

## L'effetto densità dei motoneuroni sulla curva di depauperamento motoneuronale nella sclerosi laterale amiotrofica

Paolo PINELLI (a), Fabrizio PISANO (b) e Giacinta MISCIO (b)

a) *Divisione di Scienze Biomediche, Ospedale San Paolo, Milano*

b) *Divisione di Neurologia, Servizio di Neurofisiopatologia, Fondazione Salvatore Maugeri, Clinica del Lavoro e della Riabilitazione, Istituto di Riabilitazione di Veruno (Novara)*

**Riassunto.** - Sono stati esaminati clinicamente ed elettromiograficamente in uno studio longitudinale, muscoli paretici e muscoli ancora clinicamente normali di 9 pazienti affetti da sclerosi laterale amiotrofica (SLA) e di 3 pazienti affetti da amiotrofia focale benigna (AFB). I punteggi della forza muscolare (secondo la scala MRC) sono dipendenti dai motoneuroni (MN) sia periferici che centrali. Essi sono stati corretti con valutazioni semiquantitative positive del numero di potenziali di unità motorie giganti e negative del numero di potenziali di fascicolazioni e fibrillazione. I punteggi complessivi hanno presentato una correlazione con la percentuale di unità motorie residue innervate dai MN centrali ricavata dall'ampiezza media e dal numero di spikes durante contrazione volontaria massimale. Si può osservare che nella SLA la perdita di unità motorie diminuisce negli ultimi 10 mesi di malattia; una possibile interpretazione sta nella ridotta densità del pool di MN sani in questa fase di malattia. Se ne deduce quindi che rispetto alla fase di accelerazione del processo patologico per l'effetto tossico dovuto alla quantità abnormemente alta di glutammato liberato dai MN lesi, le cellule più vicine risultano meno esposte al possibile danno neurotossico, a causa della riduzione della densità motoneuronale.

*Parole chiave:* sclerosi laterale amiotrofica, acido glutammico, elettromiografia, reinnervazione collaterale.

**Summary** (*Motoneuron density effect on motoneuron impoverishment curve in amyotrophic lateral sclerosis*).

- We have clinically and electromyographically examined, during a follow-up study, weakened muscles and still clinically normal muscles of 9 patients affected by amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and of 3 patients affected by focal benign amyotrophy (FBA). MRC scores corrected with positive semiquantitative evaluations of the number of giant motor unit (MU) action potentials and with negative evaluations of the number of fasciculations and fibrillations potentials have been found to linearly correlate with the percentage of the residual MUs calculated from the mean amplitude and the spike number during maximal voluntary contraction. A main finding is that the loss of MUs slows down in the last 10 months of the disease. It follows that after a phase when the pathological process was accelerated by the toxic effect due to the abnormally high concentration of glutamate released by dead motoneurons, the residual cells because of the decreased motoneuron density are less exposed to the possible neurotoxic damage.

*Key words:* amyotrophic lateral sclerosis, glutammic acid, electromyography, collateral sprouting.

### Introduzione

La sclerosi laterale amiotrofica (SLA) è una patologia degenerativa del sistema nervoso che interessa il motoneurone (MN), sia superiore che inferiore, e la cui patogenesi è tuttora ignota. Negli ultimi dieci anni la ricerca si è orientata secondo tre linee principali di pensiero che hanno sostenuto tre differenti teorie patogenetiche: a) genetica: un possibile deficit di superossido dismutasi potrebbe essere a sua volta causa di processi di perossidazione [1-3]; b) tossica: accumulo di glutammato, potente stimolatore eccitotossico [4]; c) autoimmunitaria: produzione di anticorpi anti-canali del calcio [5].

Noi condividiamo l'ipotesi che la patogenesi della SLA debba essere interpretata come l'azione combinata di un fattore primario che agisca come *primum movens* (per esempio un fattore genetico) a cui nelle fasi intermedie, si aggiunga un fattore secondario (accumulo di glutammato, fallimento di un fattore promuovente lo sprouting o alterazione immunitaria) che influenzi negativamente la progressione della malattia [4, 6-8].

