE, Karlsson JE, Karlsson JO, Persson LI, Wikkelso C. Patients with amyotrophic lateral sclerosis and other neurodegenerative diseases have increased levels of neurofilament protein in CSF. *J Neurochem.* (1996) 67:2013–8. doi: 10.1046/j.1471-4159.1996.67052013.x.

90. Xu Z, Henderson RD, David M, McCombe PA. Neurofilaments as biomarkers for amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE* (2016) 11:e0164625. doi: 10.1371/journal.pone.0164625.
91. Weydt P, Oeckl P, Huss A, Muller K, Volk AE, Kuhle J, et al. Neurofilament levels as biomarkers in asymptomatic and symptomatic familial amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol.* (2016) 79:152–8. doi: 10.1002/ana.24552.
92. Feneberg E, Oeckl P, Steinacker P, Verde F, Barro C, Van Damme P, et al. Multicenter evaluation of neurofilaments in early symptom onset amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* (2018) 90:e22–e30. doi: 10.1212/WNL.0000000000004761.
93. Poesen K, De Schaepdryver M, Stubendorff B, Gille B, Muckova P, Wendler S, et al. Neurofilament markers for ALS correlate with extent of upper and lower motor neuron disease. *Neurology* (2017) 88:2302–9. doi: 10.1212/WNL.0000000000004029.
94. Benatar M, Wu J, Andersen PM, Lombardi V, Malaspina A. Neurofilament light: a candidate biomarker of presymptomatic amyotrophic lateral sclerosis and phenoconversion. *Ann Neurol.* (2018) 84:130–9. doi: 10.1002/ana. 25276.
95. Gendron TF, Group CONS, Daugherty LM, Heckman MG, Diehl NN, Wu J, et al. Phosphorylated neurofilament heavy chain: A biomarker of survival for C9ORF72-associated amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol.* (2017) 82:139–46. doi: 10.1002/ana.24980.
96. Zetterberg H, Jacobsson J, Rosengren L, Blennow K, Andersen PM. Cerebrospinal fluid neurofilament light levels in amyotrophic lateral sclerosis: impact of SOD1 genotype. *Eur J Neurol.* (2007) 14:1329–33. doi: 10.1111/j.1468-1331.2007.01972.x.
97. Codron, P., Cassereau, J., Eyer, J. & Letournel, F. Neuronal Intermediate Filaments in Amyotrophic Lateral Sclerosis. in *Update on Amyotrophic Lateral Sclerosis* (InTech, 2016). doi:10.5772/63161.
98. Di Rosa M, Malaguarnera G, De Gregorio C, D'Amico F, Mazzarino MC, Malaguarnera L. Modulation of chitotriosidase during macrophage differentiation. *Cell Biochem Biophys.* (2013) 66:239–47. doi: 10.1007/s12013-012-9471-x.
99. Di Rosa M, De Gregorio C, Malaguarnera G, Tuttobene M, Biazzo F, Malaguarnera L. Evaluation of AMCase and CHIT-1 expression in monocyte macrophages lineage. *Mol Cell Biochem.* (2013) 374:73–80. doi: 10.1007/s11010-012-1506-5.
100. Starossom SC, Campo Garcia J, Woelfle T, Romero-Suarez S, Olah M, Watanabe F, et al. Chi3l3 induces oligodendrogenesis in an experimental