Particolare interesse sembra rivestire l'acido glutammico, come si evince dai dati più recenti emergenti sul ruolo di tale sostanza in diverse malattie degenerative che includono oltre alla SLA, il morbo di Parkinson e la malattia di Alzheimer.

Per avvalorare tali considerazioni abbiamo ritenuto utile effettuare studi elettromiografici longitudinali che descrivano e quantifichino la progressione della perdita dei MN. Sebbene studi di questo genere siano stati compiuti per quanto riguarda i MN periferici stimolati elettricamente [9], non è mai stata applicata una metodologia che tenga calcolo anche dei MN centrali che sono colpiti nella SLA, talora in fase iniziale.

Al fine di meglio indagare e comprendere gli eventi che influenzano la progressione della malattia può essere utile, inoltre, la comparazione con un'altra patologia di tipo degenerativo ma a progressione molto più lenta, cioè l'amiotrofia focale benigna (AFB).

## Metodologia

Uno studio preliminare è stato condotto sul muscolo opponente del pollice di una paziente di 61 anni affetta da SLA, dall'esordio della malattia fino al 32° mese. Le indagini sono iniziate quando tale muscolo era ancora clinicamente sano (MRC = 5) e sono proseguite fino a quando è diventato gravemente paretico (MRC = 2) (dati personali, non pubblicati). Si sono effettuati rilievi elettromiografici di superficie durante contrazione volontaria massimale. Per tale scopo è stato utilizzato l'elettromiografo Medelec Mystro Plus e le registrazioni sono state effettuate con elettrodi di superficie (Dantec 13L20).

**Tabella 1.** - Sclerosi laterale amiotrofica

Pazienti			Prima osservazione					Intervallo (mesi)	Osservazione finale				
n.	sesso	età	MRC	PUMG	FAS	FIB	SGCEm		MRC	PUMG	FAS	FIB	SGCEm
<b>Muscoli paretici</b>													
1	m	55	4	0	-1	0	3	47	2	+0,5	0	0	2,5
2	m	61	3	+0,5	0	0	3,5	36	2	+0,5	-0,5	-0,5	1,5
3	f	67	3	+0,5	0	0	3,5	35	3	+0,5	-1	0	2,5
4	m	58	3	+0,5	-0,5	0	3	34	3	+0,5	-0,5	-0,5	2,5
5	f	53	4	+0,5	-0,5	-0,5	3,5	41	2	+0,5	-1	0	1,5
6	m	64	4	+0,5	-0,5	-0,5	3,5	43	2	+0,5	-0,5	0	1,5
7	m	50	4	0	0	-0,5	3,5	38	2	+0,5	-0,5	0	1,5
8	f	54	4	+0,5	-0,5	-0,5	3,5	35	3	+0,5	-1	0	2,5
9	f	73	3	+0,5	0	0	3,5	37	2	+0,5	-0,5	-0,5	1,5
<b>Muscoli normali</b>													
1	m	55	5	0	0	0	5	47	1	+0,5	-0,5	0	1
2	m	61	5	0	0	0	5	36	1	0	-0,5	0	0,5
3	f	67	5	0	-0,5	0	4,5	35	2	+0,5	-0,5	-0,5	1,5
4	m	58	5	0	0	0	5	34	1	+0,5	0	-0,5	1
5	f	53	5	0	0	0	5	41	1	+0,5	0	0	1,5
6	m	64	5	0	-0,5	0	4,5	43	1	0	-0,5	0	0,5
7	m	50	5	0	-0,5	0	4,5	38	2	+0,5	-0,5	-0,5	1,5
8	f	54	5	0	-0,5	-0,5	4	35	1	+0,5	0	-0,5	1
9	f	73	5	0	-0,5	0	4,5	37	1	0	-0,5	0	0,5

MRC: Medical Research Council; PUMG: potenziali di unità motoria giganti; FAS: fascicolazioni; FIB: fibrillazione; SGCEm: score globale clinico elettromiografico medio.

Sono stati quindi misurati i seguenti parametri: 1) numero delle spikes emergenti dal pattern interferenziale, calcolato su una finestra temporale di 300 ms, 2) l'ampiezza media della contrazione volontaria massimale [10].

Abbiamo quindi identificato uno "score" clinico ed elettromiografico globale (SGCE), quantificando la forza (scala MRC) e tenendo conto dei parametri neurofisiologici (segni di reinnervazione espressi da una percentuale di potenziali di UM giganti - PUMG - pari ad almeno il 25% delle UM registrabili [11]; segni di denervazione espressi da potenziali di fascicolazione e fibrillazione). Al valore di MRC sono stati sommati algebricamente punteggi di +0,5 o +1 a seconda del numero di PUMG registrati, punteggi di -0,5 o -1 in base all'entità dei

potenziali di fascicolazione e di fibrillazione osservati. La somma di tali punteggi definisce il cosiddetto SGCE.

La valutazione è stata ripetuta 6, 24, 32 mesi dopo il primo esame.

Abbiamo quindi applicato tale metodologia ad un gruppo di 9 pazienti SLA e 3 pazienti AFB, questi ultimi classificati secondo i criteri descritti da Serratrice [12]. I pazienti sono stati selezionati in base alla presenza di almeno tre distretti muscolari sani e tre colpiti con differente grado di gravità. Su tali gruppi di muscoli è stato calcolato lo SGCE medio. Gli esami sono stati ripetuti in due tempi successivi (6 e 24 mesi) al primo studio.

Le caratteristiche cliniche dei pazienti SLA e AFB sono riportate rispettivamente nelle Tab. 1 e 2.

**Tabella 2.** - Amiotrofia focale benigna

Pazienti			Prima osservazione					Intervallo (mesi)	Osservazione finale				
n.	sezzo	età	MRC	PUMG	FAS	FIB	SGCEm		MRC	PUMG	FAS	FIB	SGCEm
<b>Muscoli paretici</b>													
10	m	41	4	+0,5	0	0	4,5	41	4	+0,5	-0,5	0	4
			3	+0,5	0	0	3,5	"	3	+0,5	0	0	3,5
			4	+0,5	0	0	4,5	"	4	+0,5	0	0	4,5
11	f	59	4	+0,5	-0,5	0	4	44	4	+0,5	-0,5	-0,5	3,5
			4	+0,5	-0,5	0	4	"	3	+0,5	-1	0	2,5
			4	+0,5	-1	0	3,5	"	4	+0,5	-1	0	3,5
12	m	60	3	+0,5	-0,5	-0,5	2,5	39	2	+0,5	-1	0	1,5
			3	+0,5	-0,5	0	3	"	2	+0,5	-1	0	1,5
			3	+0,5	-1	0	2,5	"	3	+0,5	-1	-1	1,5
<b>Muscoli normali</b>													
10	m	41	5	0	0	0	5	41	5	0	0	0	5
			5	0	0	0	0	"	5	0	-0,5	0	4,5
			5	0	-0,5	0	4,5	"	5	0	0	0	5
11	f	59	5	0	0	0	5	44	5	+0,5	0	0	4,5
			5	0	0	0	5	"	5	0	0	0	5
			5	0	0	0	5	"	5	0	0	0	4,5
12	m	60	5	0	0	0	5	39	5	0	-0,5	0	4,5
			5	0	-0,5	0	4,5	"	5	0	-0,5	0	5
			5	0	0	0	5	"	5	0	-0,5	0	4,5

MRC: Medical Research Council; PUMG: potenziali di unità motoria giganti; FAS: fascicolazioni; FIB: fibrillazione; SGCEm: score globale clinico elettromiografico medio.