- model of autoimmune neuroinflammation. Nat Commun. (2019) 10:217. doi: 10.1038/s41467-018-08140-7.*
101. *Elias JA, Homer RJ, Hamid Q, Lee CG. Chitinases and chitinase-like proteins in T2H inflammation and asthma. J Allergy Clin Immunol. (2005) 116:497–500. doi: 10.1016/j.jaci.2005.06.028.*
 102. *Hong JY, Kim M, Sol IS, Kim KW, Lee CM, Elias JA, et al. Chitotriosidase inhibits allergic asthmatic airways via regulation of TGF- β expression and Foxp3+ Treg cells. Allergy. (2018) 73:1686–99. doi: 10.1111/all.13426.*
 103. *Varghese AM, Sharma A, Mishra P, Vijayalakshmi K, Harsha HC, Sathyaprabha TN, et al. Chitotriosidase - a putative biomarker for sporadic amyotrophic lateral sclerosis. Clin Proteomics. (2013) 10:19. doi: 10.1186/1559-0275-10-19.*
 104. *Gaur, N., Perner, C., Witte, O. W. & Grosskreutz, J. The Chitinases as Biomarkers for Amyotrophic Lateral Sclerosis: Signals From the CNS and Beyond. Front Neurol 11, (2020).*
 105. *Byrne S, Walsh C, Lynch C, et al. Rate of familial amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review and meta-analysis. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2011;82:623–7.*
 106. *He J, Tang L, Benyamin B, et al. C9orf72 hexanucleotide repeat expansions in Chinese sporadic amyotrophic lateral sclerosis. Neurobiol Aging 2015;36:2660.e1–e8.*
 107. *Smith BN, Newhouse S, Shatunov A, et al. The C9ORF72 expansion mutation is a common cause of ALS+/-FTD in Europe and has a single founder. Eur J Hum Genet 2013;21:102–8.*
 108. *Ravits JM, La Spada AR. ALS motor phenotype heterogeneity, focality, and spread: deconstructing motor neuron degeneration. Neurology 2009; 73: 805– 811.*
 109. *Turner MR, Wicks P, Brownstein CA, et al. Concor- dance between site of onset and limb dominance in amyotrophic lateral sclerosis. J Neurol Neurosurg Psy- chiatry 2011; 82: 853–854.*
 110. *Simon NG, Lomen-Hoerth C, Kiernan MC. Patterns of clinical and electrodiagnostic abnormalities in early amyotrophic lateral sclerosis. Muscle Nerve 2014; 50: 894–899.*
 111. *Motor Neurone Disease: Assessment and Management. London, UK: National Clinical Guideline Centre, 2016. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK349620/>.*
 112. *Jenkins TM, Alix JJP, Fingret J, et al. Correction to: Longitudinal multi-modal muscle-based biomarker assessment in motor neuron disease. J Neurol 2020; 267: 257–258.*

113. Parvizi J, Anderson SW, Martin CO, Damasio H, Damasio AR. Pathological laughter and crying: a link to the cerebellum. *Brain* 2001; 124: 1708–1719.
114. Al-Chalabi A, Hardiman O, Kiernan MC, Chio A, Rix-Brooks B, van den Berg LH. Amyotrophic lateral sclerosis: moving towards a new classification system. *Lancet Neurol* 2016; 15: 1182–1194.
115. Pringle CE, Hudson AJ, Munoz DG, Kiernan JA, Brown WF, Ebers GC. Primary lateral sclerosis. Clinical features, neuropathology and diagnostic criteria. *Brain* 1992; 115: 495–520.
116. Finegan E, Chipika RH, Li Hi Shing S, Hardiman O, Bede P. Pathological crying and laughing in motor neuron disease: pathobiology, screening, intervention. *Front Neurol* 2019; 10: 260.
117. Wijesekera LC, Mathers S, Talman P, et al. Natural history and clinical features of the flail arm and flail leg ALS variants. *Neurology* 2009; 72: 1087–1094.
118. Niven E, Newton J, Foley J, et al. Validation of the Edinburgh cognitive and behavioural amyotrophic lateral sclerosis screen (ECAS): a cognitive tool for motor disorders. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener* 2015; 16: 172–179.
119. Strong MJ, Abrahams S, Goldstein LH, et al. Amyotrophic lateral sclerosis – frontotemporal spectrum disorder (ALS-FTSD): revised diagnostic criteria. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener*. 2017; 18: 153–174.
120. Traynor BJ, Codd MB, Corr B, Forde C, Frost E, Hardiman O. Amyotrophic lateral sclerosis mimic syndromes: a population-based study. *Arch Neurol* 2000; 57: 109–113.
121. Huijbers MG, Niks EH, Klooster R, et al. Myasthenia gravis with muscle specific kinase antibodies mimicking amyotrophic lateral sclerosis. *Neuromuscul Disord* 2016; 26: 350–353.
122. Longinetti, E. & Fang, F. Epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: an update of recent literature. *Curr Opin Neurol* 32, 771–776 (2019).
123. Leighton DJ, Newton J, Stephenson LJ, et al. Changing epidemiology of motor & neurone disease in Scotland. *J Neurol* 2019; 266:817 – 825.
124. Bhattacharya R, Harvey RA, Abraham K, et al. Amyotrophic lateral sclerosis among patients with a Medicare Advantage prescription drug plan: prevalence, survival and patient characteristics. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener* 2019; 20:251 – 259.