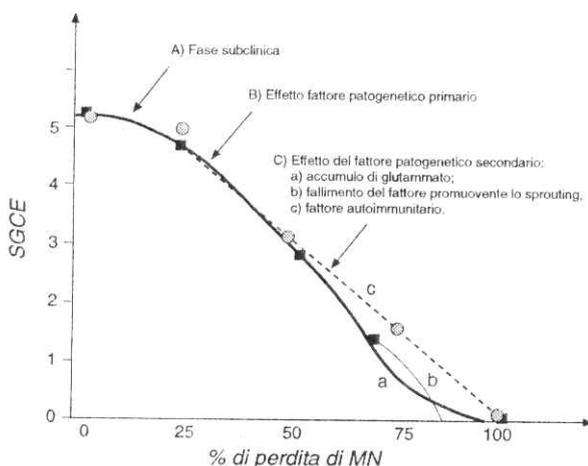
## Risultati

I risultati dello studio neurofisiologico condotto sui pazienti SLA e AFB sono riportati rispettivamente nelle Tab. 1 e 2.

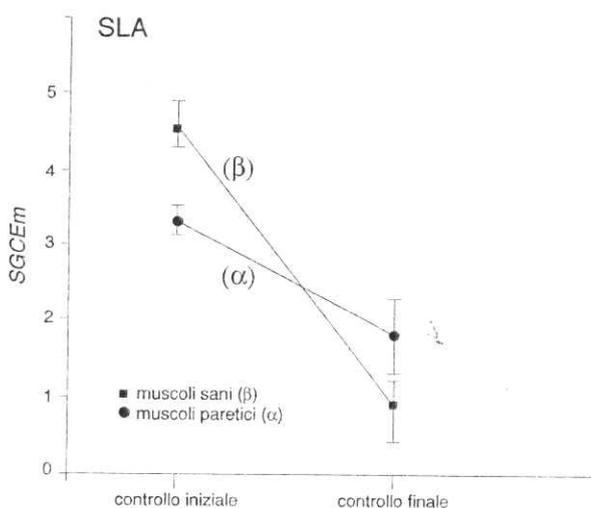
La progressione della malattia può essere descritta mediante curve teoriche di perdita motoneuronale (Fig.1) durante fasi successive:

a) fase subclinica che precede i segni clinici senza un misurabile decremento nel pool motoneuronale (pendenza lieve, Fig.1A).

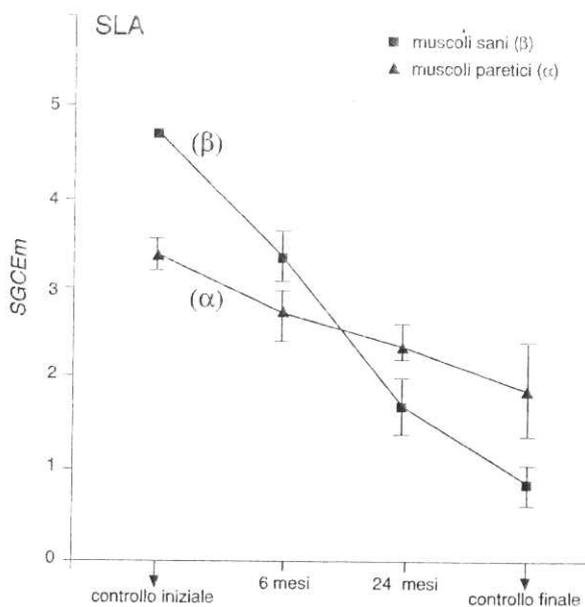
b) fase iniziale in cui la pendenza della curva diventa più ripida e può dipendere dall'aggressione da parte del fattore letale primario (Fig.1B).



**Fig. 1.** - Curve teoriche di progressione temporale della perdita di motoneuroni nella SLA. SGCE: score globale clinico ed elettromiografico. MN: motoneuroni.



**Fig. 2.** - Valore medio del SGCE (score globale clinico ed elettromiografico medio, SGCEm) di muscoli inizialmente paretici ( $\alpha$ ) e sani ( $\beta$ ) in 9 pazienti affetti da sclerosi laterale amiotrofica (SLA), in due osservazioni a tempi diversi.



**Fig. 3.** - Valore medio del SGCE di muscoli inizialmente paretici ( $\alpha$ ) e sani ( $\beta$ ) in 4 pazienti affetti da SLA, in quattro osservazioni a tempi diversi.

c) fase di ulteriore incremento di pendenza della curva per l'intervento di un fattore patogenetico secondario quale l'accumulo di acido glutammico o il venir meno di un fattore promuovente lo sprouting (si avrebbe viceversa un andamento lineare della pendenza se il fattore fosse di tipo immunitario) (Fig.1C).

d) fase terminale in cui la pendenza della curva può subire delle variazioni a seconda dell'effetto della progressiva riduzione della densità motoneuronale che riduce almeno parzialmente l'effetto tossico dell'acido glutammico (riduzione di pendenza, Fig.1Ca), ma può aggravare le conseguenze dovute al venir meno di un fattore promuovente lo sprouting (aumento di pendenza, Fig.1Cb).

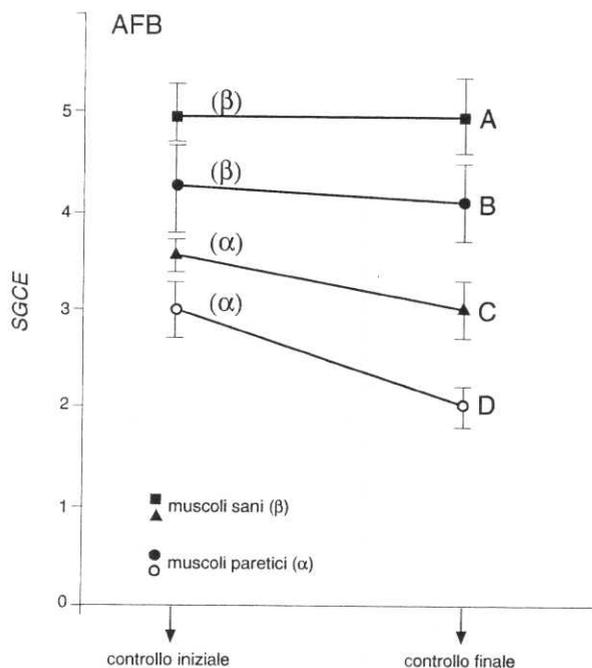
Le Fig. 2 e 3 mostrano l'andamento dello score globale clinico elettromiografico medio (SGCEm) nei diversi gruppi muscolari esaminati dei pazienti con SLA.

Dai risultati ottenuti in questo campione limitato di pazienti, emerge che durante le fasi intermedie del processo patologico, la perdita di MN è più rapida nei muscoli non gravemente coinvolti nella fase iniziale (beta), rispetto a quelli già compromessi nelle fasi di esordio della malattia (alfa).

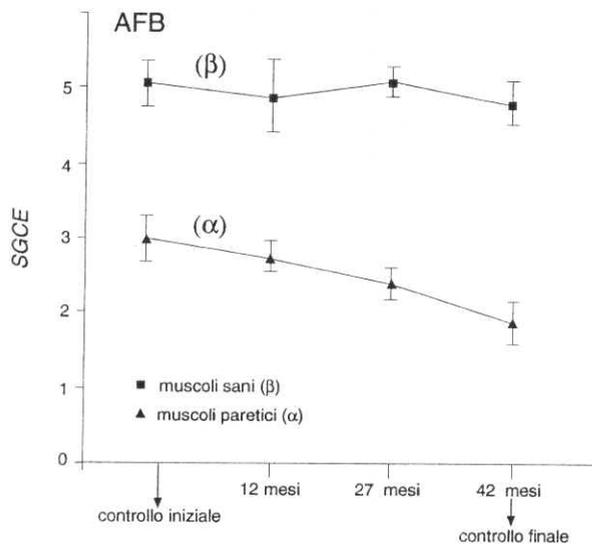
Nei pazienti con AFB, invece, la pendenza della curva dipende dal grado di compromissione iniziale dei muscoli esaminati, come risulta dalle Fig. 4 e 5.