125. *De Marchi F, Sarnelli MF, Solara V, et al. Depression and risk of cognitive dysfunctions in amyotrophic lateral sclerosis. Acta Neurol Scand 2019; 139:438 – 445.*
126. *Goutman SA, Boss J, Patterson A, et al. High plasma concentrations of organic pollutants negatively impact survival in amyotrophic lateral sclerosis. J Neurol, Neurosurg, Psychiatry 2019; 90:907–912.*
127. *Moglia C, Calvo A, Grassano M, et al. Early weight loss in amyotrophic lateral sclerosis: outcome relevance and clinical correlates in a population-based cohort. J Neurol, Neurosurg, Psychiatry 2019; 90:666–673.*
128. *Dorst J, Chen L, Rosenbohm A, et al. Prognostic factors in ALS: a comparison & between Germany and China. J Neurol 2019; 266:1516 – 1525.*
129. *Luna J, Diagana M, Ait Aissa L, et al. Clinical features and prognosis of amyotrophic lateral sclerosis in Africa: the TROPALS study. J Neurol, Neurosurg, Psychiatry 2019; 90:20 – 29.*
130. *Osuntokun BO, Adeuja AO, Bademosi O. The prognosis of motor neuron disease in Nigerian Africans: a prospective study of 92 patients. Brain: J Neurol 1974; 97:385 – 394.*
131. *Radhakrishnan K, Ashok PP, Sridharan R, Mousa ME. Descriptive epidemiology of motor neuron disease in Benghazi, Libya. Neuroepidemiology 1986; 5:47 – 54.*
132. *Abdulla MN, Sokrab TE, el Tahir A, et al. Motor neurone disease in the tropics: findings from Sudan. East Afr Med J 1997; 74:46 – 48.*
133. *Knibb JA, Keren N, Kulka A, Leigh PN, Martin S, Shaw CE, Tsuda M, Al-Chalabi A (2016) A clinical tool for predicting survival in ALS. J Neurol Neurosurg Psychiatry 87:1361–1367.*
134. *Mitsumoto H, Brooks BR, Silani V. Clinical trials in amyotrophic lateral sclerosis: why so many negative trials and how can trials be improved? Lancet Neurol 2014; 13: 1127–1138.*
135. *Writing G, Edaravone ALSSG. Safety and efficacy of edaravone in well defined patients with amyotrophic lateral sclerosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. Lancet Neurol 2017; 16: 505–512.*
136. *Al-Chalabi A, Andersen PM, Chandran S, et al. July 2017 ENCALS statement on edaravone. Amyotroph Lat- eral Scler Frontotemporal Degener 2017; 18: 471–474.*
137. *Mora JS, Genge A, Chio A, et al. Masitinib as an add-on therapy to riluzole in patients with amyotrophic lateral sclerosis: a randomized clinical trial. Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener 2020; 21: 5–14.*

138. Andersen PM, Abrahams S, Borasio GD, et al. EFNS guidelines on the clinical management of amyotrophic lateral sclerosis (MALS) – revised report of an EFNS task force. *Eur J Neurol* 2012; 19: 360–375.
139. Carreras-Delgado, J. L., Pérez-Dueñas, V., Riola-Parada, C. & García-Cañamaque, L. PET/RM: ¿un lujo o una necesidad? *Rev Esp Med Nucl Imagen Mol* 35, 313–320 (2016).
140. Shah SN, Huang SS (2015) Hybrid PET/MR imaging: physics and technical considerations. *Abdom Imaging* 40:1358–1365.
141. Levin DN, Pelizzari CA, Chen GT, Chen CT, Cooper MD (1988) Retrospective geometric correlation of MR, CT, and PET images. *Radiology* 169:817–823.
142. Wahl RL, Quint LE, Cieslak RD, et al. (1993) “Anatometabolic” tumor imaging: fusion of FDG PET with CT or MRI to localize foci of increased activity. *J Nucl Med* 34:1190–1197.
143. https://www.researchgate.net/figure/FDG-PET-CT-is-a-hybrid-imaging-technique-which-fuses-functional-PET-data-with_fig21_307659692.
144. Veit-Haibach P, Kuhn FP, Wiesinger F, Delso G, von Schulthess G (2013) PET-MR imaging using a tri-modality PET/CT-MR system with a dedicated shuttle in clinical routine. *Magn Reson Mater Phys Biol Med* 26:25–35.
145. Bindseil GA, Gilbert KM, Scholl TJ, Handler WB, Chronik BA (2011) First image from a combined positron emission tomography and field-cycled MRI system. *Magn Reson Med* 66:301–305.
146. Schäfer JF, Gatidis S, Schmidt HB, Guckel B, Bezrukov I, Plannenberga CA, et al. Simultaneous whole-body PET/MR imaging in comparison to PET/CT in pediatric oncology: Initial results. *Radiology*. 2014;273:220–31.
147. Werner MK, Schmidt H, Schwenzler NF. MR/PET. A new challenge in hybrid imaging. *AJR*. 2012;199:272–7.
148. Barthel H, Schoeter ML, Hoffman KT, Sabri O. PET/MR in dementia and other neurodegenerative diseases. *Semin Nucl Med*. 2015;45:224–33.
149. Neuner I, Kaffanke JB, Langen KJ, Kops ER, Tellmann L, Stoffels G, et al. Multimodal imaging utilizing integrated MR-PET for human brain tumour assessment. *Eur Radiol*. 2012;22:2568–80.
150. Barbosa FG, von Schulthess G, Veit-Haibach P. Workflow in Simultaneous PET/MRI. *Semin Nucl Med*. 2015;45:332–44.
151. Reiner CS, Stolzmann P, Husmann L, Burger IA, Hüllner MW, Schaefer NG, et al. Protocol requirements and diagnostic value of PET/MR imaging for liver metastasis detection. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2014;41:649–58.