## Conclusioni

La SLA si presenta con tre fasi di evoluzione documentabili mediante tecniche neurofisiologiche [13, 14]: 1) perdita di MN senza segni clinici di denervazione; 2) MN con segni di reinnervazione collaterale; 3) MN normali residui con o senza segni di reinnervazione collaterale.



**Fig. 4.** - Valore del SGCE di muscoli inizialmente parietici ( $\alpha$ ) e sani ( $\beta$ ) in un paziente affetto da amiotrofia focale benigna (AFB), in due osservazioni a tempi diversi.



**Fig. 5.** - Valore del SGCE di muscoli inizialmente parietici ( $\alpha$ ) e sani ( $\beta$ ) in un paziente affetto da amiotrofia focale benigna (AFB) in quattro osservazioni a tempi diversi.

La prima fase potrebbe essere innescata da un difetto nella nucleotide difosfatasi che può determinare un eccesso di uracile; a sua volta tale accumulo può provocare un danno al DNA [15,16]. La morte dei MN in questo caso non sarebbe di tipo apoptotico, cioè non determinerebbe lesioni della membrana con fuoriuscita di sostanze neurotossiche [17], ma potrebbe rientrare in

quei processi di patologia parabiologica che includono lunghe fasi di alterazioni della membrana. Pertanto nella seconda fase i MN possono subire l'azione anche di un fattore patogenetico secondario.

Rothstein ha dimostrato nella SLA un alterato trasporto del glutammato da parte della glia [4]; l'accumulo di glutammato extracellulare conseguente alla necrosi di alcuni MN provocata dal fattore letale primario e non allontanato dalle cellule gliali, determina la morte selettiva dei MN adiacenti. Già 5  $\mu\text{mol/l}$  di glutammato sono neurotossiche: la morte di ogni cellula può determinare la fuoriuscita di ben 10  $\mu\text{mol/l}$  di glutammato. Tale effetto neurotossico selettivo da parte del glutammato, può avvenire probabilmente tramite un meccanismo di danno trasverso, cioè ai MN sani adiacenti e la sua entità dipende dalla densità motoneuronale [18], per cui tale effetto diminuisce con il progressivo allontanamento dei MN per un aumento del deauperamento degli stessi.

Un effetto trasverso è anche ipotizzabile nel caso della perdita del fattore promuovente lo sprouting. In questa situazione, però, essendo tale fattore un compenso alla denervazione in atto, la diminuzione della densità motoneuronale dovrebbe ridurre la sua efficacia e la progressione del processo patologico di conseguenza risulterebbe ulteriormente accelerata.

Il problema della distanza tra i MN sarebbe invece irrilevante nel caso dell'intervento di un fattore immunologico.

Le curve teoriche che abbiamo descritto ci sembrano utili per differenziare le successive fasi di perdita motoneuronale, riflettendo quindi gli eventi che via via caratterizzano il processo patologico.

Nel caso dei pazienti affetti da SLA, le alterazioni patologiche più precoci avvengono in una fase preclinica mentre la fase clinica iniziale deve essere considerata già come una fase intermedia di malattia.

Noi abbiamo riscontrato un rallentamento della perdita di MN nei pazienti SLA nelle fasi terminali della malattia; quindi ciò risulta essere in accordo con l'ipotesi di un fattore neurotossico secondario autopropagantesi innescato dal processo letale primario. Esso può più precisamente essere identificato da un'aggressione da parte dell'acido glutammico. Se questo evento secondario giustifica di per sé quindi un trattamento antiglutammico, andrebbe comunque tenuta presente la bipolarità d'azione di tale aminoacido. Infatti il glutammato a dosi normali può addirittura esercitare effetti positivi sulla stessa rigenerazione collaterale e sulla sintesi di enzimi come la nucleoside-difosfatasi, carente secondo Gasic *et al.* nella SLA [19].

Ricevuto l'11 marzo 1996.

Accettato il 1 luglio 1996.

## BIBLIOGRAFIA

1. SIDDIQUE, T., FIGELWICZ, D.A., PERICAK-VANCE, M.A. *et al.* 1991. Linkage of a gene causing familial amyotrophic lateral sclerosis to chromosome 21 and evidence of genetic locus heterogeneity. *N. Engl. J. Med.* **324**: 1381-1384.
2. ROSEN, D.R., SIDDIQUE, T. & PATTERSON, D. 1993. Mutations Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial ALS. *Nature* **362**: 59-62.
3. MAZZARELLO, P. & POLONI, M. 1988. Tiamine monophosphate diminution; identity of tiamine pyrophosphorylase to nucleotide-dephosphorylase and possible pathogenetic implications for DNA damage in ALS. In: *ALS*. Elsevier Sci. Publ., Amsterdam. p. 319-324.
4. ROTHSTEIN, J.D., MARTIN, L.J. & KUNCL, R.W. 1992. Decreased glutamate transport by the brain and spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *N. Engl. J. Med.* **326**(22): 1464-1468.
5. APPEL, S.H. 1993. Excitotoxic neuronal cell death in amyotrophic lateral sclerosis. *Trends Neurosci.* **16**: 3-5.
6. GURNEY, E., BELTON, A.C., CASHMAN, N. & ANTEL, J.P. 1984. Inhibition of terminal axonal sprouting by serum from patients with amyotrophic lateral sclerosis. *N. Eng. J. Med.* **311**: 933-939.
7. PINELLI, P., PISANO, F., CERIANI, F. & MISCIO, G. 1991. EMG evaluation of motoneuron sprouting in ALS. *It. J. Neurol. Sci.* **12**: 359-367.
8. BROWN, M.C., HOLLAND, R.L. & HOPKINS, W.G. 1981. Motor nerve sprouting. *Annu. Rev. Neurosci.* **4**: 17-42.
9. MC COMAS, A.J., FAWCETT P.R.W., CAMPBELL, M.J. & SICA, R.E.P. 1971. Electrophysiological estimations of the number of motor units within a human muscle. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **34**: 121-131.
10. PINELLI, P. & TONALI, P. 1974. Il potenziale composto di UM. *Lab. Neuropsich.* **55**: 9-62.
11. BUCHTHAL, F., PINELLI, P. & ROSENFALCK, P. 1954. Action potential parameters in normal human muscle and their physiological determinants. *Acta Physiol. Scand.* **32**: 219-229.
12. SERRATRICE, G. 1991. Spinal monomelic amyotrophy. In: *ALS and other MNDs*. G. Serratrice (Ed.). Raven Press, New York. p. 169-173.
13. SWASH, M. & SCHWARTZ, M.S. 1984. Staging motor neuron disease: single fibre EMG studies of asymmetry, progression and compensatory reinnervation. In: *Research progress in motor neuron disease*. F.C. Rose (Ed.). Pitman, London. p. 123-140.
14. MAZZARELLO, P., PASETTI, C., PINELLI, P., POLONI, M. & VILLANI, A. 1984. Towards a definition of the neuronopathic process in ALS: the staging of EMG findings. In: *Neurophysiological contribution for assessing rehabilitation in lower and upper motorneuron diseases*. P. Pinelli, C. Pasetti & G. Mora (Eds). Liviana Editrice, Padova. p. 97-115.
15. POLONI, M., RINDI, G. & PATRINI, G. 1982. Thiamine monophosphate in patients with ALS. *Arch. Neurol.* **39**: 507-513.
16. BRADLEY, W.G. & KRASIN, E. 1982. DNA damage and repair in ALS. *Arch. Neurol.* **39**: 677-680.
17. CARSON, D.A. & RIBEIRO, J.M. 1993. Apoptosis and disease. *Lancet* **341**: 1251-1254.
18. LIPTON, S.A. & ROSENBERG, P.A. 1994. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N. Engl. J. Med.* **330**: 613-621.
19. GASIC, G.P. & HOLLMANN, M. 1992. Molecular neurobiology of glutamate receptors. *Annu. Rev. Physiol.* **54**: 507-536.