152. Martínez-Möller A, Eiber M, Nekolla SG, Souvatzoglou M, Drzezga A, Ziegler S, et al. Workflow and scan protocol considerations for integrated whole-body PET/MRI in oncology. *J Nucl Med*. 2012;53:1–12.
153. Zanovello, M. et al. Brainstem glucose hypermetabolism in ALS/FTD and shorten survival: a ¹⁸F-FDG PET/MR study. *Journal of Nuclear Medicine* jnumed.121.262232 (2021) doi:10.2967/jnumed.121.262232.
154. Pagani M, Chio A, Valentini MC, et al. Functional pattern of brain FDG-PET in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology*. 2014;83:1067–1074.
155. Van Laere K, Vanhee A, Verschueren J, et al. Value of 18fluorodeoxyglucose-positron-emission tomography in amyotrophic lateral sclerosis: a prospective study. *JAMA Neurol*. 2014;71:553–561.
156. Chio A, Pagani M, Agosta F, Calvo A, Cistaro A, Filippi M. Neuroimaging in amyotrophic lateral sclerosis: insights into structural and functional changes. *Lancet Neurol*. 2014;13:1228–1240.
157. Cistaro A, Pagani M, Montuschi A, et al. The metabolic signature of C9ORF72-related ALS: FDG PET comparison with nonmutated patients. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2014;41:844–852.
158. Canosa A, Pagani M, Cistaro A, et al. 18F-FDG-PET correlates of cognitive impairment in ALS. *Neurology*. 2016;86:44–49.
159. Johansson A, Engler H, Blomquist G, et al. Evidence for astrocytosis in ALS demonstrated by [11C](L)-deprenyl-D2 PET. *J Neurol Sci*. 2007;255:17–22.
160. Turner MR, Cagnin A, Turkheimer FE, et al. Evidence of widespread cerebral microglial activation in amyotrophic lateral sclerosis: an [11C](R)-PK11195 positron emission tomography study. *Neurobiol Dis*. 2004;15:601–609.
161. Bevan-Jones WR, Cope TE, Jones PS, et al. Neuroinflammation and protein aggregation co-localize across the frontotemporal dementia spectrum. *Brain*. 2020;143: 1010–1026.
162. Zimmer ER, Parent MJ, Souza DG, et al. 18F-FDG PET signal is driven by astroglial glutamate transport. *Nat Neurosci*. 2017;20:393–395.
163. Zanovello, M. et al. Brain Stem Glucose Hypermetabolism in Amyotrophic Lateral Sclerosis/Frontotemporal Dementia and Shortened Survival: An 18F-FDG PET/MRI Study. *J Nucl Med* **63**, 777–784 (2022).
164. Philips T, Robberecht W (2011) Neuroinflammation in amyotrophic lateral sclerosis: role of glial activation in motor neuron disease. *Lancet Neurol* **10**:253–263.

165. *Troost D, Van den Oord JJ, Vianney de Jong JM (1990) Immunohistochemical characterization of the inflammatory infiltrate in amyotrophic lateral sclerosis. Neuropathol Appl Neurobiol 16:401–10.*
166. *McCombe PA, Henderson RD (2011) The Role of immune and inflammatory mechanisms in ALS. Curr Mol Med 11:246–54.*